

(作成日：平成 30 年 11 月 9 日)
(最終改正日：令和 3 年 1 月 15 日)

アメリカ合衆国向け輸出食肉認定施設における牛肉からの腸管出血性大腸菌 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について

1 概要

本検査法は、腸管出血性大腸菌 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 (以下「STEC」という。)による汚染を判定するため、選択培地等による増菌培養、迅速スクリーニング試験、免疫磁気ビーズを用いた濃縮、ビーズ濃縮液の酸処理、選択分離培地への塗抹、血清型別試験及び生化学性状試験により構成される検査法である。(別添 1 参照)

2 病原体等の安全な取扱い

後述する陽性コントロール株は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における四種病原体等に該当することから、その取扱いに当たっては、同法第56条の24に基づく施設の位置、構造及び設備の技術上の基準に適合した施設で行うとともに、国際保健機関 (WHO) から示されている「実験室バイオセーフティ指針 (WHO 第 3 版)」を参考にするなど、適切な感染防御に関する取組み (病原体のエアロゾルが発生する可能性のある作業はクラス II 以上の安全キャビネットの中で行うこと、病原体を取り扱う検査室のドアへのバイオハザード警告標識の表示、オートクレーブ装置が適切な位置に設置されていること等) を行うことが推奨される。

3 品質管理

検査に係るマニュアル及び検査記録文書は適切に作成し、保管するとともに、以下に留意する。

(1) 校正及び消耗品の管理

ア 検査に使用する機器は定期的に校正を行い、校正がなされたこと及び校正の実施日をシール等で機器に表示する。また、校正の記録を作成し、保管する。

イ 検査に使用する消耗品 (培地を含む) について、保管方法や使用期限をマニュアルに定める。

(2) コントロール

以下に従って行う。スクリーニング検査において陽性の試験検体がな

い場合は、コントロールの培養は検体の培養と同じ時点で中止してよい。コントロールの管理等については別添2のとおり。

ア 増菌培養においては、代表的な1株（例：0157陽性株）を陽性コントロールとし、非接種培地を陰性コントロールとする。コントロールの培養は、サンプルの分析と同時に開始し、同じ方法で行う。なお、安全を確保する観点から、少量のスケールで実施することを妨げない。

イ スクリーニング検査においては、アで培養した陽性及び陰性コントロールからDNA抽出をしたものに加え、あらかじめ用意しておいた7つの血清群のSTEC株（*stx*⁺、*eae*⁺）全てのDNAを含むDNAテンプレートをPCR陽性コントロールとして用いる。

ウ 塗抹培養時においては、スクリーニング検査で陽性となった血清群の陽性株を陽性コントロールとして塗抹する。陰性コントロールには何も塗抹しない。

4 増菌培養

以下に留意の上、5で用いるスクリーニング検査法に従い、増菌培養を行う。

- (1) 検体重量及び培地容量の許容範囲は、以下に収めた上で、可能な限り小さくすることが望ましい。
 - ア 検体重量 ±10%
 - イ 培地容量 ±2%
- (2) N60 サンプリングにより採取した検体は、全量を使用する。万が一、規定の重量を超過した場合は、超過分を別検体として検査を実施するか、サンプリングから再度実施する。検体重量が不足する場合は、サンプリングから再度実施する。

例1：MLG5.09、MLG 5A.04及びMLG5B.05の場合

- ① 1検体（325 g）当たり1つの滅菌ストレイナーバッグに、増菌培地（975 mL mTSB）を入れ、塊が分散するまで、ストマッカー処理、ブレンダー処理又は手もみ処理を行う。
- ② 陽性コントロールとして、975 mL mTSBに陽性コントロール株1種を1エーゼ加えたもの（少量のスケールで培養する場合は、10 mL mTSBに陽性コントロール株1種を1エーゼ加えたもの）、陰性コントロールとして、975 mL mTSB（非接種。少量のスケールで培養する場合は、10 mL mTSB。）を、それぞれ1つの滅菌ストレイナーバッグに入れ、培養する。
- ③ 検体の入ったバッグを42±1℃で15～24時間培養する。

例2：5 (1) イのスクリーニング検査法 (AOAC 法) を使用する場合

- ① 1 検体 (375 g) 当たり 1 つの滅菌ストレイナーバッグに、増菌培地 (1500 mL MP) を入れ、塊が分散するまで、ストマッカー処理、ブレンダー処理又は手もみ処理を行う。
- ② 陽性コントロールとして、1500 mL MP に陽性コントロール株 1 種を 1 エーゼ加えたもの (少量のスケールで培養する場合は、10 mL MP に陽性コントロール株 1 種を 1 エーゼ加えたもの)、陰性コントロールとして、1500 mL MP (非接種。少量のスケールで培養する場合は、10 mL MP。) を、それぞれ 1 つの滅菌ストレイナーバッグに入れ、培養する。
- ③ 検体の入ったバッグを $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 15~24 時間培養する。

例3：5 (1) ウのスクリーニング検査法を使用する場合

- ① 1 検体 (375 g) 当たり 1 つの滅菌ストレイナーバッグに、増菌培地 (1000 mL TSB) を入れ、塊が分散するまで、ストマッカー処理、ブレンダー処理又は手もみ処理を行う。
- ② 陽性コントロールとして、1000 mL TSB に陽性コントロール株 1 種を 1 エーゼ加えたもの (少量のスケールで培養する場合は、10 mL TSB に陽性コントロール株 1 種を 1 エーゼ加えたもの)、陰性コントロールとして、1000 mL TSB (非接種。少量のスケールで培養する場合は、10 mL TSB。) を、それぞれ 1 つの滅菌ストレイナーバッグに入れ、培養する。
- ③ 検体の入ったバッグを $42 \pm 1^\circ\text{C}$ で 16~18 時間培養する。

5 スクリーニング検査

(1) 検査法

現行の MLG 又は以下の検査法を用いてスクリーニング検査を実施する。

- ア GeneDisc® Plate STEC (AOAC-RI#021103) /GeneDisc® Plate STEC Top 7 (AOAC-RI#031401) (Pall GeneDisc Technologies)
- イ BAX® System Real-Time PCR Assay Suite for STEC (AOAC-RI # 091301/ USDA FSIS MLG 5B.05)、BAX® Real-Time PCR Assay for E.coli O157:H7(AOAC-RI # 031002/ USDA FSIS MLG 5.09 and 5A.04) (Qualicon Diagnostics LLC, a Hygiena Company)
- ウ Applied BioSystems RapidFinder STEC Detection Workflow (AOAC - RI #061602) (Thermo Fisher Scientific)

エ QIAGEN mericon® E. coli 0157 Screen Plus (AOAC-OMA # 2017.05)、
QIAGEN mericon® E. coli STEC O-Type Pathogen Detection Assays
(AOAC-RI#101504) (Qiagen Germantown, MD)

(2) 結果の判定

各検査法の判定手順に従い判定する。陽性判定の場合は、以下に示す確認検査を実施する。

6 確認検査

(1) から (5) の方法又は、MLG5C の手順に従い、確認検査を実施する。

(1) 分離培養法

分離培養では、増菌培養液の免疫磁気ビーズ濃縮液及びその酸処理液の希釈液を塗抹する。病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 検出試験及び O 抗原遺伝子検出試験の両方が陽性であった血清群について、当日中に分離培養を行う。

ア 免疫磁気ビーズ法

免疫磁気ビーズとしては (ア) の試薬又はこれらと同等の試薬が利用できる。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 O 抗原遺伝子が陽性であった場合においても、血清群ごとにビーズ濃縮操作を行い、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最終的に (イ) に示した 1 mL の E バッファーに懸濁する。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。

(ア) 免疫磁気ビーズ

i 血清群 026

(i) 免疫磁気ビーズ 026「生研」(デンカ)

(ii) Dynabeads EPEC/VTEC 026 (ダイナル製造 ; ベリタス販売)

ii 血清群 045

(i) 免疫磁気ビーズ 045「生研」(デンカ)

iii 血清群 0103

(i) 免疫磁気ビーズ 0103「生研」(デンカ)

(ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0103 (ダイナル製造 ; ベリタス販売)

iv 血清群 0111

- (i) 免疫磁気ビーズ 0111「生研」(デンカ)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0111 (ダイナル製造; ベリタス販売)
- v 血清群 0121
- (i) 免疫磁気ビーズ 0121「生研」(デンカ)
- vi 血清群 0145
- (i) 免疫磁気ビーズ 0145「生研」(デンカ)
- (ii) Dynabeads EPEC/VTEC 0145 (ダイナル製造; ベリタス販売)
- vii 血清群 0157
- (i) 免疫磁気ビーズ 0157「生研」(デンカ)
- (ii) Dynabeads anti-E. coli 0157 (ダイナル製造; ベリタス販売)

(イ) E バッファー

i 試薬組成

牛血清アルブミン	5 g
Tween-20	0.5 mL
緩衝ペプトン水 (粉末)	20 g
精製水	1,000 mL
pH	7.2±0.2

- ii 緩衝ペプトン水に、牛血清アルブミン及び Tween-20 を加え溶解する。ろ過滅菌 (径 0.2 μm) し、2～8℃で保存する。

イ 免疫磁気ビーズ液希釈法

ビーズ懸濁液 0.1 mL に E バッファー 0.9 mL を加え 1:10 希釈液を作製する。1:10 希釈液 0.1 mL に E バッファー 0.9 mL を加え 1:100 希釈液を作製する。

ウ 酸処理

ビーズ懸濁液 450 μL に 1N 塩酸 25 μL を加え、ミキサーで攪拌し、ローターで 1 時間反応させる。その後、E バッファー 475 μL を加え 1:2 希釈液を作製する。また、この 1:2 希釈液 0.1 mL に E バッファー 0.9 mL を加え 1:20 希釈液を作製する。

エ 塗抹法

分離平板培地には i のセフィキシム・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。また、腸管出血性大腸菌の分離に適した ii の酵素基質培地 (これらと同等の培地の使用も可能。) を併用する。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。

イで作製した 1:10 希釈液及び 1:100 希釈液、並びにウで作製した 1:2

希釈液及び 1:20 希釈液 0.1 mL の免疫磁気ビーズ濃縮液を、それぞれ 2 種類以上の分離平板培地で培養する。各分離平板培地 1 枚当たり 0.1 mL をコンラージ棒で塗抹し 36±1℃で 18~24 時間培養後、疑われるコロニーを分離する。分離培地上の典型的コロニーを、それぞれのプレートからできる限り 5 個以上釣菌し、(2) 以降の試験を行う。(例：ビーズ液及び酸処理液の各希釈液を培養した、CT-SMAC 寒天培地 (計 4 枚) 及び酵素基質培地 (計 4 枚) の全てに 5 コロニー以上の典型的なコロニーの発育が見られた場合は、最低 5 コロニーずつ、計 40 コロニー以上を釣菌する。)

また、スクリーニング試験で陽性と判定された血清群と同じ血清群の陽性株を陽性コントロールとして、各種類の分離平板培地 1 枚に保存用培地から画線し、培養する。

- i CT-SMAC 寒天培地 (市販生培地、自家調製又は基礎培地使用：オキシソイド製造；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、極東製薬工業等) (045 対応)

(i) 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

(ii) 培地の調製

121℃で 15 分間滅菌後、50℃以下に冷却し、(iii) 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。

(iii) 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 (オキシソイド製造；関東化学販売、メルク、ベリタス等) を加える。

(iv) 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、045、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。

- ii CT-クロモアガー-STEPC 培地 (市販培地: 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))

(i) 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

(ii) 培地の調製

加熱溶解後(オートクレーブは不可。過度の加熱も避ける。)50℃以下に冷却してから、(iii)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し、その保存期間は2～8℃で30日以内とする。

(iii) 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。

(iv) 各血清群コロニーの典型的色調

典型的な血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 は藤色コロニーを形成する。

(2) 血清型別試験

分離平板培地から血清群 026、045、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 36±1℃で 18～24 時間純培養する。アからキまでの血清群ごとに示した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(これらと同等の免疫血清及びラテックス凝集試薬の使用も可能。)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。

ア 血清群 026

(ア) 病原大腸菌免疫血清 026 (デンカ)

(イ) E. coli 026-F「生研」(デンカ)

イ 血清群 045

(ア) 病原大腸菌免疫血清 045 (デンカ)

ウ 血清群 0103

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0103 (デンカ)

エ 血清群 0111

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0111 (デンカ)

(イ) E. coli 0111-F「生研」(デンカ)

オ 血清群 0121

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0121 (デンカ)

カ 血清群 0145

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0145 (デンカ)

キ 血清群 0157

(ア) 病原大腸菌免疫血清 0157 (デンカ)

(イ) 大腸菌 0157 検出試薬「UNI」(オキソイド製造；関東化学販売)

(ウ) E. coli 0157-F「生研」(デンカ)

(3) 生化学的性状試験

血清群 026、045、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。培地を使用する場合の培養条件は $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18～24 時間である。

ア 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)

(ア) 基礎培地組成

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	0.024 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 mL
pH	7.4 ± 0.2

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に 3 mL 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。市販品を使用してもよい。

(ウ) 大腸菌の発育性状

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。

イ LIM 培地 (日水製薬、極東製薬工業、栄研化学等)

(ア) 基礎培地組成

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

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に約 5 mL ずつ分注し 121°C で 15 分間滅菌後、急冷し高層培地とする。

(ウ) 大腸菌の発育性状

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。

ウ CLIG 培地 (極東製薬工業)

(ア) 基礎培地組成

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

(イ) 培地の調製

加温溶解後、小試験管に約3 mL ずつ分注し 115°Cで 15 分間滅菌後、斜面寒天（半高層）培地とする。

(ウ) 大腸菌の発育性状

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。

(4) 病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) 確認試験

血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 と疑われるコロニー（各血清群ごとに最大5コロニー）については、病原因子遺伝子 (*stx* 及び *eae*) を5に示すスクリーニング検査法により確認する。DNA テンプレートは1コロニーを 100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、97 \pm 2°C、10 分間加熱した後、14,000 \times g の遠心処理した上清を用いる。

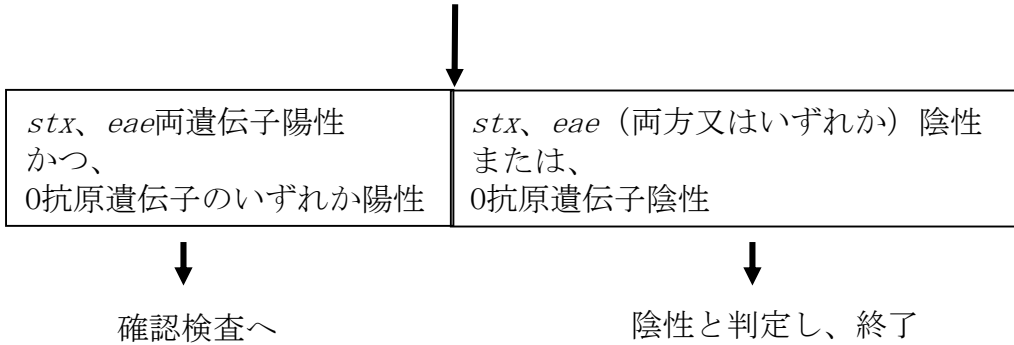
(5) 判定

最終的に腸管出血性大腸菌血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 又は 0157 が分離されたことをもって、陽性と判定する。スクリーニング検査において陽性であったが、確認検査で血清群 026、045、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。

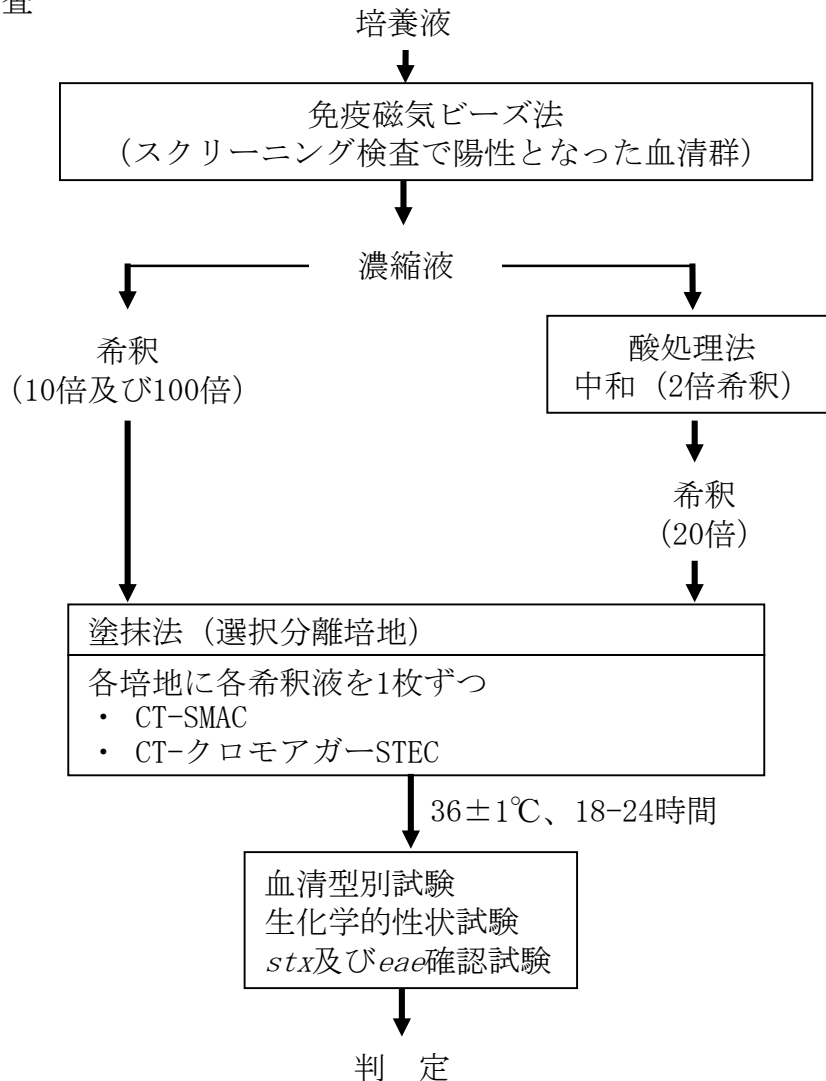
STEC検査の流れ

○ スクリーニング検査

食品検体 + 培地 (各スクリーニング法に示される培地を使用)



○ 確認検査



血清型別試験

分離平板培地から血清群026、045、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（36±1℃で18～24時間）する。凝集反応により、抗原を決定する。

生化学的性状試験

TSI：（典型的な大腸菌）高層部黄変、斜面部黄変、硫化水素非産生、ガス産生
LIM：（典型的な大腸菌）高層部紫色変、運動性陽性、インドール産生（非定型もある）
CLIG：（典型的な0157）高層部黄変、斜面部赤変、蛍光を示さない

病原因子遺伝子（*stx*及び*eae*）確認試験

スクリーニング検査法：*stx*、*eae*両遺伝子陽性

【判定】

免疫ビーズ法により培養されたコロニーを釣菌し、血清型別試験、生化学的性状試験、病原因子遺伝子（*stx*及び*eae*）遺伝子検出により、腸管出血性大腸菌血清群026、045、0103、0111、0121、0145又は0157が分離されたことを確認した場合、陽性と判断する。

陽性コントロールの管理

1 陽性コントロール株の要件

陽性コントロール株には、遺伝学的に *stx* + 及び *eae* + であり、かつ、分離培地上で典型的な特徴を示す血清群 O26、O45、O103、O111、O121、O145 及び血清型 O157:H7 の腸管出血性大腸菌を用いる。

2 陽性コントロール株の保管方法

使用中の陽性コントロール株の保存には、普通寒天培地やカジトン培地など保存に適する培地を使用する。毎月、保存株を 2 本の保存用培地に継代する。1 本の保存用培地を試験用として使用し、もう 1 本の保存用培地を継代に使用する。5 回の継代を経た後には生化学性状の再確認、若しくは新しく培養を開始することが必要となる。長期間保存する場合は、ネジロチューブに TSB 培地 1 mL を分注し、そこに平板培地上のコロニーを浮遊させた後、滅菌 Dimethyl sulfoxide (DMSO) やグリセロールを加え、 -75°C 以下で保存する。クライオビーズ (例: Cryostor™) 等を使用する場合は、各保存用試薬の使用法に従って保存する。

3 PCR 陽性コントロール用 DNA 抽出液の作製方法

- (1) カジトン培地などで保存した腸管出血性大腸菌 7 血清群の 1 エーゼをそれぞれ 10 mL の mTSB 培地に接種し、 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で一晩培養する。
- (2) 7 血清群のそれぞれの培養液を 0.1 mL ずつ 1.5 mL マイクロチューブに加え、計 0.7 mL の菌液を調製する。
- (3) $7,000 \times g$ 、10 分間の遠心を行い、上清を廃棄する。
- (4) 沈渣に 1 mL の滅菌蒸留水を加え、 $95 \sim 99^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱する。
- (5) $10,000 \times g$ 、10 分間の遠心を行い、上清を陽性コントロールとして用いる。上清は小容量のチューブに分注し、 -20°C 以下で 1 年間保存できる。