

腸管出血性大腸菌の 抗原検出用キット試薬の評価

○森哲也¹⁾, 岸野かなえ¹⁾, 難波豊彦¹⁾, 吉崎美和²⁾

1) 一般財団法人東京顕微鏡院

2) タカラバイオ株式会社SCMセンター

目的

現在、食品からの腸管出血性大腸菌の検査は、「腸管出血性大腸菌O26, O111及びO157の検査法について」（平成24年12月通知）に基づき実施。

通知法：VT遺伝子のスクリーニング⇒分離培養

上記3血清型以外の食中毒事例もあり、対象とする血清型を広げる必要性がある。諸外国でもnon-O157を対象とした検査法が導入されており、国内での整備も急務である。

本研究では、リアルタイムPCRでO抗原遺伝子を検出・型別可能なキット試薬の評価を行った。

方法

対象食品 | 牛ひき肉, 牛レバー, トマト

供試菌株 | 血清群O26, O103, O111,
O121, O145, O157

検体の調製 |

食品検体mEC培養液に, 供試菌株が $10^2 \sim 10^5$ cfu/mlとなるように添加した。

遺伝子検出 |

O抗原遺伝子検出用試薬としてタカラバイオが開発したqPCR kitを用いた (Cycleave[®]PCR EHEC (O157/O26) Typing Kitほか)。検体からのDNA抽出はアルカリ熱抽出および市販精製キットを用いた。リアルタイムPCRとしてABI7500を使用した。

結果 | アルカリ熱抽出法とDNA精製キットの比較

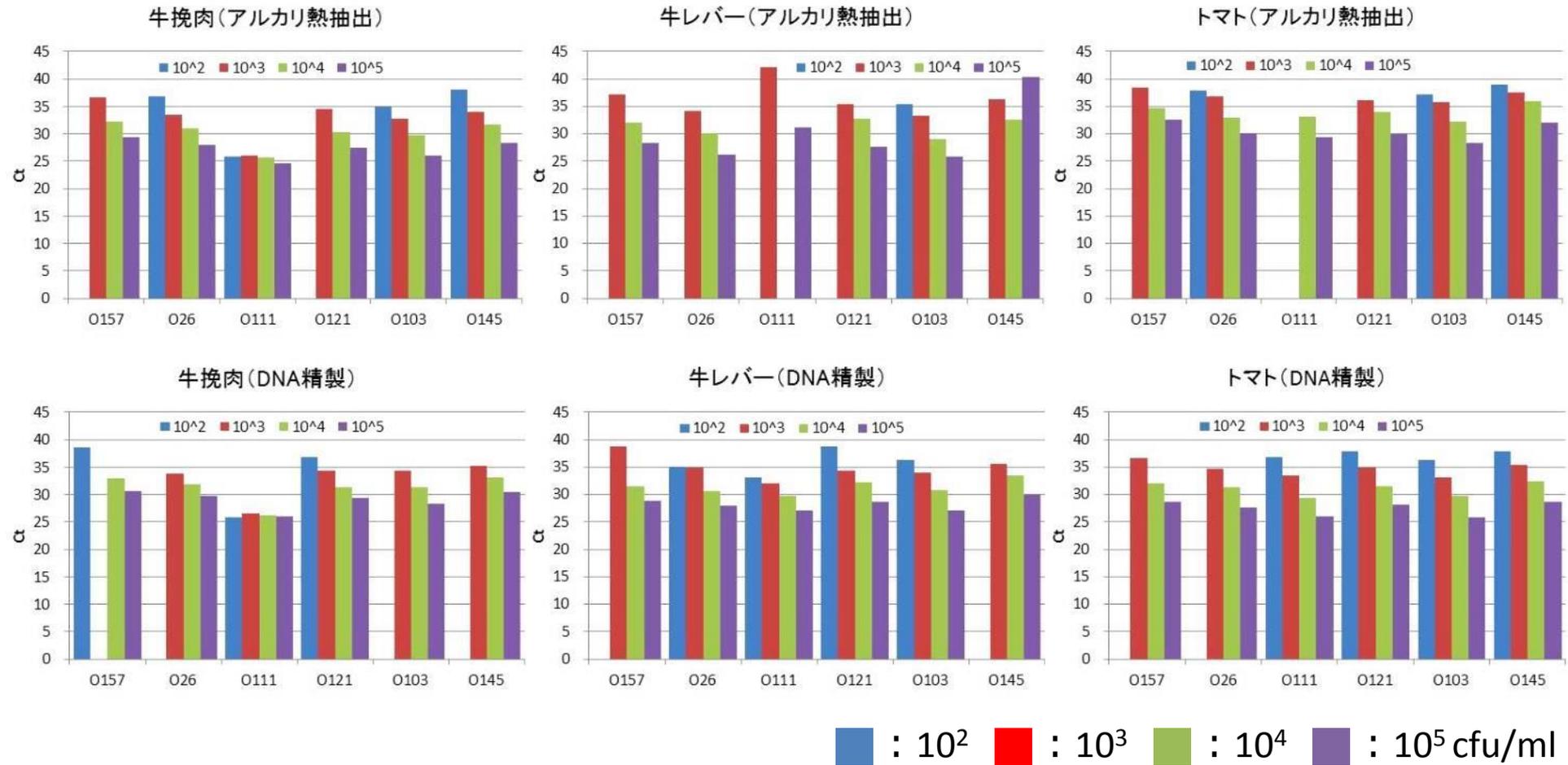
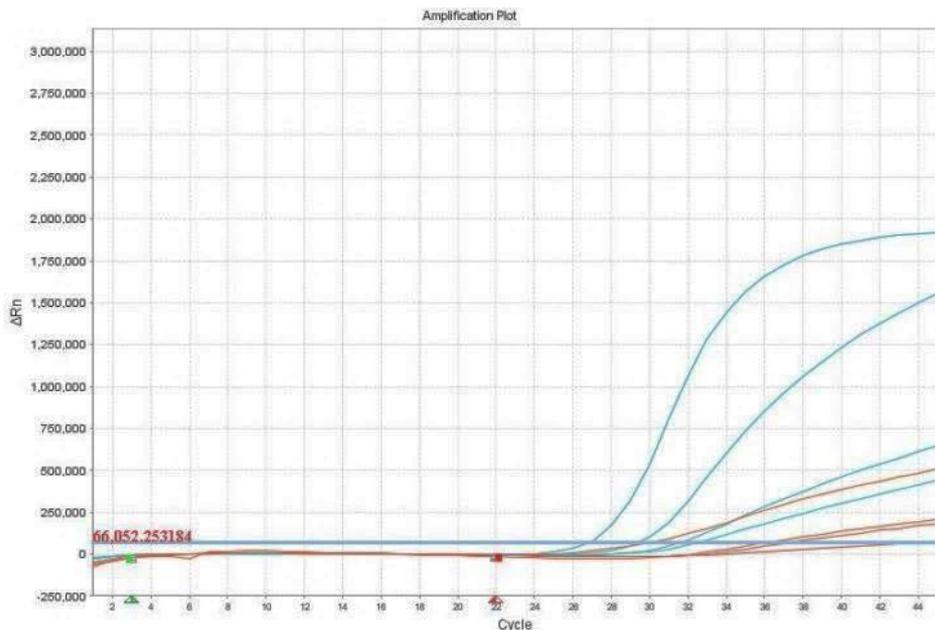


図1 DNA抽出法の違いによるCt値の比較

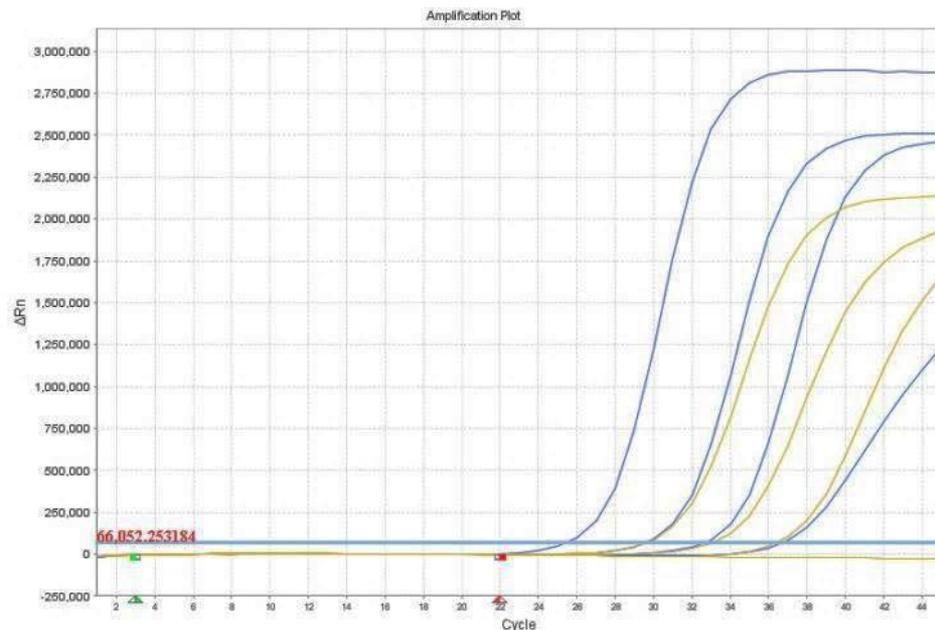
結果 | アルカリ熱抽出法とDNA精製キットの比較

PCR阻害が生じた例



牛レバー(O111検出系)
青: DNA精製キット
赤: アルカリ熱抽出

反応性が良好な例



トマト(O111検出系)
青: DNA精製キット
黄: アルカリ熱抽出

図2 DNA抽出法の違いによる増幅曲線の比較

結果 | 市販DNA精製キットの比較

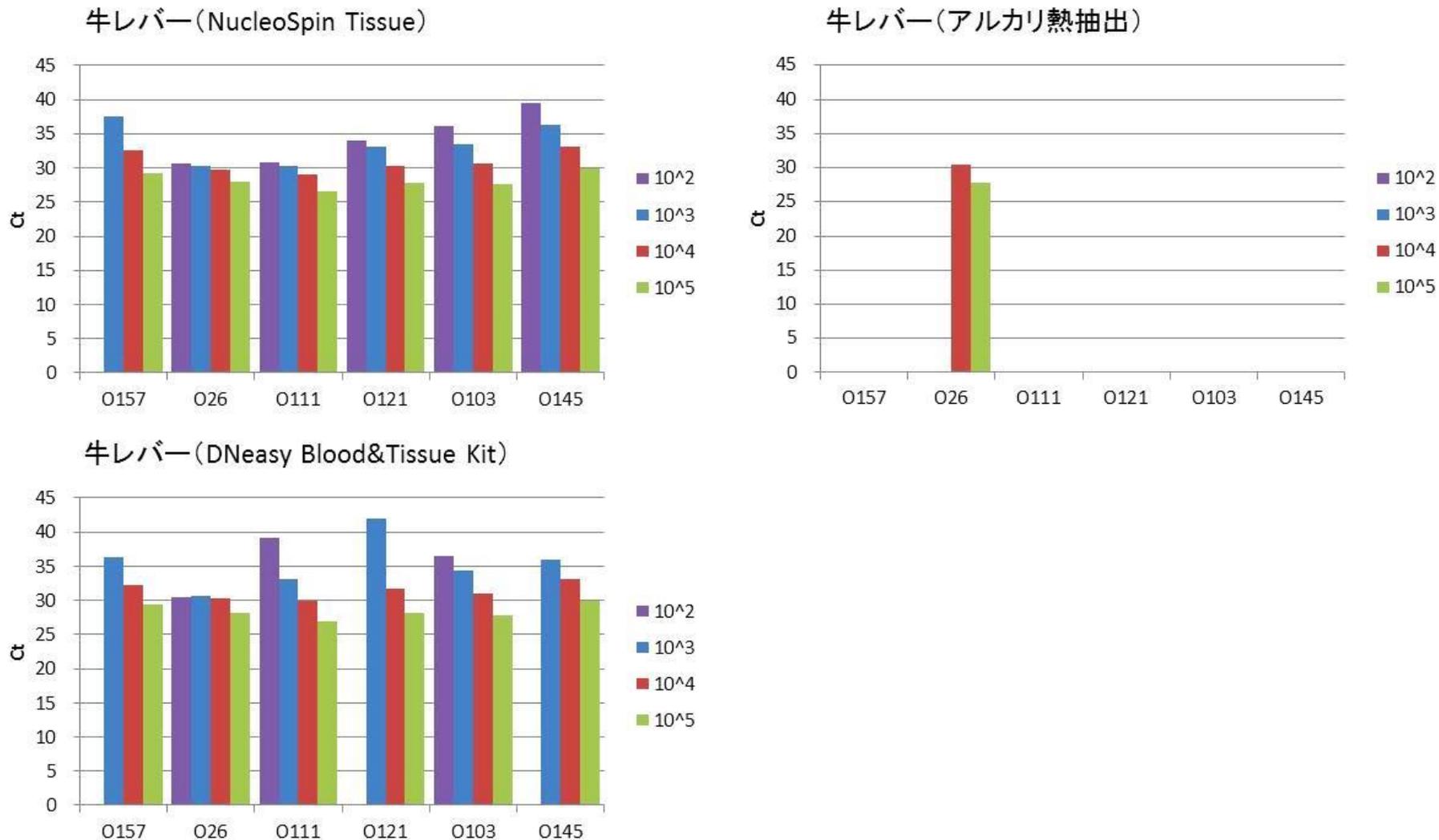


図3 市販DNA精製キットの違いによるCt値の比較

結果 | 市販DNA精製キットを用いた感度の確認

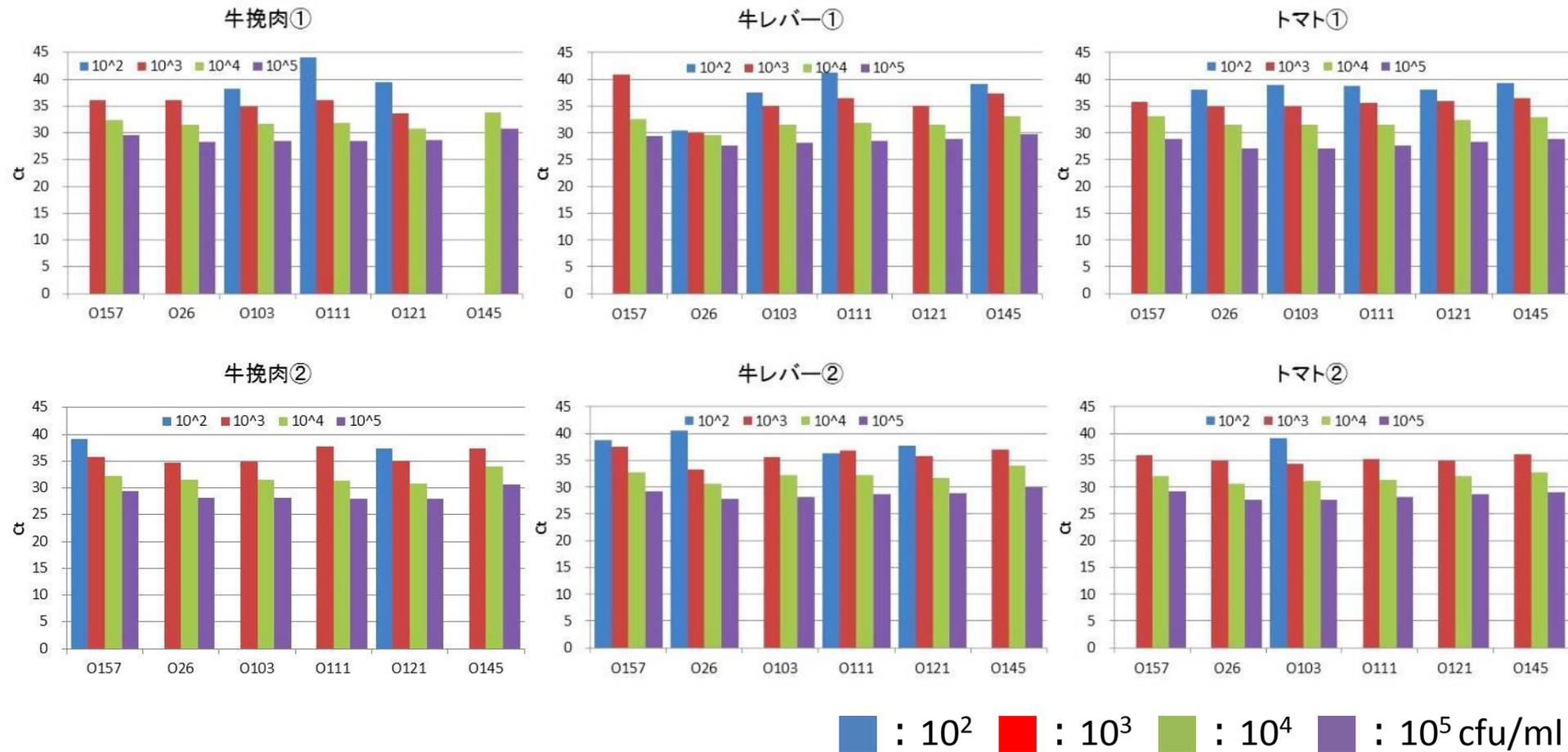


図5 市販DNA精製キットを用いた感度の確認

まとめ

アルカリ熱抽出では、牛レバーおよび牛ひき肉でPCR阻害が生じた。

市販DNA精製キットを用いることで改善が認められ、通知法で求める最低検出感度（ 10^4 cfu/ml）で検出可能であった。

以上より、検査対象とする食品の種類によってはアルカリ熱抽出法以外でのDNA抽出を考慮する必要があるが、本キットにより各O抗原遺伝子のスクリーニングに利用できると考えられる。