

# バベシア・ビゲミナ検出 PCR の特異性および検出感度の検討

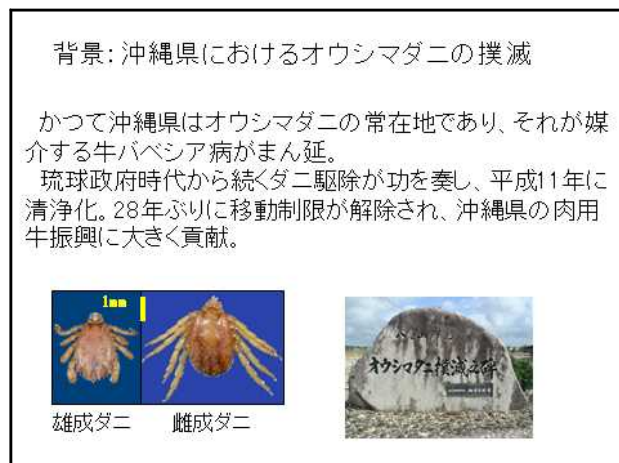
家畜衛生試験場

○青木 雄也

畜産課

宇地原 務

沖縄県はかつてオウシマダニの常在地であり、それが媒介する牛バベシア病とアナプラズマ病がまん延していた。琉球政府時代から続くダニ駆除が功を奏し、1999年に撲滅を達成、移動制限が解除され沖縄県の肉用牛振興に大きく貢献した。(図1)



(図1 オウシマダニの撲滅)

しかし、1998年、1999年に県外からの導入牛にオウシマダニの寄生を確認。県内での再発生が危惧された事から現在は牧野ダニ侵入防止対策事業により県外導入牛や先島諸島などの高齢牛を対象として血液塗沫検査や遺伝子検査を実施している。中でもバベシア・ビゲミナの遺伝子検査はFigueroaら(1992)の方法を改良したnested PCRを用いて監視しているが、一部の検体に非特異反応が確認され問題であった。(図2)そこで、このnested PCRおよびSivakumarら(2012)が報告したBB AMA-1 PCRの特異性と検出感度について検討した。

## 背景(問題点)

*E.bigemina*の遺伝子検査はBB nested PCR(Figueroaら1992改)を実施していたが、一部の検体にターゲットサイズ付近にバンドがみられた。

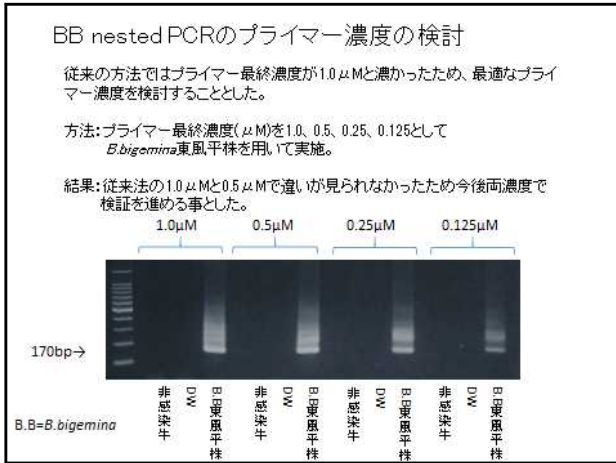
ターゲットサイズ付近でバンドのみられた検体は血液塗沫検査やテンプレートDNA量の調整、一部はシーケンスにより非特異反応と確認。



(図2 遺伝子検査の非特異反応)

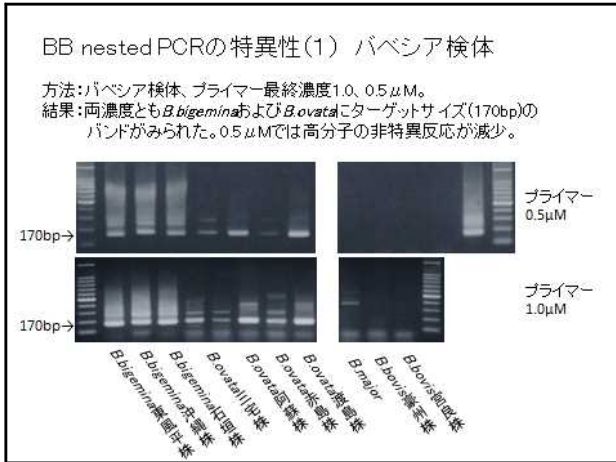
特異性試験にはバベシア・ビゲミナ(BB) 3株、バベシア・オバタ(BO)4株、バベシア・ボビス(Bb)2株等、住血微生物計8種の感染牛血液を用いた。検出感度の検討にはBB東風平株(BBK)とBO赤島株(BOA)感染牛血液を非感染牛血液で段階希釈した材料を用いた。DNAの抽出にはQIAamp DNA Blood Mini Kits(QIAGEN)、PCRにはGoTaq MasterMix(promega)、サーマルサイクラーはApplied Biosystems 2700、電気泳動は2%アガロースゲルを用いMupid-exUで30分泳動した。

まず、nested PCRのプライマー濃度を検証した。従来実施していた最終濃度1.0  $\mu$  Mから段階希釈し、0.5、0.25、0.125  $\mu$  Mで実施したところ1.0と0.5  $\mu$  Mで差がみられなかったことから、特異性や検出感度の検討では1.0および0.5  $\mu$  Mの両濃度で検証を進めることとした。(図3)

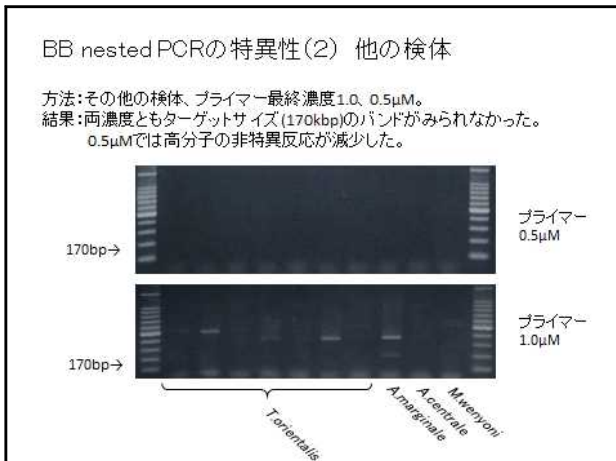


(図3 プライマー濃度の検討)

バベシア・ビゲミナやBb、BOその他の住血微生物を用いて特異性試験を実施したところ、BB nested PCRではBB、BO全株が陽性を示し、バベシア・ボビス、メイジャー、小型ピロプラズマ、アナプラズマ2種、マイコプラズマ検体に標的バンドはみられなかった。また、プライマー濃度1.0 μMでみられた非特異バンドはプライマー濃度0.5 μMでは減少した。(図4、図5)

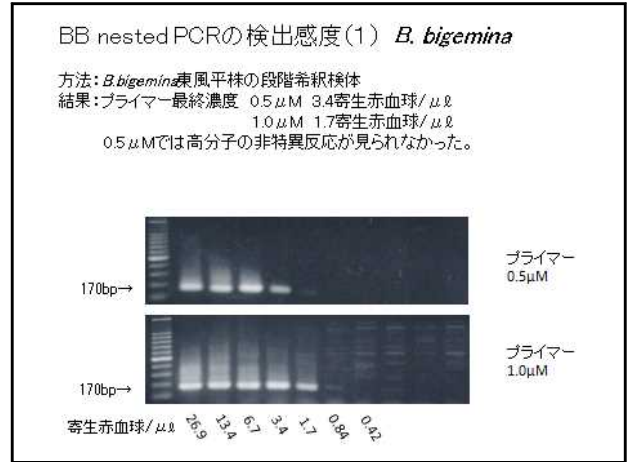


(図4 BB nestedPCRの特異性1)



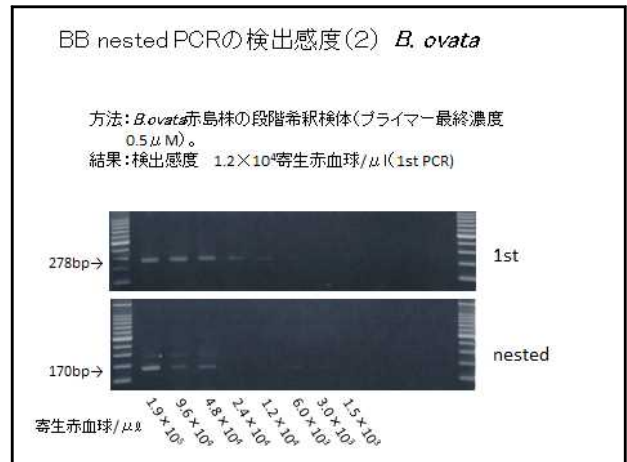
(図5 BB nestedPCRの特異性2)

BB nested PCR検出感度の検証はBB東風平株(BBK)を用いて実施。BBK検出感度は1.7寄生赤血球/μl(プライマー終濃度1.0 μM)、3.4寄生赤血球/μl(同0.5 μM)であった。プライマー終濃度1.0 μMでは高希釈検体にラダー状バンドがみられたが0.5 μMではみられなかった。(図6)



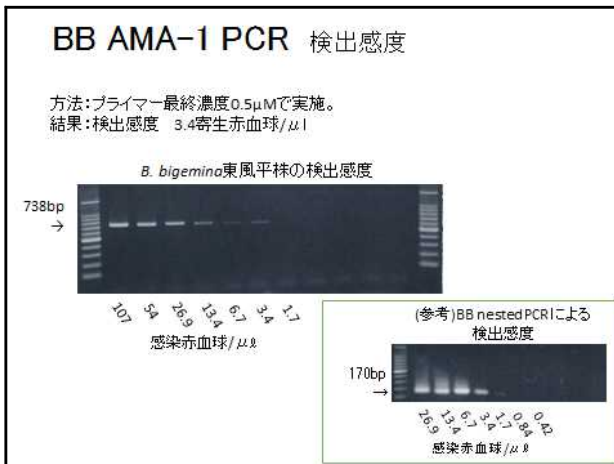
(図6 BB nestedPCRの検出感度)

従来法でBOが交差反応を示したため、バベシア・オバタ赤島株(BOA)を用いて検出感度の検証したところ検出感度は $1.2 \times 10^4$ 寄生赤血球/μlだった。(図7)



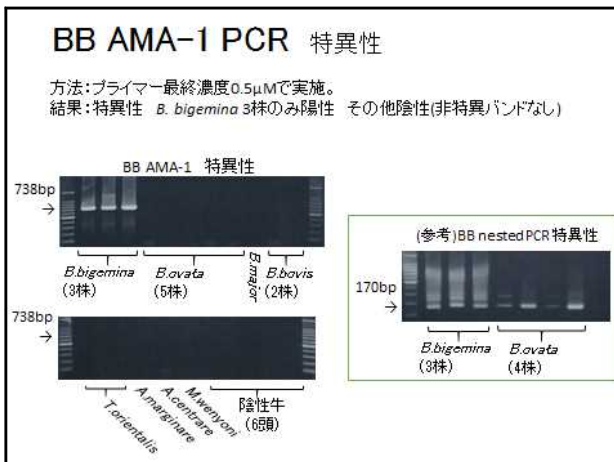
(図7 BB nested PCRの検出感度 B.ovata)

従来法のBB nested PCRではBOも同時に増幅してしまうことが分かったので新たなPCR法であるBB AMA-1 PCRの特異性試験を実施した。その結果、BB全株のみ陽性となり、他の検体には高分子バンドを含む非特異反応は生じなかった。BBK検出感度は3.4寄生赤血球/μlであった。(図8)



(図8 BB AMA-1 PCR の検出感度)

また、BB AMA-1 PCRの検出感度の検討では3.4寄生赤血球/ $\mu$  l(プライマー最終濃度0.5  $\mu$  M)であり、BB nested PCRと同等であった。(図9)



(図9 BB AMA-1 PCR の特異性)

BB nested PCRではBB、BO全株が陽性を示し、Bb、バベシア・メジャー、小型ピロプラズマ、アナプラズマ2種、マイコプラズマ検体に標的バンドはみられなかった。BBK検出感度は1.7寄生赤血球/ $\mu$ L(プライマー終濃度1.0 $\mu$ M)、3.4寄生赤血球/ $\mu$ L(同0.5 $\mu$ M)であった。プライマー終濃度1.0 $\mu$ Mでは高希釈検体にラダー状バンドがみられたが0.5 $\mu$ Mではみられなかった。BOA検出感度は $1.2 \times 10^4$ 寄生赤血球/ $\mu$ L(1st PCR、プライマー終濃度0.5 $\mu$ M)であった。BB AMA-1 PCRではBB全株のみ陽性となり、他の検体には高分子バンドを含む非特異反応は生じなかった。BBK検出感度は3.4寄生赤血球/ $\mu$ Lであった。以上より、BBの検出にはnested PCRに比べBB AMA-1 PCRがより適していることが明らかとなった。また、現在県外導入牛約800検体

の遺伝子検査をBB AMA-1 PCRで実施しているが非特異反応は確認されていない。