

食安輸発0715第1号
平成21年7月15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)

食品衛生法第26条第3項に基づく検査命令の実施について
(フランス産ソフト及びセミソフトタイプのナチュラルチーズ
の腸管出血性大腸菌 O103)

標記については、平成21年6月18日付け食安輸発第0618002号にて、腸管出血性大腸菌 O103 (以下、O103という。)に係る検査命令の実施及び試験法について通知したところです。

今般、当該試験法では競合菌の発育により検査が困難との指摘があり、国立医薬品食品衛生研究所において O103の試験法を検討した結果、平成18年11月2日付け食安監発第1102006号「腸管出血性大腸菌 O157及び O26の検査法について」別添に示す方法のうち、VT 遺伝子検出法をスクリーニング法として用いる方法を応用することにより、O103を高率に検出できるとの報告がありました。

つきましては、上記通知の別紙を別添に改正することとしますので、今後は本試験法により検査を実施するようお願いいたします。

チーズからの腸管出血性大腸菌0103の検査法について（平成21年7月15日改正）

平成18年11月2日付け食安監発第1102006号「腸管出血性大腸菌0157及び026の検査法について」別添に準じ、下記の変更を加えた方法にて実施すること。

（注）上記通知では、チーズについて培養法のみで行うとしているが、本法ではVT遺伝子検出法を利用する。

記

1 同通知別添3. 及び4. 増菌培養においては、mEC培地を使用し、培養条件を 36 ± 1 °C、 20 ± 2 時間とする。培地の組成等は次のとおりである。

○ mEC培地（栄研化学，日水製薬，極東製薬工業，Oxoid）

組成：

ペプトン 20.0g
胆汁酸塩 (Bile salts No.3) 1.12g
ラクトース 5.0g
 K_2HPO_4 4.0g
 KH_2PO_4 1.5g
NaCl 5.0g
蒸留水 1,000ml
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。

○ mEC培地（USDA法）（自家調製）

組成：

トリプトン 20.0g
胆汁酸塩 (Bile salts No.3) 1.12g
ラクトース 5.0g
 K_2HPO_4 4.0g
 KH_2PO_4 1.5g
NaCl 5.0g
蒸留水 1,000ml
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 同通知別添3. 及び4. に従い増菌培養した後、培養液について5. DNA抽出法及び6. VT遺伝子検出法を実施する。なお、DNA抽出の際には、5. 1) アルカリ熱抽出法を使用する。

3 2においてVT遺伝子陽性であった場合、増菌培養液について、リン酸緩衝液（PBS）で10⁻⁶まで10倍階段希釈し、各希釈液について再度DNA抽出及びVT遺伝子検出を実施する。

4 同通知別添8. 分離培養法においては、3においてVT遺伝子陽性の最大希釈段液及びその一段上の希釈液各0.1mlをSMAC又はVi RX026寒天培地（選択剤非添加）に2枚ずつ塗抹し分離培養を行う。SMAC及びVi RX026寒天培地の組成等は次のとおりである。

○ SMAC培地（Sorbitol MacConkey agar）（Oxoid, Difco, MAST, メルク、栄研化学、日水製薬、極東製薬工業、他）

組成：

ペプトン 20.0g
胆汁酸塩（Bile salts No.3） 1.5g
ソルビトール 10.0g
NaCl 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

★：通常使用しているMacConkey agar処方の乳糖の代わりにソルビトール10.0gを加えて使用することもできる。121℃で15分間滅菌後50℃以下に冷却し、分注し寒天平板として使用する。大腸菌のソルビット分解集落は赤色集落を形成する。

○ Vi RX 026寒天培地（栄研化学）

組成：

ペプトン 15.0g
NaCl 5.0g
胆汁酸塩 1.5g
L-ラムノース 10.0g
フェノールレッド 0.03g
発色基質 0.3g
寒天 15.0g
蒸留水 1,000ml
pH 7.0±

★：121℃で15分間滅菌後50～60℃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～紺色集落を形成する。その他の血清型の大腸菌は黄緑～緑色を、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。

塗抹平板培地上に生育した大腸菌コロニーについて、単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、その分画内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。

5 単一コロニーのVT遺伝子が陽性だった場合、9. 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2の操作に戻り、単一コロニーでVT遺伝子陽性を確認するまで3の操作を繰り返す。

チーズからの腸管出血性大腸菌0103の検査法

