

演題番号：5

演題名：Multiplex PCR を用いた *Salmonella* Choleraesuis, Typhimurium, Dublin, 及び Enteritidis の迅速判定法の検討

発表者名：○佐々木 哲¹⁾ 北野 崇¹⁾ 秋庭 正人²⁾

発表者所属：1) 中央食肉衛生検査所 2) (独) 動物衛生研究所

1. はじめに

と畜場法で全部廃棄の対象に指定されている家畜のサルモネラ症の判定には、分離されたサルモネラ属菌の血清型別の判定が必要となる。現在のサルモネラ症の同定法は培養開始から血清型判定までに7日以上の日数を必要とするため、検査保留が長期化することによる生産者への負担が懸念される。そこで今回、検査期間の短縮と正確な同定を目的として、4種のサルモネラ属菌血清型について動物衛生研究所(以下動衛研)で開発された Multiplex PCR による迅速判定法の有用性を検討したので報告する。

2. 材料及び方法

(1) 材料：4種のサルモネラ属菌血清型は *Salmonella* Choleraesuis(以下 S. C) 80 株, *Salmonella* Typhimurium (以下 S. T) 14 株, *Salmonella* Dublin (以下 S. D) 2 株, 及び *Salmonella* Enteritidis (以下 S. E) 3 株の計 99 株を供試した。また、それ以外のサルモネラ属菌として 7 血清型 7 株、及びサルモネラ属菌以外の菌 3 菌種 3 株を供試した。

(2) 方法：Multiplex PCR は、動衛研の方法に従った。各分離菌株 1 集落からアルカリ熱抽出法により DNA を抽出し、サルモネラ属菌に特異的な *invA* 遺伝子を増幅するプライマー、各血清型に特異的な 3 遺伝子を増幅する 3 種のプライマー、PCR 反応液、及び抽出 DNA を混合して PCR 反応を実施した。PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認し、それぞれ血清型において標的となる 4 遺伝子が検出できた場合に当該血清型陽性と判定した。

3. 結果

S. C80 株, S. D2 株, 及び S. E3 株はすべてにおいて 4 遺伝子の増幅産物が確認され、偽陰性株は認められなかった。一方 S. T においては、14 株中 13 株は 4 遺伝子が確認されたが、残りの 1 株は 3 遺伝子のみ増幅され、1 遺伝子は確認できなかった。その他のサルモネラ属菌及びサルモネラ以外の菌種において陽性と判定された株は認められなかった。

4. 考察およびまとめ

調査結果から、今回検討した動衛研法による迅速同定法は、S. C, S. D, 及び S. E を特異的に検出する方法として有用であることが示唆された。特に当検査所で検出される豚サルモネラ症の 99% が S. C であることから、一般の検査にこの方法を用いることにより検査日数の短縮が可能となるため、生産者の負担軽減に繋がるものと思われる。

一方、S. T14 株中の 1 株に偽陰性が認められたが、これは長期室温保存により、保存中に遺伝子に何らかの変異が起こったものと推察された。偽陰性を示したこの株については、動衛研において分子遺伝学的な性状解析を行っている。S. T は食中毒菌としても重要な血清型であることから、今後さらに継続調査が必要である。