

食安監発 0603 第 2 号
平成 23 年 6 月 3 日

各
〔 都 道 府 県
保健所設置市
特 別 区 〕
衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について

食品からの腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検出方法については、平成 18 年 11 月 2 日付け食安監発第 1102004 号「腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について」により示しているところです。

本年 4 月、富山県等で発生した腸管出血性大腸菌食中毒事件において、食肉を生食した小児等数名が死亡し、多数の重症者が確認されており、患者からは血清型 O111 が分離されていることから、今般、腸管出血性大腸菌の血清型 O111 の検出方法について検討を行い、別添のとおり食肉からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法を定めたので、この方法により検査を実施されるようお願いいたします。

なお、その他の食品からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法、血清型 O157 及び O26 との一斉試験法については、現在、検査方法の確認中であり、確認でき次第、改めて、通知することとしています。

食肉からの腸管出血性大腸菌 0111 の検査法

腸管出血性大腸菌 0111 の試験を以下の方法によって行う。ベロ毒素 (VT) 遺伝子検出法を行うための設備を整えることができない場合については培養法のみを行って差し支えない。

1. 検体の採取

1) 食肉

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

1) 食肉

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培養法及び VT 遺伝子検出法に供試する。但し、VT 遺伝子検出法の場合は、別に 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。

1) 食肉

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、 42 ± 1 で 22 ± 2 時間培養する。

4. 増菌用培地

1) ノボピオシン加 mEC 培地 (栄研化学、メルク、極東製薬工業 等)

組成：

ノボピオシナトリウム 0.020-0.025 g

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

: 121 で 15 分間滅菌後冷却し、そのまま使用する。

2) ノボピオシン加 mEC 培地 (市販の mEC 培地 (ノボピオシン不含) を用いる場合 (オキシイド製造; 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
K₂HPO₄ 4.0 g
KH₂PO₄ 1.5 g
NaCl 5.0 g
精製水 1,000 ml
pH 6.9±0.1

: 121 で 15 分間滅菌後冷却し、ノボピオシンナトリウム (メルク、シグマアルドリッチジャパン等) の濾過滅菌水溶液 (4 mg/ml) を培地 1,000 ml につき 5 ml 添加する (最終濃度 20 mg / 1,000 ml)。

3) ノボピオシン加 mEC 培地 (USDA 法) (自家調製)

基礎培地組成:

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
K₂HPO₄ 4.0 g
KH₂PO₄ 1.5 g
NaCl 5.0 g
精製水 1,000 ml
pH 6.9±0.1

: 121 で 15 分間滅菌後冷却し、ノボピオシンナトリウム (メルク、シグマアルドリッチジャパン等) の濾過滅菌水溶液 (4 mg/ml) を培地 1,000 ml につき 5 ml 添加する (最終濃度 20 mg / 1,000 ml)。

ただし、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通知法に示す増菌培養法と同等であると判断した上で、mEC において 42±1 または 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。これらの菌はセフィキシム・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 非添加のものも使用する必要がある。

5. DNA 抽出法 (VT 遺伝子検出法を行わない場合は 7 へ)

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の VT 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℃ で 10 分間加熱処理する。その処理液 50 µl を滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 8 µl 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℃ 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)

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、当日中に血清型 0111 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、 1×10^4 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

0-157 (ベロ毒素遺伝子) PCR Screening Set (タカラバイオ)

94℃ で 1 分、55℃ で 1 分、72℃ で 1 分を 35 サイクル、72℃ 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 及び PCR 酵素が使用できる。

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 µl
Distilled water	34.75 µl
10 X Ex Taq Buffer	5.0 µl
dNTP mixture (各 2.5 mM)	4.0 µl
Takara Ex Taq (5 U/µl)	0.25 µl
5 pmol/µl プライマー	Sense: 0.5 µl
	Antisense: 0.5 µl
計	50.0 µl

Sense: 5' -GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'

Antisense: 5' -TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'

94 で 1 分、43 で 1.5 分、72 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

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 ジャパン) 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、Master Mix、Real-time PCR 機器が使用できる。

Nielsen *et al.* J. Clin. Microbiol. 41:2884-93, 2003.(使用機種：ABI7700；アプライド・バイオシステムズジャパン)

(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 μ 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 μ l を加え、蓋を軽く閉める。

- サンプル DNA 5 μ 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 μ 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 で 2 分、95 で 10 分を 1 サイクル、次いで 95 で 15 秒、60 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 μ l	12.0 μ l
TaqMan Universal Master Mix	25.0 μ l	25.0 μ l
10 pmol/ μ l プライマー	VT1-F 3.0 μ l	VT2-F 3.0 μ l
	VT1-R 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	45.0 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'

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 μ 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 µl) に 18.0 µl ずつ反応液を入れる。
- 陰性コントロールとして DDW 2 µl 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 µl 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 µl 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 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。
- 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 µl	9.6 µl
10 × LC-DNA Master	2.0 µl	2.0 µl
25mM MgCl ₂	2.4 µl	2.4 µl
10 pmol/µl プライマー	StxA1 598 1.0 µl	StxA2 679 1.0 µl
	StxA1 1015 1.0 µl	StxA2 942 1.0 µl
3 pmol/µl プローブ	StxA1 FL724 1.0 µl	StxA2 FL769 1.0 µl
	StxA1 LC693 1.0 µl	StxA2 LC799 1.0 µl
計	18.0 µl	18.0 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'

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 0111 (VT 陽性株) の菌濃度が 1×10^4 cfu/ml (検体の増菌培養液) を作製し試験する。血清型 0111 (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 5×10^8 cfu/ml)。この培養液を対象検体のノボピオシン加 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 の対象検体のノボピオシン加 mEC 培養液で希釈した菌液を試料とする。この希釈菌液は 1×10^4 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. 免疫磁気ビーズ法

血清型 0111 大腸菌の分離を目的に、増菌培養液を免疫磁気ビーズ法に供試する。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、異なる血清型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 また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こと。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、ディスポーサ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) 免疫磁気ビーズ 0111「生研」(デンカ生研)
- 2) Dynabeads anti-E.coli 0111 (ダイナル製造; ペリタス販売)

その他、同等品も使用できる。

8. 分離培養法

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。直接法については増菌培養液 10 μ l、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 μ l を各種分離平板培地 1 枚あたりに画線塗抹し 36 ± 1 で 18 - 24 時間培養後、疑われるコロニーを分離する。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たり、増菌培養液を希釈するなどの操作を行う。二分画培地の場合は相当の面積に塗抹する。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。

分離培地には、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)寒天培地またはセフィキシム・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(平成18年11月2日付け食安監発第1102004号「腸管出血性大腸菌0157及び026の検査法」参照)のうち1種類を必ず使用する。CT-SBMAC寒天培地では、典型的な血清型0111の形成するソルボース非分解また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0111血清凝集にて血清型0111の確定を行う。

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こととする。

- 1) CT-SBMAC 寒天培地(市販培地:日水製薬、極東製薬工業等;自家調製または基礎培地使用(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
塩化ナトリウム 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

または

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。典型的な血清型0111はソルボース非分解また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) クロモアガー STEC 培地(市販培地または粉末培地使用:クロモアガー社製造;関東化学販売)

基礎培地組成：

ペプトンおよび酵母エキス 8.0 g

塩化ナトリウム 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：基礎培地は、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STEC サプリメント（選択剤混合物 25 mg/バイアル）を2本を加え、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。典型的な血清型 O111 は藤色コロニーを形成する。

3) 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

塩化ナトリウム 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。典型的な血清型 O111 は群青色～濃紫色コロニーを形成する。

4) 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

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

備考：保存期間は2～10 で2ヶ月以内とする。典型的な血清型 O111 はえんじ色コロニーを形成する。

5) XM-EHEC 寒天培地（市販培地：日水製薬）

組成：

ペプトン 15.0 g

塩化ナトリウム 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。典型的な血清型 O111 は白濁した赤紫～紫色コロニーを形成する。

その他、血清型 O111 を鑑別できる酵素基質培地同等品も使用できる。

9. 血清型別試験

各分離平板培地から血清型 O111 と疑われるコロニーを普通寒天培地等に純培養する（培養条件：36±1 で18 - 24時間）。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が市販されている。試験方法は、仕様書を参照すること。生菌を用いた場合は誤判定となる場合があるため、最終判定には加熱死菌を用いる。

1) 病原大腸菌免疫血清 O111 (デンカ生研)

2) *E. coli* O111-F「生研」(デンカ生研)

その他、同等品も使用できる。

10. 生化学的性状試験

血清型 O111 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、各種キット等を使用できる（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 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。LIM 培地での大腸菌は、高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生を示す。

11.VT 確認試験

血清型 0111 と疑われるコロニーについては、VT 遺伝子または 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)

その他、6 . VT 遺伝子検出法で使用した VT 遺伝子検出法および同等品も使用できる。

2) 逆受身ラッセクス凝集反応 (RPLA) 法

(1) VTEC-RPLA 「生研」(デンカ生研)

その他、同等品も使用できる。

3) イムノクロマトグラフィー法等

(1) デュオパス・ベロトキシシ (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) ラインジャッジ (タウンズ)

(4) 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)

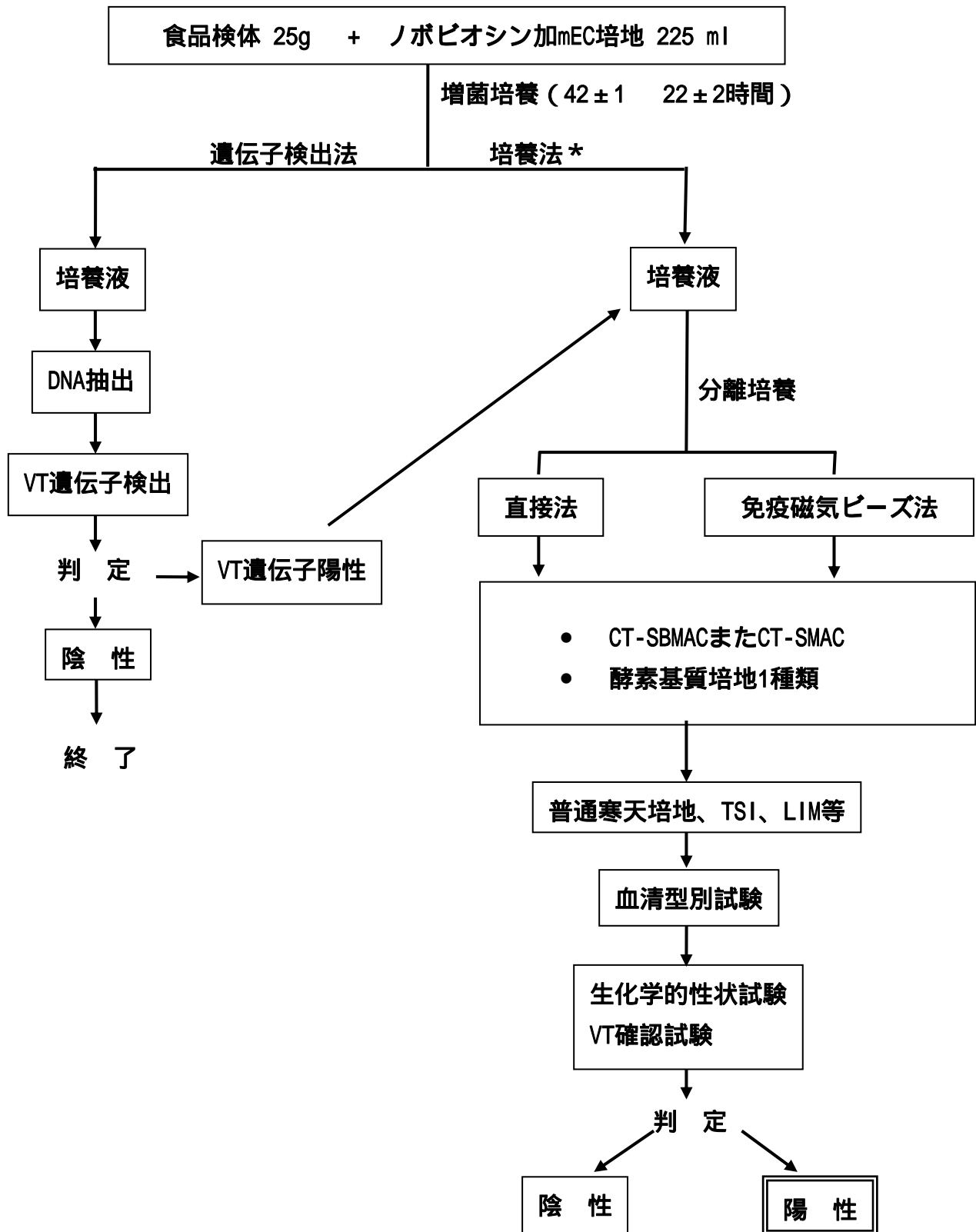
(5) RIDA スクリーン ベロトキシシ (アツマックス)

その他、同等品も使用できる。

12 . 判定

腸管出血性大腸菌血清型 0111 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、血清型 0111 の分離ができなかった場合は、陰性とする。

食肉からの腸管出血性大腸菌0111の検査法



* ペロ毒素 (VT) 遺伝子検出法を行うための設備を整えることができない等諸般の事情がある場合については培養法を行って差し支えない。