

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法 (ステージ4：最終案)

NIHSJ-02-ST4:2012 (Draft 120731)

1. カンピロバクター・ジェジュニ/コリの定義

本試験法でいうカンピロバクター・ジェジュニ/コリは、ISO 10272-1:2006 で述べる選択分離培地上で微好気培養を行った場合、25℃では集落を形成せず、42±1℃で特徴的な集落を形成する細菌で、運動性を持ち、ISO 10272-1:2006 で述べる生化学的性状と一致するものをいう。

2. 試験の概要

本試験は、試料中にカンピロバクター・ジェジュニ/コリが存在するかを、選択増菌培地にて増菌させた後、選択分離培地上に画線塗抹し、形成されたカンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を確認することによって判定する定性試験法である。試料を25 g 秤量し、プレストン増菌培地100 mlを加えて均質化し、微好気培養により増菌した後、その1白金耳量を各1枚ずつ2種類の選択分離培地に塗抹、微好気培養し、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を形成させる。選択分離培地として、mCCDA 培地ならびに第二選択分離培地¹の2種類を用いる。選択分離培地上に形成された疑わしい集落は、純培養を行った後、生化学性状を確認し同定する。

3. 使用機器、器具

- ① 乾熱滅菌器、オートクレーブ
- ② ふらん器 (37 ±1℃、42±1℃) この場合は市販の微好気用ガスケットを利用する
または微好気培養のできるふらん器(37 ±1℃、42±1℃)を用いる。
- ③ 寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25～50℃)
- ④ pHメーター
- ⑤ 天秤
- ⑥ メスシリンダー
- ⑦ 除菌フィルター (0.22 μm)
- ⑧ ストマッカー、ストマッカー袋
- ⑨ ハサミ、ピンセット
- ⑩ 試験管、試験管立て

¹ 第二選択分離培地: その試験法において共通に用いる、培地組成が明示された選択分離培地 (ここでは mCCDA 培地を指す) に追加することによって、当該微生物の分離を補助する効果が期待できるとされる選択分離培地。試験所または試験者が選択メカニズムなどの相違を考慮し選択することができる。

- ⑪ 三角フラスコ
- ⑫ 滅菌シャーレ (直径85～100mm)
- ⑬ パスツールピペット、滅菌ピペット
- ⑭ 白金耳、白金線、ガラス棒

4. 増菌培養法

4-1 試料調製

試料25 g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー袋に入れ、100 mlのプレストン増菌培地を加え、1分間ストマッキング処理を行う。

4-2 増菌培養

微好気条件下にて $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 24～48 時間培養する。

5. 微好気培養方法

微好気条件は、下記の方法によって実現する。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。微好気条件とは、酸素 $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス $10 \pm 3\%$ 、残りはチッ素を基本とする。水素を添加する場合には、酸素 $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス $10 \pm 3\%$ 、水素10%以下、残りはチッ素とする。
- ② 市販の微好気ジャーシステム（ガスキットシステムなど）を利用する。

6. 分離培養

選択分離培地に、24 時間後と48 時間後の増菌培養液を画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて24～48 時間微好気培養する。選択分離培地は、mCCDA 培地および第二選択分離培地の2種類を用いる（第二選択分離培地の例：バツラー寒天培地、スキロー寒天培地、プレストン寒天培地、カルマリー寒天培地など）。培養液は油層を出来る限り避けて採取し、選択分離培地に塗抹する。

7. 確認試験

7-1 集落の観察および採取

選択分離培地上に発育した集落のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと思われる集落を各平板につき1個を釣菌し、鑑別同定を行う。判定の結果カンピロバクター・ジェジュニ/コリでなかった場合は、4個の集落について鑑別同定を行う。鑑別同定を行う集落は、非選択寒天培地に継代し、純培養を行う。 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間微好気培養する。

7-2 鑑別同定

- ① グラム染色などによる菌形の確認: ラセン状のグラム陰性桿菌（球状 [コッコイド] の場合もある）

② カタラーゼ試験

単離集落の1白金耳量をスライドガラス上に取り、3%過酸化水素水1滴を滴下する。30秒以内に気泡の発生が確認された場合、カタラーゼ反応陽性と判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。

③ オキシダーゼ試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて単離集落の一部を取り、オキシダーゼ試薬を含ませたろ紙または市販のオキシダーゼ試験用ろ紙の上に塗抹する。なお、ニクロム線を用いて塗抹してはならない。10秒以内にろ紙が暗色化した場合、オキシダーゼ反応陽性と判定する。また、市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を使用する場合は製造業者の使用説明書に従って判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。

判定に迷う場合は、必要に応じて以下を追加して行う。

④ ラテックス凝集テスト

市販のラテックス凝集試験用キットを使用し、製造業者の使用説明書に従って判定する。

⑤ TSI 培地などで生化学性状試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う。

⑥ 馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [+]、*C. coli* [-])

⑦ インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [+]、*C. coli* [+])

⑧ PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

8. 培地および試薬

8-1 プレストン増菌培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25℃でのpHが7.5±0.2となるよう調整する。ウマ溶血液、および選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加して使用する。

基礎組成: 1,000 mlあたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
メタ重亜硫酸ナトリウム	0.25g
硫酸第一鉄	0.25g
精製水	940 ml

* 獣肉ペプトンなど

血液添加量: 基礎培地1,000 mlあたり

馬無菌溶血液	50 ml
--------	-------

選択剤組成: 基礎培地1,000 mlあたり

ポリミキシンB	5,000 IU
リファンピシン	10 mg
トリメトプリム乳酸塩	10 mg
シクロヘキシミド	100 mg
95%エタノール	10 ml

8-2 mCCDA 培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121℃にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25℃でのpHが7.4±0.2となるよう調整する。フィルター滅菌した選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加し、寒天平板として使用する。

基礎培地組成: 1,000 mlあたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
活性炭	4 g
カゼインの酵素消化物**	3 g
デオキシコール酸ナトリウム	1 g
硫酸鉄(II) (硫酸第一鉄)	0.25 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
寒天	8 ~18 g***
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** カゼインペプトンなど

*** 寒天のゲル強度による

選択剤組成: 基礎培地1,000 mlあたり

セフォペラゾン	32 mg
アンホテリシンB	10 mg
精製水	5 ml

(参考文献 : ISO 10272-1:2006)

8-3 オキシダーゼ試薬

用事調整して使用する。市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を用いても良い。

<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド	1 g
---	-----

精製水

100 ml