

この培地を保存する場合は、密閉容器に入れて冷蔵庫に収める。

この培地は、調製後96時間以内に使用する。

(2) インドキシル-β-D-グルコシド溶液

インドキシル-β-D-グルコシド0.060gを滅菌精製水8mlで溶かしたもの

この溶液は、使用の都度調製する。

(3) フェノールフタレインニリン酸塩溶液

フェノールフタレインニリン酸塩0.50gを精製水100mlで溶かした後、高圧蒸気滅菌したもの

(4) 塩化第二鉄溶液

塩化第二鉄(6水塩)4.5gを精製水100mlで溶かした後、ろ過除菌したもの

(5) アンモニア水(25%～30%)

## 2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(3) 疎水格子フィルター

第1の2(3)の例による。

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

第1の2(4)の例による。

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

第1の2(6)の例による。

(7) メンブランフィルターろ過装置

第1の2(7)の例による。

(8) メンブランフィルター用ペトリ皿

第1の2(8)の例による。

(9) 嫌気ジャー

(10) 恒温水槽

水温を44.8～45.2℃に保持できるもの

(11) 恒温器

第1の2(13)の例による。

## 3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

## 4 試験操作

(1) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

### (3) 培養操作

疎水格子フィルターろ過装置又はメンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、メンブランフィルター又は疎水格子フィルターのろ過面を上にして、気泡が入らないようにM-C P寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れ、恒温水槽に沈め、44.8～45.2℃で18～24時間培養する。

培養後、直径1mm以上の不透明な青～黄色集落をマークした後、フィルター上の集落をアンモニア蒸気に20～30秒接触させ、直ちに集落の色調を観察する。このとき、マークしたもののうち、アンモニア蒸気の接触によりピンク色～赤色(紫色は除く)に変色したものをウェルシュ菌芽胞と判定する。

## 5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落を計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

## 第3 D R C (Differential Reinforced Clostridial)培地法

### 1 培地及び試薬

#### (1) 標準濃度D R C基礎培地

少量の精製水を用いて溶性デンプン1.0gをスラリー状とし、沸騰した精製水180mlを加え、かき混ぜて溶かし、このデンプン溶液をペプトン10g、粉末酵母エキス1.5g、肉エキス10g、酢酸ナトリウム(3水塩)5.0gを溶解した混合液に加え、全量を1Lとし、加熱溶解後、ブドウ糖1.0gとL-システイン0.50gを加えて溶かし、滅菌後のpH値が7.1～7.2になるように調整した後、ねじ口瓶100mlに100mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

#### (2) 2倍濃度D R C基礎培地

標準濃度D R C基礎培地の各成分の2倍量を精製水1Lを用いて(1)と同様に調製した後、ねじ口瓶25mlには1mlずつ又は10mlずつ、ねじ口瓶100mlには50mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

#### (3) 1ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.04mlを2倍濃度D R C基礎培地1mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

#### (4) 10ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.4mlを2倍濃度D R C基礎培地10mlに無

菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(5) 50ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを2倍濃度D R C基礎培地50mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(6) 標準濃度D R C培地

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを標準濃度D R C基礎培地100mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(7) リトマス牛乳培地

生牛乳では15分間煮沸、氷室に一夜静置した後、上に浮いたクリームを捨てたもの、脱脂粉乳では20gを温精製水180mlで溶かしたものに、リトマス溶液を青紫色を呈するように加え、液層の高さが4cm程度になるように試験管に分注し、間欠滅菌したもの

(8) 亜硫酸ナトリウム溶液

亜硫酸ナトリウム4.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(9) クエン酸第二鉄溶液

クエン酸第二鉄7.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(10) 亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液

亜硫酸ナトリウム溶液とクエン酸第二鉄溶液を等量ずつ、無菌的に混合したもの  
この溶液は、使用の都度調製する。

(11) リトマス溶液

リトマス1gを精製水10mlに溶かしたもの

## 2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) ねじ口瓶：容量25ml及び100mlのもの。

(3) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(4) 白金線又は白金耳

(5) 恒温器

温度を35～37℃に保持できるもの

## 3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

## 4 試験操作

(1) 定性試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 培養操作

加熱処理した検水50mlを50ml用DRC培地1本に接種する。次いで、標準濃度DRC培地をねじ口瓶の首上端まで満たす。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

(2) 定量試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

(c) 培養操作

加熱処理した検水は、10ml用DRC培地5本に10mlずつ、1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、各段階の希釈検水は、それぞれ1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、標準濃度DRC培地を瓶の首上端まで満たす。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

## 5 菌数の算出

各希釈段階の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

## 別添3 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法

### 概 要

本試験方法は水中に存在するクリプトスポリジウムのオーシストを精製・濃縮し、蛍光抗体染色により検出するためのものである。試験はオーシストの捕捉・濃縮、選択的な分離・精製、蛍光抗体染色、顕微鏡観察の諸工程からなり、顕微鏡下で蛍光を発する粒子の寸法、外部、内部形態に基づいてオーシストを検出・計数する方法である。

#### 留意事項

一般に、水源水、水道原水、沈殿水等には多種多様の無機物、有機物、微生物等が存在している。水道水中にもその一部や浄水用薬品の反応生成物等が混入している。試料によっては、それらの物質がクリプトスポリジウムオーシストの検出を妨害することがある。特に、一部の藻類は大きさ、形態等がオーシストに酷似しており、それらが蛍光抗体試薬と交叉反応などにより偽陽性を示し、オーシストとの判別が困難となることが知られている。

本試験方法の作成に当たっては、使用可能と考えられる複数の方法について併せて採用することとし、

- 2 水試料からの懸濁粒子の捕捉・濃縮については、
  - 2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法
  - 2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法
  - 2.3 親水性 PTFE メンブレンフィルター法
  - 2.4 その他の捕捉・濃縮法
    - 2.4.1 ポリカーボネートメンブレンフィルター法
    - 2.4.2 カートリッジフィルター法
    - 2.4.3 遠心沈殿法
- 3 オーシストの選択的な分離・精製については、
  - 3.1 密度勾配遠沈法(浮遊法)
  - 3.2 免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)
- 4 蛍光抗体染色については、
  - 4.1 直接蛍光抗体染色法
  - 4.2 間接蛍光抗体染色法

を並列的に記載した。また、以下の項目を付記した。

付録1 精度管理のためのオーシスト添加実験

付録2 顕微鏡の取扱い

付録3 顕微鏡観察における蛍光フィルター選択と観察上の注意

[参考] 検査室におけるクリプトスポリジウムの感染防止方法

このうち、「標準的方法」(2.1、2.2又は2.3と、3.1及び4.1等を組み合わせた方法)については、すべての試験操作等を確定的に記述した。しかしながら、検出の原理を損なわず、かつ回収率を損なわないことが確実であるか、あるいは一層の改善が得られることが