



Application

モバイルリアルタイムPCR装置を用いた カンピロバクターの迅速検出（PCR法と培養法の比較試験）

製品名

モバイルリアルタイムPCR装置 PicoGene® (Cat.No. PCR1100)

メーカー名

日本板硝子

下記データは、食肉加工会社のお客様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

カンピロバクター食中毒は、わが国で発生している細菌性食中毒の中で、近年、発生件数が最も多く、年間およそ 300 件、2,000 人程度の患者が報告されている。そのため、こちらの食肉加工会社では、定期的にカンピロバクターの検査を実施している。カンピロバクターの検出方法は、通常培養法で行われるが、判定結果が出るまでおよそ1週間から10日かかる。一方PCR法を用いれば、約20分という速さで判定結果を得ることが可能である。

目的

モバイルリアルタイムPCR装置を用いた、カンピロバクターの迅速検出法の正確性を、従来の培養法と比較する。

試験方法

通常の検査では、生肉サンプルを用いて行うが、今回はカンピロバクター汚染率の極めて高い鳥盲腸便を用いて、PCR法および培養法で検査を行った。

サンプル採取について

内臓一式（食道から総排泄口まで）を採材した。盲腸の先端を火炎滅菌した後、滅菌したはさみで先端を切り落とし、切り落とした部分から盲腸便をシャーレに取り出した。

取り出した盲腸便をPBSで1,000倍希釈し、これをPCR法、培養法の各試験の検体とした。

PCR法

使用機器：モバイル型リアルタイムPCR装置 (PicoGene®PCR1100)

試薬：カンピロバクター属菌検出用キット（準備中）、日本板硝子

(1日目)

検体 5 μL を、カンピロバクター属菌検出用キットのチューブに添加
(キットには、試験に必要な酵素、プライマー、プローブなどが混合されている)



検体を入れたキットのチューブから、ピペットで混合液を 18 μL 吸い取り、
測定用チップへ注入



測定用チップをPCR1100にセットし、測定を実施

<PCR測定条件>

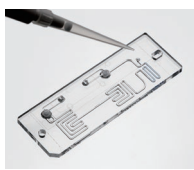
95℃、15秒

60℃、15秒

95℃、4秒 } 50サイクル



カンピロバクター属菌
検出用キット



PicoGene®PCR1100用
測定用チップ



PicoGene®PCR1100

※試薬調製に約5分、判定結果が出るまで約20分

培養法

(1日目)

前培養：プレストン培地 42℃ 24時間 微好気培養



(2日目)

選択増菌培地：バツラー寒天培地 42℃ 48時間 微好気培養



(4日目)

典型的なコロニーを検鏡し、らせん状桿菌を
カンピロバクター推定陽性とする

純培養：血液寒天培地 42℃ 48時間 微好気培養



(6日目以降)

確認試験：

- ① オキシダーゼ試験、② カタラーゼ試験、③ 好気培養、
- ④ 25℃発育試験、⑤ 馬尿酸塩加水分解試験を実施

①(+)、②(+)、③(-)、④(-) でカンピロバクター陽性
⑤(+) で、*C.jejuni*、(-) で、*C.Coli* と型判別を実施

※判定結果が出るまで約1週間

結果

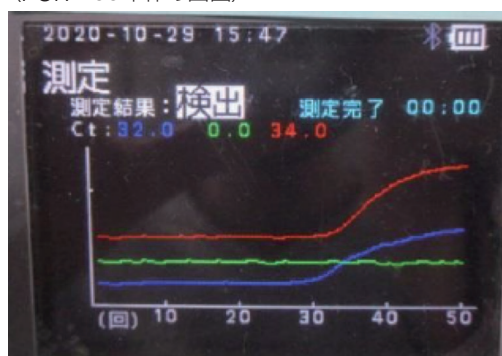
5検体の検査結果 (PCR法と培養法)

	PCR法	培養法	
検体①	+	+	+陽性 -陰性
検体②	+	+	両手法で、すべて同じ結果であった
検体③	+	+	
検体④	+	+	
検体⑤	+	+	

(検体④の場合)

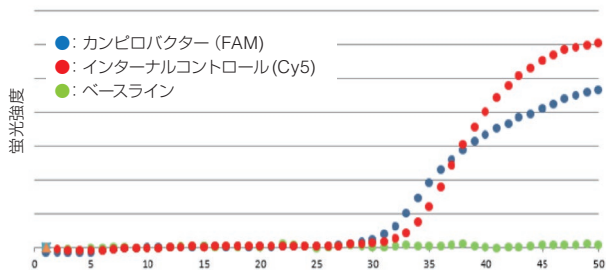
PCR法

〈PCR1100本体の画面〉



Ct値：32.0

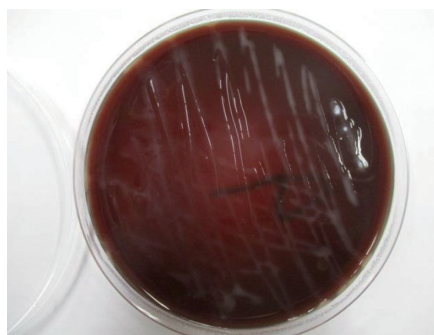
〈PCでのデータ解析〉



陽性と判定

培養法

プレストン培地で培養後、バツラー選択増菌培地で培養



コロニーの検出および4つの確認試験の結果で、陽性と判断

● まとめ

- 今回の試験では、PCR法と培養法で同様の結果が得られた (全5検体)。
- 今後も継続的な検討を行い、PCR法と従来の培養法とで同様の結果が得られるか検討が必要



お客様のコメント

PCR法は、検出までの時間が20分とかなり早く、迅速な検査方法として非常に有用に感じました。今回試験した盲腸便の検体では、濁りがあり100倍希釈まではエラーが出て測定ができませんでしたが、1,000倍希釈する事で測定が可能になりました。検出感度が良いので、検体を1,000倍希釈しても培養法と同様に陽性判定を確認できました。1,000倍希釈した検体5 μLの中にどのくらいの菌数が出て検出できたかは、今回の試験では分かりませんが、検出に必要な菌数が分かれば、今後の色々な試験の参考になると感じました。



資料

モバイルリアルタイムPCR装置を用いた
カンピロバクターの迅速検出

生肉サンプルの場合

● 用意するもの

機 器：モバイル型リアルタイムPCR装置 (PicoGene®PCR1100)
測定用チップ MCP1100
試 薬：カンピロバクター属菌検出用キット (準備中)、日本板硝子
その他：解析用PC (WINDOWS OS)
ストマッカー一式
生肉を小片化するハサミ、またはナイフ、生理食塩水、
ピペット、チップ (すべて滅菌済み)

サンプルの前処理

生肉サンプル (25 g) を小片に刻む

↓
小片化したサンプル (25 g) を、滅菌生理食塩水 (225 mL) に入れ、
ストマッカーで処理を行う

↓
ストマッカー処理液から 5 μL をピペットで吸い出し、測定用サンプル
とする

* サンプル採取の際に、固形物を吸わないように注意

盲腸便の場合

● 用意するもの

機 器：モバイル型リアルタイムPCR装置 (PicoGene®PCR1100)
測定用チップ MCP1100
試 薬：カンピロバクター属菌検出用キット (準備中)、日本板硝子
その他：解析用PC (WINDOWS OS)
はさみ、シャーレ、ピペット、チップ、PBS (すべて滅菌済み)

サンプルの前処理

内臓一式 (食道から総排泄口まで) を採材

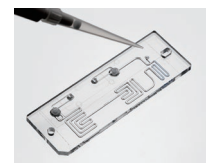
↓
盲腸の先端を火炎滅菌した後に、滅菌したはさみで先端を切り落と
し、切り落とした部分から盲腸便をシャーレに取り出す

↓
取り出した盲腸便をPBSで1,000倍希釈し、5 μL をピペットで吸い
出し、測定用サンプルとする

測定サンプルの調製

検体 5 μL を、カンピロバクター属菌検出用キットのチューブに添加
(キットには、試験に必要な酵素、プライマー、プローブなどが混合されている)

↓
検体を入れたキットのチューブから、ピペットで混合液を 18 μL 吸い取り、
測定用チップへ注入

カンピロバクター属菌
検出用キットPicoGene®PCR1100用
測定用チップ

PCR1100の測定

測定用チップをPCR1100にセットし、プログラムを選び測定を実施

<PCR測定条件>

95℃、15秒
60℃、15秒 } 50サイクル
95℃、4秒 }

↓
測定画面に「測定結果」が表示されたら完了

(注意) PCR1100にて送液エラーが出た場合
測定サンプルを5倍希釈し、再度実施

※5倍希釈方法：5 μLのサンプルに、水 (PCRグレード) を20 μL加える



PicoGene®PCR1100