

サルモネラ属菌標準試験法

NIHSJ-01:2019

サルモネラ試験法

NIHSJ-01:2019

1. はじめに

本試験法で述べるサルモネラ属菌とは、以下の試験法で *Salmonella* spp. と同定されたものとする。

2. 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、緩衝ペプトン水 (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 (Rappaport-Vassiliadis) 培地と TT (Tetrathionate) 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、集落の形成を観察する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地および LIM (Lysine Indole Motility) 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。

3. 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（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ と $42.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の制御）
- ⑱ 滅菌シャーレ

4. 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)ISO 処方：加温溶解後、 121°C 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、10 mL ずつ中試験管に分注し、 115°C 、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、 45°C 以下に冷却する。ヨウ素溶液 20 mL を培地 1 L 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すること。

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する。

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する。

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°C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°Cで 15 分間滅菌し、高層に固める。

⑤ O 群別確認血清

サルモネラ免疫血清 O 多価、O1 多価および O 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°C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°C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

5. 試験手順

1) 前増菌培養

- ① BPW を約 37°C となるよう温めておく。
- ② 試料 25 g に BPW 225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理する。
- ③ 37°C、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°C 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 及び TT 培地を 42°C、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)

⑤ 接種した培地を 37°C、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°C、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°C、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°C、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 1 mL を加える。新鮮培養菌を 1 白金耳接種し、混和後 37°C、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。液色に変化しないものは陰性である。

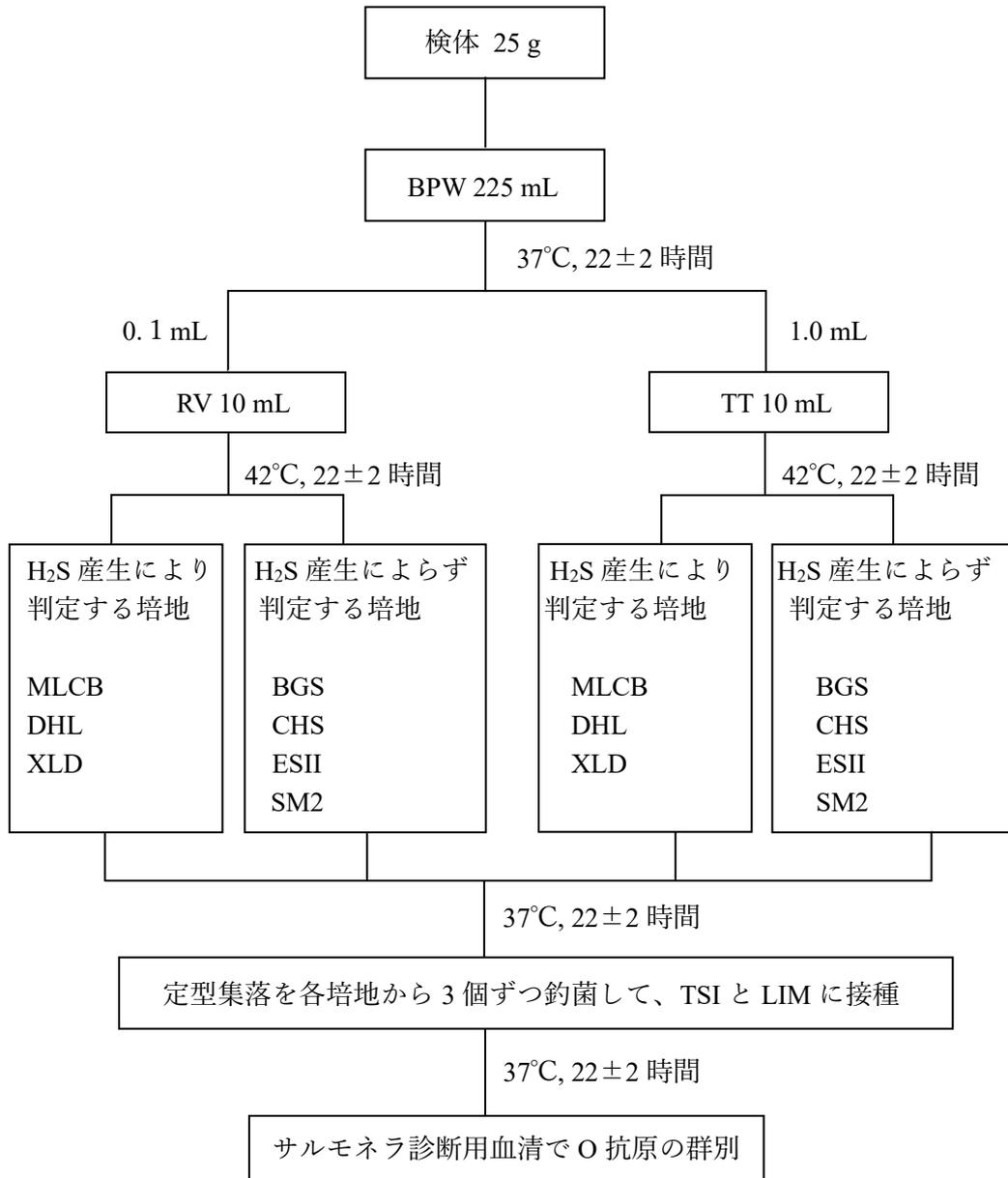
注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性、ONPG 陰性である。

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／25 g”と記載する。
- ② 検出されなかった場合は、“陰性／25 g”と記載する。

6. フローチャート

サルモネラ試験法



7. 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) ISO 処方

組成：1,000 mL あたり

カゼイン酵素分解産物	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 7.0±0.2

② ラパポーター 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 ₂ PO ₄)	1.4 g
リン酸水素二カリウム (K ₂ HPO ₄)	0.2 g
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 mL

* オートクレーブ滅菌 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
	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°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 20 mL を添加した後、混和する。よく混和しながら、10 mL 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 20 mL 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 20 mL 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 20 mL 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°C、15 分間後、液温を約 70 °C 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°C 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°C 前後に冷却し、シャーレに約 20 mL 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 2 mL 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 20 mL 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°C、15 分間滅菌後、シャーレに約 20 mL 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 ± 0.2

* 組成は上記の通りだが、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。

7. 改訂の履歴

日付	項目	内容
2009年2月18日	初版発行	
2009年6月23日	文言の一部修正	「O血清型別」を「O血清群別」に修正した
2009年10月14日	培養温度の変更	35±1°Cで培養していた箇所について、37±1°Cに変更した (ISO法への合流)
2019年2月25日	緩衝ペプトン水のpHの変更、及び文言の一部修正	<p>緩衝ペプトン水のpHを、7.2±0.2から、7.0±0.2に変更した (ISO法への合流)</p> <p>下記の文言等を修正した</p> <p>【2. はじめに】</p> <p>「集落の産生を検討」→「集落の形成を観察」</p> <p>【4. 培地、試薬および抗血清、②選択増菌用培地、Tetrathionate (TT) 培地】</p> <p>「40°C以下」→「45°C以下」</p> <p>【5. 試験手順、4)確認培養及び6. フローチャート】</p> <p>「定型的集落」→「定型集落」</p>