

## *Salmonella Choleraesuis* 感染をスクリーニングする ELISA の検討

小林 秀 樹 (動物衛生研究所)

Kobayashi, H. (2011). Evaluation of an ELISA for the Screening of *Salmonella Choleraesuis* Infection in Pigs

All about SWINE 37/38, 24-26

我国では豚に限らず全ての家畜において全国的なサルモネラの汚染実態が明らかにされていない。また、近年では豚サルモネラ症の蔓延傾向がと畜検査の成績から伺える。これらのことからサルモネラ拡散の原因究明と農場汚染実態の把握が急務となっている。諸外国において豚サルモネラ汚染のスクリーニングにはLPSを抗原とした市販ELISAキットが一般的に用いられている。日本でもELISAキットの購入は可能であるが高価なためか、あまり使用されていない。そこでO7群豚サルモネラ感染抗体をELISAで検出するためのサルモネラLPS抗原の調整法について検討し、試作ELISAの有効性を市販ELISAキットと比較評価した。

### 材料と方法

I, O および C の 3 県で新たに SC 感染が確認された農場から収集した 57 ~ 120 日齢の子豚由来 218 (I 県 80 頭, O 県 45 頭, C 県 93 頭) 血清を供試した。

試作 ELISA のための O7 群サルモネラ特異抗原 (O7-LPS) の調整は本誌 30 号 ([http://jp-spf-swine.org/All\\_about\\_SWINE/AAS/30/30\\_25-28.pdf](http://jp-spf-swine.org/All_about_SWINE/AAS/30/30_25-28.pdf)) にあるとおり市販のキット (iNtRON BIOTECHNOLOGY

社の LPS Extraction Kit) で実施した。基質液として ABTS を供試した方法は同 HP 上で記述したとおりであるが、TMB を用いた方法について以下に簡潔に述べる。

キット抽出した LPS 抗原液を NaCl 濃度 3.15M の PBS (通常の PBS に 3M の NaCl を加えて作製) で至適濃度に (通常 50,000 倍程度) 希釈し、ヌンク社製ポリソープ ELISA プレートに 100 $\mu$ l ずつ加え固相化する (4 , 20 ~ 48 時間)。固相化したプレートの溶液を捨て、0.05 % Tween20 加 PBS でウエルを 2 回洗浄する。ここで風乾した後、よく乾燥した冷暗所なら長期保存できる。室温でも乾燥した場所なら少なくとも数週間は安定している。

0.05 % Tween20 加 PBS で 0.5x ブロッキング液を作製し、陽陰性血清と被検血清を 1:100 希釈する。プレートはブロッキングする必要はない。

各希釈血清を 100 $\mu$ l ずつ各ウエルに加え、室温で 1 時間反応させる。

希釈血清液を捨て、0.05 % Tween20 加 PBS で 3 回洗浄する。

ペルオキシターゼ標識抗豚 IgG を 0.5x ブロッキング液で 2,000 ~ 3,000 倍希釈したものを

100µl ずつ各ウエルに加え，室温で 30 分間反応させる。

液を捨て 0.05% Tween20 加 PBS で 3 回洗浄する。

TMB 基質液を加え，室温で 5 ~ 10 分間反応させ，陽性コントロールの OD 値が 1.2 ~ 2.0 位を示した時点で 1N HCl を 100µl ずつ各ウエルに加え反応を停止させる。ELISA リーダー OD<sub>450 nm</sub> で判定。

市販の ELISA キット (SALMOTYPE<sup>®</sup> Pig Screen ELISA) は使用説明書に従い実施した。

結果と考察

I および O 県由来の ELISA 成績は市販のものと同試作 ELISA とで一致した (PPV 20%) (図 1&2) が C 県のそれは一部不一致であった (図 3)。I および O 県の農場は O7 群のサルモネラ感染のみであったのに対し，C 県の農場は SC 以外にも

O4 群サルモネラが分離されていた経緯があった。市販の ELISA は O7 群以外のサルモネラ抗体も検出することから C 県のような成績が得られる結果となった。

いずれの陽性農場でも PPV20% を指標にした際の確実な陽性検体は 3 ヶ月齢以降で確認されることがわかった。実際に市販のサルモネラ ELISA キットでも被検血清は 4 ヶ月齢以降 7 ヶ月齢くらいまでとしている。

豚は加齢と共にサルモネラやサルモネラ以外の種々の細菌に暴露され，多様な免疫グロブリンを産生し ELISA 抗原との交差反応が起こりやすくなることから，繁殖豚では ELISA のバックグラウンドが高くなり正確な判定が困難となる。また，これとは逆に幼若豚では移行抗体の検出も考えられるため，血清のサンプリング対象月齢が 4 ~ 7 ヶ月というのは適切である。

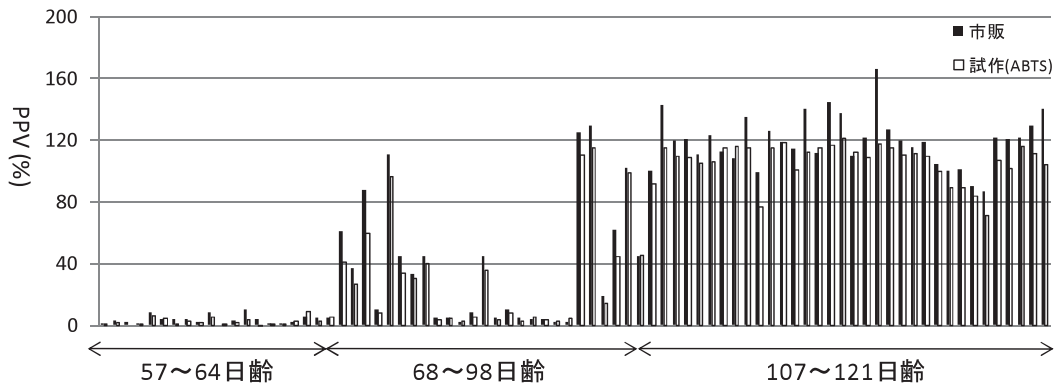


図 1 市販および試作 ELISA (ABTS 基質) による日齢別血清診断結果 (I 県)

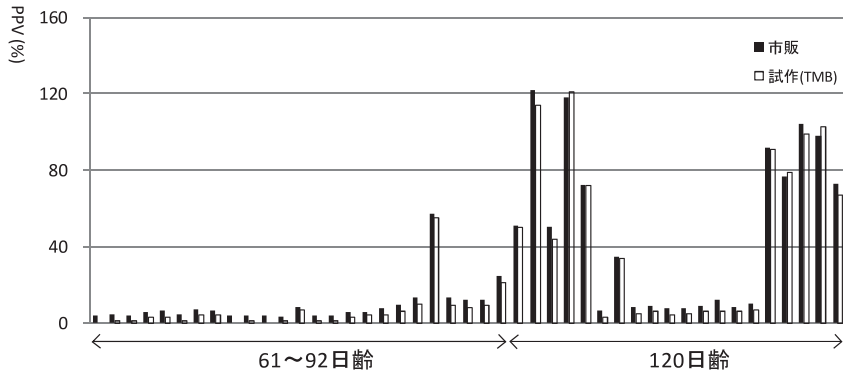


図2 市販および試作ELISA (TMB 基質) による日齢別血清診断結果 (O県)

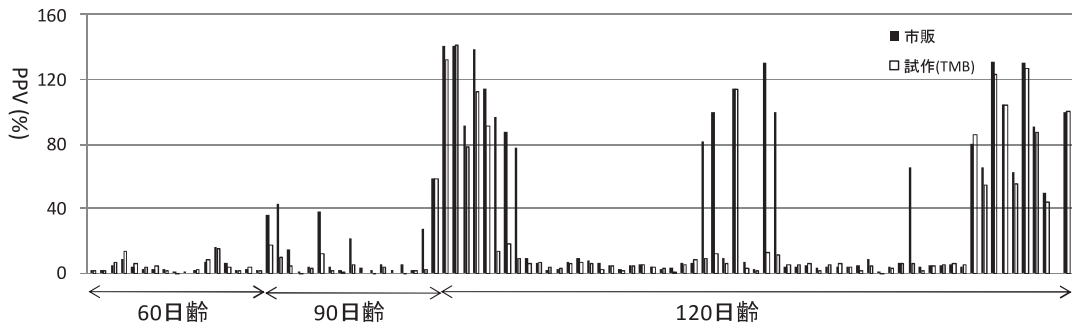


図3 市販および試作ELISA (TMB 基質) による日齢別血清診断結果 (C県)