

表 1

スルメイカの生菌数測定

	2%APW	Log	1%APW	Log	3%NaCl 加PBS (-)	Log
	17000	4.23	14000	4.15	8700	3.94
	4900	3.69	14000	4.15	14000	4.15
	14000	4.15	19000	4.28	14000	4.15
平均	11967	4.022	15667	4.190	12233	4.077
標準 偏差	5145	0.291	2357	0.077	2498	0.119

表 2

鶏挽肉の生菌数

	PBS	Log	BPW	Log
	540000	5.73	950000	5.98
	690000	5.84	910000	5.96
	530000	5.72	900000	5.95
平均	586667	5.765	920000	5.964
標準偏差	89629	0.064	26458	0.012

表 3

豚粗挽き肉の生菌数

	0.1%ペプトン 生食水		BPW	
	470000	5.67	810000	5.91
	360000	5.56	530000	5.72
	420000	5.62	640000	5.81
平均	416667	5.617	660000	5.813
標準偏差	55076	0.058	141067	0.092

表 4

豚挽肉の生菌数

	0.1%ペプトン 生食水		BPW		Log Differene
K精肉 店	1100000	6.04	450000	5.65	0.39
Oストア	830000	5.92	1200000	6.08	-0.16
Fスー パー	810000	5.91	160000	5.20	0.71
平均	913333		603333		0.310 Mean Log Difference
標準偏 差	161967		536687		0.440 SD of Log Difference

3 n=number of
samples
 $t^*=d/(sd/\sqrt{n})$ Paired t-
 1.220 test
 4.303 t-test
 distribution
 2 自由度n-
 1

表 5

鶏挽肉の生菌数 -1-

	0.1%ペプトン 生食水		BPW		Log Difference	
Fスー パー	2000	3.30	6500	3.81	-0.51	
Oスト ア	79000	4.90	101000	5.00	-0.1	
K精肉 店	1700000	6.23	1400000	6.15	0.08	
平均	593667				-0.177	Mean Log Difference
標準偏 差	958886				0.302	SD of Log Difference
					3	n=number of samples
					1.039	Paired t- test

表 6

鶏挽肉の生菌数 -2-

	0.1%ペプト ン生食水		BPW		Log Difference	
T精肉 店	470000	5.67	710000	5.85	-0.18	
肉はM	2100000	6.32	1600000	6.20	0.12	
Pー コック	150000	5.18	160000	5.20	-0.02	
平均	906667				-0.027	Mean Log Difference
標準 偏差	1045769				0.150	SD of Log Difference
					3	n=number of samples
					0.311	Paired t-test

表 7

むきみあさりの生菌数

	生食水	2%APW		Log Difference		
A産	4800	3.68	6000	3.78	-1.00	
A産	8000	3.90	6500	3.81	0.09	
C産	3600	3.56	1900	3.28	0.28	
平均	5467				-0.210	Mean Log Difference
標準偏差	2274				0.691	SD of Log Difference
					3	n=number of samples
					0.526	Paired t-test

表 8

腸炎ビブリオ検出MPN値比較

	検体1	検体2
	MPN	MPN
3%食塩加PBS(-)	75/g	23/g
APW(2%食塩)	110/g	>110/g

表9

全卵液へのサルモネラの
接種実験

	BPW-PCR	RV-MLCB	RV-CHS	TT-MLCB	TT-CHS
BPW 添加剤入り対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+
BPW 対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+

1 群: 5 試料

*¹低菌数 5.3cfu/25g

Salmonella Enteritidis 接種

NC: No colony

表 10

卵黄液へのサルモネラの
接種実験

	BPW-PCR	RV-MLCB	RV-CHS	TT-MLCB	TT-CHS
BPW 添加剤入り対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+
BPW 対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+

1 群: 5 試料

*¹低菌数 8.6cfu/25g

Salmonella Enteritidis 接種

NC: No colony

表 11

白身液へのサルモネラの
接種実験

	BPW-PCR	RV-MLCB	RV-CHS	TT-MLCB	TT-CHS
BPW 添加剤入り対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+
BPW 対照群	—	NC	NC	NC	NC
低菌群* ¹	+	+	+	+	+

1 群: 5 試料

*¹低菌数 4.8cfu/25g

Salmonella Enteritidis 接種

NC: No colony

分担研究報告書（平成 20 年度）

大腸菌・大腸菌群（衛生指標菌）試験法に関する研究

研究分担者：伊豫田淳 所属：国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨：

食品衛生法で規定されている汚染指標菌（衛生指標菌）の検査法は長年改訂されていないために実際の検査にそぐわないものや、検査法間で整合性の取れないステップあることなどが指摘されている。さらに、国際的な標準法（FDA/BAM 法や ISO 法）との調和が取れていないことから、検査を行う現場で混乱が生じているのが現状である。本研究ではこれらの現状を改善するために、微生物標準法検討委員会における専門家による会議と衛生指標菌作業部会における検討を行った結果、今後規格が制定される食品からの衛生指標菌の試験法として、ISO 法を土台にした enterobacteriaceae、presumptive *Escherichia coli*、coliform の検査法の確立を今後の検討課題とすることとし、本研究では presumptive *Escherichia coli* について ISO 法に基づいた試験実施標準作業書原案の作成を行った。

協力研究者

泉谷秀昌（国立感染症研究所）

A. 研究目的

食品衛生法では「乳および乳製品の成分規格等に関する省令」および「食品、添加物等の規格基準」の中で、個々の食品中における一般生菌数（または総菌数）、大腸菌群、糞便系大腸菌群（イタリックでない *E. coli* と同義）の検出数または陰性が規定されており、個別の試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様なステップにおいても整合性が取れない作業手順のあることや、国際的な標準法である米国 FDA の BAM（Bacterial Analytical Manual）法や EU の ISO（International Organization for Standardization）法との調和が計れていない現状が指摘されている。さらに、食品衛生法では、衛生指標菌として上述した大腸菌群、糞便系大腸菌群が使用されているが、糞便系大腸菌群とは 44-45.5 度で発育可能な一群の

大腸菌群を指しているだけで、糞便汚染の可能性の有無とは関連性がない。衛生指標菌に含まれるこれらの用語の問題点についても統一した表記等を検討していく必要がある。本年度はこれらの問題点について整理し、それらについて外部専門家を含めた標準法検討委員会と衛生指標菌作業部会での議論を基に、これらの問題点を解決するための今後の研究方針について検討することを目的とした。

B. 研究方法

コーデックス委員会（消費者の健康の保護、食品の公正な貿易の確保等を目的として、1962 年に FAO 及び WHO により設置された国際的な政府間機関で、国際食品規格（コーデックス規格）の作成等を行っている（我が国は 1966 年より参加））では、リスク評価を基にした食品検査の規格基準作りが進行しており、その際の試験法は ISO 法となっている。従って、世界的な検査法の調和という

観点から、国内においても ISO 法に準じた検査法の作成が必要であり、本研究班においても ISO 法を基にした標準法作成を行うために必要な諸問題、対象項目、バリデーションの手法、現在の規格基準との整合性等についてその方針作成を行った。食中毒起因細菌の試験法に関する約 20 名の専門家からなる微生物標準法検討委員会と衛生指標菌作業部会における議論の結果を参考に、衛生指標菌作業部会において原案を策定することとした。

C. 研究結果試験法の対象項目

作業部会案として、enterobacteriaceae、presumptive *Escherichia coli*、coliform の試験法について試験実施標準作業書の提示を目指すこととした。基本的には ISO を和訳したものを基本にして試験法の原案を作成する。すでに存在する成分規格は食品安全委員会でしかるべき手順を踏まえた後でのみ変更可能であるため、これらの規格については現時点では ISO 法への移行は考えず、今後規格が検討される食品検査法のための標準法と位置づけることとした。以下に、presumptive *Escherichia coli* の試験実施標準作業書原案（定性法、MPN 法）について記した。

試験実施標準作業書

【ISO7251 : presumptive *Escherichia coli* の検出】

定性法

1 試験項目

presumptive *Escherichia coli*

2 試験品の種類

食品一般

3 試験法の出典と概要

(1) 出典

ISO7251 : 2005

(2) 概要

本作業書の試験法は、ISO7251 : 2005 で規定された試験法により、44°C でガス産生を伴う乳糖発酵をし、トリプトファンからインドールを生成するものを presumptive *Escherichia coli* として定義し、それを検出する。

4 培地・試薬等の選択及び調製方法

Merck、Oxoid 等、市販の粉末培地を処方に従って必要量調製する。（尚、以下に記載した培地名はメーカーの商品名である）

(1) 培地

ラウリル硫酸ブイヨン (Merck : 1.10266)

トリプトース 20.0g

乳糖 5.0g

塩化ナトリウム 5.0g

ラウリル硫酸ナトリウム 0.1g

リン酸水素 2 カリウム 2.75g

リン酸 2 水素カリウム 2.75g

精製水 1,000mL

pH6.8±0.2

倍濃度 : 71g を精製水に溶かし、ダーラム管入の大試験管に 10mL 分注して 121°C で 15 分間滅菌する。(注 1)

普通濃度 : 35.5g を精製水に溶かし、ダーラム管入の中試験管に 10mL 分注して 121°C で 15 分間滅菌する。(注 1)

EC ブイヨン (Merck : 1.10765)

カゼインペプトン 20.0g

乳糖 5.0g

胆汁酸塩混合物	1.5g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素 2 カリウム	4.0g
リン酸 2 水素カリウム	1.5g
精製水	1,000mL
pH	6.9±0.2

37g を精製水に溶かし、ダーラム管入の試験管に分注して 121°C で 15 分間滅菌する。(注1)

(2) 確認培地、試薬等

ペプトン水 (Oxoid : CM0009)	
ペプトン	10.0g
塩化ナトリウム	5.0g
精製水	1,000mL
pH	7.2±0.2

15g を精製水に溶かし、試験管に分注して 121°C で 15 分間滅菌する。

BPW (緩衝ペプトン水) (Merck : 1.07228)

ペプトン	10.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素 2 ナトリウム (20 水和物)	9.0g
リン酸 2 水素カリウム	1.5g
精製水	1,000mL
pH	7.2±0.2

25.5g を精製水に溶かし、121°C で 15 分間滅菌する。

Kovacs インドール試薬 (Merck : 1.09293)

使用方法はメーカー記載内容に従うこと。

5 試験に用いる機器・器具

(1) 使用する機器

- ① 汎用天秤
- ② 高圧滅菌器
- ③ 乾熱滅菌器
- ④ ふ卵器
- ⑤ 恒温水槽

- ⑥ ストマッカー
- ⑦ 試験管ミキサー
- ⑧ pH メーター

(2) 使用する器具

- ① 滅菌採取器具 (ハサミ、スパーテル、ピンセット、のみ等)
- ② 滅菌ストマッカー袋
- ③ 滅菌メスピペット 1mL、10mL
- ④ メスシリンダー
- ⑤ 中試験管 16mm 径
- ⑥ 大試験管 20mm 径
- ⑦ ダーラム管
- ⑧ 三角フラスコ又は耐熱瓶
- ⑨ 安全ピペッター
- ⑩ 白金耳 10μL 用

6 試験法

(1) 試料の調製

- ① 容器包装の表面をアルコール綿でよく拭き、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切した後、無作為に 25g を無菌的にストマッカー用滅菌袋にとる。(注2) (注3) (注4)
- ② 滅菌 BPW 225mL を加えた後、ストマッカーで 1 分間混合し均質にし、これを試料原液とする。この時の試料原液は 10 倍希釈となる。
- ③ 滅菌 BPW を用いて試料原液から 100 倍、以下必要に応じて 1,000 倍さらに段階希釈液を調製する。(注5) すなわち、試料原液の 1mL を滅菌 BPW9mL 入り中試験管に加えて試験管ミキサーでよく混合した後、その混合液の 1mL を新しい滅菌 BPW9mL に加えてよく混合して、順次目的の希釈率に

段階調製する。

(2) 試験手順 (フローチャート)

- ① 試料原液 10mL を滅菌ピペットで正確にとり、倍濃度のラウリル硫酸ブイオン3本に分注する。(注5)
- ② 試料原液及び各段階希釈液 1mL を滅菌ピペットで正確にとり、それぞれの段階ごとに普通濃度のラウリル硫酸ブイオン3本に分注する。(注5)
- ③ 37±1℃、24±2時間培養する。(注6)
- ④ ラウリル硫酸ブイオンでガスの発生又は濁り又はその両方(以下ガス発生・濁り)が認められた試験管について培養液の1白金耳をEC発酵管に接種し恒温水槽で44±0.5℃(注7)、24±2時間培養する。ガス発生・濁りがなければそのままさらに37±1℃、24±2時間培養し、ガス発生・濁りがあれば培養液の1白金耳をEC発酵管に接種し恒温水槽で44±0.5℃(注7)、24±2時間培養する。ラウリル硫酸ブイオンで37±1℃、48±2時間培養してガス発生・濁りがなければ陰性。
- ⑤ EC発酵管でガス発生・濁りがあれば培養液の1白金耳を44℃に保温したペプトン水に接種し、恒温水槽で44±0.5℃(注7)、48±2時間培養する。ガス発生・濁りがなければそのままさらに恒温槽で44±0.5℃(注7)で24±2時間培養し、ガス発生・濁りがあれば培養液の1白金耳を44℃に保温したペプトン水に接種し恒温水槽で44±0.5℃(注7)、48±2時間培養する。EC発酵管で44±0.5℃(注7)、48±2時間培養してガス発生・濁りがなければ陰性。(注8)

- ⑥ ペプトン水培地に0.5mLのKovacsインドール試薬を添加し、1分後に赤変すればインドール陽性(注9)

(3) 算定方法

定性試験のため 算出の必要なし。

7 試験により得られた値の評価方法

(1) 評価方法

① 培地対照試験

ピペット、滅菌BPW及び培地等が無菌であったこと、並びに操作が完全であったことを確認するために、試料液の代わりに希釈に用いた滅菌BPWを試料液と同様に滅菌シャーレに採り6(2)①以降の操作を同時に行う。

② 陰性対照試験

試験対象微生物を含まない試験品(試験対象微生物が検出されなかった試験品等を使用)を使用して、6(1)以降の操作を行う。

③ 陽性対照試験

試験対象微生物を含まない試験品に基準値程度の濃度となるよう標準菌株を添加・調製した試験品及び基準値の5分の1程度の濃度となるよう標準菌株を添加・調製した試験品を使用して、6(1)以降の操作を行う。

(2) 基準

加熱後摂取冷凍食品(凍結直前加熱以外のもの) 検体 0.01gにつき 陰性

加熱食肉製品(加熱後包装)

検体 0.1gにつき 陰性

乾燥食肉製品

検体 0.1gにつき 陰性

生食用食肉

検体 1gにつき 陰性

8 試験に当たっての注意事項

- (注 1) 滅菌後速やかに水冷し、ダーラム管に気泡が残らないようにすること
- (注 2) 複数の個体からなる試験品等、試験品量が多く、その全体の細切操作が困難な場合、試料がその試験品全体を代表するものとなるようにすること。
- (注 3) 試験に当たっては、微生物の二次汚染の起こらないように無菌的に取り扱い、速やかに実施すること。
- (注 4) 細菌学的検査は一回限りしか実施できないことを念頭に、細心の注意をもって行うこと。
- (注 5) 使用するピペットはそのつど新しい物を用いること。
- (注 6) 生の甲殻類の場合、 48 ± 2 時間まで培養してから判定すること。
- (注 7) $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の培養は恒温水槽を使用すること。
- (注 8) 生の甲殻類の場合、 24 ± 2 時間以内の培養で判定すること。他はガスの産生がなければ 48 ± 2 時間まで培養する。
- (注 9) EC ブイヨンガス発生、インドール試験陽性で presumptive *Escherichia coli* とする。

《推定試験》

試料原液の調製 検体 25g^(注2) ^(注3) ^(注4) +BPW 225mL ⇒ ストマッキング 1分間 (10⁻¹)

試料原液の接種 A : 試料原液 10mL + 倍濃度ラウリル硫酸ブイヨン 10mL…3本^(注5)
 B : 試料原液 1mL + 普通濃度ラウリル硫酸ブイヨン 10mL…3本^(注5)

培 養

37±1°C、24±2時間^(注6)

ガス(+)又は濁り(+)又は両方(+)

変化なし

ECに接種 44±0.5°C^(注7)、24±2時間^(注8)

37±1°C、24±2時間^(注6)

ガス(+) ガス(-)

ガス(+)又は濁り(+)又は両方(+)

変化なし

44±0.5°C^(注7)、24±2時間^(注8)

ECに接種 44±0.5°C^(注7)、24±2時間^(注8)

ガス(+) ガス(-)

ガス(+) ガス(-)

44±0.5°C^(注7)、24±2時間^(注8)

ガス(+) ガス(-)

確認試験

確認試験 陰性

確認試験

確認試験 陰性

陰性

《確認試験》

接種

ガス(+)のECから44°Cに保温したペプトン水に1白金耳接種する

培養

44±0.5°C^(注7)、48±2時間

判定

0.5mLのインドール試薬を加え1分後に赤変すれば陽性
 変化がなければ陰性^(注9)

試験実施標準作業書

【ISO7251 : presumptive *Escherichia*

coli の計測】

MPN 法

1 試験項目

presumptive *Escherichia coli*

2 試験品の種類

食品一般

3 試験法の出典と概要

(1) 出典

ISO7251 : 2005

ISO7218 : 2007 (算定法)

(2) 概要

本作業書の試験法は、ISO7251 : 2005 で規定された試験法により、44℃でガス産生を伴う乳糖発酵をし、トリプトファンからインドールを生成するものを presumptive *Escherichia coli* として定義し、それを検出し、MPN 法により算定する。

4 培地・試薬等の選択及び調製方法

Merck、Oxoid 等、市販の粉末培地を処方に従って必要量調製する。(尚、以下に記載した培地名はメーカーの商品名である)

(1) 培地

ラウリル硫酸ブイオン (Merck : 1.10266)

トリプトース 20.0g

乳糖 5.0g

塩化ナトリウム 5.0g

ラウリル硫酸ナトリウム 0.1g

リン酸水素 2 カリウム 2.75g

リン酸 2 水素カリウム 2.75g

精製水 1,000mL

pH6.8±0.2

倍濃度 : 71g を精製水に溶かし、ダーラム管入の大試験管に 10mL 分注して 121℃で 15 分間滅菌する。(注 1)

普通濃度 : 35.5g を精製水に溶かし、ダーラム管入の中試験管に 10mL 分注して 121℃で 15 分間滅菌する。(注 1)

EC ブイオン (Merck : 1.10765)

カゼインペプトン 20.0g

乳糖 5.0g

胆汁酸塩混合物 1.5g

塩化ナトリウム 5.0g

リン酸水素 2 カリウム 4.0g

リン酸 2 水素カリウム 1.5g

精製水 1,000mL

pH6.9±0.2

37g を精製水に溶かし、ダーラム管入の試験管に 10mL 分注して 121℃で 15 分間滅菌する。(注 1)

(2) 確認培地、試薬等

ペプトン水 (Oxoid : CM0009)

ペプトン 10.0g

塩化ナトリウム 5.0g

精製水 1,000mL

pH7.2±0.2

15g を精製水に溶かし、試験管に分注して 121℃で 15 分間滅菌する。

BPW (緩衝ペプトン水) (Merck : 1.07228)

ペプトン 10.0g

塩化ナトリウム 5.0g

リン酸水素 2 ナトリウム (20 水和物) 9.0g
リン酸 2 水素カリウム 1.5g
精製水 1,000mL
pH7.2±0.2

25.5g を精製水に溶かし、121°C で 15 分間滅菌する。

Kovacs インドール試薬 (Merck : 1.09293)
使用方法はメーカー記載内容に従うこと。

5 試験に用いる機器・器具

(1) 使用する機器

- ① 汎用天秤
- ② 高圧滅菌器
- ③ 乾熱滅菌器
- ④ ふ卵器
- ⑤ 恒温水槽
- ⑥ ストマッカー
- ⑦ 試験管ミキサー
- ⑧ pH メーター

(2) 使用する器具

- ① 滅菌採取器具 (ハサミ、スパーテル、ピンセット、のみ等)
- ② 滅菌ストマッカー袋
- ③ 滅菌メスピペット 1mL、10mL
- ④ メスシリンダー
- ⑤ 中試験管 16mm 径
- ⑥ 大試験管 20mm 径
- ⑦ ダーラム管
- ⑧ 三角フラスコ又は耐熱瓶
- ⑨ 安全ピペッター
- ⑩ 白金耳 10 μ L 用

6 試験法

(1) 試料の調製

- ① 容器包装の表面をアルコール綿でよく拭き、滅菌した器具を用

いて開封し、その内容の全体を細切した後、無作為に 25g を無菌的にストマッカー用滅菌袋にとる。(注2) (注3) (注4)

- ② 滅菌 BPW 225mL を加えた後、ストマッカーで 1 分間混合し均質にし、これを試料原液とする。この時の試料原液は 10 倍希釈となる。
- ③ 滅菌 BPW を用いて試料原液から 100 倍、以下必要に応じて 1,000 倍さらに段階希釈液を調製する。(注5) すなわち、試料原液の 1mL を滅菌 BPW9mL 入り中試験管に加えて試験管ミキサーでよく混合した後、その混合液の 1mL を新しい滅菌 BPW9mL に加えてよく混合して、順次目的の希釈率に段階調製する。

(2) 試験手順 (フローチャート)

- ① 試料原液 10mL を滅菌ピペットで正確にとり、倍濃度のラウリル硫酸ブイオン 3 本に分注する。(注5)
- ② 試料原液及び各段階希釈液 1mL を滅菌ピペットで正確にとり、それぞれの段階ごとに普通濃度のラウリル硫酸ブイオン 3 本に分注する。(注5)
- ③ 37±1°C、24±2 時間培養する。(注6)
- ④ 倍濃度のラウリル硫酸ブイオンでガス発生又は濁りが認められた試験管および普通濃度のラウリル硫酸ブイオンでガス発生が認められた試験管について、培養液の 1 白金耳を EC ブイオンに接種し恒温水槽で 44±0.5°C (注7)、24±2 時間培養する。ガス発生・濁りがなければそのままさらに 37±1°C、24±2 時間培養し、ガス発生・濁りがあれば培養液の 1 白金耳を EC

ブイヨンに接種し恒温水槽で $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (注7)、 24 ± 2 時間培養する。ラウリル硫酸ブイヨンで $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 48 ± 2 時間培養してガス発生・濁りがなければ陰性。

- ⑤ EC ブイヨンでガス発生があれば培養液の 1 白金耳を 44°C に保温したペプトン水に接種し、恒温水槽で $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (注7)、 48 ± 2 時間培養する。ガス発生がなければそのままさらに恒温槽で $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (注7) で 24 ± 2 時間培養し、ガス発生があれば培養液の 1 白金耳を 44°C に保温したペプトン水に接種し恒温水槽で $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (注7)、 48 ± 2 時間培養する。EC ブイヨンで $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (注7)、 48 ± 2 時間培養してガス発生がなければ陰性。(注8)

- ⑥ ペプトン水培地に 0.5mL の Kovacs インドール試薬を添加し、1 分後に赤変すればインドール陽性(注9)

(3) 算定方法 (ISO7218 : 1996)

各希釈段階の試験管で EC 発酵管でガス発生、インドール試験陽性となった本数を計測し、MPN 表に従って presumptive *Escherichia coli* の菌数を算定する。

7 試験により得られた値の評価方法

(1) 評価方法

① 培地対照試験

ピペット、滅菌 BPW 及び培地等が無菌であったこと、並びに操作が完全であったことを確認するために、試料液の代わりに希釈に用いた滅菌 BPW を試料液と同様に滅菌シャーレに採り 6(2)①以降の操作を同時に行う。

② 陰性対照試験

試験対象微生物を含まない試験品(試験対象微生物が検出されなかった試験品等を使用)を使用して、6(1)以降の操作を行う。

③ 陽性対照試験

試験対象微生物を含まない試験品に基準値程度の濃度となるよう標準菌株を添加・調製した試験品及び基準値の 5分の1程度の濃度となるよう標準菌株を添加・調製した試験品を使用して、6(1)以降の操作を行う。

(2) 基準

生食用かき

検体 100g につき 230 以下

非加熱食肉製品

検体 1g につき 100 以下

特定加熱食肉製品

検体 1g につき 100 以下

8 試験に当たっての注意事項

(注 1) 滅菌後速やかに水冷し、ダーラム管に気泡が残らないようにすること

(注 2) 複数の個体からなる試験品等、試験品量が多く、その全体の細切操作が困難な場合、試料がその試験品全体を代表するものとなるようにすること。

(注 3) 試験に当たっては、微生物の二次汚染の起こらないように無菌的に取り扱い、速やかに実施すること。

(注 4) 細菌学的検査は一回限りしか実施できないことを念頭に、細心の注意をもって行うこと。

(注 5) 使用するピペットはそのつど新しい物を用いること。

(注 6) 生の甲殻類の場合、 48 ± 2 時間まで培養してから判定すること。

(注 7) $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の培養は恒温水槽を使用すること。

(注 8) 生の甲殻類の場合、 24 ± 2 時間以内の培養で判定すること。他はガスの産生がなければ 48 ± 2 時間まで培養する。

(注 9) EC ブイヨンガス発生、インドール試験陽性で presumptive *Escherichia coli*とする。