E.coli O157:H7/- の培養検査

SIB 寒天培地と LIG 寒天培地による *E.coli* O157:H7 の簡易検索

はじめに

E.coli O157:H7 は腸管出血性大腸菌（EHEC）の代表的な血清型として知られています。本菌型の検索には SIB 寒天培地が分離培地として使用されていますが、抗 O157 血清による試し凝集試験の実施に際して胆汁酸塩を含む培地上の菌苔を使用することは好ましくなく、また Sorbitol 及び IPA が陰性を示す集落の中には当然のことながら *E.coli* 以外の菌種が含まれています。したがって、従来は *E.coli* 以外の菌種を除外するために、数種の確認培地による煩雑な鑑別試験を必要としました。

極東 LIG 寒天培地は EHEC O157:H7/- の簡易検索用の確認培地として開発したもので各種材料を接種・培養した SIB 寒天培地上の Sorbitol、及び IPA 反応が陰性を示す集落を対象として Lactose、Indole、β-D-Glucuronidase について確認する培地です。

なお本培地は胆汁酸塩を含まず、また、Lactose 陽性の場合においても斜面部が酸性化しないように処方してありますので Indole、Oxidase test に影響はなく、さらに斜面部菌苔による抗 O157 血清での試し凝集試験も可能です。

(1)本法は以下の性状を前提としています。

表 1. *E.coli* O157:H7（EHEC O157:H7）と通常の *E.coli* の性状 [1)、2)]

	Sorbitol	Lactose	β-D-Glucuronidase	Indole	IPA (Cellobiose)	
E. coli O157:H7	－[a)]	＋	－	＋	—[b)]	—[b)]
通常の *E.coli*	＋[a)]	＋	＋	＋	—[b)]	—[b)]

※ [a)]：SIB 寒天培地での所見； [b)]：他菌種との鑑別に有用

LIG 寒天培地の処方

ｶｾﾞｲﾝﾍﾟﾌﾟﾄﾝ	7.5g
肉ﾍﾟﾌﾟﾄﾝ	2.5
乳糖	1.0
L-ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝ	0.1
MUG	0.02
NaCl	5.0
Phenol red	0.025
寒天	14.9

精製水　1000ml(pH7.4±)

表 2. *E.coli* O157:H7/- 114 株の LIG 寒天培地での結果 [3)]

由来	供試菌株数	該当性状株数
ヒト	98	98（100%）
動物	15	15（100%）
水	1	1
計	114	114（100%）

(2)LIG 寒天培地の調製

①本品 31 g を精製水 1000ml に溶解し、小試験管に 2.5～3.0ml ずつ分注します。

②121℃、15 分間高圧滅菌後に半高層培地として固めます。

(3)操作手順

①検査材料を接種培養した SIB 寒天培地から Sorbitol、IPA ともに陰性の無色、やや小型の集落（Sorbitol 陽性 *E.coli* に比し、扁平な傾向を示す）を釣菌し、LIG 寒天培地の高層部、ならびに斜面部に接種し、37℃、18～24 時間培養します。

②高層部が明瞭に酸性を示す株の斜面部菌苔により、Oxidase test、Indole spot test をおこない、Oxidase 陰性、Indole 陽性を確認します。
③紫外線（365nm）を LIG 寒天培地に照射し、蛍光を示さない株について抗 O157 血清により、試し凝集試験を実施します。（斜面部菌苔を使用）

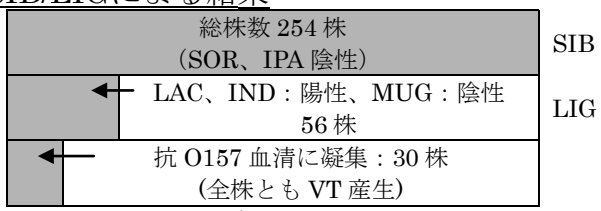
(4)適用例[3)]

甲斐らは *E.coli* O157:H7 による集団事例関連の糞便 100 例について SIB 寒天培地から Sorbitol、IPA 陰性の集落 254 株を釣菌、LIG 寒天培地により *E.coli* O157:H7 の可能性がある 56 株を選択し、このなかから抗 O157 血清に凝集する 30 株を得、その全てが Vero 毒素を産生することが確認されました。

なお抗 O157 血清に交差反応を示すことが知られている *Escherichia hermannii* や、血清学的に交差反応を示さないにせよ、本培地で *E.coli* O157:H7 と同一所見を示す可能性がある菌種についても、表 1.に示したごとく、LIG 寒天培地に Cellobiose を 1%に添加することにより、これらの菌種の鑑別・除外が容易になります。[4)]

※；Aleksic らは *E.coli* O157:H7 のなかに Sorbitol から酸を産生する菌株が存在すると報告していますが伊藤によれば，本邦ではこの種の株は確認されておりません。[4)、5)]

SIB/LIGによる結果



（図は甲斐らの成績[3)] を示す。）

使用上の注意：セロビオースを添加する場合。

培地 1000ml当りセロビオース 10.0g を加え加熱溶解後、小試験管に 2.5～3.0ml ずつ分注します。セロビオース添加LIG寒天培地にする場合は、LIG寒天培地とは異なり115℃、15 分間高圧滅菌を厳守して下さい。滅菌後、TSI寒天培地などと同様に半高層培地として固めます。

References

1） J.J.Farmer I, Betty R.Davis, et al.: Identification of New Species and Biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from Clinical Specimens. , J.Clin.Microbiol. 21:46-76.1985.
2） Samuel Ratnam, Sandra B.March, et al. :Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7., J.Clin.Microbiol. , 26:2006-2012.1988.
3）甲斐明美、伊藤　武、工藤泰雄、島田園子、江成　博：腸管出血性大腸菌 O157:H7 の検査の簡略化を目的とした LIG 寒天培地の検討．第 5 回日本臨床微生物学会　1994.
4）江成　博、島田園子、萩原博和、矢野　信禮、神田　隆：腸管出血性大腸菌の検査手順についての試案．第 6 回日本臨床微生物学会　1995.
5）S.Aleksic, H.Kach, and Bockemuhl. A Biotyping Scheme for Shiga-like(Vero) Toxin-producing *Escherichia coli* O157 and List of Serological Cross-reactions Between O157 and Other Gram-negative Bacteria. Zbl. Bact. 276：221-230.1992.
6）伊藤　武：ベロ毒素産生性大腸菌と食品衛生．モダンメディア、39：307-322,1993
7）工藤泰雄：細菌のわが国における細菌性食中毒の発生動向．モダンメディア、40：115-125,1994.

製造発売元
極東製薬工業株式会社
〒103－0024　東京都中央区日本橋小舟町 7 番 8 号
電話（03）5645－5664（代表）