

鳥類疾病学実習

鶏からの細菌の分離と同定

鶏からの細菌の分離と同定

本実習項目の目的

- 細菌感染症や食中毒発生時の対処法として病原細菌の鑑別・分離培養方法と同定方法を学ぶ。正しい無菌操作により、病原細菌の含まれる試料から安全かつ正確に菌を分離し、各種培地を用いて分離した菌の生化学性状を明らかにする。また、抗血清を利用した血清型別を行い、菌種・血清型を同定するとともにその方法を習得する。

鶏からの細菌の分離と同定

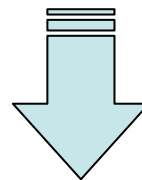
本実習項目の目的

- 本実習ではサルモネラの血清型が分からない状態で菌液を配布する。各人が一つの試料からそれぞれ菌を培養し、鑑別培地上での性状をよく観察し、免疫学的検査により型別を行う。レポートでは観察された結果を正確に記述し、得られた結果から自身が分離した菌がサルモネラのどの血清型であるかを考察する。

サルモネラ

Salmonella

- グラム陰性通性嫌気性桿菌
- 菌体（O）抗原と鞭毛（H）抗原の組み合わせにより2600種類以上の血清型に分類
- 経口感染による胃腸炎（ヒトでは食中毒）
- 重篤な場合は全身に感染し、敗血症や流産
- ヒトを含む様々な脊椎動物に感染



人獣共通感染症の起因病原体

サルモネラの分類と血清型（2007）

現在はもっと増えています（2600以上）。

			Typhi	}	ヒト
			Paratyphi A		
<i>Salmonella enterica</i> subsp.	<i>enterica</i>	1531	Dublin	-	ウシなど
	<i>salamae</i>	505	Abortusequi	-	ウマ
	<i>arizonae</i>	99	Abortusovis	-	ヒツジ
	<i>diarizonae</i>	336	Choleraesuis	}	ブタ
	<i>houtenae</i>	73	Typhisuis		
	<i>indica</i>	13	Gallinarum	}	トリ
			(Pullorum)		
<i>Salmonella bongori</i>			22		
			Typhimurium	}	様々な動物種
			Infantis		
			Montevideo		
			Hadar		
			Heidelberg		
			Agona		
			Cerro		
			...etc.		
1属	2菌種	6亜種	2579血清型		

血清型と抗原構造の記載方法

[例]

- 正式記載：*Salmonella enterica* subspecies *enterica*
serovar Typhimurium
- 一般的な呼称：*Salmonella* Typhimurium
あるいは *S. Typhimurium*
- 抗原構造（O抗原：1相H抗原：2相H抗原）
O4 : i : 1,2

家きんのサルモネラ感染症

家きんチフス（法）：*Salmonella Gallinarum*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum

ひな白痢（法）：*Salmonella Pullorum*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum

サルモネラ症：*Salmonella enterica*
（届）*Salmonella* Typhimurium,
Salmonella Enteritidis

- * 上記は鶏に感染し重篤な感染症を起こすサルモネラ
- * 鶏が腸管に保菌しているサルモネラがヒトの食中毒（感染型）の原因となる

腸チフス・パラチフス

サルモネラ属菌のチフス菌、パラチフス菌で起こる

感染源は**感染者の便、汚染された食品**。

経口感染→リンパ、血液で全身に移行し発熱。

その後全身の臓器に病変や壊死。

潜伏期10-14日と長く、発症から回復も時間がかかる（平均4週間ほど）

治療後**慢性保菌者**となることがあり感染源として重要。

サルモネラ食中毒

サルモネラ属菌（腸チフス、パラチフス以外の菌）

サルモネラが腸に感染（菌は全身に行かない）

原因食品は鶏の卵、肉！

鶏の腸にサルモネラがいる

＊鶏の体は卵管と腸管がつながり総排泄孔になる。
→卵も糞便も同じ穴から出てくる。

発熱、嘔吐、下痢（水様性）など。
潜伏期は1～3日程度。



生卵



海外の卵はよくサルモネラで汚染されているため、生で食べるのは危険！



日本の卵は親鳥のサルモネラ感染を防ぐ、卵の表面を洗浄・消毒して菌を除くため生でも食べられる

鶏群汚染から食中毒の発生へ “Food Chain”の各段階で対策が必要



原種鶏／種鶏の輸入



ブロイラー農場



採卵養鶏場



食鳥処理場



GPセンター



家庭・飲食店



家庭・飲食店

生産段階

処理・包装段階

消費段階

孵化後すぐのひなが多数死亡。
サルモネラ症か？



① 臓器・糞便の増菌培養



② 鑑別分離培地での培養

DHL寒天培地, BG寒天培地

1. 胆汁酸耐性
2. 乳糖白糖分解性
3. 硫化水素産生性



② 生化学性状分析

TSI培地, SIM培地

硫化水素産生性, 糖分解性, ガス産生性, 運動性



③ 免疫学的解析

抗血清を用いたO抗原の同定



サルモネラの同定と血清型同定!

追加の検査（薬剤感受性試験, 病原遺伝子の保有）や農場で当該疾患への対処を行う

サルモネラの分離・同定

サンプリング

- 死亡・衰弱淘汰鶏：

心血、肝臓、その他病変部

- 保菌鶏

糞便中に間欠的に排菌するためクロアカスワブを繰り返し採取

- 抗体検査で *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* が陽性となった鶏

病変部の他、肝臓、脾臓、卵巣、精巣、胗臓などを採取してサルモネラ検査を実施する。

サルモネラの分離法

サンプルを9倍量のHTT培地と混和し、増菌培養

↓ 41.5°C、24時間

DHLN寒天およびBGN寒天に塗抹・培養

↓ 37°C、24時間

陽性



TSI寒天、SIM培地、リジン脱炭酸培地にて確認培養

↓ 37°C、24時間

陽性：サルモネラと同定



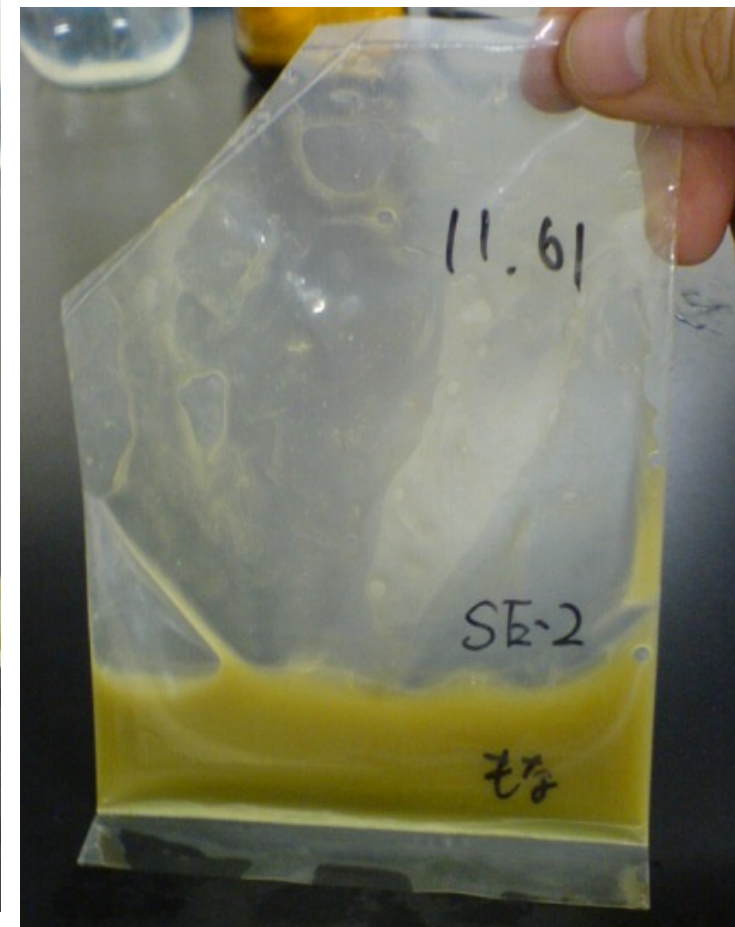
O抗原およびH抗原の決定＝血清型別

サルモネラ選択増菌用培地

材料に含まれる菌が非常に少ない事例を想定し、あらかじめ増菌培養を行う。

材料が糞便の場合、腸内細菌叢を構成する様々な細菌が含まれている。そのため、選択性の高い増菌培地（ハーナテトラチオン酸培地やセシナイト培地など）と同様に混合し、 41.5°C で24時間培養する。

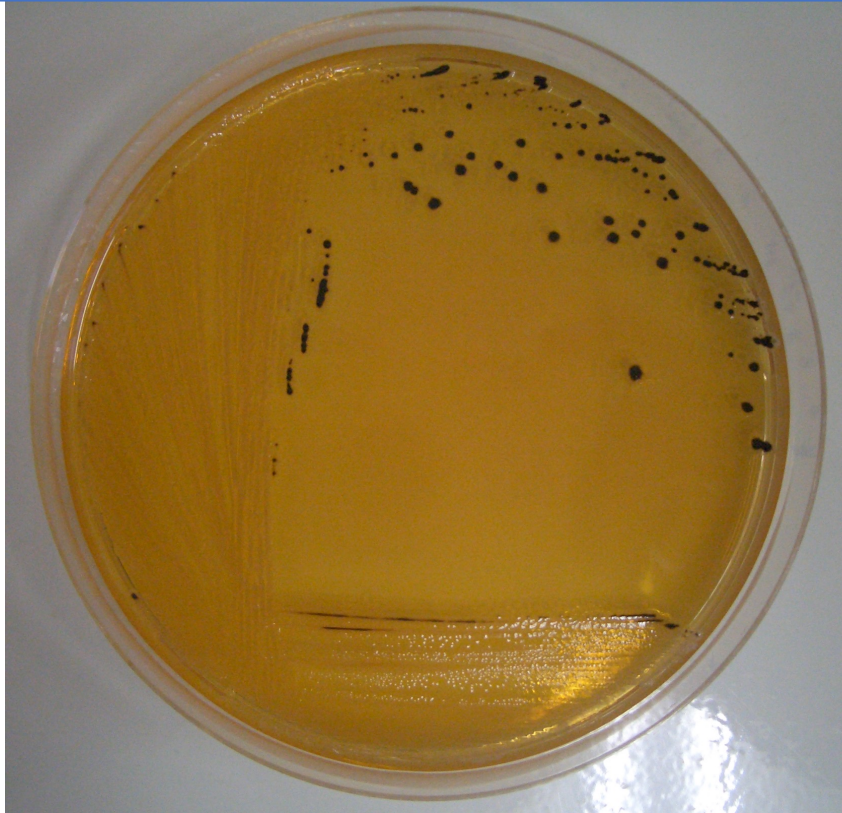
ハーナテトラチオン酸培地
(HTT)



その後、培養液を各種選択培地に塗抹して培養し、出現したコロニーを確認する。

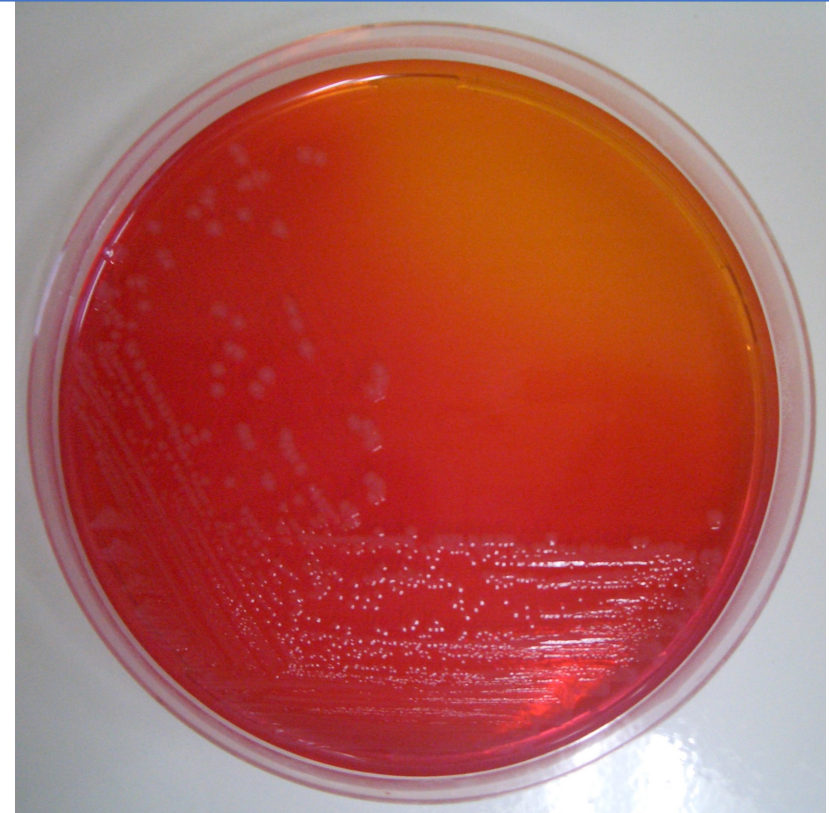
増菌したサルモネラの培養・分離

DHL寒天培地



サルモネラは硫化水素を
産生し、コロニーの中心
部が黒色となる。

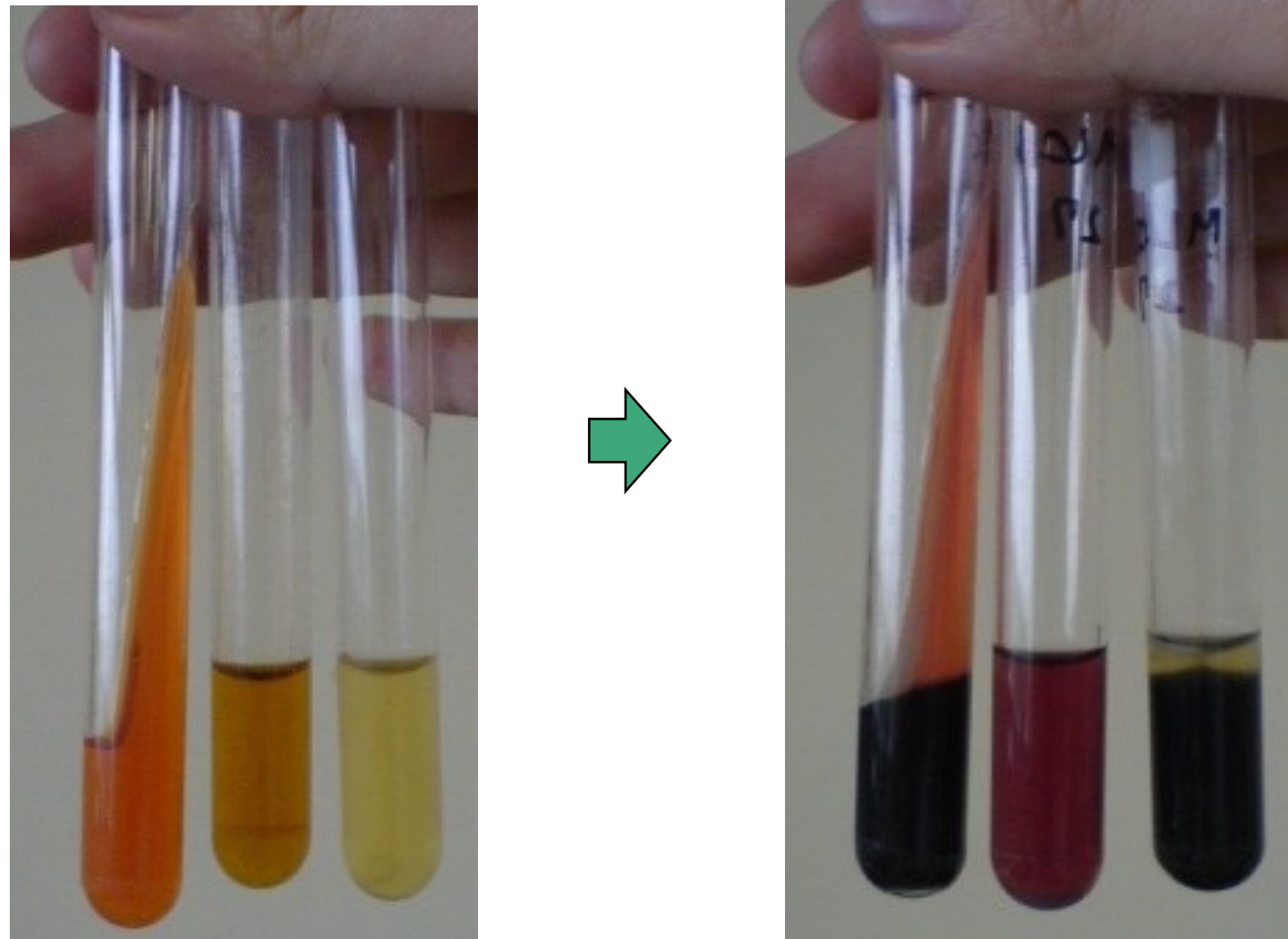
ブリリアントグリーン寒天培地



サルモネラは白色～ピン
ク色のコロニーを形成し
、周囲の培地はピンク色
～赤色となる。

生化学試験用培地

- TSI (Triple Sugar Iron) 培地 (半斜面高層)
- リジン脱炭酸培地 (液体)
- SIM (Sulfate Indol Motility) 培地 (半流動)



* 接種した菌の糖分解性, 硫化水素産生性, 運動性, ガス産生性などを観察でき, 菌の同定を行う

サルモネラの血清型別

O抗原の同定：

多価抗血清→単因子（群）抗血清→O群（抗原）
の決定

H抗原の同定（実習では行わない）：

1相抗原の同定→2相誘導→2相抗原の同定→H抗原の決定

2相抗原の同定→1相誘導→1相抗原の同定→H抗原の決定

逆相誘導

➡ O抗原とH抗原の組み合わせから血清型を決定

O抗原同定用の血清



- 各種O抗原に対するウサギ抗血清が販売されており、培養した菌と混和し、凝集反応を観察することで菌のO抗原を同定できる。

O抗原・抗血清間の凝集反応



陰性

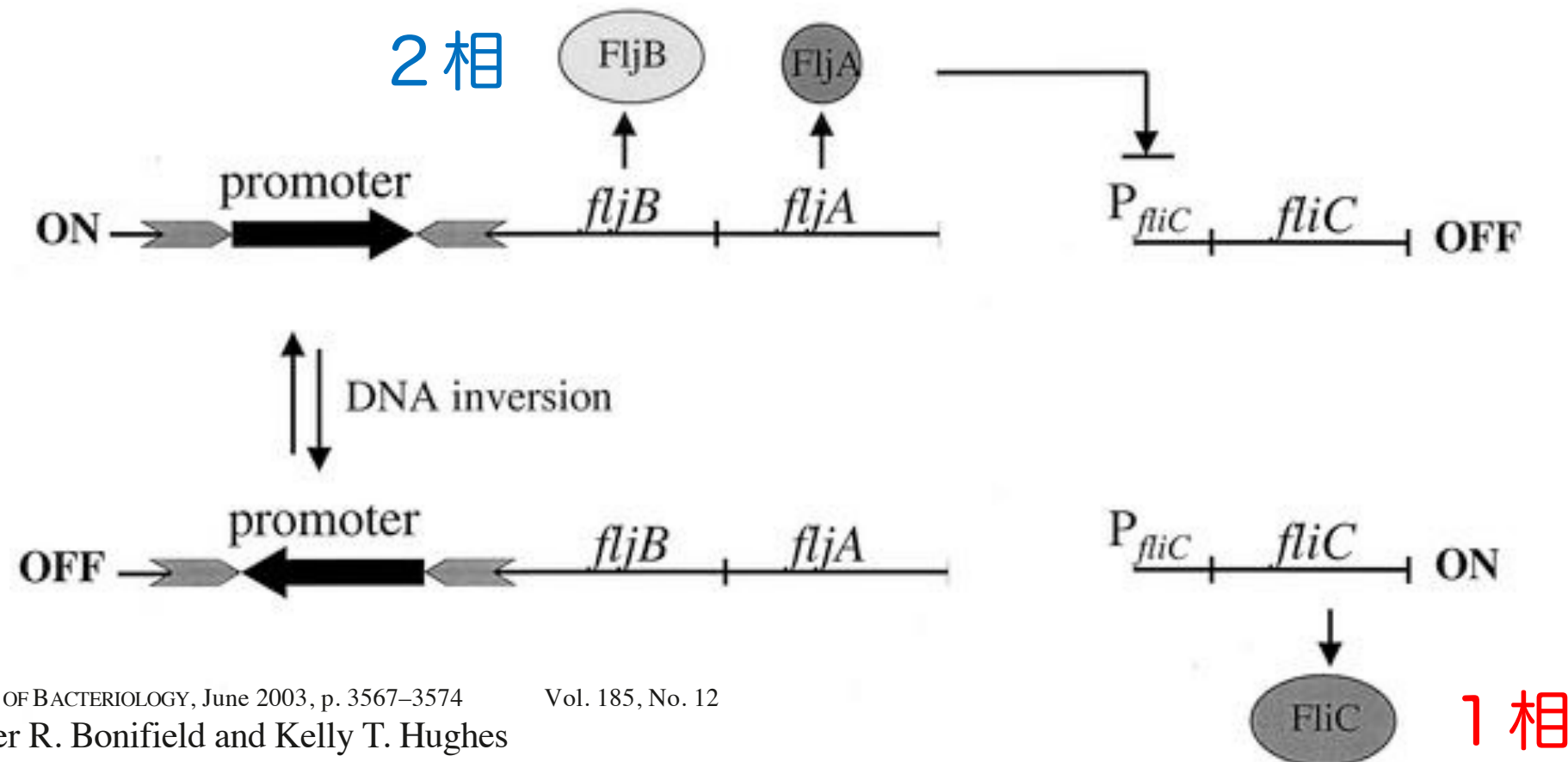
陽性

H抗原（＝鞭毛）の二相性：相変異

ほとんどのサルモネラは2種類の鞭毛タンパク質を産生する能力がある（＝2種類の鞭毛がある：2相性）。

1つの菌は、どちらか片方の鞭毛のみを発現し、運動している。

感染時に宿主が鞭毛に対する抗体を作成してきた場合、そのままでは運動できなくなるが、もう一方の鞭毛に切り替えることで運動性を維持できる。



H抗原の同定

クラギー管入りSIM培地で培養し、クラギー管外に達した運動性の高い（＝鞭毛が活発な）菌を釣菌し、HIBでさらに増殖



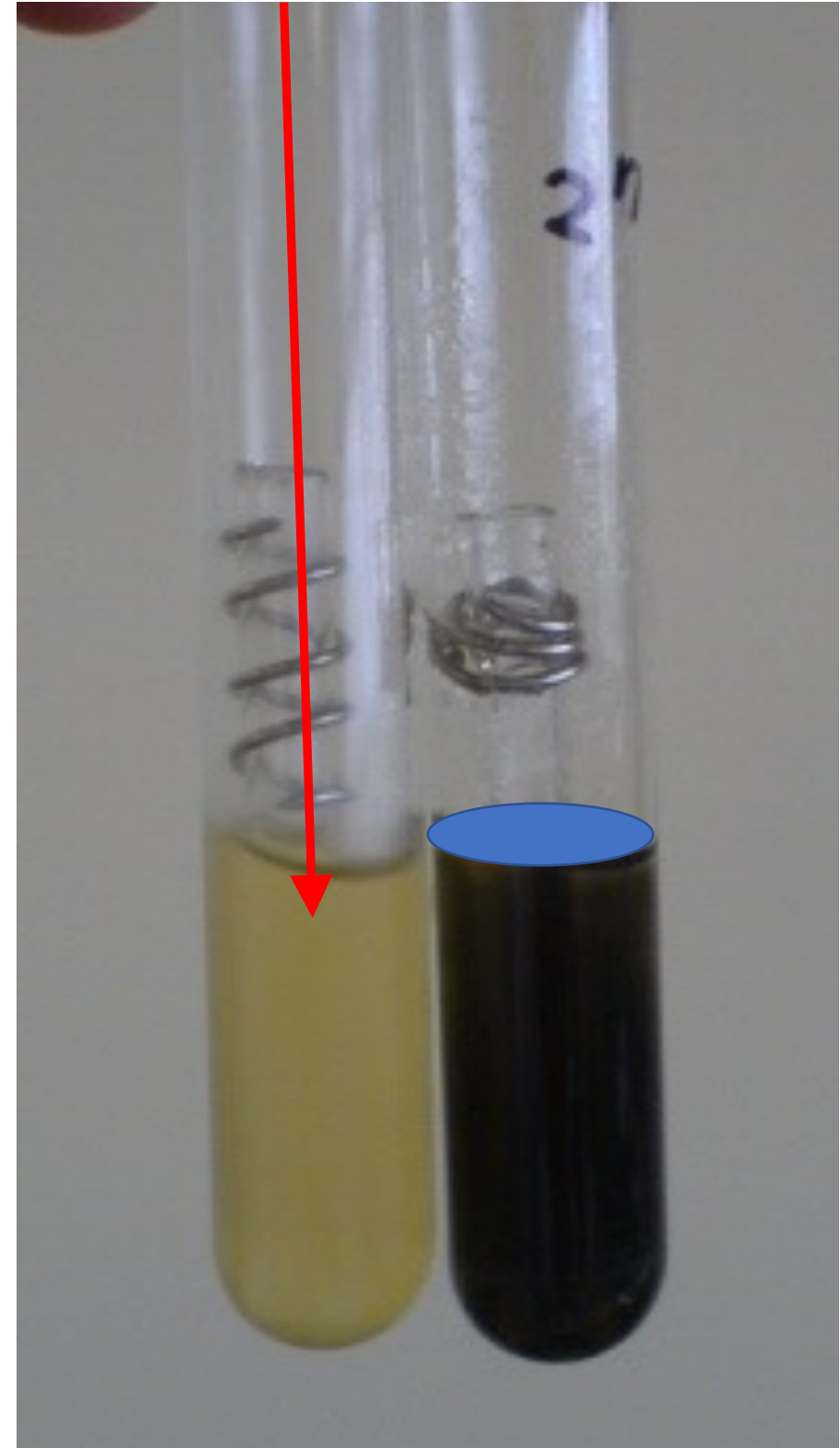
ホルマリンで不活化後、各種H抗血清と混和し、50℃で1時間静置



凝集像が認められた抗血清を陽性とし一方のH抗原を決定

1. 管の内部に菌を接種

2. 管を通して外側に出てさらに上部まできた菌を回収



H抗原・抗血清間の凝集反応



陰性



陽性

H抗原の同定（逆相の誘導）

- H抗原に対する血清を含むSIM培地で培養すると、H抗原＝鞭毛が阻害される→運動できなくなる。
- そこでサルモネラはもう一方のH抗原に切り替えて移動を始める。
- つまりH抗原に対する血清入り培地で培養した後に運動性が高い菌は逆相のH抗原を発現している！
（＝逆相誘導）
- この逆相になった菌を使用してH抗原の同定を行う。

主な血清型と抗原構造

血清型	O抗原	H抗原	
		1相	2相
Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]
Abortusovis	4,12	c	1,6
Agona	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2
Heidelberg	1,4,[5],12	r	1,2
Abortusequi	4,12	-	e,n,x
Choleraesuis	6,7	c	1,5
Montevideo	6,7,14	g,m,[p],s	[1,2,7]
Infantis	6,7,14	r	1,5
Hadar	6,8	z10	e,n,x
Typhi	9,12,[Vi]	d	-
Enteritidis	1,9,12	[f],g,m,[p]	[1,7]
Dublin	1,9,12,[Vi]	g,p	-
Gallinarum	1,9,12	-	-

鳥類疾病学実習

鶏からの細菌の分離と同定

2023.6.5

臨床材料由来菌の培養

到達目標

鶏由来試料（糞便・臓器乳剤）中に含まれる菌を正しい無菌操作により、培養する。

細菌の培養法を再確認する。

サルモネラ： 糞便を培養した選択増菌培地の培養

1人一本増菌培養した小試験管を渡します。

この中にはサルモネラが含まれていますがどの血清型が入っているかは伏せてあります。

まず実習書に自分の小試験管の番号を記載する。

各自，DHL寒天培地 1枚 に白金耳で塗抹する。

画線培養法

1. 寒天平板培地の底に、名前, 班番号, 試料番号を記入する。
2. 白金耳全体が赤くなるまで火炎滅菌する。白金耳を冷ます。
3. 検査材料の入っている試験管の栓を、白金耳を持っている手の小指にはさんで抜き、試験管の口をガスバーナーで軽く焼く。
4. 白金耳で材料を採取する。
5. 試験管の口を再び焼き、栓をし、必ず試験管立てに立てる。
6. 寒天平板培地を斜めに持ち、白金耳で撫でるように塗抹する。1 画目が終わったら白金耳を火炎滅菌し冷ます。続いて2画目を行う。
7. 寒天平板培地は蓋を下に、底(寒天培地が入っている方)を上にして置く。
8. 白金耳を火炎滅菌する。
9. 37℃の孵卵器内に、培地の底を上にして置いて培養する。

菌培養時の注意点

- 正しい無菌操作を行う。既に身に付けている操作の
はずであるが、再度操作を確認してから行うこと。
- ヒトに感染性のある細菌が含まれます。菌を扱う際
は操作者も周囲もお互いに注意を払いましょう。
- 焼いた白金耳・白金線は危険です。振り回さない。
- 操作の理由も理解しましょう。

（例：火炎滅菌した白金耳を冷ますために菌を培養
した寒天培地や試験管の液体を使用しない）