

#### ④ SM2 (chromID Salmonella Agar)

③接種した培地を  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養する。

注意：サルモネラを釣菌する際、集落の色については、硫化水素により判定する培地では黒色集落をサルモネラと推定し、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地の BGS では無色透明で培地色が赤色になったもの、CHS では藤色、ESII ではピンクそして SM2 ではピンクをサルモネラと推定する。分離用寒天培地上でのサルモネラ集落の色についてはあらかじめ検証後に検査に使用すること。

#### 4) 確認培養

① 各分離寒天培地に形成された定型的集落（各培地の上記注意を参照）を 3 個ずつ釣菌して、TSI 寒天培地と LIM 培地に接種する。

② TSI 寒天培地には白金線で高層に穿刺し、斜面に塗抹する。

③ LIM 培地は高層に穿刺する。

④ 接種した培地は  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養する。

⑤ 培養後、以下の結果が得られたものは定型的サルモネラである。

(ア) TSI 寒天培地：高層部黄変・黒変・ガス産生（高層

部における気泡または亀裂の発生) および斜面部が鮮やかに赤変したものの。

(イ) LIM 培地：培地全体が紫変（リジン陽性）、運動性陽性、上記性状確認後にインドール反応を検討する。

サルモネラはインドール反応陰性（色の変化無し）。

⑥ 定型的なサルモネラと確認された菌株は、5) に示す O 抗原の血清学的試験を行い、サルモネラであることの確定および O 抗原血清型について決定する。

⑦ サルモネラには、硫化水素非産生性、運動性の弱いもの、リジン陰性といった非定型的性状を示すものがあり、また、市販の O 血清に凝集の弱い O 群型別不能のサルモネラも知られている。①-⑥により、サルモネラの確認は可能であると考えるが、定型的性状を示さない場合は 6) に示す生化学的性状試験も検討し、サルモネラの確認をすることが望ましい。

## 5) 血清型別

サルモネラと疑われ釣菌された菌株についてサルモネラ免疫血清を用いたスライド凝集法による O 血清型別試験を TSI 寒天培地斜面上から菌を採取して実施する。

(ア) O 多価血清および O1 多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が見られた O 群血清を用いて当該菌の O 群を決定する。

(イ) サルモネラの定型的な生化学的性状を示したにもかかわらず、いずれの血清にも凝集が認められないときは O 群型別不能とする。

## 6) 生化学的性状

① 非定型的サルモネラが疑われるときは (ア) ~ (ウ) に示した生化学的性状を実施する。同定キットの使用も可。

(ア) オキシダーゼ試験：チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙に菌を塗布して1分間以内に深青色になれば陽性とする。

(イ) クエン酸：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。

(ウ) VP:VP 半流動培地に菌を穿刺し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養後、VP 用試薬 A, B を滴下する。陽性の時は数分後に試薬が赤色となる。1 時間後も赤色となら

なければ陰性とする。

注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性である。

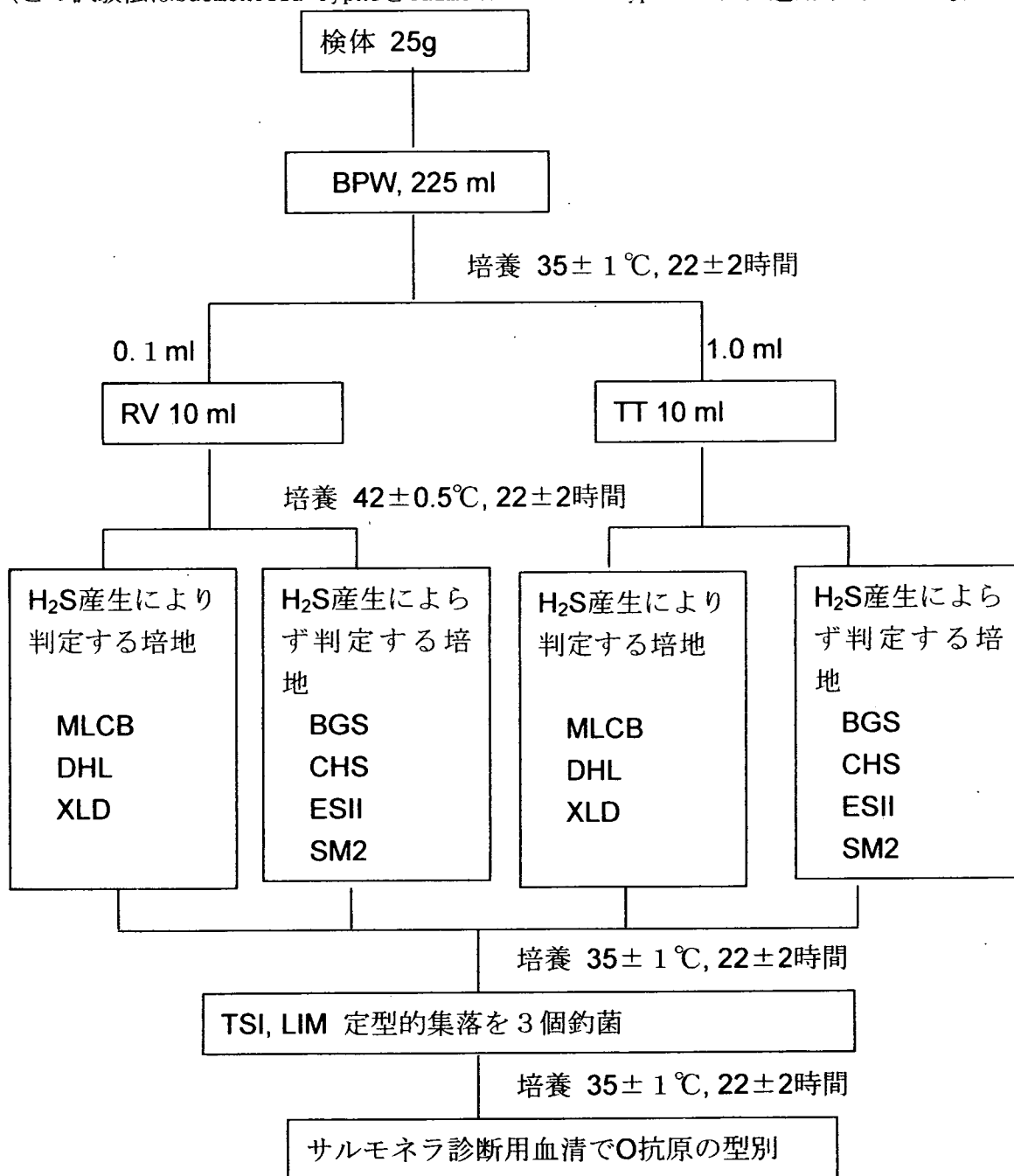
## 7) 記載

- ① サルモネラ陽性の時はO群またはO群型別不能まで記載する。
- ② 非定型的サルモネラの時も同様にO群まで記載するとともに、どの性状が異なっていたかも記入する。

## 5. フローチャート

### サルモネラ試験法

(この試験法は *Salmonella Typhi* と *Salmonella Paratyphi A* には適用不可である。)



## 6. 培地組成 (参考例) および作製方法

### ④ 緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water: BPW)

組成 : 1,000 ml あたり

ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
リン酸水素二ナトリウム (12水和物)	9.0 g
精製水	1,000 ml

\*オートクレーブ滅菌 121°C, 15 分間, pH 7.2±0.2

### ⑤ ラパポートーバシリアデイス液体培地 (Rappaport-Vassiliadis: RV)

組成 : 1,000 ml あたり

ソイペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸二水素カリウム (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.6 g
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 ml

\* オートクレーブ 115°C, 15 分間, pH5.2±0.2

③ テトラチオネート液体培地 (Tetrathionate USA: TT)

組成 : 1,000 ml あたり

カゼインペプトン	2.5 g
肉ペプトン	2.5 g
胆汁酸塩	1.0 g
炭酸カルシウム	10.0 g
チオ硫酸ナトリウム	30.0 g
精製水	1,000 ml

\* 煮沸するまで混和加熱する。この液体培地は 4°C で数週間保存可能である。この溶液を 45°C 以下に冷却後、1,000 ml に対して下記に示すヨウ素溶液 20ml を添加した後、混和する。よく混和しながら、10ml ずつ滅菌した試験管に分注する。ヨウ素溶液を添加した後は直ちに使用する。

ヨウ素溶液組成

ヨウ素	6.0 g
ヨウ化カリウム	5.0 g

精製水 20.0 ml

硫化水素産生により判定する分離寒天平板培地

④MLCB

組成：1,000 ml あたり

酵母エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
ハートエキス末	2.0 g
塩化ナトリウム	4.0 g
マンニット	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	4.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
クリスタルバイオレット	0.01 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH 6.8±

\* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。



#### ④ DHL

組成：1,000 ml あたり

肉エキス	3.0 g
ペプトン	20.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	2.3 g
クエン酸ナトリウム	1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
中性紅	0.03 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH 7.4±

\* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

#### ⑥ XLD

組成：1,000 ml あたり

酵母エキス	3.0 g
L-リジン・HCl	5.0 g

キシロース	3.75 g
乳糖	7.5 g
白糖	7.5 g
デスオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.8 g
フェノールレッド	0.08 g
寒天	12.5 g
精製水	1,000 ml

pH 7.4 ±0.2

\* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

硫化水素産生によらずサルモネラ判定する分離寒天平板培地

⑤ BGS

BGA (ブリリアントグリーン寒天培地)

組成：1,000 ml あたり

プロテオース	ペプトン	10.0 g
酵母エキス		3.0 g

乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
フェノールレッド	0.08 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 ml

pH 6.9 ±0.2

\* 上記 BGA をオートクレーブ滅菌 121℃, 15 分間後、液温を約 70℃に下げ、その温度に保って、下記のスルファピリジン溶液を添加し、混和する。培地の温度が 60℃以下の場合では、結晶が析出するので注意する。混和後、溶液温度を 60℃前後に冷却し、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

#### スルファピリジン溶液の作製方法

ジメチルホルムアミド 2ml にスルファピリジン 1 g を加えて溶解する。

#### ⑥CHS (クロモアガーサルモネラ)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
塩化ナトリウムおよび塩類	8.0 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

\*加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

⑦ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	1.5 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デスオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
マンニット	15.0 g
中性紅	0.03 g
合成酵素基質	0.45 g

ノボビオシン 0.02 g

寒天 15.0 g

pH 7.4±0.2

\*オートクレーブ滅菌 121℃, 15 分間

⑧SM2 (chromID Salmonella Agar)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン 6.25 g

トリス 0.16 g

乳糖 6.0 g

胆汁酸塩 1.5 g

発色基質混合物 0.03 g

塩化ナトリウム 5.0 g

選択剤混合物 0.03 g

寒天 14.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.3

\* 組成は上記の通りですが、生培地以外では販売していない。

⑨TSI、LIM、インドール試薬や生化学的性状試験に使用する試

薬についてはサルモネラ確認にのみ用いるものではないので、製品

情報に従って作製し、用いること。

### III 研究成果に刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表 (H17-19年度)

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Michiko Miyahara	Simultaneous enrichment Detection Method for Four Types of Pathogenic Bacteria in Food	Biocontrol Science	10	91-96	2005
Kitai, S., OShimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T. and Kitagawa, H.	Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from retail raw chicken meat in Japan	J. Vet. Med. Sci.	67 (1)	107-110	2005
Kitai, S., OShimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. and Inamoto, T.	Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus in retail raw chicken meat throughout Japan	J. Vet. Med. Sci.	67 (3)	269-274	2005
Fukuda S, Tatsumi H, Oigimi S, Yamamoto S.	Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken meat samples	Letters in Applied Microbiology	41	379-384	2005
Terai S, Yamasaki M, Oigimi S, Amano F.	Expression of SEp22, a pathogenicity - related protein of Salmonella Dps, in Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from the poultry farms in Japan	Bioscience and Microflora	24	113-118	2005
Asakura H, Oigimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S.	Role of in vivo passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7: Cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses	FEMS Microbiology Letters	253	243-249	2005
T. HASEGAWA, Y. YOSHIDA, J. KOSUGE, T. HAGA, Y. GOTO, T. SHINJO, K. UCHIDA, R. YAMAGUCHI, S. TAKEYAMA, O.K. TAKATORI	Subcutaneous granuloma associated with Macrophomina species infection in a cat	The Veterinary Record	156	23-24	2005
小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木 浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖	東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオ検出と分離菌株の諸性状	日食微誌	22	138-147	2005
宮原美知子, 小沼博隆	食品中赤痢菌の新検査法検出感度及び冷凍保存での生残性	防菌防黴誌	34	263-266	2006
中 峰松, 清水 晃, 河野潤一, 五十君静信	市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状	日食微誌	23 (4)	217-222	2006



清水 晃、松村浩介、藤尾公輔、河野潤一、北井 智、五十君静信	綿棒を用いた拭き取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状	日食微誌	23 (4)	242-246	2006
Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F.	An anti-Salmonella antibody prevents the Salmonella enterica serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella	Bioscience & Microflora	25 (3)	117-119	2006
Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S.	The sigma factor, RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in <i>Listeria monocytogenes</i>	FEMS Microbiol Lett.	263(1)	54-60	2006
Hiroshi Asakura, Akiko Ishiwa, Eiji Arakawa, Sou-ichi Makino, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto, and Shizunobu Igimi.	Gene Expression profile of <i>Vibrio cholerae</i> in the cold stress-induced viable but non-culturable state	Environmental Microbiology	9	869-879	2007
尾畑浩魅、下島優香子、小西典子、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、諸角聖、福山正文	腸炎ビブリオ食中毒事例におけるPCR法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離	感染症学雑誌	4	383-390	2006
宮原美知子	冷凍保存食品中の病原細菌の検出	防菌防黴誌	34	569-575	2006
宮原美知子、田口真澄、久米田裕子、神吉政史、郡司明彦、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重、木股裕子、塚本定三	食品からのサルモネラ新検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのサルモネラ検出	日本食品微生物学会誌	投稿中		
宮原美知子、荒川英二	食品からの腸炎ビブリオ迅速検出法の検討	防菌防黴誌	投稿中		
Masashi Kanki, Junko Sakata, Masumi Taguchi, Yuko Kumeda, Masanori Ishibashi, Takao Kawai, Kentaro Kawatsu, Wataru Yamasaki, Kiyoshi Inoue, and Michiko Miyahara	Performance of PCR-based detection of <i>Salmonella enterica</i> in poultry meat at the broth pre-enrichment step.	<i>J. Food Protect.</i>	投稿中		
宮原美知子、宮原誠	塩漬け野菜保存での腸管出血性大腸菌O157の生残性	防菌防黴誌	35, No.12	779-783	2007
塚本定三、宮原美知子	食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 サルモネラ	防菌防黴誌	35, No.8	527-535	2007
宮原美知子	サルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの食品における標準検査法の検討	日食微誌	25, No. 1		2008
藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信	市販食肉、健康人、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性	日食微誌	24 (2)	100-106	2007
清水 晃、市場智子、河野潤一、五十君静信	調理済み食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態	食衛誌	48 (5)	J341-344	2007