

# 改良した黄色ブドウ球菌用シート培地の評価

○寺村 哉、岩崎 美穂子、曾田 浩二郎、木村 龍三、牛山 正志 (JNC株式会社 横浜研究所)

## 背景

- 食品の衛生管理や品質管理において、手軽に黄色ブドウ球菌の存在を確認できるシート状培地として「サニ太くん黄色ブドウ球菌用」が開発されている。
- 「サニ太くん黄色ブドウ球菌用」では24時間培養後コロニーの発色が必ずしも明瞭とは言えず、場合によっては6時間の追加培養が必要であった。
- 追加培養の必要が無く、24時間で明瞭に黄色ブドウ球菌の存在を確認できるように全面的改良し、サニ太くんSA(黄色ブドウ球菌用)として開発を行った。
- 今回サニ太くんSA(SkSA)について、純培養菌株および人工的に黄色ブドウ球菌で汚染させた食品検体を用いた評価を行った。

## サニ太くんSA (SkSA)

- 黄色ブドウ球菌を選択的に検出できる、乾燥簡易培地。
- 1mLの液体試料を添加するだけで、培地が自動的に再構成され、*S. aureus*のみが選択的に発育する。
- 35℃、24時間培養後、*S. aureus*は水色～青色の集落を形成する。(写真)

## 評価方法

- 標準菌株を用いた評価

*S. aureus* 47株、*S. aureus* 以外の *Staphylococcus* 属菌22株、それ以外のグラム陽性菌11株、グラム陰性菌38株、酵母3株、計121株を供試した。細菌はトリプトソイ寒天培地(日水製薬)にて35℃、24時間培養し、酵母はサブローデキストロース寒天(Difco)にて25℃、72時間培養後、滅菌Butterfield's phosphate buffer (BPB) ヘマクファーランド#1 ( $3 \times 10^8$  cfu/mL)相当になるように懸濁し、供試菌液とした。各供試菌液はBPBで10倍段階希釈し、菌希釈液の1mLをSkSAおよびDry medium Aへ、0.1mLをBaird-Parker寒天培地(BP; シスメックスバイオメリュー)および卵黄加マンニット食塩寒天培地(MSEY; 日水製薬)に接種し、コンラージ棒により塗抹した。SkSAとDry medium Aは35℃、24時間培養後、BPおよびMSEYは35℃、48時間培養後、各培地上での発育および集落性状の観察を行った。

- 黄色ブドウ球菌で汚染させた食品検体を用いた評価

横浜市内で購入した市販食品100検体に、それぞれ $10^2$  cfu/g -  $10^4$  cfu/gになるように3種の *S. aureus* (NBRC 14462, NBRC 15035, NBRC 100910)をランダムに接種し、3日間冷蔵保管したものを検体として用いた。各検体に9倍量の滅菌BPBを加え、90秒間ストマッキング処理を行い試料原液とした。試料原液は滅菌BPBで10倍段階希釈を繰り返し、各希釈液を調製した。各希釈液の1mLをSkSAおよびDry medium Aへ、0.1mLをBPおよびMSEYに接種し、コンラージ棒により塗抹した。SkSAとDry medium Aは35℃、24時間培養後、BPおよびMSEYは35℃、48時間培養後、発育菌数を計測し、発育した陽性集落はPS-ラテックス(栄研化学)により *S. aureus* である確認を行った。各方法において得られた菌数をそれぞれ対数に変換し、SkSAの菌数の対数値をy軸に、対照とする培地での菌数の対数値をx軸にそれぞれプロット後、相関係数を算出し、また一元配置分散分析(ANOVA)により有意差の有無を確認した。

## サニ太くんSAの評価結果

- 標準菌株を用いた評価では、SkSAでは24時間培養で供試した全ての *S. aureus* が明瞭な水色～青色を形成し、*S. aureus* 以外の供試菌株の発育を認めなかった。本結果はISO16140 (2003) “*Protocol for the validation of alternative methods*” に記載されている、包含性30株、排他性20株の要求を満たすものであった。
- 黄色ブドウ球菌で汚染させた食品検体を用いた評価では、SkSAとDry medium A、BPおよびMSEY間の直線回帰式がそれぞれ  $y = 1.01x - 0.02$ 、 $y = 0.98x + 0.003$ 、 $y = 1.00x - 0.01$ 、相関係数( $r$ )が0.996、0.971、0.989であり、高い相関を認めた。SkSAと各培地間での直線回帰式はいずれも傾きが1に近く、切片が0に近いことを認めた。また、ANOVAによる有意差検定においてSkSAと各培地間で有意差は認めなかった。

## まとめ

今回の評価において、改良したサニ太くんSAは24時間培養で、従来法と高い相関を有する方法であることを認め、その性能の妥当性確認において、それらの要求を満たすことが出来るものと考えられた。

また、結果が明瞭な水色～青色集落として簡単に検出できるという点から、食品製造現場などの自主衛生検査において有用な手段の一つであると考えられた。

Table. Growth and colony appearances on various selective media for *S. aureus*

Strains (No. of strains tested)	% of grown strains			
	SkSA	Dry medium A	BP	MSEY
Gram positive strains				
<i>Staphylococcus aureus</i> (47)	100 blue	98 mauve	100 black EY	100 yellow EY
<i>Bacillus</i> (3)	0	33 blue, 33 purple	100 black	33 yellow, 33 pink. 33 pink EY
<i>Corynebacterium</i> (1)	0	100 blue	100 black	100 pink
<i>Enterococcus</i> (3)	0	0	100 black	67 yellow
<i>Lactobacillus</i> (2)	0	0	0	0
<i>Leuconostoc</i> (1)	0	0	100 black	0
<i>Micrococcus</i> (1)	0	0	100 black	0
<i>Staphylococcus</i> (non- <i>S. aureus</i> ) (22)	0	23 blue, 5 mauve	86 black, 5 black EY	50 yellow, 18 pink
Gram negative strains				
<i>Aeromonas</i> (1)	0	0	0	0
<i>Cedecea</i> (1)	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i> (3)	0	0	0	0
<i>Cronobacter</i> (1)	0	0	0	0
<i>Edwardsiella</i> (1)	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> (4)	0	0	25 black	0
<i>Escherichia</i> (6)	0	0	0	0
<i>Hafnia</i> (1)	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> (2)	0	0	0	0
<i>Kluyvera</i> (2)	0	0	0	0
<i>Leclercia</i> (1)	0	0	0	0
<i>Morganella</i> (1)	0	0	0	0
<i>Proteus</i> (2)	0	0	0	0
<i>Providencia</i> (1)	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> (5)	0	0	40 black	0
<i>Rahnella</i> (1)	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> (3)	0	0	33 black	0
<i>Serratia</i> (2)	0	0	0	0
Yeasts				
<i>Candida</i> (2)	0	50 blue	50 black	50 pink
<i>Saccharomyces</i> (1)	0	0	0	0

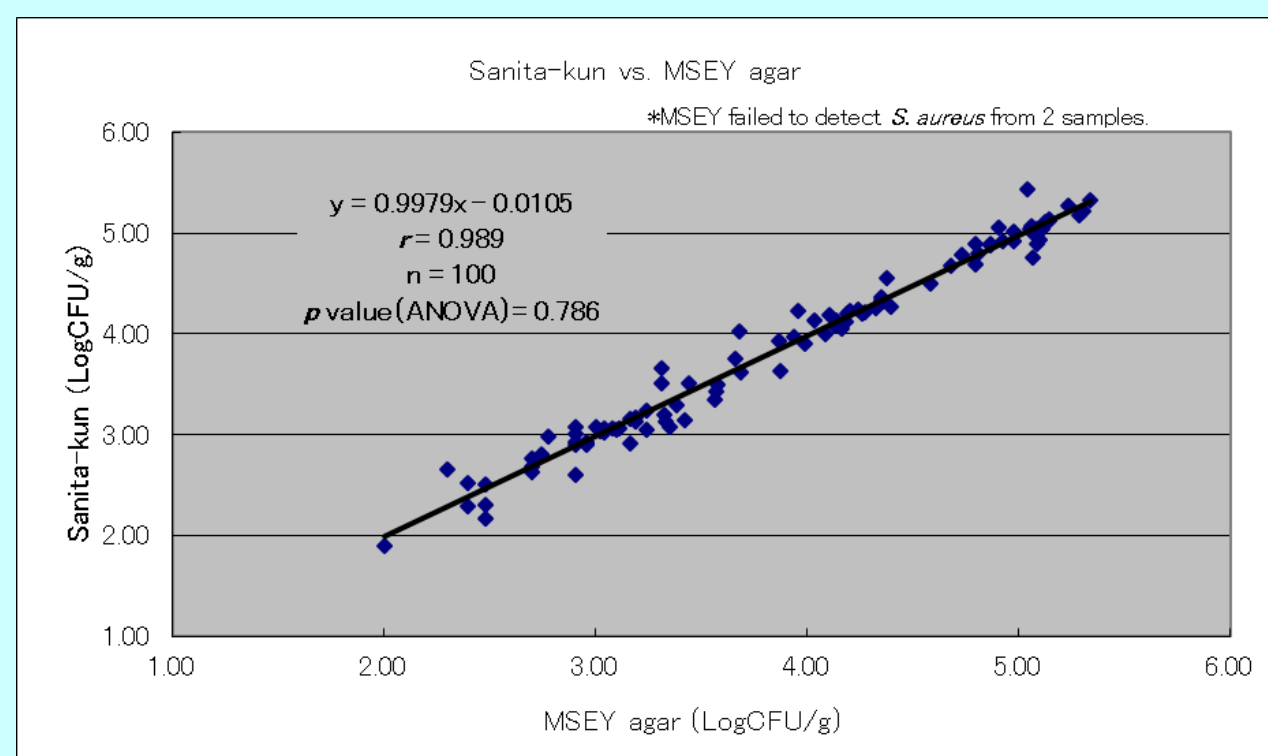
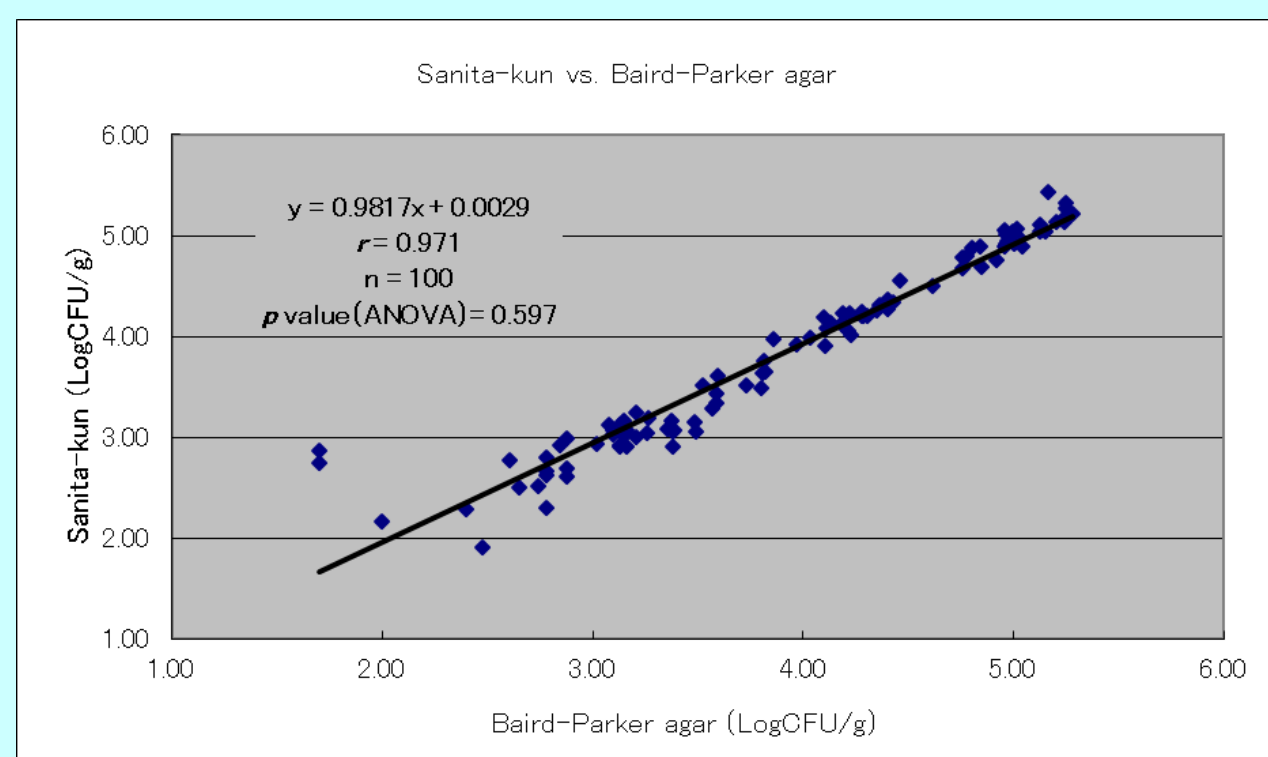
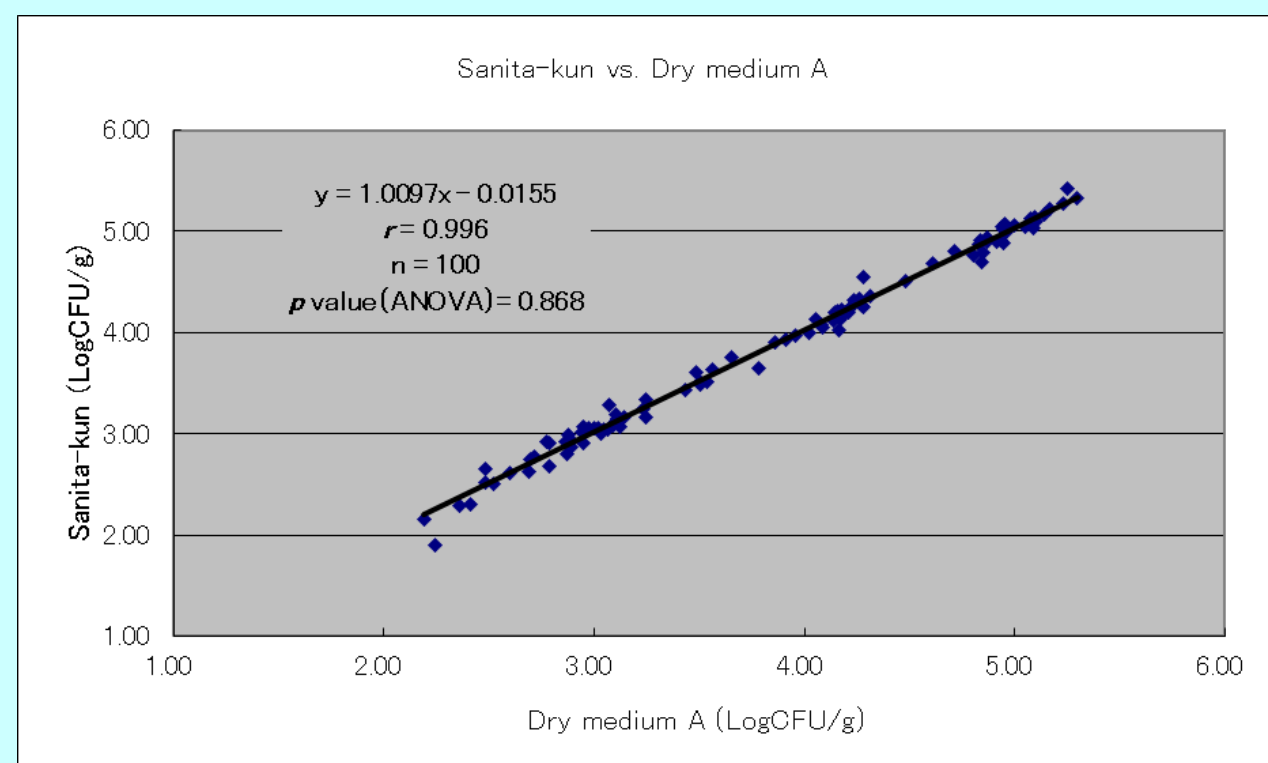


Figure. Regression lines between SkSA and several reference media for the determining population of *S. aureus*