

演題番号：2

演題名：*Salmonella Choleraesuis* PCR 検査法の改良について

発表者名：○安富祖理香 三輪英一 中村正治

発表者所属：中央食肉衛生検査所

1. はじめに

当所では平成 23 年度より、Akiba らの報告した Multiplex PCR を用いた *Salmonella Choleraesuis* (以下 SC) の迅速判定法 (以下、従来法) を行うことで、以前より SC の検査期間を短縮してきた。しかし従来法では SC と *Salmonella Typhisuis* (以下 STs)、*Salmonella Paratyphi C* (以下 SP) との識別が PCR のみではできないため、生化学的性状の確認が必要となり、PCR 検査後さらに判定に 1 日要している。そこで今回、PCR のみで SC の判定が行えるよう改良を試みたので報告する。

2. 材料及び方法

- (1) 供試菌株として SC 及び STs、SP を使い、従来法の 8 種プライマーに加えて SC では増幅されない STM3664 (Woods らの報告、986bp) を追加した 10 種プライマーを用いて Multiplex PCR を行い、SC とそれ以外が識別できるかを確認した。
- (2) (1) において SC とそれ以外がより明瞭に識別可能な最適なアニーリング温度を検討した。
- (3) 当所で平成 24 年 4 月～25 年 11 月に分離された SC189 株、県外由来 SC5 株、SC 以外のサルモネラ属菌として 13 血清型 13 株、サルモネラ属菌以外の菌種として 4 菌種 4 株を供試し、(1)、(2) で検討した 10 種プライマーを用いた Multiplex PCR を行い、その結果を従来法と比較し SC 検出精度の検証を行った。

3. 結果

- (1) SC では従来の 4 遺伝子 (領域) が増幅され、STs 及び SP では STM3664 を追加した 5 遺伝子 (領域) の増幅が確認され識別が可能であった。しかし SC でも 900～1000bp に不明瞭ではあるが非特異バンドがみられた。
- (2) (1) でみられた非特異バンドが消失するアニーリング温度は 53℃であった。
- (3) 当所由来及び県外由来の SC 株全 194 株において、従来の 4 遺伝子 (領域) の増幅産物が確認された。一方、SC 以外のサルモネラ属菌 13 株、及びサルモネラ属菌以外の 4 菌種においては SC と同様の 4 遺伝子 (領域) の増幅産物が確認されたものは無く、SC との識別が可能であった。

4. まとめ

今回の 10 種プライマーを用いた Multiplex PCR 法で、SC とそれ以外の全ての菌との識別が可能であり、その精度にも問題がみられなかったことから、保留検査への同法の導入は可能であると思料される。しかしながら STM3664 が原因と推察される非特異バンドが出現する事例が依然としてみられるため、プライマーの設計及び PCR 反応サイクルの条件などについて引き続き検討する必要があると考えられる。