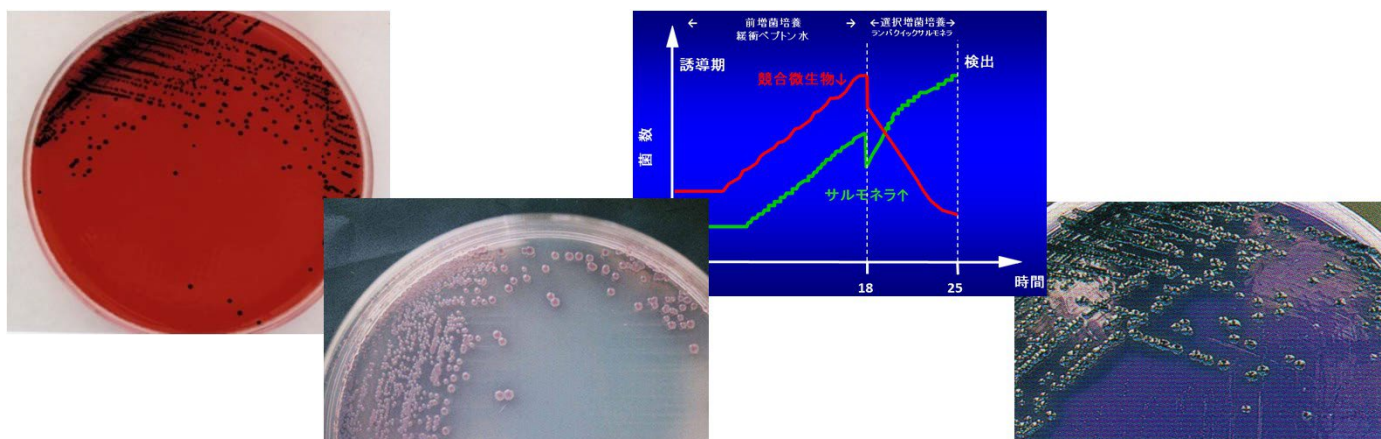


サルモネラ検査



Kanto Reagents

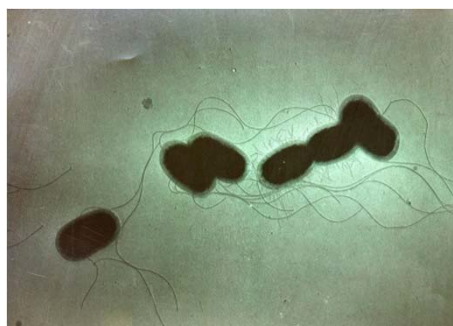
サルモネラは、重要な食中毒原因菌の一つです。関東化学では、オクソイド社製の歴史と実績のある検査試薬やクロモアガー社製の酵素基質培地という新しい原理を利用した検査試薬など、サルモネラ検査の増菌から鑑別までの様々な検査試薬をご用意しております。



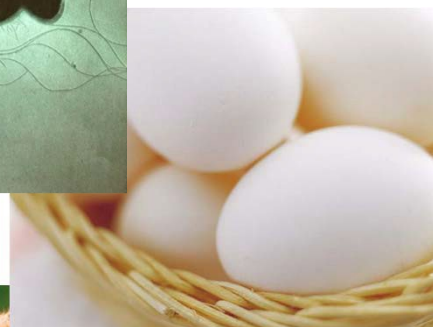
● はじめに

・*Salmonella*は、グラム陰性通性嫌気性桿菌の腸内細菌科に属する細菌で、広く爬虫類、鳥類、哺乳類に自然感染を起こす原因菌です。

・国内原因菌別患者数：1989年には2位、91年にはTOPへ、現在は3位となっています。

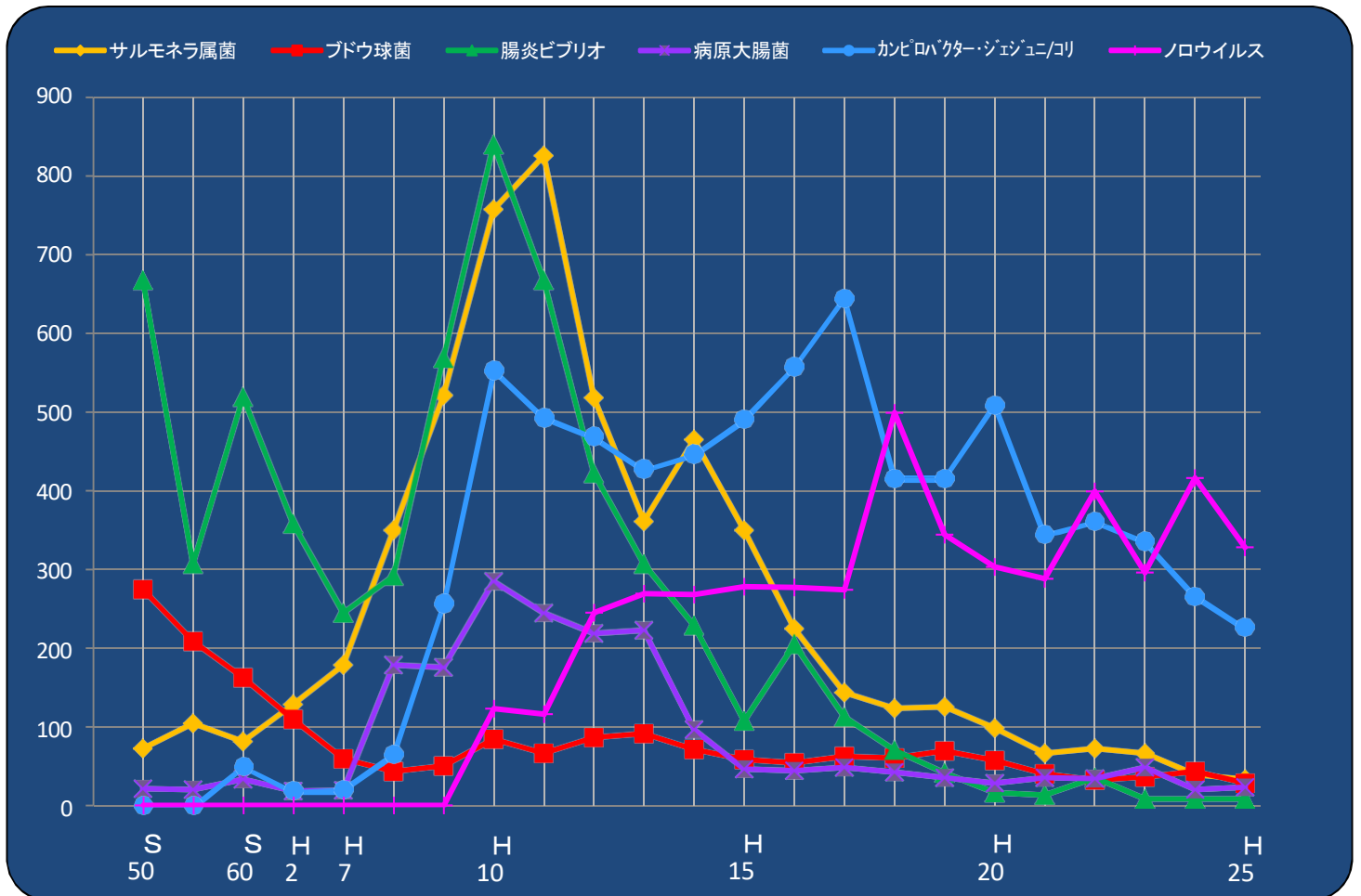


引用
伊藤 武
第8回関東食品衛生懇話会



サルモネラとは？

● 食中毒事例の変遷



H25 厚生労働省 食中毒発生事例(速報)より

● サルモネラの感染源と感染経路

- ・サルモネラの感染経路は基本的に経口による。鶏卵をはじめとする畜産物、加工畜産物、野菜、魚肉など直接、間接的に汚染された食品はすべてが感染源となる。
- ・食品以外に爬虫類等のペットを初めとした保菌動物との接触が感染源となる事がある。
- ・家畜及び家禽への伝播は主として飼料および相互感染とされている。
- ・食肉への初期感染は屠場又は食鳥処理場で起こるとされている。
- ・VBNC(Viable But Non-Culturable: 生きているけれども培養できない状況にあることを指す概念)の状態で生存していることが知られており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

サルモネラとは？

● 最少発症菌数量

従来は比較的多量の菌が侵入することが必要とされていた。



現在、実例から発症菌量予測値は $10^1 \sim 10^4$ と言われている。

小児や高齢者では成人よりもはるかに少ない菌量で発症する。特に新生児や基礎疾患のある高齢者では数個の菌でも十分な発症菌量となるといわれている。

● サルモネラの抵抗性・増殖性

本菌は通常の培地に発育可能。
寒天培地では直径1～2mmの半透明、円形集落を形成。

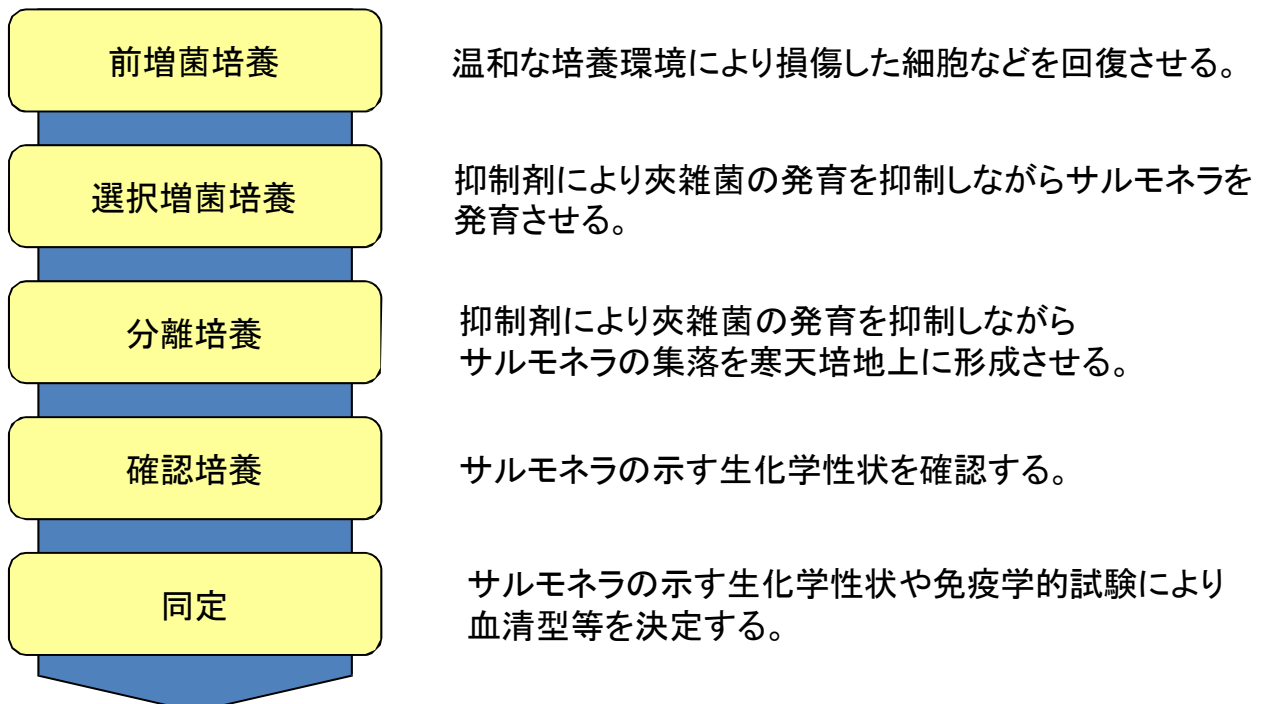
抵抗性:

胆汁酸塩、クエン酸塩、テトラチオン酸塩、マラカイトグリーン、ブリリアントグリーン、クリスタルバイオレットなどに比較的良好な抵抗性を示し、他の腸内細菌から選択できる。

増殖性:

発育温度域: $10 \sim 45^\circ\text{C}$ 、至適温度: $35 \sim 37^\circ\text{C}$
発育pH域 : $4 \sim 9$ 、至適pH域: $6.5 \sim 7.5$

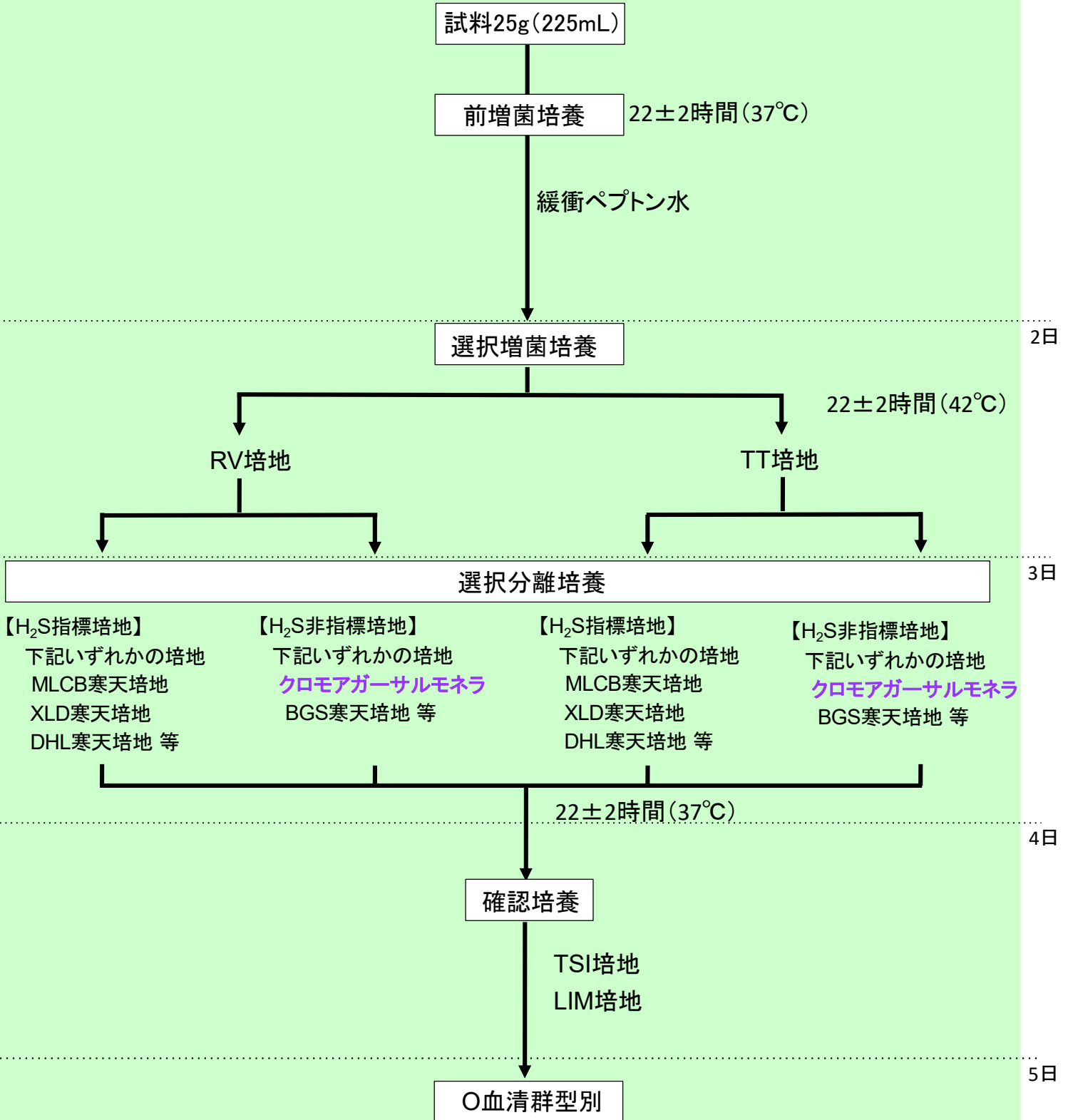
● サルモネラ検査の流れ



サルモネラの検査法

● サルモネラの検査法

公定法



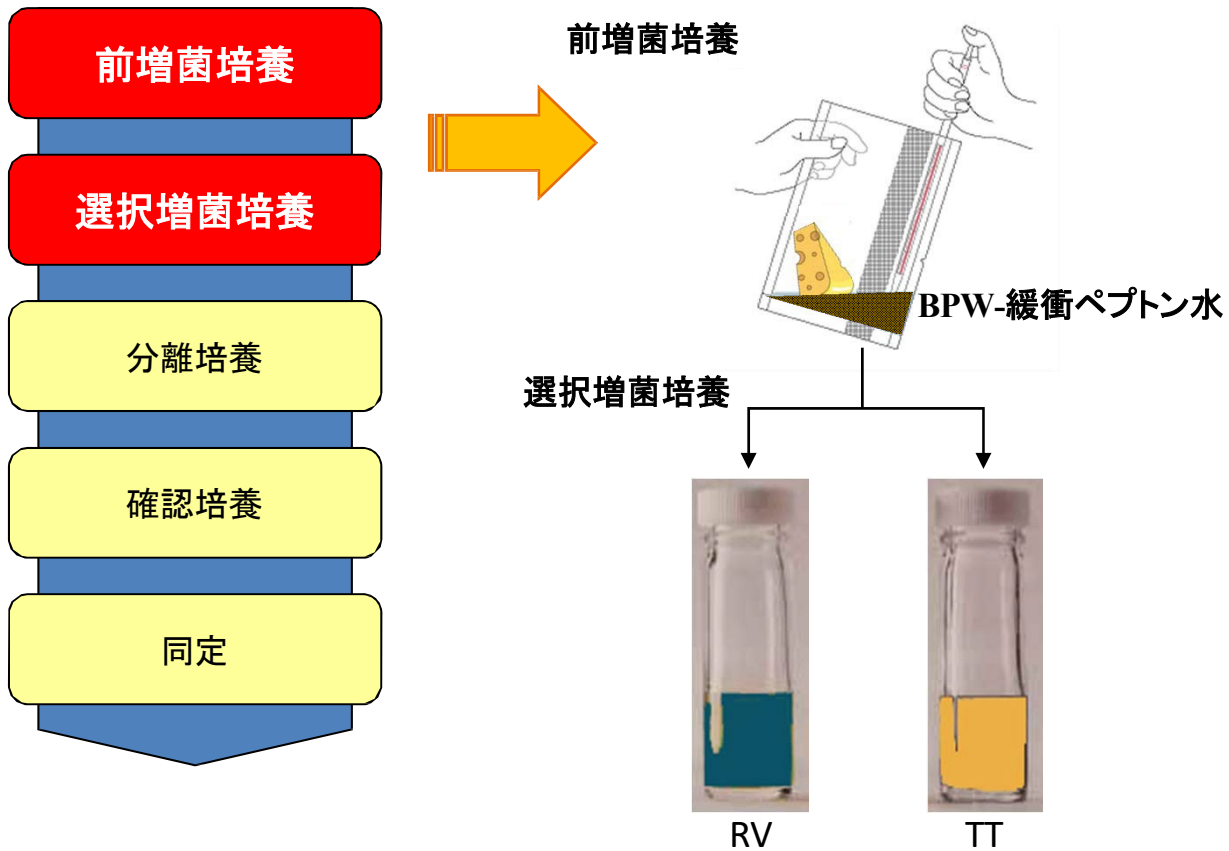
サルモネラの検査法



* SureTectについては別途案内をご用意しておりますので、弊社までお問い合わせください。

サルモネラの検査法

● サルモネラの検査法(前増菌/選択増菌培養)



● 前増菌培養

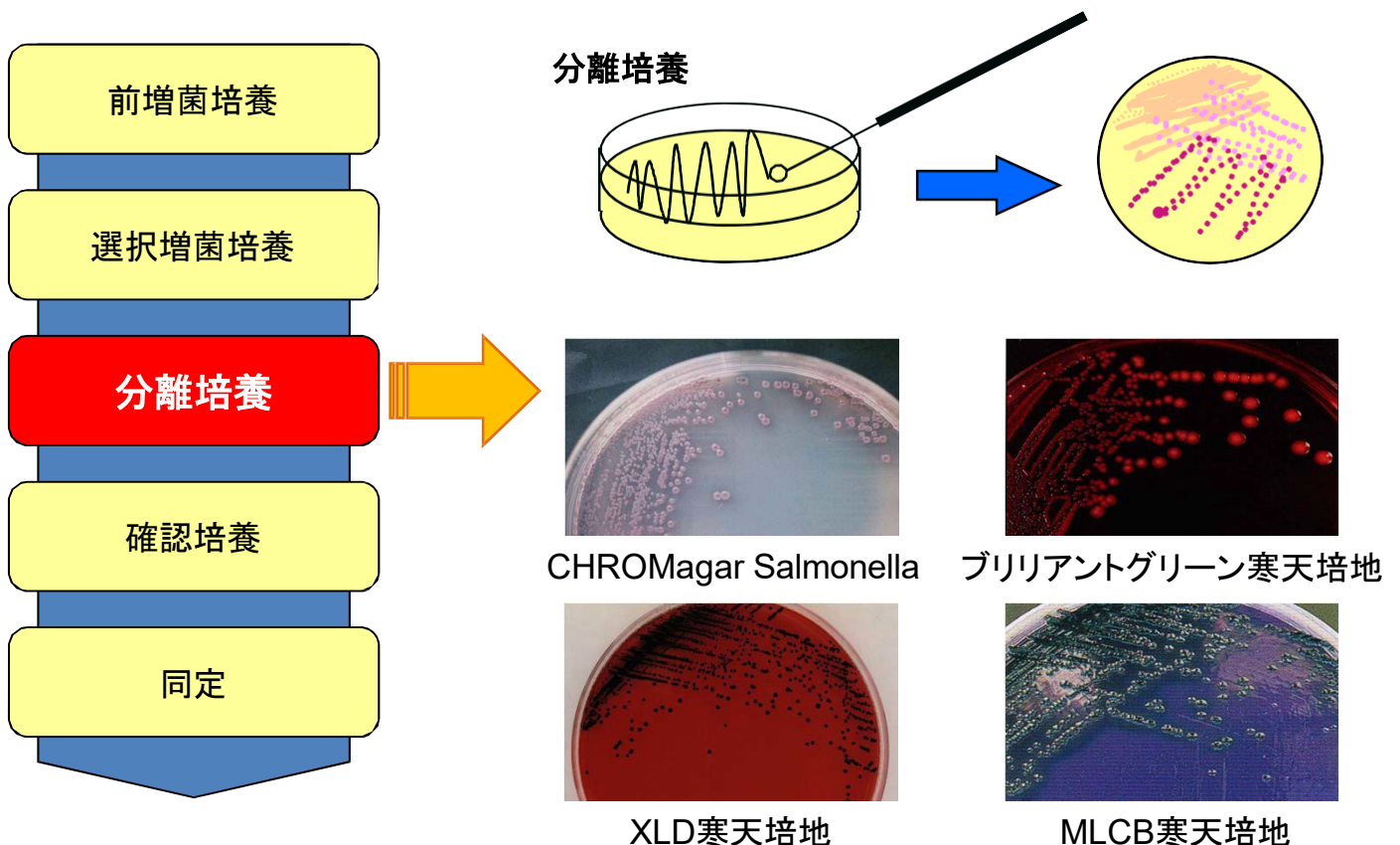
	緩衝ペプトン水(ISO処方)	緩衝ペプトン水
組成 1000ml 当たり	カゼイン酵素分解産物 10.0g 塩化ナトリウム 5.0g リン酸二水素カリウム 1.5g リン酸水素二ナトリウム(無水物) 3.5g (12水和物の場合は9.0g) pH 7.0±0.2	ペプトン 10.0g 塩化ナトリウム 5.0g リン酸二水素カリウム 1.5g リン酸水素二ナトリウム(無水物) 3.5g pH 7.2±0.2
	これまでサルモネラ検査における緩衝ペプトン水のペプトンの由来は指定されていなかったが、平成27年7月29日 食安発0729第4号「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」において、カゼイン酵素分解産物を用いる組成(ISO処方)が採用された。 また、pHについては7.2±0.2から7.0±0.2に改正された。	

サルモネラの検査法

● 選択増菌培養

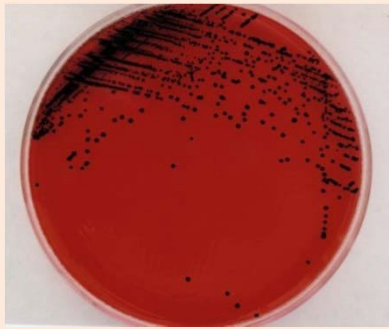
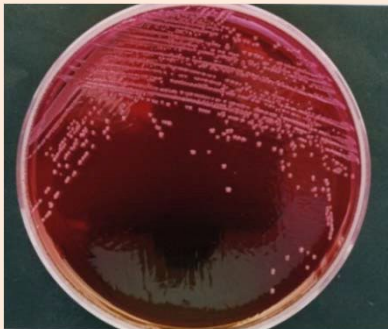
	RV(ラパポートバシリアディス液体培地)	TT(テトラチオネート液体培地)
組成 1000ml 当たり	ソイペプトン 5.0g	カゼイン酵素分解産物 2.5g
	塩化ナトリウム 8.0g	肉酵素分解産物 2.5g
	リン酸二水素カリウム 1.4g	胆汁酸塩 1.0g
	リン酸水素二カリウム 0.2g	炭酸カルシウム 10.0g
	塩化マグネシウム六水和物 40.0g	チオ硫酸ナトリウム 30.0g
	マラカイトグリーン 0.04g	pH8.0±0.2
	pH5.2±0.2	ヨウ素溶液 20ml
特徴	<p>下記サルモネラの性状を利用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・比較的高い浸透圧でも生存可 ・比較的低いpHでも生存可 ・マラカイトグリーンに比較的強い耐性を持つ。 	<ul style="list-style-type: none"> ・テトラチオン酸塩とチオ硫酸塩の相互作用によりサルモネラ以外の腸内細菌は広く抑制される。 ・ヨウ素溶液, 胆汁酸によりプロテウス属や腸内細菌以外の微生物を抑制

● サルモネラの検査法(分離培養)



サルモネラの検査法

● 選択分離培地

鑑別指標	硫化水素産生性指標培地	硫化水素非産生性指標培地
培地例	 XLD	 BGS
原理	サルモネラが産生する硫化水素が培地中の鉄イオンと反応し硫化鉄ができる。硫化鉄は黒色を呈するので、 黒色コロニー = サルモネラ としてスクリーニングする	サルモネラ以外の微生物の抑制剤や、酵素基質が含まれている。 発育, コロニーの色 = サルモネラ としてスクリーニングする
利点	分かり易い, サルモネラの特徴である硫化水素産生性が指標となる。	硫化水素非産生サルモネラを逃さない
不利点	硫化水素非産生サルモネラを見逃す。サルモネラ以外の硫化水素産生性微生物が偽陽性となる。	サルモネラ以外の微生物が発育した場合区別がつかない。

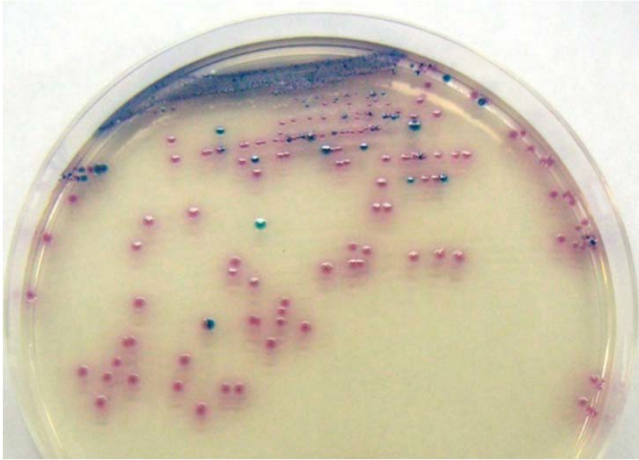
↓
クロモアガーサルモネラで解決!

● 各種硫化水素産生性指標培地

培地	DHL	MLCB	XLD
組成 1000ml 当たり	肉エキス 3.0g ペプトン 20.0g 乳糖 10.0g 白糖 10.0g デオキシコール酸Na 1.0g チオ硫酸Na 2.3g クエン酸Na 1.0g クエン酸鉄アンモニウム 1.0g 中性紅 0.03g 寒天 15.0g pH7.4±0.2	酵母エキス 5.0g ペプトン 10.0g ハートエキス末 2.0g 塩化ナトリウム 4.0g マンニト 3.0g L- リジン塩酸塩 5.0g チオ硫酸Na 4.0g クエン酸鉄アンモニウム 1.0g ブリリアントグリーン 0.0125g クリスタルバイオレッド 0.01g 寒天 15.0g pH6.8±0.2	酵母エキス 3.0g L- リジン塩酸塩 5.0g キシロース 3.75g 乳糖 7.5g 白糖 7.5g デオキシコール酸Na 1.0g 塩化ナトリウム 5.0g チオ硫酸Na 6.8g クエン酸第二鉄アンモニウム 0.8g フェノールレッド 0.08g 寒天 12.5g pH7.4±0.2
特徴	腸内細菌全体を対象とした培地。従来のデソキシコレート培地を改良した培地で、サルモネラ属やシゲラ属などの腸内細菌の分離培養に適している。夾雑菌が多い検体ではサルモネラ属菌のスクリーニングが困難。	サルモネラ属の分離用に開発された培地。ブリリアントグリーンが含まれているため、その他腸内細菌を強く抑制する。乳糖発酵に依存しないため、乳糖非発酵性サルモネラ属の検査に推奨される。	サルモネラ属・シゲラ属用分離培地。夾雑菌の著しい発育が生じて、サルモネラ属、シゲラ属の検出には影響しないため、食品中のスクリーニング検査用培地に適している。

● 硫化水素非産生性指標培地

クロモアガーサルモネラ



酵素基質培地で

微生物を色で識別する！

藤色:サルモネラ

青色:大腸菌等無

色:Proteus 等

特徴

- ・硫化水素産生、非産生に関わらずサルモネラを判定する。
- ・コロニーの色を指標として識別するので他の夾雑菌との区別も可能。

TABLE 1. Distribution of *S. enterica* serovars among stock isolates and fresh stool isolates^a

Serogroup	Serovar	No. of isolates tested	
		Stock	Fresh
A	Paratyphi A	1	
B	Typhimurium	197	7
	Derby	5	
	Brandenburg	4	
	Heidelberg	4	
	Indiana	3	1
	Saint-Paul	3	
	Paratyphi B	2	
	Agona	1	
	Bredeney	1	
C1	Virchow	10	2
	Infantis	6	1
	Montevideo	5	
	Braenderup	2	
	Isangi	2	
	Livingstone	1	
	Mbandaka	1	
	Othmarschen	1	
	Orianenburg	1	
C2	Hadar	23	2
	Goldcoast	4	
	Bovismorbificans	3	
	Blockley	1	
	Gatuni	1	
	Litchfield	1	
	Muenchen	1	
Newport	1		
C3	Emek	2	
	Kentucky	1	
D	Enteritidis	202	7
	Panama	2	
	Typhi	1	
E	Anatum	2	
	Senftenberg	2	
	Give	1	
	Munster	1	
	Oxford	1	
	Uganda	1	

^a A total of 501 stock isolates and 20 fresh stool isolates were tested.

酵素基質培地

微生物の酵素活性を利用した培地。特異性が高く、発色酵素基質の分解でコロニー自体が着色するためスクリーニングが容易です。

試験に供した**501株**全てが典型的なコロニーを形成

サルモネラ検査の迅速法

● ランバクイックサルモネラ ~選択増菌の時間を短縮します~

ラパポートバシリアディス液体培地
サルモネラが低い水分活性でも発育できる
ということを利用した培地

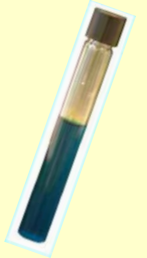
テトラチオネート液体培地
サルモネラは栄養源としてテトラチオン酸
を使用することを利用した培地



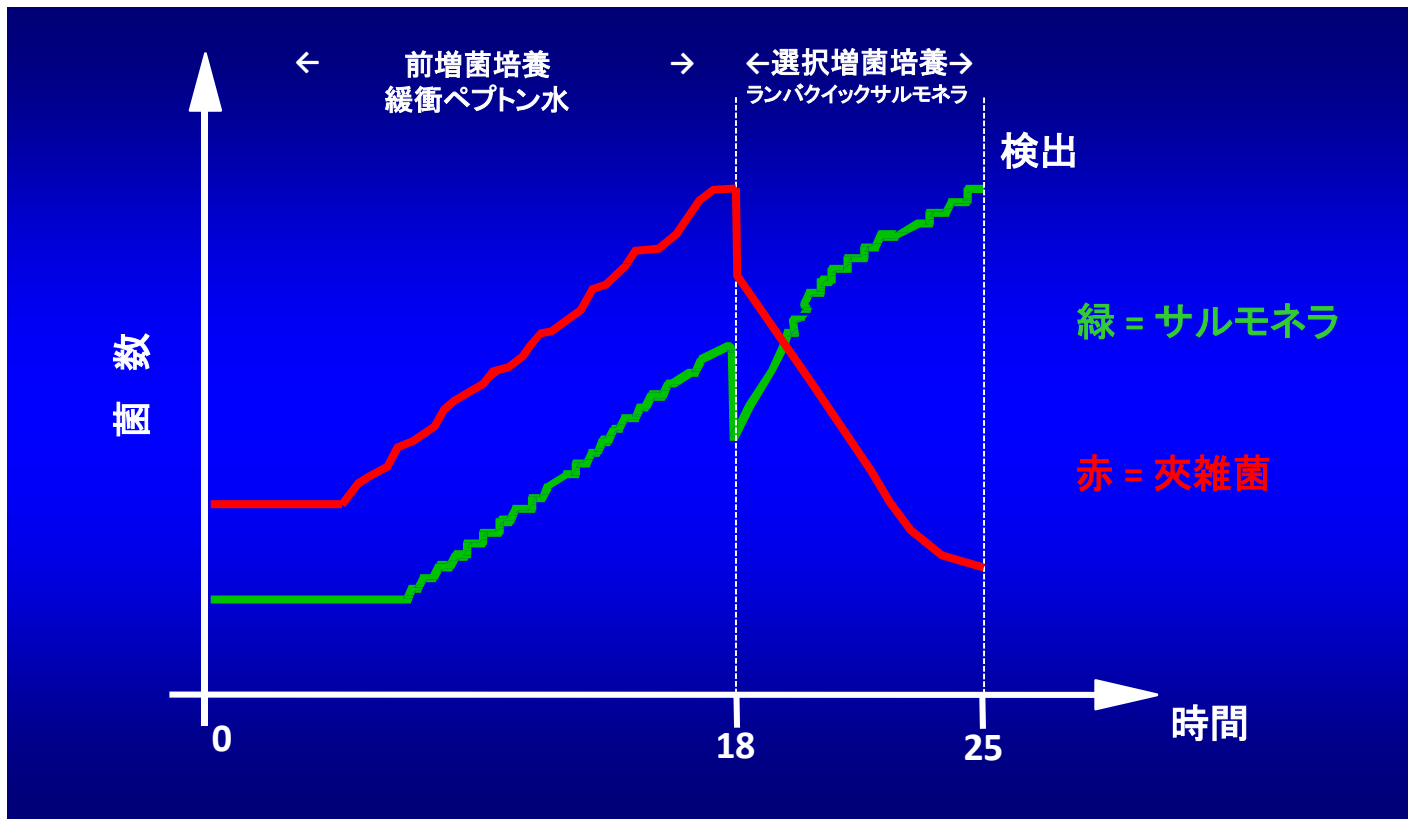
ランバクイックサルモネラ

二つの培地の性質(選択性)を兼ね備えた培地。サルモネラの増菌効率がUP

- ・ 検出感度の向上
- ・ 時間の短縮 RV・TT 20~24 時間 → ランバクイック 7時間



● ランバクイックサルモネラにおける 前増菌培養と選択増菌培養の概念図



サルモネラ検査の迅速法

● 添加回収試験成績（供試試料：冷凍鶏肉）* N=4 (S. Enteritidis 4株)

	原液濃度	10倍段階希釈系列				
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
RVS法	1.6 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	-	-
	4.9 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	+	-
	5.3 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	-	-
	6.9 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	+	-
ランバクイック法	1.6 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	-	-
	4.9 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	+	-
	5.3 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	-	-
	6.9 × 10 ⁸ CFU/mL	+	+	+	+	-

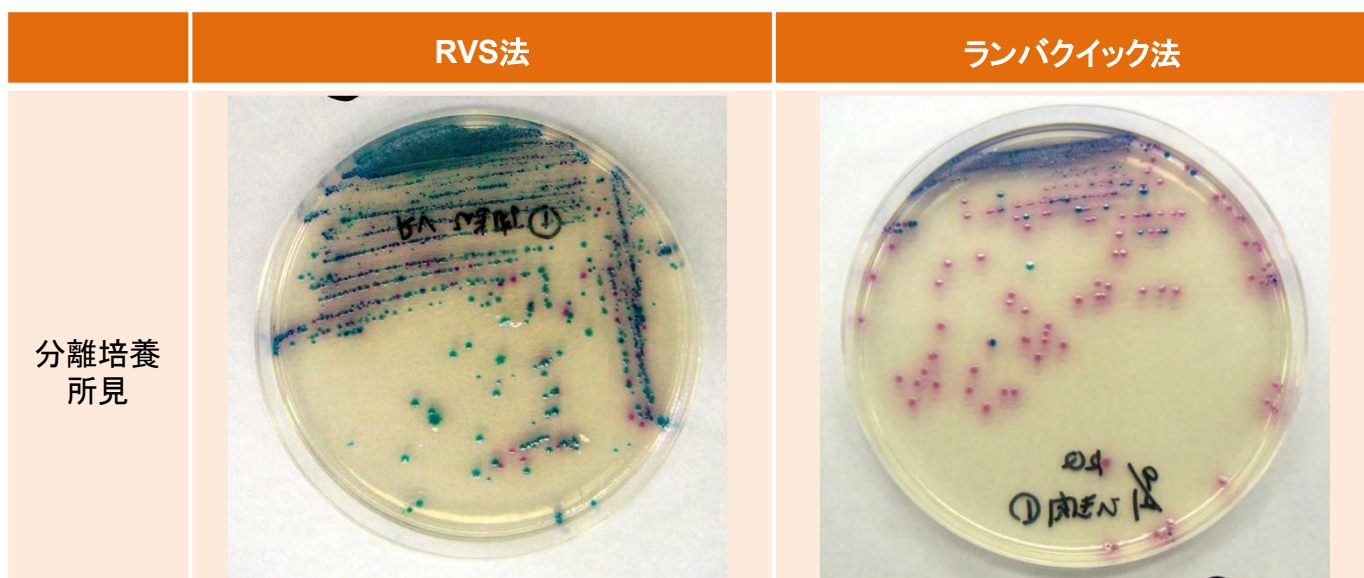
従来法(RVS法)とほぼ同等の検出感度であることが確認されている

● 日常検査ならびに市販鶏肉における比較検討試験成績*

		ランバクイック法		合計
		+	-	
RVS法	+	18	0	18
	-	19	245	264
合計		37	245	282

→37検体からはすべてサルモネラが検出された

	感度	特異度
RVS法	48.6%	100%
ランバクイック法	100%	100%



ランバクイック法の高い選択性が確認できる 藤色:サルモネラ 青色:大腸菌等 無色:Proteus等

* 引用 古川ら 日本食品微生物学会雑誌26(3),177-182,2009

関連製品一覧

用途	コード	製品名	包装
前増菌培地	710001-3	緩衝ペプトン水(ISO処方)	500g
	717724-0	緩衝ペプトン水(ISO処方)リパックシステム	300g
	717724-1	緩衝ペプトン水(ISO処方)1L用分包	1L用×40包
	717724-4	緩衝ペプトン水(ISO処方)450mL用分包	450mL用×40包
	49957-00	BPW緩衝ペプトン水(225mL)ISO処方	225mL×30袋
選択増菌培地	711669-5	ラパポート・バシリアディス(RV)ブイヨン	500g
	711669-1		100g
	711671-5	テトラチオネート液体培地(USP)	500g
	49958-42	ランバクイックサルモネラ	1L用
	20346-97	よう素溶液	20mL
選択分離培地	49958-24	クロモアガーサルモネラ	5L用
	08406-67		1L用
	72031	クロモアガーサルモネラ生培地	20枚
	72036		10枚×10
	711783-5	MLCB寒天培地	500g
	711469-5	XLD培地	500g
	72143	ランバックアガー(改良型)	5L用
711263-5	ブリリアントグリーン寒天培地	500g	
711329-5	ブリリアントグリーン寒天培地(変法)	500g	
確認用培地	711277-5	TSI寒天培地	500g
迅速確認キット	718580-6	O.B.I.S.PYR	60回
	718570-6	O.B.I.S.サルモネラ	60回
	714108-1	サルモネラテスト	100回
器材・消耗品	55000-08	滅菌ストマック袋(フィルター付)	50枚×10
	55000-09	滅菌ストマック袋	50枚×20
	96930-01	滅菌シャーレ・浅型	10枚×50
	96930-02	滅菌シャーレ・深型	10枚×50
	96930-21	滅菌スプレッター	10本×100
	96930-22	滅菌ディスポニードル	20本×50
	96930-23	滅菌ディスポループ1μL	20本×50
	96930-24	滅菌ディスポループ10μL	20本×50

- 本記載の製品は、試薬(試験、研究用として用いる化学薬品)としての用途にご利用ください。
- 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。最新情報は、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。

 関東化学株式会社

試薬事業本部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL : 03-6214-1093

HP : <https://www.kanto.co.jp>

FB-001(202502)