

食安監発第1102006号
平成18年11月2日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公印省略)

腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について

食品からの腸管出血性大腸菌 O157 の検出方法については、平成9年7月4日付け衛食第207号及び衛乳第199号「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」により示しているところである。

近年、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号）に基づく発生動向調査において、腸管出血性大腸菌感染症患者から血清型 O26 が分離される事例の増加が認められることから、今般、腸管出血性大腸菌の血清型 O157 のほか、血清型 O26 の検出方法について検討を行い、別添のとおり食品からの腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法を定めたので、検査を行う場合は下記の点に留意の上、この方法により実施されたい。

なお、平成9年7月9日付け衛食第212号及び衛乳第202号、並びに平成9年7月17日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法の解説について」は廃止する。

記

1. 本検査法は、食品中の腸管出血性大腸菌の血清型 O157 のほかに、血清型 O26 を検出する方法を定めたものであること。
2. 食肉（内臓を含む。）、食肉製品及びチーズ以外の食品については、ベロ毒素検出法をスクリーニング法として用いることが可能であること。

(別添)

食品からの腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法

腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の試験を以下の方法によって行う。なお、食肉（内臓を含む。）、食肉製品及びチーズについては培養法のみを行う。また、その他の食品についてもベロ毒素（VT）遺伝子検出法を行うための設備を整えることができない場合については培養法のみを行って差し支えない。

1. 検体の採取

1) 食品

食品検体 200 g 以上を採取する。なお、表面汚染が考えられる食品は、表面部を厚さ 0.2～0.3 cm に削り、これを検体とする。

2) 水

水の場合は、蛇口をアルコール綿等で殺菌後 3 L 以上を採水する。水槽から直接採水する場合は、柄杓等を使用する。なお、塩素消毒されている水はチオ硫酸ナトリウムで中和する。

2. 試料の調製

1) 食品

採取した検体の全体を細切、混和後、その 25 g をストマッカー袋に秤量して、これを試料とする。

2) 水

採取した検体の 3 L をメンブレンフィルター（ポアサイズ 0.45 μm ）で濾過する。フィルターが途中で目詰まりした場合は新しいフィルターを追加使用する。なお、汚濁などのためフィルターでは濾過できない場合は、遠心（3,000Xg、30 分）しその沈渣を採取し検体とする。

3. 増菌培養

以下の増菌培養液を培養法及び VT 遺伝子検出法に供試する。但し、VT 遺伝子検出法の場合は、別に 10 ml を分離培養用として試験が終了するまで冷蔵保存する。

1) 食品

ストマッカー袋中の試料に増菌培地 225 ml を加え 1 分間ストマッカーで処理後、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。

2) 水

濾過したフィルターまたは遠心して得られた沈渣を中試験管に入れ、増菌培地 15 ml を加えて $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。また、3 L の試料を小分けして等量の 2 倍濃度の増菌培地を加えて培養してもよい。

4. 増菌用培地

1) ノボビオシン加 mEC 培地 (栄研化学、日水製薬、メルク、極東製薬工業 等)

組成 :

ノボビオシンナトリウム 0.020-0.025 g

ペプトン 20.0 g

胆汁酸塩 1.12 g

ラクトース 5.0 g

K₂HPO₄ 4.0 g

KH₂PO₄ 1.5 g

NaCl 5.0 g

精製水 1,000 ml

pH 6.9±0.1

★ : 121°Cで15分間滅菌後冷却し、そのまま使用する。

2) ノボビオシン加 mEC 培地 (市販の mEC 培地 (ノボビオシン不含) を用いる場合 (オキシイド製造 ; 関東化学販売、栄研化学、日水製薬、極東製薬工業 等))

基礎培地組成 :

ペプトン 20.0 g

胆汁酸塩 1.12 g

ラクトース 5.0 g

K₂HPO₄ 4.0 g

KH₂PO₄ 1.5 g

NaCl 5.0 g

精製水 1,000 ml

pH 6.9±0.1

★ : 121°Cで15分間滅菌後冷却し、ノボビオシンナトリウム (メルク、シグマアルドリッチジャパン等) の濾過滅菌水溶液 (4 mg/ml) を培地 1,000 ml につき 5 ml 添加する (最終濃度 20 mg / 1,000 ml)。

3) ノボビオシン加 mEC 培地 (USDA 法) (自家調製)

基礎培地組成 :

トリプトン 20.0 g

胆汁酸塩 (Bile salts No.3) 1.12 g

ラクトース 5.0 g

K₂HPO₄ 4.0 g

KH₂PO₄ 1.5 g

NaCl 5.0 g

精製水 1,000 ml

pH 6.9±0.1

★：121℃で15分間滅菌後冷却し、ノボビオシンナトリウム（メルク、シグマアルドリッチジャパン等）の濾過滅菌水溶液（4mg/ml）を培地1,000mlにつき5ml添加する（最終濃度20mg/1,000ml）。

ただし、凍結等によって菌の損傷が考えられる場合は、各試験検査機関において本通知法に示す増菌培養法と同等であると判断した上で、mECにおいて36±1℃培養など選択性が弱い増菌培養法の使用を推奨する。その他の培地についても各試験検査機関で同等性について評価を行い使用しても良い。その際には分離平板培地は大腸菌が選択できるものを使用する。これらの菌はセフィキシム・亜テルル酸カリウム（CT）に感受性が高いことが考えられるのでCT非添加のものも使用する必要がある。

5. DNA抽出法（VT遺伝子検出法を行わない場合は8へ）

使用する個々のDNA抽出法に必要な培養液量からDNA抽出を行ない、それを試料として次項のVT遺伝子検出を行う。そのDNA抽出法としては以下のものが利用できる。キットについては各添付文書を参照すること。抽出DNAは氷上で取り扱い、保存は凍結が望ましい。なお、培養液の加熱による単純なDNA抽出法は検出感度が優れないため使用しない。

1) アルカリ熱抽出法

培養液0.1mlを10,000Xg、10分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した50mM NaOH 0.1mlを添加して100℃で10分間加熱処理する。その処理液50μlを滅菌した1M Tris-HCl (pH 7.0) 8μlで中和し遠心上清（10,000Xg、10分間）を検体とする。また、Loop mediated isothermal amplification (LAMP)法のキットを使用する際には、当キットに含まれるDNAアルカリ抽出試薬（EX F）を使用できる（但し、脂肪の多い食品を除く）。アルカリ存在下ではDNAが分解しやすいため、抽出後は氷上で静置し直ちに（60分以内）検出試験に使用する。直ちに使用しない場合には0～4℃で保存し、4時間以内に使用する。

2) PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent（アプライド・バイオシステムズジャパン）

3) DNeasy Tissue Kit（キアゲン）

4) High Pure PCR Template Preparation Kit（ロシュ・ダイアグノスティックス）

その他、同等品も利用できる。

但し、脂肪の多い食品については、食品成分が遺伝子増幅に影響を及ぼすためアルカリ抽出法（EX Fを除く）を使用する。

6. VT遺伝子検出法

抽出したDNAテンプレートをを用いて、VT遺伝子の検出試験を実施する。VT遺伝子検出の結果、陰性であった場合は試験を終了する。陽性であった場合は、当日中に血清型0157及び026を対象とした分

離培養を行う。

VT 遺伝子検出法では感度が、 1×10^4 cfu/ml (検体の増菌培養液) より優れるものを使用することとし、方法として以下のものがあげられる。なお、感度の確認が必要な場合には各機関にて後述の方法を参照し行う。

1) PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キットまたは公表されている Primer を各試験検査機関で合成・調製し市販の遺伝子増幅酵素にてリアクションを行う。これについては以下のものが利用できる。また、PCR 産物の電気泳動においては、1,000 bp 以下の核酸分離に対応した低分子用アガロースゲルを使用する。

(1) 市販のキットを使用する場合

① 0-157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (タカラバイオ)

94°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで1分を35サイクル、72°Cで10分1サイクルを行う。増幅 DNA の大きさは 171 bp である。

(2) 公表されている Primer を各試験検査機関で合成・調製し市販の遺伝子増幅酵素を使用する場合

下記に示す例以外にも、反応条件を検討し同等であると判断された Primer 及び PCR 酵素が利用できる。

① Lin *et al.* Microbiol. Immunol. 37: 543-548, 1993.

(使用方法例)

表 1 に示した反応液を調製する。

表 1 反応液の調製

試薬	容量
Template	5.0 μ l
Distilled water	34.75 μ l
10 X Ex Taq Buffer	5.0 μ l
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4.0 μ l
Takara Ex Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
5 pmol/ μ l プライマー	Sense: 0.5 μ l
	Antisense: 0.5 μ l
計	50.0 μ l

Sense: 5' -GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'

Antisense: 5' -TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'

94°Cで1分、43°Cで1.5分、72°Cで1.5分を40サイクル行う。増幅 DNA の大きさは 905 bp である。

2) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法

以下のキットが利用できる。

(1) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学)

対応機種：Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C 及び RT-160C: 栄研化学販売)

その他、同等の機能を有する機器が利用できる。

付属の DNA 抽出試薬の他に、5. に示した DNA 抽出方法による DNA 抽出液も利用できる。

3) Real-time PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キットまたは公表されている Primer 及び Probe を各試験検査機関で合成・調製し市販の Master Mix にてリアクションを行う。これについて下記のものが利用できる。

(1) 市販キットを使用する場合

① CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit (タカラバイオ)

対応機種： Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ)、ABI PRISM 7000、7300、7500、7700 及び 7900 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)、LightCycler Ver. 1.2、1.5、2.0

その他、同等の機能を有する機器が利用できる。

② CycleavePCR 0-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ)

対応機種： Smart Cycler、Smart Cycler II (タカラバイオ)

(2) 公表されている Primer 及び Probe を合成・調製し市販の Master Mix を使用する場合

下記に示す例以外にも、反応条件を検討し同等であると判断された Primer、Probe、Master Mix、Real-time PCR 機器が利用できる。

① Nielsen *et al.* J. Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003. (使用機種： ABI7700 ; アプライド・バイオシステムズジャパン)

(使用方法例)

● 器具

ABI PRISM 7000、7300、7500、7700 及び 7900、マイクロピペット、Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate (ABI Cat. No. N8010560)、Micro Amp Optical Cap, 8caps/strip (ABI Cat. No. 4323032)、[操作方法は Micro Amp Optical Cap を使用した場合を記すが、Optical Adhesive Covers (ABI Cat. No. 4311971)、Optical Cover Compression pads (ABI Cat. No. 4312639)、Adhesive Seal Applicators (ABI Cat No. 4333183)を用いても良い]

● 試薬

TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI Cat. No. 4304437)、TaqMan プローブ、プライマー、Distilled water

● 反応プレートの準備

表 2 に示した反応液を調製する。VT 1 と VT 2 を別々に行う。

- プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate) のウェルに 45.0 μl ずつ反応液を入れる。陽性コントロール及び陰性コントロールを設定する。
- 陰性コントロールとして DDW 5 μl を加え、蓋を軽く閉める。
- サンプル DNA 5 μl を加え、蓋 (Micro Amp Optical Cap, 8caps/strip) を軽く閉める。
- 陽性コントロール DNA VT 1 と VT 2 を別々に 5 μl を加え、蓋を軽く閉める。
- 蓋をしっかりと閉め、遠心してウェルの底の気泡を除き壁についている反応液を落とす。(遠心機が無い場合はプレートを軽く叩いたり、振り下ろしたりする。)
- Instrument タブをクリックし、サーマルサイクラー条件を次のように設定する。50°C で 2 分、95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 45 サイクル行う。
- ランを開始する。
- ランが終了したら、データ解析をする。
- ABI PRISM 7000, 7300 システム, 7500 システムの場合、Results タブ内の Amplification Plot タブをクリックする。下段のプレート表示より 96 ウェル全てのデータを表示する。Analysis Setting の Auto Ct を選び、Analyze ボタンをクリックする。Report タブをクリックし、Ct 値が得られている場合を陽性とする。

ABI PRISM 7000 及び 7700 の場合、まず Baseline を設定する。Amplification Plot 上に全てのデータを表示し、グラフの左横の数字をダブルクリックし、Y-Axis の設定を Linear にする。PCR 増幅による蛍光シグナルの増加が始まっていないように見える初期サイクルの範囲を示す Start と End のサイクル数を入力し、Analyze または Update calculations ボタンをクリックする。次いで Threshold Line を設定する。Amplification Plot 上に全てのデータを表示し Y-Axis の設定を Log にする。グラフ上の緑色または黒色の線を増幅曲線の指数関数的増幅領域の中央に設定し、Analyze または OK ボタンをクリックする。Report または Experiment Report) タブをクリックし、Ct 値が得られている場合を陽性とする。

表 2 反応液の調製

試薬	VT1	VT2
Distilled water	12.0 μl	12.0 μl
TaqMan Universal Master Mix	25.0 μl	25.0 μl
10 pmol/ μl プライマー	VT1-F 3.0 μl	VT2-F 3.0 μl
	VT1-R 3.0 μl	VT2-R 3.0 μl
5 pmol/ μl プローブ	VT1-P 2.0 μl	VT2-P 2.0 μl

計	45.0 μ l	45.0 μ l
---	--------------	--------------

VT1-F: 5' -GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'

VT1-R: 5' -CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'

VT1-P: 5' -FAM-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-TAMRA-3'

VT2-F: 5' -GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA-3'

VT2-R: 5' -GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA-3'

VT2-P: 5' -FAM-ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT-TAMRA-3'

② Bellin *et al.* J. Clin. Microbiol. 39:370-374, 2001. (使用機種: LightCycler; ロシユ・ダイアグノスティックス)

(使用方法例)

- 器具

LightCycler Ver. 1.2、1.5、2.0、マイクロピペット、LightCycler Capillaries 20 μ l

- 試薬

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe、プローブ、プライマー、Distilled water

- 反応プレートの準備

表 3 に示した反応液を調製する。VT1 と VT2 を別々に行う。キャピラリー (LightCycler Capillaries 20 μ l) に 18.0 μ l ずつ反応液を入れる。

- 陰性コントロールとして DDW 2 μ l を加え、蓋を閉める。
- 陽性コントロール及び陰性コントロールを設定する。
- サンプル DNA 2 μ l を加え、蓋を閉める。
- 陽性コントロール DNA VT 1 と VT 2 を別々に 2 μ l を加え、蓋を閉める。
- カローセルにキャピラリーをセットし、専用遠心機で遠心後、LightCycler にセットする。
- プログラムの設定を以下のように設定する。
- 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 10 秒、60°C で 5 秒 (55°C まで 0.5°C ずつタッチダウン)、72°C で 20 秒を 45 サイクル、40°C で 30 秒を 1 サイクル行う。
- ランを開始する。

ランが終了したら、データ解析をする。

Analysis Type のプルダウンメニュー中の Qualitative Detection を選択する。Channel プルダウンメニューから測定チャンネルを選択する。Analysis ボタンをクリックし、Absolute Quantification を選択し、Channel プルダウンメニューから測定チャンネルを選択する。Methods プルダウンメニューから Fit Points を選択し、Step 2 タブをクリックする。グラフ上の赤色の線を増幅曲線の指数関数的増幅領域の中央に設定し、Step

3 タブをクリックする。同様に、グラフ上の赤色の線を増幅曲線の指数関数的領域の中央に設定し、Cp 値が得られた場合を陽性とする。

表 3 反応液の調製

試薬	VT1	VT2
Distilled water	9.6 μ l	9.6 μ l
10 \times LC-DNA Master	2.0 μ l	2.0 μ l
25mM MgCl ₂	2.4 μ l	2.4 μ l
10 pmol/ μ l プライマー	StxA1 598 1.0 μ l	StxA2 679 1.0 μ l
	StxA1 1015 1.0 μ l	StxA2 942 1.0 μ l
3 pmol/ μ l プローブ	StxA1 FL724 1.0 μ l	StxA2 FL769 1.0 μ l
	StxA1 LC693 1.0 μ l	StxA2 LC799 1.0 μ l
計	18.0 μ l	18.0 μ l

StxA1 598: 5' -AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT-3'

StxA1 1015: 5' -CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT-3'

StxA1 FL724: 5' -CTG TCA CAG TAA CAA ACC GTA ACA TCG CTC-FITC-3'

StxA1 LC693: 5' -Red705-TGC CAC AGA CTG CGT CAG TGA GGT-3'

StxA2 679: 5' -TTC CGG AAT GCA AAT CAG TC-3'

StxA2 942: 5' -CGA TAC TCC GGA AGC ACA TTG-3'

StxA2 FL769: 5' -MAG AGC AGT TCT GCG TTT TGT CAC TGT CA-FITC-3'

StxA2 LC799: 5' -Red640-AGC AGA AGC CTT ACG CTT CAG GC-3'

その他、同等品も使用できる。

VT 遺伝子検出法の感度確認が必要な場合は、血清型 0157 及び 026 (VT1 及び VT2 陽性株) の菌濃度が 1×10^4 cfu/ml (検体の増菌培養液) を作製し試験する。血清型 0157 及び 026 (VT 1 及び VT 2 陽性株) を Tryptic soy broth (栄研化学、日水製薬、オキソイド製造; 関東化学販売、日本ベクトン・ディッキンソン等) (10 ml) に接種し $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18 時間培養する (約 5×10^8 cfu/ml)。この培養液を対象検体のノボビオシン加 mEC 培養液 9 ml を用いて 10^{-4} 倍希釈する。この 10^{-4} 倍希釈液 1 ml を、さらに 4 ml の対象検体のノボビオシン加 mEC 培養液で希釈した菌液を試料とする。この希釈菌液は 1×10^4 cfu/ml (検体の増菌培養液) とし試験に用いる。菌液調製について、各機関であらかじめ菌株の増殖程度を確認し、必要ならば希釈倍率の変更を行う。

7. 免疫磁気ビーズ法

血清型 0157 及び 026 大腸菌の分離を目的に、増菌培養液を各血清型の免疫磁気ビーズ法に供試す

る。免疫磁気ビーズとしては以下のものが利用できる。各社ビーズの仕様に合わせた各ビーズ液量を別々の 1.5 ml チューブに入れ、各々に 1 ml ずつ培養液を加え濃縮する。この際、異なる血清型のビーズを混合して用いてはならない。また、濃縮操作は各社製ビーズの仕様に合わせ 0.05% Tween20 加 PBS または滅菌生理食塩水を使用し最終的に 0.1 ml に懸濁する。詳細な試験方法は、各仕様書を参照すること。交差汚染を避けるためにマイクロチューブの蓋をあける際は、固く絞ったアルコール綿で蓋を覆うなどの配慮が必要である。また、ビーズ吸着操作後の培養液や洗浄液を取り除く際には、ディスポーザブルのスポイトの使用やマイクロピペットの汚染防止などを配慮する。

1) 血清型 0157

(1) 免疫磁気ビーズ 0157「生研」(デンカ生研)

(2) Dynabeads anti-E.coli 0157 (ダイナル製造 ; ベリタス販売)

その他、同等品も使用できる。

2) 血清型 026

(1) 免疫磁気ビーズ 026「生研」(デンカ生研)

(2) Dynabeads EPEC/VTEC 026 (ダイナル製造 ; ベリタス販売)

その他、同等品も使用できる。

8. 分離培養法

分離培養は増菌培養液の直接塗抹及び免疫磁気ビーズ濃縮液の塗抹によって行う。直接法については増菌培養液 10 μ l、免疫磁気ビーズ法については免疫磁気ビーズ濃縮液 10-20 μ l を各種分離平板培地 1 枚あたりに画線塗抹し 36 \pm 1 $^{\circ}$ C で 18-24 時間培養後、疑われるコロニーを分離する。多くの単離コロニーが出現するように、1 種類につき 2 枚以上の分離平板培地を用いたり、増菌培養液を希釈するなどの操作を行う。二分画培地の場合は相当の面積に塗抹する。1 検体につき典型的コロニーをできる限り 5 個以上釣菌する。

1) 血清型 0157 の分離には、セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルビトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地を必ず使用し、酵素基質培地として BCM 0157 寒天培地、クロモアガー 0157 培地、クロモアガー 0157TAM 培地、CT-0157:H7ID 寒天培地、レインボーアガー0157 培地のうち 1 種類以上を併用することとする。

(1) CT-SMAC 寒天培地 (市販生培地、自家調製または基礎培地使用 : オキシイド製造 ; 関東化学販売、日水製菓、メルク、栄研化学、日本ベクトン・ディッキンソン等)

基礎培地組成 :

ペプトン 20.0 g

胆汁酸塩 1.5 g

ソルビトール 10.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

ニュートラルレッド 0.03 g

クリスタルバイオレット 0.001 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.2±0.1

備考：121℃で15分間滅菌後、50℃以下に冷却し、以下に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。典型的な血清型 0157 はソルビトール非分解または遅分解コロニーであり無色透明コロニーを形成する。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg、亜テルル酸カリウム 2.5 mg を加える。添加剤は関東化学、メルク、アスカ純薬、ベリタス等で購入することができる。

(2) BCM 0157 寒天培地 (栄研化学)

基礎培地組成：

トリプトン 6.0 g

ポリペプトン 12.0 g

糖類 (単糖類、二糖類) 40.0 g

発色基質 0.4 g

グラム陽性菌抑制剤 1.5 g

フェノールレッド 0.1 g

塩化ナトリウム 5.0 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

添加剤 亜テルル酸カリウム 0.5 mg

pH 6.8±0.1

備考：基礎培地を加熱溶解する (オートクレーブ不可)。これを 50℃以下に冷却した後、亜テルル酸カリウムを加えてから滅菌シャーレに分注し寒天平板を作製する。なお、選択性を高めるには、ノボビオシンナトリウムを目的にあわせて (10 mg/1,000 ml) 添加するとよい。作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は 2~10℃で 90 日以内とする。典型的な血清型 0157 は黒〜濃緑色コロニーを形成する。

(3) クロモアガー0157 培地 (クロモアガー製造；関東化学販売)

組成：

ペプトン 5.0 g

酵母エキス 3.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

選択剤・発色基質混合物 1.0 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 6.8±0.1

備考：培地は、加熱溶解後（オートクレーブ不可、過度の加熱も避けること）50℃以下に冷却してから滅菌シャーレに分注し寒天平板を作製する。なお、作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は2～8℃で30日以内とする。典型的な血清型0157は藤色コロニーを形成する。

(4) クロモアガー0157 TAM 培地（クロモアガー製造；関東化学販売）

組成：

ペプトン 5.0 g

酵母エキス 3.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

選択剤・発色基質混合物 1.0 g

チオ硫酸ナトリウム・鉄混合物 5.0 g

寒天 12.0 g

精製水 1,000 ml

pH 6.8±0.1

備考：培地は、加熱溶解後（オートクレーブ不可、過度の加熱も避けること）50℃以下に冷却してから滅菌シャーレに分注し寒天平板を作製する。なお、作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は2～8℃で30日以内とする。典型的な血清型0157は藤色コロニーを形成する。

(5) CT-0157:H7ID 寒天培地（ボトル培地；日本ビオメリュー）

基礎培地組成：

ゼラチンペプトン 7.0 g

NaCl 5.0 g

酵母エキス 6.0 g

炭酸ナトリウム 0.13 g

ニュートラルレッド 0.01 g

胆汁酸塩 1.5 g

炭水化物混合物 24.0 g

活性混合物 0.25 g

発色基質混合物 0.25 g

寒天 12.5 g

精製水 1,000 ml

pH 7.1

備考：加温溶解後、50℃以下に冷却し添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は2～8℃

で7日以内とする。典型的な血清型 0157 は青緑色、その他の血清型の大腸菌は紫色のコロニーを形成する。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg、亜テルル酸カリウム 2.5 mg を加える。添加剤は日本ビオメリュー（200 ml 培地用）、関東化学、メルク、アスカ純薬、ベリタス等で購入することができる。

(6) レインボーアガー0157 培地（バイオログ製造；GSI クレオス販売）

組成：

ペプトン 6.0 g
糖類 35.63 g
発色基質 0.4 g
3-indoxyl- β -D-galactoside 0.25 g
3-indoxyl- β -D-glucuronide 0.12 g
寒天 14.0 g
精製水 1,000 ml
pH 6.8 \pm 0.1

備考：培地は、加熱溶解または 121°C で 5 分間滅菌した後、50°C 以下に冷却してから滅菌シャーレに分注し寒天平板を作製する。なお、血清型 0157 の選択性を高めるためには、ノボピオシナトリウムを目的にあわせて培地 1,000 ml あたり 100 mg 添加するとよい。ただし、血清型 0157 以外の大腸菌も生育させる場合は 10 mg の添加とする。作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は 2～8°C で 14 日以内とする。典型的な血清型 0157 は黒～灰色コロニーを形成する。

2) 血清型 026 の分離には、セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ラムノースマッコンキー (CT-RMAC) 寒天培地を必ず使用し、CT-Vi RX 026 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地、CT-ColiID 寒天培地等の大腸菌が鑑別できる培地を 1 種類以上併用することとする。セフィキシム及び亜テルル酸カリウム等の添加によって選択性の高まることが期待できるため、分離培地にはこれらを添加する。

(1) CT-RMAC 寒天培地（自家調製、MacConkey Agar Base (日本ベクトン・ディッキンソン) の使用または市販生培地：デンカ生研、日水製薬)

基礎培地組成：

ペプトン 20.0 g
胆汁酸塩 (Bile salts No.3) 1.5 g
ラムノース 10.0 g
NaCl 5.0 g
ニュートラルレッド 0.03 g

クリスタルバイオレット 0.001 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.2±0.1

備考：121℃で 15 分間滅菌後、50℃以下に冷却し、以下に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。典型的な血清型 026 はラムノース非分解または遅分解コロニーであり無色透明コロニーを形成する。ラムノース分解性の他の大腸菌は赤色コロニーを形成する。

添加剤：培地 1,000ml に対し、セフィキシム 0.05 mg、亜テルル酸カリウム 2.5 mg を加える。添加剤は関東化学、メルク、アスカ純薬、ベリタス等で購入することができる。

(2) CT-Vi RX 026 寒天培地 (栄研化学)

基礎培地組成：

ペプトン 15.0 g

NaCl 5.0 g

胆汁酸塩 1.5 g

L-ラムノース 10.0 g

フェノールレッド 0.03 g

発色基質 0.3 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.0±0.2

備考：121℃で 15 分間滅菌後、50～60℃に冷却し、以下に示す添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。典型的な血清型 026 は青紫～黒色コロニーを形成する。026 以外の血清型の大腸菌は黄緑～青緑色を、また、大腸菌以外の腸内細菌は緑、黄色または赤色のコロニーを形成する。ブドウ球菌などの腸内細菌以外の菌はほとんど発育しない。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg、亜テルル酸カリウム 2.5 mg を加える。添加剤は関東化学、メルク、アスカ純薬及びベリタス等で購入することができる。

(3) CT-SMAC 寒天培地 (前述)

(4) CT-ColiID 寒天培地 (ボトル培地；日本ビオメリュー)

基礎培地組成：

ゼラチンペプトン 7.0 g

NaCl 5.0 g

酵母エキス 3.0 g

胆汁酸塩 1.5 g

活性化剤混合物 0.3 g

発色基質混合物 0.3 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.2

備考：加温溶解後、50℃以下に冷却し添加剤を無菌的に加えたのち、滅菌シャーレに分注し寒天平板として使用する。作製した寒天平板は冷蔵保存するが、その保存期間は2～8℃で7日以内とする。典型的な026及びその他の血清型（0157を除く）はピンク～赤紫色のコロニーを形成する。血清型0157及び大腸菌群は灰色～青色を、また、他のグラム陰性菌は無色のコロニーを形成する。

添加剤：培地1,000 mlに対し、セフィキシム0.05 mg、亜テルル酸カリウム2.5 mgを加える。添加剤は日本ビオメリュー（200 ml 培地用）、関東化学、メルク、アスカ純薬及びベリタス等で購入することができる。

その他、同等の大腸菌が鑑別できる培地も使用できる。

9. 血清型別試験

各分離平板培地から血清型0157及び026と疑われるコロニーを普通寒天培地等に純培養する（培養条件：36±1℃で18～24時間）。免疫血清及び抗体を感作したラテックスを使用した凝集試薬が市販されている。試験方法は、仕様書を参照すること。生菌を用いた場合は誤判定となる場合があるため、最終判定には加熱死菌を用いる。

1) 血清型 0157

(1) 病原大腸菌免疫血清 0157 (デンカ生研)

(2) 大腸菌 0157 検出試薬「UNI」(オキシイド製造；関東化学販売)

(3) *E. coli* 0157-F「生研」(デンカ生研)

(4) プロレックスアスカ大腸菌 0157 (アスカ純薬)

その他、同等品も使用できる。

2) 血清型 026

(1) 病原大腸菌免疫血清 026 (デンカ生研)

(2) *E. coli* 026-F「生研」(デンカ生研)

その他、同等品も使用できる。

10. 生化学的性状試験

血清型0157及び026と疑われるコロニーについては、生化学的性状を確認する。TSI 寒天培地、LIM 培地、CLIG 培地、各種キット等を使用できる（培地使用における培養条件：36±1℃で18～24時間）。

1) TSI 寒天培地 (日水製薬、栄研化学、メルク、オキシイド製造 ; 関東化学販売、他)

組成 :

ペプトン 20.0 g
肉エキス 3.0 g
酵母エキス 3.0 g
NaCl 5.0 g
乳糖 10.0 g
シヨ糖 10.0 g
ブドウ糖 1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム 0.2 g
チオ硫酸ナトリウム 0.2 g
フェノールレッド 24 mg
寒天 12.0 g
精製水 1,000 ml
pH 7.4±0.2

備考 : 加温溶解後、小試験管に 3 ml ずつ分注し 121℃で 15 分間滅菌後、斜面寒天 (半高層) として使用する。また、市販品を使用してもよい。TSI 寒天培地での大腸菌は、高層部黄変、斜面部黄変、ガス産生を示す。

2) LIM 培地 (日水製薬、極東製薬工業、栄研化学他)

組成 :

ペプトン 12.8 g
酵母エキス 3.0 g
ブドウ糖 1.0 g
L-リジン塩酸塩 10.0 g
L-トリプトファン 0.5 g
ブロムクレゾールパープル 0.02 g
寒天 2.7 g
精製水 1,000 ml
pH 6.8

備考 : 加温溶解後、小試験管に約 5 ml ずつ分注し 121℃で 15 分間滅菌後急冷し高層培地とする。LIM 培地での大腸菌は、高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生を示す。

3) CLIG 培地 (極東製薬工業)

組成 :

カゼインペプトン 7.5 g
肉ペプトン 2.5 g

ラクトース 1.0 g
セロビオース 10.0 g
トリプトファン 0.1 g
MUG 0.02 g
NaCl 5.0 g
フェノールレッド 0.025 g
寒天 14.9 g
精製水 1,000 ml
pH 7.4

備考：加温溶解後、小試験管に約3ml ずつ分注し115℃で15分間滅菌後斜面寒天（半高層）培地とする。大腸菌は高層部黄変、斜面部赤変を示す。典型的な腸管出血性大腸菌 O157 は紫外線照射下で蛍光を示さないが、それ以外の血清型は蛍光を示す。

1 1. VT 確認試験

VT 遺伝子または VT 産生性を以下の方法で確認する。

1) PCR 法

- (1) O-157（ベロ毒素遺伝子）PCR Screening Set（タカラバイオ）
- (2) O-157（ベロ毒素1型、2型遺伝子）PCR Typing Set（タカラバイオ）

その他、同等品も使用できる。

2) 逆受身ラッセクス凝集反応（RPLA）法

- (1) VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）

その他、同等品も使用できる。

3) イムノクロマトグラフィ法、ELISA 法、蛍光免疫法等

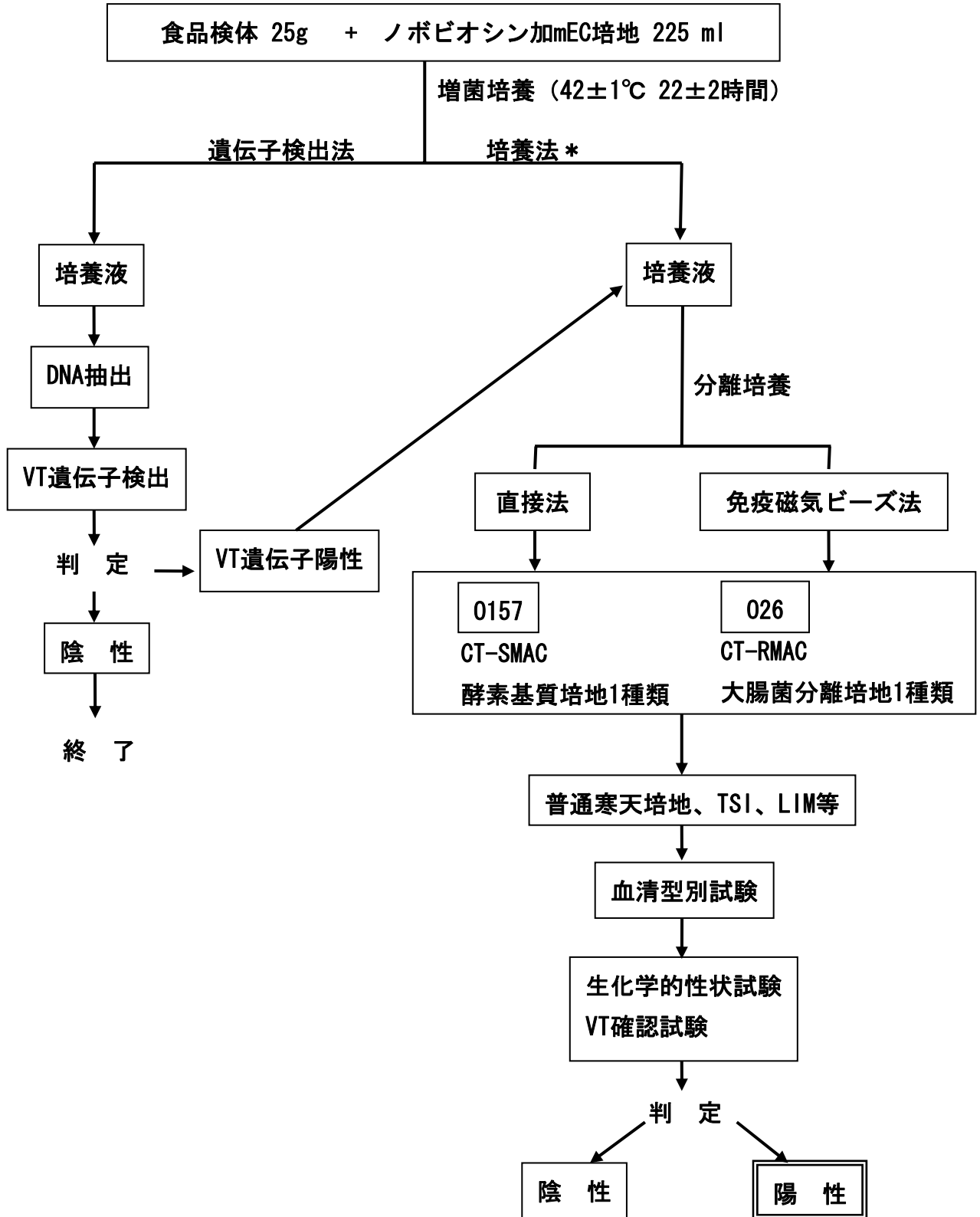
- (1) キャピリア VT（日本ベクトン・ディッキンソン）
- (2) ラインジャッジ（ベリタス）
- (3) デュオパス・ベロトキシシ（メルク）
- (4) RIDA スクリーン ベロトキシシ（アズマックス）
- (5) ノバパス ベロドクソ EIA（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ）
- (6) エバテストニッスイ VT1/2（日水製薬）

その他、同等品も使用できる。

1 2. 判定

腸管出血性大腸菌血清型 O157 または O26 が分離されたことをもって、陽性とする。VT 遺伝子検出法によって陽性であったが、血清型 O157 及び O26 の分離ができなかった場合は、陰性とする。

食品からの腸管出血性大腸菌0157 及び 026の検査法



* 食肉（内臓を含む）、食肉製品及びチーズについては培養法のみを行う。また、その他の食品についてもベロ毒素（VT）遺伝子検出法を行うための設備を整えることができない場合については培養法のみを行って差し支えない。