

## 2 飼料中のサルモネラ 7 血清型のマルチプレックス PCR 法による迅速同定法の開発及び共同試験

関口 好浩<sup>\*1</sup>, 近藤 勝<sup>\*1</sup>, 笠原 正輝<sup>\*1</sup>,  
嶋村 知紗<sup>\*2</sup>, 浅尾 美由起<sup>\*3</sup>, 山多 利秋<sup>\*4</sup>

### Development and Collaborative Study of Rapid Identification Method of Seven Serovars *Salmonella* in Feed Using Multiplex PCR

Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*1</sup>, Masaru KONDO<sup>\*1</sup>, Masaki KASAHARA<sup>\*1</sup>,  
Chisa SHIMAMURA<sup>\*2</sup>, Miyuki ASAO<sup>\*3</sup> and Toshiaki YAMATA<sup>\*4</sup>

(<sup>\*1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)  
(Now Kobe Regional Center, FAMIC),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC,

<sup>\*3</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Audit Office, FAMIC),

<sup>\*4</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau,  
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

We have developed a rapid identification method of seven serovars of *Salmonella* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*), *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, and *S. Typhimurium*) in feeds using multiplex PCR, and conducted a collaborative study.

In the multiplex PCR method, a sample was incubated in buffered peptone water at 35~37 °C for 18~24 hours. Then, DNA extraction from the supernatant with InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories; California, USA) and Ethachinmate (Nippon Gene; Tokyo, Japan) was performed. The PCR was conducted in a reaction solution which contained the extracted DNA, seven multiplex primer sets for detecting target-serovar (Hokkaido System Science; Sapporo, Japan) and KOD-FX (Toyobo; Osaka, Japan). The amplicon was subsequently separated by the electrophoresis through 2.5 w/v% agarose gel, and stained with ethidium bromide. After the electrophoresis, the test result was examined according to the presence of the amplicons with the identical size of the positive target serovar DNA fragment.

The seven multiplex primer sets were able to determine whether 128 *Salmonella* strains with 50 serovars (including 102 strains isolated from feeds) were the relevant serovars. Minimum concentrations of *Salmonella* in buffered peptone water with which we could successfully identify *Salmonella* serovars using multiplex PCR method ranged 10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup> CFU/mL for almost all of eight sample feed ingredients and seven feed samples.

A collaborative study was conducted in six laboratories, which used five sample feed ingredients and three feed samples inoculated with *Salmonella*. All laboratories correctly detected the seven serovars of *Salmonella* inoculated in samples.

Furthermore, a comparison between multiplex PCR method and reference method (culture

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 神戸センター

<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 業務監査室

<sup>\*3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

<sup>\*4</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 農林水産省消費・安全局

method) was performed for 272 commercial feed samples. Excluding two samples which inhibited PCR, 270 samples were correctly identified as negative to seven serovars. While rapid *Salmonella* detection with *invA* gene was also studied, it was found further investigations were necessary because of high false positive ratio of 4.9 % to 14.3 %.

However, the multiplex PCR method mentioned above was thus validated and established as adequate for use in inspections of *Salmonella* in feed.

**Key words:** feeds; *Salmonella* Choleraesuis; *Salmonella* Dublin; *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Gallinarum; *Salmonella* Hadar; *Salmonella* Infantis; *Salmonella* Typhimurium; multiplex PCR; rapid identification; collaborative study

**キーワード:** 飼料; *Salmonella* Choleraesuis; *Salmonella* Dublin; *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Gallinarum; *Salmonella* Hadar; *Salmonella* Infantis; *Salmonella* Typhimurium; マルチプレックス PCR; 迅速同定法; 共同試験

## 1 緒 言

飼料のサルモネラ汚染は、家畜・家きんのサルモネラ感染源となり、また、畜産食品が汚染されることにより人の食中毒の原因ともなり得ることから、家畜衛生だけでなく公衆衛生の面からも重要な問題である<sup>1)</sup>。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）は、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>3)</sup>に基づき、飼料中のサルモネラのモニタリング検査を1976年から実施しており、その試験法としては飼料分析基準<sup>4)</sup>第18章1の1.1の培養法（以下「培養法」という。）を用いている。

家畜伝染病予防法<sup>2)</sup>では、サルモネラのうち、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (biovar Pullorum 及び biovar Gallinarum を含む)（以下「*S. Gallinarum*」と略記する。他の血清型も以下同様に略記する。）が家畜伝染病の病原体、*S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis* 及び *S. Typhimurium* が届出伝染病の病原体として指定されている。これらが飼料から検出された場合には、家畜の伝染性疾病の発生予防及びまん延防止のための迅速な対応が必要となるが、培養法では、結果が判明するまでに4~6日間を要し、陽性の場合、分離菌の血清型別までは10日間程度を要することから、より短時間でサルモネラの血清型を同定する方法が求められている。

サルモネラの血清型を迅速に同定する方法としては、マルチプレックス PCR を使った方法が報告されている<sup>5), 6)</sup>。秋庭ら<sup>7)</sup>は、食の安全と動物の健康に脅威を及ぼすことが知られている主要な血清型として、上記5血清型に *S. Hadar* 及び *S. Infantis* を加えた7血清型のサルモネラ（以下「主要血清型」という。）を迅速に同定できるプライマーを開発した。

そこで、本研究では、飼料中の主要血清型を迅速に同定する方法として、秋庭らの開発したプライマーを用いたマルチプレックス PCR 法による迅速同定法及び飼料中のサルモネラの有無を迅速に判定する方法として、*invA* 検出用プライマーを用いたサルモネラの迅速検出法を開発するとともに、共通試料による共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 分析法開発

#### 2.1.1 試験菌株

Table 1 のとおり，FAMIC で実施している飼料のモニタリングにおいて飼料から分離された菌株並びに北里大学，農林水産省動物医薬品検査所及び独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所（現：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門）から分与された菌株の計 128 株（50 血清型）を検討に用いた．試験菌株は，試験開始まで 10 % スキムミルク中で $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した．

Table 1 Serovars of *Salmonella* used in this study

Serovar	Number of strains used in this study	Number of strains isolated from feed	Serovar	Number of strains used in this study	Number of strains isolated from feed
Agona	8	8	Livingstone	8	8
Albert	1	1	London	1	0
Amsterdam	1	1	Mbandaka	1	1
Anatum	2	2	Meleagridis	1	0
Bareilly	9	9	Menston	1	1
Blockley	1	0	Minnesota	1	1
Cerro	7	7	Montevideo	2	2
Choleraesuis	1	0	Muenster	1	1
Cubana	1	0	Newport	2	2
Derby	1	1	Ohio	2	2
Dublin	1	0	Orion	1	1
Enteritidis	1	0	Oslo	1	0
Fyris	2	2	Putten	1	1
Gallinarum	1	0	Rissen	1	1
Gaminara	2	2	Senftenberg	13	13
Give	1	0	Singapore	1	0
Hadar	1	0	Sofia	1	0
Havana	9	9	Tennessee	6	6
Heidelberg	1	0	Thompson	1	0
Infantis	4	4	Typhimurium	11	6
Isangi	3	3	Weltevreden	4	4
Krefeld	1	0	Wippra	1	0
Lexington	1	0	Worthington	1	0
Lille	1	0	O18:z4,z23:-	1	1
Liverpool	1	0	O3,10:g,m,s	2	2
			Total	128	102

#### 2.1.2 試料

検討に用いた試料は，全て試験開始まで冷蔵庫中 $4^{\circ}\text{C}$  で保管した．

##### 1) 抽出方法及び菌濃度検討用試料

飼料等製造工場において採取した飼料原料 8 種類 11 点及び配混合飼料 7 種類 8 点の計 19 点を試料として用いた。これらは、あらかじめ培養法に従いサルモネラが陰性であることを確認した。

## 2) 陽性試料

平成 10 年度から平成 25 年度までに FAMIC が採取した試料のうち、培養法により陽性とされた試料 44 点（配混合飼料 14 点、動物性飼料原料 26 点、植物性飼料原料 4 点）を用いた。

## 3) モニタリング用試料

平成 26 年 4 月から 12 月までに FAMIC が採取した試料 272 点（配混合飼料 111 点、動物性飼料原料 122 点及び植物性飼料原料 39 点）を用いた。

### 2.1.3 試薬

- 1) 水酸化ナトリウム、塩酸及び塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。水は、RFD230RA (ADVANTEC 製) により精製した蒸留水 (JIS K0211 の 5213 に定義された蒸留水)、Direct-Q 3 UV (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) 及び超純水を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 分間以上) で処理した滅菌超純水を用いた。
- 2) ブレインハートインフュージョン寒天培地 Brain Heart Infusion Agar (Difco 製) 52 g に水を加えて 1000 mL とし、沸騰水浴中で加熱して溶かした。これをペトリ皿に一樣に広がるように 20 mL 分注し、水平に静置させて凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた。
- 3) ハートインフュージョン寒天培地 Heart Infusion Agar (Difco 製) 40 g を水 1000 mL に加え、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌し、これをペトリ皿に一樣に広がるように 20 mL 分注した。水平に静置して凝固させた後、培地表面を乾燥させた。
- 4) トリプトソイブイオン培地 トリプトソイブイオン培地 (栄研化学製) 30 g を水 1000 mL に溶かし、中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 5) 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 水酸化ナトリウム 0.1 g に超純水 100 mL を加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 6) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (生化学用) 12.1 g に超純水 60 mL を加え、更に塩酸 4.2 mL を加えて溶かし、塩酸で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 7) 生理食塩液 塩化ナトリウムを 0.9 w/v% となるように超純水を加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 8) Ethachinmate ニッポンジーン製
- 9) MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII ジーエルサイエンス製
- 10) QIAamp DNA stool QIAGEN 製
- 11) DNeasy Blood & Tissue QIAGEN 製
- 12) MagExtractor 東洋紡製
- 13) InstaGene Matrix Bio-Rad Laboratories 製
- 14) TE 緩衝液 TE pH 8.0 ニッポンジーン製
- 15) プライマー 血清型毎に 4 つの特異的な遺伝子配列を増幅させる *S. Choleraesuis* 検出用プライマーセット, *S. Dublin* 検出用プライマーセット, *S. Enteritidis* 検出用プライマーセット,

*S. Gallinarum* 検出用プライマーセット, *S. Hadar* 検出用プライマーセット, *S. Infantis* 検出用プライマーセット, *S. Typhimurium* 検出用プライマーセット<sup>7)</sup> (全て北海道システム・サイエンス製) を用いた。

16) 10  $\mu\text{mol/L}$  プライマー混合溶液 プライマーを TE 緩衝液で 100  $\mu\text{mol/L}$  に溶解した後, 血清型毎に必要なプライマーと滅菌超純水とを混合し 10  $\mu\text{mol/L}$  プライマー混合溶液とした。

17) PCR 緩衝液 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX 東洋紡製

18) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2 mmol/L dNTPs 東洋紡製

19) DNA ポリメラーゼ液 KOD FX (1.0 unit/ $\mu\text{L}$ ) 東洋紡製

20) 陽性対照 陽性対照調製のための標準菌株として, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所から分与された *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar* 及び *S. Typhimurium*, 北里大学から分与された *S. Enteritidis*, FAMIC が飼料から分離した *S. Infantis* をそれぞれ用いた。

これら標準菌株をそれぞれブレインハートインフュージョン寒天培地で培養した後, 得られた集落を 1 個釣菌し, 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50  $\mu\text{L}$  中に懸濁させた。懸濁させた菌液をアルミブロック恒温槽で 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間加熱した後放冷した。1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4  $\mu\text{L}$  を混合して中和した後, 10000 $\times g$  で 5 分間遠心分離した上澄み液に滅菌超純水を加え, 1 mL 中に DNA として 10  $\mu\text{g}$  以上を含有する各血清型の陽性対照を調製した。

21) PCR 反応液 滅菌超純水 1  $\mu\text{L}$ , PCR 緩衝液 25  $\mu\text{L}$ , 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  プライマー混合溶液 12  $\mu\text{L}$  及び DNA ポリメラーゼ液 1  $\mu\text{L}$  を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について, 必要本数分の量をそれぞれプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に加えて調製した。

22) PCR 反応液 (阻害確認用) 21)において滅菌超純水 1  $\mu\text{L}$  を陽性対照 1  $\mu\text{L}$  に代えて調製したものを用いた。

23) TAE 緩衝液 50 $\times$ TAE (ニッポンジーン製) 20 mL を水で希釈して 1000 mL とした。

24) 2.5 %アガロースゲル Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 沸騰水浴中で加熱して溶かし, ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル形成型に流し込み, ゲルとコームの間に入らないよう慎重にコームを差し込み, 室温で静置して固化させた。

25) 電気泳動用色素溶液 6 $\times$ Loading dye タカラバイオ製

26) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder タカラバイオ製

27) ゲル染色液 臭化エチジウム 10 mg を水 1 mL に溶かして臭化エチジウム原液を調製し, 使用時にこの原液 50  $\mu\text{L}$  に TAE 緩衝液 1000 mL を加えて染色液とした。

#### 2.1.4 装置及び器具

1) アルミブロック恒温槽: Dry Thermo Unit DTU-2C タイテック製

2) DNA 増幅装置: PE9700 型 Applied Biosystems 製

3) 電気泳動装置: Mupid2 又は Mupid-exU アドバンス製

4) 電気泳動パターン撮影システム: AE-6911CX 又は AE-6932GXES-U アトー製

### 2.1.5 試験方法

#### 1) 前増菌培養

培養法の前増菌培養の方法によった。

#### 2) DNA 抽出

1)で得られた前増菌培養液の上澄み液 200  $\mu\text{L}$  をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、13000 $\times g$  で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去した。更に、1 mL の生理食塩液を添加し攪拌により懸濁後、13000 $\times g$  で 1 分間遠心分離し、上澄み液を除去した。

上澄み液を取り除いたマイクロチューブに InstaGene Matrix 200  $\mu\text{L}$  を先のマイクロチューブに添加し、懸濁させた後、水浴中で 56  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間加温を行った。10 秒間攪拌した後、アルミブロック恒温槽で 100  $^{\circ}\text{C}$ 、8 分間加熱・溶菌した。10 秒間攪拌した後、13000 $\times g$  で 3 分間遠心分離し、上澄み液 100  $\mu\text{L}$  を新しいマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に移した。

分取した上澄み液に 3 mol/L 酢酸ナトリウム 3.3  $\mu\text{L}$  を加えて混合した後、Ethachinmate 1  $\mu\text{L}$  を加えて 10 秒間攪拌した。エタノール 250  $\mu\text{L}$  を加え、10 秒間攪拌した後、12000 $\times g$  で 5 分間遠心分離した。上澄み液を除去し、70 v/v%エタノール 1 mL を加えて DNA ペレットを洗浄し、12000 $\times g$  で 5 分間遠心分離した。上澄み液を除去し、減圧乾燥した後、超純水 20  $\mu\text{L}$  を加えて溶かしたものを DNA 試料液として用いた。

#### 3) 試料溶液等の調製

各血清型につき、PCR 反応液 49  $\mu\text{L}$  を PCR チューブ（容量 200  $\mu\text{L}$ ）に入れ、DNA 試料液 1.0  $\mu\text{L}$  を加えて振り混ぜ、PCR 反応に供する試料溶液とした。また、PCR 反応液（阻害確認用）49  $\mu\text{L}$  を別の PCR チューブに入れ、DNA 試料液 1.0  $\mu\text{L}$  を加えて同様に操作し、阻害確認用試料溶液を調製した。同時に、陽性対照 1.0  $\mu\text{L}$  及び滅菌した超純水 1.0  $\mu\text{L}$  をあらかじめ PCR 反応液 49  $\mu\text{L}$  を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し、陽性対照液及び陰性対照液を調製した。なお、本研究において、阻害確認用試料溶液は実試料によるモニタリングでのみ調製した。

#### 4) PCR 反応

各試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、PCR 反応を行った。反応条件を Table 2 に示した。

Table 2 Reaction conditions of PCR

Thermal cycler	GeneAmp System 9700
Cycle conditions	94 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 2 min) $\rightarrow$ [ 98 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 10 s) $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 30 s) $\rightarrow$ 68 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 30 s) ] $\times$ 35 cycles
Mode	9600 Emulation

#### 5) 電気泳動

TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた電気泳動装置にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行った。PCR 反応の終了した試料溶液、阻害確認用試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液及び DNA 分子量マーカー各 5  $\mu\text{L}$  に電気泳動用色素溶液 1  $\mu\text{L}$  をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行った。電気泳

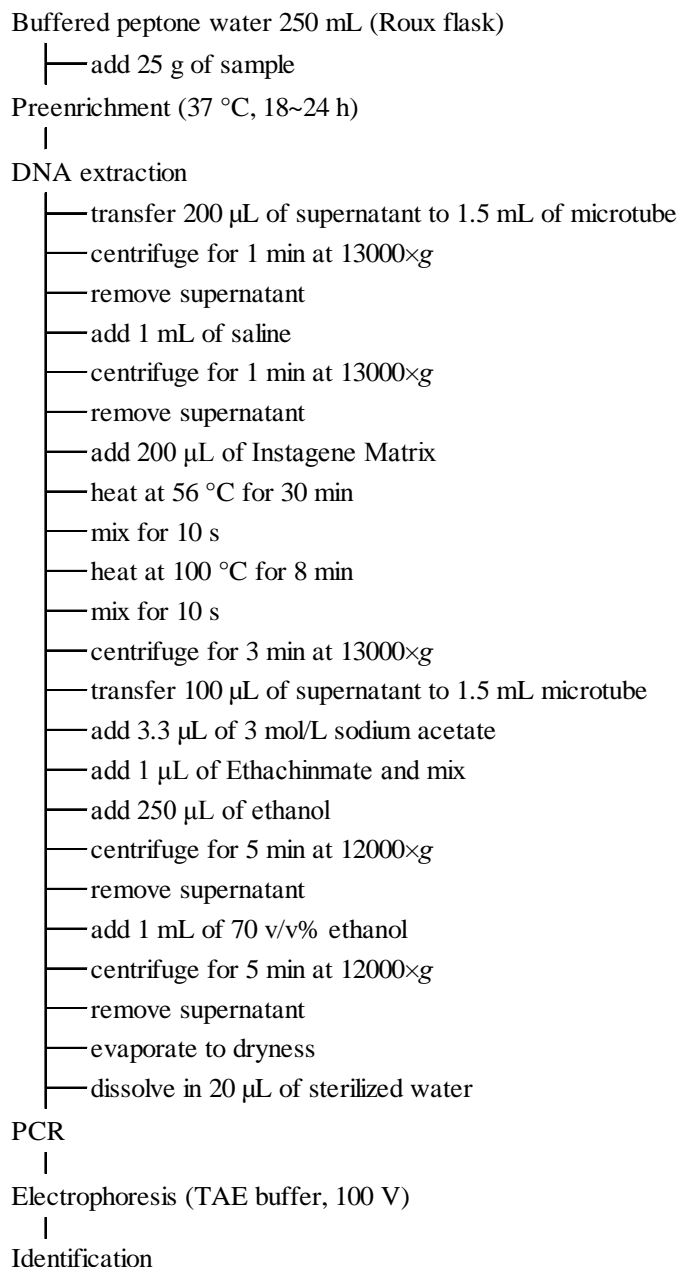
動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、電気泳動パターン撮影システムで 365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認した。

#### 6) 判定

陽性対照液において各血清型に対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において各血清型検出用プライマーセットに対応する 4 つの検出サイズの PCR 増幅産物がすべて検出された場合に、当該血清型検出用プライマーに対応するサルモネラが陽性と判定した。ただし、阻害確認用試料溶液で PCR 増幅産物が検出されない場合は、PCR 反応を阻害する成分が含まれている疑いがあることから、当該試料溶液についての判定は行わなかった。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行った。

なお、本法の概要を Scheme 1 に示した。また、各血清型検出用プライマーセットによる増幅産物のサイズは Table 3 のとおりであり、各血清型検出用プライマーセットには、ほとんど全てのサルモネラが持っている侵入性関連遺伝子 *invA* を検出するプライマーが含まれている。



Scheme 1 Analytical procedure for *Salmonella* in feeds

Table 3 Amplicon size of each serovar detecting primer set<sup>a)</sup>

<i>Salmonella</i> serovar	Amplicon size/base pairs
Choleraesuis	100, 198, 305, 605
Dublin	105, 203, 296, 605
Enteritidis	101, 203, 299, 605
Gallinarum	97, 206, 301, 605
Hadar	105, 199, 303, 605
Infantis	95, 198, 304, 605
Typhimurium	94, 196, 303, 605

a) All multiplex primer sets include common primer pair to detect *invA* gene (amplicon size: 605 base pairs).



## 2.1.6 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性

2.1.1 の試験菌株をブレインハートインフュージョン寒天培地上で 37 °C で 18~24 時間培養した後、得られた集落を 1 個釣菌し、25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL に懸濁させた後、2.1.7 の 1) のアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

## 2.1.7 DNA 抽出方法の検討

2.1.2 の 1) の試料のうち米ぬかを用い、2.1.5 の 1) により前増菌培養した *S. Choleraesuis* をトリプトソイブイオン培地で 37 °C で 20~24 時間培養し、前増菌培養の上澄み液を用いて段階希釈し  $10^5$ ~ $10^6$  CFU/mL の菌液を調製した。得られた菌液を、2.1.5 の 2) 及び次の 1) から 7) の計 8 通りの方法で DNA を抽出した後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

### 1) アルカリ熱抽出法

菌液 50 µL を 3000×g で 20 分間遠心分離し上澄み液を除去したものに 25 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL を加えて懸濁させた。懸濁させた菌液をアルミブロック恒温槽で 95 °C、5 分間加熱した後放冷した。1 mol/L トリス塩酸緩衝液 4 µL を混合して中和した後、10000×g で 5 分間遠心分離した上澄み液を DNA 試料液として用いた。10 倍希釈については、この上澄み液を滅菌超純水で 10 倍希釈した。

### 2) アルカリ熱抽出-Ethachinmate 抽出法

1) に従い調製した遠心分離後の上澄み液 20 µL を新しいマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 0.66 µL を加えて混合した後、Ethachinmate 1 µL を加えて 10 秒間攪拌した。エタノール 50 µL を加え、10 秒間攪拌した後、12000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去した。上澄み液を除去したマイクロチューブに 70 v/v% エタノールを 1 mL 加えて DNA ペレットを洗浄し、12000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、減圧乾燥した後、滅菌超純水 20 µL を加えて溶かしたものを DNA 試料液として用いた。

### 3) MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、20000×g で 2 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

### 4) QIAamp DNA stool 抽出法

マイクロチューブ（容量 2.0 mL）に菌液 200 µL を入れ、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

### 5) DNeasy Blood & Tissue 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、5000×g で 10 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

### 6) MagExtractor 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、6000×g で 5 分間遠心分離し上澄み液を除去した後、キット添付の説明書に従い DNA 試料液を調製した。

### 7) InstaGene Matrix 抽出法

マイクロチューブ（容量 1.5 mL）に菌液 200 µL を入れ、13000×g で 1 分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、生理食塩液 1 mL を添加し攪拌により懸濁後、13000×g で 1 分間遠心分離

し、上澄み液を除去した。

上澄み液を取り除いたマイクロチューブに InstaGene Matrix 200  $\mu\text{L}$  を添加し、懸濁させた後、水浴中で 56  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間加温を行った。加温後、10 秒間攪拌した後、アルミブロック恒温槽で 100  $^{\circ}\text{C}$  で 8 分間加熱・溶菌し、10 秒間攪拌した後、13000 $\times\text{g}$  で 1 分間遠心分離し、上澄み液を DNA 試料液として用いた。

#### 2.1.8 前増菌培養液中での検出可能な菌濃度の検討

2.1.2 の 1) の試料を 2.1.5 の 1) により前増菌培養した。各主要血清型をトリプトソイブイオン培地で 37  $^{\circ}\text{C}$  で 20~24 時間培養し、前増菌培養の上澄み液を用いて段階希釈し  $10^2\sim 10^6$  CFU/mL の菌液を調製した。得られた菌液を用い、2.1.5 の 2) 又は 2.1.7 の 1) により DNA 抽出を行った後、2.1.5 の 3) から 6) により血清型の同定を行った。

#### 2.1.9 *invA* を指標としたサルモネラ迅速検出法（以下「迅速検出法」という。）

*S. Enteritidis* 検出用プライマーセット及び *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットのみを用いて、2.1.5 の 1) から 5) により試験を行った。

判定は、陽性対照液において *invA* 検出用プライマーに対応する PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において *invA* 検出用プライマーに対応する PCR 増幅産物が検出された場合に、サルモネラ陽性と判定した。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行った。

#### 2.1.10 2.1.7 及び 2.1.8 で用いた菌液の菌濃度の測定

2.1.7 の検討においては、トリプトソイブイオン培地で培養した菌液を、2.1.8 の検討においては前増菌培養の上澄み液を菌数の測定に用いる菌液とした。

菌液を生理食塩液で  $10^1\sim 10^9$  倍に段階希釈した後、滅菌ペトリ皿に  $10^5\sim 10^9$  倍の希釈菌液 1 mL を滴下し、ハートインフュージョン寒天培地 9 mL と混和し固めた。表面の水滴が消えるまで乾燥した後、さらにハートインフュージョン寒天培地 10 mL を分注し固めた。同様に培地表面を乾燥し、35~37  $^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間ペトリ皿を倒置して培養した。各希釈濃度あたり 3 枚調製した。

培養後、30~300 個の集落を形成したペトリ皿の平均集落数を求め、その希釈倍率から菌濃度を求めた。

## 2.2 共同試験

### 2.2.1 共同試験用試料

#### 1) 菌液添加用試料

培養法によりサルモネラ陰性であることを確認した成鶏飼育用配合飼料及び魚粉を約 100 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 1 袋を菌液添加用試料として各試験室に送付した。

#### 2) DNA 抽出液

培養法によりサルモネラ陰性であることを確認したビールかす、肉用牛肥育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、チキンミール、フェザーミール及び大豆油かすを 2.1.5 の 1) により前増菌培養した。標準菌株の *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum* 及び *S. Hadar* 各 1 白金耳をトリプトソイブイオン培地 10 mL で 35~37  $^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間培養した後、75  $^{\circ}\text{C}$

の水浴で1分間以上加熱することにより死滅させた。前増菌培養液の上澄み 4.5 mL に、死滅させた菌液又は生理食塩液 500  $\mu$ L を添加し混合した。肉用牛肥育用配合飼料には *S. Typhimurium*，肉豚肥育用配合飼料には *S. Choleraesuis*，チキンミールには *S. Dublin*，フェザーミールには *S. Gallinarum*，大豆油かすには *S. Hadar*，ビールかすには生理食塩液をそれぞれ添加し、2.1.5 の 2) に従い DNA 試料液を調製した。これらを約 20  $\mu$ L ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）を DNA 抽出液として各試験室に送付した。

なお、各標準菌株のトリプトソイブイオン培地での培養後の菌濃度は、2.1.10 により測定した。

### 2.2.2 配付試薬

- 1) Ethachinmate
- 2) InstaGene Matrix
- 3) 10  $\mu$ mol/L プライマー混合溶液  
2.1.3 の 16) と同様に調製した。
- 4) PCR 緩衝液
- 5) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液
- 6) DNA ポリメラーゼ液
- 7) 陽性対照  
2.1.3 の 20) と同様に調製した。
- 8) 添加用菌液

標準菌株の *S. Enteritidis* 及び *S. Infantis* 各 1 白金耳をトリプトソイブイオン培地 10 mL で 35~37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した後、75  $^{\circ}$ C の水浴で1分間以上加熱することにより死滅させたもの、並びに生理食塩液を約 5 mL ずつ小分けしたもの（菌種名は非明示）を添加用菌液として各試験室に送付した。

なお、各標準菌株のトリプトソイブイオン培地での培養後の菌濃度は、2.1.10 により測定した。

### 2.2.3 分析試料

各試験室において、菌液添加用試料を 2.1.5 の 1) により前増菌培養した後、培養液の上澄み液 4.5 mL を添加用菌液 500  $\mu$ L と混合したものを 2.1.5 の 2) の DNA 抽出に用いた（試料 2 種類と菌液 3 種類で計 6 点）。DNA 抽出液は、そのまま 2.1.5 の 3) の DNA 試料液として用いた。

### 2.2.4 試験方法

本法によった。

### 2.2.5 報告方法

各試料について、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセット及び *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットを用いて試験を行い、対応する 4 つの検出サイズの PCR 増副産物がすべて検出された場合に「+」、*invA* に対応する PCR 増幅産物が検出された場合には「A」、不検出の場合は「-」を報告させることとした。結果が「A」となった試料については、さらに *S. Choleraesuis* 検出用プライマーセット、*S. Dublin* 検出用プライマーセット、*S. Gallinarum* 検出用プライマーセット、*S. Hadar* 検出用プライマーセット及び *S. Infantis* 検出用プライマーセットを用いて試験を行い同様に報告させることとした。

### 2.2.6 分析実施期間

平成 25 年 11 月 20 日～平成 25 年 12 月 6 日

### 2.2.7 解析方法

各試料及び各血清型検出用プライマーセット毎に、対応する 4 つの検出サイズの PCR 増副産物がすべて検出された数、*invA* に対応する PCR 増副産物が検出された数を集計した。

### 2.2.8 参加試験室

FAMIC 肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 6 試験室）

## 3 結果及び考察

### 3.1 分析法開発

#### 3.1.1 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性

各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性を確認するために、2.1.6 により試験菌株 128 株を正しく判定できるか確認した。

その結果は Table 4 のとおり，主要血清型は，*S. Infantis* が 4 株，*S. Typhimurium* が 11 株，残りの 5 血清型が 1 株と目的の血清型の株数は少ないが，全て陽性，その他の試験菌は全て陰性であり，正しく判定できた。

Table 4 Sensitivity and specificity of each primer sets

<i>Salmonella</i> serovar	Number of strains tested	Number of positive results of target serovar detecting primer pair set						
		Choleraesuis	Dublin	Enteritidis	Gallinarum	Hadar	Infantis	Typhimurium
Choleraesuis	1	1	0	0	0	0	0	0
Dublin	1	0	1	0	0	0	0	0
Enteritidis	1	0	0	1	0	0	0	0
Gallinarum	1	0	0	0	1	0	0	0
Hadar	1	0	0	0	0	1	0	0
Infantis	4	0	0	0	0	0	4	0
Typhimurium	11	0	0	0	0	0	0	11
Others	108	0	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (%)		100	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)		100	100	100	100	100	100	100

#### 3.1.2 抽出方法の検討

始めに，2.1.2 の 1) にそれぞれ主要血清型を添加した試料を用い，2.1.7 の 1) のアルカリ熱抽出法による DNA 抽出を検討したが，スメアリングにより判定が難しい試料及び菌種があったため，DNA 精製が必要であることがわかった。そのため，アルカリ熱抽出法で特に判定が困難であった試料として米ぬか，菌種として *S. Choleraesuis* を用い，2.1.7 により抽出方法の検討を行った。

その結果は Fig. 1 のとおり，InstaGene Matrix と Ethachinmate を用いた抽出方法（Fig. 1 のレーン 9 及び 20）が最も判定が容易であり， $10^5$  CFU/mL でも濃いバンドが得られたため，この抽出方法を採用した。

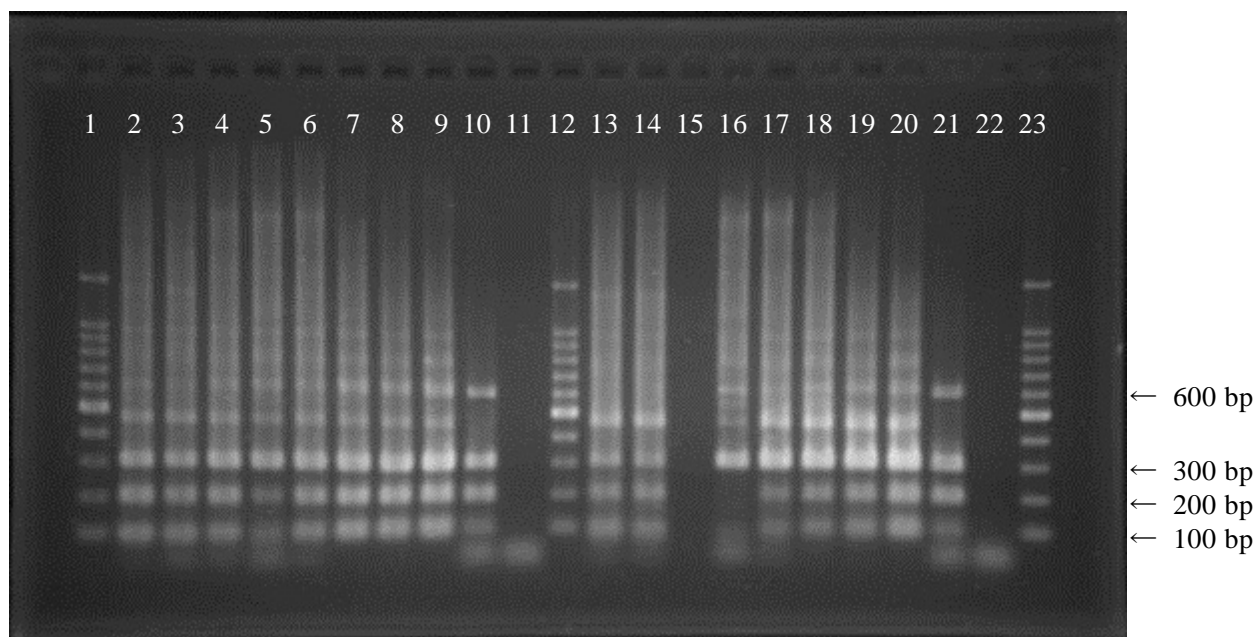


Fig. 1 Comparison of DNA extraction methods of *Salmonella Choleraesuis* mixed with rice bran

- a) Rice bran was incubated in pre-enrichment broth at 37 °C for 16 hours and then mixed with *Salmonella Choleraesuis*. The DNAs were extracted with 8 extraction method. *Choleraesuis* detecting primer set was used in PCR.
- b) Lane 1, 12, 23: 100 bp Ladder. Lane 2~9:  $10^6$  CFU/mL of *Salmonella Choleraesuis* in pre-enrichment broth. Lane 13~20:  $10^5$  CFU/mL of *Salmonella Choleraesuis* in pre-enrichment broth. Lane 10, 21: Positive control. Lane 11, 22: Negative control. Lane 2, 13: Alkali-heat treatment. Lane 3, 14: Alkali-heat treatment and Ethachinmate. Lane 4, 15: MonoFas Bacterial genom DNA extraction kit VII. Lane 5, 16: QIAamp DNA stool. Lane 6, 17: Dneasy Blood & Tissue. Lane 7, 18: MagExtractor. Lane 8, 19: InstaGene Matrix. Lane 9, 20: InstaGene Matrix and Ethachinmate.

### 3.1.3 前増菌培養液中での検出可能な菌濃度の検討

2.1.8 により検出可能な菌濃度を確認した。

その結果は Table 5 のとおり，前増菌培養液中で概ね  $10^3$ ~ $10^6$  CFU/mL まで菌濃度が増えていれば，検出可能であった。本法の抽出法により DNA を精製することで，アルカリ熱抽出法では検出不能であった *S. Choleraesuis* についても  $10^6$  CFU/mL 以上の菌濃度であれば同定できた。また，アルカリ熱抽出法において DNA 抽出溶液の希釈をしないと検出できなかった試料については，本法の抽出法では DNA 抽出溶液の希釈をせずとも検出できた。アルカリ熱抽出法と本法の抽出法での検出可能な最小菌濃度を比較すると，多くの試料では本法の抽出法の方が少ない菌濃度でも検出できた。なお，サルモネラを添加しない前増菌培養液についても同時に試験を行ったが，全てを正しく陰性と判定できた。

Table 5 Minimum concentration of *Salmonella* to be identifiable in pre-enrichment broth<sup>a), b)</sup>

Sample	Minimum concentration of <i>Salmonella</i> (CFU/mL)									
	<i>S. Choleraesuis</i>		<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
	Method A	Method B	Method A	Method A	Method B	Method A	Method A	Method A	Method A	Method B
Corn gluten meal	1.9×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>3</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	6.5×10 <sup>2</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	<u>1.1×10<sup>5</sup></u>	6.0×10 <sup>3</sup>
Rice bran 1	U	NT	NT	8.8×10 <sup>4</sup>	NT	NT	NT	NT	<u>1.1×10<sup>6</sup></u>	NT
Rice bran 2	NT	1.3×10 <sup>6</sup>	U	NT	6.3×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>5</sup>	<u>6.0×10<sup>4</sup></u>	9.0×10 <sup>5</sup>	NT	5.9×10 <sup>4</sup>
Rapeseed meal	1.9×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>5</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	6.5×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>5</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>5</sup>	<u>1.1×10<sup>6</sup></u>	6.0×10 <sup>3</sup>
Brewers grains	1.9×10 <sup>4</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	6.5×10 <sup>4</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	7.9×10 <sup>4</sup>
Meat bone meal 1	1.9×10 <sup>4</sup>	NT	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	NT	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	NT	1.1×10 <sup>5</sup>	NT
Meat bone meal 2	NT	1.6×10 <sup>4</sup>	NT	NT	7.6×10 <sup>4</sup>	NT	NT	9.0×10 <sup>5</sup>	NT	1.1×10 <sup>3</sup>
Chicken meal	1.9×10 <sup>4</sup>	3.0×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	3.6×10 <sup>5</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	2.9×10 <sup>4</sup>
Fether meal	1.9×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	6.9×10 <sup>3</sup>
Fish meal 1	1.9×10 <sup>4</sup>	NT	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	NT	9.6×10 <sup>4</sup>	>6.0×10 <sup>5</sup>	NT	1.1×10 <sup>4</sup>	NT
Fish meal 2	NT	1.6×10 <sup>4</sup>	NT	NT	1.2×10 <sup>3</sup>	NT	NT	9.0×10 <sup>5</sup>	NT	1.1×10 <sup>5</sup>
Molasses adsorption feed	U	1.6×10 <sup>6</sup>	U	8.8×10 <sup>4</sup>	1.5×10 <sup>5</sup>	9.6×10 <sup>5</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>5</sup>	<u>1.1×10<sup>6</sup></u>	1.6×10 <sup>5</sup>
Mixed feed	1.9×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	8.7×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	>6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	8.8×10 <sup>5</sup>
Formula feed for layers	U	1.6×10 <sup>6</sup>	U	8.8×10 <sup>4</sup>	1.5×10 <sup>5</sup>	9.6×10 <sup>5</sup>	<u>6.0×10<sup>5</sup></u>	9.0×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>5</sup>
Formula feed for broilers	1.9×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	U	8.8×10 <sup>4</sup>	6.5×10 <sup>3</sup>	U	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	7.9×10 <sup>4</sup>
Formula feed for finishing beef cattle 1	1.9×10 <sup>6</sup>	NT	4.0×10 <sup>5</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	NT	9.6×10 <sup>4</sup>	<u>6.0×10<sup>5</sup></u>	NT	1.1×10 <sup>6</sup>	NT
Formula feed for finishing beef cattle 2	NT	1.6×10 <sup>4</sup>	NT	NT	1.2×10 <sup>5</sup>	NT	NT	9.0×10 <sup>5</sup>	NT	1.0×10 <sup>4</sup>
Formula feed for dairy cattle	1.9×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>	8.7×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	8.8×10 <sup>4</sup>
Formula feed for finishing pigs	<u>1.9×10<sup>6</sup></u>	1.3×10 <sup>5</sup>	NT	8.8×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	<u>9.6×10<sup>5</sup></u>	6.0×10 <sup>5</sup>	9.0×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	6.9×10 <sup>4</sup>

a) Each sample was mixed with *Salmonella* after incubation in buffered peptone water at 37 °C for 16 hours. DNA extracts were performed with alkali-heat treatment (Method A) or combination of InstaGene Matrix and Ethachinmate (Method B) and then multiplex PCR was performed.

b) Each value represents the minimum concentration of *Salmonella* with positive result. "NT" indicates that the sample was not tested; "U" indicates that the serovar of *Salmonella* inoculated in the sample was not identified; and underline indicates that the result was in the case of 10-fold diluted DNA extract.

### 3.1.4 陽性試料に対する迅速検出法の適用性の検討

主要血清型を迅速に同定することは重要であるが、飼料中にサルモネラが含まれているかどうかを迅速に判定することも重要である。そこで、2.1.9 の迅速検出法により試験を行い、各血清

型検出用プライマーセットに含まれている *invA* 検出用プライマーによる *invA* の増幅を確認することで、サルモネラの検出に使用できないか確認した。

2.1.2 の 2) のサルモネラの陽性試料 44 点を確認に用いた。これらの試料は、主要血清型は含まれていない。また、試料は長期冷蔵保存されたものであるため、培養法により改めてサルモネラの生菌の存在を確認した。

迅速検出法では操作の簡便性を考え、2.1.3 の 15) の中から 2 種類のプライマーセットを選択し用いることとした。一つは畜産物由来の食中毒を引き起こすリスクが高いことから *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットを、もう一つは過去に飼料からの検出例があることから *S. Typhimurium* 検出用プライマーセットを選択した。

その結果は Table 6 のとおり、培養法で再度陽性となった試料 17 点のうち両方のプライマーセットで *invA* 陽性であったのが 16 点であり、両方のプライマーセットで *invA* 陰性であったのは 1 点のみであった。培養法で改めて陰性となった 27 点のうち両方のプライマーセットで *invA* 陰性であったのが 23 点であり、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセットのみ *invA* 陽性が 1 点、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットのみ *invA* 陽性が 3 点であった。

培養法及び迅速検出法でともに陰性と判定された試料は、長期保存中にサルモネラが死滅した、あるいは検出可能な濃度にまでサルモネラが増菌していない可能性が示唆された。

培養法で陰性と判定され、迅速検出法で陽性と判定された試料は、他の陽性となった試料の電気泳動の結果と比較すると、*invA* に対応する増幅産物のバンドが薄かったため、抽出された DNA 量が少なかったことが原因として考えられた。このことから、死菌の微量な DNA を迅速検出法で検出した、*invA* とは異なる DNA を増幅した誤検出及び試料中のサルモネラが検出限界以下<sup>8)</sup>であった可能性が示唆された。

一方、*S. Enteritidis* 検出用プライマーセットと比較して、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットで偽陽性がより多く確認された。これは、前述の可能性のほかに、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットと *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットでは用いた 4 つのプライマー対のうち *invA* に対応するプライマー対以外のプライマーが異なっており、特異性に差が生じた可能性も示唆された。

なお、培養法で陽性と判定され、迅速検出法で陰性と判定された 1 試料は、再度両試験法を実施したが、どちらも陰性と判定され、再現性がなかった。このことから、当該試料中にサルモネラが局在していた、あるいは試料中のサルモネラ菌数が微量であった可能性が考えられた。

以上の結果から、迅速検出法は、培養法と高い一致率を示しており、飼料中のサルモネラを迅速にスクリーニングする方法としても有用と考えられた。

Table 6 Relative accuracy of multiplex PCR method compared to reference method (culture method) <sup>a)</sup>

		Enteritidis detecting primer set		Typhimurium detecting primer set	
		<i>invA</i> positive	<i>invA</i> negative	<i>invA</i> positive	<i>invA</i> negative
Reference method (Culture)	Positive	16	1	16	1
	Negative	1	26	3	24
Agreement		42		40	
Accuracy (%) <sup>b)</sup>		95.5		90.9	

a) All samples in this table had been once determined Salmonella-positive by the reference method.

All samples were re-tested using reference method because of long term storage.

b) Accuracy: percentage of the results consistent with reference method

### 3.2 共同試験

本法及び迅速検出法の室間再現精度を検証するため、2.2により共同試験を実施した。

その結果は Table 7 のとおり、本法については、全てのプライマーセットで全ての試験室が血清型を正しく同定できた。また、迅速検出法については、魚粉の前増菌培養液に *S. Infantis* を添加したものを *S. Hadar* 検出用プライマーセットでマルチプレックス PCR を行った結果で、6 試験室中 1 試験室のみ *invA* 陰性となった。サルモネラ陰性試料については、全ての試験室が全てのプライマーセットで正しく判定できた。この *invA* 不検出の原因の一つは、今回添加した菌濃度である  $10^5$  CFU/mL が *S. Hadar* 検出用プライマーセットの検出下限を下回ることが考えられたほか、実施試験室での DNA の抽出効率が悪かったために、検出可能な量の増幅産物が得られなかった可能性が考えられた。しかし、目的とする *S. Hadar* を添加した試料については検出できていたこと、また、*S. Typhimurium* 検出用プライマーセットと *S. Enteritidis* 検出用プライマーセットをスクリーニング用プライマーセットとすることを想定したことから、サルモネラの陽性・陰性判定には問題ないと考えられた。



Table 7 Results of collaborative study<sup>a)</sup>

Sample	Inoculation		Type of distribution <sup>b)</sup>	Number of positive results/number of samples tested (number of <i>invA</i> positive results) <sup>c)</sup>						
	Kind of serovar	Level (CFU/mL)		<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Formula feed for layer	Saline	-	Sterilized	NT <sup>d)</sup>	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
	<i>S. Enteritidis</i>	1.67×10 <sup>5</sup>	Sterilized	NT	NT	6/6 (6)	NT	NT	NT	0/6 (6)
	<i>S. Infantis</i>	1.80×10 <sup>5</sup>	Sterilized	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)
Fish meal	Saline	-	Sterilized	NT	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
	<i>S. Enteritidis</i>	1.67×10 <sup>5</sup>	Sterilized	NT	NT	6/6 (6)	NT	NT	NT	0/6 (6)
	<i>S. Infantis</i>	1.80×10 <sup>5</sup>	Sterilized	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (5)	6/6 (6)	0/6 (6)
Brewers grains	Saline	-	DNA	NT	NT	0/6 (0)	NT	NT	NT	0/6 (0)
Formula feed for finishing beef cattle	<i>S. Typhimurium</i>	1.65×10 <sup>5</sup>	DNA	NT	NT	0/6 (6)	NT	NT	NT	6/6 (6)
Formula feed for finishing pig	<i>S. Choleraesuis</i>	2.60×10 <sup>5</sup>	DNA	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Chicken meal	<i>S. Dublin</i>	3.13×10 <sup>5</sup>	DNA	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Fether meal	<i>S. Gallinarum</i>	1.97×10 <sup>5</sup>	DNA	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)
Soybean meal	<i>S. Hadar</i>	1.86×10 <sup>5</sup>	DNA	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)	6/6 (6)	0/6 (6)	0/6 (6)

a) The collaborative study was performed with 6 laboratories. The thermal cyclers that all laboratories used were PE9700 (Applied Biosystems).

b) Sterilized *Salmonella* and DNA of *Salmonella* were distributed to each laboratory. In the case of sterilized *Salmonella*, the sterilized strains were mixed after incubation of *Salmonella* negative samples in buffered peptone water at 35–37 °C for 18–24 hours, then DNA extraction and multiplex PCR were performed (Sterilized). In the case of DNA of *Salmonella*, DNA solutions which were extracted from *Salmonella*-inoculated feeds were analyzed as template DNA (DNA).

c) Results are expressed as "number of laboratories who reported target serovar positive/number of laboratories who reported *invA* positive".

d) Not tested.

### 3.3 実試料によるモニタリング結果

本法及び迅速検出法の有用性を確かなものとするために、FAMIC が実施している飼料のサルモネラのモニタリングにおいて培養法と並行して本法及び迅速検出法による試験も行い、培養法と比較した。試料は 2.1.2 の 3) を用いた。

その結果は Table 8 のとおり、培養法では試料 272 点中 4 点がサルモネラ陽性と判定されたが、そのうち主要血清型に当たるものはなかった。

本法では試料 272 点のうちチキンミール 1 点及び糖蜜吸着飼料 1 点で PCR 反応の阻害が認められたが、その割合は約 0.7 % と低く、本法で採用した抽出法は飼料中のサルモネラ迅速同定法に用いるのに支障はないと考えられた。なお、PCR 阻害の原因としては、DNA を抽出する際に、PCR 反応を阻害する成分を十分に除去できなかった可能性が考えられた。阻害のなかった試料 270 点については、本法でも主要血清型に該当するサルモネラは存在しないと正しく判定された。

迅速検出法に関しては、*S. Hadar* 検出用プライマーセットを除いて偽陰性は認められなかったが、全てのプライマーセットで偽陽性が認められたことから、更なる検討が必要であると考えられた。偽陽性が認められた原因としては、死菌の DNA が増幅された、*invA* と異なる DNA が非特異的に増幅された、あるいは前増菌培養液中のサルモネラが同定可能な菌量に達していなかったことが示唆された。

Table 8 Comparison between reference method and multiplex PCR method for commercial feeds

Objective	Reference method (Culture method)	Multiplex PCR	Primer set							
			<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
Target serovar positive <sup>a)</sup>	Target serovar positive	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Target serovar negative	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Identification of serovar of <i>Salmonella</i>	Target serovar positive	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Target serovar negative	270	270	270	270	270	270	270	270	270
Total <sup>b)</sup>		272	272	272	272	272	272	272	272	272
Agreement (%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensitivity (%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Specificity (%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100
Positive	<i>invA</i> positive	4	4	4	4	4	4	3	4	4
	<i>invA</i> negative	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Negative	<i>invA</i> positive	20	38	13	37	6	17	26	26	26
	<i>invA</i> negative	246	228	253	229	260	249	240	240	240
Total		272	272	272	272	272	272	272	272	272
Agreement (%)		91.9	85.3	94.5	85.7	96.7	93.0	89.7	89.7	89.7
Sensitivity (%)		100	100	100	100	75.0	100	100	100	100
Specificity (%)		92.5	85.7	95.1	86.1	97.7	93.6	90.2	90.2	90.2

a) None of *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Infantis* and *S. Typhimurium* was detected by the culture method.

b) Multiplex PCR were inhibited for two samples in a total.

#### 4 まとめ

飼料中のサルモネラ 7 血清型のマルチプレックス PCR による迅速同定法について、飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であり、その有用性が確認できた。また、迅速検出法についても検討したが、さらなる検討が必要であることがわかった。

- 1) 各血清型検出用プライマーセットのサルモネラに対する感度及び特異性は、すべて 100 %であった。
- 2) 前増菌培養液からの DNA 抽出は、InstaGeneMatrix と Ethachinmate を用いた抽出法が最も判定が容易であった。
- 3) 一部試料を除き、サルモネラの菌濃度が前増菌培養液中  $10^3 \sim 10^6$  CFU/mL であれば本法により同定可能であった。
- 4) 共同試験の結果、全てのプライマーセットで全ての試験室が血清型を正しく同定できた。
- 5) 実試料を用いた培養法との比較の結果、PCR 阻害が認められた 2 点を除き、270 点全ての試料について主要血清型に該当するサルモネラは存在しないと正しく判定された。迅速検出法については、*S. Hadar* 検出用プライマーセットにおいて偽陰性が認められ、全てのプライマーセットにおいて偽陽性が認められた。

なお、本法は、*S. Hadar* 及び *S. Infantis* を除いた監視伝染病の病原体である 5 血清型の迅速同定法として、平成 27 年 6 月 16 日付けで飼料分析基準に収載された<sup>9)</sup>。

#### 謝 辞

本研究を行うに当たり菌株を提供していただいた北里大学、農林水産省動物医薬品検査所及び国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門並びに本研究に対して御助言御指導を賜った国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の秋庭正人先生に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 佐藤静夫：飼料のサルモネラ汚染と対策，鶏病研究会報，**39**, 113-132 (2003).
- 2) 法律：家畜伝染病予防法，昭和 26 年 5 月 31 日，法律第 166 号 (1951).
- 3) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Chunhong Zhu, Min Yue, Shelley Rankin, François-Xavier Weill, Joachim Frey and Dieter M. Schifferli: One-step identification of five prominent chicken *Salmonella* serovars and biotypes, *J. Clin. Microbiol.*, **53**(12), 3881-3883 (2015).
- 6) Kamela Charmaine S. Ng and Windell L. Rivera: Multiplex PCR-based serogrouping and serotyping of *Salmonella enterica* from tonsil and jejunum with jejunal lymph nodes of slaughtered swine in metro Manila, Philippines, *J. Food Prot.*, **78**(5), 873-880 (2015).

- 7) Masato Akiba, Masahiro Kusumoto and Taketoshi Iwata: Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR, *J. Microbiol. Methods*, **85**, 9-15 (2011).
- 8) 千原哲夫, 関口好浩, 橋本仁康, 大島慎司, 杉本泰俊, 本広昭, 木村晃一, 上橋健三: クオリボックス TM システムによる飼料中のサルモネラの迅速検出法の検討, *日本食品微生物学会雑誌*, **25** (3), 109-119 (2008).
- 9) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の一部改正について, 平成 27 年 6 月 16 日, 27 消安第 1181 号 (2015).