

参考文献

- [1] ISO707/IDF 50 乳及び乳製品 サンプルングのガイダンス
- [2] ISO6887-1 食品及び動物飼料の微生物学—微生物学的試験のための試験検体、試料原液及び10倍階段希釈液の調製—パート1：試料原液及び10倍階段希釈液の調製のための一般的規則
- [3] ISO/TS11133-1 食品及び動物飼料の微生物学—培地の調製及び製造に関するガイドライン—パート1：試験所における培地調製のための品質保証の一般的ガイドライン
- [4] Guillaume-Gentil, O., Sonnard, V., Kandhai, M. C., Marugg, J. D., and Joosten, H. 環境検体からの *Enterobacter sakazakii* 検出のための、簡便で迅速な培養法 *Journal of Food Protection*, vol. 68, No. 1, 2005. p 64-69.

## 別添2

### BAM 法

#### 乳児用調製粉乳からの *Enterobacter sakazakii* の分離及び定量

2002年7月；2002年8月改定

背景:*Enterobacter sakazakii* は Enterobacteriaceae 科、*Enterobacter* 属に属するグラム陰性桿菌である。この菌は 1980 年に *Enterobacter sakazakii* と改名されるまでは、黄色色素産生 *Enterobacter cloacae* と呼ばれていた。Urmenyi と Franklin は、1961 年に *E. sakazakii* による最初に確認された髄膜炎の 2 症例を報告した (1)。続いて、*E. sakazakii* による髄膜炎、敗血症、壊死性腸炎が世界中から報告された。ほとんどの報告された症例は乳児のものであるが、成人の感染についても報告されている (2)。全体的に、致命率は大変ばらつきがあり、時には 80% もの高さになる。*E. sakazakii* の自然宿主は不明であるが、報告が多く見られることから、粉乳を元とする乳児用ミルクが感染を媒介していると示唆されている (3-5)。

#### A. 道具と材料

1. 45.5±0.2°C を維持できる循環システムのついた蓋付き恒温水槽。水位は中に入れた試験管の培地液面よりも上となるようにする。
2. National Institute of Standards and Technology (NIST) に認証された、55cm の長さで 1-55°C を測定できる、0.1°C の精度の浸水型温度計、または同等品
3. 35 から 37°C 及び 24 から 26°C の恒温槽
4. 0.1mL 目盛りの 1、5、及び 10mL のピペット
5. 直径 3 から 4mm で塗布面が 45 から 55mm のコンラージ棒(ホッケースティック)
6. 直径 3mm の白金耳
7. 精度 0.1g で 2kg まで計測可能な秤
8. 1.0 及び 10.0mL の目盛りつき滅菌ピペット
9. 検体を取り扱うための滅菌器具 (BAM 第 1 章参照)
10. ストッパー或いはテフロンの内張りつきポリエチレン製スクリュウキャップつき、160mL の容量硼酸シリカガラス製の希釈用瓶。
11. テフロンの内張りつきポリエチレン製スクリュウキャップのついた、滅菌済みエーレンマイヤーフラスコ。2L、250mL 及び 125mL の容量。滅菌済みプラスチック製品で代用可能。
12. テフロンの内張りがついたポリエチレン製スクリュウキャップつき滅菌ボトル。100mL の容量。滅菌済みプラスチック製品で代用可能。
13. ケベックコロニーカウンター、或いは同等品。拡大鏡つき。
14. API20E 生化学性状キット
15. プラスチックシャーレ。滅菌済み。15×150mm

#### B. 培地と試薬

1. トリプティケース (トリプティック) ソイ寒天 (BAM M152)。作製した培地は、2 から 8°C で 4 週間保存可能。
2. violet red bile glucose agar (VRBG agar): 培地成分を 1L の蒸留水に加え (色素類は 1% 水溶液を濾過滅菌する)、溶解するまでかき混ぜながら沸騰水中で加温する。この培地は、滅菌してはならない。45°C に冷却し、直径 15cm のシャーレに分注する。すぐに使用しない場合は、冷蔵庫で 5 から 8°C で保存する。この培地は、市販の乾燥粉末製品を使用できる (Oxoid, CM0485) ; 容器に記されている使用方法により作製する。作製した培地は、2 から 8°C で 4 週間まで保存可能である。

イーストエクストラクト	3.0g
ペプトン	7.0g
塩化ナトリウム	5.0g

胆汁酸塩 No. 3	1.5g
乳糖	10.0g
ニュートラルレッド	0.03g
クリスタルバイオレット	0.002g
寒天	15.0g
ブドウ糖	10.0g

3. *Enterobacteriaceae* 増菌培地 (EE プロス) : 極めて少数の衰弱した *Enterobacteriaceae* 菌体を阻害しないよう、精製された Ox-gall とブリリアントグリーンのみを使用する。組成を 1L の精製水に加え、沸騰水中で溶解する。90mL ずつ分注する。この培地は、市販の乾燥粉末製品を使用できる (Oxoid, CM0317) ; 容器に記載されている使用方法により作製する。完成した培地は、緑色を呈する。作製した培地は、2 から 8°C で 4 週間まで保存可能である。

ペプトン	10.0g
ブドウ糖	5.0g
リン酸 1 水素ナトリウム 2 水和物	8.0g
リン酸 2 水素カリウム	2.0g
Ox-gall	20.0g
ブリリアントグリーン	0.015g

#### 4. オキシダーゼ試験試薬 (BAM R54)

C. *E. sakazakii* の推定試験 : 推定法は、当該製品中の微生物菌量が少ないと思われる場合に行う 3 本法を基礎としている。

1. 検体の採取に先立ち、缶の蓋の周囲と、サンプリングに使う薬匙を滅菌する。MPN3 本法に従い、乳児用調製粉乳を 100g、10g 及び 1g を 3 組ずつ無菌的に採取する。それぞれ、2L、250mL 及び 125mL 容量のエーレンマイヤーフラスコに入れる。あらかじめ 45°C に加温した 9 倍量 (10 倍希釈となるように) の滅菌蒸留水を加え、粉末が均一に溶解するまで手で静かに攪拌する。図 1 参照。(注 : 簡便に実施するため、あらかじめ秤量し、45°C に加温した水を直接フラスコに加える。100mL のスクリーキャップつきボトルを 10g と 1g に使用してもよい。) 36°C で一夜培養する。

2. 160mL の滅菌ボトルに分注された 90mL の *Enterobacteriaceae* 増菌培地に各培養液から 10mL を採取し、加える。36°C で一夜培養する。

3. 各ボトルを静かに攪拌し、以下のように平板への塗布を行う。

a) 直接塗抹法 : 滅菌コンラージ棒を用いて、各増菌培養液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の VRBG 寒天平板に塗布する。(注 : 乳児用調製粉乳に多量の *E. sakazakii* が含まれていることが疑われる場合は、塗布前に培養菌液を滅菌済み EE プロスで  $10^{-4}$  から  $10^{-6}$  に希釈する。)

b) 直接画線法 : 直径 3mm の白金耳を用いて (約  $10 \mu\text{l}$ )、各増菌培養液をそれぞれ 2 枚の VRBG 寒天平板に、単一集落を形成するように少なくとも平板の 3/4 に広げて塗布する。

(注 : 画線に用いた平板は、集落が密になりすぎた場合のために予備として保存しておく。)

4. シャーレを 36°C で一夜培養する。*E. sakazakii* の典型的な集落形態を示すか否か、平板を観察する。

5. 上記の平板から、5 つの推定 *E. sakazakii* 集落を釣菌し、トリプティケースソイ寒天平板に継代する。25°C で 48 から 72 時間培養する。

6. TSA 平板から、黄色色素を呈する集落のみを選択し、API20E 生化学性状同定システムを製造者の指示書に従って使用して確認する。*E. sakazakii* 陽性確認には、オキシダーゼ試験が必須である (*Enterobacter* の菌の生化学性状 表 1 参照)。

7. MPN を算出する (BAM マニュアル、Appendix 2 ; 連続希釈からの最確数の算出) *E. sakazakii* の存在が

確認された各希釈の「試験管」本数に基づき、検体 g 当たりの MPN を算出する。

D. 典型的 *E. sakazakii* 集落の形態

- a). VRBG 寒天：典型集落は、胆汁酸由来の紫色のハローに囲まれた紫色の集落である。図 2 参照。
- b) TSA 寒天：典型集落は、25°C で 48 から 72 時間培養後にみられる黄色色素を呈する集落である。

E. 参考文献

1. Urmenyi, A. M. C. and Franklin, A. W. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1: 313-315.
2. Hawkins, R. E., Lissner, C. R. and Sanford, J. P. 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J* 84 (6): 793-795.
3. Simmons, B. P., Gelfand, M. S., Haas, M., Netts, L. and Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol* 10: 398-401.
4. van Acker, J., De Smet, F., Muyltermans, G., Bougatef, A., Naessens, A. and Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* 39: 293-297.
5. Biering, G., Karlsson, S., Clark, N. C., Jansdottir, K. E., Ludvigsson, P., and Steingrimsson, O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 27 (9): 2054-2056.
6. Food and Agriculture Organization. 1994. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 21-1979. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
7. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J Med Microbiol*. 48: 559-567.
8. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol*. 34: 103-113.
9. Muytjens, H. L., Roelofs-Willems, H., and Jaspar, G. H. J. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 26: 743-746.
10. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. 1997. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Lett Appl Microbiol*. 24: 9-13.
11. Muytjens, H. L., van der Ros-van de Ripe, J. and van Druten, H. A. M. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J Clin Microbiol* 20: 684-686.

表1. 参考文献8より *Enterobacter*種の生化学性状の相違<sup>a</sup>

試験		反応 <sup>b</sup>				
		<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
リジン脱炭酸		-	-	+	-	+
アルギニン加水分解		+	+	-	-	-
オルニチン脱炭酸		+	+	+	-	+
シアン化カリウム中での増殖		+	+	+	V	-
発 酵	シヨ糖	+	+	+	(+)	+
	ダルシトール	-	(-)	-	(-)	-
	アドニトール	-	(-)	+	-	-
	ラフィノース	+	+	+	V	+
	D-ソルビトール	-	+	+	V	-
	x-メチル-D-グルコシド	+	(+)	-	-	-
	D-アラビトール	-	(-)	+	-	+
黄色色素		+	-	-	(+)	-

<sup>a</sup>Farmer and Kelly, 1992 より転載

<sup>b</sup> + : 90 から 100%が陽性、(+): 75 から 89%が陽性、v : 25 から 74%が陽性、(-) : 10 から 24%が陽性、- : 0 から 9%が陽性

## フロー図

### 検体調製・前増菌

100g、10g、1g の試験画分を各 3 組秤量し、それぞれ 2L、250mL、125mL のフラスコに入れる

↓

あらかじめ 45°C に加温した 9 倍量の滅菌蒸留水を加える

↓

36°C で一夜培養する

↓

### Enterobacteriaceae 増菌培地での選択増菌

160mL の滅菌ボトルに分注された 90mL の *Enterobacteriaceae* 増菌培地に 10mL の前増菌液を接種する

↓

36°C で一夜培養する

↓

### VRBG 培地での分離

培養した増菌培地を静かに攪拌する。

↓

培養液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の VRBG 培地に塗布する

(2) 各増菌培養液 1 白金耳ずつをそれぞれ 2 枚の VRBG 培地に画線培養する

↓

36°C で一夜培養する

↓

5 つの推定 *Enterobacter sakazakii* 集落 (紫色のハローに囲まれた紫色の集落) を釣菌し、トリプティケース  
ソイ寒天に継代する

↓

25°C で 48 から 72 時間培養する

↓

### 確認試験：黄色色素の産生

↓

### 確認試験：生化学性状

黄色集落を選択し、API20E にて確認する

↓

MPN の算出

(1) 各増菌

別添 2.

資料 5 :  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法 (和訳)

国際規格 ISO 16649-2 食品及び動物飼料の微生物学— $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法—第2部, 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

まえがき

ISO (国際標準化機構) は、各国の標準化機関 (ISO 加盟団体) の国際的な連合体である。通常、国際規格の策定作業はISO 専門委員会を通じて行われる。専門委員会が設置されている特定の課題に関心のある各加盟団体は、その委員会に代表を派遣する権利を有する。国際機関も、政府機関であれ非政府機関であれ、ISO と連携して作業に参加することができる。ISO は、電気技術の標準化に関するあらゆる問題について、国際電気標準会議 (IEC) と密接に協力する。国際規格の原案は、ISO/IEC 指令パート3に規定された規則に従って作成される。

専門委員会が採択した国際規格案は、投票のため各加盟団体に配布される。

国際規格として公布されるには、投票する加盟団体の少なくとも75 %による承認を要する。本規格の一部の要素は特許権の対象となる可能性があるという点に注意すること。ISO は、そのような特許権の一部又はすべてを特定する義務を負わない。

国際規格ISO 16649-2 は、専門委員会ISO/TC 34「食品」、分科委員会SC 9「微生物」により策定されたものである。

ISO 16649 は、食品及び動物飼料の微生物学— $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法 という標題のもと、以下の部分から構成される。

- 第1部: メンブレンフィルター及び5-ブロモ4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニドを用いた

44°Cにおける集落計数法

- 第2部: 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

- 第3部: 最確数法

序文

食品及び飼料製品は実に多種多様であるため、特定の製品については、この一般試験法があらゆる詳細な点で適切というわけではない可能性もある。そのような場合、正当な技術的理由により不可欠であれば、当該製品に特異的な、異なる方法を用いることもできる。それでも、可能な限りこの一般試験法を適用するよう最大限の努力を払うべきである。

本規格が次に見直しされる際には、この一般試験法がどの程度順守されてきたかに関する、また特定製品に関しては本法から逸脱した理由に関する、その時点で利用できるあらゆる情報が考慮に入れられる。

試験方法の調和は即時に達成できるわけではない。また、特定の製品グループについては、この一般試験法に適合しない国際規格及び/又は国家規格がすでに存在している可能性もある。そのような基準が再検討される際に本規格に適合するよう変更され、最終的にこの一般試験法から逸脱した基準として残るのは、十分に確立された技術的理由のゆえに必要とされ

るものだけとなることが期待される。

本国際規格は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための2つの一般試験法（ISO 16649-1 及びISO 16649-2）について説明している。使用者は、ISO 16649-1 かISO 16649-2 のいずれかを選ぶことができる。両規格とも一般的な事例に適用することができるが、大きなストレスを受けた大腸菌細胞を含む食品には、ISO 16649-1 を使用すべきである。

食品及び動物飼料の微生物学— $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法

—

第2部：

5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニドを用いた44°Cにおける集落計数法

### 1 適用範囲

本規格は、ヒトによる摂取及び動物への給餌を目的とした製品における $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数のための一般試験法を定めるものである。この方法では、 $\beta$ -グルクロニダーゼ酵素検出用の発色成分を含有する固形培地を用いた44°Cにおける集落計数法を採用している。警告—44°Cで発育しない大腸菌の菌株、特に大腸菌0157 など $\beta$ -グルクロニダーゼ陰性の菌株は検出されない。

### 2 引用規格

以下に示す規格文書には、本文中で引用されており、本規格の一部を構成する規定が含まれている。日付が付された参考文献については、その後に行われた修正又はそれらの文献の改訂版は適用されない。しかしながら、本規格に基づき合意した関係者には、以下に示す規格文書の最新版を適用する可能性について検討するよう勧められている。日付が付されていない参考文献については、参照されている規格文書の最新版が適用される。ISO 及びIEC の加盟国は、現在有効な国際規格の登録リストを維持する。

ISO 6887-1、食品及び動物飼料の微生物学—微生物試験のための試料、試料原液及び10 倍段階希釈液の調製—第1 部：試料原液及び10 倍段階希釈液の調製に関する一般規則

ISO 7218、食品及び動物飼料の微生物学—微生物試験に関する一般規則

### 3 用語及び定義

本規格の目的においては、以下の用語と定義を適用する。

#### 3.1

$\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌

本規格に定める条件下で、44°Cにおいてトリプトン胆汁酸X グルクロニド培地（TBX）上に典型的な

青色の集落を形成する細菌

#### 3.2

$\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の計数

本規格に従って試験及び計算を実施した場合の、試料1 ml あたり又は1 g あたりの $\beta$ -グルクロニ



## ダーゼ陽性大腸菌の集落数 (CFU) の測定

### 4 原理

4.1 トリプトン胆汁酸X グルクロニド培地 (TBX) の2枚の平板に、所定量の試料又は試料原液を接種する。同じ条件下で、試料又は試料原液の10倍段階希釈液を用いて、各希釈液を2枚の平板に接種する。平板を $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で18~24時間培養した後、 $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の特徴的な集落の有無を調べる。

4.2 試料1 g あたり又は1 ml あたりの $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の集落数 (CFU) を算出する (第10項参照)。

### 5 希釈水及び培地

最新の試験所規範については、ISO 7218を参照のこと。

#### 5.1 希釈水

ISO 6887-1、又は試験する製品を対象とした特定の国際規格を参照のこと。

#### 5.2 培地：トリプトン胆汁酸Xグルクロニド培地 (TBX)

##### 5.2.1 組成

カゼイン酵素消化物 20.0 g

胆汁酸塩 No. 3 1.5 g

5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸 (BCIG) 144  $\mu\text{mol}$  a

ジメチルスルホキシド (DMSO) b 3 ml

寒天 9 g~18 g c

精製水 1000 ml

a 例えば、シクロヘキシルアンモニウム塩 0.075 g

b ジメチルスルホキシドは吸入及び接触により有害である。

c 寒天のゲル強度に依存する。

##### 5.2.2 調製

BCIG を、ジメチルスルホキシド又はメーカーが推奨する希釈液に溶解する。すべての成分を溶かし、加熱して沸騰させる。

必要であれば、 $25^{\circ}\text{C}$ における滅菌後のpH が $7.2 \pm 0.2$ となるように調整する。

$121^{\circ}\text{C}$ に設定したオートクレーブ内で15分間滅菌する。ただちに培地を $44^{\circ}\text{C} \sim 47^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽 (6.3) に入れて冷ます。

### 6 装置及びガラス器具

通常の微生物試験用装置 (ISO 7218参照)、特に以下のものを使用する。

6.1 乾熱滅菌 (オーブン) 又は湿熱滅菌 (オートクレーブ) 用の装置

6.2 恒温器： $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で稼働できるもの。

6.3 恒温水槽： $44^{\circ}\text{C} \sim 47^{\circ}\text{C}$ の間に維持できるもの。

6.4 試験管、フラスコ又は瓶：適切な容量のもの。

6.5 先端目盛 (吹き出し) ピペット又はマイクロピペット：開口部が広く、公称容量が1 ml 及び10 ml で、それぞれ0.1 ml と0.5 ml 区切りの目盛りが付いたもの。

6.6 ペトリ皿：直径約90 mmのもの。

6.7 pHメーター：精度が0.1 pH単位のもの。

pHメーターの最小測定単位は0.01 pHとする。pHメーターは、手動又は自動の温度補正機能を備えていること。

## 7 検体の採取

試験室は、輸送又は保存中に損傷又は変化していない、真に製品を代表する検体を受け取ることが重要である。

検体の採取は、本規格に定める方法には含まれていない。当該製品の検体採取を扱った特定の国際規格がない場合は、この問題について関係当事者間で合意を得ることが推奨される。

## 8 検体の調製

当該製品に適切な特定の国際規格に従って検体を調製すること。特定の国際規格がない場合は、この問題について関係当事者間で合意を得ることが推奨される。

## 9 手順

### 9.1 試験、試料原液及び希釈液

ISO 6887-1、及び当該製品に適切な他の特定の国際規格を参照のこと。

### 9.2 接種及び培養

9.2.1 滅菌したピペット又はマイクロピペット (6.5) を用いて、滅菌ペトリ皿 (6.6) に検体 (液体の場合) 1 ml を、その他の製品の場合は試料原液 (10<sup>-1</sup>) 1 ml を分注する。

各希釈液を2枚の平板に接種する。

必要であれば、10倍段階希釈液を調製し、希釈液ごとに新しい滅菌ピペットを用いてこの手順を繰り返す。

9.2.2 各ペトリ皿に、あらかじめ恒温水槽 (6.3) 内で44℃～47℃に冷ましたTBX 培地 (5.2) 約15 ml を注ぎ入れる。

試料液を培地と注意深く混ぜ合わせた後、ペトリ皿を冷えた水平面に静置して培地を凝固させる。

試料液をペトリ皿に分注してから培地を注ぎ入れるまでの経過時間は、15分を超えてはならない。

9.2.3 接種したペトリ皿 (9.2.2) を倒置し、44℃に設定した恒温器 (6.2) で18～24時間培養する。

培養時間は24時間を超えてはならない。

警告—ストレスを受けた大腸菌細胞の存在が疑われる場合、まず37℃で4時間、次いで培養温度を44℃に上げて18～24時間培養する。培養温度は45℃を超えてはならない。

### 9.3 集落の計数

指定時間培養 (9.2.3) した後、典型的集落数が150個未満かつ総 (典型的及び非典型的) 集落数が300個未満の各ペトリ皿における、β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の典型的集落を計数する。それらが該当するペトリ皿の一部である場合、第10項に記載の種々の計算方法において、典型的集落数が0個のペトリ皿を考慮に入れるべきである。

## 10 結果の表示

### 10.1 一般規定

10.2 の計算は、GLP に従って試験を実施する際に最も頻繁に遭遇する事例を考慮に入れたものである。何らかの特別な、ほとんど起こりそうもない事例が生じる可能性もある（例：同じ希釈液から調製した2枚のペトリ皿で集落数が大きく異なる、あるいは2つの連続した希釈液における希釈係数の比率と集落数の比率が大きく異なる）。その場合、計数結果を調べ、検討する必要がある、権限を有する微生物学者により却下される可能性もある。

### 10.2 計算

結果が有効であるためには、青色の集落を最低15個含む少なくとも1枚のペトリ皿で生菌数を計数する必要があると一般に見なされている。

検体中に存在する1 ml あたり又は1 g あたりのβ-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数 (N) を、2つの連続した希釈液の加重平均として、次の方程式を用いて計算する。

(1)

ここで

$\Sigma a$  2つの連続した希釈液に該当する、すべてのペトリ皿（そのうち少なくとも1枚が最低15個の青色集落を含む）で計数した集落の総数

$n_1$  最初の希釈液に該当するペトリ皿の枚数

$V$  各ペトリ皿に接種した試料液の容量 (ml)

$n_2$  2段階目の希釈液に該当するペトリ皿の枚数

$d$  該当する最初の希釈液に対応する希釈係数 [直接接種された検体が該当する場合 (液体製品) は  $d = 1$ ]

結果を有効数字2桁に四捨五入する (ISO 7218参照)。

計算結果として、1 ml あたり (液体製品) 又は1 g あたり (その他の製品) のβ-グルクロニダーゼ陽性大腸菌数を取り、有効数字2桁 (100個未満の場合) の整数、又は1.0~9.9に適切な10の累乗を掛けた数で表す。

### 10.3 低菌数の推定

10.3.1 2枚のペトリ皿が [検体の (液体製品)、又は試料原液の (その他の製品)、あるいは最初に接種された又は該当する希釈液のレベルで] 15個未満の青色集落を含んでいる場合、検体中に存在するβ-グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数 ( $N_E$ ) を、2枚の平板の算術平均として、次の方程式を用いて計算する。

(2)

ここで

$\Sigma c$  2枚のペトリ皿で計数した青色集落数

$V$  各ペトリ皿に接種した試料液の容量 (ml)

$n$  該当するペトリ皿の枚数 (この場合は  $n = 2$ )

$d$  試料原液の、あるいは最初に接種された又は該当する希釈液の希釈係数 [直接接種された検体が該当する場合 (液体製品) は  $d = 1$ ]

計算結果を有効数字2桁に四捨五入する (ISO 7218参照)。

結果を次のように表示する。

- 1 mlあたり（液体製品）又は1 gあたり（その他の製品）の  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の推定菌数： $N_E = Y$

10.3.2 2枚のペトリ皿に、検体（液体製品）の、あるいは最初に接種された試料原液（その他の製品）の、又は該当する希釈液のレベルで青色集落が含まれていない場合、結果を次のように表示する。

-  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 mlあたり（液体製品）又は1 gあたり（その他の製品）1/d未満ここで、d は試料原液の、あるいは最初に接種された又は該当する希釈液の希釈係数である〔直接接種された検体が該当する場合（液体製品）は  $d = 1$ 〕。

10.3.3 最初の希釈液  $d_1$ を接種した2枚のペトリ皿では、目に見える青色集落を伴う青色及び非典型的集落の総数が300個を超え、かつ次の希釈液 $d_2$ を接種した2枚のペトリ皿では、総数が300個未満ではあるが計数できる青色集落がない場合、結果を次のように表示する。

-  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 mlあたり（液体製品）又は1 gあたり（その他の製品） $1/d_2$ 未満かつ $1/d_1$ を超える

ここで、 $d_1$ と $d_2$ は希釈液 $d_1$ と $d_2$ に対応する希釈係数である。

10.3.4 最初の希釈液  $d_1$ を接種した2枚のペトリ皿では、目に見える青色集落を伴わずに典型的及び非典型的集落の総数が300個を超え、かつ次の希釈液 $d_2$ を接種した2枚の皿では、総数が300個未満であるが計数できる青色集落がない場合、結果を次のように表示する。

-  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 ml（液体製品）あたり又は1 gあたり（その他の製品） $1/d_2$ 個未満

ここで、 $d_2$ は希釈液  $d_2$ に対応する希釈係数である。

#### 10.4 計算方法：特別な事例

10.4.1 最初の希釈液  $d_1$ を接種した2枚のペトリ皿で青色集落数が150個を超え、かつ次の希釈液 $d_2$ を接種した2枚のペトリ皿では青色集落数が15個未満の場合は、

- 希釈液  $d_1$ を接種した2枚のペトリ皿のそれぞれで青色集落数が150～167個（150個に相当する加重平均の上部の信頼区間）の範囲内であれば、一般的事例の計算方法（10.2）を使用し、
- 希釈液  $d_1$ を接種した2枚のペトリ皿のそれぞれで青色集落数が167個（150個に相当する加重平均の信頼区間の上限）を超えるのであれば、希釈液  $d_2$ の計数結果のみを考慮し、低菌数計数（10.3）を実施する。

10.4.2 青色集落の計数が、どの希釈液を接種されたペトリ皿でも150個を超える数値を示す場合、結果を次のように表示する。

-  $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は1 ml（液体製品）あたり又は1 gあたり（その他の製品） $150/d$ 以上ここで、d は最後に接種された希釈液の希釈係数である。

10.4.3 希釈倍率が最低の（濃度が最高の）希釈液を接種した2枚のペトリ皿のみが典型的集落150個未満を含む場合、検体中に存在する $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の生菌数（ $N'$ ）を、2枚のペトリ皿で計数した集落の算術平均として、次の方程式を用いて計算する。

(3)

ここで

$\Sigma c$  2枚のペトリ皿（そのうち少なくとも1枚は15個の典型的集落を含む）で計数した青色集落の総数

V 各ペトリ皿に接種した試料液の容量 (ml)

n 該当するペトリ皿の枚数（この場合は  $n = 2$ ）

d 該当する希釈液に対応する希釈係数

計算結果を有効数字2桁に四捨五入する（ISO 7218参照）。

#### 10.5 信頼限界

ISO 7218を参照。

#### 11 試験報告書

試験報告書には以下の点を明記すること。

- 検体の識別に必要とされるあらゆる情報
- 使用した検体採取方法（分かっている場合）
- 使用した試験方法（本規格を参照する）
- 本規格に明記されていない、又は任意と見なされている操作上の詳細、及び試験結果に影響を及ぼした可能性がある出来事に関する詳細
- 得られた結果（使用した表示方法を明記する）
- 併行精度を確認した場合、得られた最終結果

