

食安輸発1120第1号
平成26年11月20日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課
輸入食品安全対策室長
(公印省略)

腸管出血性大腸菌O104の検査法について

標記については、平成24年12月18日付け食安輸発1218第5号にて通知したところです。
今般、当該通知が引用している平成24年12月17日付け食安監発1217第3号が廃止され、
新たに平成26年11月20日付け食安監発1120第3号「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、
O121、O145及びO157の検査法について」が通知されたことから、O104の検査法について別添のとおり所要の改正を行ったので御了知願います。

なお、平成24年12月18日付け食安輸発1218第5号は廃止します。

別添

食品からの腸管出血性大腸菌 0104 の検査法について

平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 3 号「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」の別添（以下「通知別添」という。）に準じ、次の変更を加えた方法にて実施する。

0104 については、これまで国内において感染事例の報告はなく、ヨーロッパで感染が報告されている株は、腸管凝集性大腸菌の病原因子の保有が示唆されており、また、多数の抗生物質耐性を獲得していることが報告されています。本試験法は、現時点の情報に基づき、0104 を幅広に検出することを目的とした暫定的な試験法であり、今後、入手される情報に基づき、改正することができますので了知願います。

1. 通知別添 3. 増菌培養の培養条件を、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 20±2 時間培養する。

2. 通知別添 5. DNA 抽出法において、脂肪が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可能性があるため、VT 遺伝子検出法での内因性又は外因性コントロールが検出されない場合は異なる抽出法、又は、4. に示す分離培養法を実施する。

3. 通知別添 6. VT 遺伝子検出法で陽性であった場合は、次に示す 0104 抗原遺伝子検出法の結果と合わせて、必要な試験を実施する。VT 遺伝子及び 0104 抗原遺伝子が陽性の場合は、当日中に血清型 0104 を対象とした分離培養を行う。

○ 0104 抗原遺伝子検出法

抽出した DNA テンプレートを用いて、0104 抗原に特異的な遺伝子の検出試験を実施する。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 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。下記に示す対象遺伝子以外にも、0104 抗原に特異的な配列を有する遺伝子を対象にしてもよい。

0104 抗原遺伝子検出法では感度が、 $1 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{ml}$ （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 0104 菌株を使用し通知別添 6. の方法を参照して行う。

1) Real-time PCR 法

・検出対象遺伝子を *wzx0104* とする場合

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、試薬や機器が使用できる。

（使用方法例）

使用機種： ABI7500；アプライド・バイオシステムズ

表 1 に示した反応液を調製する。

表 1 反応液の調整（1 反応当たり）

試薬	添加量
SYBR Premix Ex Taq (2X)	25 μl

プライマー (10 pmol/μl)	wzx0104-f 1 μl
	wzx0104-r 1 μl
ROX Reference Dye II (50X)	1 μl
滅菌水	17 μl
サンプル DNA	5 μl
計	50 μl

wzx0104-f: TGTCGCGCAAAGAATTCAAC

wzx0104-r: AAAATCCTTAAACTATACGCC

反応条件は、95°Cで30秒、次いで95°Cで5秒、60°Cで30秒を40サイクルとする。

T_m値は77-78°Cである。

(参考資料 : Detection and identification of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) 0104 in food by Real Time PCR. Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Lab_Proc_VTEC_0104.pdf)

2) PCR法

(1) 検出対象遺伝子を *wzx0104* とする場合

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、試薬や機器が使用できる。

(使用方法例)

表2に示した反応液を調製する。

表2 反応液の調整 (1反応当たり)

試薬	添加量
10X <i>Ex Taq</i> buffer	5 μl
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4 μl
プライマー (18 pmol/μl)	wzx0104-f 1 μl
	wzx0104-r 1 μl
TaKaRa <i>Ex Taq</i> (5U/μl)	0.25 μl
滅菌水	33.75 μl
サンプル DNA	5 μl
計	50 μl

wzx0104-f: TGTCGCGCAAAGAATTCAAC

wzx0104-r: AAAATCCTTAAACTATACGCC

反応条件は、94°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで1分を40サイクル、72°C 10分とする。增幅DNAの大きさは100 bpである。PCR産物の電気泳動においては、1,000bp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。

(参考資料 : Detection and identification of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) 0104 in food by Real Time PCR. Istituto Superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Lab_Proc_VTEC_0104.pdf)

(2) 検出対象遺伝子を *rfb0104* とする場合

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、試薬や機

器が使用できる。

(使用方法例)

表3に示した反応液を調製する。

表3 反応液の調整 (1反応当たり)

試薬	添加量
10X <i>Ex Taq</i> buffer	5 μ l
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4 μ l
プライマー (18 pmol/ μ l)	104rfb0-f 1 μ l 104rfb0-r 1 μ l
TaKaRa <i>Ex Taq</i> (5U/ μ l)	0.25 μ l
滅菌水	33.75 μ l
サンプルDNA	5 μ l
計	50 μ l

104rfb0-f : TGAACTGATTTTAGGATGG

104rfb0-r : AGAACCTCACTCAAATTATG

反応条件は、94°Cで5分、次いで94°Cで30秒、55°Cで1分、72°Cで1分を30サイクル、72°C 5分とする。増幅DNAの大きさは351 bpである。PCR産物の電気泳動においては、1,000bp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。

(参考資料: H. Karch. Laborinformationen zum EHEC Ausbruchsstamm (Stand 01.06.2011). Universitätsklinikum Münster. http://www.ehec.org/pdf/Laborinfo_01062011.pdf)

4. 血清型0104を対象とした分離培養及びそれ以降の試験については、次の方法により実施する。

○ 分離培養法

VT遺伝子及び0104抗原遺伝子陽性であった場合、0104の分離を行うために増菌培養液について、

- ①リン酸緩衝液(PBS)で 10^{-6} まで10倍階段希釀し、各希釀液について再度DNA抽出及びVT遺伝子検出を実施する。
- ② VT遺伝子陽性の最大希釀段液及びその一段上の希釀液各0.1mlを分離平板培地に塗抹する。分離培地には、ソルビトールマッコンキー(SMAC)寒天培地又はVi RX026寒天培地にセフィキシム・亜テルル酸カリウム(CT)添加及び非添加のもの両方を使用し、種類ごとに2枚ずつ塗抹し分離培養を行なう。塗抹平板培地上に生育した大腸菌コロニーについて、單一コロニー浮遊液を調整する。1プレートに95コロニー以上が検出された場合はコロニー群を4分画以上に分け、その分画の大腸菌コロニーをすべて釣菌し、それぞれの分画ごとのコロニー浮遊液を作製し、VT遺伝子検出法を実施する。
- ③單一コロニーのVT遺伝子が陽性だった場合、次に示す血清型別試験等を実施する。分画ごとのコロニー浮遊液がVT遺伝子陽性だった場合、当該浮遊液について①の操作に

戻り、單一コロニーで VT 遺伝子陽性を確認するまで②の操作を繰り返す。

上記操作の過程で、CT 添加による VT 遺伝子陽性菌の生育阻害がほとんどないと考えられた場合は、CT 添加の分離培地のみを使用してよい。

1) SMAC 寒天培地 (市販生培地、自家調整または基礎培地使用 : オキソイド製造 ; 関東化学販売、メルク、栄研化学、日水製薬、極東製薬工業、日本ベクトン・ディッキンソン等)

組成 :

ペプトン 20.0g
胆汁酸塩 1.5g
ソルビトール 10.0g
塩化ナトリウム 5.0g
ニュートラルレッド 0.03g
クリスタルバイオレット 0.001g
寒天 15.0g
蒸留水 1,000ml
pH 7.2±0.1

マッコンキー基礎培地にソルビトールを加えて使用することもできる。121°Cで15分間滅菌後 50°C以下に冷却し、分注し寒天平板として使用する。0104 は多くの大腸菌と同様にソルビトールを分解し、赤色集落を形成する。

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

1) に示す SMAC 寒天培地を 121°Cで 15 分間滅菌後、50°C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。
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、ベリタス等で購入することができる。

3) Vi RX 026 寒天培地 (栄研化学)

組成 :

ペプトン 13.5 g
胆汁酸塩 1.2 g
塩化ナトリウム 5.0 g
酵素基質混合物 6.1 g
選択剤 0.002 g
寒天 19.0 g
精製水 1,000 ml
pH 7.2±0.2

121°Cで 15 分間滅菌後 50~60°Cに冷却し、分注し寒天平板として使用する。Vi RX 026 寒天培地では、026 は濃緑~紺色集落、他の血清型の大腸菌は黄緑~緑色を形成するが、0104 は比較的濃い緑色集落を形成する。また、大腸菌以外の腸内細菌は黄色~赤

色集落を形成し、ブドウ球菌などの腸内細菌以外は発育しない。

4) CT-Vi RX 026 寒天培地

3) に示す Vi RX 026 寒天培地を 121°Cで 15 分間滅菌後、50°C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。

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、ベリタス等で購入することができる。

○ 血清型別試験

VT 遺伝子陽性分離菌株の血清型別試験では、0104 血清にて凝集を確認するか、0104 抗原遺伝子を対象にした遺伝子検出法を行う。

1) 血清凝集試験

0104 血清 (SSI (Statens Serum Institute) 製造；ベリタス販売 等) にて凝集を確認する。

2) 0104 抗原遺伝子検出

VT 遺伝子陽性分離菌株の集落や液体培養などから得られた菌体を滅菌蒸留水に浮遊させ 100°Cで 10 分加熱処理し、その遠心上清 (10,000Xg、10 分) を抽出 DNA とする。前に示した方法を使用する。

○ 生化学的性状試験

VT 遺伝子陽性分離菌株の生化学的性状は、TSI、LIM などによって性質を確認するが、一般的な大腸菌と異なる可能性があるため、今後の情報に注意する。

1) TSI 寒天培地 (日水製薬、栄研化学、メルク、オキソイド製造；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
ショ糖 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 3ml ずつ分注し 121°C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
ブル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5ml ずつ分注し 121°Cで 15 分間滅菌後急冷し高層培地とする。多くの大腸菌は、高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生を示すが、高層部黄色変、運動性陰性など、非定型の性質を持つ場合もある。

○ 判定

腸管出血性大腸菌 0104 が分離されたことをもって、陽性とする。
0104 抗原遺伝子陽性であったが、血清型 0104 の分離されなかった場合は、陰性とする。

食品からの腸管出血性大腸菌0104の検査法

