

食安監発 1217 第 3 号
平成 24 年 12 月 17 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 026、0111 及び 0157 の検査法について

標記については、平成 24 年 5 月 15 日付け食安監発 0515 第 3 号により通知しているところです。

今般、VT 遺伝子検出法によるスクリーニング法等について所要の改正を行い、当該通知を廃止し、別添のとおりとするので、検査を行う場合はこの方法により実施されるようお願いいたします。

食品からの腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法

食品からの腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の試験は、原則として、ベロ毒素 (VT) 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 0.2～0.3 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

以下の増菌培養液を VT 遺伝子検出法及び培養法に供試する。なお、10 ml を試験が終了するまで冷蔵保存する。

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。

4. 増菌用培地

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

組成:	ペプトン	20.0 g
	胆汁酸塩	1.12 g
	ラクトース	5.0 g
	K_2HPO_4	4.0 g
	KH_2PO_4	1.5 g
	NaCl	5.0 g
	精製水	1,000 ml
	pH	6.9 ± 0.1

備考: 121°C 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

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。

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のVT遺伝子の検出試験を行う。

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、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ため、1) のアルカリ熱抽出法を使用する。

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 1 M 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)

5) その他、同等品も利用できる。

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 遺伝子検出法としては以下のものが利用できる。試験には陽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、当日中に7以降の分離培養を行う。

1) PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キット又は公表されているプライマー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) 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分を1サイクル行う。
増幅 DNA の大きさは 171 bp である。

② その他、同等の機能を有する試薬・機器が利用できる。

(2) 公表されているプライマー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

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

(使用方法例)

ア. 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
滅菌精製水	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 (5U/ 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'

イ. 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その他、反応条件を検討し同等であると判断されたプライマー及びPCR酵素が利用できる。

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 (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)

(2) 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 遺伝子検出キット又は公表されているプライマー及びプローブを各試験検査機

関で合成・調製し、市販の Master Mix 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 CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ)

対応機種： Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ)、ABI PRISM 7000、7300、7500、7500Fast、7700 及び 7900 (ライフテクノロジーズジャパン)、LightCycler 480II 及び Nano (ロシュ・ダイアグノスティックス)

ただし、ABI PRISM 7000、7300、7500、7500Fast、7700 及び 7900 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 480II 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) 公表されているプライマー及びプローブを合成・調製し、市販の Master Mix を使用する場合

① Nielsen *et al.* J. Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003.

(使用方法例)

ア. 機器

ABI PRISM 7000、7300、7500、7500Fast、7700 及び 7900、LightCycler 480II 及び Nano、Thermal Cycler Dice Real Time System IIが使用できる。ただし、ABI PRISM 7500Fast では、standard mode にて使用する。

イ. 試薬

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

ウ. 反応液の準備

表 2 に示した反応液を調製する。総反応容量は 30.0 μ l 又は 50.0 μ l とする。

エ. 反応プレートのウェル又は反応チューブに 25.0 μ l 又は 45.0 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。

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 40 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. ABI PRISM 7000、7300、7500、7500Fast、7700 及び 7900 では、Auto 解析又は Threshold を 0.2 に設定して解析する。Baseline については、安定した部分 (目安として 3-10 cycle) に手動設定による解析を行う。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 480II 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 2-1 反応液の調製 1

試薬		容量
滅菌精製水		4.0 μ l
TaqMan Environmental Mater Mix 2.0		25.0 μ l
10 pmol/ μ l プライマー	VT1-F	3.0 μ l
	VT1-R	3.0 μ l
	VT2-F	3.0 μ l
	VT2-R	3.0 μ l
5 pmol/ μ l プローブ	VT1-P	2.0 μ l
	VT2-P	2.0 μ l
計		45.0 μ l

表 2-2 反応液の調製 2

試薬		容量
滅菌精製水		4.0 μ l
TaqMan Environmental Mater Mix 2.0		15.0 μ l
20 pmol/ μ l プライマー	VT1-F	0.9 μ l
	VT1-R	0.9 μ l
	VT2-F	0.9 μ l
	VT2-R	0.9 μ l
5 pmol/ μ l プローブ	VT1-P	1.2 μ l
	VT2-P	1.2 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-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.

(使用方法例)

ア. 機器

LightCycler Ver. 2.0 (LightCycler Capillaries 100 μ l 用) が使用できる。

イ. 試薬

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe、プローブ、プライマー、滅菌精製水

ウ. 反応液

表 3 に示した反応液を調製する。

エ. 反応液 45.0 μ l と検体 DNA 5 μ l をキャピラリーにアプライする。

オ. 増幅反応は、95℃で10分を1サイクル、次いで95℃で10秒、60℃で5秒（55℃まで0.5℃ずつタッチダウン）、72℃で20秒を45サイクル、40℃で30秒を1サイクル行う。

カ. ランを開始する。

キ. ランが終了したら、データ解析をする。

表3 反応液の調製

試薬			容量
滅菌精製水			14.0 μl
10×LC-DNA Master			5.0 μl
25mM MgCl ₂			6.0 μl
10 pmol/μl プライマー	VT1	StxA1 598	2.5 μl
		StxA1 1015	2.5 μl
	VT2	StxA2 679	2.5 μl
		StxA2 942	2.5 μl
3 pmol/μl プローブ	VT1	StxA1 FL724	2.5 μl
		StxA1 LC693	2.5 μl
	VT2	StxA2 FL769	2.5 μl
		StxA2 LC799	2.5 μl
計			45.0 μl

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'

③その他、同等の機能を有する試薬・機器が使用できる。

4) その他、同等の手法も使用できるが、感度が1X10⁴ 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、0111 又は 0157（VT 陽性株）の菌濃度が約1X10⁴ cfu/ml（検体の増菌培養液）を作製し試験する。血清群 026、0111 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±1℃で 18±1 時間培養する（約5X10⁸ cfu/ml）。この培養液を対象検体の 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 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1X10⁴ 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. 分離培養法

VT 遺伝子検出試験の結果、陽性であった場合は、当日中に分離培養を行う。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。

直接塗抹法については増菌培養液 10 µl、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 µl を各種分離平板培地 1 枚あたりに画線塗抹し 36±1°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。また、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。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。

なお、凍結等によって菌の損傷が考えられる場合は、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 非添加の分離平板培地も使用する。

1) 直接塗抹法

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) 寒天培地及び 2) の (2) に示す血清群 0111 用の酵素基質培地のうち 1 種類について、各 1 枚ずつ計 2 枚を使用する。CT-SMAC 寒天培地では、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 及び 0111 はソルビトール分解の赤色コロニーを形成する。それぞれの典型的コロニーを釣菌して血清凝集にて確定を行う。酵素基質培地では、それぞれの培地での典型的な血清群 0111 のコロニー、また、大腸菌のコロニーを各培地上での特徴に従って釣菌し、8 以降の血清型別試験を行う。

CT-SMAC 寒天培地 (市販培地、自家調製又は基礎培地使用: オキシイド製造; 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)

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°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。典型的な血清群 0157 はソルビトール非分解又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、ベリタス等で購入することができる。

2) 免疫磁気ビーズ法

(1) 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、

異なる血清群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 (ダイナル製造; ベリタス販売)

②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 (ダイナル製造; ベリタス販売)

③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 (ダイナル製造; ベリタス販売)

④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

①血清群 026

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する。また、CT-Vi RX 026 寒天培地、CT-クロモアガー026/0157 培地、CT-SMAC 寒天培地、CT-ColiID 寒天培地等の血清群 026 が鑑別できる培地を1種類以上併用する。

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、分離平板培地にはこれらを添加する。

ア. CT-RMAC 寒天培地 (自家調製、MacConkey Agar Base(日本ベクトン・ディッキンソン等)の使用又は市販培地: 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°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。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、ベリタス等で購入することができる。

イ. 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。典型的な血清群026は青紫～黒色コロニーを形成する。血清群026以外の大腸菌は黄緑～青緑色を、また、大腸菌以外の腸内細菌は緑、黄色又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、ベリタス等で購入することができる。

ウ. 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。典型的な血清群026は緑色コロニーを、血清群0157は赤色コロニーを形成する。その他の大腸菌は赤紫～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。添加剤は関東化学、メルク、ベリタス等で購入することができる。

エ. CT-chromID Coli 寒天培地 (ボトル培地；シスメックス・バイオメリュー)

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及びその他の血清群（0157を除く）はピンク～赤紫色のコロニーを形成する。血清群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ユー（200 ml 培地用）、関東化学、メルク、ベリタス等で購入することができる。

オ. CT-SMAC 寒天培地（前述）

カ. その他、血清群026を同等に鑑別できる培地も使用できる。

②血清群0111

セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルボースマッコンキー(CT-SBMAC)寒天培地又はCT-SMAC寒天培地のうち1種類を必ず使用する。CT-SBMAC寒天培地では、典型的な血清群0111の形成するソルボース非分解又は遅分解の無色透明コロニー、CT-SMAC寒天培地では、典型的な大腸菌コロニーを釣菌して、8以降の血清型別試験を行う。

また、酵素基質培地として、クロモアガーSTEC培地、CIX寒天培地、Vi EHEC培地、XM-EHEC寒天培地等のうち1種類以上を併用する。

ア. CT-SBMAC 寒天培地（市販培地：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。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、ベリタス等で購入することができる。

イ. CT-SMAC 寒天培地 (前述)

ウ. クロモアガー-STEPC 培地 (市販生培地又は粉末培地使用：クロモアガー社製造；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	5.2 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添付のクロモアガー-STEPC サプリメント（選択剤混合物 25 mg/バイアル）を 2 本加え、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。典型的な血清群 0111 は藤色コロニーを形成する。また、血清群 026、0157、0121 などの一部血清群の大腸菌も藤色コロニーを形成する。

エ. CIX 寒天培地 (市販生培地：極東製薬工業)

組	カゼインペプトン	9.7 g
成：	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。典型的な血清群 0111 は群青色～濃紫色コロニーを形成する。また、血清群 026 も群青色～濃紫色コロニーを形成する。血清群 0157 は青～青緑色のコロニーを形成する。

オ. Vi EHEC 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。典型的な血清群 0111 はえんじ色コロニーを形成する。また、血清群 026 は緑色、0157 は無色透明で中心部褐色のコロニーを形成する。

カ. XM-EHEC 寒天培地（市販培地：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。典型的な血清群 0111 は白濁した赤紫～紫色コロニーを形成する。また、血清群 026 は青紫色コロニーを、血清群 0157 は赤紫～紫色コロニーを形成する。

キ. その他、血清群 0111 を同等に鑑別できる酵素基質培地も使用できる。

③血清群 0157

CT-SMAC 寒天培地を必ず使用する。また、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。

ア. CT-SMAC 寒天培地（前述）

イ. 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
NaCl	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：加熱溶解後（オートクレーブ不可）50℃以下に冷却してから亜テルル酸カリウムを加え、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。

典型的な血清群 0157 は黒～濃緑色コロニーを形成する。

ウ. 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、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。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。典型的な血清群 0157 は藤色コロニーを形成する。

エ. 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
	NaCl	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 : 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、選択性を高めるには、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。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。典型的な血清群 0157 は藤色コロニーを形成する。

オ. 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、選択性を高めるためには、ノボビ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、血清群 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℃で14日以内とする。典型的な血清群 0157 は黒～灰色コロニーを形成する。

カ. その他、血清群 0157 を同等に鑑別できる酵素基質培地も使用できる。

8. 血清型別試験

分離平板培地から血清群 026、0111 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）。市販の免疫血清及び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 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)

3) 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)

4) その他、各血清群につき、同等品も使用できる。

9. 生化学的性状試験

血清群 026、0111 及び 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、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℃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。

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±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。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、それ以外の血清型は蛍光を示す。

10. VT 確認試験

血清群 026、0111 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) PCR 法

- (1) 0-157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (タカラバイオ)
- (2) 0-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set (タカラバイオ)
- (3) その他、6. VT 遺伝子検出法で示した検出法及び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 (アヅマックス)
- (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。

11. 判定

腸管出血性大腸菌血清群 026、0111 又は 0157 が分離されたことをもって、陽性とする。VT 遺伝子検出法によって陽性であったが、血清群 026、0111 又は 0157 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O26, O111, O157検査法

