

大腸菌群・E.coli 同時検査用

滅菌液体培地 ~ 寒天培地より高感度に検出 ~

Pro·media XM シリーズは、大腸菌群・大腸菌を迅速に判定するキット類です。酵素基質を使用しているため、誰にでも簡単かつ迅速に信頼性の高い検査ができます。XM シリーズは主として食品検査に、XM プロスはこれらキットに用いられている試薬でユーザーが自社で培養液を作成することができます。



【Pro·media XMシリーズ の使用方法】

①



アルミシール側表面を
アルコールまたは
火炎滅菌します

②



オープナーまたは
ピペット等で
開口します

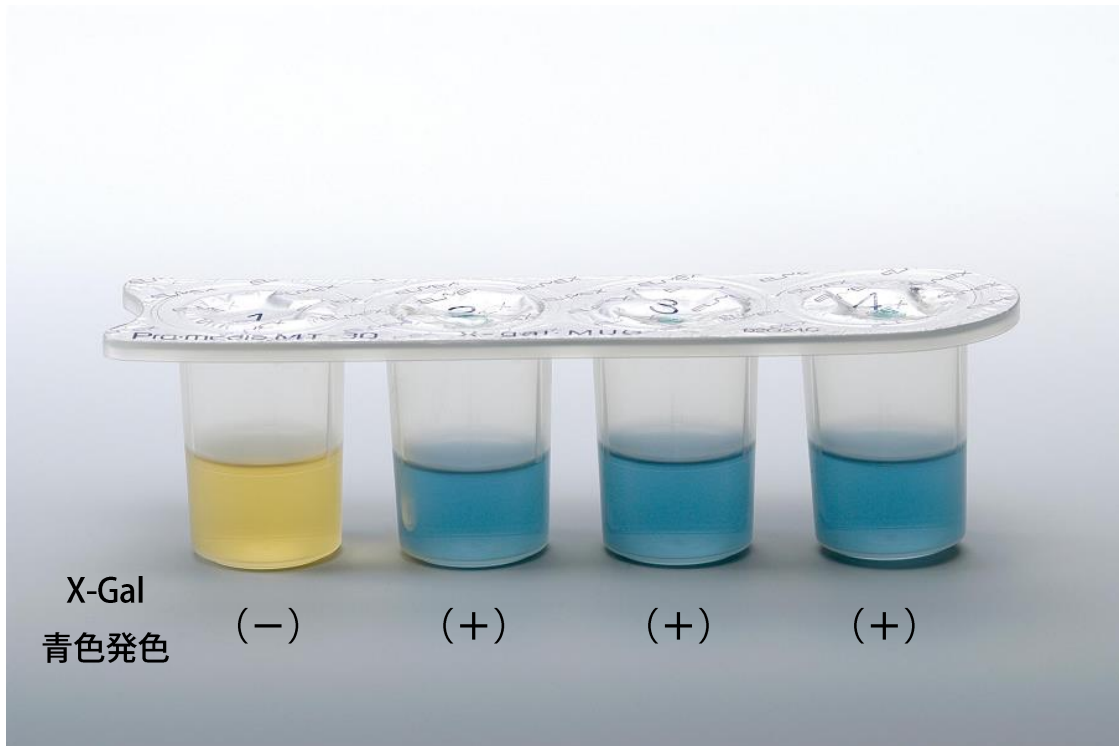
③



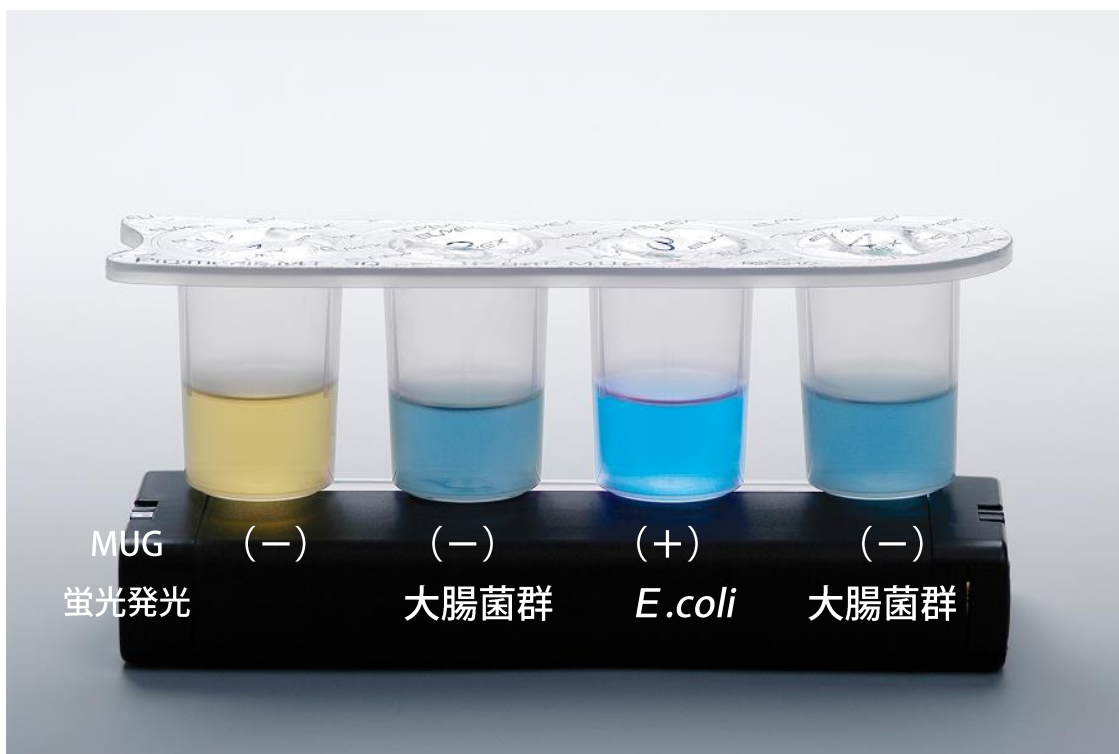
XM-30 の場合は検液 1mL
XM-31 の場合は検液 10mL
XM-32 の場合は検液 5mL
を注入します

【判定】

大腸菌群陽性の場合青色に発色します



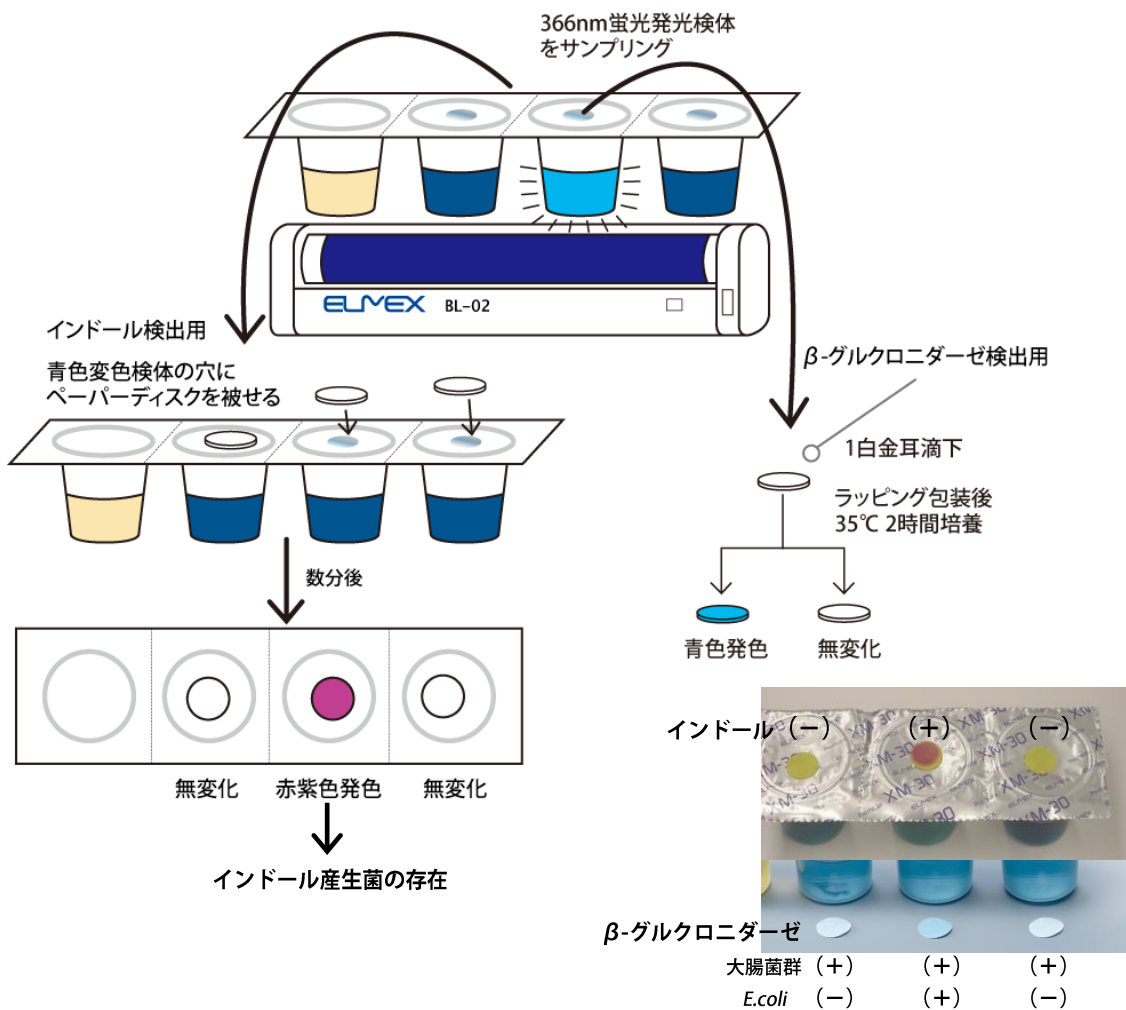
更に *E.coli* 陽性の場合、ブラックライト(波長 366nm)の光で励起され、蛍光(波長 460nm)を発光します。



■ 追加試験 ペーパーディスク Pro-media IND-01, GLU-01



IND-01 はインドール産生能の確認用、GLU-01 は生肉・生鮮魚介類の偽陽性蛍光確認用です



■ Pro-media XM-30 大腸菌インドール反応陽性例 (Kovacs の方法)

これは一般的に広く使用されているコバックスのインドール試薬の陽性例です。

コバックス試薬は材料に濃塩酸を使用しているため臭いが強烈ですがペーパーディスクなら臭気も気にならず後処理も容易です。

またある菌では更にインドールを分解してしまうため試薬を加えても反応が陰性になる場合があります。試験紙をあらかじめ乗せておけばそのような菌にも対応可能です。

(参考文献：新細菌培地学講座下1 (第二版) 坂崎利一著 P-24)

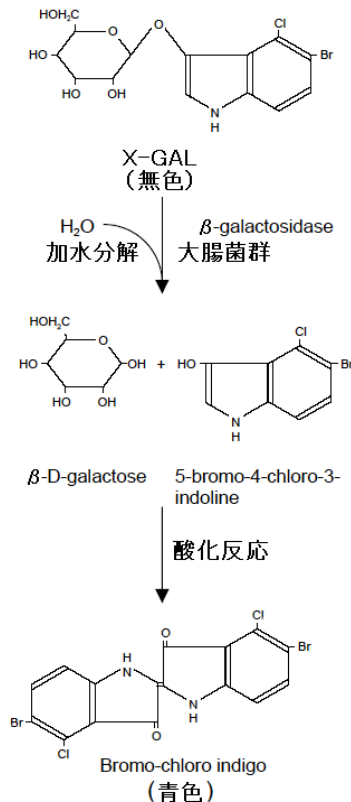


■ 酵素基質法 (X-GAL・MUG) の原理

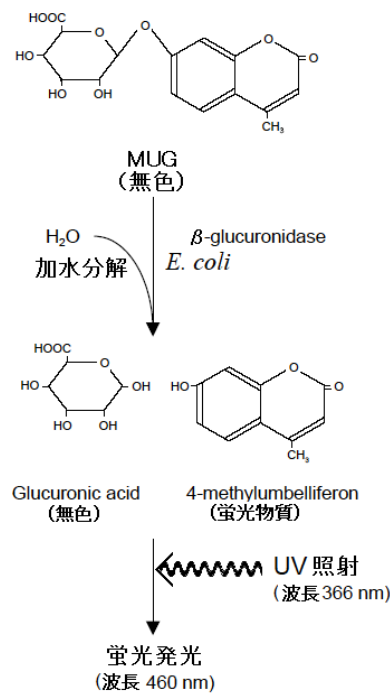
X-GAL (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル β-D-ガラクトピラノシド) が大腸菌群の持つ乳糖分解酵素 β-ガラクトシダーゼと水による加水分解によって5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリンとなり酸化重合を経てプロモクロロインディゴとなります。

一方、*E. coli* は、特異的酵素 β-グルクロニダーゼを持っておりそれにより、MUG を加水分解し蛍光物質である4-メチルウンベリフェロンを形成します。そこに波長 366nm の紫外線を照射すると蛍光を発生します。

【大腸菌群の検出反応式】



【*E. coli* の検出反応式】



■ 酵素基質液体培地の感度

【酵素基質培地の摂取菌数と反応時間】

(1) <i>E. coli</i> ATCC 25922		(2) <i>E. coli</i> IF 03302		(3) <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 213048	
Bacteria/ml	Reaction time	Bacteria/ml	Reaction time	Bacteria/ml	Reaction time
3,500	7	1,700	8	100,000	8
320	10	190	10	9,500	10
31	12	18	12	940	12
3	14	2	14	95	14
<1	16	<1	16	8	17
10 ¹ in the above	No reaction	10 ¹ in the above	18	1	20
		10 ¹ in the above	No reaction	<1	24
				10 ¹ in the above	No reaction

左欄菌数は標準寒天培地、液体培地は Pro-media XM-30 を使用
Presented by Mr. Seiichi Kaneko, Kanagawa Health Laboratory
(Kanagawa University of Human Services)

菌数は標準寒天培地を用い、混釈培養で得たものです。

すべての菌種において寒天培地では検出できなかった 1/10 に希釈した希釈液でも酵素基質培地は検出しています。

この原因として、

①寒天中の不飽和脂肪酸が菌の発育を抑制する。

②50℃で混釈すると熱によりその温度でも死滅する菌がある。

従って、菌種にもよりますが、液体培地は寒天培地に比して 10 倍以上の感度があるものと思われま。この差は一般の食品においては冷凍食品や乾燥食品など菌がストレスを受けているほど顕著になると言われています。

【β-ガラクトシダーゼを指標とした大腸菌群に該当するグラム陰性通性嫌気性桿菌の菌種】

大腸菌群の指標となる性状は乳糖発酵性で、それに関する酵素がβ-ガラクトシダーゼです。この性状の差異は、乳糖を発酵するためには乳糖分解酵素の他に細胞膜透過酵素が必要でありその酵素を欠いた菌が乳糖を発酵できない潜在的乳糖発酵菌となります。例えば、下表の *Serratia marcescens* 等は典型的な例です。

グラム陰性通性嫌気性桿菌における乳糖発酵性とβ-Galactosidaseとの関係

Species	Lactose	β-GAL	Species	Lactose	β-GAL
<i>Budvicia aquatica</i>	85%	95%	<i>Kluyvera ascorbata</i>	99%	100%
<i>Buttiauxella agrestis</i>	100%	100%	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	95%	100%
<i>Cedecea davisae</i>	20%	90%	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	95%	100%
<i>Cedecea lapagei</i>	60%	99%	<i>Moellerella wisconsensis</i>	100%	100%
<i>Cedecea neteri</i>	35%	100%	<i>Pantoea agglomerans</i>	95%	99%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	35%	95%	<i>Rahnella aquatilis</i>	100%	100%
<i>Citrobacter braakii</i>	80%	80%	<i>Salmonella IIIa</i>	15%	100%
<i>Citrobacter farmeri</i>	15%	100%	<i>Salmonella IIIb</i>	85%	95%
<i>Citrobacter freundii</i>	80%	90%	<i>Salmonella V</i>	0%	95%
<i>Citrobacter koseri</i>	50%	99%	<i>Salmonella VI</i>	20%	45%
<i>Citrobacter sedlakii</i>	100%	100%	<i>Serratia ficaria</i>	15%	100%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	15%	100%	<i>Serratia fonticola</i>	95%	100%
<i>Citrobacter youngae</i>	25%	95%	<i>Serratia liquefaciens</i>	10%	95%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	95%	100%	<i>Serratia marcescens</i>	1%	95%★
<i>Enterobacter amnigenus</i>	70%	90%	<i>Serratia odorifera</i>	90%	100%
<i>Enterobacter asburiae</i>	75%	100%	<i>Serratia plymuthica</i>	80%	70%
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	10%	100%	<i>Serratia rubidaea</i>	100%	100%
<i>Enterobacter cloacae</i>	95%	99%	<i>Shigella sonnei</i>	1%	95%
<i>Enterobacter dissolvens</i>	0%	100%	<i>Trabulsiella guamensis</i>	95%	100%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	55%	95%	<i>Yersinia bercovieri</i>	40%	80%
<i>Enterobacter hormaechei</i>	10%	95%	<i>Yersinia enterocolitica</i>	5%	95%
<i>Enterobacter intermedius</i>	100%	100%	<i>Yersinia frederiksenii</i>	40%	100%
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	0%	100%	<i>Yersinia intermedia</i>	35%	90%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	95%	100%	<i>Yersinia kristensenii</i>	10%	70%
<i>Escherichia coli</i>	95%	95%	<i>Yersinia mollaretii</i>	40%	80%
<i>Escherichia fergusonii</i>	0%	85%	<i>Yersinia pestis</i>	0%	50%
<i>Escherichia hermannii</i>	45%	99%	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0%	70%
<i>Escherichia vulneris</i>	15%	100%	<i>Yersinia rohdei</i>	0%	50%
<i>Ewingella americana</i>	70%	85%	<i>Yersinia ruckeri</i>	0%	50%
<i>Hafnia alvei</i>	5%	90%	<i>Yokenella regensburgei</i>	0%	100%
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100%	100%			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%	100%	<i>Erwinia spp.</i>	50%	95%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	30%	80%	<i>Aeromonas spp.</i>	95%	99%
<i>Klebsiella planticola</i>	100%	100%	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	45%	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	99%	<i>Vibrio cholerae</i>	5%	95%
<i>Klebsiella terrigena</i>	100%	100%			

■ 大腸菌群中の *E.coli* の同定率

- ・乳糖からの酸産生 …………… 95%
- ・乳糖からのガス産生 …………… 90%
- ・インドール …………… 95%
- ・メチルレッド …………… 99%
- ・44.5℃による発育 …………… 80%
- ・β-グルクロニダーゼ陽性…… 95%

良く使用される EC 培地ですが、44.5℃による発育では80%の *E.coli* が検出されますが、β-グルクロニダーゼを指標とすると95%の *E.coli* を検出します。

■ β-Glucuronidase 陽性の腸内細菌

- ・ *Escherichia coli* …………… 95%
- ・ *Shigella flexneri* …………… 5%
- ・ *Shigella boydii* …………… 5%
- ・ *Shigella sonnei* …………… 100%
- ・ *Salmonella* spp …………… 20%
- ・ その他の腸内細菌 …………… < 0.1%

β-グルクロニダーゼ陽性の腸内細菌がどの程度存在するかを示したものです。大腸菌の95%の菌株に見られるβ-グルクロニダーゼは、100種類に及ぶ腸内細菌菌種の中ではシゲラ、サルモネラをのぞいてはごく例外的にしか認められない特異的な酵素です。培養において本酵素の存在は大腸菌の存在を示す指標となります。

■ SWAB TEST 専用 高感度酵素基質培地 Pro-media ST-SSP



【5mL 検液中の大腸菌群・E.coli の有無を検査】

① 拭き取る



② 混釈する



③ Pro-media ST-SSP を注入



【36°C24 時間培養後判定】



淡黄色
陰性



青色発色
大腸菌群陽性



蛍光発光
E.coli 陽性

検液 5mL 中の大腸菌群・E.coli を検査するので通常の 5 倍の感度になります

【酵素基質培地使用上の注意点】

- 1) 検体中に β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼがあると反応する。
(β -グルクロニダーゼはGLU-01で判定可能)
Ex) β -ガラクトシダーゼ：タマネギ、キャベツ
 β -グルクロニダーゼ：生獣肉、生鮮魚介類
- 2) グラム陽性菌が多量に存在すると抑制できず発現する場合がある。
Ex) β -ガラクトシダーゼ：乳酸菌
 β -グルクロニダーゼ：ブドウ球菌の一部
- 3) O-157は、 β -グルクロニダーゼ陰性ですので大腸菌群として検出されます。