

## 1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理した試料を、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18 時間培養後、上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18 時間培養する。出現した培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定する。

なお、市販のアルカリペプトン水に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

## 2. 同定

腸炎ビブリオと推定される集落については普通寒天斜面、TSI 寒天、LIM 培地に接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、TSI 寒天および LIM 培地の性状が表 1 に一致した場合は、更に耐塩性試験、VP 試験およびオキシダーゼ試験を行う。表 1 に示した性状と一致したものを腸炎ビブリオと同定する。

### ① 普通寒天斜面培地

普通寒天斜面培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養する。

#### 普通寒天斜面培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	5g	塩化ナトリウム	20g
ペプトン	10g	寒天	15g
		pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の普通寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

### ② TSI 寒天による試験

TSI 寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、斜面部の黄変により乳糖及び白糖の分解性を、高層部の黄変によりブドウ糖の分解性を、高層部の黒変により硫化水素の産生性を、高層部の気泡又は亀裂によりガス産生性を確認する。

#### TSI 寒天培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	3g	クエン酸鉄アンモニウム	0.2g
酵母エキス	3g	チオ硫酸ナトリウム	0.2g
ペプトン	20g	フェノールレッド	24mg
乳糖	10g	寒天	12g
白糖	10g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	1g		
塩化ナトリウム	<u>20g</u>	pH	7.3

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の TSI 寒天に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

#### ③ LIM 培地による試験

LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を高層部に穿刺し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、培地の色が濃い紫色になったものをリジン陽性とする。また、高層部に菌が発育し混濁の認められたものを、運動性陽性とする。さらに、インドール試薬を加えて 5 分以内に赤色したものを陽性とする。

#### LIM 培地 (2%NaCl 加)

ペプトン	10g	塩化ナトリウム	<u>20g</u>
酵母エキス	3g	ブロムクレゾールブルー	20mg
ブドウ糖	1g	寒天	3g
L-リジン塩酸塩	10g	精製水	1,000ml
L-トリプトファン	0.5g	pH	6.7

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、高層培地とする。

なお、市販の LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

インドール試薬には、Kovac 法と Ehrlich 法があるが、どちらを使用しても差し支えない。Kovac 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 5g を  $50^{\circ}\text{C}$ の水浴中でアミルアルコール 75ml に溶かし、冷やしてから濃塩酸 25ml を加えて作り、遮光して  $4^{\circ}\text{C}$ に保存する。Ehrlich 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1g をエタノール 95ml に溶かし、これに濃塩酸 20ml を加えて作る。

#### ④ 耐塩性試験

Nutrient Broth (Difco, Merck, BBL: 肉エキス 0.3%、ペプトン 0.5%) 又は Lab-Lemco Broth (Oxoid) に塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および 8%加えたものに、腸炎ビブリオと

推定される菌を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18時間培養し、明瞭な増殖による培地の濁りを確認する。

また、上記 Broth 以外にペプトン水又はトリプトン水 (pH7.2) に、塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および 8%加えたものを使用しても差し支えないが、使用にあたっては腸炎ビブリオ標準菌株を用い、0%で発育しないこと、8%で発育することを確認した後、使用すること。

なお、本試験に際して接種する菌は、普通寒天培地の菌を用い、接種菌量は希釈により濁りが目に見えない程度の少菌量を接種すること。

#### ⑤ Voges-Proskauer (VP) 試験

VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18~24時間培養後、その上層部に 6%  $\alpha$ -ナフトール・アルコール液 0.2ml 及び 0.3%クレアチン加 40%水酸化カリウム水溶液 0.1ml を加え、1時間以内に赤色あるいは深紅色となったものを陽性とする。

##### VP 半流動培地 (2%NaCl 加)

酵母エキス	1g	塩化ナトリウム	<u>20g</u>
カゼインペプトン	7g	寒天	3g
ソイペプトン	5g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	10g	pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧蒸気滅菌を行う。

なお、市販の VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

#### ⑥ チトクローム・オキシダーゼ試験

1 w/v %テトラメチル *p*-フェニルジアミン蒸留水液を染みこませたろ紙をシャーレ内に置き、ろ紙に白金耳 (白金製) で普通寒天培地上の菌を塗布する。10秒以内に紫色に変色すれば陽性である。

なお、市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙を使用してもよい。市販の試験用ろ紙に精製水を数滴滴下し、ろ紙全体を湿らせた後、普通寒天培地上の菌を白金耳で塗布する。

表1 腸炎ビブリオの性状

T S I寒天				L I M培地			発 育		V P	オキシダーゼ
斜面	高層	硫化水素	ガス	リジン	インドール	運動性	O %	8 %		
赤	黄	-	-	+	+	+	-	+	-	+

## 腸炎ビブリオ検査方法・定性法

