

13 県内で分離されたサルモネラの血清型と薬剤感受性

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○太田 智恵子 齋藤 豪
相馬 亜耶 水島 亮
林 敏展 菅原 健
森山 泰穂 渡部 巖
小笠原 和弘

1 はじめに

サルモネラは自然界に広く分布し、人や動物の胃腸炎、下痢症、敗血症などの原因の一つとして公衆衛生上も重要な細菌であり、近年の感染症分野においては、プラスミド伝達性で、新世代のセファロスポリン系薬剤に広く耐性を示す、基質特異性拡張型βラクタマーゼ、(以下、ESBL)産生菌などの多剤耐性菌の出現が問題視されている。

また、青森県環境保健センターの研究年報では、県内で人から分離される血清型の中に平成24年頃から、*Salmonella* Typhimurium (以下、ST)の単相変異株と考えられる血清型04:i-が散見されることが報告されている¹⁾⁻²⁾。

一方、家畜分野においても、国内の牛からESBL産生性の04:i-が分離されていることから、分離される本菌の動向を監視していく必要がある³⁾。

これまで病性鑑定課では種々の検査依頼で搬入された菌株について保存してきたが、平成25年からは菌株ライブラリー化事業として、各家保で分離、保存されていた菌株についても集約して整理・保存すること

とした。

そこで今回、県内で平成10年から27年に家畜伝染病予防事業、交付金事業などで動物、環境などから分離され保存していたサルモネラについて血清型と薬剤感受性について調査し、さらに、近年分離頻度が増加した04:i-について分子疫学的解析を行ったので、その概要を報告する。

2 材料と方法

(1) 材料

平成10年から27年に分離保存したサルモネラを分離事例あたり1株選択し、合計113株を用いた。その内訳は、表1に示すとおり、鶏が74株、合鴨が16株、牛が12株、豚10株、馬1株である。

表1 供試菌株

年次	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	24	25	26	27	計
鶏	15	17	16	6	3	1		4	2	4	2	2		2			74
合鴨	4	5	1								1	1	2	1	1		16
畜種 牛	2				1			1			2	3	1			2	12
豚			1			1				2	3	1	1			1	10
馬						1											1
計	15	24	21	8	3	2	2	4	3	4	5	8	6	5	1	3	113

(2) 方法

血清型別試験は、市販のサルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研(株))を用い常法に従い実施した。

薬剤感受性試験は、10種類の薬剤(アンピシリン(A)、セファゾリン(C)、ストレプトマイシン(S)、カナマイシン(K)、テトラサイクリン(T)、ナリジクス酸(N)、シプロフロキサシン(CPFX)、スルフィソキサゾール(Su)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM))について、センシディスク(BD)を用い、一濃度ディスク拡散法により実施した。

薬剤感受性試験において、セファゾリンに耐性を示した株についてはさらに、ESBL産生菌の検索のため、以下の検査も追加で実施した。

微量液体希釈法では、セフォチアム(CTM)、セフォタキシム(CTX)、セフトジジム(CAZ)、セフェピム(CFPM)、セフポドキシム(CPDX)、フロモキシセフ(FMOX)の6薬剤について、最小発育阻止濃度を求めた。

βラクタマーゼの検出はP/Cアーゼテスト(日水製薬(株))、シカベータテスト(関東化学(株))を用い定法に従い実施した。

また、ダブルディスクシナジー法をセフ

オタキシム、セフトジジム、セフポドキシム、セフェピム、クラブラン酸・アモキシシリンの5種類のディスクを用いて行った。

O4:i:-については、非酵素法⁴⁾で処理したプラグを用いたパルスフィールドゲル電気泳動を行い、遺伝的差異を検討した。

3 結果

(1) 血清型別試験

表1に示すとおり36種類の血清型に分類された。

Enteritidisが21株と最も多く、STが18株、O4:i:-が12株、Infantisが10株と続き、その他は1から数株ずつであった。

分離動物種毎に見ると、鶏では28種類と多くの血清型が、牛で4種類、豚で5種類の血清型が確認された。

また、Enteritidis 21株は全て鶏からの分離であった。STは、鶏、合鴨、牛、豚と多くの動物種から分離されていた。O4:i:-は、鶏、牛、豚から分離された。

表2 血清型別結果

血清型	株数	血清型	株数
Enteritidis	21	Bardo	1
Typhimurium (ST)	18	Choleraesuis	1
O4:i:-	12	Give	1
Infantis	10	Harder	1
Amsterdam	6	Hindmarsh	1
Newport	4	Kentucky	1
Agona	3	Kiambu	1
Muenster	3	Livingstone	1
Senftenberg	3	Salmonella II	1
Derby	2	Manhattan	1
Dublin	2	O7 HUT	1
Gaminara	2	Ohio	1
Mbandaka	2	Orion	1
Heidelberg	2	Othmarschen	1
O:1,13,19 HUT	2	Rissen	1
O4 HUT	1	Singapore	1
Altona	1	Thompson	1
Anatum	1	Uganda	1

表3 血清型と分離動物

動物種	血清型(株数)				
鶏	Enteritidis(21)	S T (5)	O4:i: - (4)	Infantis(8)	Newport(4)
	Agona(3)	Gaminara(2)	Muenster(2)	Senftenberg(3)	Mbandaka(1)
	Heidelberg(2)	O:1,13,19 HUT(2)	Altona	Anatum	Give
	Harder	Hindmarsh	Kentucky	Kiambu	Livingstone
	Salmonella II	O7 HUT	Ohio	Orion	Othmarsche
	Singapore	Thompson	Uganda		
合鴨	S T (6)	Infantis(2)	Amsterdam(6)	Muenster	Manhattan
牛	S T (2)	O4:i: - (7)	Dublin(2)	O4 HUT	
豚	S T (5)	O4:i: - (1)	Derby(2)	Choleraesuis	Rissen
馬	Bardo				

(2) 薬剤感受性試験

薬剤耐性については、表4に示すとおりアンピシリン耐性が45株で39.5%であった。また、ストレプトマイシン耐性が42株、テトラサイクリン耐性が35株、サルファ剤耐性が35株、セファゾリン耐性が9株、ナリジクス酸耐性が3株であった。

表4 薬剤別耐性状況

	A	S	T	Su	C	N	K	CP
耐性株(株)	44	42	35	35	9	3	5	6
耐性率(%)	38.9	37.2	31.0	31.0	8.0	2.7	4.4	5.3

• CPFX、FOMIは全て感受性

シプロフロキサシン、ホスホマイシンは全ての株が感受性であった。

薬剤耐性パターンは表5のとおり21パターンであり、2剤以上に耐性を認めた多剤耐性株は40株、35.1%であった。鶏、合鴨由来株の多くは、耐性がないか、単剤耐性であった。一方、5剤、6剤耐性の株は、主に牛、豚から分離された。

表5 分離動物と薬剤耐性パターン

耐性数	鶏	合鴨	牛	豚	馬	計	薬剤耐性パターン
6		2		1	3	40 (35.4%)	ACSTSuCp(2)、AKSTSuCp
5			6	2	8		ACSTSu(6)、AKSTSu、ASTSuCp
4	3	1		1	5		KSTSu(2)、AKTSu、ASTSu、ATSuCp
3	13		1	4	18		ACCP、STSu(15)、AST、STCp
2	4		1	1	6		SSu(3)、AN(2)、ST
1	29	5	1		36		A(26)、S(7)、Su、T、N
0	25	9	1	2	37		

(株)

また、6剤耐性の牛由来株はS Tであり、5剤耐性の牛由来6株はO4:i:-であった。豚由来株はS T、Choleraesuisが1株ずつで、いずれも臨床症状を示したのから分離されたものであった。

薬剤耐性状況の経時的変化を図1に示した。鶏、合鴨分離株では、単剤耐性から耐性なしのものが多く、調査対象初期には3~4剤耐性が見られていたが、近年では、なし、あるいは単剤耐性の傾向であった。一方、牛・豚分離株では、例数は少ないものの分離時期によらず、多剤耐性が多く見られた。

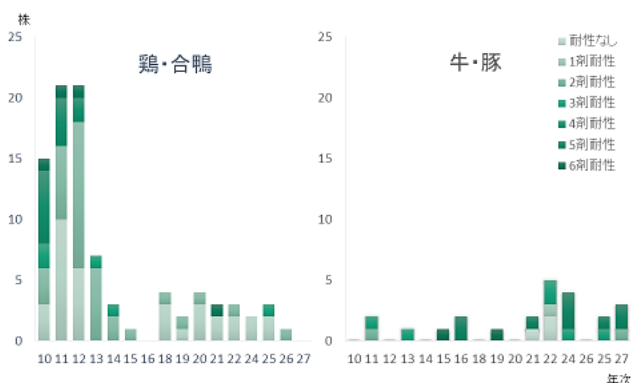


図1 薬剤耐性の経時的変化

(3) ESBL 産生菌の検索

ESBL 産生菌の検索に用いたセファゾリン耐性株は表6に示すとおり9株で、内訳は鶏由来が1株、牛由来が8株であった。ま

た、分離時期は鶏が平成 10 年、牛由来の ST が 15 年と 19 年、O4:i:-が 24 年、25 年、27 年であった。

表6 ESBL産生菌の検索

血清型	分離年	畜種	CTM	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	FMOX
Senftenberg	10	鶏	>16	4	2	16	>4	≤0.5
S T	15	牛	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5
S T	19	牛	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5
O4:i:-	24	牛	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	2
O4:i:-	24	牛	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	2	≤0.5
O4:i:-	24	牛	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5
O4:i:-	25	牛	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5
O4:i:-	27	牛	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5
O4:i:-	27	牛	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤1	≤0.5

βラクタマーゼ: 全てペニシラーゼを産生
シカベータテスト: 鶏一株でESBL検出
DDST : 鶏の一株で阻止帯が確認された→ESBL産生菌

牛由来の S T、O4:i:-8 株は、供試したセファロスポリン薬剤に感受性を示した。

一方、鶏由来の Senftenberg1 株は第 2～4 世代に対し低感受性であった。ベータラクタマーゼは、9 株全てペニシラーゼのみの産生であり、シカベータテストにおいて鶏由来の一株で ESBL 産生を確認した。

加えてダブルディスクシナジー法においても、鶏由来の一株で緩衝帯が観察され、ESBL 産生が確認された。

(4) パルスフィールドゲル電気泳動

O4:i:-の PFGE 像は、図 2 に示すとおり大きく 2 つの泳動パターンに分けられた。平成 12 年から 22 年分離された 6 株は同様の泳動像となり、鶏由来の 1 株が 2 剤に耐性であったが、その他は耐性を持たなかった。

一方、24 年から 27 年の牛由来 6 株は若干の違いは見られるものの、同様の泳動像であり、すべての株が 5 剤に耐性であった。

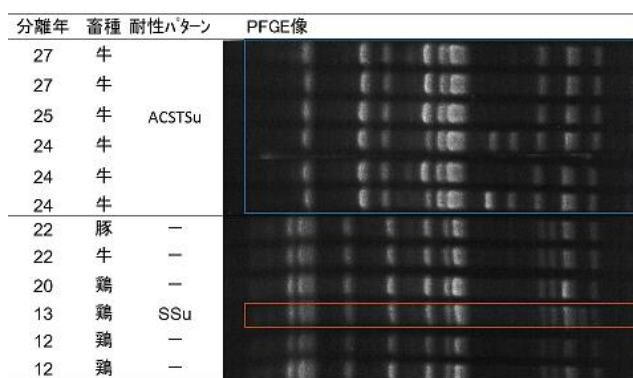


図2 O4:i:-の耐性パターンとPFGE像

4 まとめ及び考察

今回調査に供した県内で分離したサルモネラのうち鳥類から分離された株の薬剤耐性の傾向は、調査初期に 3 剤、4 剤耐性のものも見られたが、近年は耐性が少なくなっていると思われた。しかし、調査数が少ないため今後例数を増やして継続して調査する必要がある。

また、5 剤、6 剤耐性の株については、下痢症状を呈し治療歴のある牛、豚等からの分離であったことから、多剤耐性菌を増加させないためには農場での薬剤使用歴の把握や結果に基づく獣医師への情報提供も必要である。

今回、検出頻度が低い Senftenberg にセファロスポリン系薬剤に低感受性の株があったことから、分離頻度の高い血清型だけでなく分離された多くの株についてデータを収集する必要があると考えられた。同時に、平成 10 年に分離された古い菌株であったが、ESBL の産生が確認されており継続検査が必要である。薬剤耐性遺伝子は染色体の他、プラスミド上にも存在し、他の菌種にも拡散する恐れがあることから、その出現にも注意を払う必要がある。

また、O4:i:-は、分離時期で泳動像が大

きく変わり、薬剤耐性の数も増加するなど性状が変化していることから今後とも注意が必要である。

近年、家畜、特に牛で分離が増加している 04:i:- についてみると、県内の人における散発サルモネラ症事例において検出が増加し、平成 25 年では最多の 31% となっていることが報告されている²⁾。さらに人において全国的にも 04:i:- の検出は、平成 23 年に 0.6% であったが、平成 26 年は 7.9% と多くを占める⁵⁾ など、公衆衛生面でもデータ蓄積が必要な血清型の一つである。

このような変化を察知するため、今後とも人でのサルモネラの検出情報に注目し、家畜からの分離菌の傾向を把握し、薬剤感受性の変化、多剤耐性菌の出現について監視していく所存である。

また今後は、今回検査ができなかったプラスミドや遺伝子検査などについても詳細に検討したい。

<参考文献>

- 1) 福田ら：県内の散発サルモネラ症由来分離株の血清型別（2010年～2012年），青森県環境保健センター研究報告, 24, 1-5(2013)
- 2) 福田ら：県内の散発サルモネラ症由来分離株の血清型別（2013年），青森県環境保健センター研究報告, 25, 14-17(2014)
- 3) 貞弘ら：多剤耐性Salmonella 04:i:- による牛サルモネラ症発生事例と薬剤耐性遺伝子の解析, 家畜衛生週報, 3380, 374-376(2015)
- 4) 野田ら：非酵素法で行うパルスフィー

ルド・ゲル電気泳動の適用菌種の検討, 岐阜県保健環境研究所報, 19, 5-10(2011)

- 5) URL<<http://www.nih.go.jp/niid/images/iasr/arc/gb/2014.48j.csv>>