

# 黄色ブドウ球菌検査



黄色ブドウ球菌は、広く環境に分布している食中毒原因菌であり、食品衛生上重要な食中毒菌として位置づけられています。

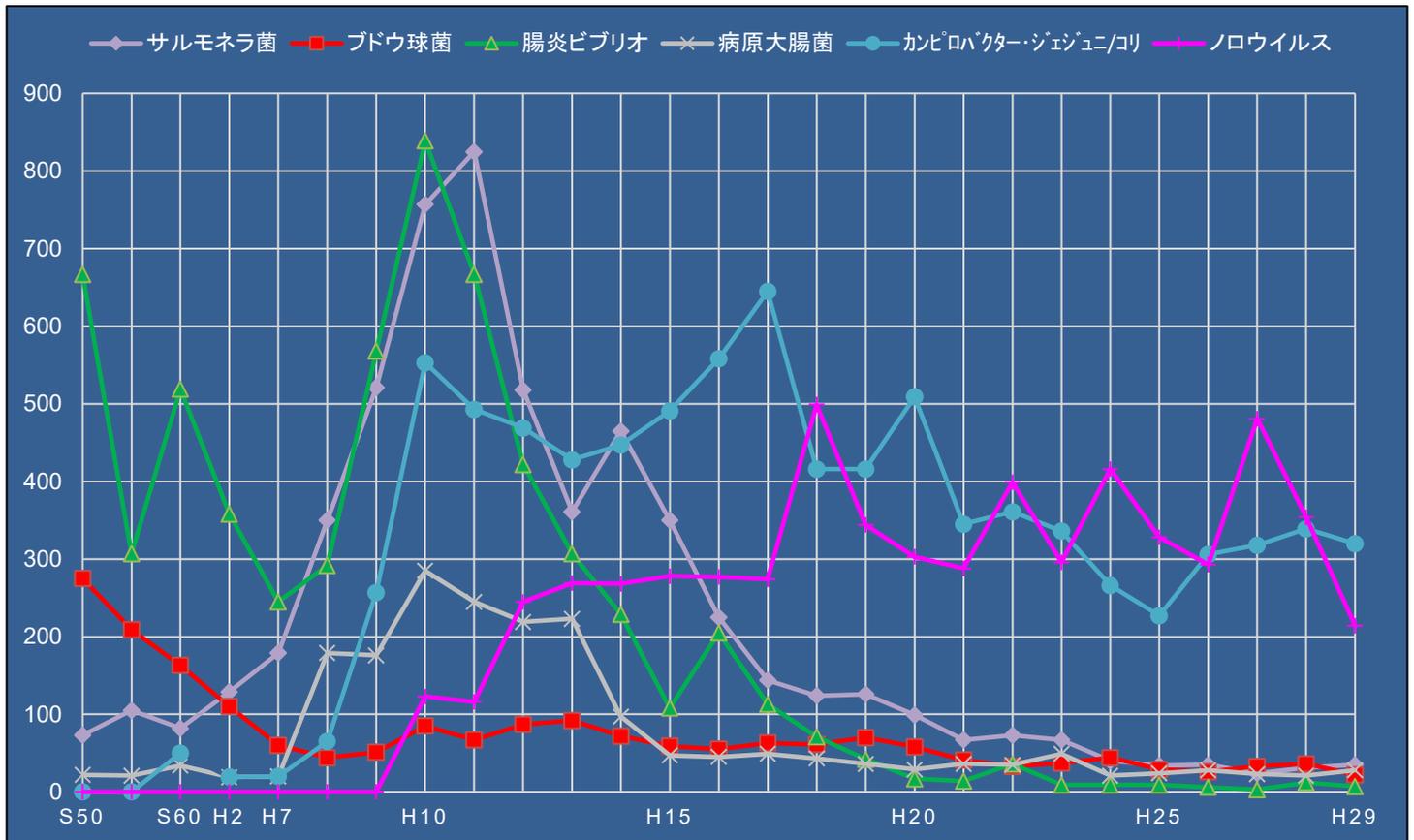
関東化学では、クロモアガー社製の酵素基質培地やオクソイド社製の歴史と実績のある検査試薬など、黄色ブドウ球菌検査の効率化、簡便化につながる様々な検査試薬を御用意しております。

## 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)

- 黄色ブドウ球菌は加熱(60℃、30分間程度以上)で死滅しますが、産生される毒は耐熱性です。
- 食品中や食品原材料、食品製造ライン・調理器具などの食品製品環境の汚染状況を定量的に検査することが重要です。



## ● 食中毒事例の変遷



H29 厚生労働省 食中毒発生事例(速報)より

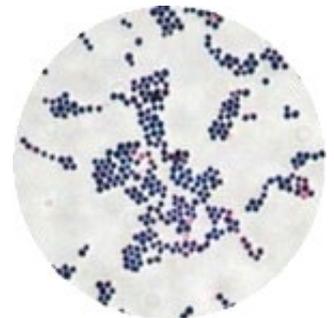
- ・ 発生件数は細菌性食中毒全体の2.2%と発生割合は少ないが大規模な食中毒を引き起こすことがあるので注意が必要

## ● 黄色ブドウ球菌の感染源と感染経路

- 黄色ブドウ球菌は自然界に広く分布し、ヒトの鼻腔や手指、毛髪、腸管、ヒトの傷口などにも存在するため、容易に感染する。
- 食品中で増殖する際、エンテロトキシンという毒素を産生する。この毒素を食品と一緒に口にすることで食中毒を引き起こす。

## ● 特徴(形状)

- ・ グラム陽性球菌 (直径約1 $\mu$ m)
- ・ 通性嫌気性菌
- ・ 不規則な配列でブドウの房状に集団を形成
- ・ 増殖速度が速く、ほとんどの培地上で発育
- ・ コロニーは正円・円滑で盛り上がり、光沢がある
- ・ 黄色の色素を産生し、黄色のコロニーとして観察される



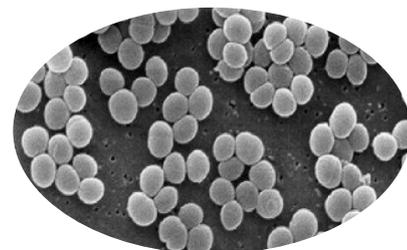
# 黄色ブドウ球菌とは

## ● 特徴（生化学的）

- ・細胞壁表面にプロテインAを有する
- ・DNA分解酵素(DNase)や血漿凝固因子(コアグララーゼ)を産生
- ・食中毒の起因物質である腸管毒素(エンテロトキシン)を菌体外に産生

## ● エンテロトキシンについて

- 食品1g中に10万個以上の菌が存在するとエンテロトキシンによる食中毒を発症する。
- 胃液中の酸、消化酵素に耐性がある。
- 毒素は耐熱性があり、100℃、20分間の加熱によっても不活性化されない。→調理によって不活性化しない。



## ● 黄色ブドウ球菌の抵抗性・増殖性

### 抵抗性

- ・食塩濃度7～10%存在下で増殖可能（耐塩性）
- ・乾燥状態でも長時間生存

### 増殖性

- 発育温度域： 6～48℃ 至適温度： 35～41℃  
発育pH域： 4～10 至適pH域： 6～7

## ● 通知

「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」(平成27年7月)

### 国際整合性を確保するために

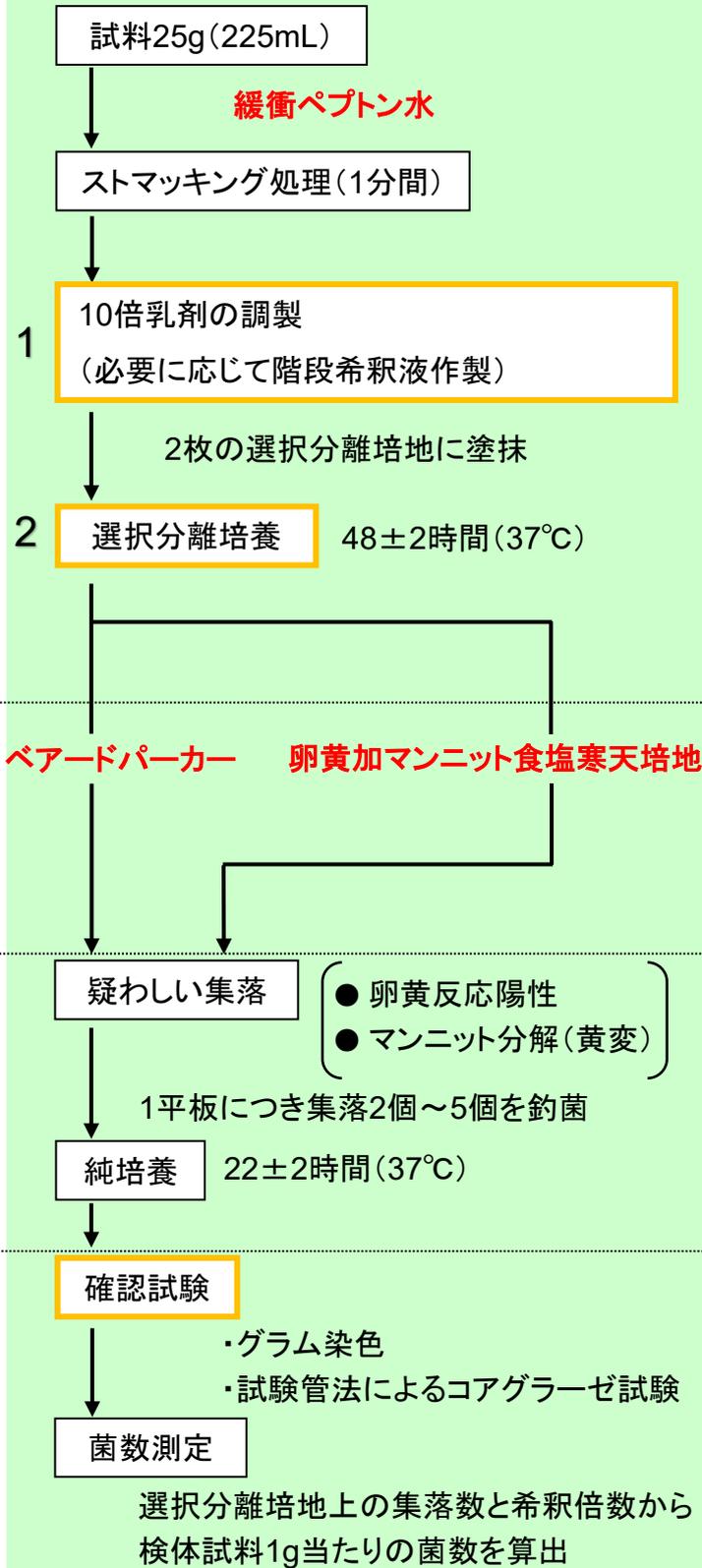
- 本試験法の改正は、国内の公定法をコーデックスの示す標準法(ISO法)と整合性を持たせるために行われた。
- ISO6888-1に相当する試験法であるNIHSJ-03を基に策定された。

	改正前	改正後
検出様式	黄色ブドウ球菌の検出	コアグララーゼ陽性菌の検出
希釈液	ペプトン加生理食塩水	BPW
選択分離培地	卵黄加マンニット食塩寒天培地	ベアードパーカー

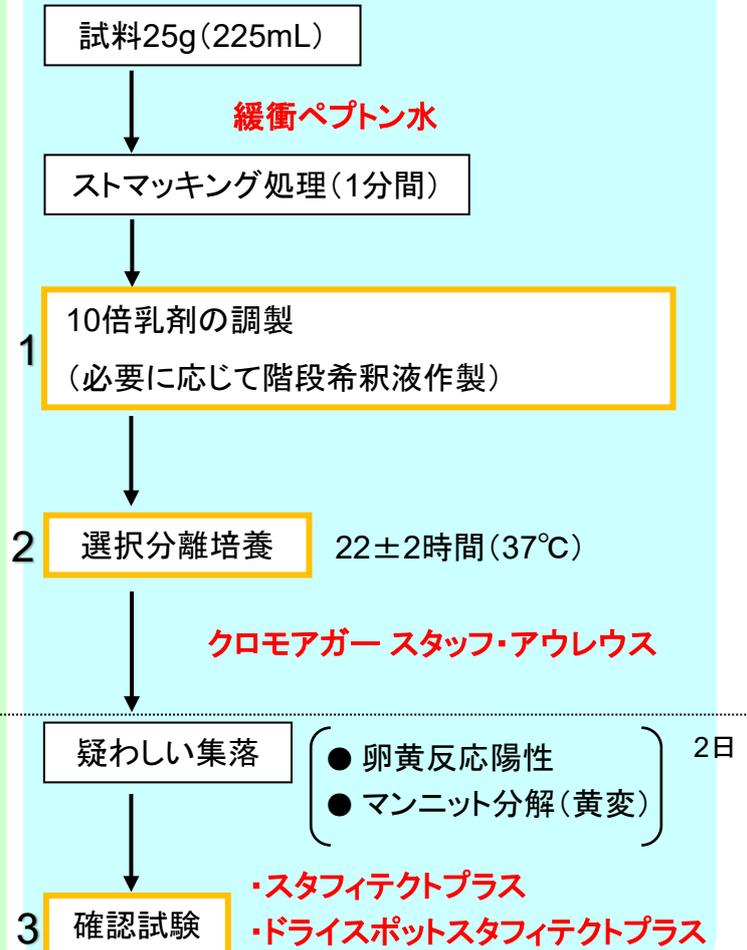
# 黄色ブドウ球菌の検査法

## ● 黄色ブドウ球菌の検査法

### 公定法



### 迅速法

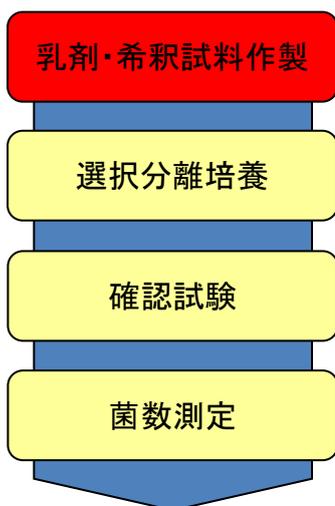


3日

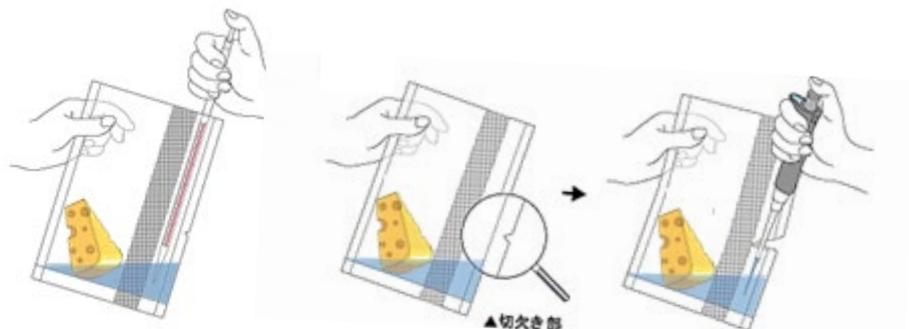
4日

# 黄色ブドウ球菌の検査法

## 1, 乳剤・希釈試料作製

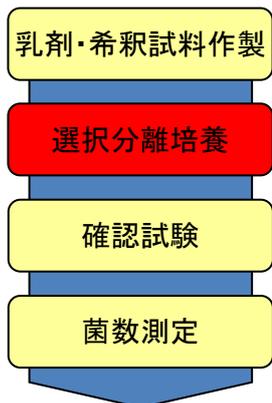


- ・ 検体25gを無菌的にストマック袋に採取し、9倍量のBPW (225mL)を加え1分間ストマッキング処理を行う。
- ・ 懸濁液を10倍乳剤として、10倍階段希釈液(100倍、1000倍)を作製する。



希釈液: 緩衝ペプトン水

## 2, 選択分離培養



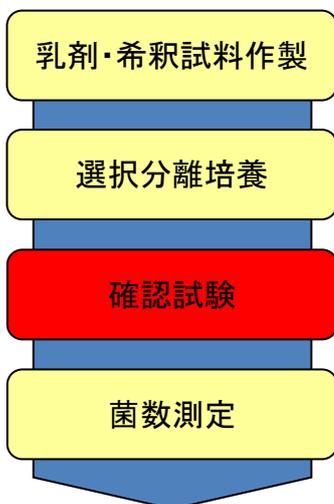
- ・ 選択分離培地各2枚に希釈液0.1mLを塗抹する。(公定法)

ベアードパーカー寒天培地  
(卵黄加マンニット食塩寒天培地でも可)

- ・ 選択分離培地に希釈液0.1mLを塗抹する。(迅速法)

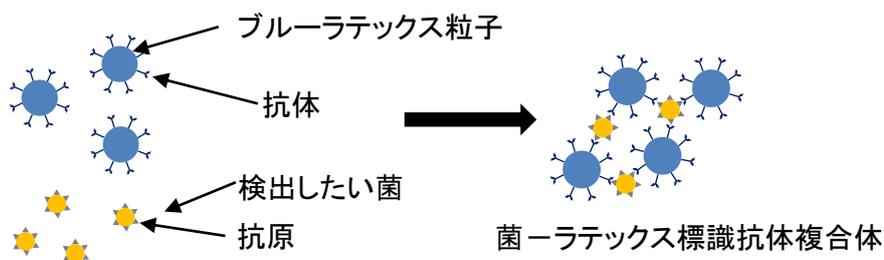
クロモアガー スタッフ・アウレウス

## 3, 確認試験



- ・ 分離培養後に疑わしい集落をラテックスの凝集によって確認する。

- 迅速性・・・凝集反応を肉眼で迅速に判断(20秒)
- 特異性・・・抗体抗原反応により特異的に反応
- 操作性・・・簡易な操作  
白いスライド上に青色ラテックスが凝集し判定が容易



迅速キット

- ・ ドライスポットスタフィテクトプラス
- ・ スタフィテクトプラス

## 緩衝ペプトン水

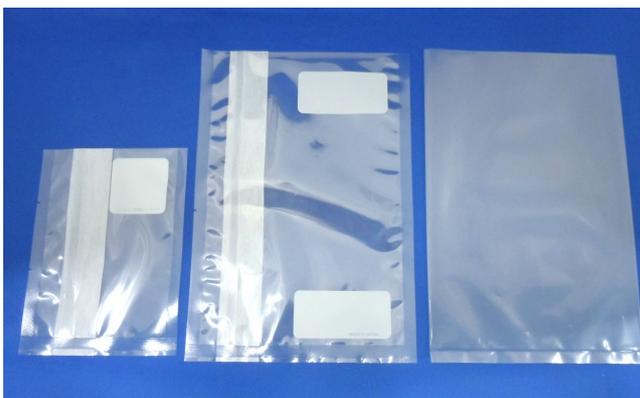
- 食安発0729第4号『食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について』や標準試験法、食品衛生検査指針に記載
- 食品加工工程で損傷を受けた細菌の回復能に優れているため、前増菌や希釈等の用途に適する



	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 (12水和物の場合は9.0g) pH 7.2±0.2

### ストマック袋

- フィルターでろ過した検液を採取可能
- 検液採取に便利な切欠き部付き



- 自立可能

## ベアードパーカー寒天培地



- 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』やISO6888に記載
- ピルビン酸ナトリウムにより損傷した黄色ブドウ球菌を回復
- 黄色ブドウ球菌が損傷を受けている可能性のある食品（食肉加工品、冷凍食品等）の検査に推奨される

### 組成 (g/L)

カゼイン胨消化物	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
寒天	20.0 g
pH 7.0±0.2	

### 調製方法

- ① 本品63gを1Lの精製水に懸濁し、加熱溶解後、121°C、15分間滅菌する。
- ② 約50°Cまで冷却した後、卵黄乳液と亜テルル酸カリウム溶液をそれぞれ最終濃度が1%、0.01%になるように添加して攪拌する。
- ③ シャーレに分注し、固化させる。

### 典型的なコロニー所見

黄色ブドウ球菌：

周囲に透明帯が存在する黒色コロニー

表皮ブドウ球菌：

周囲に透明帯が存在しない黒色コロニーまたは抑制

大腸菌：抑制される

### 培養条件

37°C、48時間±2時間、好気培養

培地成分	役割
ピルビン酸ナトリウム	損傷菌回復、発育促進
亜テルル酸塩 グリシン 塩化リチウム	黄色ブドウ球菌以外の菌の発育抑制

## 卵黄加マンニット食塩寒天培地



- 7.5%食塩耐性を利用し、他の細菌の発育を抑制する
- マンニット分解能と卵黄反応を利用

### 組成 (g/L)

ペプトン	10.0 g
肉エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	75.0 g
マンニット	10.0 g
フェノールレッド	0.025 g
寒天	15.0 g
pH 7.4±0.2	

### 調製方法

- ① 本品111gを1Lの精製水に懸濁し、加熱し溶解する。121°Cで15分間、高圧蒸気滅菌する。
- ② 約50°Cまで冷却した後、卵黄乳液を最終濃度が約3%になるように添加して攪拌する。
- ③ シャーレに分注し、固化させる。

### 典型的なコロニー所見

黄色ブドウ球菌：  
コロニーとその周辺が黄色

### 培養条件

37°C、48時間±2時間、好気培養

培地成分	役割
マンニット フェノールレッド	培地の黄変(フェノールレッドの変色)によるマンニット分解能の確認
塩化ナトリウム	他の細菌の発育を抑制

# クロモアガー スタッフ・アウレウス

## 酵素基質培地



- 24時間培養で検出
- 特異酵素基質により反応が明瞭
- 卵黄反応陰性の黄色ブドウ球菌も検出可能
- その他のブドウ球菌等による偽陽性反応がほとんどない

### 組成 (g/L)

ペプトン混合物	40.0 g
塩化ナトリウム	25.0 g
特殊色素混合物	2.5 g
寒天	15.0 g
pH 6.9	

### 調製方法

- ① 本品82.5gを1Lの精製水に懸濁し、ゆっくり攪拌して十分に寒天を膨潤させ、攪拌しながら沸騰するまで加熱する。
- ② オートクレーブを用いる場合は、圧力がかからないようにし、100℃で行う。
- ③ または、電子レンジを使用する場合は、最初に沸騰させてから容器を取り出して静かに攪拌し、再度短時間レンジで加熱する。寒天が溶けるまでこの操作を繰り返す。
- ③ 48℃まで冷却し、均一になるように攪拌して適当量を滅菌シャーレや試験管に分注して表面を乾燥する。

### 典型的なコロニー所見

黄色ブドウ球菌：ピンク色から藤色  
その他の細菌：無色・青色・抑制

### 培養条件

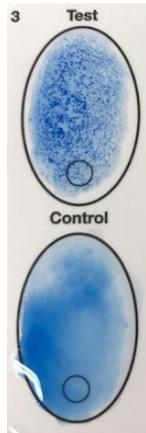
37℃、24時間±2時間、好気培養

### 菌種による培地での発育性

	マンニット	卵黄反応	クロモアガー スタッフ・アウレウス	A社	株数
<i>S. aureus</i>	黄色	+	藤色	青色	13
	黄色	-	藤色	青色	7
<i>Staphylococcus</i> 属	黄色	-	青色 他	水色 他	10
<i>S. epidermidis</i>	黄色 他	-	抑制	青色 他	3

渡辺, 他: 酵素基質培地の評価. 宮城保環年報, 2006

ドライスポット  
スタフィテクトプラス



- 迅速性
- 正確性

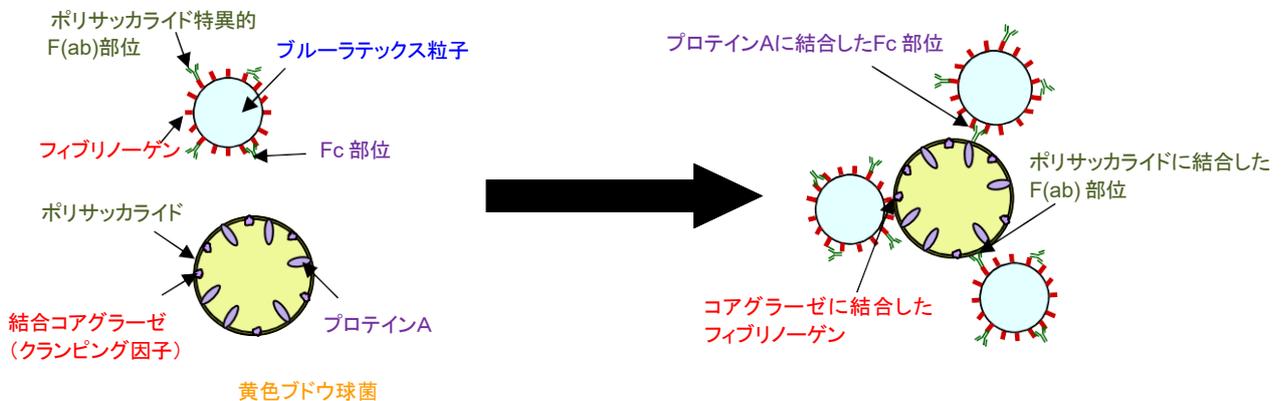
スタフィテクトプラス



- 簡便性
- 結果が鮮明

原理

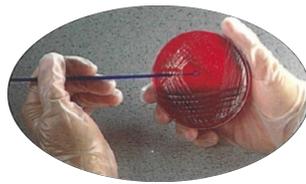
ブルーラテックス試薬と黄色ブドウ球菌液を混ぜると①フィブリノーゲンと結合コアグララーゼ、②Fc部分とプロテインA、③特異的F(ab)とポリサッカライドの反応により、ブルーラテックス粒子の凝集反応が起きる。



操作方法 (ドライスポットスタフィテクトプラス)



1. 生理食塩水を滴下



2. 培地から疑わしいコロニーを釣菌



3. コロニーを生理食塩水と混和



4. 浮遊菌液とラテックス試薬を混和した後、20秒間やさしく回転させ判定

## 関連製品

培地名	製品番号	製品名	容量
<b>希釈液</b>			
緩衝ペプトン水	49957-00	BPW緩衝ペプトン水(225mL)ISO処方	225 mL × 30
	07029-62	シカメディア 緩衝ペプトン水(ボトル)	300 g
	07029-64	シカメディア 緩衝ペプトン水(リパック)	300 g
	07029-79	シカメディア 緩衝ペプトン水(1L用分包)	1 L用 × 40
<b>ストマック袋</b>			
	71532	自立式ストマック袋	50枚
	55000-08	滅菌ストマック袋(フィルター付き)	500枚
	55000-09	滅菌ストマック袋	1000枚
	55000-14	滅菌ストマック袋ミニ(フィルター付き)	500枚
<b>選択分離培地</b>			
ベアードパーカー 寒天培地	07442-62	シカメディア ベアードパーカー寒天基礎培地	300 g
	713047-1	卵黄乳液	100 mL
	713030-1	亜テルル酸カリウム溶液 3.5%	2 mL × 10本
	71721	ベアードパーカー寒天生培地	10枚 × 10包
	71722		10枚 × 2包
卵黄加マンニット 食塩寒天培地	07027-62	シカメディア マンニートル食塩寒天培地	300 g
	07027-64	シカメディア マンニートル食塩寒天培地 (リパック)	300 g
	07027-14	シカメディア マンニートル食塩寒天培地 (200mL用分包)	200 mL用 × 40
	713047-1	卵黄乳液	100 mL
	717590-7	卵黄加マンニット食塩寒天培地 II	10枚 × 10包
	717590-6		10枚 × 2包
クロモアガー スタッフ・アウレウス	49958-30	クロモアガー スタッフ・アウレウス	5 L用
	08407-67		1 L用
	72062	クロモアガー スタッフ・アウレウス生培地	10枚 × 10包
<b>迅速キット</b>			
	717511-1	ドライスポットスタフィテクトプラス	120回
	717512-1	スタフィテクトプラス	100回

- 
- 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>