

マルチプレックスPCRキット

腸内細菌遺伝子検出キット-マルチPCR-

検便検体から、食中毒原因菌をマルチプレックスPCRにて検出する試薬です。

腸内細菌遺伝子検出キット-マルチPCRは、食中毒原因菌として知られるサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌の遺伝子を、マルチプレックスPCRで検出する試薬です。



特長1 簡便

- 検便懸濁液を加熱・遠心分離するだけでPCRに使えます。
東洋紡独自技術で核酸精製不要のPCRを実現しました。検便試料を水に懸濁し加熱処理と遠心分離を行ったものをPCRに使用します。面倒なDNA精製は必要ありません。
- バンドの出現で、菌の種類と存在を判別できます。
マルチプレックスPCRにより、3菌種を一つの反応で検出します。それぞれの菌種で、増幅されるDNAの長さが異なります。電気泳動でその長さを判定して、菌種を判別します。難しいコロニー判定の必要はありません。

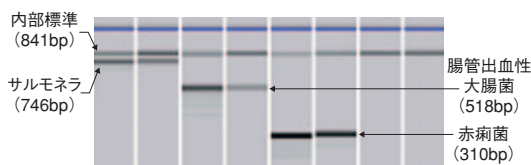


図1. PCR産物の電気泳動イメージ
サルモネラ、EHEC O157、赤痢菌の陽性検体を、本キットを用いたPCRに供した場合の電気泳動イメージです。陽性検体の場合、図に示したようなバンドが検出されます。

特長2 高感度

- 平板選択培地での培養に対し100倍の感度。
東洋紡独自の反応液、プライマー、そしてステップダウンサイクルPCRの組み合わせで高感度、高特異性のPCRを実現しました。各菌種で平板選択培地による培養法に比べ約100倍の検出感度を示します。

* ステップダウンサイクルPCR

サイクル数が進行するにつれてアニーリング温度を下げていく設定です。アニーリング温度の高いステップを先行し特異性の高い増幅を優先させた後、アニーリング温度を下げながら増幅量を優先させるサイクルを行います。

表1. 接種糞便試料を用いた生菌検出限界濃度の検討

	接種生菌数 (cfu/g)	検出結果					
		0	7×10^2	7×10^3	7×10^4	7×10^5	7×10^6
サルモネラ	培養法	-	-	-	+	+	+
	本キットPCR法	-	+	+	+	+	+
EHEC O157	培養法	-	-	-	+	+	+
	本キットPCR法	-	+	+	+	+	+
赤痢菌	培養法	-	-	-	-	+	+
	本キットPCR法	-	+	+	+	+	+

生菌数が既知のサルモネラ、EHEC O157、赤痢菌の培養液を陰性糞便試料に接種し各種濃度の接種糞便試料を作製しました。これを、培養法および本キットを用いたPCRで検出に供しました。

特長3 検体のプールが可能

- 検出感度が高いため検体をプールすることが可能です。
50検体をプールして平板選択培地での培養法と同等以上の感度です

表2. 接種糞便試料と陰性糞便試料をプールした場合の生菌検出限界濃度の検討

	接種生菌数 (cfu/g)	プール数										培養法	
		1	10	20	40	50	60	70	80	90	100		
サルモネラ	7×10^2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7×10^3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	7×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EHEC O157	7×10^2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7×10^3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	7×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
赤痢菌	4×10^2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4×10^3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

生菌数が既知のサルモネラ、EHEC O157、赤痢菌の培養液を陰性糞便試料に接種し各種濃度の接種糞便試料を作製しました。これを、陰性糞便試料と混合プールしました。プールした試料の数は1から100までそれぞれ表に記載したものです。このプールした試料を培養法および本キットを用いたPCRで検出に供しました。

実施例 検便検体スクリーニングへの応用

1. 目的

食中毒予防を目的とした調理従事者の検便検査は大量の検体を処理する必要があります。本キットを用いたプールPCR法でスクリーニングを行った場合の、従来の培養法との相関と、どの程度の陰性検体を排除できるかについて検討しました。

2. 方法

あらかじめ培養法にて陽性判定された12検体（サルモネラ陽性8検体、腸管出血性大腸菌陽性4検体）および陰性判定された1,988検体、合計2,000検体を対象に、以下の2つの方法で検査を行いました。

1) 培養法

すべての検体を培養法で検査しました。

2) スクリーニングを行う方法

検体懸濁液を50検体分プールし、本キットでマルチプレックスPCRを行いました。陽性となったプールに含まれる検体を各々個別に培養法で検査し、陽性検体を検出しました。

*培養法

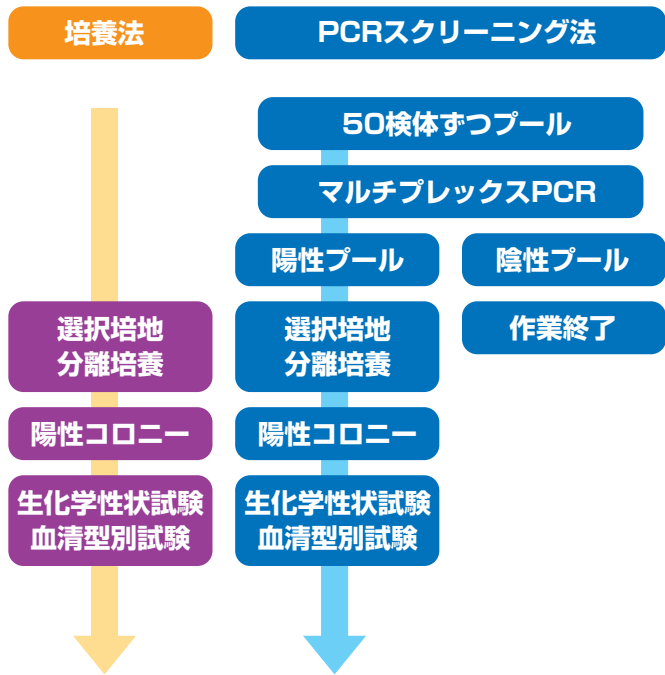
SS Plus寒天平板培地、CT-SMAC寒天平板培地、CT-RMAC寒天平板培地に検体を塗布後37℃、20時間培養し、コロニーの形成を観察しました。サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌が疑われるコロニーを3～5個釣菌し、生化学性状試験、血清型別試験を行いました。

3. 結果

1)の培養法で検出されたすべての陽性検体が、2)の方法でスクリーニングを行った場合でも陽性として検出されました。一方、スクリーニングでサルモネラ陽性と検出されましたが、培養法で陰性となった検体が1検体ありました。従い、(1)の培養法に対し、(2)のスクリーニングを行う方法は感度（陽性一致率）100%（12/12）、特異度（陰性一致率）99.95%（1987/1988）となりました。

4. 考察

陽性率をサルモネラ0.05%、腸管出血性大腸菌0.02%、赤痢菌0.001%未満と仮定し、これに本方法の感度が100%、特異度が99.95%であることを加味すると、通常の検査では**94%の陰性検体を培養法を経ずに排除できると算定されます**。本方法は十分に有効なスクリーニング方法であると思われます。



		腸内細菌遺伝子検出キット-マルチPCR-					
		サルモネラ		腸管出血性大腸菌		赤痢菌	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
培養法	陽性	8	0	4	0	0	0
	陰性	1	1991	0	1996	0	2000

品名および内容		包装	保存温度	Code No.	価格
腸内細菌遺伝子検出キット-マルチPCR-		500回用*	-20℃	FIK-101	¥150,000
2×PCR Master Mix	1ml×5本				
10×Primer Mix UNG (Uracil-DNA Glycosylase)	1ml×1本 200μl×1本				

*PCR 500回分、50検体プール時 検便検体25,000検体を処理可能です。

・本キットは株式会社らいふと共同開発された製品です。

*詳細は東洋紡・ライフサイエンス事業部（担当：荒川 taku_arakawa@toyobo.jp）までお問い合わせください。