

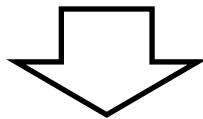
衛生微生物技術協議会
動物由来感染症レファレンスセンター報告
(平成23年度)

世話人： 棚林 清（感染研獣医科学部）
(H23担当 今岡 浩一)

組 織： 山形県衛生研究所
東京都健康安全研究センター
愛知県衛生研究所
京都府保健環境研究所
長崎県環境保健研究センター
感染研獣医科学部

目的と経過

動物由来感染症の実験室検査法の整備を目的に、野兔病をモデルとして抗体検出法（微量凝集反応）及び病原体ゲノム検出法（conventional PCR）についてモデル検体を用いた検査を試行し手技等の検証を実施。【平成21－22年度】



➤平成23年度 ブルセラ属菌の4菌種の同定

4種のプライマーセットによるPCR検査について

- ✓感染研方式の検証
- ✓各地衛研の方式での検証
- ✓模擬血清検体からの検出

➤ 実施結果概要

1. PCRの反応パターンで菌種を同定する：感染研方式 puReTaq Ready-To-Go PCR Beadsの使用

(反応例)

模擬検体1：*B. abortus* DNA溶液

模擬検体2：*B. melitensis* DNA溶液

模擬検体3：*B. suis* DNA溶液

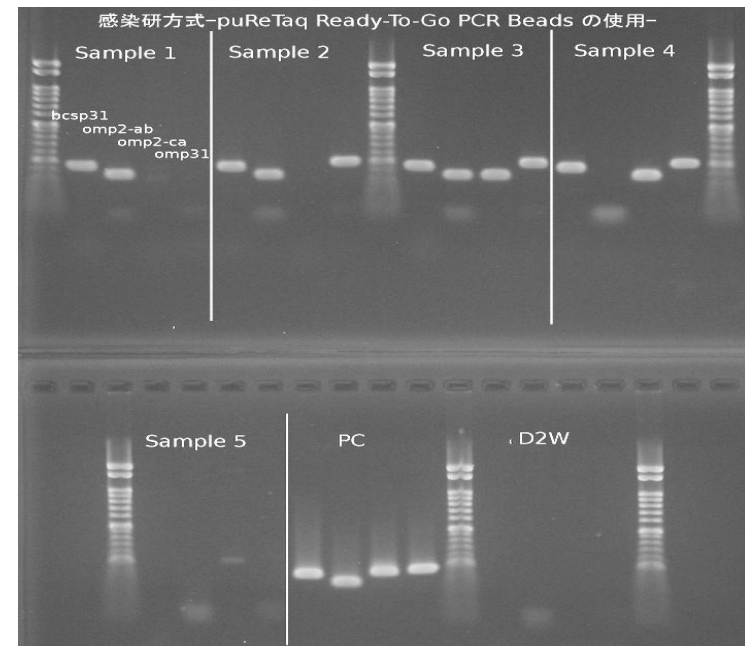
模擬検体4：*B. canis* DNA溶液

陰性対照1：*O. anthropi* DNA

陽性対照(PCRコントロール)：

増幅サイズの異なるオリゴDNA

陰性対照：D2W



いずれの機関でも当該菌種を同定できた。

➤ 実施結果概要

2. PCRの反応パターンで菌種を同定する：各地衛研方式 (各機関で通常使用しているDNAポリメラーゼの使用)

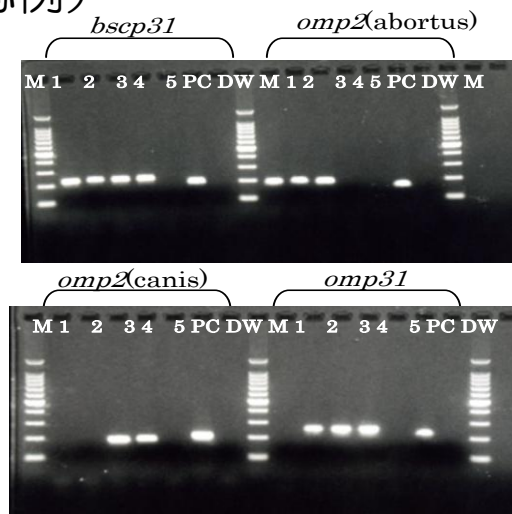
* Takara: EX Taq, EX Taq Hot Start Version,
Perfectshot ExTaq (loading dye mix)

* Promega: Go-Taq colorless master mix

* Toyobo: Blend Taq

* Applied Bio.: AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP

(反応例)



95°C, 10min
⇒ 35cycles ×
(96°C, 3sec →
65°C, 3sec →
68°C, 5sec)
⇒ 72°C, 10sec ⇒ 4°C

* いずれの機関でも
当該菌種を同定できた。
* AmpliTaq Gold
Fastは、若干感度は落
ちるが、なによりも反
応サイクルが早い。

➤ 実施結果概要

3. 血清からのDNA抽出とPCRによるブルセラ属菌の検査 (各施設で通常使用しているDNA抽出法の使用)

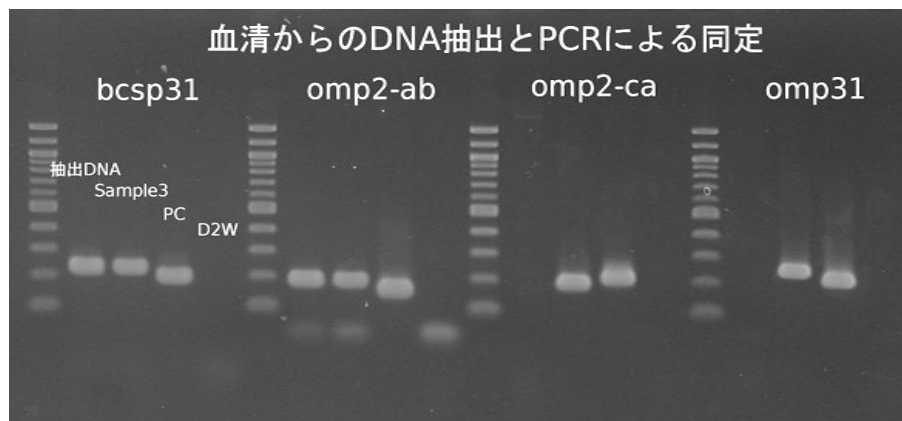
* QIAGEN: QIAamp DNA Mini Kit - 3施設

Dneasy Blood & Tissue Kit

QIAamp MinElute Virus Spin Kit

* エーディア: SepaGene

(反応例)



* いずれのKitでも、
混入している菌体の
DNAを抽出でき、
当該菌種を同定でき
た。

平成24年度計画

1. 炭疽の検査の試行と検証

(炭疽菌PCR)

2. 野兎病やブルセラ症検査用試薬の配備

(野兎病抗体検査用：陽性対照血清、抗原菌液)

(PCR検査用：陽性対照DNA、プライマーセット)

3. 整備すべき動物由来感染症の検査技術等について継続的検討