



新しい微生物学検査 — 色素・蛍光基質と培地を 使用して

M. MANAFI

- 蛍光/色素基質を選択培地に添加することで、サブカルチャーの必要性や微生物を同定するための生化学試験を省くことが可能となる。
- このような手法は分離用寒天平板あるいは液体培地中で直接的な微生物の検出を可能にする。

蛍光基質

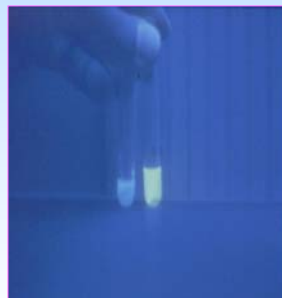
- 蛍光色素 (8-アニリノ-1-ナフタレン-スルホン酸,ANS)
- pH 蛍光指示薬 (アクリジン、7-ヒドロキシクマリン)
- 酸化還元指示薬 (メチレンブルー、ヤヌスグリーンB、インジゴカルミン)
- 酵素基質



- 蛍光酵素基質は、一般に、糖やアミノ酸などの特異酵素に対する特異基質と蛍光物質からなり、紫外線を目視可能な光に変換する。

蛍光酵素基質はほとんどクマリンから誘導されており、

- 4-メチルウンベリフェロン (4-MU)
- 7-アミド-4-メチルクマリン
- 4-トリフルオロ-メチルウンベリフェロン (4-TMU)



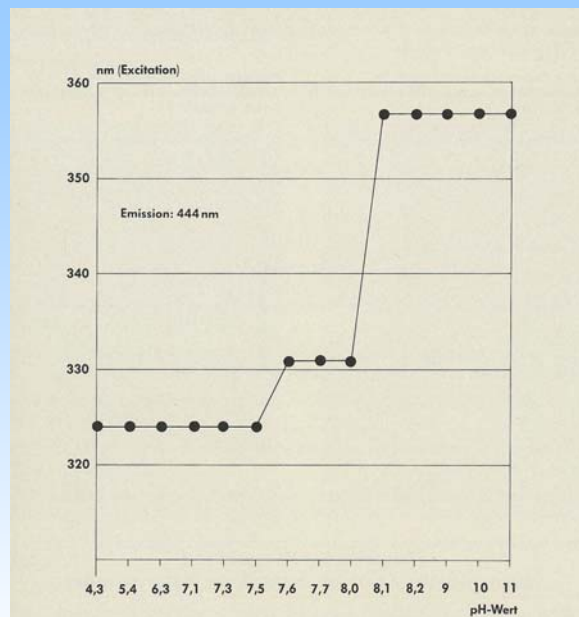
メチルウンベリフェリル基質の限界

- UVランプが必要
- pH依存性
- 寒天平板では拡散

メチルウンベリフェリル基質の利点

- 水溶性
- 熱安定性
- 高感度
- 健康上の危険無し
- 手ごろな価格
- 広範囲な基質
- 公定法

pH依存性



色素基質

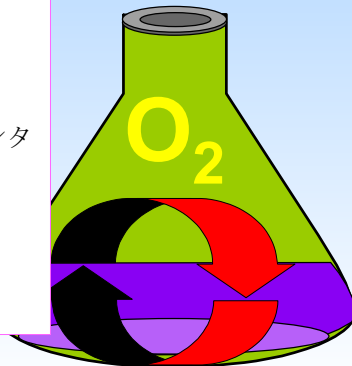
一般的に4種の色素化合物の識別が可能

- 自己発色基質
- 分子内再配列
- 同時捕獲基質
- 培養後のカップリング基質

発色化合物

- o-, および p-ニトロフェノール
- p-ニトロアニリン (PNA)
- 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル (X, ターコイズブルーからミントグリーン)
- 6-クロロ-3-インドリル (サーモンピンク)
- 5-ブロモ-3-インドキシル- (群青色)
- 5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシル-マゼンタ (紫色から赤紫色)
- 6-クロロ-3-インドキシル- (淡紅色、ばら色から淡紅色)
- N-メチルインドキシル- (緑色)

高価格
酸素要求性



蛍光基質および色素基質を含んだ培地

食品および水

- *E. coli* & *coliforms*
- *E. coli* O157:H7
- *Enterobacteriaceae*
- *E. sakazakii*
- *Salmonella* spp.
- *Pseudomonas* spp.
- *Vibrio* spp.
- *C. perfringens*
- *L. monocytogenes*
- *S. aureus*
- *B. cereus*
- *Enterococci*

臨床

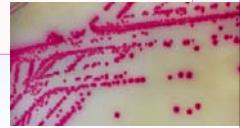
- ✓ UTI
- ✓ *Candida* spp. (*albicans*)
- ✓ グラム鑑別
- ✓ MRSA

酵素法

- 近年、大腸菌群の検出に β -D-ガラクトシダーゼ、そして*E. coli*の検出には β -D-グルクロニダーゼを使用した手法が広く利用され、受け入れられています。
- β -D-グルクロニダーゼは、 β -D-glucopyranosiduronic 誘導体を加水分解して、類似のアグリコンやD-グルクロン酸を産生する。
- β -D-グルコニダーゼは*E. coli*の94-97%に存在する。他の*Escherichia* spp.はこの酵素を産生しない。
- *Salmonella*、*Shigella*、*Yersinia*もこの酵素を産生。

β -D-グルクロニダーゼ(*E. coli*)活性は以下のような種々の色素基質及び蛍光基質を使用して測定できる

- p-ニトロフェノール- β -D-グルクロニド (PNPG)
- 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロニド (BCIG)
- フェノールフタレン-モノ- β -D-グルクロニド
- 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニド (MUG)
- 8-ヒドロキシキノリン- β -D-グルクロニド (HQQ)
- 6-クロロ-3-インドキシル- β -D-グルクロニド (Salmon-glu)、
- 5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシル- β -D-グルクロニド (magenta-glu)



β -D-ガラクトシダーゼ (大腸菌群) は以下のような種々の色素基質を使用して検出できる

- o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG),
- 6-Chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (Salmon-Gal),
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
- 5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (magenta),
- 8-hydroxychinoline- β -D-galactoside,
- 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUGal),
- 5-iodo-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (Iodo-gal),
- N-Methylindoxyl- β -D-galactopyranoside (Green-gal),
- cyclhexenoesculetin- β -D-galactoside (CHE-gal),
- 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside
- P-Naphtholbenzin- β -D-galactoside (PNB-gal)



E.coli /Coliforms

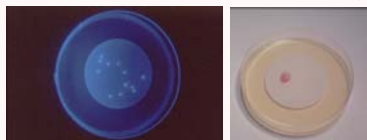
Chromocult® Coliform Agar& Chromocult® Coliform Agar ES Chromoplate Coliform Agar	Merck
Chromocult® TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) Agar	Merck
RAPID® E. coli 2	Bio-Rad
Harlequin™ E.coli / Coliform Medium	lab m
Harlequin™ TBGA	lab m
CHROMagar® E.coli	CHROMagar
CHROMagar® ECC	CHROMagar
Coli 2G-Agar	Heipha
ECD-Agar with MUG	Heipha
EMX-Agar	Heipha
Fluorocult® ECD-Agar	Merck
Fluorocult®VRB Agar	Merck
Fluorocult® MacConkey Agar	Merck
Selective E.coli /Coliform-Chromogen-Agar	Oxoid
TBX	Oxoid
TBX/Agar	Bio-Rad
3M Petrifilm™ E.coli/Coliform Count Plate	3M
Coli ID medium	BioMérieux

E. coli 検出用培地

• **TBX 寒天**

TBX寒天はトリプトン胆汁酸培地の改良品で、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド (X-GLUC or BCIG) が添加されている。GUDは、酵素基質 BCIG を分解して色素物質を生成し、明瞭で判定しやすい青緑色のE.coliのコロニーを形成する。

• **フルオロカルト培**



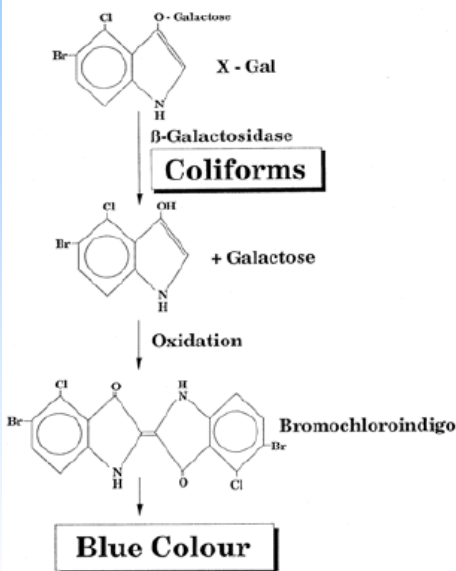
and the
Readycult[®]
method is more
economical too!

レディーカルト コリフォーム
操作法

レディーカルト・ブリスター
パック1個を100ml 検体に
加え、35-37°Cで18-24時間
培養後判定



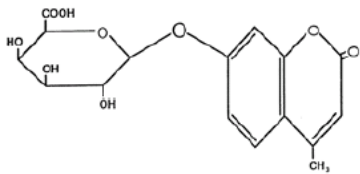
Detection of β -Galactosidase
Activity of Coliforms



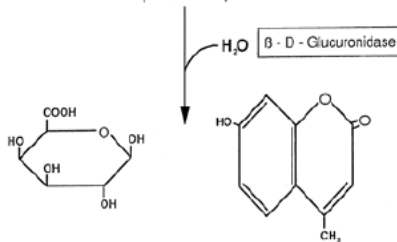
大腸菌群により色が
青-緑に変化



***Detection of β -Glucuronidase
Activity of *E. coli****



4 - Methylumbelliferyl - β - D - glucuronide (MUG)
(colourless)



Glucuronic acid
(colourless)

4 - Methylumbelliferone
(fluorescent)

E. coli

蛍光

青緑色の有

無

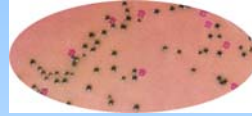
インドール



特 徴

- 調製済みブリスターパック型
- 現場で使用可能にデザイン
- 培地の調製不要
- 操作時間は1分以内
- 単に培地を加え、培養、判定するだけ
- 判定は18時間から24時間以内
- 明確な色の変化・蛍光による簡単な検出
- 濁った水でも分析可能

***E. coli* O157:H7**

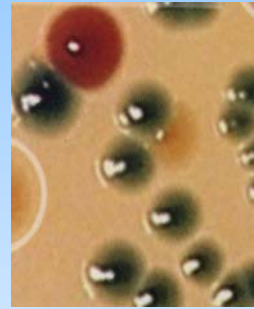


Medium	Composition	Reference
MacConkey-Sorbitol Agar (MSA) or “SMAC”	MacConkey’s with 1% sorbitol replacing lactose	March and Ratnam, 1986
MSA-MUG	SMAC + MUG	Szabo ,1986
BCIG MSA- (USDA)	SMAC + BCIG	Okrend <i>et al.</i>, 1990
CR-SMAC	SMAC + Cefixime + Rhamnose	Chapman <i>et al.</i>, 1991
CT-SMAC (FDA)	SMAC +Cefixime + Tellurite	Zadik <i>et al.</i>, 1993
HQG-SMAC	8-hydroxyquinoline-β-D-glucuronide	Reinders <i>et al.</i>, 2000

<i>E.coli</i> O157:H7	BCM® <i>E.coli</i> O157:H7 (+)	License from Heipha
	R&F <i>E.coli</i> O157:H Agar	R&F Laboratories
	Fluorocult® <i>E.coli</i> O157:H7-Agar	Merck
	Fluorocult®HC-Agar after SZABO	Merck
	O157:H7 ID-Medium	BioMérieux
	CHROMagar® O157	CHROMagar
	BBL™ CHROMagar™ O157	BD
	Harlequin™ SMAC-BCIG	lab m
	Rainbow®Agar O157	Biolog



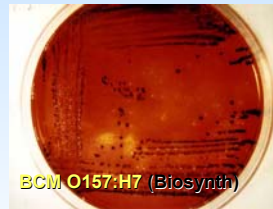
Fluorocult E.coli O157:H7 (Merck)



E. coli O157:H7 ID (BioMerieux)



Rainbow agar O157 (Biolog)



BCM O157:H7 (Biosynth)

Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting Escherichia coli O157:H7 in food.
Int J Food Microbiol 2001 Dec 30;71(2-3):257-62.

サルモネラ

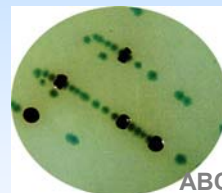
既存のサルモネラ検出用培地の特異性は非常に低く、まれにある陽性のサルモネラの中から、多数の擬陽性を判定する結果となっている(例：**Citrobacter, Proteus**)。

疑わしいコロニーについての不要な検査に対する負担が非常に大きいため、ルーチン検査において陽性サルモネラコロニーを見過ごし、てしまいがちである。

Salmonella spp	Rambach Agar	CHROMagar/Merck/Heipha
	AES Salmonella Agar plate (ASAP)	AES
	Salmonellen-Ident-Agar	Heipha
	Salmonellen-Ident-Agar/XLD-Agar (double plate)	Heipha
	SM ID medium	BioMérieux
	SM ID 2-medium	BioMérieux
	Salmonella-Chromogen-Agar (OSCM)	Oxoid
	X.L.D.Agar/Chromogenic Salmonella selective agar (double plate)	Oxoid
	BBL™ CHROMagar™ Salmonella	BD
	Harlequin™ Salmonella ABC	lab m
	Rainbow® Salmonella Agar	Biolog
	R&F Salmonella agar	R&F Laboratories

サルモネラ

色素酵素基質及び蛍光酵素基質の使用により、サルモネラの迅速・簡易検出が可能にする。



Rainbow

ランバック寒天 (メルク)

ランバック寒天はプロピレングリコール、ペプトン、酵母エキス、デオキシコール酸ナトリウム、ニュートラルレッド、Xgal から構成されている。プロピレングリコールから形成される酸によりサルモネラコロニー中のニュートラルレッドが沈殿して赤色に呈色する。

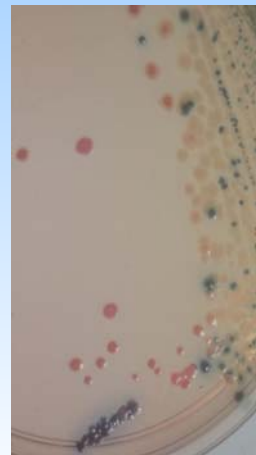
ランバック寒天の主な欠点は *S. typhi*、*S. paratyphi* を検出できないこと。 *S. moscow* や *S. wassenaar* などある種のまれな株も検出できないこと。さらに、 *S. arizona* などβ-D-ガラクトシダーゼを産生するサルモネラが検出できないことである。

(Rambach 1990).



SM-ID 1 寒天 (bioMérieux)

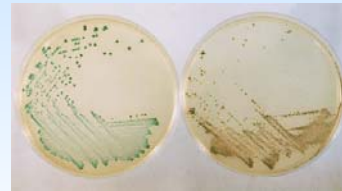
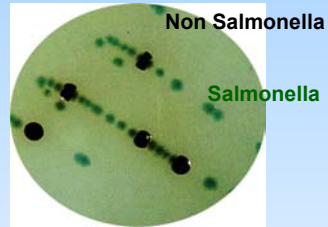
- **SM-ID 1** 寒天ではサルモネラのコロニーがその独特な赤色で検出され、他方大腸菌群は青色、紫色、無色などを呈する。**SM-ID** 培地に使用されている生化学的特性は、**ニュートラルレッド指示薬と組み合わせたグルクロン酸からの酸の生成**である。
- β-ガラクトシダーゼ (**Xgal**) と β-グルコシダーゼ (**Xglu**) に対する2つの色素基質によりサルモネラ(陰性)の他の腸内球菌からの鑑別が可能。使用する選択剤は胆汁塩とプリリアントグリーン。 (**Dusch& Altwegg 1995**)



ABC-サルモネラ (Lab M., UK)

ABC培地には3, 4-シクロヘキセノエスクレチン-β-D-ガラクトシドと5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-α-D-ガラクトピラノシドが含まれており、**Salmonella spp.**の選択分離を促進する。

この培地はβ-ガラクトシダーゼ非活性、α-D-ガラクトシダーゼ活性により**Salmonella spp.**が腸内細菌科の他のメンバーから区別できるという事実を生かしたものである(Perry et al. 1999)。

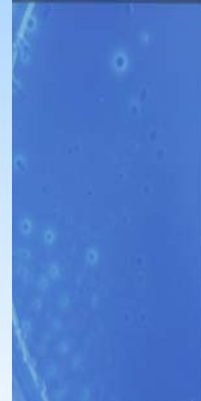
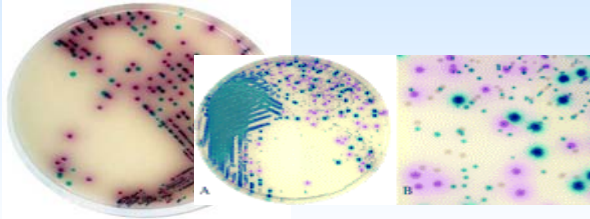


サルモネラの分離・推定同定用の色素寒天プレート市販品 色素培地

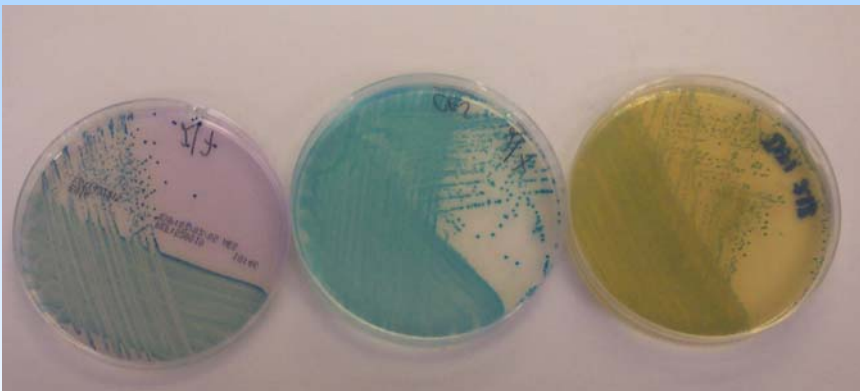
色素培地						
	Rambach agar	SMID 2	CHROMagar Salmonella	ABC medium	CSE agar	Compass Salmonella agar
製造元	Merck	bioMérieux, France	CHROMagar Microbiology, France	Lab M. Ltd., United Kingdom	PPR Diagnostics Ltd., United Kingdom	Biokar diagnostics, France
サルモネラの検出						
原理	Propylène glycol metabolisation	β-D-glucuronate metabolisation	Esterase detection	α galactosidase detection	Esterase detection	Esterase detection
指示薬	Phenol red acidification	Phenol red acidification	Patented substrate	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside	4-[2-(4-octanoyloxy-3-5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-quinolinium-1-[propan-3-yl carboxylic acid] bromide.	5-bromo-6-chloro-3-indolyl-caprylate
コロニーの色	Red	Pink	Mauve	Green	Burgundy	Magenta
他の腸内細菌との判別						
検出酵素	β-D-galactosidase	β-D-galactosidase	β-D-galactosidase	β-D-galactosidase	No	β-glucosidase
使用基質	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	Patented substrate	3,4-cyclohexenoesculetin-β-D-galactoside	No	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside
コロニーの色	Blue, salmon or colorless	Blue or green	Blue or white	Black of grey	Colorless	Blue

カプリル酸 エステラーゼ

- **MUCAP TEST** は蛍光性 4-メチルウンベリフェリル-カプリル酸を用いたカプリル酸 エステラーゼ迅速検出に基づいたサルモネラ菌用の確認試験である。C8エステラーゼの存在下、4-メチルウンベリフェリル(4-MU)の放出により基質が切断される。
- コロンビア寒天に発育させた各コロニーに **MUCAP**を1 滴加え、1~5分間UVライト(366nm) 下で観察する。強度の青い蛍光は **Salmonella spp.** の存在を示す。

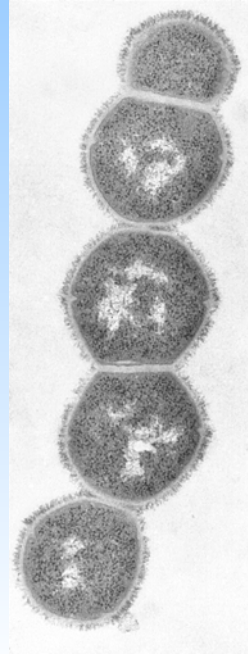


Enterobacter sakazakii	ESIA chromogenic medium	AES
	Enterobacter sakazakii – Chromogen-Agar	Oxoid
	Chromocult Enterobacter sakazakii – Agar	Merck



P-056 (Manafi and Lang) : *Enterobacter sakazakii* 検出用の3種の色素基質培地の比較;
a Preliminary Study, ASM 2005 (Atlanta)

腸球菌の 検出及び増菌



腸球菌

- 腸球菌は水および食品の糞便汚染の指標として使用されている。
- 「腸球菌」と「糞便性連鎖球菌」は時折同じ意味で使用されている。
- 「腸球菌」はLancefield分類のD群レンサ球菌である *S. faecalis* と *S. faecium* を指し、「糞便連鎖球菌」はすべての連鎖球菌が含まれる。

クリニカルマイクrobiオロジーマニュアル
第7版1999年

- **Gruppe I: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus***
- **Gruppe II: *E. faecalis*, *Lactococcus spp.* *E. faecium*, *E. Casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum***
- **Gruppe III: *E. durans*, *E. hiraе*, *E. dispar***
- **Gruppe IV: *E. sulfureus*, *E. cecorum***
- **Gruppe V: *E. columbae*, *Vagococcus fluvialis***

β -D-グルコシダーゼ

- 腸球菌用の優れた選択培地を探す試みは1918年までさかのぼり約100種の培地が提示、検討されているが、十分に満足できるものはない。
- 主な腸球菌の全てが β -D-グルコシダーゼ (**β -GLU**)を産生することが知られている (EC. 3. 2. 21)。

- 色素及び蛍光基質を用いた β -D-グルコシダーゼ活性の検出は、少なからぬ注目を集めている。
- 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロシド (Littel and Hartman 1983) やインドキシル- β -D-グルクロシド (Dufour 1980) などの基質は既に β -D-グルコシダーゼ活性の検出の項に記載されている。

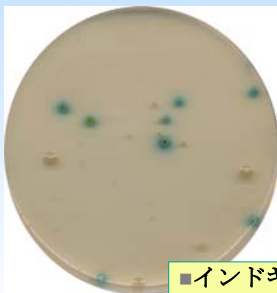
腸球菌：



Slanetz-Bartley 寒天



カナマイシン エスクリン
アザイド寒天



■インドキシル- β -D-グルクロシド
(mEI 寒天)

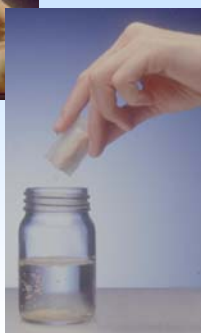
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルコ ピラノシド (XGLU) ド (BCIG)

クロモカルト腸球菌バイオンと レディーカルト腸球菌 (メルク)

M. Manafi: 新しい色素基質法による水中腸球菌の迅速な同定
1997年5月3-8日第97回アメリカ微生物学会にて発表

クロモカルト腸球菌バイオンとレディーカルト腸 球菌 (メルク)

■腸球菌
色の変化 緑色に

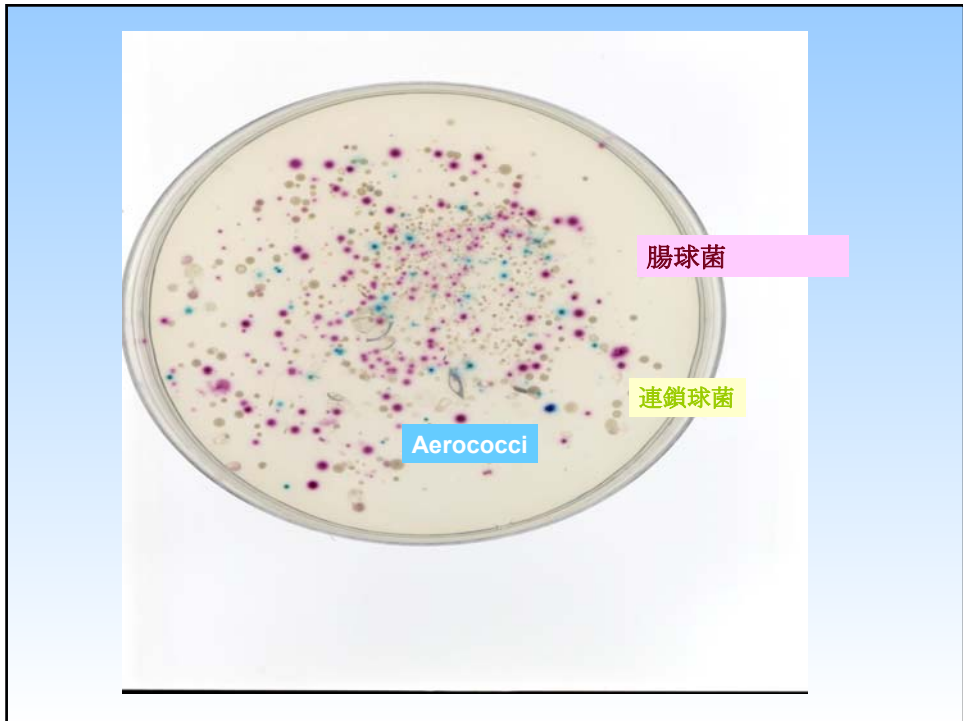


クロモカルト腸球菌ブイヨンと レディーカルト腸球菌 (メルク)

- レディーカルト腸球菌は100ml 検水用にブリスターパック式で提供。
- 発色体**X-GLU**を使用して腸球菌の有無を調べるため、パック**1個**にクロモカルト腸球菌ブイヨンが必要量含まれる。
- アジ化ナトリウムはグラム陰性菌などの共存する細菌を抑制し、**X-GLU**は非常に特異的に腸球菌を検出、厳選されたペプトンにより発育を促進。

利 点

- 調製済みブリスターパック型
- 培地の調製不要
- 操作時間は**1分以内**
- 培地を加えて培養・判定するだけ
- 判定は18時間から24時間以内
- 明確な色の変化による簡単な検出
- 作業時間と材料費を軽減



***Listeria monocytogenes*/*L.ivanovii* および
Listeria spp.**

Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti ,(ALOA™)	AES /Biolife
BBL™ CHROMagar™ Listeria	BD
CHROMagar® Listeria	CHROMagar
Oxoid Chromogenic Listeria Agar (OCLA)	Oxoid
Rapid`L.mono	Bio-Rad
BCM® <i>Listeria monocytogenes</i> plating medium	License from Biosynth
R&F <i>Listeria monocytogenes</i> detection system	R&F Laboratories
3M Petrifilm™ Environmental Listeria plates	3M
Listeria Agar after Ottaviani und Agosti	Heipha
LIMONO-Ident-Agar	Heipha

HEMOLYTIC, PI-PLC, AND LISTERIOLYSIN ACTIVITIES IN 77 *LISTERIA*^a

<i>Listeria</i> spp.	# of Strains	% β -Hemolytic ^b	% PI-PLC ^c	% <i>hylA</i> Gene
<i>L. welshimeri</i>	11	0	0	0
<i>L. seeligeri</i>	20	100	0	0
<i>L. ivanovii</i>	8	100	87.5	0
<i>L. innocua</i>	18	0	0	0
<i>L. mono</i>	20	90	100	100

^aListeria ID using BAM methods, ^b5% sheep blood agar

^cTurquoise colonies on BCM[®] *L. monocytogenes* plating medium

Kindly provided by K.C. Jinneman, J.M. Hunt, and J.M. Johnson, FDA, Bothell, WA.

BCM (*Listeria monocytogenes* 検出システム)

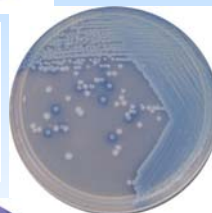
選択増菌ブイヨン中の 4-MU-IP (4-MU-ミオイノシトール-1-リン酸) →

L. monocytogenes は青色の蛍光を発する(4-MU)



平板培地中の X-IP (5-プロモ-4-クロロ-3-インドキシル-ミオイノシトール-1-リン酸)

BCML *monocytogenes* では *L. monocytogenes* と *L. ivanovii* は PI - PLC の酵素反応により青緑色の凸型コロニーを形成する (Restaino, et. al. 1999)。

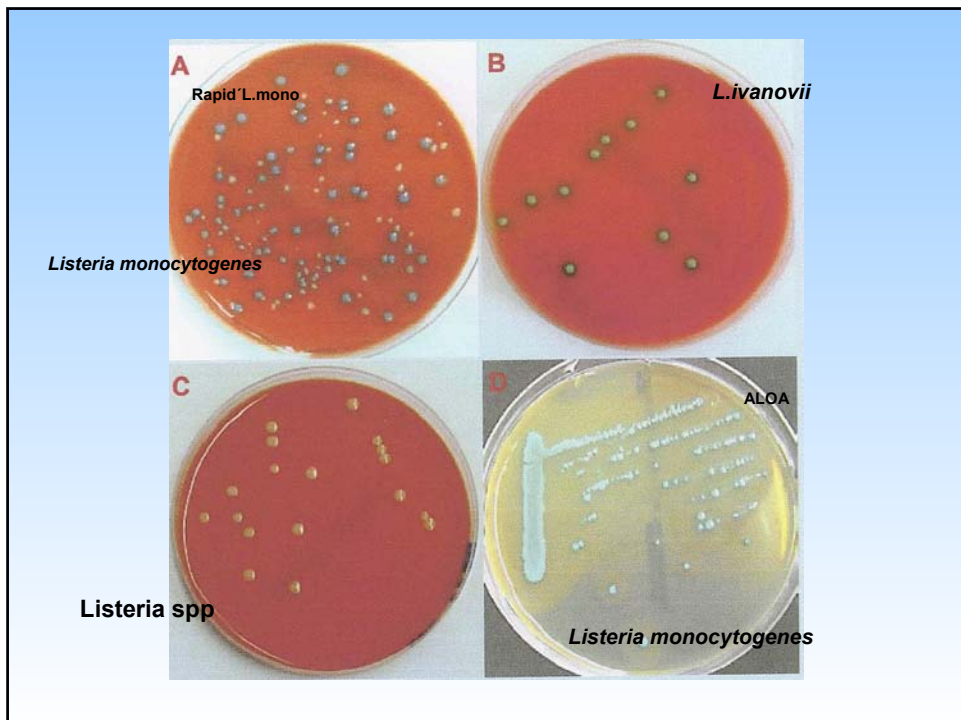


リステリア菌を *L. ivanovii* から分離する蛍光確認培地及び/又はラムノース由来酸



ラピッドL'MONO寒天 Rapid L`MONO agar (Sanofi, France) はホスファチジルイノシトールフォスホリパーゼC (PI-PLC)と キシロース発酵の検出に基づく。その結果、*L. ivanovii* のコロニーは黄色のハロー（キシロース陽性）に囲まれた青色となる一方、*L. monocytogenes* はハローのない（キシロース陰性）青色となる。他の *Listeria spp.* のコロニーは、PI-PLC 活性がないため白色のままである (Kapriskova et al. 2000).

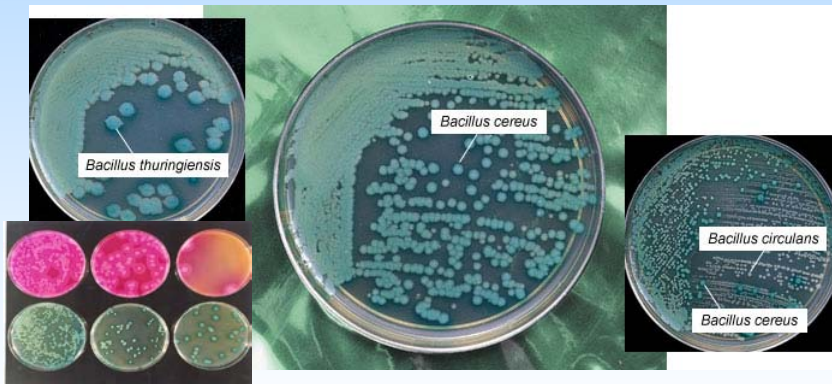
ALOA培地 では*L. monocytogenes* は特徴のある不透明なハローに囲まれた青味がかかったコロニーに発育する (Vlaemynck, 2000)



セレウス菌

<i>Bacillus cereus</i> group (<i>B.anthraxis</i> ; <i>B.cereus</i> , wild-type and differentiation from probiotic strains; <i>B.thuringiensis</i> ; <i>B.mycooides</i> , <i>B.weihenstephanensis</i>)	BCM® <i>Bacillus cereus</i> group plating medium	License from Biosynth
	Cereus-Ident-Agar	Heipha
	R&F <i>Bacillus anthracis</i> agar	R&F Laboratories
	<i>Bacillus cereus</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> agar	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus Cereus</i> - chromogen -selective	Oxoid

菌種によるホスファチジルイノシトール特異性フォスホリパーゼC (PI-PLC) 活性の検出に基づき、***B. cereus*** と ***B. thuringiensis*** 株は5-ブromo-4-クロロ-3-インドキシル-ミオ-イノシトール-1-リン酸とPI-PLC 酵素反応により青緑色のハローがあるものと無い青緑色の平らで光沢のないコロニーを形成する。



黄色ブドウ球菌

<i>Staphylococcus aureus</i>	CHROMagar® Staph.aureus	CHROMagar/BD/Mast
	3M Petrifilm™ Staph Express Count Plate	3M
	<i>S.aureus</i> ID Agar (SA ID)	BioMérieux
MRSA	CHROMagar® MRSA	CHROMagar/Mast

•CHROMagar□ *S. aureus* medium (CHROMagar, France)を使用すると *S. aureus* のコロニーはピンク色を示す。18種に分類されているブドウ球菌の内、*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. caprae*、*S. schleiferi* はピンク色のコロニーを形成する。

• SAID(bioMerieux)を使用すると *S. aureus* は緑色のコロニーを形成。



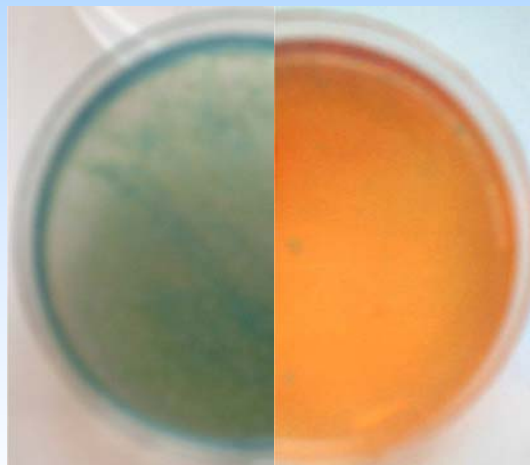
A BP Agar: Baird- Parker
B Agar, RPFA: Baird- Parker
 RPF SAID: Staph aureus ID,
C CSA: CHROMagar *S.aureus*
A: *S. aureus*;
B: *S. caprae*;
C: *S. carnosus*;
D: Gram+ Stäbchen,
E: Gram+ Stäbchen,
F: *Proteus vulgaris*

各種培地を用いた偽陽性の結果

Stamm (Anzahl isolierter Stämme)	Wachstum auf BP f.p. / r.n.		Wachstum auf RPFA f.p. / r.n.		Wachstum auf SAID f.p. / r.n.		Wachstum auf CSA f.p. / r.n.	
	f.p.	r.n.	f.p.	r.n.	f.p.	r.n.	f.p.	r.n.
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	4	0	0	4	3	1	2	2
<i>S. capitis</i> (5)	0	5	0	5	5	0	4	1
<i>S. caprae</i> (2)	0	2	0	2	2	0	2	0
<i>S. carnosus</i> (1)	1	0	0	1	0	1	1	0
<i>S. hämolyticus</i> (3)	0	3	0	3	0	3	1	2
<i>S. hominis</i> (2)	1	1	0	0	1	1	1	1
<i>S. lentus</i> (1)	0	1	0	1	1	0	1	0
<i>S. lugdunensis</i> (3)	0	3	0	3	2	1	3	0
<i>S. sciuri</i> (9)	2	7	0	9	7	2	3	6
<i>S. warneri</i> (2)	2	0	0	2	0	2	1	1
<i>S. xylosois</i> (4)	2	2	1	3	1	3	0	3
Gram+ Stäbchen (58)	3	56	0	58	7	51	26	32
Gram- Stäbchen (12)	1	11	0	12	2	10	1	11

CHROMagar 黄色ブドウ球菌: 食品基材の影響

生乳



肉

- この検討では、新しい2種の色素基質平板培地、**S.aureus ID (SAID)** と **CHROMagar S.aureus (CSA)**を試験した。従来品の培地として**Baird-Parker Agar (BP Agar)** と **Baird-Parker RPF Agar (RPFA)**を用い、**100**の食品検体について黄色ブドウ球菌の有無を評価する能力を比較した。更に**4種**の培地すべてについて回収率を調査した。基準培地としてヒツジの血液寒天を使用した。

- 検討した培地はすべて高感度（すべての培地で100%）であることが確認できた。しかし特異性と発育支持能には違いがあった。
- Baird-ParkerRPR 寒天（RPFA）が最も優れており、特異性98.7%、発育支持能99.0%であった。
- BP寒天は66.3%と70.6%
- SAIDは59.2%と62.5%
- CSAは59.9%と64.4%

- すべての非***S. aureus*** 株が***S. aureus*** と簡単に識別できたわけではなかった。特に**SAID** と**CSA** はかなりの偽陽性があった。**SAID**ではルード(**rood**)だけでなく非***S. aureus*** 株もいくつか緑色のコロニーを形成した。**CSA**ではいくつか陽性と陰性の連鎖球菌を凝集し、さらに代表的な連鎖球菌でないルードなどは偽陽性を示した。

- **RPFA**(注入プレート法として) は回収率(88.3%) の点で最も有効な培地であることを確認した。**BP Agar**、**RPFA**(表面培養法として)、**SAID**の回収率は75.3%~79.1%であったが、**CSA**は極めて低い回収率27.9%であった。



ビブリオ菌

- **V. parahaemolyticus** コロニーはこの培地では紫色に発色し、関連の細菌株から識別できた。
- **V. parahaemolyticus** は色素基質寒天を用いた場合、現在**V. parahaemolyticus** の分離に使用されている**TCBS**寒天培地より天然の海産物から高頻度に分離できた。

ウェルシュ菌 (*C. perfringens*)の検出

- ウェルシュ菌は糞便汚染の指標である。
- ウェルシュ菌の芽胞は水の精製工程の有効性を表す。
- 潜伏性病原菌(ウイルス、オーシストなど)の存在に対する指標の可能性

グラム鑑別

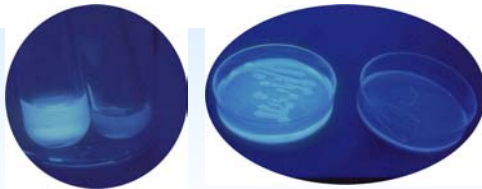
Fluorogenic dye: 8-anilino-1-naphthalene-sulphonic-acid (ANS)



L-alanine-aminopeptidase

L-alanine-4-nitroanilide (LANA, BactidentR Aminopeptidase, Merck)

L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin (AAMC) (Gramsure, remel)



Manafi 1991, J. Appl. Microbiol,

けつろん

結論として、酵素法（EDM）はある種の微生物の特異的な酵素活性を利用した強力な手法であることが確認できた。

蛍光または色素基質を選択培地に添加することで、サブカルチャーの必要性やある微生物を同定するための生化学試験を削除することが可能になる。これらの酵素試験法は、水中や食品中の微生物を算定することにおいて、迅速、特異的、高感度の革新的手法であるといえる。

将来の需要と考察1

既存色素基質・蛍光基質

- さまざまな色調を発色し、発色後の識別を増長させるために色素基質をミックスする。

- 色素基質、pH 指示薬および炭水化物の組み合わせより特異的分離のために従来法に対して現在の色素基質を使用

例:グリコシダーゼ
色素基質と硫化水素産生の組み合わせ

- 病原菌や指標菌の同定、分離のために別の要素を付加する

将来の需要と考察2

他の酵素に対する新しい色素基質・蛍光基質の作製

- 他の酵素:

- 非病毒性対病毒性因子
- 酵素の特異性
- 複数の病原菌に対する使用

- 例:

- 他のホスホリパーゼC酵素
- デカルボオキシラーゼ (Decarboxylase)
- *Campylobacter* と *E. coli* O157:H7
- 種特異酵素・病毒性因子?