

7. ひな白痢急速診断用菌液を用いたSE感染鶏の発見と検査方法の検討

奈良県家畜保健衛生所 業務第2課 ○武平有理子 前田寛之

1 はじめに

養鶏場からの依頼で検査を実施している一農家において、SEワクチンを接種していないにもかかわらず、ひな白痢急速凝集反応に強く反応する血清を認めた。寒天ゲル内沈降反応（AGP）においても、今までに経験したことのないようなラインが現れたため、畜主に事情を説明すると、更なる検査を依頼された。検査は家畜保健衛生所内での取り決めに基づき進めた。

2 初発見鶏の特定及び解剖、培養

鶏舎内でのおおよその場所がわかっていたため、全血による急速凝集反応を行い鶏を特定し、精密検査を実施した。

産卵もしており、特別臨床症状も見受けられなかったが、解剖の結果、肉眼的な病変として、卵巣が一部黒くなっていた。また、盲腸は全体的に死亡鶏のような腐敗色を呈し、盲腸が付着していた腸間膜においても黒くなっていた。その他に著変はなかった。

培養方法は鶏卵のサルモネラ総合対策指針に準じて行った。ひな白痢菌の場合を想定しクロモアガーサルモネラにも塗抹したが、分離されたのはひな白痢菌と同じ血清学的グループに属するS. Enteritidis (SE)であった。

また指針では、臓器はハーナテトラチオネート等を用いた増菌培養を行うが、分離精度を上げるためEEMブイヨン培地を用いて前増菌培養も行った。おおよそのコロニー数に応じて+~+++に判別した。全体的に前増菌培養を行ったほうが良い結果が得られ、増菌だけでは分離できなかった肝臓や脾臓からもSEを検出することができた。

	卵巣	卵管	心臓	肝臓	胆汁	脾臓	小腸	盲腸
前増菌	+++	++	-	+++	-	+++	+++	++
増菌	++	+	-	-	-	-	+	++

3 同居鶏の検査

汚染状況を把握するため、同居鶏についても全血による急速凝集反応を行い、同様に検査を実施した。培養は、上記の結果を踏まえ、前増菌培養から行った。

主な培養結果としては、腹膜拭い液から最も高率に分離された。呼吸器系からの感染を考え、肺や気管も検査を行ったが、分離されなかった。主要臓器では、やはり卵巣からの分離がよく、盲腸等の消化器系よりも好む結果が得られた。また、血液からも分離される個体があり、菌血症を起こしていることが確認できた。

4 薬剤感受性試験

鶏舎には天井とたれ落ちかけた板との間に、古い鳥の巣が確認され、巣はS Eで汚染されていることがわかった。

分離されたS Eが同一起源のものであるのかどうか検討するため、薬剤感受性試験を行った。DSは鶏舎の牽引スワブを意味する。耐性率は平成18年度の薬剤耐性菌調査における結果を示した。

	初発鶏	鳥の巣	DS1	DS2	DS3	DS4	耐性率
アンピシリン	19	18	18	20	21	18	12.5
セフトゾリン	22	21	21	23	21	19	3.1
ストレプトマイシン	21	19	20	21	20	19	82.8
カナマイシン	23	21	21	22	21	20	39.1
オキシテトラサイクリン	19	19	20	19	0	0	78.1
クララムフェニコール	24	23	25	24	21	18	0.0

阻止円直径(mm)

DS3、4でオキシテトラサイクリンが耐性となっている以外はすべて感受性があった。

5 マイクロタイター法

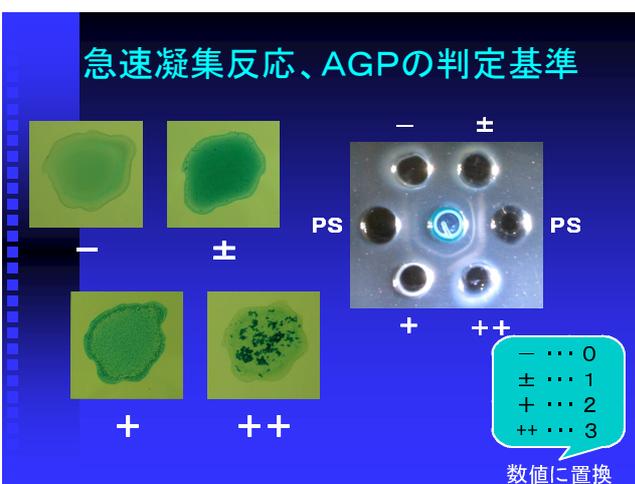
今回、持ち帰った鶏からS Eを分離することができたが、もう少し確信を持って精密検査に入れればと考え、現場レベルでのマイクロタイター法を試行してみた。

検査は96穴プレート縦長に使用し、血清を生理食塩水で段階希釈する。次に、ひな白痢急速診断用菌液を生理食塩水で2倍に希釈したものを抗原とし、血清と等量の20μlずつ加える。(抗原を2倍に希釈した理由は原液では濃すぎて凝集が見えにくいことと、無駄に抗原を使わないためである。また、2倍以上に希釈しても検査を行うことはできるが、確実に凝集が見えることと、急速凝集反応であやしい場合のみの検査であることが前提であるため、検体数が少ないことから2倍とした。)1分間振とう混和後、凝集が沈降するまで10分間待ち、判定を行う。完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を、抗体価とした。

6 急速凝集反応、AGPの判定基準

急速凝集反応、AGPをマイクロタイター法と比較するため、それぞれ4段階に判定した。PSは初発見鶏の血清であり、陽性血清として用いた。

急速凝集反応は陰性を0、疑陽性を1、陽性を2、強陽性は3として数値に置き換えた。本来判定に++はないが、今回の検査ではこのような強い凝集が多く見られたため、比較するには必要であった。



写真は血清凝集反応であるが、全血凝集反応の場合も同様に判定基準をつくった。

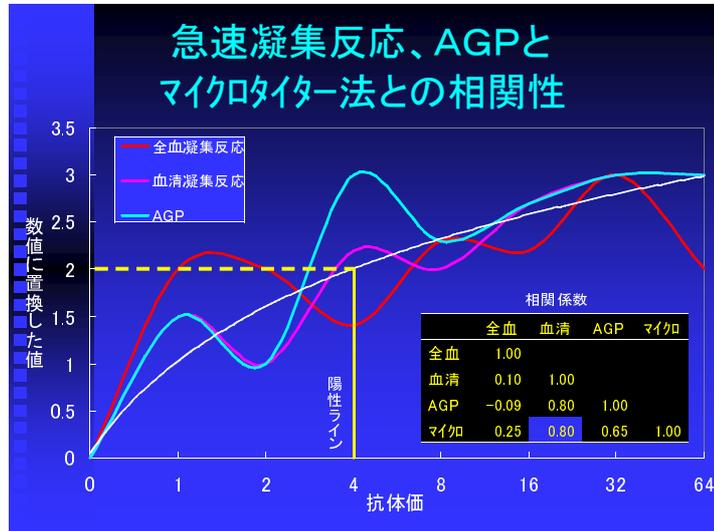
また、AGPの判定は、ラインがないものを0、うっすらラインのあるものを1、1本

くっきりラインのあるものを2、2本ラインが存在するものは3とした。AGPにおける2本ラインが何を意味しているのかわからないが、陽性血清も2本ラインであるため、1つの判定としていた。

7 急速凝集反応、AGPとマイクロタイター法との相関性

上記のように数値に置き換えた値を用いて、急速凝集反応、AGPとマイクロタイター法における抗体価との相関性について検討した。

血清凝集反応とAGPはほぼ同様の曲線を描いたが、全血凝集反応は離れた曲線となった。マイクロタイター法は、血清凝集反応と相関が一番強いことが確認できた。



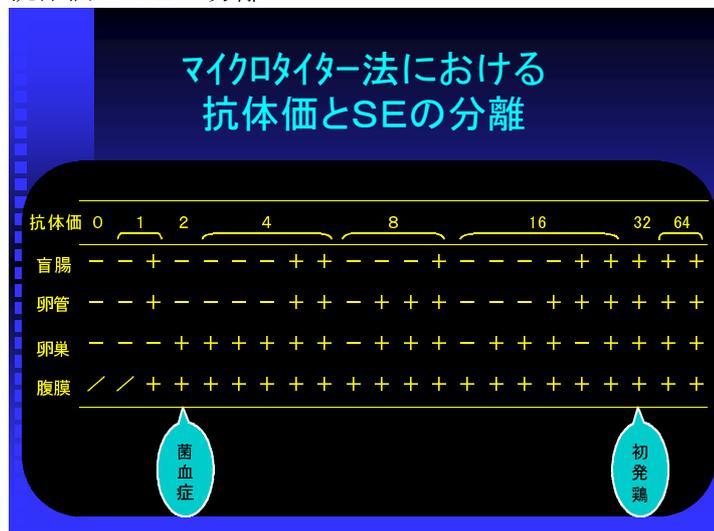
この結果を踏まえ、血清凝集反応のグラフより近似曲線を描き、数値に置き換えた値では2、つまり+の判定のところと近似曲線との交点から抗体価は4倍となった。SEの分離状況から考えても適合しているものと思われ、4倍を陽性ラインとした。

8 マイクロタイター法における抗体価とSEの分離

マイクロタイター法における抗体価とSEの分離の状況は表のようになった。縦4つの判定が1羽分の結果である。

SEは盲腸よりも卵管、卵管よりも卵巣を好む結果が得られた。

この検査法では初発見鶏の抗体価は32倍となり、これくらい高い値であると、ほぼ主要な臓器からSEが分離された。1、2倍であってもSEが分離されることがあるが、これには感染の時期が関与しているものと思われ、菌血症を起こしてる個体の抗体価は2倍とかなり低くなっていた。



9 マイクロタイター法の定期検査への応用

マイクロタイター法を定期検査に応用した。定期検査を行っている14戸の農家で今回、急速凝集反応で判定に困った血清は225検体中22検体あった。この検査方法を用いた

結果、当該農家は4検体中3検体が陽性の判定となり、その中に初発見鶏も含まれている。その他の農家の18検体はすべて陰性の判定となった。

また、今年度に検査を行った当該農家の保存血清が30検体あり、この中にも急速凝集反応で判定に困った血清があったが、マイクロタイター法では、すべて陰性の判定となった。

10 マイクロタイター法の利点

- ・短時間で簡便に実施でき、AGPの結果を待つことなく、当日判定できる。
- ・急速凝集反応、AGPで疑陽性の場合でもマイクロタイター法では抗体価として数値化されるので、明確な判定結果が得られ、人による判定結果に違いが生じにくい。
- ・今後、急速凝集反応に強く反応する場合、抗体価が測定できるので、AGPと併用することで、その後の対応への判断の一助になりうる。

最後に、当該農家については、鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき指導を行っている。