

養豚場におけるサルモネラ汚染状況

木嶋真人¹⁾、山本孝史²⁾ (¹動物衛生研究所、²現東京農業大学)

Kishima M., Yamamoto K. (2007). Surveillance of salmonella infection in pigs in Japan.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 51, 1-4

はじめに

豚のサルモネラ感染症は、豚の生産性を阻害するだけでなく人獣共通感染症として公衆衛生上も重要な疾病である。本症は、1)敗血症型、2)下痢症型、3)無症状型、の3つに大別されるが、無症状型であっても公衆衛生上の重要性は敗血症型や下痢症型と同じである。豚は種々の血清型のサルモネラに感染して無症状の保菌豚となり、長期間にわたって排菌する^{8,21,22)}。また、農場が汚染されるとサルモネラは環境中に長期間にわたって生存する^{10,12)}。豚の腸管内のサルモネラは、と畜場における枝肉のサルモネラ汚染の原因となり^{4,5)}、サルモネラに汚染した豚肉および豚肉製品は人のサルモネラ症の原因となり得る。

Salmonella enterica serovar Typhimurium (S. Typhimurium) は、人や動物のサルモネラ症の主要な原因のひとつである。1984年に英国において、S. Typhimurium definitive phage type 104 (DT104) と呼ばれる多剤耐性を持つ菌が分離され、1990年代には世界各地に広がって、DT104 に起因する食中毒が発生した。DT104 は我が国でも牛、豚、鶏から分離されている。

豚肉の安全性を高めるためには、養豚場におけるサルモネラ汚染の原因を明らかにし、汚染を低減化する必要がある。デンマークをはじめとする EU 各国では、農場のサルモネラ低減化を目指した息の長い取り組みがなされている。そこで、わが国における養豚場の汚染実態を明らかにするため、血清反応による抗体調査ならびに糞便中からのサルモネラの分離培養を試みると共に、分離した S. Typhimurium の中に占める DT104 の割合を調べた。

材料と方法

1) 酵素抗体法による血清抗体の調査

1999年から2001年において、27ヶ所の養豚場で飼育している821頭から血清を採取し、市販の酵素抗体法キット (Salmotype Pig ELISA, Labor Diagnostik Leipzig 社製) を使用して抗体価を測定した。陽性血

清の OD に対する割合が20%以上を示した場合を陽性とした¹⁵⁾。また、10頭の子豚について、分娩1週間から31週後の間に血清を採取して抗体産生状況を調べた。

2) 糞便からのサルモネラの分離

2003年7月から2005年6月の間に、5393頭の豚から糞便を採取し、サルモネラの分離を試みた。増菌培養にはハーナ・テトラチオン酸塩培地 (栄研化学) と Rappaport-Vassiliadis 培地 (Difco) を使用し、ハーナ・テトラチオン酸塩培地は42℃、Rappaport-Vassiliadis 培地は37℃で20時間培養した。分離株は生化学的性状を検査した後、サルモネラ血清型別用免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別を行った。

3) Polymerase chain reaction (PCR) による DT104 の検索

DT104 と関連していることが知られている遺伝子あるいはスパーサー領域を標的とするプライマーを使用した (表1)。侵襲性に関与している *invA* 遺伝子は、殆どのサルモネラが保有していることが知られているので陽性対照とした^{16,18)}。

表1 PCR に使用したプライマー

プライマー	標的	配列 (5' - 3')	PCR産物のサイズ
invA-F ^a	<i>invA</i> 遺伝子	TTGTTACGGCTATTTTGACCA	521 bp
invA-R ^b		CTGACTGCTACCTTGTGTATG	
104SR-F	DT104 スパーサー領域 ^c	GTCAGCAGTGTATGGAGCGA	162 bp
104SR-R		AGTAGCGCCAGGACTCGTTA	
artA-F	<i>artA</i> 遺伝子	CTGGTTATGCAAGTGCTGTT	666 bp
artA-R		CTCCCGTGGCTCATAAAAC	
spvC-F	<i>spvC</i> 遺伝子	CTATGAGCCAAGGTTTTCAG	392 bp
spvC-R		GTCAGTCAAGGACTGTC	
pefA-F	<i>pefA</i> 遺伝子	GCGCGGCTCAGCCGAACAG	157 bp
pefA-R		GCACGAGAAGCCAGGAACAGTG	
intI-F	<i>intI</i> 遺伝子	CCTCCCGCAGCATCATC	280 bp
intI-R		TCCACGCATCGTCAGGC	

a F: forward

b R: reverse

c 16S - 23SのrRNAスパーサー領域

結果

1) サルモネラに対する抗体の保有状況

27農場で飼育している821頭のうち127頭 (15.5%) が抗体陽性であり、24農場 (88.9%) で飼育している豚の1頭以上が抗体を保有していた。

2) サルモネラに対する抗体の経時的変化

分娩後1週目に採取した血清中には移行抗体が存在していたが、3週目には消失した。分娩後10週目から

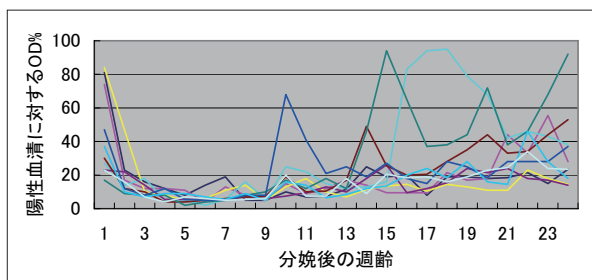


図1 サルモネラに対する抗体の経時的変化

15週目頃には感染抗体が徐々に上昇し、27週目には殆どの豚が抗体陽性となった(図1)。

3) 豚糞便からのサルモネラ分離成績

検査した5393頭のうち169頭(3.1%)から20の血清型と1種類の血清型別不能のもの、計172株のサルモネラを分離した(表2)。分離した血清型の主なものは、型別不能; O4,12:d-; 29.1% (50/172)、*S. Typhimurium*; 15.1% (26/172)、*S. Anatum*; 9.9% (17/172)、*S. Derby*; 8.7% (15/172)、*S. Havana*; 7.0% (12/172)、*S. Infantis*; 5.2% (9/172) である。また、*S. Stanley* と O4,12:d-, *S. Corvallis* と *S. Virchow*、*S. Typhimurium* と *S. Virchow* をそれぞれ同一個体から分離した。

表2 豚糞便から分離したサルモネラの血清型

血清型	分離株数 (%)
O4,12:d-	50 (29.1)
Typhimurium	26 (15.1)
Anatum	17 (9.9)
Derby	15 (8.7)
Havana	12 (7.0)
Infantis	9 (5.2)
Brandenburg	6 (3.5)
Corvallis	6 (3.5)
Livingstone	4 (2.3)
London	4 (2.3)
Meleagridis	4 (2.3)
Virchow	4 (2.3)
Give	3 (1.7)
Stanley	3 (1.7)
Newport	2 (1.2)
Panama	2 (1.2)
Agona	1 (0.6)
Alachua	1 (0.6)
Enteritidis	1 (0.6)
Taksony	1 (0.6)
Uganda	1 (0.6)
合計	172 (169頭)

4) PCRによるDT104の検索

供試した *S. Typhimurium* 26株のうち、16株は、DT104 スペーサー領域、*artA* 遺伝子、*spvC* 遺伝子、

pefA 遺伝子、*intI* 遺伝子を保有しており、DT104 であることが明らかとなった(表3)。

表3 DT104検索PCRの結果

遺伝子						株数
<i>invA</i>	DT104 SR ^a	<i>artA</i>	<i>spvC</i>	<i>pefA</i>	<i>intI</i>	
+	+	+	+	+	+	16
+	+	-	+	+	+	2
+	-	-	+	+	-	1
+	-	-	-	-	-	7
+	-	-	+	+	-	LT2株

a DT104 SR: 16S - 23SのrRNAスペーサー領域

5) *S. Typhimurium* DT104の薬剤耐性

供試した16株のうち、11株は、アンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、クロラムフェニコール(CP)に耐性、3株はABPCとSMに耐性、1株はABPCとCPに耐性、1株はABPCに耐性を示した。

考察

デンマークでは、1995年にサルモネラ低減化計画がスタートし、酵素抗体法(Mix ELISA)で養豚場の汚染状況をモニターしながら、サルモネラを排除する取り組みがなされてきた¹⁵⁾。その結果、1993年には豚肉のサルモネラ汚染率は3.5%、豚肉に起因する人のサルモネラ症の発生は1144件であったが、2000年には、それぞれ0.7%と166件に減少した。

我が国では、養豚場のサルモネラ汚染状況についてはあまり調査がなされておらず、今回、血清抗体保有状況の調査と糞便からのサルモネラの分離を試みた。その結果、養豚場におけるサルモネラ汚染はEUよりも軽微であると考えられたが、今後更に抗体保有率と保菌率の関係等の基礎的調査を継続する必要があると思われる。

今回糞便から分離した血清型で最も分離率が高かったのは、monophasicで型別不能なO4,12:d-であった。我が国において豚の下痢便からサルモネラの分離を試みたAsaiら³⁾の報告によると、*S. Typhimurium*の分離率が最も高く、次いでO4,12:d-であった。我々は健康豚の糞便を培養し、Asaiらは下痢便を培養しており、この分離率の違いは、対象とした糞便材料の違いによる可能性が高いと思われる。

PCRによる *S. Typhimurium* DT104の検出について、Pritchettら¹⁷⁾は、DT104のrRNAの16S-23Sのスペーサー領域を検出するプライマーを使用する方法を報告している。また、Saitohら¹⁹⁾は、*artA* 遺伝子はDT104のADP-ribosyltransferase toxin homologue

(putative pertussis-like toxin subunit)をコードすることを報告している。そこで我々は、DT104 SR と *artA* 遺伝子の両方を保有する *S. Typhimurium* は DT104 である可能性が非常に高いと考えて PCR を実施した。その結果、供試した *S. Typhimurium* 26 株のうち 16 株がその両方を保有しており、DT104 であると考えられた。

今回豚の糞便から分離した血清型のうち、*S. Typhimurium*、*S. Infantis*、*S. Corvallis*、*S. Virchow*、*S. Newport*、*S. Agona*、*S. Enteritidis* は、人のサルモネラ症の原因となる頻度の高い血清型である。人のサルモネラ症の殆どは食品に起因し、その原因の中には豚肉も含まれている。豚肉の安全性を高めるため、養豚場レベルでのサルモネラ汚染の原因を特定して、排除する必要がある。

今回我々が糞便から分離した monophasic な O4,12:d- は、血清型の中で最も分離率が高かったが野外で発生する疾病との関係は不明である。Asai ら³⁾ は、この O4,12:d- の型を豚の下痢便から *S. Typhimurium* に次ぐ高い頻度で分離しており、疾病との関連性は高いと思われる。諸外国においては、monophasic な O4,12:i- が米国、スペイン、タイにおける人のサルモネラ症例から分離されている^{1,2)}。また、monophasic な O9,12:l,v- がイスラエル、イタリア、スイスにおいて人や食肉から分離され⁶⁾、イスラエルの仔牛の下痢便からも分離されている²³⁾。よって、今後このような monophasic で型別不能な株が分離された場合、一般に分離されるサルモネラと同じ衛生対策を講じる必要がある。今回分離した monophasic な O4,12:d- については、1) H 抗原の 1 相と 2 相の遺伝子を検出する PCR^{7,9)}、2) 血清型に特異的な遺伝子を検出する PCR^{11,14)}、3) パルスフィールドゲル電気泳動^{13,20)}、によって検討することにより血清型の推定が可能になると思われる。

引用文献

- 1) Agasan A. et al. 2002. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i- strains causing food-borne infections in New York City. J. Clin. Microbiol. 40, 1924-1929.
- 2) Amavisit P. et al. 2005. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i- isolates in Thailand. J. Clin. Microbiol. 43, 2736-2740.
- 3) Asai T. et al. 2002. Isolation of *Salmonella* from diarrheic feces of pigs. J. Vet. Med. Sci. 64, 159-160.
- 4) Berends B.R. et al. 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. Int. J. Food Microbiol. 36, 199-206.
- 5) Borch E. et al. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int. J. Food Microbiol. 30, 9-25.
- 6) Burnens A. P. et al. 1996. Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v-, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. J. Clin. Microbiol. 34, 1641-1645.
- 7) Echeita M. A. et al. 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res. Microbiol. 153, 107-113.
- 8) Fedorka-Cray P.J. et al. 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. Vet. Microbiol. 41, 333-344.
- 9) Herrera-León S. et al. 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-I flagellar antigens of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 42, 2581-2586.
- 10) Ishiguro N. et al. 1979. A longitudinal epidemiological study of *Salmonella* infection on a piggery: a study on the mode of contamination by biotyping of *Salmonella typhimurium* and by the antibiogram. Jpn. J. Vet. Sci. 41, 261-272.
- 11) Kim H. J. et al. 2006. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. J. Food Protect. 69, 1653-1661.
- 12) Letellier A. et al. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. Vet. Microbiol. 67, 299-306.
- 13) Liebana E. et al. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. J. Clin. Microbiol. 39, 3609-3616.
- 14) Lin J.-S. and Tsen H.-Y. 1999. Development and use polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. J. Food Protect. 62, 1103-1110.

- 15) Nielsen B. et al. 2001. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. Proc. 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Food Borne Pathogens in Pork. Leipzig, Germany. 14-29.
- 16) Nucera D.M. et al. 2006. Comparison of API 20E and *invA* PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. J. Clin. Microbiol. 44, 3388-3390.
- 17) Pritchett L.C. et al. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. J. Clin. Microbiol. 38, 3484-3488.
- 18) Rahn K. et al. 1992. Amplification of a *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes 6, 271-279.
- 19) Saitoh M. et al. 2005. The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Microbiology 151, 3089-3096.
- 20) Tenover F. C. et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.
- 21) Wood R.L. et al. 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. 50, 1015-1021.
- 22) Wood R.L. and Rose R. 1992. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. Am. J. Vet. Res. 53, 653-658.
- 23) Yeruham I. et al. 2005. Outbreak of salmonellosis in calves in a dairy herd caused by monophasic *Salmonella* serovar 9,12:l,v:-. Vet. Rec. 157, 778-779.