

(別添)

生食用食肉の腸内細菌科菌群(Enterobacteriaceae)検出試験法

1 腸内細菌科菌群の定義

腸内細菌科菌群(Enterobacteriaceae)とは、本試験法に従って試験を行ったときに、バイオレットレッド胆汁ブドウ糖(VRBG)寒天培地上で特徴的な集落を形成し、ブドウ糖を発酵するオキシダーゼ反応陰性の微生物をいう。

2 試験法の概要

この試験法はISO 21528-1:2004に述べられている定性試験法を基に作成した。生食用食肉試料 25 gを秤量し、緩衝ペプトン水225 mlを加えた後、37 °Cで 18±2時間培養する。培養液 1 mlを EEブイヨン 10 mlに加え、37 °Cで 24±2時間培養後、VRBG寒天平板に画線塗抹する。37 °Cで 24±2時間培養後、形成された腸内細菌科菌群の典型集落を釣菌し、オキシダーゼ反応及びブドウ糖発酵性を確認し、腸内細菌科菌群の有無を判定する。

3 培地及び試薬

- 1) 緩衝ペプトン水(Buffered Peptone Water; BPW)：前増菌培地
各培地成分又は乾燥培地を溶解して 121 °C, 15 分間高圧蒸気滅菌して使用する。

動物組織の酵素消化物*	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	9.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
精製水	1,000 ml
	pH 6.8~7.2

* 獣肉ペプトンなど

- 2) 緩衝ブリリアントグリーン胆汁ブドウ糖ブイヨン(Buffered Brilliant Green Bile Glucose Broth ; EE ブイヨン)：選択増菌培地

各培地成分又は乾燥培地を加温溶解後、速やかに冷却し、滅菌した中試験管に10 ml分注する。培地を30分以上加熱してはならない。必要であれば、加温溶解後に25 °CでのpHが 7.2±0.2となるように調整する。本培地は滅菌してはならない。

動物組織の酵素消化物*	10.0 g
ブドウ糖	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	6.45 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
精製牛胆汁	20.0 g
ブリリアントグリーン	0.0135 g
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

- 3) バイオレットレッド胆汁ブドウ糖寒天培地(Violet Red Bile Glucose Agar ; VRBG寒天培地)：選択分離培地

各培地成分又は乾燥培地を加温溶解し、市販の直径85~100 mm滅菌済みシャーレに15 mlを目安に分注する。必要であれば、加温溶解後に25 °CでのpHが7.4±0.2となるように調整

する。本培地を滅菌してはならない。

動物組織の酵素消化物*	7.0 g
酵母エキス	3.0 g
胆汁酸塩 No. 3	1.5 g
ブドウ糖	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	0.002 g
寒天	9 g~18 g **
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** 寒天のゲル強度による

4) 普通寒天培地 (Nutrient Agar)

各培地成分又は乾燥培地を、加温溶解して121 °C、15分間高圧蒸気滅菌後、寒天平板として使用する。必要であれば、滅菌後に25 °CでのpHが7.3±0.2となるように調整する。

注：オキシダーゼ反応用には糖不含の培地を使用する。糖を含有する培地に発育した集落は酸性になるので、オキシダーゼ反応を誤判定する可能性がある。

肉エキス	3.0 g
動物組織の酵素消化物*	5.0 g
NaCl	5.0 g
寒天	9 g~18 g **
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** 寒天のゲル強度による

5) ブドウ糖発酵性試験用培地 (高層培地)

ISO 21528-1:2004で示されている組成は以下のとおりである。しかし、現時点ではこの処方市の市販品が入手困難なため、腸内細菌科菌群のブドウ糖発酵性を試験できる他の市販の培地を用いても良い。この場合、培地の作製及び使用方法は、製造業者の使用説明書に従う。適切な容量の試験管に培地を分注（例：内径11 mm×120 mmの試験管で培地の深さ3 cm）し、121 °C、15分間高圧蒸気滅菌後急冷し、高層培地として固めて使用する。保存したものを使用する際は、溶存酸素を除去するため、使用直前に加温溶解後に急冷して使用する。市販品としては、OF培地、アンドレードのペプトン水（ブドウ糖と寒天を添加し、半流動培地として使用）などがある。

カゼインの酵素消化物*	10.0 g
酵母エキス	1.5 g
ブドウ糖	10.0 g
NaCl	5.0 g
プロムクレゾールパープル	0.015 g
寒天	9 g~18 g **
精製水	1,000 ml
	pH 7.0±0.2

* カゼインペプトンなど

** 寒天のゲル強度による。

6) オキシダーゼ試薬

用時調製して使用する。市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を用いても良い。

<i>N, N, N', N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド	1.0 g
精製水	100 ml

4 機械及び器具

- 1) 乾熱滅菌器：170 °C～180 °C(乾熱)を保持できる機種
- 2) 高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)：少なくとも121 °C(湿熱)を保持できる機種
- 3) 恒温器：37 °C±1 °Cを保持できる機種
- 4) 恒温水槽：44 °C～47 °Cを保持できる機種
- 5) 試験管：ブドウ糖発酵性試験用
- 6) シャーレ：ガラス製又はプラスチック製で直径85 mm～100 mmの滅菌済み品
- 7) 白金耳(直径約3 mm)及び白金線：白金/イリジウム合金製，ニッケル/クロム合金製，ガラス棒，プラスチック製の使い捨て製品
- 8) 滅菌ピペット：1 mlが計量できる器具
- 9) pHメーター：25 °Cにおける正確さが±0.1 pH以内の機種
- 10) ホモジナイザー：蠕動式(可能であれば速度及び時間を調整できる機種；ストマッカー)又は回転式(ブレンダー)の機種
- 11) 天秤：0.01 gから計量可能な機種

5 試験手順(フローチャート参照)

- 1) 試料の調製
生食用食肉の生食部位から採取した検体の全体を無菌的に細切，混和した後，その25 gをストマッカー袋等に秤量して試料とする。
- 2) 前増菌培養
秤量した試料に，緩衝ペプトン水225 mlを加えホモジナイザーを用いて1～2分間攪拌混合した後，37 °Cで18±2時間培養する。
- 3) 選択増菌培養
培養後の緩衝ペプトン水1 mlをEEブイヨン10 mlに加え，37 °Cで24±2時間培養する。
- 4) 選択分離培養
培養後のEEブイヨンから1白金耳量を取り，VRBG寒天平板に画線塗抹した後，37 °Cで24±2時間培養する。
- 5) 集落の判定及び継代培養
 - ① 培養後の寒天平板上に腸内細菌科菌群の典型集落(淡紅色～赤色又は紫色を呈する集落)が形成されているかを判定する。典型集落が認められた場合は，任意に独立集落を選定する。ある種の腸内細菌科菌群は集落又は培地の脱色を引き起こすことがある。従って，特徴的な集落が存在しない場合，白みがかった集落を確定のために選定すること。形状の異なる複数の典型集落が認められた場合は，それぞれに独立集落を選定する。
 - ② 選定した集落をそれぞれ釣菌し，普通寒天平板に画線塗抹する。37 °Cで24±2時間培養後，独立集落を選定して次の確定試験を実施する。
- 6) 確定試験
培養後の普通寒天培地上に形成された単離集落について，オキシダーゼ試験及びブドウ糖発酵性試験を実施する。
 - ①オキシダーゼ試験
白金耳，白金線又はガラス棒を用いて単離集落の一部を取り，オキシダーゼ試薬を含ませたる紙又は市販のオキシダーゼ試験用ろ紙の上に塗抹する。なお，ニクロム線を用いて塗抹してはならない。10秒以内にろ紙が暗色化しない場合，オキシダーゼ反応は陰性と判

定する。また、市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を使用する場合、製造業者の使用説明書に従って判定する。

②ブドウ糖発酵性試験

白金線を用いて、オキシダーゼ反応が陰性の集落をブドウ糖発酵性試験用培地に穿刺した後、37℃で24±2時間培養する。培養後、培地全体の色調が黄色に変色した場合、ブドウ糖発酵性は陽性と判定する。また、市販の培地を使用する場合には、製造業者の使用説明書に従って判定する。

③腸内細菌科菌群の確定

オキシダーゼ反応が陰性、かつブドウ糖発酵性が陽性と判定された集落を腸内細菌科菌群と確定する。

7) 結果表示

腸内細菌科菌群が検出された場合は陽性/25 gと表示する。また、腸内細菌科菌群が検出されなかった場合は陰性/25 gと表示する。

6 参考文献

- 1) ISO 21528-1:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment
- 2) NIHSJ-15-ST4:2011, 腸内細菌科菌群の検出試験法（増菌培養法）

腸内細菌科菌群の検出試験法(増菌培養法)フローチャート

