

食安輸発0614第1号  
平成23年6月14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

今般、ヨーロッパ地域を中心に腸管出血性大腸菌O104による健康被害が発生していることを踏まえ、腸管出血性大腸菌O104の検査法を別添のとおり定めたので、この方法により検査を実施するようお願いいたします。

## 食品からの腸管出血性大腸菌 0104 の検査法について

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」（以下「平成 18 年通知」という。）別添に準じ、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 を幅広く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、改正することがありますので了知願います。

なお、本試験法の詳細については、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室まで問い合わせください。

## 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。

## 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

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、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $20 \pm 2$  時間培養する。増菌培養液を培養法及び遺伝子検出法に供試する。また、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。

## 4. 増菌用培地

1) mEC 培地（オキシド製造；関東化学販売、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
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 g
NaCl	5.0 g
精製水	1,000 ml
pH	$6.9 \pm 0.1$

$121^\circ\text{C}$  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 20.0g  
胆汁酸塩 (Bile salts No.3) 1.12g  
ラクトース 5.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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。

## 5. DNA 抽出法

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以降の VT 遺伝子及び 0104 抗原遺伝子検出を行う。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 0.1 ml を 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 0.1 ml を添加して 100°Cで 10 分間加熱処理する。その処理液 50µl を滅菌した 1 M 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、脂肪の多い食肉を除く)。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°Cで保存し、4 時間以内に使用する。

2) PrepMan Ultra Sample Preparation Regent (アプライド・バイオシステムズ)

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、同等品も使用できる。

但し、脂肪の多い食肉については、食品成分が遺伝子増幅に影響を及ぼすためアルカリ熱抽出法 (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、7. 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、当日中に血清型 0104 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、 $1 \times 10^4$  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 (ペロ毒素遺伝子) 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、試薬や機器が利用できる。

###### 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 $\mu$ l
Distilled water	34.75 $\mu$ l
10 X <i>Ex Taq</i> Buffer	5.0 $\mu$ l
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4.0 $\mu$ l
<i>Takara Ex Taq</i> (5U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
5 pmol/ $\mu$ l プライマー	Sense: 0.5 $\mu$ l
	Antisense: 0.5 $\mu$ l
計	50.0 $\mu$ 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使用できる。

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 抽出液も使用できる。

### 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)、LightCycler Ver. 1.2、1.5、2.0

その他、同等の機能を有する機器が使用できる。

#### (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 試薬や機器が使用できる。

##### 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)

#### (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  $\mu$ l 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  $\mu$ l を加え、蓋を軽く閉める。
- サンプル DNA 5  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 $\mu$ l	12.0 $\mu$ l
TaqMan Universal Master Mix	25.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l プライマー	VT1-F 3.0 $\mu$ l	VT2-F 3.0 $\mu$ l
	VT1-R 3.0 $\mu$ l	VT2-R 3.0 $\mu$ l
5 pmol/ $\mu$ l プローブ	VT1-P 2.0 $\mu$ l	VT2-P 2.0 $\mu$ l
計	45.0 $\mu$ l	45.0 $\mu$ 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 ;

## ロシュ・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 $\mu$ 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  $\mu$ l) に 18.0 $\mu$ l ずつ反応液を入れる。
- 陰性コントロールとして DDW 2 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95 $^{\circ}$ C で 10 秒、60 $^{\circ}$ C で 5 秒 (55 $^{\circ}$ C まで 0.5 $^{\circ}$ C ずつタッチダウン)、72 $^{\circ}$ C で 20 秒を 45 サイクル、40 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l	9.6 $\mu$ l
10 $\times$ LC-DNA Master	2.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 $\mu$ l	2.4 $\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l プライマー	StxA1 598 1.0 $\mu$ l	StxA2 679 1.0 $\mu$ l
	StxA1 1015 1.0 $\mu$ l	StxA2 942 1.0 $\mu$ l

3 pmol/ $\mu$ l プローブ	StxA1 FL724 1.0 $\mu$ l	StxA2 FL769 1.0 $\mu$ l
	StxA1 LC693 1.0 $\mu$ l	StxA2 LC799 1.0 $\mu$ l
計	18.0 $\mu$ l	18.0 $\mu$ 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 TAG TCC GGA AGC ACA TTG-3'

StxA2 FL769: 5'-MAG AGC AGT TCT GCG TTT TGT CAG 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 026、0111、0157 などの VT 陽性株の菌濃度が  $1 \times 10^4$  cfu/ml (検体の増菌培養液) を作製し試験する。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  $18 \pm 1$  時間培養する (約  $5 \times 10^8$  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  $1 \times 10^4$  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. 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を利用できる。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、 $1 \times 10^4$  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 0104 菌株を使用し 6. の方法を参照して行う。

### 1) Real-time 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)

使用機種: ABI7500; アプライド・バイオシステムズ

表 4 に示した反応液を調製する。

表 4 反応液の調整 (1 反応当たり)

試薬	添加量
----	-----



SYBR Premix <i>Ex Taq</i> (2X)	25 $\mu$ l
プライマー (10 pmol/ $\mu$ l)	wzx0104-f 1 $\mu$ l
	wzx0104-r 1 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50X)	1 $\mu$ l
滅菌水	17 $\mu$ l
サンプル DNA	5 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

wzx0104-f: TGTCGCGCAAAGAATTTCAAC

wzx0104-r: AAAATCCTTTAAACTATACGCC

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](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5に示した反応液を調製する。

表5 反応液の調整 (1反応当たり)

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

wzx0104-f: TGTCGCGCAAAGAATTTCAAC

wzx0104-r: AAAATCCTTTAAACTATACGCC

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。増幅 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](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 6 に示した反応液を調製する。

表 6 反応液の調整 (1 反応当たり)

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

104rfb0-f : TGAAGTATTTTTAGGATGG

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](http://www.ehec.org/pdf/Laborinfo_01062011.pdf))

## 8. 分離培養法

6. 及び7. において、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。
- ② VT 遺伝子陽性の最大希釈液及びその一段上の希釈液各 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ニー (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、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。
- ③ 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①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：オキシド製造；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)

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、その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。

## 9. 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。7. に示した方法を使用する。

## 10. 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 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、運動性陰性など、非定型の性質を持つ場合もある。

#### 11. 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

