

## [原 著]

長時間加圧 Brain Heart Infusion 培地を用いた腸管出血性大腸菌  
O157:H7 の迅速 H 型別法青木日出美<sup>1),\*</sup>・山崎 貢<sup>2),\*</sup>・林 智子<sup>1)</sup>・巽 則雄<sup>3)</sup>・服部 悟<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 愛知県衣浦東部保健所<sup>2)</sup> 愛知県一宮保健所<sup>3)</sup> 安城更生病院

(平成24年8月3日受付, 平成24年10月16日受理)

大腸菌の鞭毛抗原の血清型 (H 血清型) は, 一般的には試験菌を 3~5 回半流動培地を通過させて運動性を増強後, プイヨン培養し, これを 1% ホルマリン加生理食塩水で固定した H 抗原液と免疫血清を用いて凝集反応を行い決定する (以下, 従来法)。われわれは, 長時間加圧滅菌した Brain Heart Infusion (BHI) 培地で腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) O157:H7 を培養すると菌の運動性が著しく増強される現象を見だし, さらに本現象を応用して EHEC O157 の H7 抗原を短期間に検出できる血清型別法 (以下, 迅速 H 型別法) を開発した。迅速 H 型別法は煩雑な継代培養を必要とせず, 121°C, 120 分加圧処理した BHI 培地で 6 時間, もしくは 24 時間培養するだけで H 抗原液を調製できる。迅速 H 型別法により 88 株の EHEC O157:H7 を検査した結果, うち 85 株 (97%) を 1~2 日で H7 に型別できた。残り 3 株は迅速 H 型別法で型別できなかったが, これら 3 株は従来法において継代培養を 6 回以上 (培養 2 週間以上) も必要とする運動性微弱株であった。今回開発した迅速 H 型別法は, 検査期間を大幅に短縮 (5~7 日を 1~2 日) 可能であるうえ H 血清の使用量を約 30% 削減できるので臨床微生物検査における活用が期待される。

**Key words:** 腸管出血性大腸菌 O157, 鞭毛抗原, H 血清型別, 迅速検査法, Maillard 反応

## 序 文

ベロ毒素を産生する大腸菌である腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) はヒトに腹痛, 下痢, 血便などを起こす<sup>1)</sup>。重症例では溶血性尿毒症症候群, けいれんや意識障害を伴う脳症を合併し, 時には死亡することがある<sup>1)</sup>。検査室で EHEC と疑われる大腸菌を検出した場合は, 感染症発生動向調査事業に規定されているベロ毒素産生性と毒素型の確認, それに菌体抗原である O 血清群および鞭毛抗原である H 血清型を決定する<sup>2)</sup>。

国立感染症研究所感染症情報センターが発行している病原微生物検出情報 (IASR)<sup>3)</sup>を見ると, 2011 年に地方衛生研究所から報告された EHEC 事例の約 6 割は O157 (1,296 例) による事例であり, このうち O157:H7 が 72.8% (944 例), O157:H21 が 0.1% (1 例), 非運動性の O157:HNM が 5.9% (76 例) を占め, 残り 21.2% (275 例) は H 型別不能もしくは H 型別未実施の H 型不明事例であった。H 型不明事例が多いことの原因には, 診断血清のコスト<sup>4)</sup>のほか, 煩雑な H 型別法<sup>4)</sup>がかかわっており, 特にクレイギー管を入れた半流動培地中を 3~5 回通過させる運動性の増強操作が検査室の負担となっている。

われわれは, 検査室のデシケーター内に室温で長期保管してあった Brain Heart Infusion (BHI) 培地と新しいロットの BHI 培地を用いて, EHEC O157:H7 の H 抗原液を調製し H 型別したところ, 予期に反し, 古いロットの BHI 培地で培養したほうが新しいロットよ

著者連絡先: (〒448-0857) 愛知県刈谷市大手町 1 丁目  
12 番地  
愛知県衣浦東部保健所 試験検査課  
青木日出美  
TEL: 0566-21-4778  
FAX: 0566-25-1470

\* Co-first authors

りも H7 血清に強く凝集することを認めた。Maillard 反応 (もしくは褐変反応)<sup>5)</sup> と呼ばれるアミノ酸と糖の縮合反応が培地の保管中に徐々に進行し EHEC O157 の H 型別成績および運動性に影響した可能性が考えられたので、長時間加圧により同反応を強く起こさせた BHI 培地 (長時間加圧培地) を調製し、これを用いて EHEC O157: H7 を 37°C、4 時間培養後に鏡検したところ、通常の BHI 培地では静止菌に混じったわずかな菌体が弱く運動しているのに対して、長時間加圧培地では半数以上の菌体が活発に運動していることを観察した。

そこで、今回見いだした現象を応用することにより、EHEC O157: H7 の H 型別を簡単かつ短期間に検査できる迅速 H 型別法を開発したので報告する。

## 材料および方法

### 1) 供試株

愛知県内で分離された患者 90 名および接触者 12 名に由来する 102 株の EHEC O157 (うち、H7 型 88 株、非運動性 (HNM) 14 株)、および EHEC とはカテゴリーが異なる毒素原性大腸菌 (ETEC) (血清型 O159: H7) 1 株、それに非病原性大腸菌 (血清型 O1: H7) 1 株の合計 104 株を用いた。迅速 H 型別法の条件の検討には 88 株の O157: H7 のうち、運動性の強い 157-02 株と運動性の弱い 157-78 株の 2 株を用いた。

### 2) 運動性増強培地

菌株の運動性を増強させるための培地には BHI を用いた。表 1 に、使用した 5 種類の BHI 培地 (栄研化学 (以下、Eiken)、日水製薬 (以下、Nissui)、Oxoid、Difco、BBL) の主要成分を示した。5 種類の BHI 培地はそれぞれ使用書に示された 15 分間加圧滅菌した BHI 培地のほかに、著者らが独自に考案した 120 分と 180 分の長時間加圧処理 (prolonged autoclave treatment:

PAT) により調製した BHI 培地を実験に供した。BHI 培地の加圧滅菌は、特定 1 台のオートクレーブ (BS-245 TOMY) を用いて 121°C (約 110 kPa) で行った。

### 3) H 型別血清

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) (以下、免疫血清) を用いた。

### 4) 運動性増強能の評価

各種 BHI 培地における O157: H7 の運動性は、0.3% 寒天平板上の発育円の大きさを指標として評価した。0.3% 寒天平板は、PBS に 0.002% ニュートラルレッドと 0.3% Bact agar (Difco) を加えて、溶解・滅菌後、直径 90 mm のシャーレに 10 ml ずつ分注して作製した。試験株 157-02 株を 15 分、120 分および 180 分加圧処理した 5 社の BHI 培地にそれぞれ接種し、37°C で 1 時間培養後、その培養液 50  $\mu$ l を吸収させた滅菌円形ろ紙 (直径 10 mm、厚さ 1.1 mm、Advantec) を 0.3% 寒天平板上に置き 37°C 5 時間培養した。発育円の直径をノギスで測定し、3 回の実験の平均値を比較した。

### 5) 迅速 H 型別法の構築

#### (1) BHI 培地の種類と加圧時間

運動性の強い 157-02 株と運動性の弱い 157-78 株の 2 株をそれぞれ 15 分、120 分、180 分加圧した 5 社の BHI 培地に接種し 37°C で 4 時間培養後、抗原液を調製し検討した。

#### (2) 1% ホルマリン加生理食塩水固定液 (以下、1% ホルマリン加生食) 量および H7 血清量

抗原液調製用の 1% ホルマリン加生食添加量を 157-02 株と 157-78 株を用いて検討した。前項 (1) で最も良好であった種類および加圧時間の BHI 培地を中試験管に 3 ml ずつ分注し 1 白金線量の試験菌を接種し 37°C で 4 時間培養した。培養液に 1% ホルマリン加生食を等量または 3 倍量加えて抗原液を調製し検討した。添加する H7 血清量は、免疫血清の使用書に記載

表 1. 5 種類の BHI 培地の主要成分

BHI 培地	エキス類				ペプトン (g/L)	グルコース (g/L)
	由来	脳 (g/L)	心臓 (g/L)	計 (g/L)		
Eiken	記載なし	記載なし	記載なし	17.5	10.0	2.0
Nissui	ブタ	4.0	4.0	8.0	17.5	2.0
Oxoid	ウシ	12.5	5.0	17.5	10.0	2.0
Difco	ウシ	7.7	9.8	17.5	10.0	2.0
BBL	ウシ	6.0	6.0	12.0	14.5	3.0

された3滴 (100  $\mu$ l) のほか、1滴と2滴を抗原液 (157-02株) に添加して検討した。

### (3) H血清反応および判定

H血清反応は抗原液0.5 mlにH血清を添加し、52°Cで90分間行った。反応後、3,000 rpmで10分間遠心し、軽く攪拌後、凝集の有無を蛍光灯下にて目視で判定した。H7血清の対照は、H7以外のH血清1種類と生理食塩水を用いた。

### 6) 迅速H型別法の評価

EHEC O157 102株およびEHEC以外のH7型の大腸菌2株の合計104株を用いて、構築した迅速H型別法と従来法により免疫血清に含まれる全種類のH血清(22種類)を用いてH型別を行い評価した。従来法の鞭毛増強操作にはSIM培地(Nissui)を用い、抗原調製の培地には使用書のとおり15分加圧滅菌したBHI(Eiken)を用いた。H血清反応は免疫血清に添付された使用書に従い実施した。

表2. 加圧時間を変えた5社BHI培地の運動性増強能の評価

BHI培地	BHI培地の加圧時間 <sup>a)</sup> (分)	発育円の直径 <sup>b)</sup> (mm)
Eiken	15	14.8
	120	16.8
	180	16.6
Nissui	15	15.1
	120	16.4
	180	15.8
Oxoid	15	15.6
	120	17.8
	180	16.3
Difco	15	15.4
	120	17.2
	180	16.8
BBL	15	13.6
	120	14.0
	180	13.6

<sup>a)</sup> オートクレーブ (BS-245 TOMY) を用いて121°C (約110 kPa) で行った。

<sup>b)</sup> 5種BHI培地におけるO157:H7の運動能増強能を0.3%寒天平板上の発育円の直径を指標として評価した。

## 結 果

### 1) 加圧時間を変えた5社のBHIの運動性増強能の評価

15分、120分および180分加圧した5社BHI培地における運動性の増強能を比較した。表2のとおり、157-02株 (O157:H7) の発育円の直径は5社BHI培地のすべてにおいて、120分加圧培地が15分および180分加圧培地よりも大きかった (15分加圧との差0.4~2.2 mm, 180分加圧との差0.2~1.5 mm)。また、5社の120分加圧BHI培地を用いた場合の発育円の直径を比較すると、OxoidのBHI (17.8 mm) が最も大きく、次いでDifco (17.2 mm), Eiken (16.8 mm), Nissui (16.4 mm), BBL (14.0 mm) の順であった。したがって、120分加圧したOxoidのBHI培地の運動性が最も強かった。図1に、15分および120分加圧したOxoidのBHI培地で培養した場合の発育円の大きさの違いを示した。

### 2) 迅速H型別法の構築

#### (1) BHI培地の種類と加圧時間

運動性の強い157-02株と運動性の弱い157-78株を用いた結果を表3に示した。5社BHI培地のうち、Oxoid, DifcoおよびEikenが供試株2株とも120分と180

表3. 5社BHIにおける加圧時間別のH型別成績の比較

BHI培地	BHI培地の加圧時間 <sup>a)</sup> (分)	H7型別成績	
		157-02株 <sup>b)</sup>	157-78株 <sup>c)</sup>
Eiken	15	-	-
	120	+	+
	180	+	+
Nissui	15	-	-
	120	+	-
	180	+	+
Oxoid	15	+	-
	120	+	+
	180	+	+
Difco	15	-	-
	120	+	+
	180	+	+
BBL	15	-	-
	120	-	-
	180	-	-

<sup>a)</sup> オートクレーブ (BS-245 TOMY) を用いて121°C (約110 kPa) で行った。

<sup>b)</sup> 運動性の強い株。

<sup>c)</sup> 運動性の弱い株。

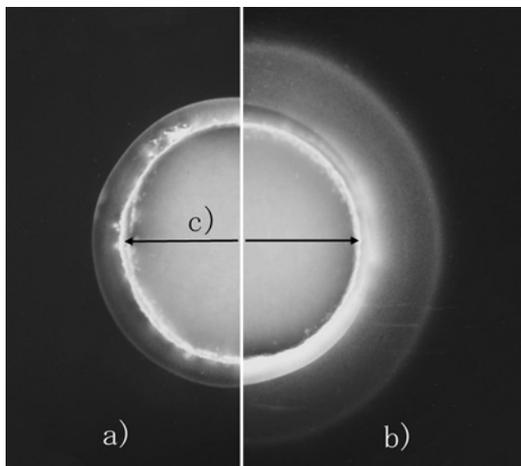


図1. 長時間加圧BHI培地による O157:H7 の運動性増強現象

15分および120分加圧したBHI (Oxoid) 培地に O157:H7 を接種し 37℃, 1時間培養後, その培養液 50  $\mu$ l を吸収させた滅菌円形ろ紙を 0.3%寒天平板に置き 37℃, 5時間培養した. a) 15分加圧培地における発育円. b) 120分加圧培地における発育円. c) 滅菌円形ろ紙.

分の加圧培地で H7 が検出され良好であった。この成績は、発育円の傾向と一致していた。Oxoid の BHI 培地は強運動性株 157-02 株において 120 分と 180 分の加圧培地で H 型別できただけでなく 15 分加圧培地でも型別できたことから、最も運動性増強培地に適すると判断された。また、BHI 培地の加圧時間には、発育円 (17.8 mm) が一番大きかった 120 分を選択した。

### (2) 1%ホルマリン加生食添加量および H7 血清量

157-02 株と 157-78 株を用い 1%ホルマリン加生食の添加量を検討した。その結果、等量の 1%ホルマリン加生食を加えた場合は 157-02 株のみが H7 血清に凝集したが 3 倍量の 1%ホルマリン加生食添加した場合は 2 株とも強く凝集した。次に、抗原液 0.5 ml に添加する H7 血清量を検討した。免疫血清の使用書に示されている血清 3 滴 (100  $\mu$ l) と、1 滴、2 滴の場合を比較した結果、血清 2 滴を添加した場合に最も強く凝集した (図 2)。以上の結果をもとに迅速 H 型別法を構築した (図 3)。

### 3) 迅速 H 型別法の評価

表 4 に、迅速 H 型別法による H7 型別率と培養時間および従来法の継代数との関係を示した。従来法による継代培養を必要としなかった 6 株は、4 時間、6 時間、24 時間のいずれの培養時間においても迅速 H 型

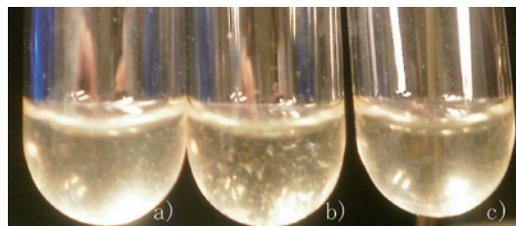


図2. 添加 H7 血清量の検討

H7 血清を a) 1 滴添加, b) 2 滴添加, c) 3 滴添加した場合の凝集反応の強さを比較した。



図3. 迅速 H 型別法

別法により高率 (100%) に H7 型別できた。H7 型別率と従来法における継代数との関係を見ると、継代数が 5 回以内の 81 株における H7 型別率は、4 時間 91% (74 株)、6 時間 95% (77 株)、24 時間 100% (81 株) であり、6 時間もしくは 24 時間培養を行うことにより高率に型別できた。しかし、従来法において 6~13 回の継代が必要であった運動性微弱株 7 株では迅速 H 型別法の培養時間を長くしても H7 型別率は 57% (4 株) にどまり増加しなかった。一方、従来法により非運動性と判定された O157:HNM 14 株は迅速 H 型別法によっても H 型別されなかった。

また、表には示さなかったが、全供試株 104 株のうち EHEC 以外の大腸菌であるが EHEC O157:H7 と同じく H7 型の 2 株 (ETEC O159:H7, 非病原性大腸菌 O1:H7 各 1 株) が迅速 H 型別法により H7 に型別されることを確認した。

## 考 察

大腸菌の運動性および運動器官である鞭毛の産生量

表4 迅速H型別法によるH7型別率と培養時間および従来法の継代数との関係

血清型	従来法		迅速H型別法					
	継代回数	株数	H7型別率 (H7型別株数/供試株数)					
			4時間培養		6時間培養		24時間培養	
O157:H7	0 <sup>a)</sup>	6	100%	(6/6)	100%	(6/6)	100%	(6/6)
	1~2	51	94%	(48/51)	98%	(50/51)	100%	(51/51)
	3~5	24	83%	(20/24)	88%	(21/24)	100%	(24/24)
	計	81	91%	(74/81)	95%	(77/81)	100%	(81/81)
	6~13	7	57%	(4/7)	57%	(4/7)	57%	(4/7)
	合計	88	89%	(78/88)	92%	(81/88)	97%	(85/88)
O157:HNM <sup>b)</sup>	-	14	0%	(0/14)	0%	(0/14)	0%	(0/14)

a) クレイギー管入り半流動培地を通過させずに従来法でH7型別できた株。

b) 運動性陰性株。

に影響する物質や環境因子が以前から知られている<sup>6)</sup>。鞭毛産生を促進する因子には低酸素濃度<sup>6)</sup>やある種の短鎖脂肪酸<sup>7)</sup>があるが、今回、長時間加圧したBHI培地の運動性増強作用は初めての報告と思われる。

長時間加圧BHI培地がO157の運動性を増強させる機序については、鞭毛の産生量やBHI培地の成分等の詳細を調べていないので明確にできないが、通常の培地調製法よりも長時間加圧することによりBHI培地中で何らかの反応が起きたことで鞭毛産生が促進される環境が整ったものと推測する。5社BHI培地の成分を示した表1を見比べると、迅速H型別法において最も型別成績がよかったBHI (Oxoid) は、脳浸出液の含有量 (12.5 g/L) が詳細不明のBHI (Eiken) を除く残り3社のBHI培地よりも1.6~3.1倍多い。BHI培地では、長時間加圧により鞭毛産生促進物質が脳浸出液の含有量に応じてより多く生成している可能性が考えられる。鞭毛産生促進物質に関して、最近Tobeら<sup>7)</sup>が単鎖脂肪酸の一種である酪酸が鞭毛産生を促進すると報告しており、今後、脳浸出液中の酪酸の濃度を調べる必要があると考える。

一方、鞭毛産生を抑制する因子にはグルコース、高い温度、低分子量のアルコールなどがある<sup>6)</sup>。今回、運動性の増強作用が5社BHI培地のうち最も弱く、かつ迅速H型別法の型別率も低かったBHI (BBL) は、脳浸出液の含有量 (6.0 g/L) が少ないうえ、グルコースの含有量 (3.0 g/L) が多かった (ほか4社はすべて2.0 g/L)。グルコースは大腸菌の鞭毛産生に抑制的に働く<sup>6)</sup>ことが知られており、BHI (BBL) の結果においても培地成分のグルコースが菌の鞭毛産生を抑制し

運動性に影響を与えた可能性も十分考えられる。Girardeauら<sup>8)</sup>は、子牛下痢症に由来する大腸菌のK99抗原の発現がオートクレーブ滅菌した培地では抑制され、濾過滅菌した培地では抑制されないことを見いだしたが、彼らはオートクレーブによるMaillard反応で生じた培地中のL-アラニンとグルコースの縮合生成物もしくは同反応で遊離グルコースが減少したことがK99抗原の発現抑制に関係していると考えている。今回の報告はGirardeauらが報告<sup>8)</sup>したK抗原とは異なりH抗原の発現にかかわるものであるが、運動性と凝集反応が加圧時間に依存して強くなることからMaillard反応が関係すると考える。

EHEC O157のH型別法にはgold standardである凝集法<sup>9)</sup>を検出原理とする従来法のほか、運動性抑制試験法<sup>4)</sup>やPCR法<sup>10)</sup>がある。今回、開発した迅速H型別法は、従来法と同じく凝集法を原理としている。迅速H型別法は、従来法では5~7日かかる型別検査日数を1~2日に短縮することが可能であるので、疫学調査の迅速化につながる非常に有用な方法であると考ええる。また、迅速H型別法は、高価なH血清量を従来法に比べて約30%削減できることからコスト面でも優れており、日常的にEHECを検査している検査室での活用およびH型別判事例の増加によるO157発生病動向調査<sup>2)</sup>の充実が期待される。

Warerら<sup>11)</sup>は、ソルビトール分解性や運動性微弱など非定型的な生化学性状を示すEHEC O157:H7株が欧米で顕在化してきたことに注目し菌を見逃すリスクを指摘している。われわれの迅速H型別法 (培養24時間) によるH7型別率は、従来法のクレイギー管入

り半流動培地による継代培養が5回までの O157:H7 株では 100% (81 株/81 株) と非常に高率であったが、6 回以上 (培養期間 2 週間以上) の継代培養を要する運動性の極めて弱い株では 57% (4 株/7 株) にとどまった。今後、運動性微弱株の運動性増強法を検討する必要があると考える。

#### 本論文における Co-first authors の役割分担

①古い培地が新しい培地よりも H 型別成績が良好であったことの確認 (青木日出美), ②長時間加圧処理による培地の作成と運動性増強現象の確認 (山崎 貢), ③長時間加圧培地による迅速 H 型別法の開発 (青木日出美, 山崎 貢), ④論文作成 (青木日出美, 山崎 貢) により行った。

**謝 辞** 本研究に協力をいただいた愛知県衛生研究所の松本昌門先生はじめ諸先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 勢戸和子. 2009. *Escherichia coli* STEC (志賀毒素産生性大腸菌). p. 281-296, 食品由来感染症と食品微生物 (中西寿男, 丸山 努編), 中央法規出版, 東京.
- 2) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 12 条第 1 項 (平成十年十月二日法律第百十四号)
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター. 2012. <特集> 腸管出血性大腸菌感染症 2012 年 4 月現在. 病原微生物検出情報 33: 115-117.
- 4) Murinda, S. E., L. T. Nguyen, S. I. Ivey, et al. 2002. Novel single-tube agar-based test system for motility enhancement and immunocapture of *Escherichia coli* O157:H7 by H7 flagellar antigen-specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4685-4690.
- 5) Martins, S. I. F. S., W. M. F. Jongen, M. A. J. S. Van Boekel. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Sci. Technol.* 11: 364-373.
- 6) Soutourina, O. A., P. N. Bertin. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 505-523.
- 7) Tobe, T., N. Nakanishi, N. Sugimoto. 2011. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two step in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 79: 1016-1024.
- 8) Girardeau, J. P., H.C. Dubourguier, P. H. Gouet. 1982. Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanine Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 463-470.
- 9) Durso, L. M., J. L. Bono, J. E. Keen. 2005. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4941-4944.
- 10) Johnson, J. R., A. L. Stell. 2001. PCR for specific detection of H7 flagellar variant of *fliC* among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3712-3717.
- 11) Ware, J. M., S. L. Abbott, J. M. Janda. 2000. A new diagnostic problem: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains with aberrant biochemical properties. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 38: 185-187.

## A Novel Method of Detection of H7 Flagella Antigen of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 by Using Motility Enhancement Medium Reinforced by Means of Prolonged Autoclave Treatment

Hidemi Aoki<sup>1),\*</sup>, Mitsugu Yamazaki<sup>2),\*</sup>, Tomoko Hayashi<sup>1)</sup>, Norio Tatsumi<sup>3)</sup>, Satoru Hattori<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Aichi Prefectural Kinuura-Tobu Health Center

<sup>2)</sup> Aichi Prefectural Ichinomiya Health Center

<sup>3)</sup> Anjo Kosei Hospital

\* Co-first authors

We have found a phenomenon to increase motility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (EHEC O157) by culturing in Brain Heart Infusion (BHI) medium autoclaved for 120 minutes. Based on the phenomenon, we developed an accurate and rapid method for detecting H7 flagellar antigen of EHEC O157. Before an agglutination test of H7 antigen, it usually performed multiple passages of EHEC O157 in motility enhancement medium, which into the Craigie's tube was inserted. The method described here does not require the troublesome multiple passages, because it uses the motility enhancement medium reinforced. The EHEC O157 was inoculated in Brain Heart Infusion medium,

which were autoclaved at 121°C for 120 minutes. The broth cultures used for the H7 agglutination test are obtained at incubation at 37°C for 6 or 24 hours. The rapid method was able to classify 85 (97%) out of the 88 EHEC O157 strains which were H7-typed by conventional method within 2 days. The three strains, not H7-typed by the rapid method, had very weak motility, so that required more than 6 passages (more than 2 weeks) to gain enough motility for H7-typing by the conventional method. The procedure here significantly shortens the period of H7-typing of EHEC O157 (approximately 3 to 5 days), and could be adapted easily for routine use in clinical laboratories.