# EMA-qPCR法による浴槽水からのレジオネラ属菌検出

○高間朋子[1]，井上浩章[1]，吉崎美和[2]，縣　邦雄[1]　（[1]アクアス㈱つくば総研，[2]タカラバイオ㈱バイオ研）

## 背景

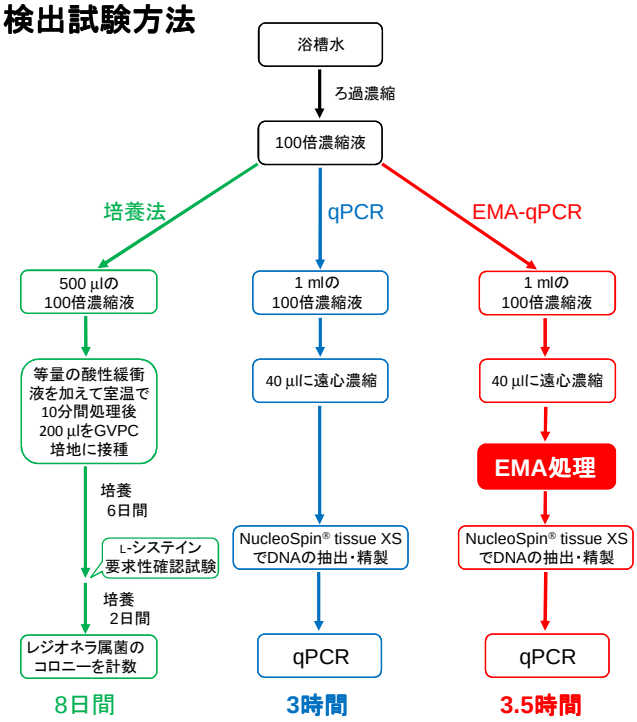
浴槽水のレジオネラ属菌を検出する方法としてPCR法やLAMP法などの遺伝子検出法は培養法と比較して迅速性に優れる利点がある．ただし，遺伝子検出法はレジオネラ属菌の生菌だけでなく死菌も検出するため，培養法よりも陽性率が高くなる．それを改善するため，遺伝子検出法にエチジウムモノアジド（EMA）処理を組み合わせて，死菌のDNAに由来する陽性率を低減させる手法が実用化されている．今回，実際の浴槽水を用いてEMA処理あり／なしの試料から定量PCR（qPCR）によりレジオネラ属菌を検出し，培養法の結果と比較することでEMA処理の効果を評価した．

## 材料と方法

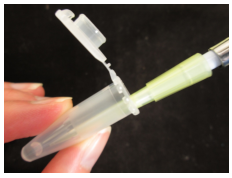
2012年9月から2012年12月に採取した浴槽水111検体から，EMA-qPCR法，qPCR法および培養法によりレジオネラ属菌を検出した．
試験に使用した試薬，機器等を以下に示す．

- Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）
- NucleoSpin® Tissue XS（タカラバイオ）
- Cycleave® PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）
- LED CrossLinker 12（タカラバイオ）
- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（タカラバイオ）

## 検出試験方法

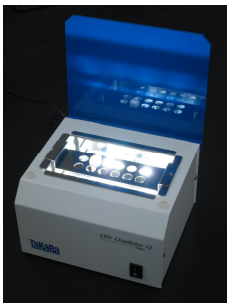



## EMA処理方法



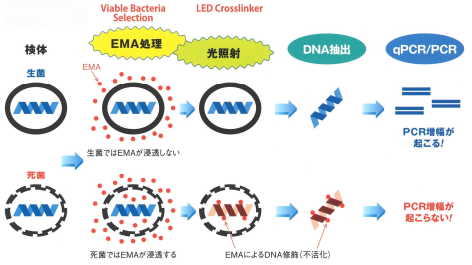
① EMA試薬を添加して混合

② 遮光して室温で15分間



③ 15分間光照射（LED CrossLinker 12）

## EMA処理の原理




EMA処理により生菌を選択的に検出できる

タカラバイオ製品カタログ「PCRによる生菌由来DNAの選択的な検出法」より転載

## EMA処理なしqPCR結果

| | | 培養法 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 検出 | 不検出 | total |
| EMA処理なしqPCR | 検出 | 29 | 56 | 85 |
| | 不検出 | 1 | 25 | 26 |
| | total | 30 | 81 | 111 |

## EMA処理ありqPCR結果

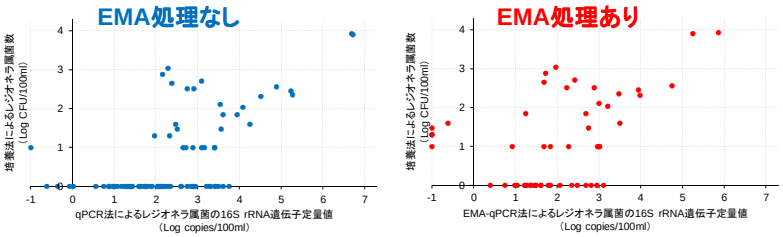
| | | 培養法 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 検出 | 不検出 | total |
| EMA処理ありqPCR | 検出 | 26 | 23 | 49 |
| | 不検出 | 4 | 58 | 62 |
| | total | 30 | 81 | 111 |

EMA処理により培養法不検出，qPCR法陽性の不一致が半分以下に減少

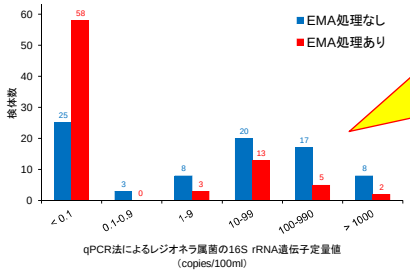
培養法の不検出は10 CFU/100ml未満

qPCR法の不検出は45サイクルのPCRでDNAが増幅せず

EMA処理により培養法不検出のプロット（X軸上）が減少し，全体的に検出した遺伝子量が減少（プロットが左へシフト）した




qPCR法とEMA-qPCR法で検出されたレジオネラ属菌遺伝子の定量値の比較




培養法不検出検体の中には「EMA処理あり」でもDNAが検出されるものがあり
- 培養法の検出下限との相違
- EMAで処理されていない死菌
- 培養法で検出されない生菌（VBNC）の存在

が理由として考えられる

培養法不検出検体のレジオネラ属菌遺伝子定量値の分布

## まとめ

1. EMA-qPCR法は培養法不検出，遺伝子検出法陽性の不一致を半分以下に減少させた．
2. EMA処理条件や検出感度の調整により，培養法と遺伝子検出法の不一致が更に減少し，有効な手法となることが期待される．
3. 培養法で検出できないVBNC（Viable but nonculturable）状態のレジオネラ属菌の影響については今後の検討課題である．
4. 遺伝子量からの生菌数定量化についても今後の検討課題である．