

45 牛マイコプラズマ肺炎

担当	検査チャート
家畜保健衛生所	
病性鑑定施設	<p>(4) 細菌培養試験</p> <p>&lt;分離培養&gt;</p> <p>(5) 細菌性状分析</p> <p>(6) PCR</p> <p>(+) (-)</p> <p>血清型別</p> <p>(+) (-)</p> <p>(7) 病理組織検査</p> <p>(8) 免疫組織化学検査</p> <p>(+) (-)</p>
判定・結果	<p>(+) (-) (+) (-)</p>
最終判定	<p>最終判定は、細菌培養試験、細菌性状分析、病理組織検査を主体に、疫学調査、臨床検査の結果を併せて総合的に判断する。</p>
その他	<p>1. 分離マイコプラズマの血清型別が必要な場合は、動物衛生研究所等の専門機関に依頼する。</p> <p>2. 材料送付方法:分離菌を送付する場合は、以下のいずれかの方法で行う。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・カラーチェンジした液体培養菌を保冷剤と共に冷凍で送付</li> <li>・1.8mlの液体培地に0.2ml接種し、培養しないでそのまま室温で送付</li> <li>・寒天培地でコロニーを十分発育させたものを4℃で送付</li> </ul>

→類似疾病検査

- ① 43 牛パストツレラ症    ② 50 ヒストフィルス・ソムニ感染症    ③ 33 牛パラインフルエンザ3型
- ④ 31 牛アデノウイルス病    ⑤ 30 牛RSウイルス病    ⑥ 15 牛伝染性鼻気管炎    ⑦ 58 牛クラミジア症
- ⑧ 62 牛肺虫症    ⑨ 1 牛肺疫

○ 病原体: *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar*, *Ureaplasma diversum*

(1) 疫学調査

- ① 1ヵ月齢から育成期の子牛に好発する。
- ② 年間を通じて発生するが春および秋に多い。
- ③ 舎飼いまたはフィードロット方式の多頭飼育場に多い。

(2) 臨床症状

- ① 初期には眼粘膜の充血、流涙、発咳、水様鼻汁を漏出し、やがて膿性鼻汁となる。
- ② 経過が長びいた例では、一般症状は悪化し、喘鳴、腹式呼吸を呈する。

(3) 剖 検

- ① 肺の肝変化。*M. bovis* 感染では径2~10mmの白色円形ないし管状の多発性乾酪壊死形成 (*Mannheimia haemolytica* や *Histophilus somni* 感染肺でも壊死巣の形成が特徴であるが、それらは形が不規則である)。*M. dispar* 等の感染では、肺の前腹部の赤紫色斑状の無気性病変程度
- ② 関節炎がみられることがある。

(4) 細菌培養試験(分離培養)

鼻汁、肺、病変部乳剤を 0.002% DNA 添加 Hayflick 培地、変法 Taylor-Robinson 培地および BHL 培地に接種。培養は密栓して定量培養を行う。

色調の変化を生じた場合は、寒天培地に塗抹し、高湿度下 37℃で 3~5 日間炭酸ガス培養を行う。*M. dispar* については、BHL 液体培地により豚マイコプラズマ肺炎の起原菌 *M. hyopneumoniae* の分離と同様に実施する。

(5) 細菌性状分析

“分離菌の性状” 参照

(6) P C R

参考文献 1)、2) を参照

(7) 病理組織検査

- ① 化膿性気管支肺炎。*M. bovis* 感染では円形の壊死巣形成。病変は気管炎および周囲肺胞への好中球浸潤に始まり、気管支上皮の壊死、脱落へと進行。気管支内には、細胞の形状は保ったまま核の染色性を失った好中球が蓄積する。この所見は、*M. bovis* 感染の特徴である。これにより気管支は拡張し、周囲でマクロファージ、リンパ球浸潤および線維化
- ② *M. dispar* 等による肺炎では、急性期には特徴に乏しい、化膿性気管支肺炎。慢性例では、気管支周囲のリンパ球浸潤、濾胞形成。気管支、気管支腺上皮の過形成
- ③ 滑膜や関節の壊死を伴う化膿性線維索性関節炎がみられることがある。

(8) 免疫組織化学検査

病変部に *M. bovis* 抗原を検出する。

その他:

(分離培地)

- ① DNA 添加変法 Hayflick 培地 (液体培地)

Bacto PPLO broth w/o CV	2.1g
ブドウ糖	1.0g
蒸留水	70ml
(高圧滅菌121℃、15分、下記を無菌的に加える。)	
1%フェノールレッド	0.2ml
非働化馬血清	20ml
25%酵母エキス(自家製)	10ml
5%酢酸タリウム	0.5ml
20万単位/mlペニシリンG	0.5ml

0.2% DNA* pH 7.6~7.8に修正	1.0ml
----------------------------	-------

\* 蒸留水で煮沸して溶かす。

- 1) 全てを混合し pH を修正後グラスウール製のプレフィルターを併用して0.2µmのメンブランフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 2) アルギニン分解性マイコプラズマも検査対象とする場合はアルギニン塩酸塩を0.2g添加し、pHを7.2とする。

(寒天培地)

蒸留水20mlで調製した2倍高濃度の液体培地と、オートクレーブ滅菌した1.3%アガロースまたは2%精製寒天50mlを50℃で混合して平板を作製する。
--

- 1) マイコプラズマ用液体培地およびマイコプラズマ用寒天生培地が市販されている。
- 2) 酢酸タリウムは非常に毒性が強い物質なので取扱いには十分注意する。

## ② BHL 培地 (*M. dispar* 用) \*

ブルセラ・ブロス	5.8g
ラクトアルブミン水解物	2.0g
塩類溶液	50ml
豚血清	100ml
馬血清	100ml
25%イースト・エキス	50ml
メチシリン(10mg/ml)	10ml
蒸留水	700ml
pH 7.6~7.8 (5%炭酸ナトリウムで調整)	

\* 寒天を1.2%加える。

## ③ 変法 Taylor-Robinson 培地

(液体培地)

Bacto PPLO broth w/o CV	2.1g
蒸留水	70ml
(高圧滅菌121℃、15分、下記を無菌的に加える。)	
0.4%フェノールレッド	1ml
非働化馬血清	20ml
25%酵母エキス(自家製)	10ml
10%尿素液	1ml
2.5%酢酸タリウム	0.5ml
20万単位/ml ペニシリンG	0.5ml
pH 6.0に修正	

全てを混合し pH を修正後グラスウール製のプレフィルターを併用して0.2µmのメンブランフィルターでろ過滅菌してもよい。

(寒天培地)

蒸留水20mlで調整した2倍高濃度の液体培地とオートクレーブ滅菌した1.3%アガロースまたは2%精製寒天50mlを50℃で混合して平板を作製する。
---

(血清型別)

マイコプラズマ種の同定は生化学的性状および抗血清を用いた血清型別(発育阻止試験、蛍光抗体法、代謝阻止試験等)により可能である。血清型別が必要な場合は、動物衛生研究所等の専門機関へ依頼する。

(参考文献)

・清水高正: マイコプラズマとその実験法(尾形 学監修). 102-130、近代出版(1988).

1) Kobayashi, H., et al.: J. Vet. Med. Sci. 60, 1299-1303 (1998).

2) Subramaniam, S., et al.: Mol. Cell. Probes. 12, 161-169 (1998).

(分離菌の性状)

菌種	ブドウ糖	アルギニン	ウレアーゼ活性	フィルムスポット	DNA加 Hayflick 培地	集落形態	関与する病気			
							肺炎	関節炎	乳房炎	繁殖障害
<i>M. bovirhinis</i>	+	-	-	-	+	乳頭状	○		○	
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	+	乳頭状	○	○	○	
<i>M. dispar</i>	+	-	-	-	-	微細コロニー	○			
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	-	+	+	乳頭状	○	○	○	○
<i>U. diversum</i>	-	-	+	-	-	微細コロニー	○			○
<i>M. alkalescens</i>	-	+	-	-	+	乳頭状			○	