

演題名：Multiplex PCRを用いた *Salmonella Choleraesuis* の迅速判定法の検討

発表者：○大橋麻美 北野崇

発表者所属：中央食肉衛生検査所

1. 緒言

Salmonella Choleraesuis (以下 *S.C*) は、豚のサルモネラ症としてと畜場法で全部廃棄の対象に指定されている血清型のひとつである。*S.C* は当所管内において2008年6月から2010年1月まで発生した本症の原因菌の9割以上を占めており、と畜検査において重要な細菌である。当所において本菌判定に行われているAPI(細菌同定検査キット)を用いた方法では、検査に4日を要し保留豚の品質低下や生産者への負担が懸念される。そこで、今回 *S.C* の判定を迅速に行うことを目的として Multiplex PCR (以下 MPCR) を用いた方法を検討したので報告する。

2. 材料及び方法

(1)材料：*S.C* は当検査所で分離された2株、埼玉県食肉衛生検査所で分離された2株、宮崎県食肉衛生検査所で分離された1株、鹿児島県食肉衛生検査所で分離された1株を用いた。

Salmonella Typhimurium (以下 *S.T*) は沖縄県家畜衛生試験場(以下 家衛試) で分離された1株、*Salmonella Agona* (以下 *S. Agona*) 及び *Salmonella Bareilly* (以下 *S. Bareilly*) は家衛試で分離された各1株、及び *Salmonella Infantis* (以下 *S. Infantis*) は沖縄県衛生環境研究所で分離された1株を用いた。

(2)方法：ア、イ共にアルカリ熱抽出法でDNAを抽出してサーマルサイクラーにセットしPCR反応を行い、アガロースゲル電気泳動で得られた増幅産物を確認した。使用したキット、プライマー及び得られる増幅産物(bp)は以下の通りである。

ア. *Salmonella* 属菌の判定

キット…TaKaRa サルモネラ invA gene One Shot PCR Kit(以下 invA Kit)

ほとんどすべての *Salmonella* 属菌が保持しているとされる侵入性因子関連遺伝子(invA gene)を増幅する。

Primer Set SIN-1&2…378bp：サルモネラ属共通の invA 遺伝子領域の増幅産物

イ. *S.C* の判定

キット…QUIAGEN Multiplex PCR Kit (Davidらの報告(2008年)参考)

STM3664…986bp、CsPcSC4352…709bp(最終濃度 3.9 μM)

3. 結果

MPCRでは *S.T*、*S. Agona*、*S. Bareilly*、*S. Infantis* は沖縄は986bpに、*S.C* は709bpに増幅産物が確認された。invA Kitを用いたPCRでは *S.T*、*S.C* ともに378bpに増幅産物が確認できた。

4. 考察

今回PCR法で *Salmonella* 属菌を、MPCR法で *S.C* を3日目に判定することが可能であることがわかった。この方法では現行より少ない工程で行うことができ、また検査日数を1日短縮することができる。

今後の課題として、実用化に向けて様々な血清型株を用いて試験回数を重ね、再現性を確保する必要があると考える。また *Salmonella* 属菌の判定と *S.C* の判定を同時に行うための条件設定を検討し、試験精度向上に取り組む必要があると思われる。