

演題番号：2

演題名：*Salmonella Choleraesuis* の迅速判定法の検討(第2報)

発表者名：○工藤奈々、宮城国太郎、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25年度に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、現行法)にSTM3664 遺伝領域を標的とするプライマーを加えて、SCと*Salmonella Typhisuis*(以下、STs)、*Salmonella Paratyphi C*(以下、SP)がPCRのみで識別可能であると報告した。しかし、非特異バンドが検出されたため課題となっていた。今回、昨年度の改良を目的に、非特異バンドの消失および特異的かつ良好な感度で検出されるPCRの条件を検討した。

2. 材料および方法

- (1) PCR条件の検討：供試菌株として、SC(NBRC105684株)及びSTs(ATCC8321株)、SP(ATCC13428株)を用い、平成25年度に検討したKOD FX Neo(東洋紡)と今回新たにEmeraldAmp PCR Master Mix(TaKaRa)のDNAポリメラーゼについて、非特異バンドの有無を比較検討した。また、プライマー同士の競合作用が認められるため、各プライマー(*invA*-F/R、CMP-F/R、STM3664-F/R)の最適濃度比を検討した。さらに最適濃度比を用いて、至適アニーリング温度範囲を測定した。
- (2) SC検出精度の検証：当所にて平成25年11月から平成26年12月にかけて分離されたSC143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4菌種4株を供試し、SC検出精度の検証を行った。

3. 結果

- (1) PCR条件の検討：昨年度同様KOD FX Neoでは非特異バンドが検出されたが、EmeraldAmp PCR Master Mixにおいては、非特異バンドは確認されずSCで4本、STsおよびSPで5本のバンドを認めた。また、各プライマーの濃度比については $invA : CMP : STM3664 = 3 : 0.5 : 0.5$ (プライマー対最終濃度は各々 $0.3 \mu M : 0.05 \mu M : 0.05 \mu M$) が最適であり、アニーリング温度は53~56°Cの間で良好な遺伝子の増幅が得られた。
- (2) SC検出精度の検証：当所由来及び県外由来の計148株において、標的とする増幅産物が確認され、SC以外のサルモネラ属菌13株、サルモネラ属菌以外の4菌種ではSCと同様の増幅遺伝子は確認されず、非特異バンドも確認されなかった。

4. まとめ

今回改良したPCR法では、課題であった非特異バンドが認められず、偽陽性もなく良好な遺伝子の増幅が得られたことから、保留検査への同法の導入は可能であると思料された。導入した場合、生化学的性状の判定を省略することができ、保留後3日でSCの有無を確認できることから、合否判定の短縮が期待される。今後、引き続き現行法と並行して本方法を行い、SC検出精度を検証し、保留検査体制を整えたい。