

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

astA 特異的リアルタイム PCR 法の開発

研究要旨

これまでに示されている *astA* の 35 の遺伝子多型 (バリエント) の中でも、配列上完全な *astA* 遺伝子のバリエントタイプを特異的に増幅するリアルタイム PCR 法の開発を検討した。複数設計したプライマーおよびプローブ候補の中からより検出性に優れる候補を選定し、特異性を試験した。その結果、開発したリアルタイム PCR 法は、配列上不完全な *astA* バリエントタイプ保有大腸菌株や大腸菌以外の細菌種は増幅しないことが示された。また、複数の *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株を用いて検討した感度試験では、菌株のみ供試した場合と食品培養液も併せて供試した場合の両試験において、検出感度が優れることが示された。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に増幅する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌による汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用が有用と考えられた。そのため、今後の食中毒事例発生時における本リアルタイム PCR 法の活用が期待されると考えられた。

研究協力者

鹿児島大学

大岡唯祐

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

astA 保有大腸菌の食品での検査

法として、*astA* 遺伝子特異的な遺伝子検出法が有用であると考えら

れ、コンベンショナル PCR 法やリアルタイム PCR 法が既に複数報告されている。特に、様々な細菌が混在する食品から *astA* 保有大腸菌を検出するためには、特異性が高く迅速な判定が可能なリアルタイム PCR 法のプローブ法の活用が適していると考えられる。

一方で、*astA* 遺伝子には、その遺伝子配列の違いから複数の遺伝子多型 (バリエント) タイプが報告されている (Silva et al., BMC Microbiol. 2014, 14:135; Maluta et al, FEMS Microbiol. Lett. 2017, 364:6)。分担研究者の大岡の解析では、今回対象とした 35 タイプの全バリエントの中には開始コドンの変異や *astA* 配列中への終始コドンの挿入などによって配列上不完全な *astA* バリエントも存在することが示されている (詳細略、Personal communication)。また、昨年度までの本研究において、日本の集団食中毒事例由来株は多様なバリエントタイプを保有していることが示された。さらに、昨年度の報告では、配列上不完全な *astA* バリエントタイプとして v22 のみが報告されていたが、その後、v7、v15 および v33 についても同様に配列上不完全であることが予想されると分担研究者の大岡から指摘

された。そこで本研究では、v7、v15、v22 および v33 以外の配列上完全な *astA* バリエントタイプを特異的に検出するリアルタイム PCR 法を開発することを目的とした。なお、本研究では、予備試験にて各種 Assay の検出性に差が認められることが予想された配列上完全な *astA* バリエントタイプである v29 および v34 を保有する *astA* 保有大腸菌株を活用した。

B. 研究方法

[1] プローブ候補の設計

昨年度作製した v22 以外の *astA* バリエント特異的なプライマーおよびプローブセット候補 (Assay 7、Assay 8、Assay 10 および Assay 11) 4 種類を基本として、v7、v15 および v33 の配列を非検出にするためにプローブの配列を修正した。なお、新しいプローブを用いた配列上完全な *astA* バリエントタイプを検出対象するリアルタイム PCR 法候補を以下 Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r とした。

[2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立 (1) 「*astA* 保

有大腸菌の性状等の解析」において、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 を保有すると特定された *astA* 保有大腸菌および予備試験にて各種 Assay の検出性に差が認められることが予想された配列上完全な *astA* バリエーションタイプである v29 および v34 を保有すると特定された *astA* 保有大腸菌の合計 7 株を供試した。

(2) リアルタイム PCR 法

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r について、それぞれに特異的なプライマーおよびプローブを用いて以下の分量にて反応試薬を調製した。2×TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 15 μL、10 μM フォワードプライマー 0.9 μL、10 μM リバースプライマー 0.9 μL、菌株の熱抽出 DNA 溶液 5 μL、滅菌蒸留水 7.3 μL の合計 30 μL とした。機器は QuantStudio 3 または QuantStudio 5 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。50°C 2 分および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 40 サイクル増幅反応させた。検討した 4 つの Assay のうち増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を以降の検討に用

いた。

[3] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における Assay 11r での検出

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立「*astA* 保有大腸菌の性状等の解析」において、大腸菌と同定され、保有する *astA* バリエーションが特定された *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例 12 事例由来株 120 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症 39 事例由来株 41 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 32 事例由来株 46 株および無症状保菌者由来株 6 株の合計 213 株を供試した。

(2) リアルタイム PCR 法

菌株の熱抽出 DNA を B. 研究方法 [2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定にて検討し決定した Assay 11r に供試した。前述の B. 研究方法 [2] (2) と同様の試薬組成に加え、既存の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーおよびプローブ (Fratamico et al., Foodborne Pathog. Dis. 2011, 8) をインターナルコントロール (IC) として加えた Duplex の方法にて試験した。なお、[2] (2) と同様の機器および反応温度条件

にて試験した。Ct 値が得られた場合を陽性と判定した。また、陰性の結果が得られた場合には、その株の保有する *astA* バリエーションタイプを考察した。

[4] *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における Assay 11r の検出

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立「*astA* 保有大腸菌の性状等の解析」において、大腸菌以外の細菌種と同定された *astA* 保有細菌合計 5 株を供試した。その詳細は、散発下痢症 1 事例の患者由来 *Morganella morganii* 1 株、無症状保菌者由来 *Klebsiella pneumoniae* 1 株、2016 年に患者から分離された *Klebsiella oxytoca* 1 株、2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株および 2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* 1 株である。

(2) リアルタイム PCR 法

上記 B. 研究方法 [3] (2) と同様に実施した。

[5] *astA* 保有大腸菌の菌液を用いた Assay 11r の感度試験

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌集団食中毒事例由来の本菌 4 株 (AST19、AST46、

AST73 および AST198) を供試した。なお、昨年度の本研究の遺伝子解析によって、*astA* バリエーション保有コピー数は AST19 および AST46 では 2 コピー、AST73 では 5 コピー および AST198 では 1 コピーであることが明らかになっている。

(2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存された菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を tryptone soya broth (TSB) 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。この菌培養液 1 mL を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌リン酸緩衝食塩水 (滅菌 PBS) 1 mL を加え、混和した溶液を原液とした。それを滅菌 PBS にて 10^{-1} から 10^{-8} まで 10 倍階段希釈し、 10^{-1} から 10^{-8} の希釈溶液 (想定 8~0 log CFU/mL) の各 100 μ L を以下に示すアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100 μ L を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、10,000 \times g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。抽出 DNA を下記 PCR 法のテンプレートとした。

(3) リアルタイム PCR

前述の B. 研究方法 [3] (2) と

同様に Assay 11r を実施した。各 DNA につき 3 反応実施し、3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子が増幅された最も菌数が少ない段階を検出限界とした。

[6] 食品培養液を用いた Assay 11r の感度試験

(1) 供試菌株

前述の B. 研究方法 [4] (1) と同様に *astA* 保有大腸菌 AST19、AST46、AST73 および AST198 の 4 株を供試した。

(2) 食品検体

各 1 検体の市販の国産豚肉スライス、輸入冷凍むきエビおよび国産ベビーコーンを供試した。

(3) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ (10 μ L) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37 $^{\circ}$ C にて 18 時間培養した。また、各食品検体を 25 g 採取し、modified EC 培地 (mEC、日水製薬) 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42 $^{\circ}$ C にて 22 \pm 2 時間培養した。この食品培養液にて *astA* 保有大腸菌 4 菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種食品培養液 (想定 8 \sim 1 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。この菌接種食品培養液各 100 μ L を上記アルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA を下記

PCR 法のテンプレートとした。

(4) リアルタイム PCR

前述の B. 研究方法 [3] (2) と同様に Assay 11r を実施した。各 DNA につき 3 反応実施し、3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子が増幅された最も菌数が少ない段階を検出限界とした。

C. 研究結果

[1] プローブ候補の設計

V7、v15、v22 および v33 以外の *astA* バリエーションタイプに共通する遺伝子配列を確認し検討したところ、一部の配列を混合塩基とするプローブを設計した。(表 1)。

[2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r のいずれにおいても、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 保有株は陰性であった。一方、Assay 8r および Assay 11r では、供試した株のうち v29 保有株および v34 保有株の 6 株では、同程度の Ct 値 (17.4-20.6) を示したが、Assay 7r および Assay 10r では、v29 保有株の Ct 値 (28.1-30.7) と v34 保有株の Ct 値 (16.4-17.1) とに大きな差が認められた (図 1) ため、Assay 7r および Assay 10r に

における配列上完全な *astA* バリエーションタイプの検出性が劣ると考えられた。Assay 8r はフォワードプライマーおよびプローブを新規に設計したが、リバースプライマーには過去に報告がある既存の配列を活用していたものである。一方、Assay 11r は、フォワードプライマー、リバースプライマーおよびプローブのいずれも新規に設計したものであったため、新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。

[3] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における Assay 11r での検出

集団食中毒事例由来株 120 株、散発下痢症由来株 41 株、および無症状保菌者由来株 6 株のいずれも Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅された(表 2)。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株のうち 44 株は *astA* および IC の両方が増幅され、他 2 株は IC が増幅されるも *astA* が増幅されなかった。これら 2 株の保有する *astA* バリエーションタイプは v7 であった。

[4] *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における Assay 11r での検出

K. pneumoniae 1 株および *K. oxytoca* 3 株はいずれも IC が増

幅されるも *astA* が増幅されなかった(表 3)。また、*M. morgani* は、*astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった。

[5] *astA* 保有大腸菌の菌液を用いた Assay 11r の感度試験

astA を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.9 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.4 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9994$ を示した(図 2)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $2.2 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.7 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9972$ を示した(図 2)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.4 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9915$ を示した(図 2)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.6 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.2 \text{CFU/PCR tube}$) にお

いて 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9975$ を示した(図 2)。

[6] 食品培養液を用いた Assay 11r の感度試験

豚肉の培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.9 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.4 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9956$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.1 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9853$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.5 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.2 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9975$ を示した(図 3)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株

AST198 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{CFU/mL}$ ($=1.9 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9981$ を示した(図 3)。

エビの培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.0 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9952$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.1 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9891$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.5 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.2 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9906$ を示した(図 3)。さら

に、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{ CFU/mL}$ ($=1.9 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9861$ を示した(図 3)。

ベビーコーンの培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $0.9 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.04 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9902$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.8 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.3 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9944$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.0 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.05 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の

近似曲線は、 $R^2=0.9905$ を示した(図 3)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{ CFU/mL}$ ($=1.9 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9865$ を示した(図 3)。

D. 考察

本研究にて開発した Assay 11r では、配列上不完全な *astA* バリエントタイプである v7 を保有する大腸菌株は増幅されないことが示された。また、大腸菌以外の *astA* 保有細菌のうち、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* についても、Assay 11r において *astA* は増幅されないことが示された。一方、*M. morgani* は、Assay 11r の *astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった結果であったが、IC として採用した 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーおよびプローブは、大腸菌を検出する目的で開発されていた。そのため、Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅される場合を *astA* 保有大腸菌陽性と判定することが適していると考えられた。本研究にて開発したリアルタイム

PCR 法は、*astA* のうち大腸菌保有の配列上完全な *astA* バリエーション特異的な増幅が可能であることが示唆された。今後、本研究の供試菌株が保有しなかった種類の *astA* バリエーションタイプについて、その配列を合成し、特異性試験によって検出性を検討する必要があると考えられた。

また、保有する *astA* バリエーションタイプの種類やコピー数が異なる 4 株の *astA* 保有大腸菌を用いた感度試験では、検出限界が 2.2 log CFU/mL 以下といずれの株でも検出性に優れることが示された。また、増幅曲線の近似式がいずれも $R^2=0.99$ を示しており、高い直線性を示すことから、定量性にも優れることが示された。*astA* 保有大腸菌 4 菌株および 3 種類の食品の増菌培養液を用いて感度を検討したところ、いずれの食品および菌株でも検出限界が 2.6 log CFU/mL 以下であり検出性に優れることが示された。また、増幅曲線の近似式がいずれも R^2 が 0.98 以上を示しており、高い直線性を示すことから、食品培養液を用いた場合でも定量性にも優れることが示された。そのため、開発した *astA* 特異的リアルタイム PCR 法は、食品培養液中の *astA* 保有大腸菌を優れた感度で

増幅することが示された。

E. 結論

大腸菌が保有する配列上完全な *astA* バリエーションタイプを特異的に増幅するリアルタイム PCR 法を開発した。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用にも有用と考えられた。そのため、今後の食中毒事例発生時における本リアルタイム PCR 法の活用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品および環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析. 日本食品微生物学

会雑誌 印刷中

(学会等発表)

新井沙倉，廣瀬昌平，池田伸代，門口真由美，有川衣美，溝腰朗人，新免香織，横山孝治，土井りえ，齊木大，大西貴弘，工藤由起子．食品における *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討．第 44 回日本食品微生物学会学術総会．令和 5 年 9 月 21-22 日．大阪

新井沙倉，溝腰朗人，佐伯美由紀，木全恵子，柳本恵太，原田誠也，山谷聡子，土屋彰彦，床井由紀，福留智子，長岡宏美，山田香織，濱夏樹，山中拓哉，小西典子，土井りえ，廣瀬昌平，工藤由起子．食品および環境等における *Escherichia albertii* の汚染実態調査．第 119 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 5 年 10 月 12 日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

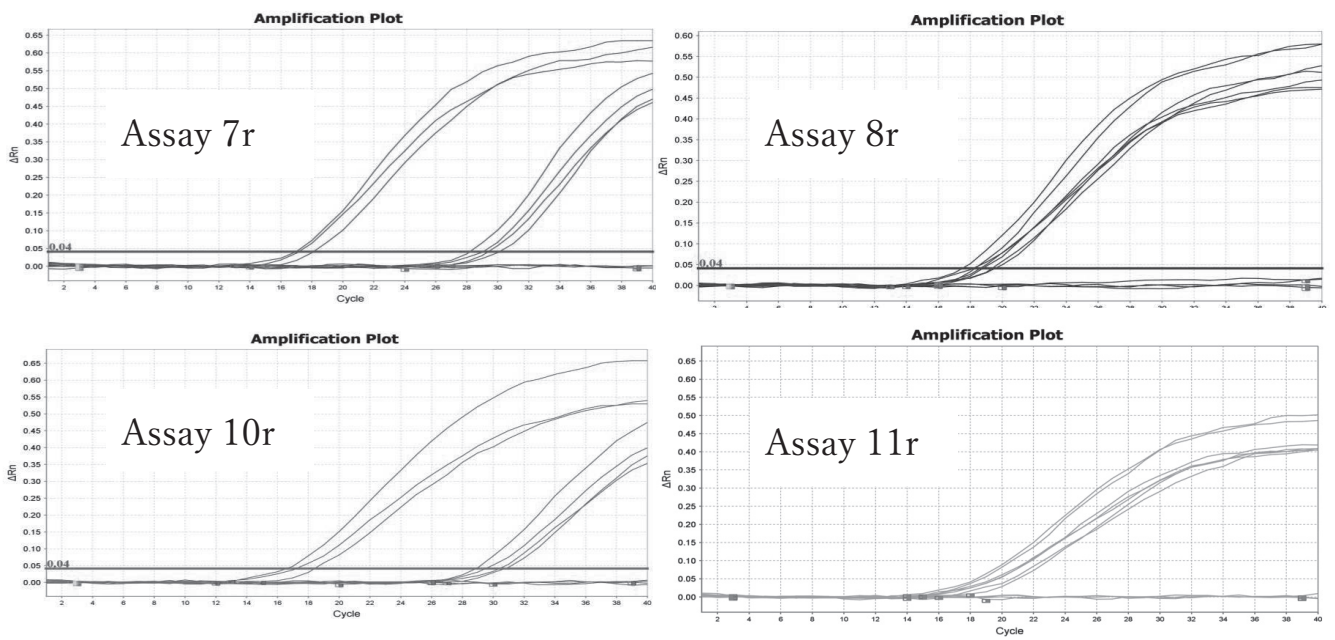


図 1. 機能しないバリエントを含む一部のバリエント保有株の各種 Assay における蛍光プロット像

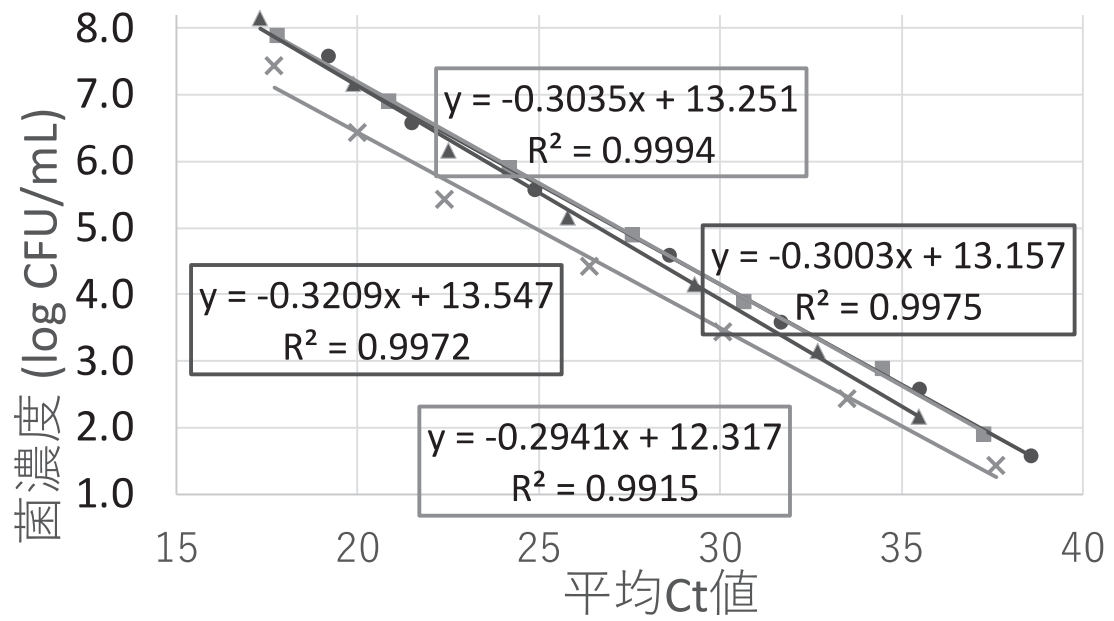


図2. 各種 *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検量線

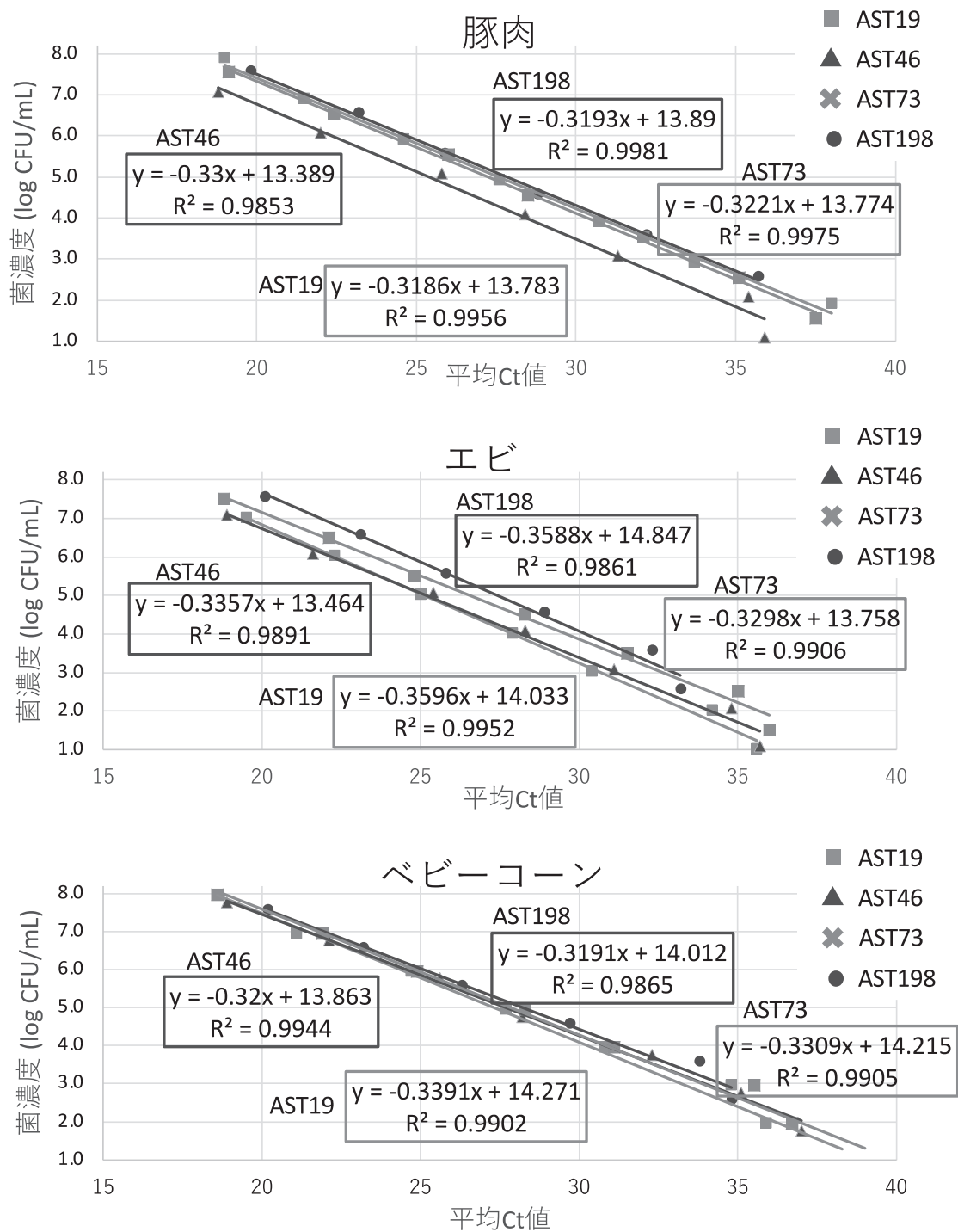


図 3. 各種食品培養液と各種 *astA* 保有大腸菌培養液の希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検量線

表 1. 供試した *astA* 特異的リアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブ候補

名称	目的	プライマーおよびプローブ配列 (蛍光およびクエンチャー標識)	産物 (bp)
Assay 7	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出	論文投稿の都合により、 配列等は伏せさせていただきます	111
Assay 8	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		115
Assay 10	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		122
Assay 11	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		126

表 2. 多様な *astA* 保有大腸菌の Assay 11r での検出性

由来	事例数	株数	Assay 11r陽性株数	
			<i>astA</i>	IC*
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となった 集団食中毒事例由来株	12	120	120	120
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される 散発下痢症由来株	39	41	41	41
その他病原体による集団食中毒事例由来株	32	46	44	46
無症状保菌者	-	6	6	6

-: 該当なし, IC: インターナルコントロール

表 3. 各種 *astA* 保有細菌の Assay 11r での検出性

細菌種	由来	Assay 11r陽性株数	
		<i>astA</i>	IC
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	2016年に患者から分離	0	1
	2018年に患者から分離	0	1
	2018年にスワブから分離	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無症状保菌者	0	1
<i>Morganella morganii</i>	患者	1	0

*MALDI-TOF MSでの*K. oxytoca*との一致率が80~86%であった。

表 4. *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検出限界

<i>astA</i> 保有 大腸菌株	<i>astA</i> バリエーション	<i>astA</i> コピー数	検出限界*
			(log CFU/mL)
AST19	論文投稿の都合により、内容は 控えさせていただきます	2	1.9
AST46		2	2.2
AST73		5	1.4
AST198		1	1.6

*3反応中3反応で陽性となった最も菌数が少ない段階を検出限界と設定

表 5. 各種食品培養液と *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検出限界

<i>astA</i> 保有 大腸菌株	<i>astA</i> バリエーション	<i>astA</i> コピー数	検出限界 (log CFU/mL)*		
			豚肉	エビ	ベビーコーン
AST19	論文投稿の都合により、 内容は控えさせていた できます	2	1.9	1.0	0.9
AST46		2	1.1	1.1	1.8
AST73		5	1.5	1.5	1.0
AST198		1	2.6	2.6	2.6

*3反応中3反応で陽性となった最も菌数が少ない段階を検出限界と設定