

事 務 連 絡
平成 27 年 3 月 24 日

各検疫所 御中

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課

食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法

標記については、平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 3 号別添にて示しているところですが、検査に使用するキット等の一部製品について、わかりにくい等の意見があったことから、別紙新旧表のとおり表現の変更等を行いましたのでお知らせします。

(別紙)

「食品からの腸管出血性大腸菌026、0103、0111、0121、0145及び0157の検査法」の
新旧表

項目	新	旧
脚注1	水を検体とする場合には、食品衛生検査指針微生物編2004の検体の採取、試料の調製、増菌培養（増菌培地は本検査法の培地を使用する。）を参考に実施する。 <u>ただし、食品衛生検査指針微生物編の改訂時には新版を参考にする。</u>	水を検体とする場合には、食品衛生検査指針微生物編2004の検体の採取、試料の調製、増菌培養（増菌培地は本検査法の培地を使用する。）を参考に実施する。
5. DNA抽出法	5) <u>NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル社製造;タカラバイオ販売)</u> 6) <u>その他、同等品も使用できる。</u>	5) その他、同等品も使用できる。
8. 分離培養法 1) 免疫磁気ビーズ法 (2) 免疫磁気ビーズ塗抹法	④ <u>CT-クロモアガーSTEC培地 (市販生培地：関東化学、基礎培地使用 (クロモアガーSTEC基礎培地：クロモアガー社製造；関東化学販売))</u> 添加剤： <u>培地1,000 mlに対し、セフィキシム0.05 mg及び亜テルル酸カリウム2.5 mg (オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。</u>	④ <u>CT-クロモアガーSTEC培地 (粉末培地使用：クロモアガー社製造；関東化学販売) 又はクロモアガーSTEC生培地 (市販生培地：関東化学)</u> 添加剤： <u>培地に添付されたCT添加試薬を添加して使用する。</u>

<p>10. 生化学的性状試験</p> <p>1) TSI寒天培地 (日水製薬、栄研化学、メルク、オキソイド製造；関東化学販売等)</p>	<p>備考：加温溶解後、小試験管に3ml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。市販品を使用してもよい。TSI寒天培地での<u>典型的な大腸菌</u>は、高層部黄変、斜面部黄変、硫化水素非産生、ガス産生を示す。</p>	<p>備考：加温溶解後、小試験管に3ml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。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、硫化水素非産生、ガス産生を示す。</p>
<p>10. 生化学的性状試験</p> <p>3) CLIG培地（極東製薬工業）</p>	<p>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。<u>典型的な血清群0157</u>は、高層部黄変、斜面部赤変を示し、紫外線照射下で蛍光を示さない。</p>	<p>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。<u>大腸菌は高層部黄変、斜面部赤変を示す。典型的な血清群0157は紫外線照射下で蛍光を示さないが、それ以外の血清群は蛍光を示す。</u></p>

(別添)

食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法

食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の試験は、原則として、ペロ毒素 (VT) 遺伝子及び 0 抗原遺伝子検出法によるスクリーニングを行い、陽性であった場合には分離培養法で菌の分離を行い、確認試験の結果、判定する。

1. 検体の採取

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、表面部を厚さ約 0.3 cm に削り、これを検体とする。¹

2. 試料の調製

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。

3. 増菌培養

以下の増菌培地を VT 遺伝子検出法、0 抗原遺伝子検出法及び分離培養法に供試する。ストマッカー袋中の試料に 225 ml の増菌培地 (室温) を加え 1 分間以内のストマッカー処理などを行った後、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。

増菌培養が終了した当日中に VT 遺伝子検出試験及び 0 抗原遺伝子検出試験を実施し、ともに陽性の検体は、原則として、当日中に陽性であった血清群の免疫磁気ビーズ法及び直接塗抹法による分離培養を行う。また、VT 遺伝子検出試験を実施し陽性であった検体の 0 抗原遺伝子検出試験を実施せずに分離培養を行う場合は、原則として、当日中に免疫磁気ビーズ法及び直接塗抹法による分離培養を行う。ただし、いずれの場合も当日中に分離培養を行えない場合は、増菌培養液 10 ml を冷蔵 (8°C 以下) し 1 日以内に分離培養法に使用する。また、追試などに備えて冷凍 (-75°C 以下) する場合には、凍結保護剤を培養液に添加する。凍結保護剤として滅菌ジメチルスルホキシド (DMSO、シグマ等) を使用する場合は、最終濃度 5 ~ 10% になるように添加する。ただし、冷蔵及び冷凍保存中に食品によっては培養液中の腸管出血性大腸菌が食品成分や食品由来菌の影響を受ける場合が考えられるため、可能な限り当日中に分離培養法を実施する。

4. 増菌用培地

1) mEC 培地 (日水製薬、メルク、オキソイド製造 ; 関東化学販売、極東製薬工業、栄研化学等)

組成 :	ペプトン	20.0 g
	胆汁酸塩	1.12 g
	ラクトース	5.0 g

¹ 水を検体とする場合には、食品衛生検査指針微生物編 2004 の検体の採取、試料の調製、増菌培養 (増菌培地は本検査法の培地を使用する。) を参考に実施する。ただし、食品衛生検査指針微生物編の改訂時には新版を参考にする。

K ₂ HPO ₄	4.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
NaCl	5.0 g
精製水	1,000 ml
pH	6.9±0.1

備考：121℃で15分間滅菌後冷却し、そのまま使用する。

2) mEC 培地 (USDA 法) (自家調製)

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
	K ₂ HPO ₄	4.0 g
	KH ₂ PO ₄	1.5 g
	NaCl	5.0 g
	精製水	1,000 ml
	pH	6.9±0.1

備考：121℃で15分間滅菌後冷却し、そのまま使用する。

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検査法に示す増菌培養法と同等であると判断した上で、mEC 培地において36±1℃培養など選択性を弱めた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。また、検体中の腸管出血性大腸菌以外の菌の増殖が腸管出血性大腸菌の増殖を妨げると考えられる場合は、ノボビオシン加 mEC 培地において42±1℃培養など選択性を高めた増菌培養法も考慮する。

5. DNA 抽出法

増菌培養液から DNA 抽出を行ない、それを試料として6.VT 遺伝子検出法を行う。

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。抽出 DNA は氷上で取り扱い、保存は冷凍が望ましい。なお、増菌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。可能であれば1検体につき2本のマイクロチューブを用いて DNA を抽出する。なお、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、各血清群について8.分離培養法を実施する。

1) アルカリ熱抽出法

培養液 0.1 ml をマイクロチューブにとり、10,000Xg、10分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85μl を添加して100℃で10分間加熱処理する。その処理液に滅菌した 1M Tris-HCl (pH 7.0) 15 μl を加えて中和し、遠心上清 (2,000~10,000Xg、10分間) を検体とする。また、VT 遺伝子検出キットに含まれる DNA アルカリ抽出試薬を使用できる (ただし、上記と同等のアルカリ液及び中和液の組成及び容量に限る)。抽出後は

0～4℃静置し検出試験に使用する。当日使用しない場合には冷凍保存する。

- 2) PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (ライフテクノロジーズジャパン)
- 3) DNeasy Blood & 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)
- 5) NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル社製造;タカラバイオ販売)
- 6) その他、同等品も使用できる。

6. VT 遺伝子検出法

抽出した DNA を用いて、VT 遺伝子の検出試験を実施する。VT 遺伝子検出法（内因性又は外因性コントロールを設定）としては以下のものが利用できる。試験には陽性及び陰性コントロールを設定する。

VT 遺伝子検出試験の結果、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、原則として、当日中に後述する 0 抗原遺伝子検出法及び分離培養法を実施する。0 抗原遺伝子検出法を行わずに分離培養法を実施する場合も、原則として、当日中に実施する。

1) Real-time PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キット又は公表されている方法を参照した試薬にて反応を行う。これについて下記のものを利用できる。

(1) 市販キットを使用する場合

- ① CycleleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (CY217A・CY217B、タカラバイオ) (サイクリング・プローブ法)

対応機種： Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ)、Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7 (ライフテクノロジーズジャパン)、LightCycler 480 II (ロシュ・ダイアグノスティックス)

ただし、Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7 では、manual 解析で baseline を安定した部分に修正し、threshold を適切な値に修正する。また、LightCycler 480 II において、Abs Quant/2nd Derivative Max (auto 解析) で適切な判定が行えない場合は、Abs Quant/Fit Points 解析で Background を安定した部分 (目安として 4-10 cycle) に手動設定し解析を行う。

- ② foodproof STEC スクリーニングキット (3216D60211、バイオテコン・ダイアグノスティックス製造; プラクティカル販売) (5'-ヌクレアーゼ活性を利用した加水分解プローブ法)

対応機種： Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems ViiA7、LightCycler 480 II

本試験では、キットに含まれる ROX 検出によるインチミン遺伝子 (*eae*) を測定しないため、測定時に、ROX 検出フィルターは使用しない。Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast 及び Applied Biosystems ViiA7 において、auto 解析で適切な判定が行えない場合は、陽性コントロールと陰性コントロールを参照し、

threshold を適切な値に修正して解析する。また、LightCycler 480 IIにおいて、Abs Quant/2nd Derivative Max (auto 解析) で適切な判定が行えない場合は、Abs Quant/Fit Points 解析で background を安定した部分 (目安として 3-15 cycle) に手動設定し解析を行う。

③ その他、同等の機能を有する試薬・機器が使用できる。

(2) 公表されている方法を参照した試薬を使用する場合

① VT1 及び VT2 遺伝子については Nielsen らの方法 (参照元: Clin. Microbiol. 41:2884-2893, 2003)、内因性コントロールとしての 16SrRNA 遺伝子については米国農務省 (United States Department of Agriculture, USDA, 参照元: MLG 5B Appendix 1. 01) のリアルタイム PCR 法を参照した方法 (5'-ヌクレアーゼ活性を利用した加水分解プローブ法)

(使用方法例 1)

ア. 機器

Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7、LightCycler 480 II、Thermal Cycler Dice Real Time System II が使用できる。ただし、ABI PRISM 7500Fast では、standard chemistry にて使用する。

イ. 試薬

TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (ライフテクノロジーズジャパン、Product No. 4396838)、加水分解プローブ、プライマー、滅菌精製水

ウ. 反応液の準備

表 2-1 に示した反応液を調製する。

エ. 反応プレートのウェル又は反応チューブに 25.0 μ l ずつ反応液を入れる。

オ. 検体 DNA 5 μ l を加えて、試験を行う。総反応容量は 30.0 μ l となる。

カ. 増幅反応は、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 サイクルに設定し、ランを開始する。

キ. ランが終了したら、データ解析をする。

ク. Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7 では、auto 解析又は threshold を 0.05 に設定して解析する。必要のある場合は、baseline を安定した部分 (目安として 3-10 cycle) に手動設定し解析を行う。各検体につき、Ct 値が得られている場合を陽性とする。また、LightCycler 480 II において、Abs Quant/2nd Derivative Max (auto 解析) で適切な判定が行えない場合は、Abs Quant/Fit Points 解析で background を安定した部分 (目安として 4-10 cycle) に手動設定し解析を行う。Thermal Cycler Dice Real Time System II では、CP 法 (auto 解析) にて解析する。

表 2-1 反応液の調製

試薬	容量
滅菌精製水	6.28 μ l

TaqMan Environmental Master Mix 2.0		15.0 μ l
プライマー	VT1-F (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l
	VT1-R (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l
	VT2-F (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l
	VT2-R (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l
	16SrRNA-F (20 pmol/ μ l)	0.24 μ l
	16SrRNA-R (20 pmol/ μ l)	0.24 μ l
プローブ (5 pmol/ μ l)	VT1-P	0.6 μ l
	VT2-P	0.6 μ l
	16SrRNA-P	0.6 μ l
計		25.0 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-BHQ1-3'

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-BHQ1-3'

16SrRNA-F: 5'-CCT CTT GCC ATC GGA TGT G-3'

16SrRNA-R: 5'-GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC-3'

16SrRNA-P: 5'-HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ1-3'

使用機器ごとに適切な蛍光色素を選択して反応を行う。

Applied Biosystems 7500・7500Fast・7900HT・ViiA7: FAM-BHQ1 を FAM-None、
HEX-BHQ1 を VIC-None。

LC480: FAM-BHQ1 を Excitation 465 nm・Emission 510 nm、HEX-BHQ1 を Excitation
533 nm・Emission 580 nm。

Dice II: FAM-BHQ1 を FAM、HEX-BHQ1 を HEX。

(使用方法例 2)

使用方法例 1 の試薬を使用し、使用方法例 1 に示した機種、LightCycler Nano 及び Applied Biosystems 7000、7300 及び 7700 において、VT1・VT2 遺伝子及び 16SrRNA 遺伝子を各 simplex の系（両遺伝子ともにプローブの蛍光標識に FAM を使用）として反応する。

表 2-2 及び 2-3 に示した反応液を調製する。

表 2-2 反応液の調製

試薬		容量
滅菌精製水		7.36 μ l
TaqMan Environmental Master Mix 2.0		15.0 μ l
プライマー	VT1-F (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l
	VT1-R (50 pmol/ μ l)	0.36 μ l

	VT2-F (50 pmol/μl)	0.36 μl
	VT2-R (50 pmol/μl)	0.36 μl
プローブ (5 pmol/μl)	VT1-P	0.6 μl
	VT2-P	0.6 μl
計		25.0 μl

表 2-3 反応液の調製

試薬		容量
滅菌精製水		8.92 μl
TaqMan Environmental Master Mix 2.0		15.0 μl
プライマー	16SrRNA-F (20 pmol/μl)	0.24 μl
	16SrRNA-R (20 pmol/μl)	0.24 μl
プローブ (5 pmol/μl)	16SrRNA-P	0.6 μl
計		25.0 μl

② その他、同等の機能を有する試薬・機器が使用できる。

2) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法

以下のものが利用できる。

(1) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (外因性コントロール入り) (LMP681、栄研化学)

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

(2) その他、同等の機能を有する機器が使用できる。

3) PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キットにて反応を行う。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) EHEC (VT gene) PCR Screening Set (RR120A、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分を1サイクル行う。増幅 DNA の大きさは VT 遺伝子が 171 bp、内部標準遺伝子が 685 bp である。

(2) その他、同等の機能を有する試薬が使用できる。

4) その他、同等の手法も使用できるが、感度が 1×10^4 cfu/ml (増菌培養液) より優れるものを使用することとし、感度の確認が必要な場合には各試験検査機関にて次の方法を参照して行う。

血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 (VT 陽性株) の菌濃度が約 1×10^4 cfu/ml (検体の増菌培養液) を作製し試験する。血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 (VT 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 ± 1 時間培養する (約 5×10^8 cfu/ml)。この培養液を対象検体の mEC 培養液 9ml 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 mEC 培養液で希釈した菌液を試料とする。この希釈菌液は約 1 X10⁴ 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. 0 抗原遺伝子検出法

6. VT 遺伝子検出法にて陽性であった場合には、その DNA 抽出液を用いて 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の 0 抗原遺伝子の検出試験を実施する。また、VT 遺伝子検出法と異なる遺伝子検出法にて 0 抗原遺伝子を検出する場合には、培養液中の成分によって遺伝子検出の反応阻害がないことを確認する。すなわち、0 抗原遺伝子検出に使用する遺伝子検出法の原理と同じ VT 遺伝子検出法にて、検出系に含まれる内因性・外因性コントロールが陽性であることを確認する必要がある。

0 抗原遺伝子検出法としては以下のものが利用できる。試験には陽性及び陰性コントロールを設定する。0 抗原遺伝子が陽性の場合、原則として、当日中に 8. 以降の分離培養法を行う。

1) Real-time PCR 法

市販の 0 抗原遺伝子検出キット又は公表されている方法を参照した試薬にて反応を行う。これについて下記のものを利用できる。

(1) 市販キットを使用する場合

- ① Cycleave PCR EHEC (0157/026) Typing Kit (CY237、タカラバイオ)、Cycleave PCR EHEC (0111/0121) Typing Kit (CY238、タカラバイオ)、Cycleave PCR EHEC (0103/0145) Typing Kit (CY239、タカラバイオ) (サイクリング・プローブ法)

対応機種： Thermal Cycler Dice Real Time System II、Applied Biosystems 7500 及び Applied Biosystems 7500Fast

ただし、使用する DNA 抽出液は 5. DNA 抽出法で示した 3) DNeasy Blood & Tissue kit にて得たものとする。また、解析については Applied Biosystems 7500 及び Applied Biosystems 7500Fast では、manual 解析で baseline を安定した部分に修正し、threshold を適切な値に修正する。

- ②その他、同等の機能を有する試薬・機器が利用できる。

(2) 公表されている方法を参照した試薬を使用する場合

- ① 026、0103、0121 及び 0145 抗原遺伝子については米国農務省 (United States Department of Agriculture、USDA、参照元：MLG 5B Appendix 1.01)、0111 及び 0157 抗原遺伝子については欧州食品安全機構 (European Food Safety Authority、参照元：EFSA Journal. 11:3138、2013) のリアルタイム PCR 法を参照し、組み合わせた方法 (5'-ヌクレアーゼ活性を利用した加水分解プローブ法)

(使用方法例)

ア. 機器

Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7、LightCycler 480 II、Thermal Cycler Dice

Real Time System IIが使用できる。ただし、ABI PRISM 7500Fast では、standard chemistry にて使用する。

イ. 試薬

TaqMan Environmental Master Mix 2.0、加水分解プローブ、プライマー、滅菌精製水

ウ. 反応液の準備

表 3 に示した反応液を調製する。

エ. 反応プレートのウェル又は反応チューブに 25.0 μ l ずつ反応液を入れる。

オ. 検体 DNA 5 μ l を加えて、試験を行う。総反応容量は 30.0 μ l とする。

カ. 増幅反応は、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サイクルに設定し、ランを開始する。

キ. ランが終了したら、データ解析をする。

ク. Applied Biosystems 7500、Applied Biosystems 7500Fast、Applied Biosystems 7900HT 及び Applied Biosystems ViiA7 では、auto 解析又は threshold を 0.05 に設定して解析する。必要のある場合は、baseline を安定した部分（目安として 3-15 cycle）に手動設定し解析を行う。各検体につき、Ct 値が得られている場合を陽性とする。また、LightCycler 480 II において、Abs Quant/2nd Derivative Max（auto 解析）で適切な判定が行えない場合は、Abs Quant/Fit Points 解析で background を安定した部分（目安として 4-10 cycle）に手動設定し解析を行う。LightCycler Nano では、auto 解析を行う。Thermal Cycler Dice Real Time System IIでは、CP 法（auto 解析）にて解析する。

表 3 0 抗原遺伝子検出反応液の調製

試薬			容量
滅菌精製水			7.9 μ l
TaqMan Environmental Master Mix 2.0			15.0 μ l
026/ 0157 検出	プライマー (20 pmol/ μ l)	Wzx-026-F	0.3 μ l
		Wzx-026-R	0.3 μ l
		RfbE-0157-F	0.3 μ l
		RfbE-0157-R	0.3 μ l
	プローブ (5 pmol/ μ l)	Wzx-026-P	0.6 μ l
		RfbE-0157-P	0.3 μ l
0103/ 0111 検出	プライマー (20 pmol/ μ l)	Wzx-0103-F	0.3 μ l
		Wzx-0103-R	0.3 μ l
		WbdI-0111-F	0.3 μ l
		WbdI-0111-R	0.3 μ l
	プローブ (5 pmol/ μ l)	Wzx-0103-P	0.3 μ l
		WbdI-0111-P	0.6 μ l
0121/ 0145	プライマー (20 pmol/ μ l)	Wzx-0121-F	0.3 μ l
		Wzx-0121-R	0.3 μ l

検出		Wzx-0145-F	0.3 μ l
		Wzx-0145-R	0.3 μ l
	プローブ (5 pmol/ μ l)	Wzx-0121-P	0.3 μ l
		Wzx-0145-P	0.6 μ l
計 (各反応液)			25.0 μ l

Wzx-026-F: 5'-GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C-3'

Wzx-026-R: 5'-AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC-3'

Wzx-026-P: 5'-HEX-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G-BHQ1-3'

Wzx-0103-F: 5'-TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT-3'

Wzx-0103-R: 5'-ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC-3'

Wzx-0103-P: 5'-FAM-AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ1-3'

WbdI-0111-F: 5'-CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT -3'

WbdI-0111-R: 5'-TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C -3'

WbdI-0111-P: 5'-HEX- TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA -BHQ1-3'

Wzx-0121-F: 5'-AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A-3'

Wzx-0121-R: 5'-GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT-3'

Wzx-0121-P: 5'-FAM-CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C-BHQ1-3'

Wzx-0145-F: 5'-AAA CTG GGA TTG GAC GTG G-3'

Wzx-0145-R: 5'-CCC AAA ACT TCT AGG CCC G-3'

Wzx-0145-P: 5'-HEX-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ1-3'

RfbE-0157-F: 5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'

RfbE-0157-R: 5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'

RfbE-0157-P: 5'-FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ1-3'

使用機器ごとに適切な蛍光色素を選択して反応する。

Applied Biosystems 7500・7500Fast・7900HT・ViiA7 : FAM-BHQ1 を FAM-None、
HEX-BHQ1 を VIC-None。

LC480 : FAM-BHQ1 を Excitation 465 nm・Emission 510 nm、HEX-BHQ1 を Excitation
533 nm・Emission 580 nm。

Dice II : FAM-BHQ1 を FAM、HEX-BHQ1 を HEX。

その他の機器において各0抗原遺伝子の simplex の系(プローブの蛍光標識に FAM
を使用) 又は duplex 等の multiplex の系として使用できるが、感度が 1×10^4 cfu
/ml (増菌培養液) より優れるものを使用することとし、感度の確認が必要な場
合には各試験検査機関にて 6. VT 遺伝子検出法の 4) を参照して行う。

②その他、同等の機能を有する試薬・機器が使用できる。

2) LAMP 法

公表されている方法を参照した試薬を用いる。又は、市販の 0157 抗原遺伝子キットにて

反応を行う。これについては下記のものを利用できる。

(1) 公表されている方法を参照した試薬を使用する場合

① Wang らの方法 (参照元: Appl. Environ. Microbiol., 78: 2727-2736, 2012) のプライマー及び反応条件を参照して反応を行う。

(使用方法例)

ア. 機器

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C、RT-160C、LoopampEXIA: 栄研化学)

イ. 試薬

Loopamp DNA 増幅試薬キット (LMP204/LMP205/LMP206、栄研化学)、プライマー、滅菌精製水

ウ. 反応液の準備

表 4 に示した反応液を調製する。

エ. 反応チューブに 20.0 μ l ずつ反応液を入れる。

オ. 検体 DNA 5 μ l を加えて、試験を行う。総反応容量は 25.0 μ l となる。

カ. 増幅反応は、0157 では 63°C60 分、80°C 2 分。0157 以外の血清群では 65°C60 分、80°C 2 分とし、反応を開始する。

キ. 反応が終了したら、増幅曲線、判定等を確認する。

表 4 0 抗原遺伝子検出反応液の調製

試薬		容量
2 × Reaction Mix. (RM)		12.5 μ l
<i>Bst</i> DNA Polymerase		1.0 μ l
026 検出	026-wzy-F3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	026-wzy-B3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	026-wzy-FIP (45 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	026-wzy-BIP (45 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	026-wzy-LF (25 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	026-wzy-LB (25 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	滅菌精製水	0.5 μ l
0103 検出	0103-wzx-F3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0103-wzx-B3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0103-wzx-FIP (45 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0103-wzx-BIP (45 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0103-wzx-LF (25 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0103-wzx-LB (25 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	滅菌精製水	0.5 μ l
0111 検出	0111-wzy-F3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0111-wzy-B3 (2.5 pmol/ μ l)	1.0 μ l
	0111-wzy-FIP (45 pmol/ μ l)	1.0 μ l

	0111-wzy-BIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0111-wzy-LB (25 pmol/μl)	1.0 μl
	滅菌精製水	1.5 μl
0121 検出	0121-wzy-F3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0121-wzy-B3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0121-wzy-FIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0121-wzy-BIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0121-wzy-LF (25 pmol/μl)	1.0 μl
	滅菌精製水	1.5 μl
0145 検出	0145-wzx-F3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0145-wzx-B3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0145-wzx-FIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0145-wzx-BIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0145-wzx-LF (25 pmol/μl)	1.0 μl
	滅菌精製水	1.5 μl
0157 検出	0157-wzy-F3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0157-wzy-B3 (2.5 pmol/μl)	1.0 μl
	0157-wzy-FIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0157-wzy-BIP (45 pmol/μl)	1.0 μl
	0157-wzy-LF (25 pmol/μl)	1.0 μl
	0157-wzy-LB (25 pmol/μl)	1.0 μl
	滅菌精製水	0.5 μl
計		20 μl

026-wzy-F3: 5'-GACTATGAAGCGTATGTTGAT-3'

026-wzy-B3: 5'-TCCTGATTTGAACAATGTCAAT-3'

026-wzy-FIP: 5'-ACCGCCTAAATACTTAACACCATAATTAATGTCAATGAACTTTATGCC-3'

026-wzy-BIP: 5'-TTCCTTGGGACCACATTCCTACATGTAAAGCAGCAAACC-3'

026-wzy-LF: 5'-ACCAGCGATAACCAATCTC-3'

026-wzy-LB: 5'-TACAATACAGTAAGTATACAGCATT-3'

0103-wzx-F3: 5'-ACTCAGTGGTGTAGTAACATG-3'

0103-wzx-B3: 5'-TCACCTTGATTTTCTGCTGA-3'

0103-wzx-FIP: 5'-ATTTGCTATTCCAATTGGACCAGTACTTTAGACTAATTTGTGGCCTTC-3'

0103-wzx-BIP: 5'-TTGGACAATTGCAAAATTTGTGGATCTATTAACCTTGTGAACTTG-3'

0103-wzx-LF: 5'-AATTGCAACAACCTTTGAAATAA-3'

0103-wzx-LB: 5'-CCTTTATAAATGGATTCATTTTCATC-3'

0111-wzy-F3: 5'-AAGGCGTAACTTTTTTTGAAC-3'

0111-wzy-B3: 5'-TCATGAGGGTCATTAGGAATT-3'

0111-wzy-FIP: 5'-TCACCAAGCTGTGAAACCAAACCTACAGCAAGTAATATTGAACGT-3'

0111-wzy-BIP: 5'-TCCATGGTATGGGGACATTAATTTTGGATGGAAGTCCATATAACGT-3'
 0111-wzy-LB: 5'-CTTAAATAACGGCGGACAAT-3'
 0121-wzy-F3: 5'-GCTCAGCTTTTATCTTGTTCAA-3'
 0121-wzy-B3: 5'-ATAGGCTCCCAACCATCC-3'
 0121-wzy-FIP: 5'-ACGCAAAAAGTATGGATTACATACCTGATATAACAGAACCGACTTGG-3'
 0121-wzy-BIP: 5'-TGTTGCTGGTTCCTTATTATGTAGTAAAAGCAAGCCAAAACACTC-3'
 0121-wzy-LF: 5'-TAAAGCCATCCAACCCACGC-3'
 0145-wzx-F3: 5'-TTTGTAAGACAAGGTGTATGG-3'
 0145-wzx-B3: 5'-GCATTGGTACAGACAGCTTTA-3'
 0145-wzx-FIP: 5'-CACAGTACCACCAAAACCAAAAAATATTGGTTAGCTATAGCTGTGA-3'
 0145-wzx-BIP: 5'-AGTGTGCTTGGAGTGGCTTACAATCCCAGTTTGTAAATATCGC-3'
 0145-wzx-LF: 5'-TTCTTAAGTTCGGATACACTAGCA-3'
 0157-wzy-F3: 5'-TCCCTTTAGGGATATATATACCTT-3'
 0157-wzy-B3: 5'-ATAACTGATATTTTCATTTTCGTGAT-3'
 0157-wzy-FIP: 5'-TTCCAGCCACTAAGTATTGCAATATGAAAAAACCCATAGCTCGA-3'
 0157-wzy-BIP: 5'-TGCATCGGCCTTCTTTTTTGGAACGTATCATGCAATAAGATCA-3'
 0157-wzy-LF: 5'-ATAATGATATATGAATAGAATGCGC-3'
 0157-wzy-LB: 5'-TCCTTTTCTCTCCGTATTGAT-3'

(2) 0157 抗原遺伝子対象の市販キットを使用する場合

① Loopamp 大腸菌 0157 検出試薬キット (LMP631、栄研化学)

3) その他、同等の手法も使用できるが、感度が 1×10^4 cfu/ml (増菌培養液) より優れるものを使用することとし、感度の確認が必要な場合には各試験検査機関にて 6. VT 遺伝子検出法の 4) を参照して行う。

8. 分離培養法

分離培養は増菌培養液の免疫磁気ビーズ濃縮液の塗抹及び増菌培養液の直接塗抹によって行う。VT 遺伝子検出試験及び 0 抗原遺伝子検出試験の両方が陽性であった場合は陽性であった血清群について、また、VT 遺伝子検出試験が陽性で 0 抗原遺伝子検出法を行わずに分離培養法を実施する場合は 6 血清群について、原則として当日中に行う。当日中に分離培養をしない場合は、保存培養液を使用して実施する。

なお、磁石スタンド接触面へのビーズの吸着が芳しくない場合は、免疫磁気ビーズ塗抹法と同様に分離平板培地各 2 枚を使用して直接塗抹法を実施する。その他、必要があると思われる場合は目的に合わせた分離培養法を実施する。

1) 免疫磁気ビーズ法

(1) 免疫磁気ビーズ濃縮法

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ビーズ液量を 1.5 ml チューブに入れ、培養液 1 ml を加えて濃縮する。この際、複数の 0 抗原遺伝子が陽性であった場合に、異なる血清群のビーズを混合して用いない。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 又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。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血清群 026

- ア. 免疫磁気ビーズ 026「生研」(デンカ生研)
- イ. Dynabeads EPEC/VTEC 026 (ベリタス販売)

②血清群 0103

- ア. 免疫磁気ビーズ 0103「生研」(デンカ生研)
- イ. Dynabeads EPEC/VTEC 0103 (ベリタス販売)

③血清群 0111

- ア. 免疫磁気ビーズ 0111「生研」(デンカ生研)
- イ. Dynabeads EPEC/VTEC 0111 (ベリタス販売)

④血清群 0121

- ア. 免疫磁気ビーズ 0121「生研」(デンカ生研)

⑤血清群 0145

- ア. 免疫磁気ビーズ 0145「生研」(デンカ生研)
- イ. Dynabeads EPEC/VTEC 0145 (ベリタス販売)

⑥血清群 0157

- ア. 免疫磁気ビーズ 0157「生研」(デンカ生研)
- イ. Dynabeads anti-E.coli 0157 (ベリタス販売)

⑦各血清群につき、その他、同等品も使用できる。

(2) 免疫磁気ビーズ塗抹法

分離平板培地にはセフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT) 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する。ただし、026 免疫磁気ビーズ濃縮液を塗抹する場合には CT 添加ラムノースマッコンキー (CT-RMAC) 寒天培地、0111 免疫磁気ビーズ濃縮液を塗抹する場合には CT 添加ソルボースマッコンキー (CT-SBMAC) 寒天培地を CT-SMAC 寒天培地に替えて使用しても良い。

また、腸管出血性大腸菌の分離に適した以下の④から⑬の酵素基質培地を 1 種類以上併用する。なお、凍結等によって菌の損傷が考えられるなど、汚染菌の CT 感受性が高いことが考えられる場合などは、CT 非添加の分離平板培地も使用する。

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る。二分画培地の場合は相当の面積に塗抹する。菌が密集して発育した場合には、コロニー形態の鑑別ができないため、単離コロニーが 30 個程度以上出現するよう工夫して塗抹する。1 検体につき各種培地の典型的コロニーをできる限り 5 個以上釣菌し、9. 血清型別試験以降の試験を行う。

- ① CT-SMAC 寒天培地 (市販生培地、自家調製又は基礎培地使用: オキシド製造; 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、極東製薬)

工業等)

基礎培地組成	ペプトン	20.0 g
	胆汁酸塩	1.5 g
	ソルビトール	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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 0157 はソルビトール非分解又は遅分解の無色透明コロニー、血清群 026、0103、0111、0121 及び 0145 は一般的な大腸菌と同様にソルビトール分解の赤色コロニーを形成する。

- ② CT-RMAC 寒天培地 (市販生培地：デンカ生研、日水製薬、極東製薬工業等；自家調製又は基礎培地使用 (マッコンキー基礎培地を用いる場合：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 (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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026 はラムノース非分解又は遅分解コロニーであり無色透明コロニー、血清群 0103、0111、0121、0145 及び 0157 は一般的な大腸菌と同様に赤色コロニーを形成する。

- ③ CT-SBMAC 寒天培地 (市販生培地：日水製薬、極東製薬工業等；自家調製又は基礎培地使用 (マッコンキー基礎培地を用いる場合：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
ソルボース	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

又は

マッコンキー基礎培地	40.0 g
ソルボース	10.0 g
精製水	1,000 ml
pH	7.1±0.2

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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 0111 はソルボース非分解又は遅分解コロニーであり無色透明コロニー、血清群 026、0103、0121、0145 及び 0157 は一般的な大腸菌と同様に赤色コロニーを形成する。

④ CT-クロモアガー-STEPC 培地 (市販生培地：関東化学、基礎培地使用 (クロモアガー-STEPC 基礎培地：クロモアガー社製造；関東化学販売))

粉末培地調製は以下の通りである。

基礎培地組成：ペプトン及び酵母エキス	8.0 g
NaCl	5.2 g
特殊酵素基質混合物	2.6 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml
pH	7.0±0.2

備考：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、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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 は藤色コロニーを形成する。

⑤ CIX 寒天培地 (市販生培地：極東製薬工業)

組成：	カゼインペプトン	9.7 g
	胆汁酸塩	1.5 g
	糖類	10.0 g
	NaCl	5.0 g
	寒天	15.0 g
	酵素基質 2 種	0.2 g
	選択剤混合物	2.55 mg
	pH 指示薬	0.03 g
	精製水	1,000 ml
	pH	7.5±0.1

備考：保存期間は 2～10℃で 3 ヶ月以内とする。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026 及び 0111 は群青色～濃紫色コロニー、血清群 0157 は青～青緑色のコロニーを形成する。血清群 0103、0121 及び 0145 は多様な色調のコロニーを形成する。

⑥ XM-EHEC 寒天培地（市販生培地：日水製薬）

組成：	ペプトン	15.0 g
	NaCl	3.0 g
	胆汁酸塩	1.8 g
	ソルビトール	15.0 g
	発色酵素基質混合物	0.24 g
	選択剤	5.05 mg
	寒天	13.0 g
	精製水	1,000 ml
	pH	7.2±0.2

備考：保存期間は 4～10℃で 2.5 ヶ月以内とする。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026 は青紫色コロニー、血清群 0111 は白濁した赤紫～紫色コロニー、血清群 0157 は赤紫～紫色コロニーを形成する。血清群 0103、0121 及び 0145 は多様な色調のコロニーを形成する。

⑦ Vi EHEC 寒天培地（市販生培地：栄研化学）

組成：	ペプトン	13.5 g
	胆汁酸塩	1.2 g
	NaCl	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

備考：保存期間は 2～10℃で 2 ヶ月以内とする。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026 は緑色コロニー、血清群 0111

はえんじ色コロニー、0157 は無色透明で中心部褐色のコロニーを形成する。血清群 0103、0121 及び 0145 は多様な色調のコロニーを形成する。

⑧ CT-クロモアガー-026/0157 培地 (クロモアガー製造 ; 関東化学販売)

基礎培地組成 :	ペプトン及び酵母エキス	8.0 g
	NaCl	5.0 g
	選択剤・発色基質混合物	23.0 g
	寒天	15.0 g
	精製水	1,000 ml
	pH	7.0±0.2

備考 : 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、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。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。

添加剤 : 培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造 ; 関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調 : 典型的な血清群 026 は緑色コロニー、血清群 0157 は赤色コロニーを形成する。血清群 0103、0111、0121 及び 0145 は多様な色調のコロニーを形成する。

⑨ CT-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
	NaCl	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 : 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、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。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。

添加剤 : 培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg (オキシイド製造 ; 関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

各血清群コロニーの典型的色調 : 典型的な血清群 0157 は藤色コロニー、血清群 026、0103、0111、0121 及び 0145 は一般的な大腸菌と同様に青色コロニーを形成する。

⑩ CT-BCM0157 寒天培地 (栄研化学)

基礎培地組成 :	ペプトン	18.0 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
NaCl	5.0 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml
pH	6.8±0.1

備考：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、1規定の塩酸又は水酸化ナトリウムで pH6.8±0.1 に調製して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。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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg（オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等）を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 0157 は黒～濃青色コロニー、血清群 026、0103、0111、0121 及び 0145 は一般的な大腸菌と同様に緑色コロニーを形成する。

⑪ CT-Vi RX026 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。

添加剤：培地 1,000 ml に対し、セフィキシム 0.05 mg 及び亜テルル酸カリウム 2.5 mg（オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等）を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群 026 は青紫～黒色コロニー、血清群 0103、0111、0121、0145 及び 0157 は一般的な大腸菌と同様に黄緑～青緑色のコロニーを形成する。

⑫ CT-レインボーアガー0157 培地（バイオログ製造；セントラル科学貿易販売）

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±0.1

備考：加熱溶解又は121℃で5分間滅菌した後、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。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14日以内とする。

添加剤：培地1,000 mlに対し、セフィキシム0.05 mg及び亜テルル酸カリウム2.5 mg（オキシイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等）を加える。

各血清群コロニーの典型的色調：典型的な血清群0157は黒～灰色コロニーを形成する。血清群026、0103、0111、0121及び0145は多様な色調のコロニーを形成する。

⑬ その他、同等に腸管出血性大腸菌を検出できる培地も使用できる。

2) 直接塗抹法

直接塗抹法については増菌培養液10 µlを1) 免疫磁気ビーズ法で示した分離平板培地の①から③の1種類及び④から⑬の1種類について各1枚ずつ計2枚に画線塗抹し36±1℃で18～24時間培養後、疑われるコロニーを分離する。なお、詳細は1) 免疫磁気ビーズ塗抹法に準拠して実施する。また、単一コロニーの出現には、増菌培養液を希釈したものを塗抹するなどの操作を必要に応じて行う。

9. 血清型別試験

分離平板培地から血清群026、0103、0111、0121、0145又は0157と疑われるコロニーを釣菌し、普通寒天培地等にて純培養する（培養条件：36±1℃で18～24時間）。市販の免疫血清又は抗体を感作したラテックスを使用した凝集試薬を用いて、仕様書の試験方法を参照し血清型別試験を行う。

なお、免疫血清を使用する場合には、生菌を用いた場合に誤判定となることがあるため、最終判定には加熱死菌を用いる。

1) 血清群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）

2) 血清群0103

- (1) 病原大腸菌免疫血清 0103（デンカ生研）

3) 血清群0111

- (1) 病原大腸菌免疫血清 0111（デンカ生研）
- (2) E. coli 0111-F「生研」（デンカ生研）

4) 血清群0121

- (1) 病原大腸菌免疫血清 0121（デンカ生研）

5) 血清群0145

- (1) 病原大腸菌免疫血清 0145（デンカ生研）

6) 血清群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）

7) その他、各血清群につき、同等品も使用できる。

10. 生化学的性状試験

血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 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、各種キット等から選択して使用できる（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；関東化学販売等）

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	0.024 g
	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℃で 15 分間滅菌後、斜面寒天（半高層）として使用する。市販品を使用してもよい。TSI 寒天培地での典型的な大腸菌は、高層部黄変、斜面部黄変、硫化水素非産生、ガス産生を示す。

2) LIM 培地（日水製薬、極東製薬工業、栄研化学等）

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±0.2

備考：加温溶解後、小試験管に約 5ml ずつ分注し 121℃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（血清群 0111 の多くの株）、運動性陰性など、非定型の性質を持つ場合もあることから、これらについても大腸菌の性状として検査する。

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±0.2

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。典型的な血清群 0157 は、高層部黄変、斜面部赤変を示し、紫外線照射下で蛍光を示さない。

11. VT 確認試験

血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 と疑われるコロニーについては、VT 遺伝子又は VT 産生性を以下の方法で確認する。

1) 遺伝子検出法

- (1) 6. VT 遺伝子検出法で示した各種検出法
- (2) 0-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set (RR105A、タカラバイオ)
- (3) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (LMP621、栄研化学)
- (4) その他、同等品も使用できる。

2) 逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) 法

- (1) VTEC-RPLA 「生研」 (デンカ生研)
- (2) その他、同等品も使用できる。なお、増菌培養液での VT 遺伝子検出試験の代替には使用できない。

3) イムノクロマトグラフィー法等

- (1) デュオパス・ベロトキシン (メルク製造：極東製薬工業販売)
- (2) キャピリア VT (タウンズ)
- (3) NH イムノクロマト VT1/2 (日本ハム製造：日水製薬、和光純薬工業、極東製薬工業、コスモ・バイオ販売)
- (4) RIDA スクリーン ベロトキシン (アズマックス)
- (5) その他、同等品も使用できる。なお、増菌培養液での VT 遺伝子検出試験の代替には使用できない。

12. 判定

腸管出血性大腸菌血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 が分離されたことをもって、陽性とする。VT 遺伝子検出法及び O 抗原遺伝子検出法によって陽性であったが、血清群 026、0103、0111、0121、0145 又は 0157 の分離ができなかった場合は、陰性とする。