

# レジオネラ生菌遺伝子検査システム ～ LC EMA-qPCR法 ～

that's  
GOOD  
science!

採水翌日に結果判定！

検査開始 1日目

2日目

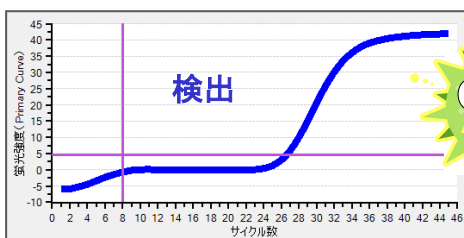


液体培養(LC)

EMA処理

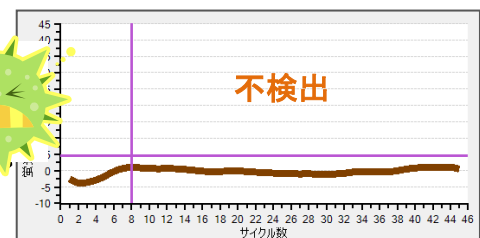
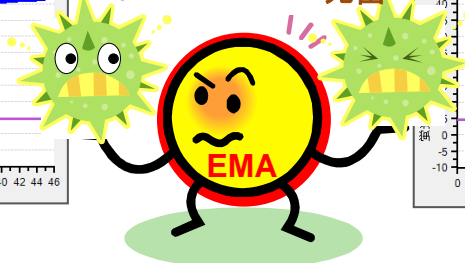
DNA抽出

リアルタイム  
PCR



生菌

死菌



※ 生菌由来の遺伝子のみを検出する方法(生菌検出法)は、厚生労働省健康局生活衛生課長通知(平成27年3月31日)「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正について(健衛発0331第7号)に記載されています。

※ LC EMA-qPCR法は、遺伝子検査の最大の特長である迅速性に加えて生菌選択性を併せ持つ「生菌検出法」です。

= LC EMA-qPCR法は、  
培養検査前の迅速なスクリーニング検査法として活用できます =

## 「レジオネラ生菌遺伝子検査システム」



★ 試薬キット

+



★ 装置

# 2日間で結果判定！ 生菌遺伝子検査法「LC EMA-qPCR法」

## 検査開始 1日目



### 1. 検水の濃縮

検水 500 ml



100倍濃縮液



1,000倍濃縮液



(ATP測定)

酸処理



### 2. 液体培養 (Liquid Culture)

#### ★生菌の選択的検出をより確実に！

MWY 液体培地で36°C18時間培養 → 生菌のみが増殖し、相対的に生菌の選択性が向上する。

液体培養に使用する培地のベース

**Legionella LC Medium Base** (製品コード 9016)

<製品内容>

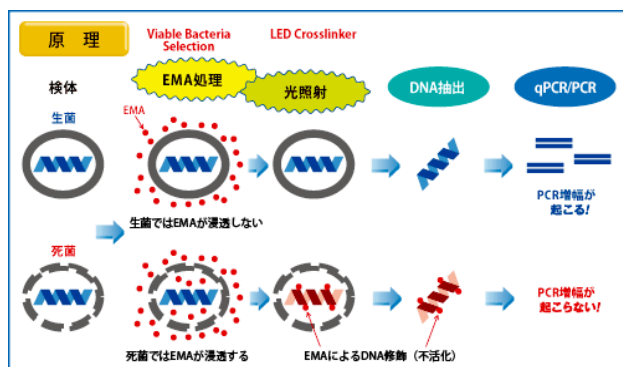
Legionella LC Medium Base	90 ml
---------------------------	-------



### 3. EMA処理

#### ★死菌由来のPCR増幅を抑制し、生菌由来DNAを選択的に検出

EMAで修飾された死菌DNAがPCR増幅できない状態となることを利用して、生菌DNAを選択的に検出する。



#### 「EMA-PCR法」の原理

EMA (ethidium monoazide) は、可視光に暴露すると核酸に共有結合する色素である。生菌を含む検体にEMAを添加して照射を行っても、生菌ではEMAが内部浸透せず、DNAの化学修飾は起ころない。一方、死菌ではEMAが浸透するため、DNAはEMAにより化学修飾される。EMA修飾されたDNAはPCRの鋳型とならず、遺伝子増幅できないため、PCR検出で生菌由来DNAのみが検出される。

照射装置

**LED Crosslinker 12** (製品コード EM200)

LC EMA-qPCR法専用のEMA試薬

**Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR** (製品コード 7730)

<製品内容>

• Solution A-leg (LC)	625 μl × 2
• Solution B-leg (LC)	200 μl × 4



なら、採水翌日に結果判定が可能です！

2日目

30分

EMA処理



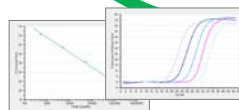
30分

DNA抽出



90分

リアルタイムPCR



## 4. DNA抽出

### ★熱処理と遠心だけの簡単操作

Lysis Bufferを加えて95°C10分間加熱後、4°Cで遠心分離、さらに5分間氷冷するだけで、qPCR用鑄型DNAが得られる。

### ★DNA溶液回収の操作性がアップ

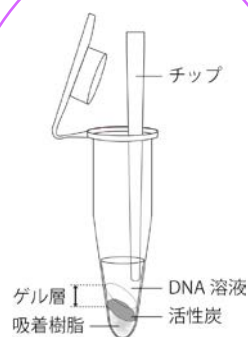
界面活性剤とPCR阻害物質吸着樹脂からなり、遠心後は吸着樹脂の上にゲル層が形成される仕組みで、初心者でも簡単にDNA溶液の回収が可能！

レジオネラ菌専用のDNA抽出試薬

**Lysis Buffer for *Legionella*** (製品コード 9181)

<製品内容>

Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	500 µl × 5
------------------------------------	------------



DNA溶液の回収が簡単！

## 5. リアルタイムPCR

### ★広範囲なレジオネラ属菌の検出をカバー

*L. londiniensis*を含む74種でターゲット遺伝子の増幅を確認しています。検出可能な菌種リストは、説明書を参照してください。

### ★1チューブでインターナルコントロールによる偽陰性チェックが可能

レジオネラ属菌検出キット(ターゲット: 16S rRNA遺伝子)

**Cycleave®PCR *Legionella* (16S rRNA)**

**Detection Kit** (製品コード CY240)

<製品内容>

● 2 × Cycleave Reaction Mixture	625 µl
● 16S Primer / Probe Mix	250 µl
○ <b>Solution E</b>	125 µl
● 16S Positive Control	100 µl
● EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 2



PCR反応阻害を緩和！

レジオネラ16S rRNA  
遺伝子

FAM



インターナル  
コントロール(IC)

ROX



リアルタイムPCR装置 **Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*** (製品コード TP700)

**Thermal Cycler Dice Real Time System *II*** (製品コード TP900)

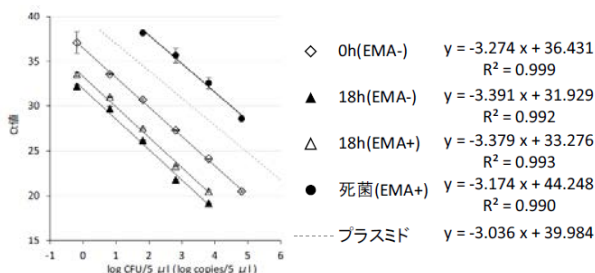
検出結果の判断基準について

「厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業) 公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 平成24年度分担研究報告書」より引用

■ LC EMA-qPCR法におけるレジオネラ1 CFU あたりの16S Positive Control コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラ菌の10倍希釈系列を用いて、それぞれ2連でLC EMA-qPCRを行い、検量線を作成した。この回帰式の切片と、16S Positive Control の回帰式の切片の差から、レジオネラ1 CFU当りの16S Positive Control コピー数が以下の通り算出された。

18 時間培養EMA処理後のコピー数(レジオネラ1 CFU 当り)  
 $2^{(39.984-33.276)} = 104.5 \div 100$  コピー



アメーバ培養レジオネラを用いたLC EMA-qPCR の検量線

「厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業) レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成26年度分担研究報告書」より引用

■ LC EMA-qPCR による循環式浴槽水等における検査結果

平成26年度に浴用施設から採取された176検体の試料について、平板培養法とLC EMA-qPCR法の比較を行った。平板培養法では57/176検体(32.4%)から10 CFU/100 ml以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA-qPCR法では、カットオフ値を1 CFU/100 ml相当とした場合、82 / 176検体(46.6%)の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA-qPCR法の平板培養法に対する感度は89.5%(51 / 57検体)、特異性は73.9%(88 / 119検体)であり、高い相関を示した。

平板培養法とLC EMA-qPCR 法との比較(n=176)

LC EMA-qPCR法のカットオフ値 1 CFU/100 ml相当

LC EMA-qPCR法	平板培養法	平板培養法		計
		≥10	<10	
LC EMA-qPCR法	≥1	51	31	82
	<1	6	88	94
計		57	119	176

感度 89.5% 特異性 73.9%

■ LC EMA-qPCR法によるレジオネラ生菌遺伝子迅速検査【製品一覧】

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
<b>液体培養(LC)</b>				
Legionella LC Medium Base	液体培養に使用する培地のBase	90 ml	9016	¥16,500
<b>EMA処理</b>				
Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR	LC EMA-qPCR専用のEMA試薬キット	25回 50回	7730S 7730	¥18,000 ¥33,000
<b>照射装置</b>				
LED Crosslinker 12	EMA処理検体(1.5 ml チューブ) 12本を一度に処理可能	一式	EM200	¥107,800
<b>DNA抽出試薬</b>				
Lysis Buffer for Legionella	レジオネラ属菌専用の簡易DNA抽出試薬	50回	9181	¥11,000
<b>リアルタイムPCR試薬</b>				
Cycleave®PCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit	レジオネラ属菌の検出&定量(16S rRNA遺伝子)	25回 50回	CY240S CY240	¥31,000 ¥57,000
<b>EMA処理の成否確認試薬</b>				
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)	EMA処理の成否を確認するキット	50回	CY290	¥28,000
<b>リアルタイムPCR装置</b>				
Thermal Cycler Dice® Real Time System II	96ウェル対応	一式	TP900	¥4,125,000
Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite	48ウェル対応	一式	TP700	¥2,530,000

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。 ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。  
 ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。 ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。  
 ・本パンフレット記載の価格は2015年9月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2015年9月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282  
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995  
 TaKaRaテクニカルサポートライン  
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995  
 ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店