サルモネラ属菌標準試験法

NIHSJ-01-ST4 (090218)

(090623 一部修正)

(091014 一部修正 37℃対応)

サルモネラ試験法

はじめに

本サルモネラ試験法は、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”（http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html で情報公開中）が作成したサルモネラ属菌標準試験法を基に作成された。この委員会では、国内の食品からの微生物に関する標準試験法に関する議論を行い、今後統一した方向性で、食品における微生物試験法を整理することを目的に試験法の検討を進めてきた。その方向性とは、国際的な標準法である ISO 法との互換性を重視し、科学的根拠に基づいた試験法の妥当性確認を行いながら標準となる試験法を策定している。ISO 法では、従来国内で行われてきた試験法と基本的な考え方や用いる培地などに異なる部分があるが、委員会では ISO 法に準じるという統一した方向性で試験法策定を進めている。今回採用された培養温度 37℃は、この方向性の下に採用されている。

一方、従来の国内の試験法は、培養温度を 35℃としているものが多いため、次のサルモネラの ISO 法の改正までは、移行期として 35℃での培養で行われた試験結果も、同等の試験結果として扱うものとする。

1. 試験法の概要

試験試料 25 g をストマッキング袋等に無菌的にとりわけ、BPW 225 ml を加え、ストマッカーなどで均質化し、培養する。その培養液の一部を RV 培地と TT 培地で選択増菌培養後、2 種類の分離寒天培地（硫化水素産生性で検出する培地と硫化水素産生性に関係なくサルモネラを検出する培地、それぞれ 1 種類）に塗抹培養し、集落の産生を検討する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI 寒天培地および LIM 培地に接種し、生化学的性状の確認を行う。さらに、抗 O 血清による凝集反応により O 抗原の血清型別を実施してサルモネラ属菌と確定する。

2. 使用器具、装置

① 滅菌ハサミ

② 滅菌ピンセット

③ 滅菌装置

④ ストマッカー

⑤ ストマッキング袋

⑥ 三角フラスコ

⑦ 自動秤量分注装置または秤量器

⑧ pH 計

⑨ 滅菌ピペットまたはマイクロピペットと滅菌チップ

⑩ メスシリンダー

⑪ 小試験管

⑫ 中試験管

⑬ 試験管立て

⑭ 白金耳

⑮ 高圧蒸気滅菌器　（滅菌のインジケーター必要）

⑯ 乾熱滅菌器　（滅菌のインジケーター）

⑰ 恒温槽または恒温水槽　(37±1℃と 42.0±0.5℃の制御)

⑱ 滅菌シャーレ

3.　培地、試薬および抗血清

① 前増菌用培地緩衝ペプトン水（BPW）：加温溶解後、121℃で 15 分間滅菌する。

② 選択増菌用培地

Rappaport-Vassiliadis (RV)培地：加温溶解後、10ml ずつ中試験管に分注し、115℃、15分間滅菌する。作製後は冷蔵庫で数

週間保存可能。

Tetrathionate（TT）培地：沸騰まで加温混和後、40℃以下に冷却する。ヨウ素溶液20mlを培地1Lに加え、よく攪拌する。さらに攪拌しながら、10 ml ずつ滅菌中試験管に分注する。TT基礎培地は作製後冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日に使用のこと。

③ 分離寒天培地

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB、DHLと XLDから 1種類。使用説明書に従って作製。

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：BGS(ブリリアントグリーン＋スルファピリジン)、CHS(クロモアガーサルモネラ)、ES II（ESサルモネラ寒天培地II）, SM2から１種類。使用説明書に従って作製。

④ 確認用培地

TSI（Triple Sugar Iron）寒天培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層斜面とする。

LIM（Lysine Indole Motility）培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

⑤ 0群別確認血清

サルモネラ免疫血清0多価、01多価および0群血清

⑥ 生化学的性状確認培地と試薬等

シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、斜面とする。

VP半流動培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

インドール試薬

VP用試薬

チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙

ONPGディスク

4. 試験手順

1) 前増菌培養

① BPW を約 37℃となるよう温めておく。

② 試料 25g に BPW 225m l を加え、1 分間ストマッカー処理する。

③ 37±1℃、22±2 時間前増菌培養する。

2) 選択増菌培養

① RV 培地および TT 培地を約 42℃となるように温めておく。

② BPW で前培養した培養液 0.1 ml を RV 培地 10 ml に接種する。

③ BPW で前培養した培養液 1 ml を TT 培地 10 ml に接種する。

④ 接種した RV および TT 培地を 42±0.5℃、22±2 時間培養する。

3) 選択分離培養

① 培養後の RV および TT 培地をよく攪拌する。

② 1 白金耳量を、以下の（ア）硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地および（イ）硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹する。

（ア） 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地（1 種類選択）

① MLCB
② DHL
③ XLD

（イ） 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地（1 種類選択）

① BGS （ブリリアントグリーン＋スルファピリジン）

② CHS（クロモアガーサルモネラ）

③ ESII （ES サルモネラ寒天培地 II）

④ SM2 (chromID Salmonella Agar)

③接種した培地を 37±1℃、22±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試験に使用すること。

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 37±1℃、22±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の性状である。

（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。

（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の性状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 抗原群について決定する。

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。

5) O 血清群別

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 血清群別試験を 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）～（エ）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、37±1℃、22±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、37±1℃、22±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。

（エ） ONPG：ONPG ディスク 1 枚を小試験管にとり、滅菌精製水 1ml を加える。新鮮培養菌を 1 白金耳接種し、混和後 37±1℃、18-24 時間培養し、液色で判定する（早いものは 1-2 時間で判定可能）。液色が黄色となったものを陽性とする。液色が変化しないものは陰性である。

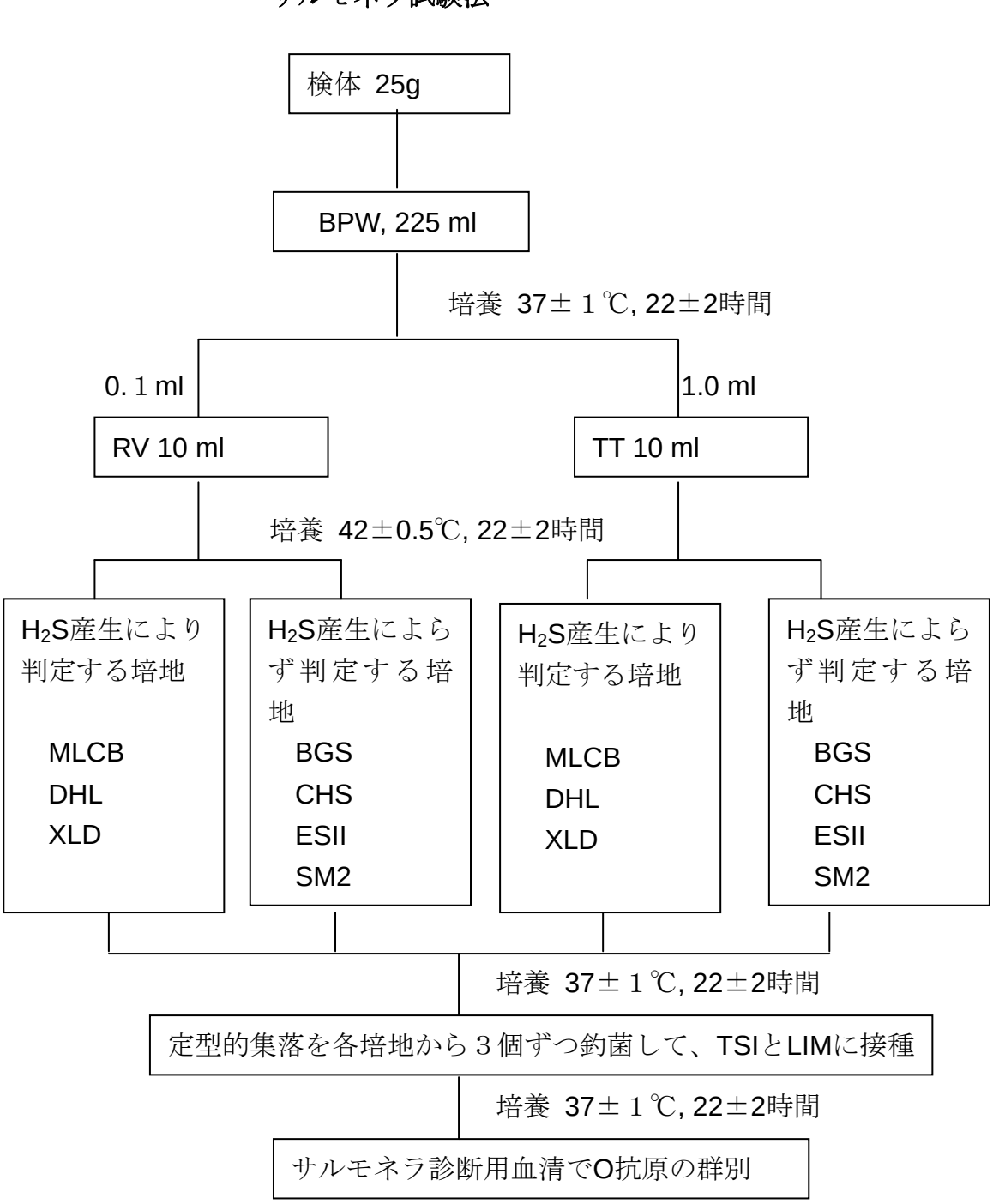
注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性、ONPG 陰性である。

7) 試験成績の結果表示

① 以上の試験によりサルモネラの検出された場合は、“陽性／25ｇ”と記載する。

② 検出されなかった場合は、“陰性／25ｇ”と記載する。

5. フローチャート


サルモネラ試験法
検体 25g
BPW, 225 ml
培養 37±１℃, 22±2時間
0.１ml
1.0 ml
RV 10 ml
TT 10 ml
培養 42±0.5℃, 22±2時間
H2S産生により判定する培地
MLCB
DHL
XLD
H2S産生によらず判定する培地
BGS
CHS
ESII
SM2
H2S産生により判定する培地
MLCB
DHL
XLD
H2S産生によらず判定する培地
BGS
CHS
ESII
SM2
培養 37±１℃, 22±2時間
定型的集落を各培地から３個ずつ釣菌して、TSIとLIMに接種
培養 37±１℃, 22±2時間
サルモネラ診断用血清でO抗原の群別

6. 培地組成（参考例）および作製方法

① 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℃, 15 分間, pH 7.2±0.2

② ラパポート－バシリアディス液体培地 (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_2PO_4)	1.6 g
塩化マグネシウム六水和物 ($MgCl_2・6H_2O$)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 ml

1. オートクレーブ 115℃, 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

pH 8.0±0.2

＊ 煮沸するまで混和加熱する。この液体培地は 4℃で数週間保存可能である。この溶液を 45℃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

④　MLCB

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±0.2

＊ 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

⑤　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±0.2

＊ 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-リジン塩酸塩	5.0 g

キシロース	3.75 g
乳糖	7.5 g
白糖	7.5 g
デ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

⑦ 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。

⑧　CHS　（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	0.8 g
その他塩類	7.2 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH　7.6±0.2

＊加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

⑨　ESII (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
リン酸水素二ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デ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 分間滅菌後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

⑩　SM2 (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。

⑪　TSI、 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。