

食安発 0729 第 4 号
平成 27 年 7 月 29 日

各
〔 都 道 府 県 知 事
保 健 所 設 置 市 市 長
特 別 区 区 長 〕 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長
(公 印 省 略)

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

食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号。以下「告示」という。）に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法について、国際整合性を図る観点から、国立医薬品食品衛生研究所における試験法検討の結果、今般、その試験法が報告されたところである。

については、「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」（平成 5 年 3 月 17 日付け衛乳第 54 号。以下「平成 5 年通知」という。）及び「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」（平成 10 年 11 月 25 日付け生衛発第 1674 号。以下「平成 10 年通知」という。）を下記のとおり改正することとしたので、関係者への周知方よろしく願います。

なお、本通知は、平成 28 年 1 月 29 日から適用することとし、それまでの間、なお従前の例によることができる旨申し添える。

記

- 1 平成 5 年通知のうち、別紙 1 を本通知の別添のとおり改める。
- 2 平成 10 年通知のうち、第 2 の 2 の (2) のア中「別紙に示す試験法により、」を「平成 5 年 3 月 17 日付け衛乳第 54 号に示す試験法により、」に改め、別紙を削除する。

(別紙1) 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

第1 検体の採取、運搬及び試料の調製

1 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品

- (1) 1検体当たり約100gを採取する。検体は、原則として容器包装のまま採取する。ただし、ハム等のように、1包装単位が1kg以上に及ぶものは、切断して採取する。この場合、滅菌した器具及び容器を用い、汚染の起こらぬよう検体を採取すること。また、切断面で微生物が増殖したり、包装内面を伝わって断面部から微生物が内部に侵入しないように保管法にも注意すること。
- (2) 採取した検体の運搬は、保冷容器を用い、氷等で4℃以下に検体を保ち、速やかに検査に供することができるよう運搬すること。なお、冷凍状態のものは、ドライアイス等で凍結しつつ運搬すること。
- (3) 微生物試験に供する試料の調製は、製品（スライスハム等細切された製品を除く。）の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mLを加えて細碎し、試料液とする。スライスハム等細切された製品にあっては、滅菌した器具を用いて25gを無菌的に切断して採り、試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mLを加えて細碎し、試料液とする。

ただし、食肉製品に係る試験のうち、サルモネラ属菌については別添1、黄色ブドウ球菌については別添2によること。

2 砂糖、でん粉及び香辛料

検体の採取に当たっては、検査対象を十分にかき混ぜた後、砂糖又はでん粉にあっては100g以上、香辛料にあっては10g以上を無菌的に滅菌採取ビンに採る。

検体は、よくかき混ぜた後、無菌的に5gを滅菌試料ビンに採取し、滅菌ペプトン加生理食塩水を加えて100mLとし、密栓してよく振り混ぜる。

その液約20mLを無菌的に滅菌中試験管（18mm×180mm）に採り、沸騰水浴中に入れ10分間加熱した後、急冷して試料液とする。

第2 試薬及び培地

1 微生物試験に用いる試薬及び培地

試薬及び培地は、次のとおりとする。なお、(2)から(6)については市販品を用いても差し支えない。

ただし、食肉製品に係る試験のうち、サルモネラ属菌については別添1、黄色ブドウ球菌については別添2によること。

(1) ペプトン加生理食塩水

ペプトン1.0 g及び塩化ナトリウム8.5 gを精製水1,000 mLに溶かし、滅菌する。最終pHは 7.0 ± 0.1 でなければならない。

(2) ECはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン20.0 g、乳糖5.0 g、胆汁酸塩1.5 g、リン酸水素カリウム4.0 g、リン酸二水素カリウム1.5 g及び食塩5.0 gを1,000 mLの精製水に溶かす。これをはっ酵管に分注して滅菌した後、速やかに冷却する。最終pHは 6.9 ± 0.1 でなければならない。

(3) EMB培地

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン10.0 g、リン酸水素カリウム2.0 g、乳糖10.0 g、エオシンY0.4 g、メチレンブルー0.065 g及び寒天15 gを精製水1,000 mLに加え、加熱溶解し、滅菌し、分注して、平板とする。最終pHは 7.0 ± 0.1 でなければならない。

(4) 乳糖ブイヨンはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

肉エキス3.0 g、ペプトン5.0 g、乳糖5.0 g及びブロムチモールブルー0.024 gを1,000 mLの精製水に溶かす。これをはっ酵管に分注して滅菌した後、速やかに冷却する。最終pHは 7.2 ± 0.1 でなければならない。

(5) クロストリジウム培地

標準処方は次のとおりとする。

混合ペプトン15.0 g、大豆ペプトン7.5 g、酵母エキス7.5 g、肉エキス7.5 g、クエン酸鉄アンモニウム1.0 g、メタ重亜硫酸ナトリウム1.0 g、L-システイン塩酸塩0.75 g及び寒天30.0 gを精製水1,000 mLに加え、加熱溶解し、滅菌する。最終pHは 7.6 ± 0.1 でなければならない。

(6) 倍濃度BGLBはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン 10.0 g、乳糖 10.0 g、牛胆汁末 20.0 g 及びブリリアントグリーン 0.0133 g に精製水を加えて 500 mL とし、加温溶解し、はっ酵管に約 10 mL ずつ分注した後、滅菌する。最終 pH は 7.2 ± 0.1 でなければならない。

2 亜硝酸根の試験に用いる試薬

試薬は、次のとおりとする。

- (1) スルファニルアミド：〔特級〕
- (2) スルファニルアミド液：スルファニルアミド 0.5 g を塩酸（1→10）100 mL に加温しながら溶かす。
- (3) ナフチルエチレンジアミン溶液：N—1—ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.12 g を水 100 mL に溶かす。
- (4) N—1—ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：〔特級〕

第3 試験法

1 微生物

(1) 非加熱食肉製品及び特定加熱食肉製品の E. coli の試験法

- ① 試料液 1 mL ずつを接種した EC はっ酵管を 5 本、試料液の 10 倍希釈液 1 mL ずつを接種した EC はっ酵管を 5 本用意し、 $44.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ の温度で 24 時間 ± 2 時間培養した後、ガス発生を認めないものは E. coli 陰性とする。
- ② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ で 24 時間 ± 2 時間培養後 EMB 培地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面培地に移植する。

その乳糖ブイオンはっ酵管で当該集落を 48 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は E. coli 陽性とし、その他の場合は E. coli 陰性とする。

- ③ 試料液について陽性を示すものが 3 以下であれば E. coli がその 1 g につき 10 以下、試験液の 10 倍希釈液について陽性を示すものが 3 以下であれば E. coli がその 1 g につき 100 以下とする。

(2) 加熱食肉製品及び乾燥食肉製品の E. coli の試験法

① 試料液 1 mL それぞれについて 5 本の EC はっ酵管に接種し、 $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度で 24 時間 \pm 2 時間培養した後、ガス発生を認めないものは E. coli 陰性とする。

② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養後 EMB 培地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面培地に移植する。

その乳糖ブイオンはっ酵管で当該集落を 48 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は E. coli 陽性とし、その他の場合は E. coli 陰性とする。

(3) サルモネラ属菌試験法

別添 1 の方法によること。

(4) 黄色ブドウ球菌試験法

別添 2 の方法によること。

(5) クロストリジウム属菌試験法

試料液 10 mL 及び試料液の 10 倍希釈液 10 mL ずつをそれぞれについて 2 枚の滅菌パウチ（ラミネートフィルム製、市販品あり。）に正確に採り、あらかじめ加温して溶かし $45\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度に保持したクロストリジウム培地約 15 mL をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却凝固させる。培地が凝固した後、 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養する。この場合、検体の希釈に用いた滅菌ペプトン加生理食塩水 10 mL を培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養したものを対照とし、パウチ、滅菌生理ペプトン加食塩水及び培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確かめなければならない。菌数の算定は、黒色の集落につき、食品、添加物等の規格基準中第 1 食品の部 D 各条の項の○ 氷雪の 1 氷雪の成分規格の(2)の 2. の a から g までに準じて行い、クロストリジウム属菌の菌数とする。

(6) 大腸菌群試験法

① 3 本の倍濃度 BGLB はっ酵管に試料液 10 mL ずつをそれぞれに接種し、 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度で 48 時間 \pm 3 時間培養した後、ガス発生を認めないものは大腸菌群陰性とする。

② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養後 EMB 培

地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面培地に移植する。その乳糖ブイオンはっ酵管で当該集落を 48 時間±3 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は大腸菌群陽性とし、その他の場合は大腸菌群陰性とする。

(7) 芽胞数の試験法

試料液の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を作成する。

試料液、試料液の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液のそれぞれについて滅菌ペトリ皿を 2 枚用意し、滅菌ピペットを用いて対応する滅菌ペトリ皿に当該試料液 1 mL ずつを正確に採り、あらかじめ加温して溶かし 45 °C~50 °C の温度に保持した標準寒天培地（食品、添加物の規格基準中第 1 食品の部 D 各条の○ 氷雪の 1 氷雪の成分規格の目の(2)の 2. 細菌数（生菌数）の測定法に規定する標準寒天培養基をいう。）約 15 mL をこれに加え、静かによく混合し、冷却凝固させる。培地が凝固した後、倒置して 35.0 °C±1.0 °C で 48 時間±3 時間培養する。この場合、検体の希釈に用いた滅菌ペプトン加生理食塩水 1 mL に培地を混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養したものを対照とし、ペトリ皿、滅菌ペプトン加生理食塩水及び培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確かめなければならない。

芽胞数の算定は、食品、添加物等の規格基準中第 1 食品の部 D 各条の項の○ 氷菓の 1 氷菓の成分規格の目の(3)の 2. 細菌数（生菌数）の測定法に規定する細菌数の算定により行う。

2 亜硝酸根

(1) 試料液の調製

試料約 10 g を正確に量り、約 80 °C の水 80 mL 及び 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、ホモジナイズした後、容量 200 mL のフラスコに移す。容器は温水 10 mL ずつで 5 回洗浄し、洗液はフラスコに加える。これに硫酸亜鉛溶液（3→25）10 mL を加えてよく振り混ぜた後、ときどき振り混ぜながら 80 °C の水浴中で 20 分間加温する。次に、冷水中で室温まで冷却した後、0.5N 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.5 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。内容をよく混和し、冷蔵庫中に約 30 分間放置した後、乾燥ろ紙を用いて共栓フラスコへろ過する。最初のろ液約 20 mL を捨て、澄明なる液を試料液とする。

(2) 空試料液の調製

水 10 mL を容量 200 mL のフラスコに採り、(1) 試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

亜硝酸ナトリウム 0.150 g を正確に量り、1,000 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて溶かして正確に 1,000 mL とし、標準原液とする。標準原液 10 mL を正確に量り、100 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100 mL とし、その 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし標準液とする（この液 1 mL は、亜硝酸根 $0.2 \mu\text{g}$ を含む。）。標準液 2.5 mL、5 mL、10 mL、15 mL 及び 20 mL をそれぞれ正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 20 mL とし、それぞれを検量線用標準液とする（これらの液 20 mL 中には、それぞれ亜硝酸根 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $2 \mu\text{g}$ 、 $3 \mu\text{g}$ 及び $4 \mu\text{g}$ を含む。）。

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 540 nm の吸光度を測定する。

② 測定

試料液及び空試料液それぞれ 20 mL（注 1）を正確に量り、それぞれ 25 mL のメスフラスコに入れ、それぞれにスルファニルアミド液 1 mL、塩酸（1→2）1 mL、ナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL 及び水を加えてそれぞれ正確に 25 mL とし、よく振り混ぜ、20 分間放置し（注 2）、測定液及び空測定液とする。水 20 mL を用いて同様に操作したものを対照として 540 nm における測定液及び空測定液の吸光度を測定し、 E_A 、 E_B とする。試料液が着色しているときは試料液 20 mL を正確に量り、塩酸（1→2）1 mL 及び水を加えて正確に 25 mL としたものを、水を対照として吸光度を測定し、 E_C とする。

吸光度差 $E_A - E_B$ 、又は試料液が着色した場合は吸光度差 $E_A - (E_B + E_C)$ を求め、 ΔE とする（注 3）。

③ 検量線

検量線用標準液 20 mL ずつをそれぞれ正確に量り、それぞれ 25 mL のメスフラスコに入れ、②測定における試料液と同様に操作し、それぞれの吸光度差 ΔE_{S_1} 、 ΔE_{S_2} 、 \dots ΔE_{S_5} を求め、検量線を作成する。

④ 定量

測定液の吸光度差 ΔE と検量線から試料液中の亜硝酸根含有量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$) を求め、次式によって検体中の亜硝酸根含量 (g/kg) を計算する。

亜硝酸根含量 (g/kg)

$$= C \times (200/20) \times (1/W) \times (1/1,000)$$

$$= C / (100 \times W)$$

C : 試料液中の亜硝酸根含量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)

W : 試料の採取量 (g)

(注1) NO_2^- 濃度の高い場合は、検量範囲 ($0.02 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) に入るよう試料液を希釈する。

(注2) 呈色は反応時間 10 分間から 2 時間程度まで安定であるので、約 20 分間放置してよい。

(注3) 試料中にアスコルビン酸等の還元物質が含まれている場合は定量妨害となり、亜硝酸の測定値は低くなる。その場合、試料量の 10 g を 5 g 又は 2 g に減らすか、試料液の 20 mL を 10 mL 又は 5 mL に減らすことにより、その測定値の低下を幾分か防止することができる。

3 pH

(1) 食肉製品

次の①又は②の方法により行うこと。

① 直接法

ニードル型電極を検体に直接挿入するか、又はスリーブ型電極を直接検体切断面に当てて pH を測定する。測定部分は、いずれの電極を用いた場合も検体表面から 5 mm 以上の内側とし、最低 3 か所を測定して、その平均値を検体の pH とする。

② 水抽出法

検体表面から 5 mm 以上の内側の部分を採取し試料とする。試料に、食肉の場合は試料に対して 9 倍量以内、製品の場合は試料と 2～3 倍量以内の精製水を加え、均質化し、得られた上澄液について pH を測定し、検体の pH とする。

(2) 魚肉ねり製品

製品の一部を採取し試料とし、試料に、その 10 倍量の精製水を加え、細碎し、pH を測定し、検体の pH とする。

4 水分活性

次の(1)又は(2)の方法により行うこと。ただし、(2)により行うことができるのは、アルコール等揮発性物質の影響を受けない場合に限る。

なお、飽和溶液の選定に当たっては測定しようとする（適否の判定基準となる）水分活性を中心に上下同間隔を持つ試薬を用いるよう留意すること。また、飽和溶液の作製に当たっては、25℃における溶解度を予め把握しておくこと。水分活性の測定値は小数点以下2桁までとし、3桁以下は切捨とすること。

(1) 容器包装を取り除き、検体表面から5 mm以上内側の部分を速やかに細切するか、表層部分が除去しにくい検体にあつてはそのまま輪切りにして試料とする。試料は水分活性測定装置の検出器内空間容積の3%以上の容積となるよう適当量を採取し、アルミ箔皿又は開放型平皿に乗せ、直ちに検出器に入れて上蓋を閉めて密閉し、25℃±2℃の条件下に置く。10分間隔で数値を読み、その間に数値の変動が認められない時点が、検出器内の水蒸気圧が平衡状態になったと見なし、その時の数値を検体の水分活性とする。

なお、水分活性測定装置には電気抵抗式（Change in electrical conductivity of immobilized salt soln）による機器を用い、測定する前に既知飽和溶液を用いて校正すること。

(2) 容器包装を取り除き、無作為に10 g～20 gを採り、これを検体とする。

検体を速やかに細切し、これより約1 gをとり、（又は検体を内径25 mmのコルクポーターで抜き取った後約1 gになるようにスライスし、）予め精秤したアルミ箔（内径25 mm）に入れて精秤する。これを試料とする。

測定しようとする水分活性より高い値をもつ飽和溶液A及び測定しようとする水分活性より低い値をもつ飽和溶液Bを準備する。

試料は速やかにコンウェイユニット（以下「ユニット」という。）の内室に入れ、外室にはA、Bを別々のユニットに3 mL～4 mLを入れた後、ユニットのすり合わせ部分にワセリンを塗り蓋をする。クリップして気密を保つようにして25℃±2℃で2時間±0.5時間静置する。

2時間±0.5時間静置後試料の重量を精秤し、予め測定した重量との増減を求め、次式により試料の水分活性を算出する。

$$\text{水分活性} = (b \times x - a \times y) / (x - y)$$

a : 飽和溶液Aの水分活性の値

b : 飽和溶液Bの水分活性の値

x : Aを使用した際の試料の重量増加量

y : Bを使用した際の試料の重量減少量

(別添1) サルモネラ属菌試験法

1. 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、ストマッカー等で均質化し、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属菌を検出する培地、それぞれ1種類)に塗抹後、培養し、疑わしい集落の形成を観察する。サルモネラ属菌と疑われる集落3個を TSI (Triple Sugar Iron)寒天培地及び 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。

2. 使用器具、装置

- (1) 滅菌ハサミ
- (2) 滅菌ピンセット
- (3) ストマッカー
- (4) ストマッキング袋
- (5) 三角フラスコ
- (6) 自動秤量分注装置又は秤量器
- (7) pH計
- (8) 滅菌ピペット、マイクロピペット及び滅菌チップ
- (9) メスシリンダー
- (10) 小試験管
- (11) 中試験管
- (12) 試験管立て
- (13) 白金耳
- (14) 高圧蒸気滅菌器(滅菌のインジケーター)
- (15) 乾熱滅菌器(滅菌のインジケーター)
- (16) 恒温槽、恒温水槽(37℃±1℃及び42.0℃±0.5℃の仕様)
- (17) 滅菌シャーレ(直径90mm～100mm)

3. 培地、試薬及び抗血清

- (1) 前増菌用培地
 - ・緩衝ペプトン水(BPW) : 加温溶解後、121℃で15分間滅菌する。
- (2) 選択増菌用培地
 - ・RV (Rappaport-Vassiliadis)培地 : 加温溶解後、10mLずつ中試験管に分注し、115℃

で15 分間滅菌する。作製後は冷蔵庫で数週間保存可能である。

- ・TT (Tetrathionate) 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又はXLDから 1 種類。使用説明書に従って作製する。

- ・硫化水素産生又は非産生によらずサルモネラ属菌と判定する培地：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)、ESII (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 多価及びO群血清

(6) 生化学的性状確認培地、試薬等

- ・シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注し、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、小試験管に分注し、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

- ・マロン酸塩培地：加温溶解後、小試験管に分注し、121 °Cで15 分間滅菌する。

4. 試験手順

(1) 検体の調整

① 1 検体当たり約 100 g を採取する。検体は、原則として容器包装のまま採取する。ただし、ハム等のように、1 包装単位が 1 kg 以上に及ぶものは、切断して採取する。この場合、滅菌した器具及び容器を用い、汚染の起こらぬよう検体を採取すること。また、切断面で微生物が増殖したり、包装内面を伝わって断面部から微生物が内部に侵入しないように保管法にも注意すること。

- ② 採取した検体の運搬は、保冷容器を用い、氷等で4℃以下に検体を保ち、速やかに検査に供することができるよう運搬すること。なお、冷凍状態のものは、ドライアイス等で凍結しつつ運搬すること。
- ③ 微生物試験に供する試料の調製は、製品（スライスハム等細切された製品を除く。）の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。
スライスハム等細切された製品にあつては、滅菌した器具を用いて25gを無菌的に切断して採り、試料とする。

(2) 前増菌培養

- ① BPW を約37℃に温めておく。
- ② 試料25gにBPW 225mLを加え、1分間ストマッカー処理する。
- ③ 37℃で22時間±2時間前増菌培養する。

(3) 選択増菌培養

- ① RV 培地及びTT 培地を約42℃に温めておく。
- ② BPW で前培養した培養液0.1mLをRV 培地10mLに接種する。
- ③ BPW で前培養した培養液1mLをTT 培地10mLに接種する。
- ④ 接種したRV 及びTT 培地を42℃で22時間±2時間培養する。

(4) 選択分離培養

- ① 培養後のRV 及び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及び(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラ属菌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）
 - ・MLCB
 - ・DHL
 - ・XLD(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラ属菌と判定する分離用寒天培地（1種類選択）
 - ・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）
 - ・ESII（ESサルモネラ寒天培地II）
 - ・SM2（chromID Salmonella Agar）
- ③ 接種した培地を37℃で22時間±2時間培養する。

注：サルモネラ属菌を釣菌する際、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属菌と推定とする。また、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラ属菌と判定する培地のうち、BGSでは無色透明（培地色

は赤色)、CHS では藤色並びに ESII 及び SM2 ではピンク色の集落がサルモネラ属菌と推定される定型集落である。分離用寒天培地上でのサルモネラ属菌集落の色についてはあらかじめ既知のサルモネラ属菌株を用いて検証しておくこと。

(5) 確認培養

- ① 各分離用寒天培地に形成された定型集落(各培地上記注意を参照)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℃で22時間±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属菌と判断する。
 - (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又は亀裂の発生)及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)、運動性陽性となることを確認後、インドール試薬の重層によりインドール反応を検討する。サルモネラ属菌はインドール反応陰性である(色の変化は無い)。インドール反応陽性の場合、数分以内に重層試薬の赤変を示す。
- ⑥ 定型的なサルモネラ属菌と判断された菌株は、(6)に示すO抗原の血清学的試験を行い、サルモネラ属菌であることの確定及びO抗原群について決定する。
- ⑦ サルモネラ属菌には、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属菌も知られている。①から⑥の操作により、定型的サルモネラ属菌の判断は可能であると考えるが、定型的性状を示さない場合は(7)に示す生化学的性状試験を実施し、サルモネラ属菌の確認をする。

(6) O血清群別

サルモネラ属菌と疑われ、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。

- ① O多価血清及び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。
- ② サルモネラ属菌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群型別不能とし、(6)に示す生化学的性状試験を実施する。

(7) 生化学的性状

非定型的サルモネラ属菌が疑われる場合に(ア)から(オ)までに示した生化学的性状試験を実施する。市販の同定用キットの使用も可能である。

(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) クエン酸利用能試験：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、37 °C で 22 時間± 2 時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。

(ウ) VP 試験：VP 半流動培地に菌を穿刺し、37 °C で 22 時間± 2 時間培養後、VP 用試薬 A 及び 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 試験：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 で 18 時間～24 時間培養し、液色で判定する（早いものは 1 時間～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。液色が変化しないものは陰性である。

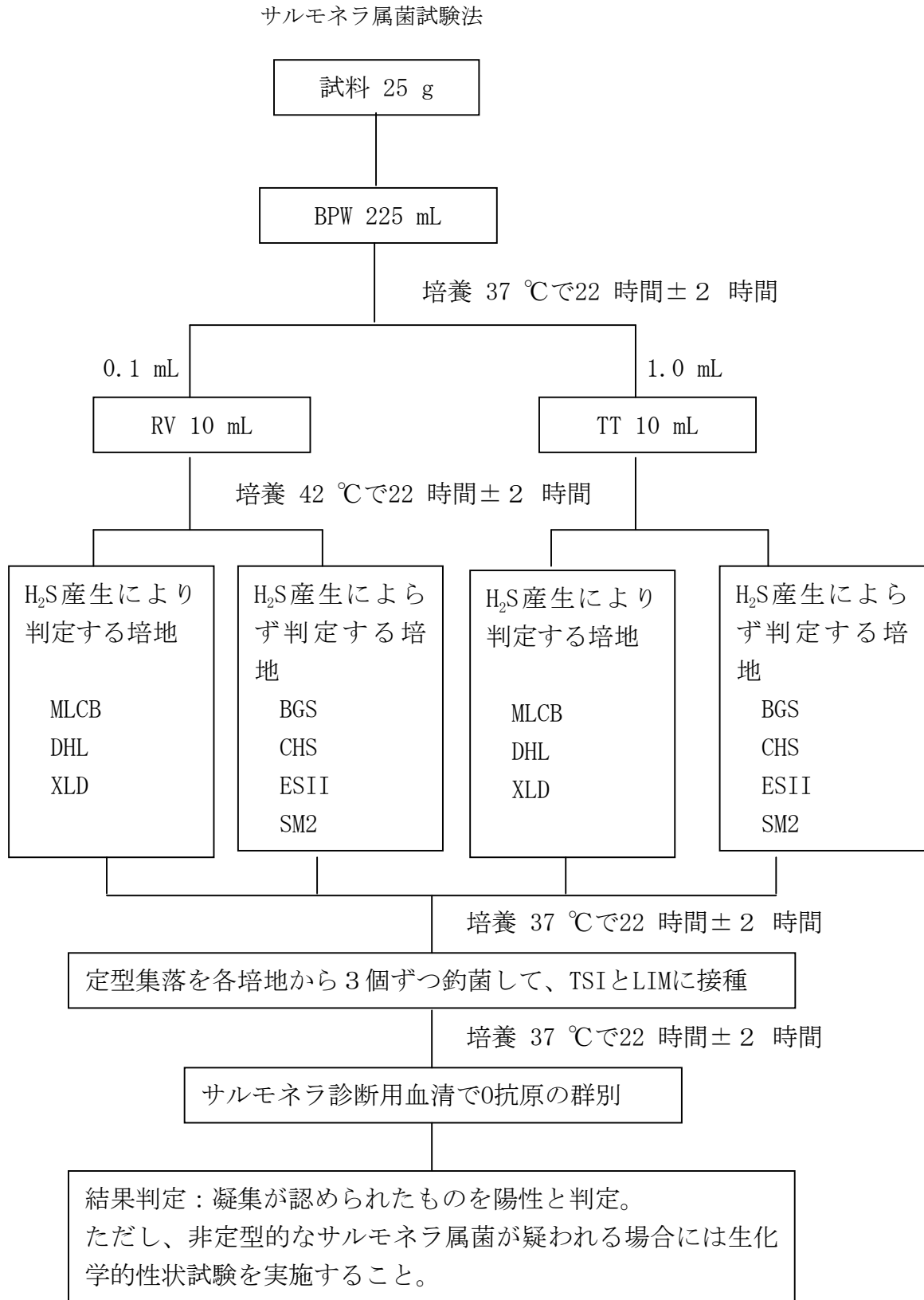
(オ) マロン酸利用能試験：マロン酸塩培地に新鮮培養菌を白金線で接種し、37 °C で 24 時間～48 時間培養して判定する。液色が明らかに青色となったものを陽性とし、緑色に留まるものを陰性と判定する。

注：サルモネラ属菌はオキシダーゼ陰性、クエン酸利用能陽性、VP 陰性、ONPG 陰性である。マロン酸利用能では、ほとんどのサルモネラ属菌は陰性であるが、*subspecies salamae*, *arizonae* 及び *diarizonae* では陽性であるので注意を要する。非定型的サルモネラ属菌が疑われ、生化学的性状試験を実施してもなお判断が難しい場合は、国立医薬品食品衛生研究所又は国立感染症研究所に照会すること。

(8) 記載

- ① サルモネラ属菌陽性の際は陽性/25 g とし、0 群又は 0 群型別不能まで記載する。
- ② 非定型的サルモネラ属菌の際も同様に 0 群まで記載するとともに、どの性状が異なっていたかを記入する。

5. フローチャート



6. 培地組成（参考例）及び作製方法

(1) 緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water: BPW)

組成：1,000 mL 当たり

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

※ リン酸塩は、無水物や複数の水和物が存在するため、異なった水和物等を用いる場合はその分子量に合わせて、必ず重量補正を行うこと

(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 当たり

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 115 °C、15 分間、pH 5.2±0.2

(3) テトラチオネート液体培地 (Tetrathionate USA: TT)

組成：1,000 mL 当たり

カゼイン酵素分解産物	2.5 g
肉酵素分解産物	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

※ 沸騰するまで混和加熱する。この基礎培地は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 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 当たり

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 当たり

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 当たり

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属菌を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 当たり

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 で 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 当たり

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 当たり

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
ノビオシン	0.02 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL
pH 7.4±0.2	

※ オートクレーブ滅菌 121 °C で 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 当たり

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

※ 組成は上記のとおりだが、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属菌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。

(別添2) 黄色ブドウ球菌試験法

1. 試験の概要

試験試料 25 g を秤量し、緩衝ペプトン水 (BPW) 225 mL 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 0.1 mL をそれぞれ 2 枚の選択分離平板培地に塗抹、培養し、黄色ブドウ球菌と疑われる典型的な集落を計数する。試料 1 g 当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 ISO 6888-1 にあるベアード・パーカー (Baird-Parker) 寒天培地を用いる。なお、わが国で従来から広く行われている 3 % 卵黄加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るものではなく同等に扱われるべきものとし、Baird-Parker 寒天培地の代替培地として用いることができる。黄色ブドウ球菌と疑われる集落は、純培養を行った後、コアグラゼ試験等で性状を確認し同定する。本試験法は、ISO 6888-1:1999 と妥当性確認を行った試験法である。

2. 使用機器、装置

- (1) 乾熱滅菌器、オートクレーブ
- (2) ふらん器 (37 °C ± 1 °C)
- (3) 寒天平板用乾燥器又はふらん器 (25 °C ~ 50 °C)
- (4) 恒温水槽 (37 °C ± 1 °C)
- (5) pH 計
- (6) 秤量器
- (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、ストマッキング袋
- (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 (直径 90 mm ~ 100 mm)
- (14) 白金耳、パスツールピペット
- (15) 滅菌ピペット (1 mL、2 mL、10 mL)
- (16) 滅菌コンラージ棒 (スプレッダー)

3. 希釈液、培地及び試薬

(1) 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered peptone water (BPW)

市販の BPW を使用する。

(2) Baird-Parker 寒天培地

① 基礎培地

市販品を使用する。

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

自家調製又は市販品 3.5 % 溶液を使用する。

③ 卵黄液 Egg yolk emulsion

自家調製 20 % 溶液又は市販品 30 % 溶液を使用する。

④ 培地調製

基礎培地を 121 °C で 15 分間オートクレーブした後、約 50 °C に保温する。亜テルル酸カリウム溶液及び卵黄液を加え、培地の厚さが 4 mm より厚く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 分注する。）。

4 °C で 24 時間まで保存が可能である。使用前に平板表面を乾燥させる（25 °C ~50 °C、培地表面の水滴が消えるまで）。

(3) 3 % 卵黄加マンニット食塩寒天培地

① 基礎培地

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

② 培地調製

基礎培地を 121 °C で 15 分間オートクレーブした後、30 % 卵黄液を 100 mL 加えて混合し、滅菌シャーレに分注し、固めた後乾燥して用いる。卵黄液の濃度が異なる場合は、終濃度が 3 % となるよう調製する。

(4) 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 (TSA) 培地を用いる。

(5) コアグララー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。

(6) コアグララーゼ試験用ウサギ血漿

市販品を用いる。

4. 試験手順 (図 1)

(1) 検体の調製

① 1 検体当たり約 100 g を採取する。検体は、原則として容器包装のまま採取する。ただし、ハム等のように、1 包装単位が 1 kg 以上に及ぶものは、切断して採取する。この場合、滅菌した器具及び容器を用い、汚染の起こらぬよう検体を採取すること。また、切断面で微生物が増殖したり、包装内面を伝わって断面部から微生物が内部に侵入しないように保管法にも注意すること。

② 採取した検体の運搬は、保冷容器を用い、氷等で 4 °C 以下に検体を保ち、速やかに検査に供することができるよう運搬すること。なお、冷凍状態のものは、ド

ライアイス等で凍結しつつ運搬すること。

- ③ 微生物試験に供する試料の調製は、製品（スライスハム等細切された製品を除く。）の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から 25 g を無菌的に採り試料とする。

スライスハム等細切された製品にあつては、滅菌した器具を用いて 25 g を無菌的に切断して採り、試料とする。

- ④ 試料をストマッカー袋に入れ、BPW 225 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。基準適合性を判定する場合は、10 倍乳剤で行う。なお、10 倍乳剤の 10 倍階段希釈液（100 倍、1,000 倍）を作製し、計数を行うことにより更に高い菌数を測定することができる。

(2) 菌選択分離試験

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シャーレ側面には触れないよう塗抹する。15 分間乾燥させた後、平板を逆さにして培養する。37 °C で 48 時間 ± 2 時間培養する。途中 37 °C で 22 時間 ± 2 時間にて観察、定型集落があればシャーレ裏面にマークしておく。

※ 定型集落とは、周囲に透明帯が存在する、黒又は灰色で、光沢のある隆起した円形集落を指す。集落の大きさは 22 時間 ± 2 時間培養では約 1 mm ~ 1.5 mm、48 時間 ± 2 時間培養では約 1.5 mm ~ 2.5 mm である。培養 22 時間 ± 2 時間以降では透明帯の内側で集落の周囲に直に白濁帯が観察される。

※ 非定型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、内臓肉の試験では注意が必要である。

- ② 3 % 卵黄加マンニット食塩寒天培地法 (Baird-Parker 寒天培地の代替培地として用いることができる。)

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、37 °C で 48 時間 ± 2 時間培養する。途中 37 °C で 22 時間 ± 2 時間にて観察、黄色ブドウ球菌と疑われる集落があればシャーレ裏面にマークしておく。

※ 黄色ブドウ球菌と疑われる集落とは、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のある隆起した直径約 1 mm ~ 2 mm の集落を指す。卵黄反応の弱い集落についてもコアグラゼ試験で確認する。

(3) 確認試験

① 純培養

選択分離培地上に発育した黄色ブドウ球菌と疑われる集落を 1 平板につき 2 個 ~ 5 個釣菌し、非選択性のトリプトケースソイ寒天 (TSA) 培地に塗抹、純培養を

行う。37 °Cで22 時間±2 時間培養する。

② 同定

・グラム染色

単離した集落でグラム染色を実施する。グラム陽性の球菌である。

・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（図2）は、純培養した集落を釣菌し、2 mL～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 °Cで22 時間±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 培養液が0.2 mL～0.3 mL 入った試験管にウサギ血漿0.5 mL を加え、軽く混和して、37 °Cの恒温水槽（ふらん器でも代替可能である。）で22 時間±2 時間まで観察しながら培養する。

観察は、培養後1 時間間隔で4 時間～6 時間まで血漿凝固の有無を調べ、完全凝固（全体がゼリー状となる。）又は部分凝固（一部がゼリー状となる。）した時点で陽性と判定する。なお、観察時に試験管を強く振らないことに注意すること。陰性のものは22 時間±2 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。

Baird-Parker 寒天培地上で、定型集落を形成し、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。3 % 卵黄加マンニット食塩寒天培地についても同様に、黄色ブドウ球菌と疑われる集落を形成し、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。

※ 市販の乾燥ウサギ血漿用いる場合は、添付の仕様書に従ってコアグララーゼ試験を行っても良い。ウサギ血漿を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用いること。

(4) 菌数測定

平板上に形成された集落数から、希釈倍数を考慮して、黄色ブドウ球菌菌数を算出する。基準適合性は、10 倍乳剤を接種した2 枚の寒天平板上に得られた黄色ブドウ球菌の全集落数により判定する。

図1 黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

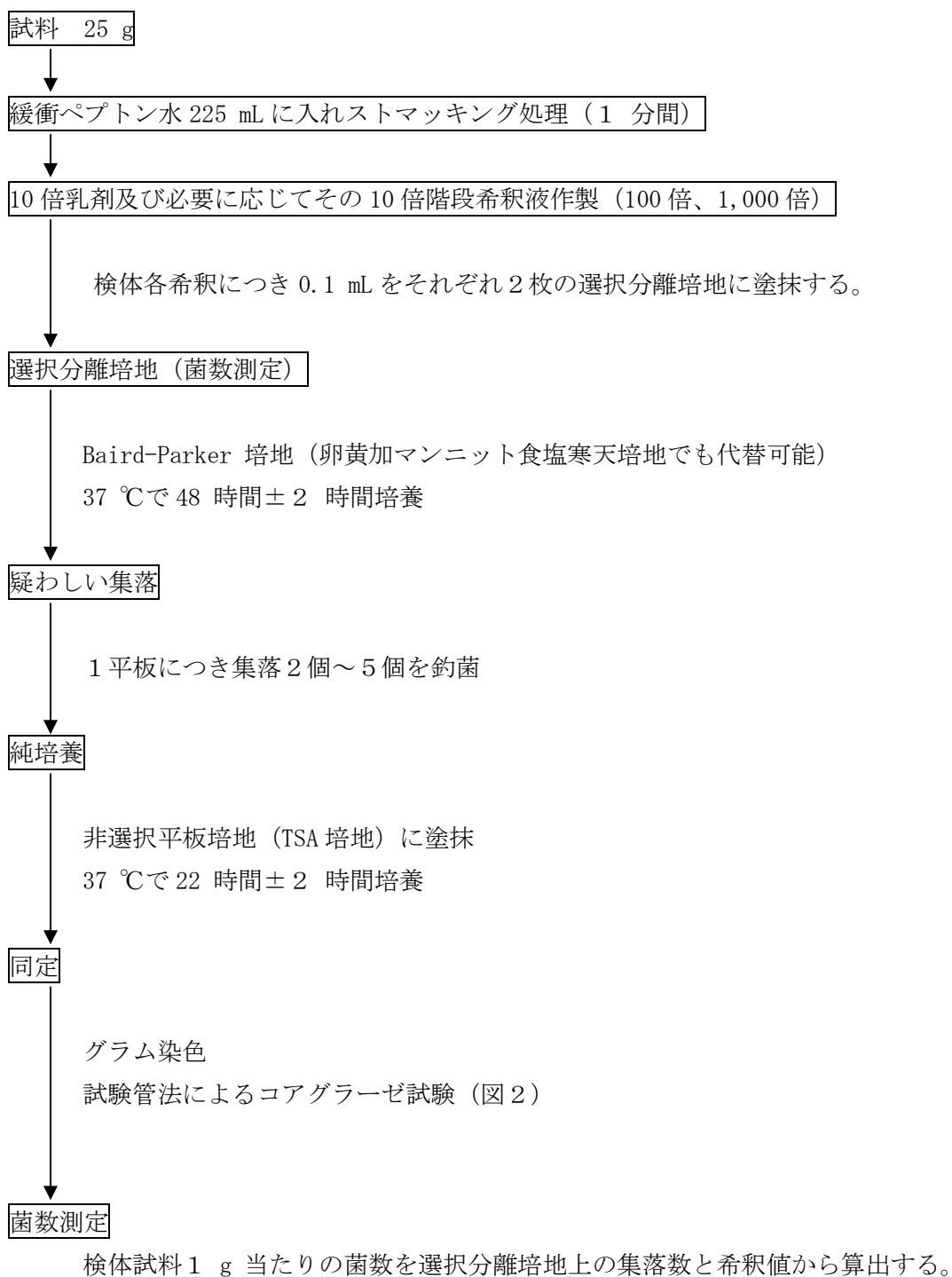
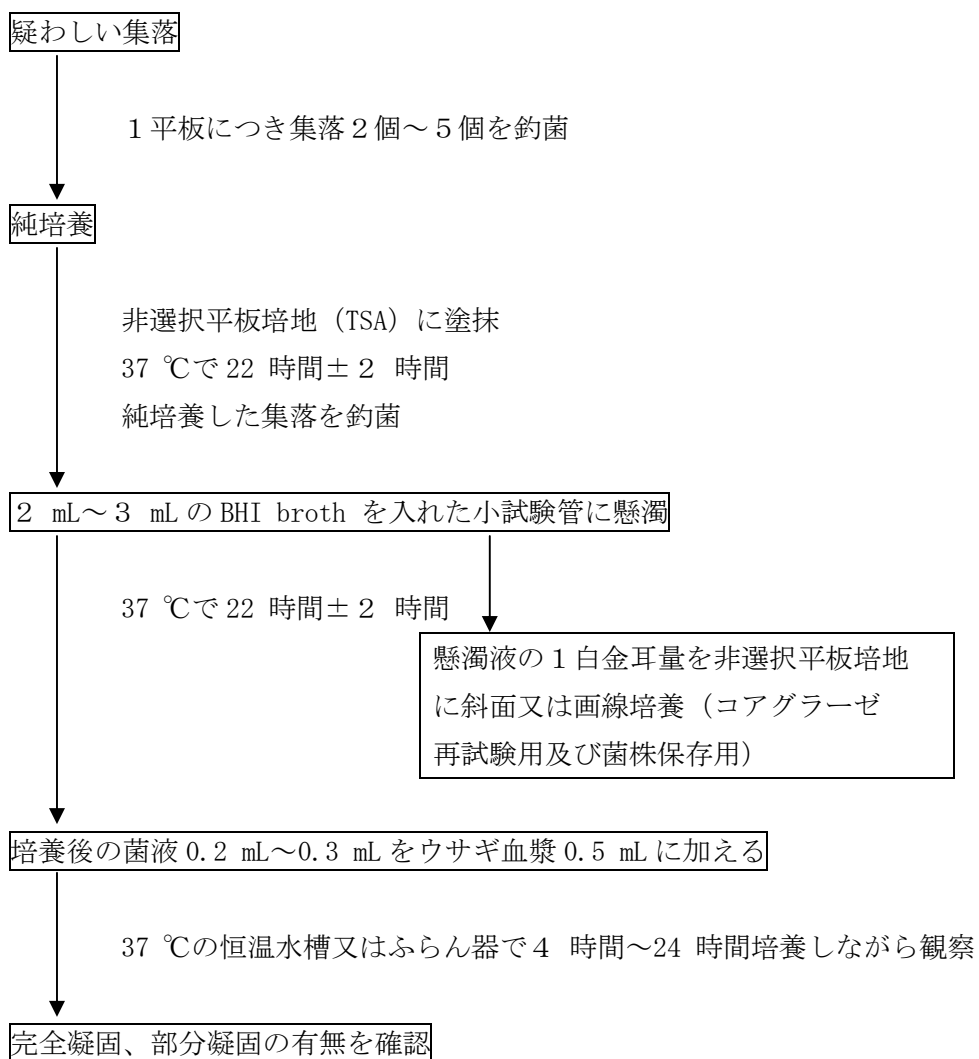


図2 試験管法によるコアグララーゼ試験



コアグララーゼ陽性と判定する。

希釈液、培地及び試薬の組成と調製

1. 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered peptone water (BPW)

組成

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

※ リン酸塩は、無水物や複数の水和物が存在するため、異なった水和物等を用いる場合はその分子量に合わせて、必ず重量補正を行うこと

2. Baird-Parker 寒天培地

(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
寒天 (ゲル強度により)	12 g ~ 22 g
精製水	1,000 mL
	pH 7.2±0.2

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

組成

K_2TeO_3	1.0 g
精製水	100 mL

※ 溶解 (微加熱可) 後、0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌、4 °Cで1ヶ月まで保存が可能である。

(3) 卵黄液 (20 %~30 %) Egg yolk emulsion

新鮮な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、又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、例えば 20 %卵黄液の場合、4 倍量の無菌精製水を加え、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 °C で保存し、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必要がなくなる。

(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* spp.) による汚染がある時にのみ使用が可能である。

組成

スルファメサジン	0.2 g
0.1M 水酸化ナトリウム	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し、4 °C で1ヶ月まで保存が可能である。

(5) 培地調製

組成

基礎培地	100 mL
亜テルル酸溶液（最終濃度 0.01 %）	1.0 mL
卵黄液（20 %）	5.0 mL
（スルファメサジン溶液 2.5 mL）	

基礎培地を 121 °C で 15 分間オートクレーブした後、約 50 °C に保温する。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の厚さが 4 mm より厚く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 分注する。）。組成中に市販の 30%卵黄液を使用する時は、滅菌精製水を用いて所定濃度になるよう調整する。

保存する場合は 4 °C で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ない）。使用前に平板表面を乾燥させる（25 °C ~ 50 °C、培地表面の水滴が消えるまで）。

市販生培地の使用が可能である。ただし、市販の生培地については、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能）

(1) 基礎培地

組成

肉エキス	1 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	75 g
マンニット	10 g
寒天	15 g
フェノールレッド (0.2 % 溶液)	12 mL
精製水	850 mL
	pH 7.4±0.2

(2) 培地調製

基礎培地を 121 °C で 15 分間オートクレーブした後、20 % 卵黄液を 150 mL 加えて混合し、滅菌シャーレに分注し、固めた後乾燥して用いる。

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

※ 市販生培地の使用が可能である。

4. コアグラージェ試験用ウサギ血漿

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を仕様書のとおり希釈して用いる。新鮮なウサギ血漿を 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 % 加えること。自家調製する場合は、既知の黄色ブドウ球菌株を用いて、凝集を確認したのものを用いる。