

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3733143号

(P3733143)

(45) 発行日 平成18年1月11日(2006.1.11)

(24) 登録日 平成17年10月21日(2005.10.21)

(51) Int. Cl.

C12Q 1/14 (2006.01)

F I

C12Q 1/14

請求項の数 5 (全 32 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-531945 (86) (22) 出願日 平成9年5月27日(1997.5.27) (65) 公表番号 特表2001-508305(P2001-508305A) (43) 公表日 平成13年6月26日(2001.6.26) (86) 国際出願番号 PCT/US1997/008825 (87) 国際公開番号 W01998/032874 (87) 国際公開日 平成10年7月30日(1998.7.30) 審査請求日 平成16年5月27日(2004.5.27) (31) 優先権主張番号 08/785,398 (32) 優先日 平成9年1月23日(1997.1.23) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 ミネソタ・マイニング・アンド・マニュファクチャリング・カンパニー アメリカ合衆国55144-1000ミネソタ州セント・ポール、スリーエム・センター</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 稜</p> <p>(74) 代理人 弁理士 山本 宗雄</p> <p>(72) 発明者 マーク、パトリック・エイ アメリカ合衆国55133-3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス33427</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 ブドウ球菌を選択的に検出するための増殖培地

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ブドウ球菌の増殖のために選択される成分、および指示物質としてグルコピラノシド指示物質のみを含み、該グルコピラノシド指示物質の含有量が、試料を培地中で培養するときに、ブドウ球菌を含有するコロニーは着色されないでバチルス微生物を含有するコロニーが着色されることにより、ブドウ球菌を含有するコロニーとバチルス微生物を含有するコロニーとを識別するのに十分な量である、試料中のブドウ球菌を検出するための培地。

【請求項2】

検出可能なコロニーを生じる条件下で請求項1に記載の培地中で試料を培養する工程；を包含する、試料中のブドウ球菌を検出する方法。

【請求項3】

検出可能なコロニーを生じる条件下で請求項1に記載の培地中で試料を培養する工程；を包含する、試料中のブドウ球菌を検出し、試料から増殖したブドウ球菌のコロニーと、試料から増殖したバチルス微生物等の他の微生物のコロニーとを識別する方法。

【請求項4】

該試料中のブドウ球菌の有無を確認することを更に含む、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

該試料中のブドウ球菌を計数することを更に含む、請求項2又は3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、試料中に *Staphylococcus aureus* を含むブドウ球菌を検出および計数するのに有用な培地（ここで、該試料を該培地において培養する場合、該培地は、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）のコロニーとバチルス（*Bacillus*）のコロニーとを識別するのに十分な量の指示物質を含有する）、ならびにそのような培地を用いて試料中のブドウ球菌を検出するための方法に関する。

発明の背景

現在、異なるタイプの試料において、細菌を決定、同定および計数するための様々な方法およびプロセスが利用されている。例えば、水、食物または酪農製品の試料において、菌が混入しているまたは菌が混入しているおそれのあるそれらの試料の品質を評価するために、大腸菌を同定および計数するための方法が利用されている。

大腸菌の混合集団から *E. coli*（通常、グラム陰性の桿状細菌に分類される大腸菌の特定のタイプ）を識別する方法の1つが米国特許第5,210,022号に報告されている。該特許では、2つの特定の細菌酵素、 α -ガラクトシダーゼおよび β -グルクロニダーゼの存在下で対比色の不溶性比色沈殿物を形成する2つの基質が試験培地に組込まれている。これらの2つの基質を使用すると、大腸菌と *E. coli* とを識別することができる。何故なら、すべての大腸菌が α -ガラクトシダーゼを産生する一方、*E. coli*のみが β -グルクロニダーゼを産生するからである。インキュベーション時に基質含有培地中で異なる細菌のコロニーが増殖すると、*E. coli* または大腸菌のコロニーのいずれか一方の周辺に対比色の沈殿物を形成する。沈殿した基質の対比色によって、混合集団において他の大腸菌コロニーから *E. coli* のコロニーが容易に同定される。

サルモネラ（*Salmonella*）、ブドウ球菌、またはストレプトコッカス（*Streptococcus*）等の病原性を有するまたはヒトへの悪影響に関連する他の種類の細菌についてもそのような選択的識別が必要である。

Staphylococcus aureus（*S. aureus*）は、食品加工産業において重要な指標として使用されている。この生物を検出することは重要である。何故なら、株のなかには、ブドウ球菌食中毒として知られる消耗性疾患に関連するブドウ球菌エンテロトキシンと呼ばれる熱安定性毒素を産生し得るものがあることが知られているからである。更に、加工食品中にこの生物が存在することは、皮膚表面、特に外鼻孔に細菌を有する無症状の保菌者による加工後の混入を示唆し得る。

S. aureus およびエンテロトキシンを産生するブドウ球菌を検出することは重要であるため、効率的で高い信頼性を有し、かつ正確なブドウ球菌の同定が必要とされている。ブドウ球菌の決定に現在最も多く使用されている培地は、卵黄-グリシン-テルル酸-ピルビン酸寒天（EYGTP寒天）であり、ベアード・パーカー・エイガー（Baird Parker Agar）（BPA）とも呼ばれている。本培地は、選択かつ選別的培地成分を利用して、食物試料中に認められるブドウ球菌と他の細菌とを識別する。BPA中に存在するテルル酸カリウムおよび塩化リチウムは、他のほとんどの細菌を阻害する。BPA中の *S. aureus* は、テルル酸カリウムと反応して黒色のコロニーを生じ、卵黄のレシチンと反応してコロニーの周囲に不透明な「ハロー」を生じる。BPAにおいて不透明なハローを有する黒色のコロニーは、「典型的な」コロニーとみなされる。このように、BPA成分は *S. aureus* と他の細菌とを識別する共同識別反応を提供する。

不幸なことに、BPAでは、*S. aureus* および他の細菌との異常な反応が生じる可能性がある。この培地での結果に誤った陽性および誤った陰性反応があるということは、BPAの結果が「推定的な」結果に過ぎないことを意味する。2つの異常な反応とは：（1）非 *S. aureus* 細菌がBPA上で増殖して誤った陽性反応を生じる（すなわち、典型的なコロニーを生じる）こと；および（2）のすべての *S. aureus* 株が、識別培地成分と反応して「典型的な」BPA陽性反応（すなわち、テルル酸陽性（黒色コロニー）、陽性卵黄またはレシチナーゼ反応（不透明なハロー））を生じることができるとは限らないことである。これらの理由のため、BPAプレートからの更なる「確認」工程が必要である。これらの方法はコアギュ

10

20

30

40

50

ラーゼまたは耐熱性ヌクレアーゼの存在を検出するための手順を含む。BPA培地と共同して使用する場合、いずれかの方法が*S.aureus*の有無の確認とされる。

しかし、BPA工程から確認へ進行するためには、更なる試験のためにコロニーのタイプを認識し、選択することが必要である。一般には、「典型的な」コロニーは確認のために選択され、他のタイプのコロニーのそれぞれの代表も確認のために選択される。典型的なコロニーを生じ得る非*S.aureus*細菌には、バチルス属およびエンテロコッカス (*Enterococcus*) 属がある。BPA上で増殖し、典型的ではないコロニーを生じ得る他の株としては、リステリア (*Listeria*) 種およびエンテロバクテリアセアエ (*Enterobacteriaceae*) 科のいくつかの要素が挙げられる。これらの株がBPA上で典型的なコロニーを生じない場合であっても、確認試験のために選択する必要のある「典型的ではない」コロニーの数が増加する。

10

米国特許第5,443,963号には、試料中のブドウ球菌を同定および計数する方法が記載されている。ここで、培養培地は、指示物質としてインドリルグルコピラノシドを含有する。この方法は、ブドウ球菌から産生される - グルコシダーゼはインドリルグルコピラノシド基質とは反応しないが、試料中の他の細菌から産生される - グルコシダーゼはインドリルグルコピラノシドと反応して独特な色を生じるという原理を利用する。従って、この方法により、ブドウ球菌を試料中の非ブドウ球菌から識別することができる。しかし、該特許に記載の方法は、試験試料中に存在するまたは存在する可能性のあるすべての非ブドウ球菌からブドウ球菌を識別するわけではない。例えば、該特許に記載の方法は、ブドウ球菌と試験試料中に存在するバチルス種とを識別しない。バチルスおよび上記の他の微生物は、*S.aureus*を含有することが疑われる試料を培養するのに用いられるBPA等の培地において誤った陽性（「典型的な」コロニー）をもたらす原因である。従って、「典型的な」コロニーに起因する誤った陽性結果は、依然として実質的な問題とされている。そのような誤った陽性結果を削除する培養系は、微生物学的試験の分野において極めて有用である。誤った陰性結果も依然として重要な問題とされており；スタフィロコッカス種および典型的ではないコロニーを生じる株は誤った陰性結果をもたらす原因であり、典型的ではないすべてのコロニーのタイプを現在使用されている系で更に試験する必要がある。典型的ではない非スタフィロコッカスのコロニーを削除し、典型的ではないスタフィロコッカスのコロニーを少なくとも推定的に同定し得る培養系があれば極めて有利である。

20

従って、試料中の*S.aureus*の効率的な検出および計数においては、*S.aureus*の確実な検出ならびに試料中の他の微生物によって生じる誤った陽性および誤った陰性結果の削除を可能にする方法が必要である。

30

発明の概要

一般に、本発明は、ブドウ球菌を検出するための培養培地を特徴とする。ここで、該培養培地は、バチルス微生物を含有するコロニーとブドウ球菌を含有するコロニーとを識別するのに十分な量の指示物質を含有する。該培地は、(1)更なる確認試験を必要とする「典型的な」コロニーとして予め同定される非ブドウ球菌微生物のコロニーを（非ブドウ球菌 - 陰性結果として）削除し、(2)他に更なる試験を必要とする非ブドウ球菌のコロニーを削除し、(3)典型的ではないブドウ球菌のコロニーを推定的に同定することができる。本発明はまた、試料中のブドウ球菌を検出し、試料から増殖したブドウ球菌のコロニーと、試料から増殖したバチルス微生物等の他の微生物のコロニーとを識別する方法を特徴とする。

40

従って、1つの局面において、本発明は、試料中のブドウ球菌を検出するのに有用な培地を特徴とする。ここで、該培地はブドウ球菌の増殖に対して選択的であり、該培地において該試料を培養する場合にバチルスのコロニーとブドウ球菌のコロニーとを識別するのに十分な量でグルコピラノシド指示物質を含有する。

1つの好ましい実施態様において、培地はベアード・パーカー・エイガー (*Baird Parker Agar*) の形態にある。もう1つの実施態様において、培地は、薄フィルム培養デバイスの自立性、防水性基材上に付着した乾燥ブrossの形態である。更にもう1つの好ましい実施態様において、培地はペクチン酸カルシウムゲルの形態である。

50

グルコピラノシド指示物質は、好ましくはインドリルグルコピラノシドである。好ましい比色用グルコピラノシド指示物質は、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシドである。

グルコピラノシド指示物質は、バチルス微生物を含有するコロニーとブドウ球菌を含有するコロニーとを識別するのに十分な量で存在する。試料を栄養培地中で培養する場合、典型的に、指示物質は少なくとも約100 μg/mLの濃度で存在する。

もう一つの局面において、本発明は試料中のブドウ球菌を検出する方法を特徴とする。該方法は、検出可能なコロニーを生じる条件下において選択培養培地中で試料を培養する工程を含む。ここで、該培養培地は、バチルス微生物を含有コロニーとブドウ球菌を含有するコロニーとを識別するのに十分な量で上記の指示物質を含有する。

該方法は、試料中のブドウ球菌の存在を確認する更なる工程を含み、また、試料中のブドウ球菌を計数する工程を更に含んでもよい。確認工程は、試料から増殖する微生物がコアギュラーゼ活性を示すかどうか、または試料から増殖する微生物が耐熱性ヌクレアーゼ活性を示すかどうかを決定することを含んでもよい。好ましくは、試料から増殖するコロニーが耐熱性ヌクレアーゼ活性を示すかどうかを決定する工程は、そのようなコロニーに対して、トルイジンブルーO、バインダ、および非加水分解性DNAを含む物品を配置してもよい。

該方法において試験される試料は、食物試料、臨床試料、家畜試料、化粧品試料、製薬試料、環境物試料、またはブドウ球菌に対する試験が所望される他の任意の試料であってもよい。

本発明の他の利点および特徴については、以下の説明および請求の範囲から明らかであろう。

発明の詳細な説明

本発明は、ブドウ球菌の増殖に対して選択性を有する培地中に十分量のグルコピラノシド指示物質があれば、ブドウ球菌を含み、バチルスおよび他の微生物を含有するまたは含有する可能性のある試料を該培地中で培養する場合に、バチルスを含有するコロニーとブドウ球菌を含有する他の微生物とを識別することができるという本明細書においてはじめて報告された観察結果を利用する。この予想外の観察結果は、(選択培地において「典型的な」コロニーを生じ得る)バチルス種等の微生物とブドウ球菌とを識別することを可能にする。それはまた、現在利用可能な系において推定的な「典型的な」結果を生じない特定のスタフィロコッカスをブドウ球菌のコロニーとして推定的に同定することも可能である。このことは、食物、臨床または他の多くのタイプの試料を試験する場合に特に有利である。ここで、S.aureus等のエンテロトキシンを産生する生物の効率的かつ信頼性の高い検出は極めて重要である。

従って、本発明は、試料中のブドウ球菌を検出するのに有用な培地を含む。ここで、該培地は、ブドウ球菌の増殖に選択的であり、バチルス微生物を含有するコロニーとブドウ球菌を含有するコロニーとを識別するのに十分な量で存在するグルコピラノシド指示物質を含有する。指示物質は、非スタフィロコッカス微生物のβ-D-グルコシダーゼに対するグルコピラノシド基質であり、ブドウ球菌によって加水分解されない。

比色用インドリルグルコピラノシドは、本発明における使用に好ましいグルコピラノシド指示物質であり、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシドは好ましいインドリルグルコピラノシドである。

本発明の使用に適切な他のインドリルグルコピラノシドとしては、たとえば：

- (1) 5-ブromo-6-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシド；
- (2) 6-クロロ-3-インドキシル-β-D-グルコピラノシド；または
- (3) 3-インドキシル-β-D-グルコピラノシド

が挙げられる。好ましい5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシドは、本発明の使用に非常に適切である。何故なら、そのグルコース部分は、非ブドウ球菌生物のβ-D-グルコシダーゼによって酵素的に切断され、該分子の残りの部分は二量体を形成してコロニーの付近に沈殿し、色彩の変化を生じるからである。上記の化合物(1)~(3)

10

20

30

40

50

も、この沈殿現象を示し、このため、本発明の培地での使用に非常に適切であると予想される。これらの化合物は、沈殿を生じないために、コロニーから拡散遊離して指示物の検出を困難にしている指示物質よりも好ましい。一般に、(1)非ブドウ球菌微生物の -グルコシダーゼとは反応するがブドウ球菌の -グルコシダーゼとは反応せず、(2)そのグルコース部分が酵素的に切断されたときに検出可能なシグナルを提供する任意のグルコピラノシド物質は、適切なグルコピラノシド指示物質として役に立つ。

指示物質は、バチルス微生物を含有するコロニーとブドウ球菌を含有するコロニーとを識別するのに十分な量で存在しなければならない。微生物の例としては、本発明に記載のブドウ球菌と識別されるバチルスに加えて、エンテロコッカス、リステリア、ならびに(プロテウス(Proteus)、エンテロバクター(Enterobacter)、セラティア(Serratia)、およびクレブシラ(Klebsiella)を含む)エンテロバクテリアセアエ科に属するいくつかの微生物が挙げられる。本明細書に記載の通り、本発明では、指示物質は、バチルス、リステリア、およびエンテロバクテリアセアエを識別するのに十分な量で存在する場合、任意の非スタフィロコッカス(-グルコシダーゼ陽性微生物)とブドウ球菌とを識別することを意図する。

ブドウ球菌を検出および計数する分野において現在公知の選択増殖培地系のうち、バチルスの「典型的な」コロニーおよび他の多くの属の微生物とブドウ球菌とを識別し得る培地は得られていない。以外にも、十分量の特定のグルコピラノシド指示物質を含んでいれば、そのような微生物とブドウ球菌とを識別することが可能である。更に、BPAタイプの培地において、典型的でないコロニーをブドウ球菌として推定的に同定し得る培地も得られておらず；そのようなスタフィロコッカス種はそのような「典型的ではない」コロニーを生じる。本発明を実施する場合、そのようなコロニーは推定的にブドウ球菌として同定される。

一般に、試料を培養する場合、指示物質は培養培地に対する該物質の溶解限界に近い濃度で存在しないなければならない。このことは、すべての非スタフィロコッカスの -グルコシダーゼ陽性生物の検出、染色および試料由来のブドウ球菌コロニーとの識別の可能性を最大にする。好ましい5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- -D-グルコピラノシドを含むインドリルグルコピラノシドについては、試料培養時に、濃度が少なくとも約100 µg/mLでなければならない。当業者は、培養培地中のインドリルグルコピラノシド指示物質の最適濃度が、使用される特定の指示分子に依存して変化され得、そのような濃度は通常事項として調整および最適化され得る。

本発明の1つの実施態様において、本発明の培地は、寒天ゲルの形態であってもよい。ここで、識別用指示物質を含む選択栄養培地は、寒天内に含有される。好ましい寒天ゲルの1つの例は、上記のペアード・パーカー・エイガーであり、スタフィロコッカス試験の分野において周知である。ペアード・パーカー・エイガーアプリケーションにおける本発明の実施については、以下の実施例1に例示されている。一般に、本発明の培地を利用するペアード・パーカーアプリケーションでは、バチルスおよび上記の他の微生物を含む非ブドウ球菌コロニーが、グルコピラノシド指示物質により生じる特徴的な色(例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- -D-グルコピラノシドが指示物質として使用される場合は青または緑色)で染色され、これらのコロニーを陰性とみなして除くことができる。黒色のコロニーは、「典型的」であっても、そうでなくても、ブドウ球菌(S.aureusである場合を含む)と推定され、更なる試験のために選択され得る。

もう1つの実施態様において、培地は、3M PERTRIFILM™培養装置のような薄フィルム培養プレート装置の形態であってもよい。薄フィルム培養プレート装置の2つの例示的な実施態様は、(1)粉末化培地被覆薄フィルム装置であって、栄養培地成分およびゲル化剤が、自立性、防水性薄フィルム支持体および頂部フィルムに付着し、それぞれのフィルムが非阻害性の粘着剤を含有する装置、および(2)プロス被覆薄フィルム装置であって、栄養プロスが、培地成分に対して予め選択された被覆重量で自立性、防水性薄フィルム基材上に被覆され、乾燥されており、頂部フィルムがゲル化剤、場合により染色剤を付着して含有し、インキュベーションの間、該頂部フィルムが試料を覆うように具備されている

10

20

30

40

50

、装置である。開口部を有するスタイロフォーム層を頂部フィルムと底部フィルムとの間に配置して、該開口部が培養試料用のウェルを形成するようにしてもよい。3M PETRIFILM™装置のような薄フィルム培養装置を使用する場合、1ミリリットルのサンプル容量または接種量が標準的である。

ブロスおよび粉末被覆装置を含む薄フィルム装置については、3Mの米国特許第4,565,783号に詳細に記載されており、開示内容のすべては参考として明細書中に援用されている。薄フィルム培養装置におけるブドウ球菌の検出に使用するのに好ましい選択培地には、ブドウ球菌が検出可能なコロニーを生じるのに必要な適切な栄養物、塩、およびイオンならびに所望でない他の微生物の増殖を防止するための阻害物が含まれる。適切な栄養物、塩、およびイオンとしては、トリプトースペプトン、ジペプトン、酵母抽出物、およびピルビン酸が挙げられるが、これらの例に限定されない。所望でない微生物の増殖を防止するために選択された阻害剤が培地に含まれる。該所望でない微生物としては、グラム陽性細菌（例えば、E.coli）およびグラム陰性細菌が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。これらの所望でない細菌を阻害すると、ブドウ球菌の増殖が選択的に増強される。適切な阻害剤として、様々な周知の抗微生物または抗生物質化合物が挙げられる。例えば、ナリジクス酸等のキノリンを基剤とする抗細菌化合物、メタンスルホン酸コリスチン等のポリミキシン誘導性化合物、セフトジジム等の抗生物質化合物、および塩化リチウム等の塩が公知であり、好ましい阻害剤である。

10

薄フィルム培養装置はまた、固体培養培地を提供するためのゲル形成剤を含む。固体培地は、試料中に存在し得る細菌コロニーの増殖のために規定の面域を提供する。適切なゲル形成剤としては、市販の寒天ならびにゲル形成化ガム（例えば、キサンタンガム、ローカストビーンガム、ラムサンガム（rhamsan gum）、ガーガム、およびそれらの混合物）が挙げられる。

20

薄フィルム培養装置アプリケーションにおける本発明の実施については、以下の実施例4に例示されている。

栄養培地が、薄フィルム培養装置（例えば、PETRIFILM™スタフィロコッカス計数（Staphylococcus Count）プレート等）の形態にある本発明の実施態様において、ある容量（例えば、1ミリリットル）の試料を該装置上に配置したとき、指示物質が所望の濃度で培養培地中に存在するような十分量で指示物質が含まれる（例示的な調製プロトコルについては以下の実施例を参照のこと）。そのような薄フィルム培養装置中で試料をインキュベーションした後、ブドウ球菌のコロニーは赤色に染色される（頂部フィルムに含まれるテトラゾリウム染料による、以下の実施例を参照のこと）が、非ブドウ球菌のコロニーは、グルコピラノシド指示物質の特徴的な色に染色される。5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルコピラノシドを指示物質として使用する場合、バチルスを含む非ブドウ球菌のコロニーおよび上記の他の微生物は特徴的な青または緑色に染色される。この時点で、すべての青または緑色のコロニーをブドウ球菌について陰性とみなして除くことができるが、すべての赤色コロニーは、ブドウ球菌と推定される。すべてのコロニーが青または緑色に染色される場合、試料はブドウ球菌について陰性であり、更なる試験を必要としない。本発明を実施するためのもう1つの適切な培養形式は、REDIGEL™のような非寒天、ペクチン酸カルシウム培養系であり、例えば、ベアード・パーカータイプ識別検出試薬を含有する。REDIGEL™形式における本発明の実施については、以下の実施例3に例示されている。

30

40

本発明を実施する場合、本明細書に記載の培養装置の培養培地に試験試料が接種される。この説明の目的のために、該培養培地は指示物質としてインドリルグルコピラノシドを含有すると仮定する。試験試料は食物、臨床、家畜、化粧品、製薬、または環境物試料、あるいはブドウ球菌に対する試験を要するまたは所望される他のいずれかの試料であり得る。微生物試験のためのそのような試料の調製は、当該分野において周知である。

試料は、ある時間（例えば、約18~48時間の間）および条件（例えば、約30~37の間）下で培養して、培養培地において試料由来の微生物に検出可能なコロニーを形成させる。指示物質の存在下でコロニーが増殖すると、 α -グルコシダーゼ陽性、非ブドウ球菌微生物

50

物のすべてのコロニーは、グルコピラノシド基質との α -グルコシダーゼ反応の結果として青または緑等の特徴的な色を生じる。スラフィロコッカスのコロニーは特徴的な色を生じない。何故なら、それらは、 α -グルコシダーゼを生じるが、この特定のグルコピラノシド基質を加水分解する酵素を生じないからである。

培養培地中のすべてのコロニーが、グルコピラノシド指示物質との反応に基づいて特徴的な色を生じる場合、試料は陰性であり、更なる試験を必要としない。培養培地中の特定のコロニーが典型性を呈し、特徴性を生じない場合、これらのコロニーはスタフィロコッカスのコロニーであると推定され、これらは *S. aureus* 等のエンテロトキシンを産生するまたはエンテロトキシンを産生する可能性のある微生物を含み得、そして例えば、エンテロトキシンを産生するまたはエンテロトキシンを産生する可能性があるブドウ球菌が存在するかどうかを決定するための更なる確認試験のために選択され得る。培養培地中の特定のコロニーが典型性を呈するにもかかわらず青または緑色に染色されない場合、これらのコロニーもブドウ球菌と推定され、そのような更なる試験のために選択され得る。

推定上のスタフィロコッカスのコロニーの確認を、いくつかの既知の方法で達成してもよい。コロニーがコアギュラーゼ活性を示すかどうか、または耐熱性ヌクレアーゼ活性を示すかどうかを決定するために、コロニーを試験してもよい。コアギュラーゼまたは耐熱性ヌクレアーゼ活性のいずれか一方の結果が陽性であれば、ブドウ球菌の存在が確認されたとみなす。コアギュラーゼまたは耐熱性ヌクレアーゼ活性の有無を決定するための方法の多くは、当該分野において周知である。

当該分野において公知のそれらの方法に加えて、培養試料中の耐熱性ヌクレアーゼ活性の有無を決定することによってブドウ球菌の存在を確認する1つの好ましい手段は、非耐熱性のヌクレアーゼを不活化するのに十分な温度にまで試料を加熱した後、トルイジンブルー（加水分解されたまたは加水分解されていないDNAの存在下で染色識別するメタクロマジー染料）、加水分解されていないDNAおよび試料中のコロニーに対するバインダを含有する物品を配置することを含む。そのような物品およびその使用のための好ましい処方

非制限的例を以下に例示する：

成分

DNA (Difco Laboratories, Detroit, MI)	3.6 g/L	30
トルイジンブルーO (TBO, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)	0.32 g/L	
塩化カルシウム、無水物 (Sigma, St. Louis, MO)	1.1 mg/L	
塩化ナトリウム (Sigma, St. Louis, MO)	10 g/L	
トリス (Tris) 塩酸 (Sigma, St. Louis, MO)	6.85 g/L	
トリス塩基 (Sigma, St. Louis, MO)	0.8 g/L	40
λカラゲニン (Sigma, St. Louis, MO)	0.4 g/L	
ガーガム (バインダ) (Rhone-Poulenc Food Ingredients, Cranbury, NJ)	10 g/L pH 7.3 または 9.0	

該物品を調製する場合、すべての試薬（TBOおよびガーガムを除く）を1リットルの脱イオン水中と一緒に混合してもよい。懸濁液を一定の攪拌で混合し、沸騰するまで加熱する。TBOを混合物に添加し、攪拌を維持したまま熱源から取り出す。次いで、懸濁液をエア

10

20

30

40

50

ミキサーで混合（ボルテックスによる激しい攪拌を伴う）し、ガーガム（バインダ）を添加して均質になるまで混合する。懸濁液を1晩4℃で冷却し、次いで、ナイフコーターを用いて0.18mmポリエステルフィルム上に被覆する。0.12～0.25mmのナイフ間隙を評価する（0.05～0.10g/24平方インチの被覆重量）。フィルムを2～10分間、93℃で熱乾燥する。物品は約0.12mm～0.25mmの厚さを有し得、次いで、該乾燥フィルムから所望の形状を切断し得る。

試料を本発明の培地中でインキュベーションした後、培養試料を、例えば、60℃で30分間熱処理して、非耐熱性のヌクレアーゼを不活化する。次いで、物品を試料に対して配置する。スタフィロコッカスが存在する場合、約1～4時間以内に、適切な条件下で特徴的な赤または桃色の色の変化がコロニーの周囲に生じる。赤または桃色の色の変化があれば、エンテロトキシンを産生するまたはエンテロトキシンを産生する可能性のある*S. aureus*等のブドウ球菌の存在が確認されたとみなす。そのような物品およびその使用については、3Mの米国特許出願番号08/696,385号の明細書および請求の範囲に記載されており、その開示内容のすべては参考として本明細書に援用されている。

10

試料中にブドウ球菌の存在が確認された場合、培養試料中のブドウ球菌のコロニーの数および元の試料に存在するブドウ球菌のコロニーの数は、様々な公知の定量方法のいずれかを用いて決定され得る。

以下の実施例により本発明を例示する。

実施例

以下の実施例に記載の実験では、以下の微生物株（表1）を使用した。

20

表 1

種	株の 名称	供給源
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	23842	ATCC ²
<i>Bacillus cereus</i>	11778	ATCC ²
<i>Bacillus cereus</i>	13061	ATCC ²
<i>Bacillus cereus</i>	14579	ATCC ²
<i>Bacillus circulans</i>	61	ATCC ²
<i>Bacillus circulans</i>	4513	ATCC ²
<i>Bacillus coagulans</i>	7050	ATCC ²
<i>Bacillus licheniformis</i>	14580	ATCC ²
<i>Bacillus megaterium</i>	14581	ATCC ²
<i>Bacillus mycoides</i>	6462	ATCC ²
<i>Bacillus polymyxa</i>	842	ATCC ²
<i>Bacillus pumilis</i>	72	ATCC ²
<i>Bacillus sphaericus</i>	4525	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	6051	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	23059	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	23856	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	23857	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	23858	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	23859	ATCC ²
<i>Bacillus subtilis</i>	29056	ATCC ²
<i>Bacillus species</i>	bb	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L1	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L2	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L3	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L4	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L5	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L6	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L7	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L8	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L9	食品単離体 ¹

10

20

30

40

種	株の 名称	供給源
<i>Bacillus species</i>	L10	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L11	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L12	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L13	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L14	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L16	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L17	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L18	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L19	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L20	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L21	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L22	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L23	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L24	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L25	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L26	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L27	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L28	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L29	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	L30	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	LK1	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	LK2	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	LK3	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	LK4	食品単離体 ¹
<i>Bacillus species</i>	LK5	食品単離体 ¹
<i>Enterococcus faecium</i>	882	ATCC ²
<i>Enterococcus faecium</i>	19434	ATCC ²
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	ATCC ²
<i>Enterococcus faecalis</i>	14990	ATCC ²
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	ATCC ²
<i>Enterococcus faecalis</i>	MMM	食品単離体 ¹

10

20

30

40

種	株の 名称	供給源
<i>Enterococcus species</i>	P89	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P90	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P91	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P92	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P93	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P94	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	P88	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1026	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1028	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1030	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1032	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1038	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1040	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1044	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1148	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M2017	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M2022	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1144	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1067	臨床単離体 ³
<i>Enterococcus species</i>	M1062	臨床単離体 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	W-832	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	13301	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	13565	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	12600	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	27659	ATCC ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	12598	ATCC ²
<i>S. epidermidis</i>	12228	ATCC ²
<i>S. epidermidis</i>	14990	ATCC ²
<i>S. epidermidis</i>	35547	ATCC ²
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	U28	臨床単離体

10

20

30

40

種	株の 名称	供給源
<i>Klebsiella oxytoca</i>	U33	臨床単離体
<i>Listeria grayi</i>	11120	ATCC ²
<i>Listeria innocua</i>	33091	ATCC ²
<i>Listeria ivanovii</i>	19119	ATCC ²
<i>Listeria ivanovii</i>	19919	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	13932	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	19112	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	19118	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	43256	ATCC ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	49594	ATCC ²
<i>Listeria murrayi</i>	25401	ATCC ²
<i>Proteus vulgaris</i>	U61	臨床単離体 ³
<i>Proteus vulgaris</i>	U62	臨床単離体 ³
<i>Proteus vulgaris</i>	U63	臨床単離体 ³

¹ 3M™ Microbiology Products Laboratory 培養コレクションの食品単離体、3M Center, Saint Paul, MN

² American Type Culture Collection, Rockville, MD

³ University of Minnesota Clinical Microbiology 培養コレクション、Minneapolis, MN

実施例 1

ベアード・パーカー・エイガーアプリケーション

本実施例では、ベアード・パーカー・エイガーアプリケーションにおける本発明の実施について例示する。

10

20

30

材料：

ベアード・パーカー・エイガー(BPA)	Difco Laboratories, Detroit, MI	
バクト (Bacto) 卵黄-亜テルル酸 懸濁液(EYT)	Difco Laboratories, Detroit, MI	
5-ブロモ-4-クロロ-3-	Biosynth International,	
インドリル-β-D-グルコピラノシド (BCIG)	Chicago, IL	10
ジメチルホルムアミド(DMF)	Fisher Scientific, Fairlawn, NJ	
トリプシンダイズブロスチューブ	DiMed Laboratories, St. Paul, MN	
トリプシンダイズ寒天プレート	DiMed Laboratories, St. Paul, MN	

方法：

126 g のBPA粉末 (Difco Laboratories) を秤量し、製造者の方法に従って2リットルの脱イオン水と混合した。100ミリグラムのBCIGを、16×150ミリメートルのスクリュウキャップ付きガラスチューブに秤量した。10ミリリットルのDMFをBCIG粉末に添加し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。懸濁液を水浴中で60 にし、粉末が溶解するまでインキュベートした。混合および加熱処理したBPA粉末を、サンプリングして8個の200ミリリットルアリコートとし、500ミリリットル容量のガラスオートクレーブ可能な容器に入れた。最初の7個の容器に(別々の容器に)2ミリリットル、1ミリリットル、0.5ミリリットル、0.25ミリリットル、0.125ミリリットル、0.0625ミリリットル、および0.0313ミリリットルの10ミリグラム/ミリリットルBCIG溶液を添加した。最後のBPAアリコートにはBCIGを添加しなかった。容器を121、15分間、15気圧でオートクレーブした。全ての8個の容器を46 に調節した。調節を維持しながら、バクト卵黄-亜テルル酸 (EYT) 懸濁液を2 ~ 8 から46 へ加温した。BPAが46 に達した後、10ミリリットルのEYT懸濁液をそれぞれの容器に添加した。容器を穏やかに巡回させて溶融寒天にEYTを混合した。20ミリリットルのBCIG培地を9個の15×150ミリメートルペトリ皿のそれぞれに添加した。プレートに注いで固化させた後、プレートを倒置して使用前に室温で1晩インキュベートした。細菌培養物をTSA画線プレート上に画線し、37 で1晩インキュベートした。これらの同じプレートを反復実験のために使用し、2 ~ 8 に維持した。アッセイ前にプレートを室温に加温した。BCIG/BPAプレートを8等分のパイ形状に区画した。単離されたコロニーをTSAプレートから選択し、濃度あたりBCIG/BPA区分あたり1コロニーでBCIG/BPAプレート上に画線した。プレートを37 で48時間インキュベートした。48時間後にプレートを観察した。結果を表2に示す。

表 2

株	種	BPA (BCIG 濃度、ug/mL)							
		0	100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6
27660	<i>S. aureus</i>	T ¹	T	T	T	T	T	T	T
13301	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
13565	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
12600	<i>S. aureus</i>	B ²	B	B	B	B	B	B	B
27659	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
W-832	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
12598	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
25923	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T
19433	<i>E. faecalis</i>	B	G ³	G	B	B	B	B	B
MMM	<i>E. faecalis</i>	B	G	G	G	B	B	B	B
882	<i>E. faecium</i>	B	G	G	G	B	B	B	B
19434	<i>E. faecium</i>	B	G	G	G	B	B	B	B
P88	<i>E. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
P89	<i>E. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
P90	<i>E. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
P91	<i>E. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
P92	<i>E. species</i>	B	G	G	G	B	B	B	B
P93	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
P94	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
M1026	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
M1028	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
M1030	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B

10

20

30

株	種	BPA (BCIG 濃度、ug/mL)							
		B	G	G	B	B	B	B	B
M1032	<i>E. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
M1038	<i>E. species</i>	B	G	G	G	B	B	B	B
L3	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L4	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
L8	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L9	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
L11	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L12	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L13	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L14	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L18	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L20	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L24	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
L27	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B
LK1	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
LK3	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
LK4	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B	B	B
LK5	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B	B	B

¹典型的なコロニー

²黒色沈殿物を伴う典型的ではないコロニー

³青～緑色沈殿物を伴い、黒色沈殿物を伴うまたは伴わない典型的ではないコロニー

実施例 2

更なる株を 0 および 100 マイクログラム / ミリリットルで BCIG/BPA 培地を用いて試験した。63 g の BPA 粉末 (Difco Laboratories) を秤量し、製造者の方法に従って 950 ミリリットルの脱イオン水と混合した。100 ミリグラムの BCIG を、16 × 150 ミリメートルのスクリュウキャップ付きガラスチューブに秤量した。10 ミリリットルの DMF を BCIG 粉末に添加し、ポルテックスミキサーで激しく攪拌した。懸濁液を水浴中で 60 にし、粉末が溶解するまでインキュベートした。混合および加熱処理した BPA 粉末をサンプリングして 2 個の 425 ミリリットルアリコートとし、1000 ミリリットル容量のガラスオートクレーブ可能な容器に入れた。一方の容器に 5.0 ミリリットルの 10 ミリグラム / ミリリットル BCIG 溶液を添加した。他方の BPA アリコートには BCIG を添加しなかった。容器を 121 、15 分間、15 気圧でオートクレーブした。両容器を 46 に調節した。調節を維持しながら、バクト卵黄-亜テルル酸 (EYT) 懸濁液を 2 ~ 8 から 46 へ加温した。BPA が 46 に達したら、25 ミリリットルの EYT 懸濁液をそれぞれの容器に添加した。容器を穏やかに回転させて溶融寒天に EYT を混合した。20 ミリリットルの BCIG 培地を 25 個の 15 × 100 ミリメートルペトリ皿に添加した。プレートに注いで固化させた後、プレートを倒置して使用前に室温で 1 晩インキュベートした。

細菌培養物を TSA 画線プレート上に画線し、37 で 1 晩インキュベートした。これらの同

10

20

30

40

50

じプレートを反復実験のために使用し、2～8 に維持した。アッセイ前にプレートを室温に加温した。BCIG/BPAプレートを8等分のパイ形状に区画した。単離されたコロニーをTSAプレートから選択し、濃度あたりBCIG/BPA区分あたり1コロニーでBCIG/BPAプレート上に画線した。プレートを37 で48時間インキュベートした。48時間後にプレートを観察した。結果を表3に示す。

表3

株	種	0 µg/ml BCIG/BPA	100 µg/ml BCIG/BPA
23842	<i>B. amyloliquefaciens</i>	B ¹	G ²
11778	<i>B. cereus</i>	B	B*
13061	<i>B. cereus</i>	B	B*
14579	<i>B. cereus</i>	B	B*
61	<i>B. circulans</i>	B	G
4513	<i>B. circulans</i>	B	G
7050	<i>B. coagulans</i>	B	G
14580	<i>B. licheniformis</i>	B	G

10

20

株	種	0 $\mu\text{g/ml}$ BCIG/BPA	100 $\mu\text{g/ml}$ BCIG/BPA
14581	<i>B. megaterium</i>	ng ³	ng
6462	<i>B. mycoides</i>	B	B'
842	<i>B. polymyxa</i>	B	G
72	<i>B. pumilis</i>	B	G
4525	<i>B. sphaericus</i>	B	B'
6051	<i>B. subtilis</i>	B	G
23059	<i>B. subtilis</i>	B	G
23856	<i>B. subtilis</i>	B	G
23857	<i>B. subtilis</i>	B	G
23858	<i>B. subtilis</i>	B	G
23859	<i>B. subtilis</i>	B	G
29056	<i>B. subtilis</i>	B	G
BB	<i>B. species</i>	B	G
L1	<i>B. species</i>	B	G
L2	<i>B. species</i>	ng	ng
L3	<i>B. species</i>	B	G
L4	<i>B. species</i>	B	G
L5	<i>B. species</i>	ng	ng
L6	<i>B. species</i>	ng	ng
L7	<i>B. species</i>	ng	ng
L8	<i>B. species</i>	B	G
L9	<i>B. species</i>	B	G
L10	<i>B. species</i>	ng	ng
L11	<i>B. species</i>	B	G
L12	<i>B. species</i>	B	G
L13	<i>B. species</i>	B	G
L14	<i>B. species</i>	B	G
L15	<i>B. species</i>	ng	ng
L16	<i>B. species</i>	B	G

10

20

30

40

株	種	0 µg/ml BCIG/BPA	100 µg/ml BCIG/BPA
L17	<i>B. species</i>	B	G
L18	<i>B. species</i>	B	G
L19	<i>B. species</i>	ng	ng
L20	<i>B. species</i>	B	G
L21	<i>B. species</i>	ng	ng
L22	<i>B. species</i>	ng	ng
L23	<i>B. species</i>	ng	ng
L24	<i>B. species</i>	B	G
L25	<i>B. species</i>	ng	ng
L26	<i>B. species</i>	ng	ng
L27	<i>B. species</i>	B	G
L28	<i>B. species</i>	ng	ng
L29	<i>B. species</i>	ng	ng
L30	<i>B. species</i>	B	G
LK1	<i>B. species</i>	B	G
LK2	<i>B. species</i>	ng	ng
LK3	<i>B. species</i>	B	G
LK4	<i>B. species</i>	B	G
LK5	<i>B. species</i>	B	G
882	<i>E. faecium</i>	B	G
19434	<i>E. faecium</i>	B	G
29212	<i>E. faecalis</i>	B	G
14990	<i>E. faecalis</i>	B	G
19433	<i>E. faecalis</i>	B	G
MMM	<i>E. faecalis</i>	B	G
P89	<i>E. species</i>	B	G
P90	<i>E. species</i>	B	G
P91	<i>E. species</i>	B	G
P92	<i>E. species</i>	B	G

10

20

30

40

株	種	0 µg/ml BCIG/BPA	100 µg/ml BCIG/BPA
P93	<i>E. species</i>	B	G
P94	<i>E. species</i>	B	G
P88	<i>E. species</i>	B	G
M1026	<i>E. species</i>	B	G
M1028	<i>E. species</i>	B	G
M1030	<i>E. species</i>	B	G
M1032	<i>E. species</i>	B	G
M1038	<i>E. species</i>	B	G
M1040	<i>E. species</i>	B	G
M1044	<i>E. species</i>	B	G
M1148	<i>E. species</i>	B	G
M2017	<i>E. species</i>	B	G
M2022	<i>E. species</i>	B	G
M1144	<i>E. species</i>	B	G
M1067	<i>E. species</i>	B	G
M1062	<i>E. species</i>	B	G
25923	<i>S. aureus</i>	T ⁺	T
W-832	<i>S. aureus</i>	T	T
13301	<i>S. aureus</i>	T	T
13565	<i>S. aureus</i>	T	T
12600	<i>S. aureus</i>	B	B
27659	<i>S. aureus</i>	T	T
12598	<i>S. aureus</i>	T	T
12228	<i>S. epidermidis</i>	B	B
14990	<i>S. epidermidis</i>	B	B
35547	<i>S. epidermidis</i>	B	B
U28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B	G
U33	<i>Klebsiella oxytoca</i>	B	G
11120	<i>Listeria grayi</i>	B	G

10

20

30

40

株	種	0 µg/ml BCIG/BPA	100 µg/ml BCIG/BPA
33091	<i>Listeria innocua</i>	B	G
19119	<i>Listeria ivanovii</i>	B	G
19919	<i>Listeria ivanovii</i>	B	G
13932	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
15313	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
19112	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
19118	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
43256	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
49594	<i>Listeria monocytogenes</i>	B	G
25401	<i>Listeria murrayi</i>	B	G
U61	<i>Proteus vulgaris</i>	B	G
U62	<i>Proteus vulgaris</i>	B	G
U63	<i>Proteus vulgaris</i>	B	G

*BCIG 陰性株

¹ 黒色沈殿物を伴う典型的ではないコロニー

² 青～緑色沈殿物を伴い、黒色沈殿物を伴うまたは伴わない典型的ではないコロニー

³ 増殖せず

⁴ 典型的なコロニー

実施例 3

REDIGEL™ ベアード・パーカー

本実施例では、ペクチン酸カルシウム (REDIGEL™) アプリケーションにおける本発明の実施について例示する。

材料：

ベアード・パーカー REDIGEL™

RCR, Inc., Goshun, IN

(10 プレートサイズ)

5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル

Biosynth International,

β-D-グルコピラノシド (BCIG)

Chicago, IL

ジメチルホルムアミド (DMF)

Fisher Scientific, Fairlawn, NJ

トリプシンダイズブロスチューブ

DiMed Laboratories, St. Paul, MN

トリプシンダイズ寒天プレート

DiMed Laboratories, St. Paul, MN

方法：

REDIGEL™ (微生物の増殖および検出用ゲルマトリックスとしてペクチン酸カルシウムを

10

20

30

40

50

利用する市販の製品)は、ベアード・パーカー・エイガーと同様にブドウ球菌の検出のための系を利用する。このアプリケーションのために使用した系は、ペクチンを有する溶液中に選択および識別試薬を含有する110ミリリットルの溶液ならびに微生物増殖用ゲルマトリックスの形成に必要なカルシウムを含有する処理済ペトリ皿を含む10プレートキットである。5ボトルの溶液に以下の容量の10ミリグラムBCIG/1ミリリットルDMFを添加した: 1.1ミリリットル、0.55ミリリットル、0.275ミリリットル、0.1375ミリリットル、0.0688ミリリットル、および0ミリリットル。これらは、1ミリリットルあたり100、50、25、12.5、6.3および0マイクログラムBCIGを生じる。それぞれの溶液の11ミリリットルを9個の個々のプレートに添加した。プレートを6時間室温で直立させた。次いで、TSA培養物を、BPA評価のために、前のセクションに記載のプレート上に画線した。次いで、プレートを37℃でインキュベートし、48時間目に読み取った。結果を表4に示す。

表4

株	種	REDIGEL™ ベアード・パーカー (BCIG 濃度、 $\mu\text{g/mL}$)					
		0	100	50	25	12.5	6.3
27660	<i>S. aureus</i>	T ¹	T	T	T	T	T
13301	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
13565	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
12600	<i>S. aureus</i>	B ²	B	B	B	B	B

10

20

株	種	REDIGEL™ ベアード・パーカー (BCIG 濃度、 $\mu\text{g/mL}$)					
27659	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
W-832	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
12598	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
25923	<i>S. aureus</i>	T	T	T	T	T	T
19433	<i>E. faecalis</i>	B ¹	G ³	G	G	G	B
MMM	<i>E. faecalis</i>	B	G	G	G	G	B
882	<i>E. faecium</i>	B	G	G	G	G	B
19434	<i>E. faecium</i>	B	G	G	G	G	B
P88	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P89	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P90	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P91	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P92	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P93	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
P94	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
M1026	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
M1028	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
M1030	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
M1032	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
M1038	<i>E. species</i>	B	G	G	G	G	B
L3	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B
L4	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
L8	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B
L9	<i>B. species</i>	B	G	G	G	B	B
L11	<i>B. species</i>	B	G	G	G	B	B
L12	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B
L13	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
L14	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
L18	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B

10

20

30

40

株	種	REDIGEL™ ベアード・パーカー (BCIG 濃度、 $\mu\text{g/mL}$)					
		B	G	G	B	B	B
L20	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
L24	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
L27	<i>B. species</i>	B	G	G	G	B	B
LK1	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
LK3	<i>B. species</i>	B	G	B	B	B	B
LK4	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B
LK5	<i>B. species</i>	B	G	G	B	B	B

¹典型的なコロニー

²黒色沈殿物を伴う典型的ではないコロニー

³青～緑色沈殿物を伴い、黒色沈殿物を伴うまたは伴わない典型的ではないコロニー

実施例 4

BCIG滴定を有するPETRIFILM™ スタフィロコッカス計数プレート

本実施例では、薄フィルム培養装置における本発明の実施について例示する。

10

20

材料：

PETRIFILM™ 好気性細菌計数用 頂部フィルム	3M Company, St. Paul, MN	
キサントガム	Kelco, San Diego, CA	
ローカストビーンガム	Genu Worldwide, Lille Skensved, Denmark	10
ガーガム	Meyhall Chemical RG, Zandaam The Netherlands	
7.5 ミル メリネックス	ICI Films, Wilmington, DE	
ブロス粉末：		
トリプトースペプトン	Acumedia, Baltimore, MD	20
ジペプトン	Acumedia, Baltimore, MD	
酵母抽出物	BBL, Baltimore, MD	
塩化リチウム	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
ナリジクス酸	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
セフタジジム	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
ピルビン酸	Sigma Chemical, St. Louis, MO	30
卵黄懸濁液	Difco Laboratories, Detroit, MI	
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-	Biosynth International	
β-D-グルコピラノシド (BCIG)	Naperville, IL	
20 ミル スタイロフォーム	Astro-Valcour, Inc., Glen Falls, NY	

S. aureusとBCIG陽性非S. aureusとの識別のためのBCIGの有効範囲を決定するための滴定を、以下のように行った：

頂部フィルム：

キサントガム、ローカストビーンガムおよびガーガムを2：2：1の割合で混合した。この混合物を、トリフェニルテトラゾリウムクロリドを24平方インチのフィルムあたり約0.4グラムのレベルで含有するPETRIFILM™好気性細菌計数用 (Aerobic Count) 頂部フィルム上に粉末被覆した。

ブロス混合物：

ブロス粉末を以下の方法で混合した：

トリプトースペプトン	100グラム	
ジペプトン	100グラム	
酵母抽出物	40グラム	50

塩化リチウム	40グラム
ナリジクス酸	80ミリグラム
セフトジジム	8ミリグラム
ピルビン酸	40グラム
卵黄懸濁液	80ミリグラム
脱イオン水	4リットル

粉末を水と激しく混合した。溶液をサンプリングして8個の500ミリリットルアリコートとした。以下の量のBCIGを別々のアリコートに添加し、激しく混合した：100ミリグラム、75ミリグラム、50ミリグラム、37.5ミリグラム、25ミリグラム、および12.5ミリグラム。キサンタンガム：ガーガムの等量混合物の5グラムをそれぞれの溶液に添加し、激しく混合した。すべての粉末を添加してよく混合した後、溶液を激しく混合しながら80に加熱した。次いで、溶液を1晩2～8に冷却した。プロスを、約13ミルのナイフ間隙を介してメリネックス (Melinex) 上に被覆し、次いで、約10分間93で乾燥した。この被覆により、24平方インチあたり300～350ミリグラムの被覆重量が達成された。20ミルのスタイロフォームをアクリル酸粘着剤で転移被覆した。スタイロフォーム材料から直径2インチの円を取り出した。これは、接種物を保持するためのウェルとして機能する。プロスを被覆したウェブ (web) を20ミルのスタイロフォーム上に積層した。粉末被覆頂部フィルムをスタイロフォーム / プロス被覆メリネックス積層物に付着させるための蝶着部として、2分の1インチの両面粘着テープを使用した。フィルムを、ほぼ中央に円を有する3×4インチの長方形に切り出した。評価する前に、フィルムを5～10キログレイで線照射した。トリプシンダイズプロス中で1晩、37で培養することによって、評価のために細菌培養物を調製した。培養物を適切に希釈して、バッファフィールド・スタンダード・メソッド・バッファ (Butterfields Standard Methods Buffer) (Fisher Scientific, Chicago, IL) 中1ミリリットルあたり約100コロニー形成単位 (cfu) を達成した。それぞれの細菌の希釈物を、PETRIFILMTM好気性細菌計数プレート (PAC) 上にプレート化した等価物から得られた結果と比較した。結果を表5に示す。細菌希釈物 (1.0ミリリットル) をプレート化し、37で24時間後に計数した。

10

20

表 5

株	種	PETRIFILM™ スタフィロコッカス計数プレート (BCIG 濃度、 $\mu\text{g/mL}$)							
		0	100	75	50	37.5	25	12.5	PAC
27660	<i>S. aureus</i>	92-	83-	80-	83-	62-	86-	76-	85
13301	<i>S. aureus</i>	175-	154-	184-	170-	193-	194-	173-	184
13565	<i>S. aureus</i>	39-	50-	44-	44-	45-	51-	43-	42
12600	<i>S. aureus</i>	120-	121-	134-	132-	120-	106-	112-	130
27659	<i>S. aureus</i>	115-	122-	144-	132-	127-	130-	125-	166
W-832	<i>S. aureus</i>	189-	161-	159-	158-	157-	170-	164-	168
12598	<i>S. aureus</i>	115-	95-	114-	106-	112-	104-	92-	114
25923	<i>S. aureus</i>	39-	49-	55-	57-	59-	61-	48-	54
19433	<i>E. faecalis</i>	ng ¹	ng	3 [*]	24 [*]	21 [*]	ng	ng	137
MMM	<i>E. faecalis</i>	125-	98 [*]	156 [*]	136 [*]	145 [*]	142 [*]	134 [*]	205
882	<i>E. faecium</i>	41-	65 [*]	82 [*]	69 [*]	53 [*]	75 [*]	69-	78
19434	<i>E. faecium</i>	80-	41 [*]	63 [*]	82 [*]	91 [*]	107 [*]	78-	131
P88	<i>E. species</i>	36-	10 [*]	25 [*]	28 [*]	28 [*]	34-	14-	103
P89	<i>E. species</i>	16-	32 [*]	26 [*]	13 [*]	41 [*]	28-	21-	81
P90	<i>E. species</i>	9-	3 [*]	9 [*]	10 [*]	20 [*]	21 [*]	8 [*]	115
P91	<i>E. species</i>	20-	7 [*]	28 [*]	17 [*]	64 [*]	35 [*]	ng	121
P92	<i>E. species</i>	ng	ng	ng	ng	5 [*]	22 [*]	ng	102
P93	<i>E. species</i>	20-	2 [*]	20 [*]	17 [*]	12 [*]	25 [*]	2-	80
P94	<i>E. species</i>	13-	4 [*]	29 [*]	5 [*]	29 [*]	34 [*]	10-	102
M1026	<i>E. species</i>	2-	1 [*]	2 [*]	1 [*]	ng	4 [*]	ng	62
M1028	<i>E. species</i>	ng	8 [*]	16 [*]	7 [*]	8 [*]	25 [*]	1-	74
M1030	<i>E. species</i>	1-	5 [*]	ng	ng	20 [*]	28 [*]	1-	146
M1032	<i>E. species</i>	ng	6 [*]	1 [*]	4 [*]	7 [*]	6 [*]	ng	70
M1038	<i>E. species</i>	11-	ng	ng	ng	14 [*]	7 [*]	ng	67
L3	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	210
L4	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L8	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L9	<i>B. species</i>	139-	121 [*]	144 [*]	153 [*]	135-	157-	135-	180

10

20

30

40

株	種	PETRIFILM™ スタフィロコッカス計数プレート (BCIG 濃度、 $\mu\text{g/mL}$)							
L11	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L12	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	190
L13	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	200
L14	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L18	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L20	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
L24	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	250
L27	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	>300
LK1	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	330
LK3	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	157
LK4	<i>B. species</i>	ng	ng	ng	ng	ng	ng	ng	170
LK5	<i>B. species</i>	170-	150*	180*	220*	190*	210-	180-	270

* 増殖せず

* 青～赤味を帯びた青色コロニー

赤色コロニーのみ

更なる株を評価するために、0 および 100 マイクログラム / ミリリットル BCIG を有する PET RIFILM™ スタフィロコッカス計数 (PSC) プレート処方物を以下のように調製した：

10

20

材料：

PETRIFILM™ 好気性細菌計数用 頂部フィルム	3M Company, St. Paul, MN	
キサントタンガム	Kelco, San Diego, CA	
ローカストビーンガム	Genu Worldwide, Lille Skensved Denmark	10
ガーガム	Meyhall Chemical AG, Zandaam The Netherlands	
7.5 ミル メリネックス ブロス粉末：	ICI Films, Wilmington, DE	
トリプトースペプトン	Acumedia, Baltimore, MD	
ジペプトン	Acumedia, Baltimore, MD	20
酵母抽出物	BBL, Baltimore, MD	
塩化リチウム	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
ナリジクス酸	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
セフトジジム	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
ピルビル酸	Sigma Chemical, St. Louis, MO	
卵黄懸濁液	Difco Laboratories, Detroit, MI	
5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルコピラノシド (BCIG)	Biosynth International, Naperville, IL	30
20 ミル スタイロフォーム	Astro-Valcour, Inc., Glen Falls, NY	

頂部フィルム：

キサントタンガム、ローカストビーンガムおよびガーガムを 2 : 2 : 1 の割合で混合した。この混合物を、トリフェニルテトラゾリウムクロリドを 34 平方インチのフィルムあたり約 0.4 グラムのレベルで含有する PETRIFILM™ 好気性細菌計数用頂部フィルム上に粉末被覆した。

40

ブロス混合物：

ブロス粉末を以下の方法で混合した：

トリプトースペプトン	50 グラム	
ジペプトン	50 グラム	
酵母抽出物	20 グラム	
塩化リチウム	20 グラム	
ナリジクス酸	40 ミリグラム	
セフトジジム	4 ミリグラム	
ピルビン酸	20 グラム	50

卵黄懸濁液 40ミリリットル
脱イオン水 2リットル

粉末を水と激しく混合した。溶液をサンプリングして2個の1000ミリリットルアリコートとした。200ミリグラムのBCIGを1つのアリコートに添加し、激しく混合した。キサントガム：ガーガムの等量混合物の20グラムを両溶液に添加し、激しく混合した。すべての粉末を添加してよく混合した後、両溶液とも激しく混合しながら80℃に加熱した。次いで、溶液を1晩2～8℃に冷却した。ブrossを、約10ミルのナイフ間隙を介してメリネックス上に被覆し、次いで、約10分間93℃で乾燥した。この被覆により、24平方インチあたり300～350ミリグラムの被覆重量が達成された。20ミルのスタイロフォームをアクリル酸粘着剤で転移被覆した。スタイロフォーム材料から直径2インチの円を取り出した。これは、接種物を保持するためのウェルとして機能した。ブrossを被覆したウェブ(web)を20ミルのスタイロフォーム上に積層した。粉末被覆頂部フィルムをスタイロフォーム/ブross被覆メリネックス積層物に付着させるための蝶着部として、2分の1インチの両面粘着テープを使用した。フィルムを、ほぼ中央に円を有する3×4インチの長方形に切り出した。評価する前に、フィルムを5～10キログレイで紫外線照射した。トリプシンダイズブross中で1晩、37℃で培養することによって、評価のために細菌培養物を調製した。培養物を適切に希釈して、バッファフィールド・スタンダード・バッファ(Fisher Scientific, Chicago, IL)中1ミリリットルあたり約100コロニー形成単位(cfu)を達成した。それぞれの細菌の希釈物を、3M PETRIFILMTM好気性細菌計数プレート上にプレート化した等価物から得られた結果と比較した。細菌希釈物(1.0ミリリットル)をそれぞれ2個ずつプレート化し、37℃で24時間後に計数した。結果を表6に示す。

10

20

表6

株	種	PACプレート	PSCプレート
(Mean cfu/ミリリットル)			
23842	<i>B. amyloliquefaciens</i>	265	ng ¹
11778	<i>B. cereus</i>	86.5	ng
13061	<i>B. cereus</i>	320	ng
14579	<i>B. cereus</i>	215	ng
61	<i>B. circulans</i>	810	295*
4513	<i>B. circulans</i>	570	355*
7050	<i>B. coagulans</i>	230	ng
14580	<i>B. licheniformis</i>	208	144*
14581	<i>B. megaterium</i>	ng	ng
6462	<i>B. mycoides</i>	ng	ng
842	<i>B. polymyxa</i>	125	ng
72	<i>B. pumilis</i>	940	520*
4525	<i>B. sphaericus</i>	165	174-
6051	<i>B. subtilis</i>	225	ng
23059	<i>B. subtilis</i>	149	ng
23856	<i>B. subtilis</i>	95	ng
23857	<i>B. subtilis</i>	>1000	ng
23858	<i>B. subtilis</i>	265	ng
23859	<i>B. subtilis</i>	415	ng
29056	<i>B. subtilis</i>	546	ng
L3	<i>B. species</i>	148	ng
L4	<i>B. species</i>	>1000	ng
L8	<i>B. species</i>	230	ng
L9	<i>B. species</i>	154	137*
L11	<i>B. species</i>	800	ng
L12	<i>B. species</i>	550	ng
L13	<i>B. species</i>	>1000	ng

10

20

30

40

L14	<i>B. species</i>	>1000	ng
L18	<i>B. species</i>	>1000	ng
L24	<i>B. species</i>	630	ng
L27	<i>B. species</i>	210	ng
882	<i>E. faecium</i>	26	4*
19433	<i>E. faecalis</i>	59	ng
MMM	<i>E. faecalis</i>	77	16*
P89	<i>E. species</i>	66	ng
P90	<i>E. species</i>	84	ng
P91	<i>E. species</i>	49	ng
P92	<i>E. species</i>	60	ng
P93	<i>E. species</i>	70	ng
P94	<i>E. species</i>	59	ng
P88	<i>E. species</i>	40	ng
M1026	<i>E. species</i>	43	ng
M1028	<i>E. species</i>	44	ng
13301	<i>S. aureus</i>	112	108-
13565	<i>S. aureus</i>	60	63-
12600	<i>S. aureus</i>	79	73-
27659	<i>S. aureus</i>	64	78-
12598	<i>S. aureus</i>	62	52-
35547	<i>S. epidermidis</i>	24	22-

*増殖せず

*青～赤味を帯びた青色コロニー

赤色コロニーのみ

本発明の他の実施態様についても添付されている本発明の請求の範囲内にある。

10

20

30

フロントページの続き

(72)発明者 ルンド, マーリス・イー
アメリカ合衆国 5 5 1 3 3 3 4 2 7 ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス 3
3 4 2 7

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平 0 9 - 5 0 8 2 7 9 (J P , A)
特開平 0 2 - 1 9 5 8 9 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/00 - 70

G01N 21/00 - 33/98

C12N 1/00 - 13/00

PubMed、MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)