

131 鶏ボツリヌス症

担当	検査チャート
家畜保健衛生所	<p>(1) 疫学調査</p> <p>(2) 臨床検査</p> <p>(3) 剖検</p> <p>(4) 細菌培養試験</p> <p>(5) 毒素検査</p> <p>(6) 毒素型別</p> <p>(7) 病理組織検査</p> <p>(死亡鶏、鑑定殺鶏)</p> <p>(飼料等) (血清、糞便)</p> <p>(血清、肝乳剤、腸内容物)</p> <p><直接培養> <増菌培養> <分離培養></p> <p><マウス接種法> <PCR></p> <p><毒素中和法></p>
病性鑑定施設	<p>(+) (-)</p> <p>(+) (-)</p>
判定・結果	<p>(+) (-) (+) (-)</p>
最終判定	<p>疫学調査、臨床検査の結果を基に、毒素検査、毒素型別においてボツリヌス毒素が検出された場合、本病と判断する。</p>
その他	<p>ボツリヌス菌・毒素は感染症法の二種病原体等に指定され、同法の規制の対象となる。所持許可を受けていない施設では、一連の材料は、ボツリヌス菌の分離・同定までの一連の検査が終了した時点(菌の分離等ができなかった場合も含む)から3日以内に滅菌等を行う。検査過程では材料は適正に管理する(記帳・施錠保管等)。</p>

→類似疾病検査

- ① 熱射病 ② 114 マレック病 ③ 一酸化炭素中毒 ④ 飼料中毒

○ 病原体: *Clostridium botulinum* C 型毒素産生菌

(1) 疫学調査

- ① 平飼いのブロイラーやアイガモ農法のアイガモに好発する。
② 死亡率が高い。
③ 高温多湿時(6~7月)に好発する。
④ あひる、かもでは夏から秋にかけて流行する。

(2) 臨床検査

- ① 脚、翼の麻痺
② 首を垂れ嗜眠状態
③ 背部の脱羽、紅潮
④ 急死
⑤ 黄白色下痢

(3) 剖 検

特に特徴的な所見はない。

発症や死亡に結びつくような病変がないことを確認する。

(4) 細菌培養試験(直接・増菌・分離培養)

- ① 盲腸内容などの消化管内容、餌やウジ、飼育環境の泥などの材料から分離を試みる。材料 1~10g 程度を遠心処理し、卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地に画線塗抹(直接培養)あるいは、数本の増菌培地(CaCO₃-FCM)の深部に移植する。
② 一部は 75℃ 15 分加熱後、残りは非加熱で 37℃、2~3 日(最長 7 日)嫌気培養し(増菌培養)、培養液中のボツリヌス毒素を確認する(マウス接種法、PCR)。
③ 毒素陽性の培養液から卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地を用いて 37℃で 2~3 日間嫌気培養し、分離する(分離培養)。
④ 集落は乳光反応陽性、半透明扁平辺縁部根足状(卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地)を呈する。ただし、乳光反応の程度および集落の

形状は様々

(5) 毒素検査(マウス接種法、PCR)

(マウス接種法)

- ① 血清、肝乳剤、腸内容物、培養液、分離菌等の毒素検査を行う。
② 毒素試料希釈用緩衝液および乳剤作製は 0.2%ゼラチン加リン酸緩衝液(0.1M pH6.2)を用いる。検体から直接毒素検出を行う場合には抗生剤入りゼラチン希釈液(ペニシリン 300 IU/ml、ストレプトマイシン 0.5mg/ml)を用いる。
③ 試料 0.5ml をマウス腹腔内に接種し、ボツリヌス毒素に特徴的な症状(腹部陥凹、腰部麻痺)の発現と致死を観察する。検体等に余裕があれば対照として 100℃、10分加熱処理した試料を同様に接種し、発症しないことを確認する。
④ 特徴的症状を伴ってマウスを死亡させた試料はボツリヌス毒素陽性と判定し、抗毒素血清を用いて毒素型を決定する。
⑤ 原因と疑われる飼料等の検査も同時に行う。

(PCR^{1),2)})

検体数が多い等マウス接種法による毒素検査が困難な場合、スクリーニングの目的で利用できる。毒素型も同時に確認できるが検出された遺伝子が機能していることを確認するためマウス接種法により毒素産生性の有無を確認しなければならない。

材料は、増菌または分離培養した検体を BHI にて培養した検体を用いる。

市販のプライマーが利用できる。

より詳細な検査法は以下のサイトを参照

http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html

(6) 毒素型別(毒素中和法)

確定診断のため必須である。抗毒素血清は動物衛生研究所等専門機関から入手できる。動物衛生研究所では要望に応じて抗 C 型血清を配布している。

動物衛生研究所の抗血清を用いる場合は、サンプルはゼラチン希釈液で 2~4 倍程度に希釈する。2 本の小試験管に 0.5ml ずつ取り分け、それぞれ以下の通り処理する。

1. 0.5ml のゼラチン希釈液と混合
2. 0.5ml の C 型抗毒素血清(2IU/ml)と混合

これらをそれぞれマウスに 0.5ml ずつ腹腔内接種し、観察する。毒素が抗血清で中和された群のマウスは生存する(毒素中和法)。

他の毒素型(A、B、D、E、F 型等)菌による毒素は、抗 C 型血清では中和されない。

(7) 病理組織検査

特異的な所見はない。他の疾病を疑う病変がないことを確認することが重要である。

その他:

(分離培地)

① 増菌培地(CaCO₃-FCM)

(基礎培地)

酵母エキス	1.0%
硫酸アンモニウム	1.0%
ブドウ糖	1.0%
可溶性澱粉	0.5%
L-システイン塩酸塩	0.1%
加温溶解し、10% NaOHでpH7.6に調整後、炭酸カルシウムを最終濃度0.5%になるように加える(溶けないので分注の際は攪拌しながら行う。)	

(CaCO₃-FCM)

基礎培地	10ml
クックドミート培地	1.25g
100℃で5~10分湯煎後、115℃15分滅菌し、流水または氷水で急冷する。	

② 卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地 (システイン溶液)

L-システイン塩酸塩	0.275g (最終濃度 0.1%)
蒸留水	250ml
10% NaOHでpH7.3に調整	

(基礎培地)

GAM寒天培地	20.35g (最終濃度 7.4%)
システイン溶液	250ml
115℃、15分滅菌	

基礎培地(55℃に保温)	250ml
50%卵黄生食液	25ml

(参考)

http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html

牛ボツリヌス症を念頭に置いた検査法であるが、鶏ボツリヌス症の検査にも応用できる。

(参考文献)

- 1) Heffron, A. & Poxton, I.R.: J. Med. Microbiol. 56, 196-201 (2007).
- 2) Fach, et al.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13, 279-285 (1996).