

黄色ブドウ球菌試験法 最終案 091117

黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

(ステージ4：最終案) NIHSJ-03-ST4

1. 黄色ブドウ球菌の定義

本試験法でいう黄色ブドウ球菌は、選択培地上で定型的あるいは非定型的な発育集落を示すコアグラーゼ陽性のグラム陽性球菌を指す。ISO6888-1 で定義されるコアグラーゼ陽性ブドウ球菌 (coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)) に相当する。

2. 試験の概要

本試験は、試料中にどの程度の黄色ブドウ球菌が存在するかを、直接平板培地に接種した後、形成された黄色ブドウ球菌の集落数を計測することにより定量する定量試験である。試料を秤量し、その9倍量の緩衝ペプトン水 (BPW) を加えて均質化し、BPW を用い10倍階段希釈液を作製する。その0.1ml をそれぞれ2枚の選択分離平板培地に塗抹、培養し、黄色ブドウ球菌の典型的な集落を計数する。試料1gあたりの菌数を選択分離培地上の集落数と希釈値から算出する。試験法は選択分離培地としてISO6888-1にあるBaird-Parker培地を用いる。なお、わが国で従来から広く行われているマンニット食塩寒天培地による試験法は実績、信頼性の上から否定されものではなく同等に扱われるべきものとし、Baird-Parker培地の代替培地として使用することができる。疑わしい集落は、純培養を行った後、コアグラーゼ試験等で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 °C)
- ③ 寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25 ~ 50°C)
- ④ 恒温水槽 (37 ± 1 °C)
- ⑤ pH メーター
- ⑥ 天秤
- ⑦ メスシリンダー
- ⑧ 除菌フィルター (0.22 μm)
- ⑨ ストマッカー、ストマッカー袋
- ⑩ 滅菌ハサミ、ピンセット
- ⑪ 試験管 (小、中)、試験管立て
- ⑫ 三角フラスコ
- ⑬ 滅菌シャーレ (90 mm)

- ⑭ 白金耳、パスツールピペット
- ⑮ 滅菌ピペット（1、2、10 ml）
- ⑯ 滅菌コンラージ棒（スプレッダー）

4. 直接平板培養法（表 1）

4-1 検体の調製

検体 X g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマックカーに入れ、9 倍量の BPW 9X ml を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。得られた懸濁液を 10 倍乳剤として菌分離に用いる。また、10 倍乳剤の 10 倍階段希釈液（100 倍、1,000 倍）を作製する。

4-2 菌選択分離試験

4-2-1 Baird-Parker 寒天培地法

検体各希釈につき 0.1 ml ずつそれぞれ 2 枚の Baird-Parker 寒天培地に接種し、コンラージ棒を用いて塗抹する。この時シャーレ側面には触れない。15 分間乾燥させた後、平板を逆さにして培養する。37±1℃にて 48 時間培養する。途中 24 時間にて観察、定型的集落があればシャーレ裏面にマークしておく。

定型的集落とは、周囲に透明帯が存在する、黒あるいは灰色で、光沢のある隆起した円形集落を指す。集落の大きさは 24 時間培養では 1～1.5 mm、48 時間培養では 1.5～2.5 mm くらいである。培養 24 時間以降では透明帯の内側で集落の周囲直に白濁帯が観察される。

非定型的集落は透明帯や白濁帯がきわめて小さいか確認し難いもので、乳製品、エビ類、内臓の試験では注意が必要となる。

菌数測定においては総集落数 300 個以下で、定型および非定型集落数が 150 個未満（少なくとも 1 枚の平板は 15 個以上であること）の平板を対象として算出する。なお、希釈 2 段階に応じた菌数変化を示すことが信頼性は高い。

4-2-2 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地法（Baird-Parker 寒天培地の代替として使用可）

Baird-Parker 寒天培地法と同様、検体各希釈につき 0.1 ml ずつそれぞれ 2 枚の平板に接種、塗抹し、48 時間培養する。

定型的集落は、黄色で、集落周囲に卵黄反応による白濁帯がみられる光沢隆起した直径 1～2 mm の集落を指す。

非定型的集落は卵黄反応陰性のものであり、乳製品などでは注意が必要である。

4-3 確認試験

4-3-1 純培養

選択分離培地上に発育したブドウ球菌を疑う集落を 1 平板につき 2～5 個釣菌し、非選択性のトリプトケースソイ寒天培地平板培地に塗抹、純培養を行う。37±1℃で 22±2 時間培養する。

4-3-2 同定

4-3-2-1 グラム染色

常法に従う。

4-3-2-2 コアグララーゼ試験

試験管法によるコアグララーゼ試験（表 2）は、純培養した集落を釣菌し、0.2～0.3 ml のブレインハートインヒュージョンブイヨン（BHI）の入った小試験管に懸濁し、37±1℃で 22±2 時間培養する。同時に懸濁液の一部を非選択平板培地に培養し、コアグララーゼ再試験用および菌株保存用とする。

次に、BHI 培養試験管にウサギ血漿 0.5 ml を加え、かるく混和して、37±1℃の恒温水槽（ふらん器でも可）で培養、24 時間まで観察する。

培養後 1 時間間隔で 4～6 時間まで血漿凝固の有無を調べ、完全凝固（全体がゼリー状）または部分凝固（一部がゼリー状）した時点で陽性と判定する。観察時に試験管を強く振らないこと。陰性のものは再び 24 時間まで培養して判定する。疑わしい反応が出た場合は、非選択平板培地に増殖させた菌を用いて再試験を行う。

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。自家調製する場合は、黄色ブドウ球菌株を用いて、凝集を確認したものをを用いる。

Baird-Parker 寒天培地上で、定型的集落を形成し、グラム陽性球菌で、コアグララーゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌と同定する。

4-4 菌数測定

4-4-1 平板上における黄色ブドウ球菌菌数

ISO 7218:2007(E)を基に作成された NIHSJ-18 に従い計数する。[このセクションは別文書として示す]

5. 希釈液、培地、試薬

5-1 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered pepton water (BPW)

市販の BPW を使用

5-2 Baird-Parker 寒天培地

5-2-1 基礎培地

市販品を使用

5-2-2 亜テルル酸カリウム溶液 Potassium tellurite solution

本試験では市販品 3.5%溶液を使用

5-2-3 卵黄液 Egg yolk emulsion

本試験では市販品 30%溶液を使用

5-2-4 培地調製

組成

基礎培地	100 ml
亜テルル酸溶液 (3.5%)	0.3 ml
卵黄液 (30%)	5.0 ml

基礎培地を 121℃15 分間オートクレーブした後約 50℃に保温。亜テルル酸カリウム溶液、卵黄液を加え、培地の厚さが >4 mm となるように滅菌シャーレに分注する（市販の 90 mm シャーレでは約 20 ml 分注）。

4℃で 24 時間まで保存可。使用前に寒天乾燥（25～50℃、培地表面の水滴が消えるまで）。

5-3 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

5-3-1 基礎培地

本試験では市販品を使用。基礎培地量は 1,000 ml 分を 900 ml に調整する。

5-3-2 培地調製

基礎培地を 121℃15 分間オートクレーブした後、卵黄液（5-2-3）を 100 ml 加えて混合、滅菌シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。

5-4 選択増菌培地

市販のトリプトケースソイブロス（TSB）に 7.5%NaCl および 1 %ピルビン酸ナトリウムを添加して用いる。

5-5 非選択平板培地

本試験では市販のトリプトケースソイ寒天培地（TSA）を用いる。

5-6 コアグラゼ試験用ブレインハートインヒュージョンブイヨン（BHI）

市販品を用いる。

5-7 コアグラゼ試験用ウサギ血漿

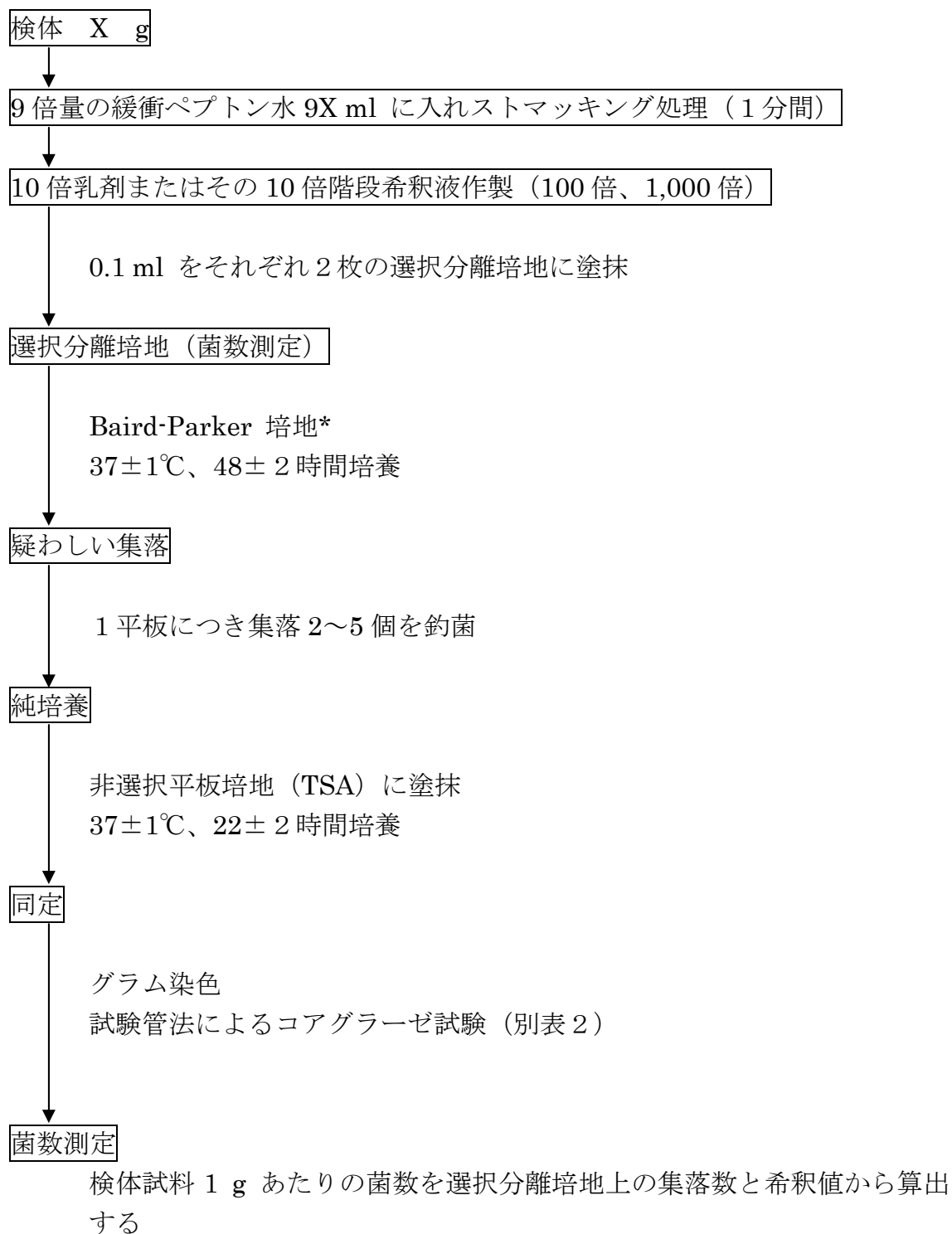
市販品を用いる。

5-8 ラテックス凝集反応試薬

市販品を用いる。

表 1

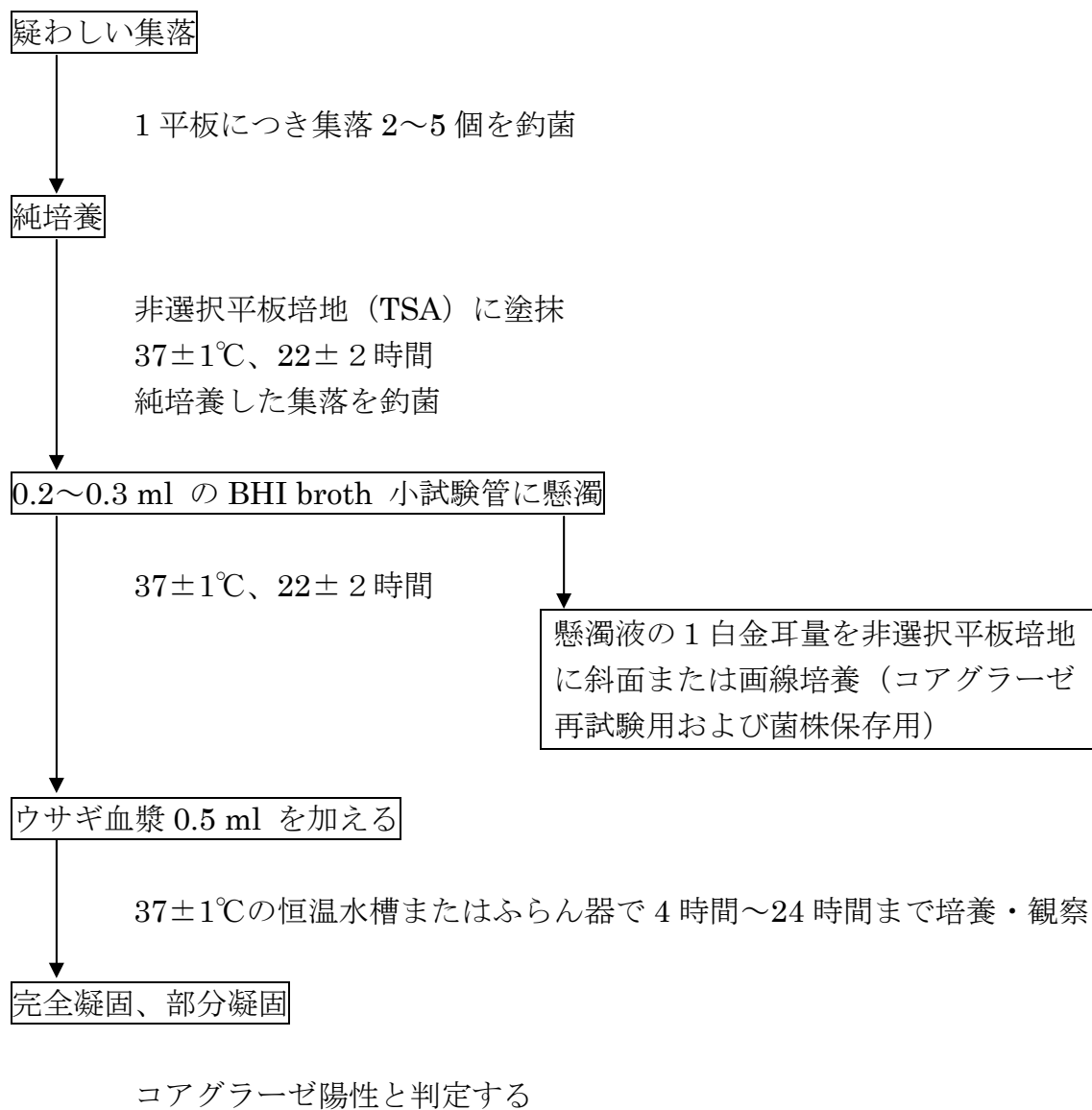
黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法



*卵黄加マンニット食塩寒天培地を代替え培地とすることができる。

表 2

試験管法によるコアグララーゼ試験



希釈液、培地および試薬の組成と調製

1. 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered pepton water (BPW) [M192]

組成

ペプトン	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄ (リン酸水素二ナトリウム)	3.5 g
KH ₂ PO ₄ (リン酸水素一カリウム)	1.5 g
精製水	1,000 ml
pH 7.2 ± 0.2	
オートクレーブ	121℃、15 分間

市販の BPW でも可

2. Baird-Parker 寒天培地

2-1 基礎培地

組成

カゼイン胨消化物 (Tryptone)	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
肉エキス	5.0 g
ピルビン酸ナトリウム	10.0 g
L-グリシン	12.0 g
塩化リチウム	5.0 g
カンテン (ゲル強度により)	12 ~ 22 g
精製水 (最終)	1,000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

市販品 Oxoid CM0275 など

2-2 亜テルル酸カリウム溶液 (1%) Potassium tellurite solution

組成

K ₂ TeO ₃	1.0 g
精製水	100 ml
溶解 (微加熱可) 後、0.22 μm フィルターにてろ過滅菌、4℃で1ヶ月まで保存可	

市販品 Oxoid SR030 (3.5%溶液) など

2-3 卵黄液（20%）Egg yolk emulsion

新鮮卵で卵殻に傷のないものを選び、洗剤でブラシ洗浄する。流水で水洗後、70%エタノールに30秒間浸漬後に風乾するか、あるいはエタノールを噴霧後に火炎滅菌する。無菌的に割卵して卵白を除去する。この場合、市販のステンレス製の黄身取り器を滅菌して使用すると容易である。卵黄を滅菌した広口びん（希釈びん等）に入れ、4倍量の無菌精製水を加え、例えば滅菌ガラス棒を用いてエマルジョンを作製する。保存する場合は4℃で、3日以内に使用する。

（注）基礎培地に卵黄液を加えて混合すると泡立つが、市販のステンレス製連続分注器を使用すれば、平板作製時に泡を消す手間が省ける。

市販品 Oxoid SR047（30%溶液）など

2-4 スルファメサジン（スルファジミジン）溶液（0.2%）

Sulfamezathine (sulfamethazine, sulfadimidine)

プロテウス *Proteus* による汚染がある時にのみ使用可。

組成

スルファメサジン	0.2 g
NaOH 0.1M	10 ml
精製水	90 ml
溶解後、0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌、4℃で1ヶ月まで保存可	

2-5 培地調製

組成

基礎培地	100 ml
亜テルル酸溶液（最終 0.01%）	1.0 ml
卵黄液	5.0 ml
（スルファメサジン溶液 2.5 ml）	

基礎培地を 121℃15 分間オートクレーブした後約 50℃に保温。亜テルル酸カリウム溶液、卵黄液を加え、滅菌シャーレに培地圧が >4 mm となるように分注する（市販の 90 mm シャーレを使う場合は約 20 ml 分注）。組成中市販品使用の時は使用書にあるとおり所定濃度にて調整する（卵黄最終 1.5%などが異なる）。

4℃で保存1日までとする（自家調製の場合は、培地性能が低下しないことを確認した期間内であればこの限りではない）。

使用前に寒天乾燥（25～50℃、培地表面の水滴が消えるまで）。

市販生培地の使用を可とする。ただし、市販の生培地については、業者の示す使用期限を越えないように冷蔵で保存する。

3. 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地(Baird-Parker 寒天培地の代替として使用可)

3-1 基礎培地

組成

肉エキス	1 g
ペプトン	10 g
NaCl	75 g
マンニット	10 g
カンテン	15 g
フェノールレッド（0.2%溶液）	12 ml
精製水（最終）	850 ml
pH 7.4 ± 0.2	

市販品 ニススイ、栄研など

3-2 培地調製

基礎培地を 121℃15 分間オートクレーブした後、卵黄液（2-3）を 150 ml 加えて混合、滅菌シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。

市販の 30%卵黄液を用いる時は基礎培地量を 900 ml とし、卵黄液 100 ml を添加する。

市販生培地の使用を可とする。

4. 選択増菌培地

市販のトリプトケースソイブロス（TSB）を基礎培地として、これに 7.5%NaClおよび1%ピルビン酸ナトリウムとなるよう添加して用いる。

5. コアグララーゼ試験用ウサギ血漿

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。あるいは新鮮ウサギ血漿を3倍量の滅菌精製水を用いて希釈したものを用いてもよいが、凝固防止剤にクエン酸塩を用いた場合は EDTA を

0.1%加えて使用する。自家調製する場合は、黄色ブドウ球菌株を用いて、凝集を確認したものをを用いる。