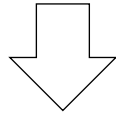


図1 *A. butzrelii*の集落

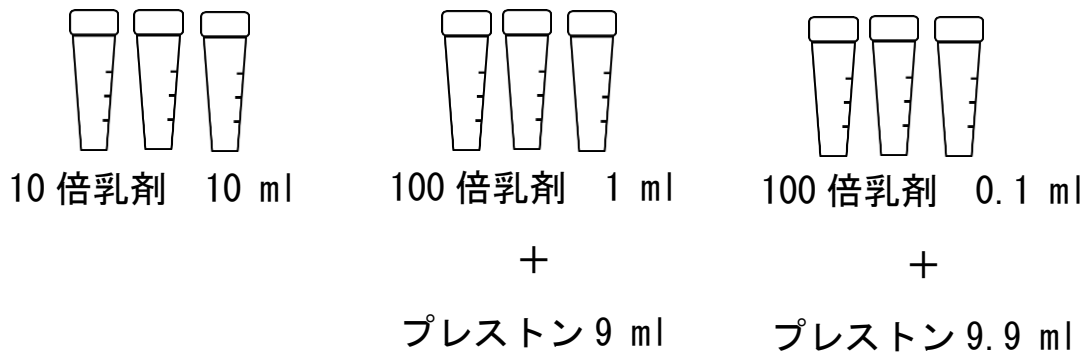
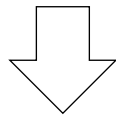


図2 *C. jejuni* の集落

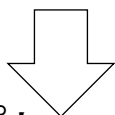
検体 25 g + 5%馬血液加プレストン培地 225 ml



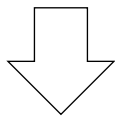
ストマッキング 2 分間 (10 倍乳剤)



各 3 本を 37°C、48 時間、微好気培養



マルチプレックス PCR



最確数を算出

図 3 最確数法によるカンピロバクター属菌の計数

プライマー

ARCO: CGTATTCACCGTAGCATAGC
BUTZ: CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA
SKIR: GGCGATTTACTGGAACACA
CRY1: TGCTGGAGCGGATAGAAGTA
CRY2: AACAACTACGTCCTTCGAC

反応液の組成

Quick Taq HS DyeMix	12.5 μ l
ARCO (50 μ M)	0.1 μ l
BUTZ (50 μ M)	0.1 μ l
SKIR (50 μ M)	0.1 μ l
CRY1 (50 μ M)	0.1 μ l
CRY2 (50 μ M)	0.1 μ l
Template DNA	0.1 μ l
滅菌精製水	0.1 μ l

PCR 反応条件

<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
62°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>40 sec × 30</u>
68°C	5 min

結果判定 (以下の分子量のバンドが検出された場合、陽性とする)

<i>A. skirrowi</i>	641 bp
<i>A. butzleri</i>	401 bp
<i>A. cryaerophilus</i>	257 bp

図 4 アルコバクター属菌のマルチプレックス PCR の条件

プライマー

CjSPCU1: TTTAGCCTTTGCAACTCCTA
CjSPCR2: AAGGGTAGCAGCTGTAA
CcSPCU1: TAGGGATATGCACGCAAAG
CcSPCUR1: GCTTAATACAGTTACGATAG
CfSPCU2: AAGCATAAGTTTTGCAAAG
CfSPCR1: GTTTGGATTTTCAAATGTTCC

反応液の組成

Quick Taq HS DyeMix	12.500 μ l
CjSPCU1 (50 μ M)	0.125 μ l
CjSPCR2 (50 μ M)	0.125 μ l
CcSPCU1 (50 μ M)	0.500 μ l
CcSPCUR1 (50 μ M)	0.500 μ l
CfSPCU2 (50 μ M)	0.500 μ l
CfSPCR1 (50 μ M)	0.500 μ l
Template DNA	2.000 μ l
滅菌精製水	8.250 μ l

PCR 反応条件

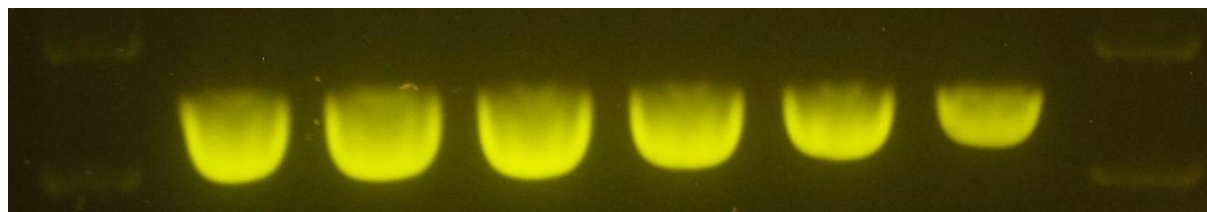
<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
55°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>42 sec × 35</u>
68°C	5 min

結果判定（以下の分子量のバンドが検出された場合、陽性とする）

<i>C. jejuni</i>	524 bp
<i>C. fetus</i>	397 bp
<i>C. coli</i>	313 bp

図 5 カンピロバクター属菌のマルチプレックス PCR の条件

C. jejuni



6×10^6

6×10^5

6×10^4

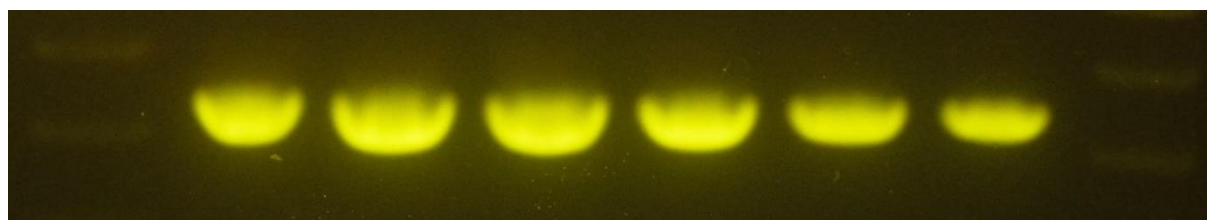
6×10^3

6×10^2

6×10^1

cfu/ml 増菌培養液

C. coli



1×10^7

1×10^6

1×10^5

1×10^4

1×10^3

1×10^2

cfu/ml 増菌培養液

図 6 カンピロバクター属菌のマルチプレックス PCR の感度

1. 対象

カンピロバクター食中毒およびカンピロバクター食中毒が疑われる患者便

2. 方法

1) Arcobacter 選択培地を作成する。

組成 : Arcobacter broth base	12 g
Bacto agar	7.5 g
蒸留水	500 ml

121℃、15分滅菌後、50℃に冷却し、CAT supplement を無菌的に1バイアル加えた後、シャーレに分注し使用する。



便を塗抹し、30℃、48時間、好気培養を行う。



カンピロバクター様コロニーを10個選択する。



アルカリ熱抽出法もしくは熱抽出法でDNAを抽出し、これをテンプレートとする。



マルチプレックスPCRによって *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を検出する。

図7 便からのアルコバクター属菌分離手順

DNA 抽出方法

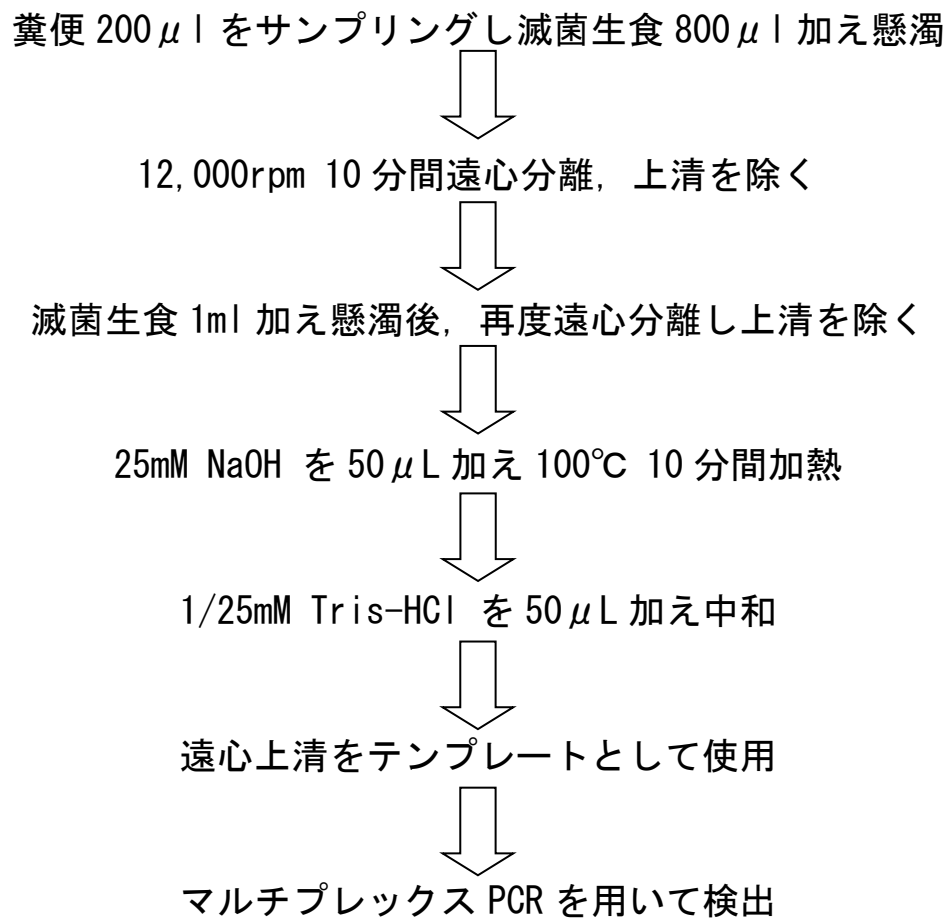


図 8 糞便を対象とした *Arcobacter* 属菌の検出手順
(糞便中 DNA の検出)

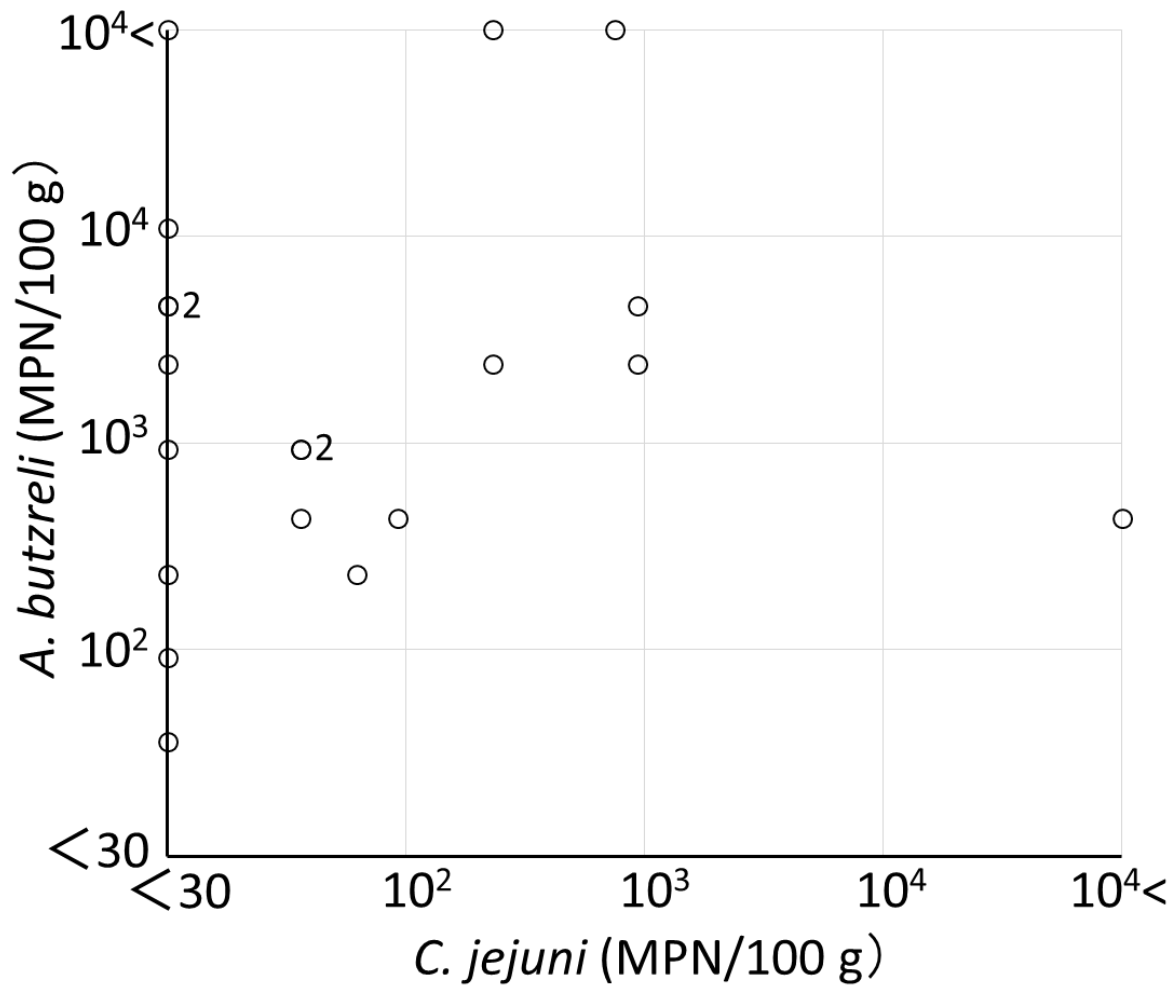


図9 鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の汚染菌数の比較

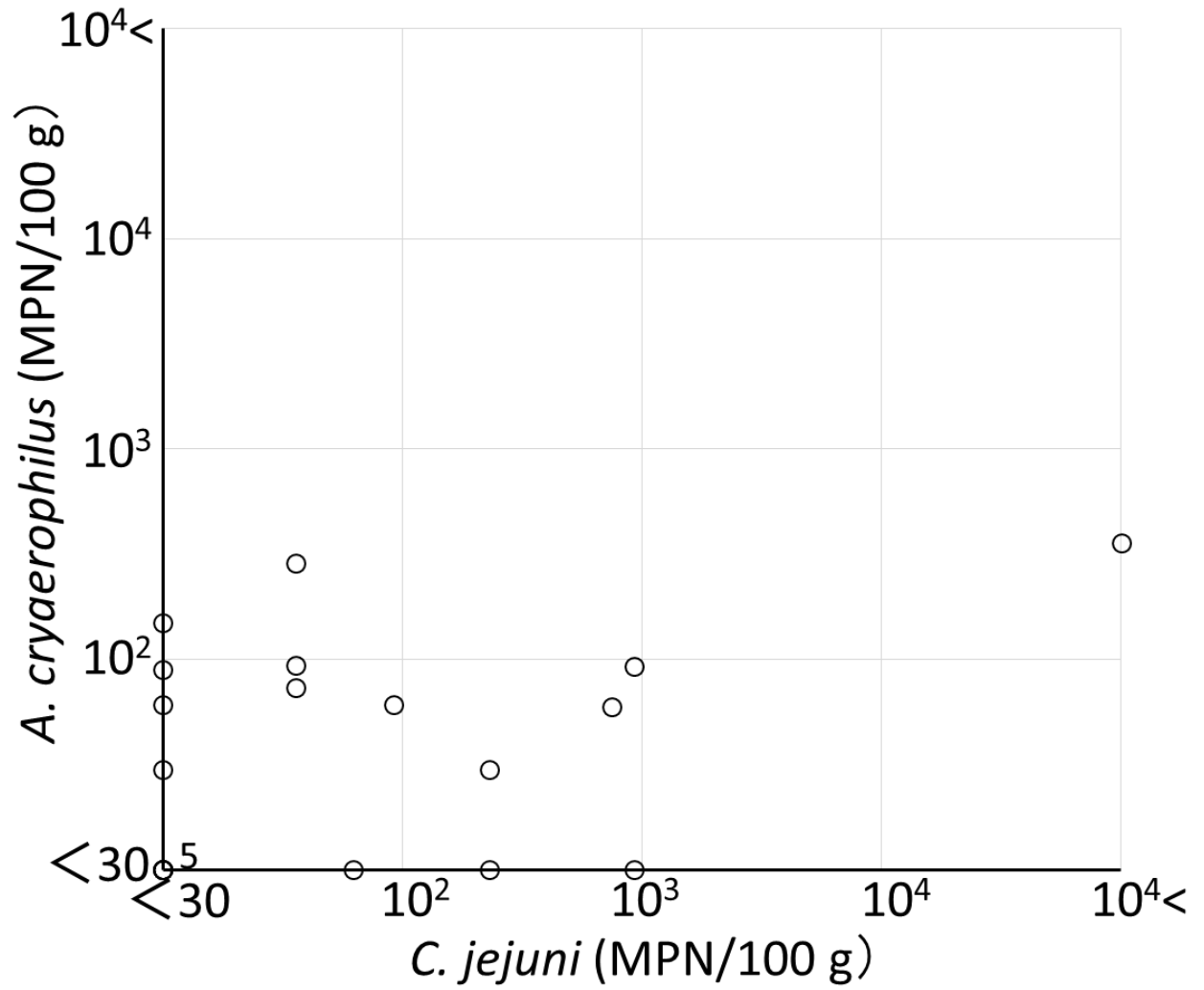


図 10 鶏肉における *A. cryaerophilus* と *C. jejuni* の汚染菌数の比較

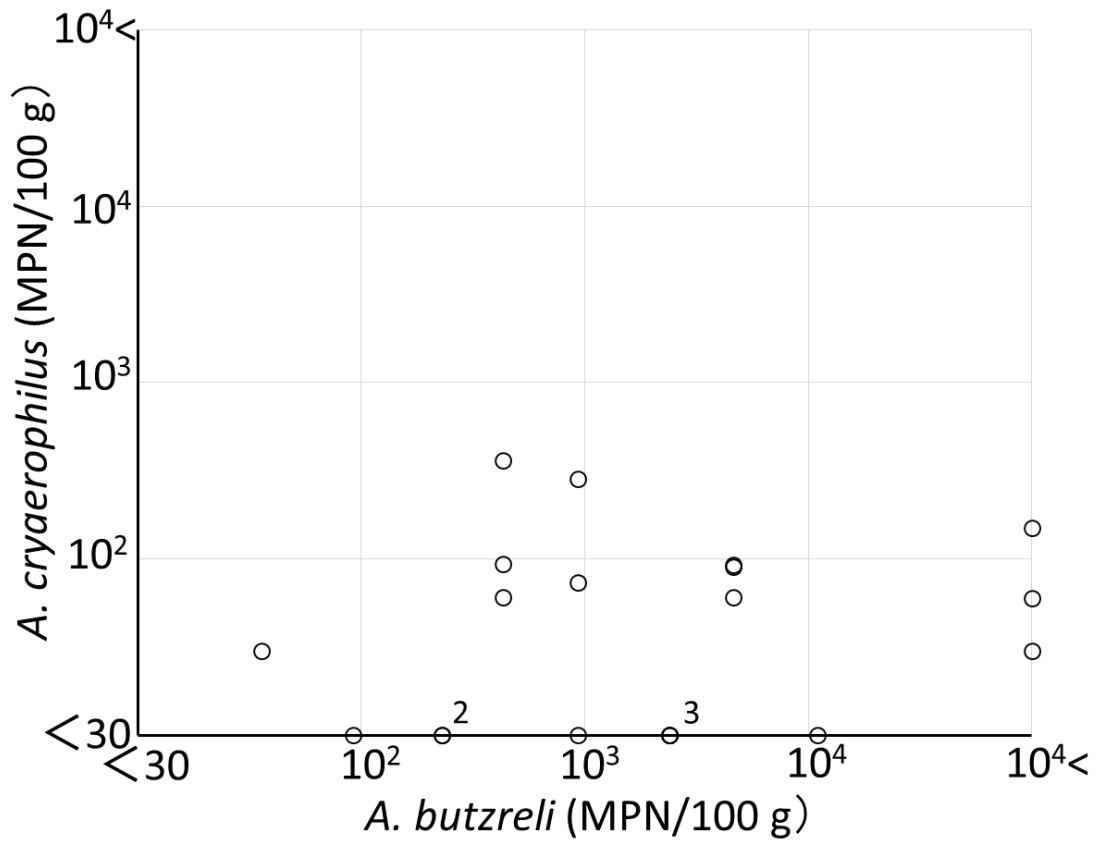


図 11 鶏肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の汚染菌数の比較

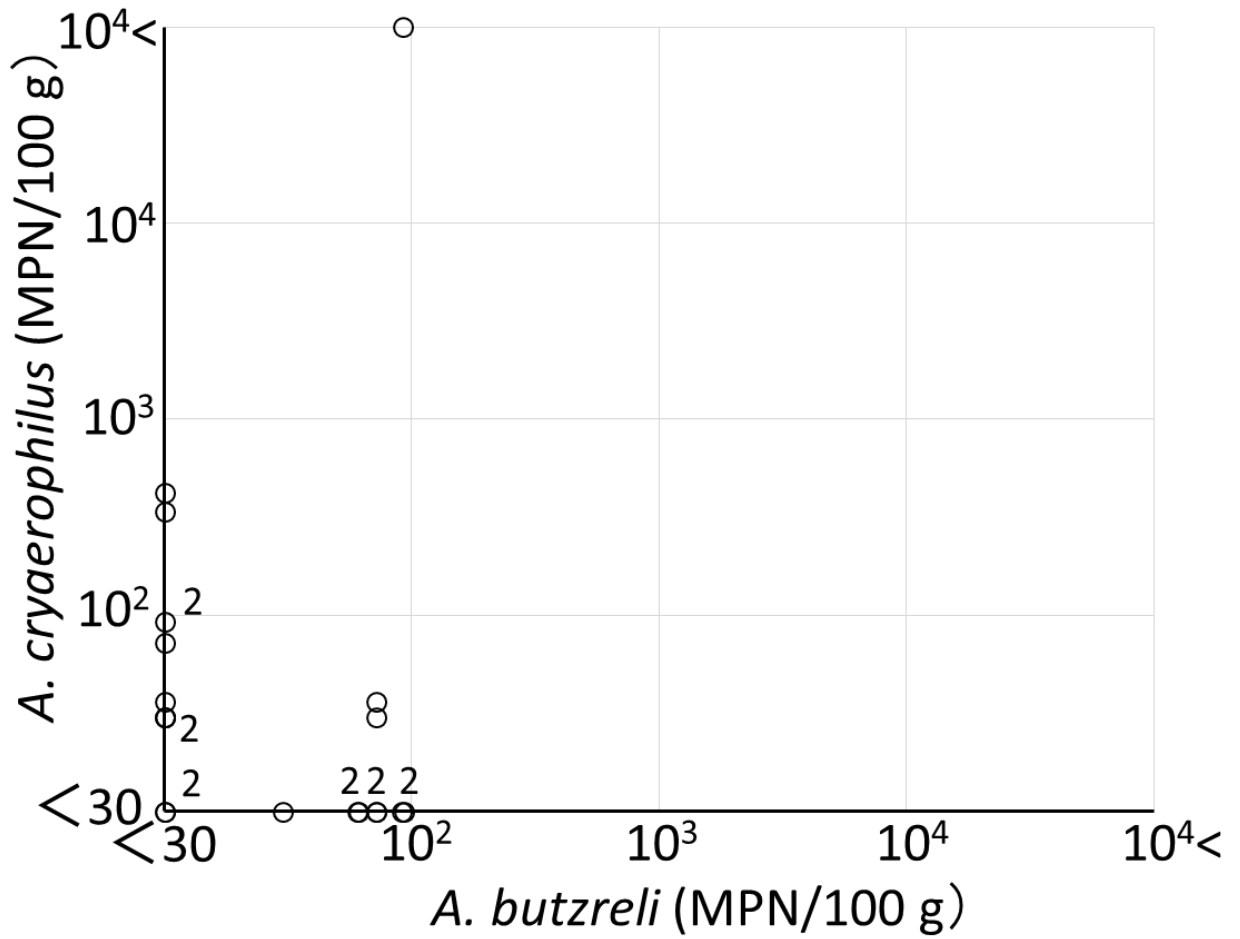


図 12 豚肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の汚染菌数の比較