

豚敗血症の迅速診断に向けた基礎調査

発表者氏名：江澤綾子

発表者所属：東藻琴食肉衛検

はじめに

と畜検査で敗血症の疑いが認められた場合、原因菌を分離し判定するまでに通常2～3日間を要し、その間当該獣畜の枝肉等は処分保留のまま保管される。これまで、当所において敗血症と判定された豚から分離された原因菌のほとんどが*Streptococcus*属菌である(第1図)。演者らは以前、*Streptococcus*属菌の迅速PCR法を用いて動物の主要疾病由来*Streptococcus*属(*S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*または*S. dysgalactiae subsp. equisimilis*、*S. agalactiae*、*S. porcinus*、*S. equi*、*S. canis*、*S. uberis*、*S. suis type1*、*S. suis type2*、*S. bovis*)を一斉に同定する方法を報告した¹⁾。そこで今回、と畜検査における敗血症原因菌の迅速同定法を確立するための基礎調査として、敗血症と判定された豚から分離された同属菌株等についても本法が活用できるか試験を行った。

材料および方法

当所の検査により敗血症と診断され、API20STREPにより*S. suis*と同定された純培養株を用いてPCRコンディションの調整を行った。また、当該豚の臓器スタンプ培養で得られたコロニーから釣菌した。それぞれの菌株は、50 μ lの5mMEDTAに懸濁し、25mg/mlのアクロモペプチダーゼを0.5 μ l加えて、37 $^{\circ}$ C、30分インキュベートした。その後95 $^{\circ}$ C、15分加熱後、室温まで冷却して鋳型DNAサンプルとし、第2図および第1表に示した方法でPCRを実施した。

結果

当所で分離した純培養株および臓器スタンプ培養のコロニーから抽出した鋳型DNAで行った結果、夾雑物の影響を受けることなく、PCR産物を得ることができ*S. suis type1*であると判定できた(第3図)。

まとめ

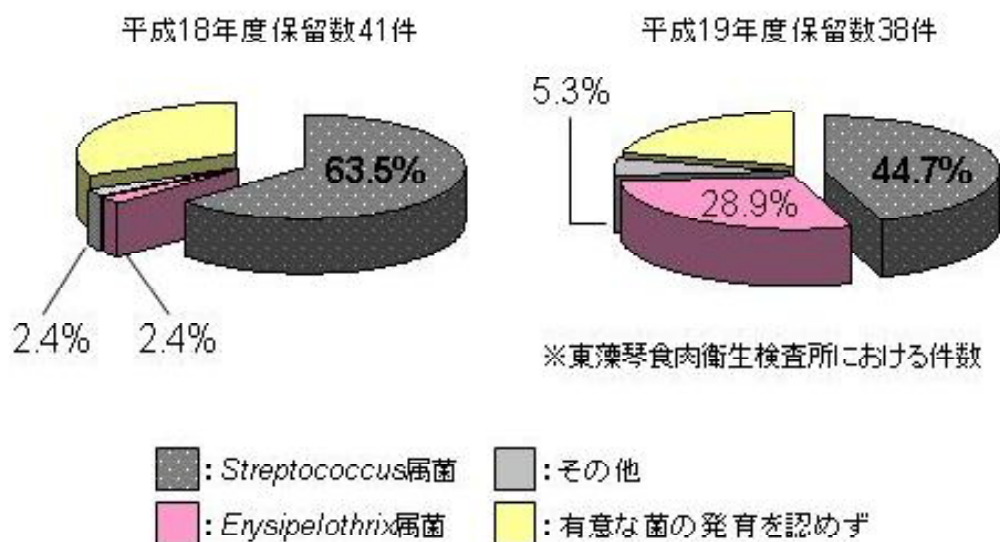
本調査により、夾雑物の存在においても本PCR法に対する影響は少なく、正確に判定することが可能であるとわかった。*Streptococcus*属は、主要な分類法であるランスフィールド型別試験においても分類は確定せず、市販同定キットを用いても同定不能となる場合

があり菌種の判定には、純培養後さらに24時間要する場合もある。本PCR法を利用すると今のところ、4時間程度で判定が可能となるので実用性は高いと考えられる。

さらに、*Erysipelothrix*属菌のプライマーなど、他の菌属のプライマーを組み合わせる事ができれば、より多くの菌の一斉同定が可能になると思われる。

引用文献

- 1) Kawata K., Anzai T., Senna K., Kikuchi N., Ezawa A., Takahashi T. (2004): Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. FEMS Microbiology Letters 237:57-64.



第1図 疑敗血症で検査した豚から分離された菌

ReactionA	ReactionB
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. uberis</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. canis</i>
<i>S. porcinus</i>	<i>S. suis I</i>
<i>S. equi</i>	<i>S. suis II</i>
	<i>S. bovis</i>

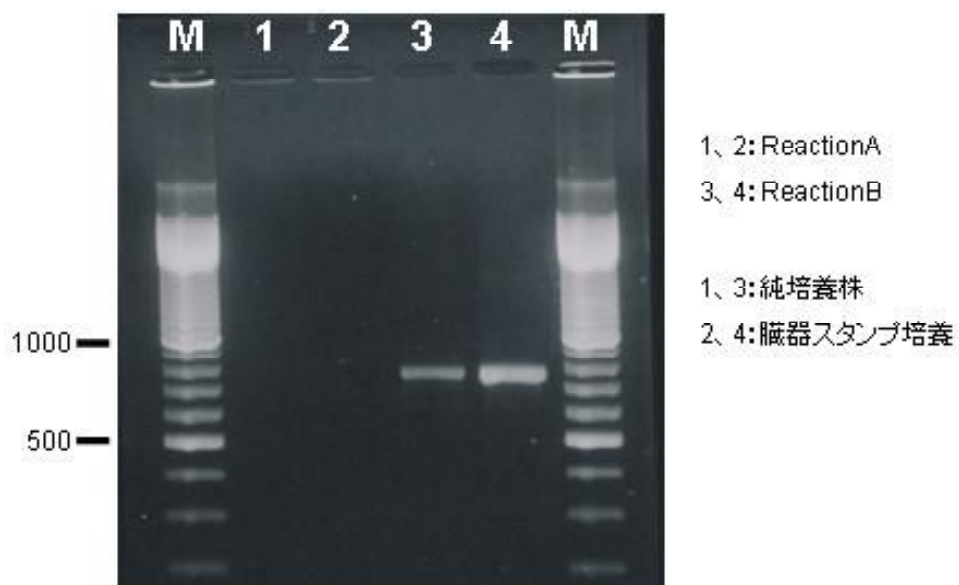
第2図 *Streptococcus*属菌の迅速PCR

- PCR組成(3反応分)

DW	39.6μl	}	Total 57μlを19μlずつ に分注後、サンプル1μl を加える
MgCl ₂ (25mM)	2.4μl		
dNTP(2mM)	6.0μl		
primer mix	2.4μl		
Taq polymerase	0.6μl		
10× buffer	6.0μl		
- PCRプログラム

94℃、2min	}	30サイクル
↓		
94℃、1min		
55℃、30sec		
72℃、1min		
↓		
72℃、1min		
4℃		

第1表 primer mixの対応菌種法



第3図 純培養株および臓器スタンプ培養のPCR泳動像

【口頭発表】

- ・平成20年度オホーツク獣医師会獣医学術研究発表会(北見市)
- ・平成20年度日本獣医公衆衛生学会北海道地区大会(洞爺湖町)
- ・全国公衆衛生獣医師会協議会調査研究発表会(東京都)

牛の肝臓

発表者氏名：大西綾衣 松井高峯¹⁾

1)帯畜大獣医病理

発表者所属：東藻琴食肉衛検

症例：牛 ホルスタイン種 雌 80ヶ月齢

臨床的事項：特になし

肉眼所見：肝臓表面に、直径約1～10mmの不整形な黄白色結節を十数個認めた。結節は約1～5mmの線状や円形の黄白色斑の集簇で形成されていた。剖面にて結節は実質にも入り込み中心部に約1mmの黄色チーズ様物質が認められた。その他の臓器には著変を認めなかった。

病理組織所見：結節は数個の壊死巣からなっており、その周囲に線維芽細胞、好酸球およびリンパ球の浸潤がみられた。また肝実質内や壊死巣付近で好酸性膜様物を認めた。好酸性膜様物は一部線維芽細胞に取り囲まれているのもあった。なお、この物質はPAS反応陰性であった。グリソン鞘では結合織の増生、好酸球の浸潤、血管内皮細胞の絨毛性増殖および偽胆管がみられた。肝臓漿膜の中皮は立方状を呈し、結節部においては乳頭状に増殖しているのがみられた。

組織診断名：多病巣性好酸球性静脈炎及び好酸球性肉芽腫炎（寄生虫を疑う）



写真1 肝臓表面の黄白色結節

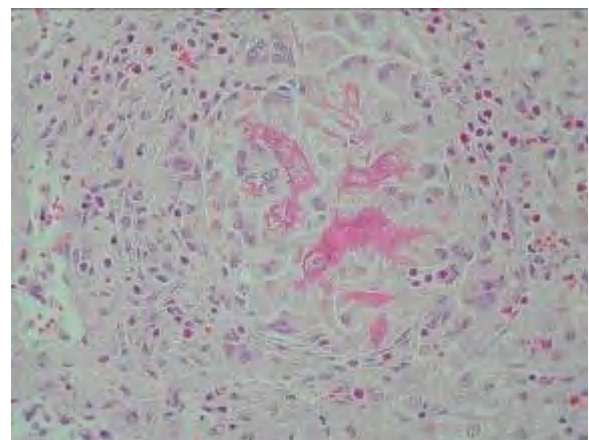


写真2 肝実質内の好酸性膜様物質

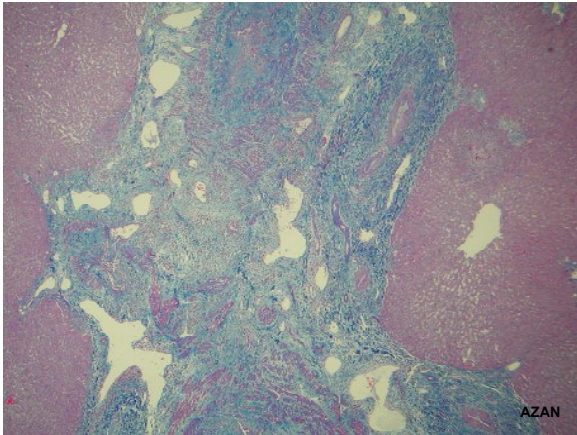


写真3 グリソン鞘における結合組織の増生、リンパ管の拡張、
小葉間血管の血管内皮細胞の絨毛性増殖、偽胆管
(AZAN 染色)

口頭発表：全国食肉衛生検査所協議会 57 回病理研修会