

豚のサルモネラ検査法

全農家畜衛生研究所 大角 貴 幸

1. はじめに

SPF豚農場認定制度が発足して10年が経過したが、この間、消費者の「食の安心・安全」についての関心はさらに高まり、SPF豚生産においても、生産性の向上等を目的とした養豚経営の観点からだけでなく、より安心・安全に対する消費者ニーズに対応する観点からの取り組みが求められている。

このような社会的状況を背景に、日本SPF豚協会ではSPF対象疾病の見直しを行い、GGP、GP農場における排除対象疾病としていくつかの疾病の追加を行った。そのひとつにサルモネラ・コレラシス (*Salmonella Choleraesuis*; SC) も加えられ、併せて評価法も定められた。しかし、統一した検査法は示されておらず、早急な確立が望まれる。

今回、我々が検討した「豚からのサルモネラ検査法」、特にSCの検査法等について紹介し、皆様の参考になれば幸いである。

2. SC分離のための増菌培地の検討

サルモネラの分離を行う場合、検体に含まれるサルモネラの菌数は少量であり、他の細菌の汚染もあることから、選択増菌培養という方法を用いて、有意にサルモネラの菌数を増やす方法が行われる。例えば、*S. Gallinarum* (ひな白痢菌) を除く鶏のサルモネラ検査では、Hajna-tetrathionate (HTT) 培地を用いて増菌培養する方法が行われている(⑨)が、SCの場合、HTTを選択増菌培

地に用いると発育が阻害されることがあり(④⑤)、近年、Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地(⑩)を用いた検査法が報告されている(1, ⑦, ⑫)。そこで、RV培地とHTT培地を用い、37℃および42℃におけるSCの増殖性について比較した。

SC野外分離株4株を供試株として、あらかじめトリプトソイブイオンで37℃、24時間培養した供試菌液を $10^1 \sim 10^4$ cfu/mlに10倍段階希釈した。その後、RV (Oxid社)とHTT培地(栄研)各9mlに各希釈段階の菌液1mlを接種し、37℃および42℃で20時間培養後、20 μ g/mlノボオシン加DHL (DHLN, 栄研)および同ノボオシン加ブリリアントグリーン寒天培地(BGN, BBL社)に塗抹し、SCの増殖性を比較した。

その結果、RV培地を用いた場合、37℃培養では、4株すべてが 10^1 cfu/ml接種から菌の発育が認められた。一方、42℃培養では、3株が 10^1 cfu/ml接種から菌の発育が認められたが、1株は 10^4 cfu/ml接種でも菌の発育が認められなかった。

HTT培地を用いた場合、37℃培養では、2株が 10^1 cfu/ml接種から菌の発育が認められた。また、残り2株のうち1株は 10^3 cfu/ml接種から菌の発育が認められたが、1株は 10^4 cfu/ml接種でも菌の発育が認められなかった。42℃培養では、4株すべてが 10^4 cfu/ml接種でも菌の発育が認められなかった(表1)。

このことから、SCの分離はRV培地を用い37℃で20時間増菌培養を行い、その後分離培地を用い

表1 RV 培地と HTT 培地における 37 および 42°C での SC の発育性

増菌培地	株	37°C 培養				42°C 培養			
		接種菌数 (log cfu/ml)				接種菌数 (log cfu/ml)			
		1	2	3	4	1	2	3	4
RV	B-90	+	+	+	+	-	-	-	-
	C-00	+	+	+	+	+	+	+	+
	S-01	+	+	+	+	+	+	+	+
	S-02	+	+	+	+	+	+	+	+
HTT	B-90	+	+	+	+	-	-	-	-
	C-00	-	-	-	-	-	-	-	-
	S-01	+	+	+	+	-	-	-	-
	S-02	-	-	+	+	-	-	-	-

+ : 寒天平板上で菌の発育を認める

- : 寒天平板上で菌の発育が認められない

ることが適当と考えられた。

3. SC 発生農場由来材料を用いた増菌培地の検討

通常、SC の感染例では、臓器、血餅、鼻スワブ、直腸スワブ等を材料として検査が行われる(⑦, ⑪, ⑫, ⑬, ⑭)。そこで、SC 発生農場由来の野外材料を用いて、RV 培地を使用した場合の分離成績を検討した。

同一農場由来の 5, 7 および 9 週齢豚各 5 頭の血餅、鼻スワブ、直腸スワブを供試材料とし、それら検体を RV 培地で 37°C 20 時間増菌培養後、DHLN および BGN へ菌を塗抹し、37°C で 24 時間培養した。培養後、サルモネラと疑われるコロ

ニーについて常法に従い(②, ⑩)、生化学性状および血清型を調べた。

その結果、7 週齢では 1 頭 (20%)、9 週齢では 5 頭 (100%)、計 6 頭から SC が分離された。材料別では血餅から 4 頭 (26.7%)、鼻スワブから 1 頭 (6.7%)、直腸スワブでは 3 頭 (20.0%) から SC が分離された (表 2)。

以上の結果から、SC を対象とした場合の検査材料としては、血餅や直腸スワブが適していると考えられた。また、今回の検査から、この農場では 7 週齢より感染が始まり、徐々に感染が広がっていることが示唆された。

表 2 同一農場から採材した野外感染由来材料からの SC の分離成績

グループ	週 齢	検査頭数	検査頭数分離陽性頭数 (%)			
			血餅	鼻スワブ	直腸スワブ	合計*
A	5	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B	7	5	1 (20.0)	0 (0)	0 (0)	1 (20.0)
C	9	5	3 (60.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	5 (100)
計		15	4 (26.7)	1 (6.7)	3 (20.0)	6 (40.0)

* : SC が 3 種類の材料それぞれから分離された頭数

表3 RV 培地と HTT 培地における豚糞便からのサルモネラ分離成績

	RV (37°C 培養)		合 計
	+	-	
HTT (42°C 培養)	+	68 (19.5) *	151 (43.4)
	-	5 (1.4)	
合 計		275 (79.0)	348 (100)

* : サルモネラが分離された頭数 (%)

4. 糞便からのサルモネラの分離

サルモネラの分離は増菌培地の違いによって差が認められることが報告されている (③, ④, ⑥, ⑧, ⑩)。そこで、糞便を材料として、RV 培地を用いて培養する方法と、HTT 培地を用いて培養する方法でのサルモネラの分離率を比較した。

8 農場、3 ~ 5 ヶ月齢の糞便計 348 検体を用い、RV 培地および HTT 培地各 9 ml に糞便 1g を加え、培地と攪拌後、RV 培地は 37°C で 20 時間、HTT 培地は 42°C で 20 時間増菌培養を行った。培養後 DHLN, BGN へ菌を塗抹後 37°C で 24 時間培養し、サルモネラと疑われるコロニーについて常法に従い (②, ⑩), 生化学性状および血清型を調べた。

その結果、RV あるいは HTT 培地を用いて、348 検体中 156 検体 (44.8%) からサルモネラが分離された。HTT 培地では 151 検体 (43.4%) から分離されたが、RV 培地では 73 検体 (21.0%) であった。RV, HTT 両培地で分離された検体は 68 検体 (19.5%) であった。HTT 培地のみの分離は 83 検体 (23.9%), RV 培地のみの分離は 5 検体 (1.4%) であった (表 3)。分離されたサルモネラについて血清型別を実施した結果、9 血清型が分離されたが、SC は分離されなかった (表 4)。

以上の結果から、SC 以外のサルモネラを分離する場合、RV 培地を用いて 37°C で 20 時間培養する方法は、HTT 培地を用いて 42°C で 20 時間培養す

表4 RV 培地と HTT 培地での豚糞便からの分離成績 (血清型)

血清型	増菌培地	
	RV	HTT
O4,12:d:-	27 *	65
S. Havana	17	31
S. Livingstone	12	16
S. Typhimurium	5	11
S. London	7	8
S. Corvallis	4	6
S. Infantis	3	6
S. Anatum	1	6
S. Virchow	3	4
計	79	153

* : それぞれの培地から分離された株数

る方法に比べ、分離率が低くなる傾向が見られた。

5. まとめ

SC の増菌培養を行う場合は、RV 培地を用いて 37°C で 20 時間培養する方法が適当であるが、SC 以外のサルモネラの増菌培養を行う場合は、HTT 培地を用いて 42°C で 20 時間培養する方法が適当である。豚のサルモネラを検査する場合は RV 培地と HTT 培地の併用が望ましいと考えられた。以上、今回紹介した結果より豚のサルモネラ検査法として図 1 の方法を推奨する。

最後に今回我々が紹介した検査法をもとに、SPF 豚農場認定制度におけるサルモネラ検査法が統一されることを望む。

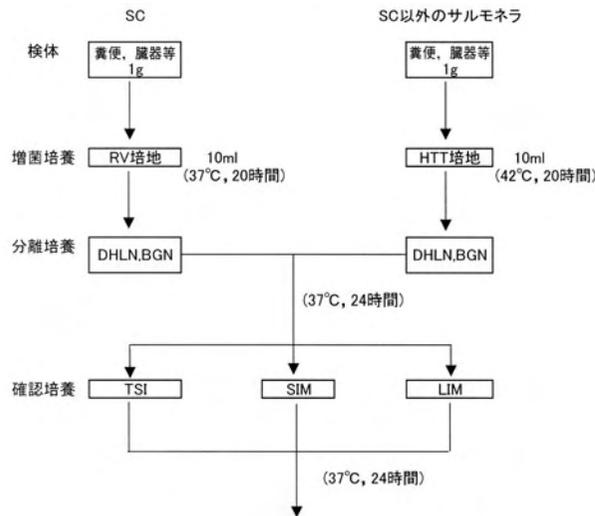


図1 サルモネラ検査法 (増菌培養法)

6. 参考文献

- 1) Anderson, R. C., Genovese, K. J., Harvey, R. B., Stanker, L. H., Deloach, J. R. and Nisbet, D. J. 2000. J. Vet. Diagn. Invest. 12: 257-260.
- 2) Asai, T., Otagiri, Y., Osumi, T., Namimatsu, T., Hirai, H. and Sato, S. 2002. J. Vet. Med. Sci. 64: 159-160.
- 3) Bager, F. and Petersen, J. 1991. Acta. Vet. Scand. 32: 473-481.
- 4) Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F. and Colin, P. 1997. Int. J. Food. Microbiol. 38: 211-216.
- 5) 坂崎利一, 田村和満. 1992. pp 82-93. 腸内細菌 (上) 第3版. 近代出版.
- 6) Davies, P. R., Turkson, P. K., Funk, J. A., Nichols, M. A., Ladely, S. R. and FedorkaCray, P. J. 2000. J. Appl. Microbiol. 89: 169-177.
- 7) Gray, J. T., FedorkaCray, P. J., Stabel, T. J. and Ackermann, M. R. 1995. Vet. Microbiol. 47: 43-59.
- 8) Harvey, R. B., Anderson, R. C., Farrington, L., Droleskey, R. E., Genovese, K. J., Ziprin, R. L. and Nisbet, D. J. 2001. J. Vet. Diagn. Invest. 13: 258-260.
- 9) 鶏病研究会. 2001. 鶏病研究会報. 37: 14-30.
- 10) Namimatsu, T., Tsuna, M., Imai, Y., Futo, S., Mitsuse, S., Sakano, T. and Sato, S. 2000. J. Vet. Med. Sci. 62: 615-619.
- 11) Reed, W. M., Olander, H. J. and Thacker, H. L. 1986. Am. J. Vet. Res. 47: 75-83.
- 12) Roof, M. B., Kramer, T. T., Kunesh, J. P. and Roth, J. A. 1992. Am. J. Vet. Res. 53: 1333-1336.
- 13) 佐藤祐子. 1998. Proc. Jpn. Pig. Vet. Soc. 33: 12-14.
- 14) 田中信明, 宇田川公章, 引田仁朗. 1994. 日獣会誌. 47: 937-939.
- 15) Vassiliadis, P. 1983. J. Appl. Microbiol. 54: 69-76.
- 16) Voogt, N., Raes, M., Wannet, W. J., Henken, A. M. and van de Giessen, A. W. 2001. Lett. Appl. Microbiol. 32: 89-92.