

沖縄県における *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性および浸潤状況調査

家畜衛生試験場

○茂野 悟 石井 圭子

北部家畜保健衛生所

中尾 聡子

中央家畜保健衛生所

鈴木 萌美

Mycoplasma bovis (Mb) は牛呼吸器病症候群の主要な病原体の一つであるが、有効なワクチンはなく、衛生対策および抗生物質の投与による予防や治療が行われている。近年は薬剤耐性化が進んでいるとの報告があるが、本県における薬剤感受性や浸潤状況に関する報告はない。今回、病性鑑定により分離されたMbの薬剤感受性、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子型別および子牛のMb浸潤状況調査を実施した (図1)。また、Mbによる肺炎の多発している発生農場において追跡調査を実施した。

薬剤感受性調査: 材料と方法

・材料: *M. bovis* 64株 (平成22~30年分離株)

(由来: 鼻腔スワブ、肺、耳道洗浄液)

・方法: 微量液体希釈法

⇒ 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

供試薬剤

マクロライド系	エリスロマイシン、 タイロシン チルミコシン
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン
フルオキノロン系	エンロフロキサシン
その他	チアムリン、リンコマイシン (平成29年~) チアンフェニコール、フロルフェニコール

*下線: 牛マイコプラズマ肺炎治療薬

図2 薬剤感受性調査の材料と方法

牛のマイコプラズマ



菌種	病原性	症状
<i>M. bovis</i>	◎	肺炎、関節炎、乳房炎、中耳炎
<i>M. bovirhinis</i>	△	肺炎、中耳炎
<i>M. bovigenitarium</i>	○	肺炎、関節炎・乳房炎・繁殖障害
<i>M. alkalescens</i>	○	肺炎
<i>M. dispar</i>	○	肺炎 (株による病原性の差あり)

(病性鑑定指針 第4版)

- ・有効なワクチンがなく、抗菌剤による対策が中心
- ・マクロライド系薬剤の治療効果が高いが、近年薬剤耐性化の傾向 (日獣会誌 2013,66,加藤)

図1 背景

【薬剤感受性調査】

平成22~30年に分離された野外株64株を用いた。エリスロマイシン (EM)、チルミコシン (TMS)、タイロシン (TS)、リンコマイシン (LCM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、エンロフロキサシン (ERFX)、チアムリン (TML)、チアンフェニコール (TF)、フロルフェニコール (FF) の9薬剤について微量液体希釈法 (動物用抗菌剤研究会の標準法に準拠) を実施し、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した (図2)。

各薬剤のMIC90は、EMおよびTMSが最も高く (128μg/ml以上)、耐性化が顕著であった。また、OTCおよびERFXはMICが幅広く分布し、一部の株について耐性株が確認された。TMLはMIC90が7薬剤の中で最も低く、高感受性であった (図3、図4)。

成績

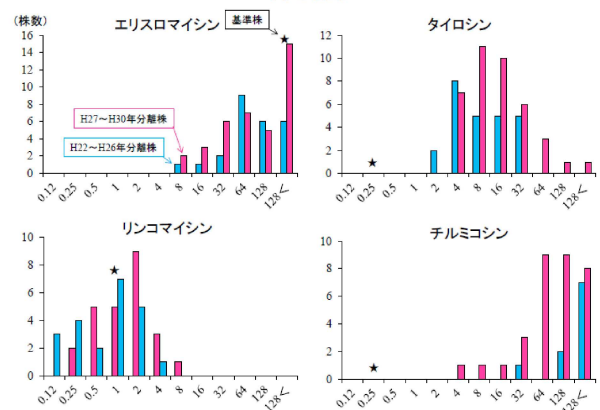


図3 薬剤感受性調査成績 (1)

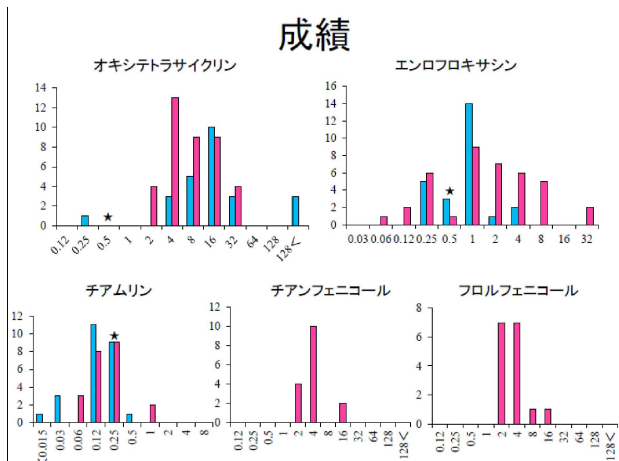


図4 薬剤感受性調査成績 (2)

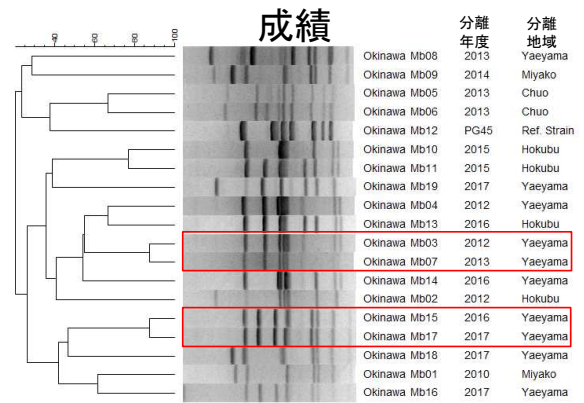


図6 PFGEによる遺伝子型別 成績

【PFGEによる遺伝子型別】

材料は2009年以降分離された18株とし、制限酵素にはSmaIを用いた。クラスター解析はBioNumerics 7.6を用いた（動物衛生研究部門に依頼）(図5)。

【浸潤状況調査】

県内肉用牛農場（46 戸）の育成牛（140頭）からそれぞれ、2、4、6、8 カ月齢に採材した血清を供試し、間接ELISA 法 (Bruggmann の変法) により抗体陽性率を求めた。ELISA 抗原は、基準株のPG45 株をTween20 にて抽出した抗原を用いた (図7)。

PFGEによる遺伝子型別

- ・目的:PFGEにより遺伝子型の相同性を比較
- ・材料:M.bovis 18株(平成22~29年分離株)
- ・制限酵素 Sma I によりDNA切断
電圧 6v/s, パルスタイム 4-40s, 泳動時間20時間
- ・クラスター解析: BioNumerics 7.6(動物衛生研究部門)

浸潤状況調査:材料と方法

- ・材料:育成牛(肉用牛140頭)の血清
(2015~2016年生まれ2,4,6,8カ月齢の追跡調査)

北部	中央	宮古	八重山
25頭	49頭	25頭	41頭

- ・方法:間接ELISA法(Bruggmannの変法)
抗原:M.bovis PG45株をTween20により抽出
- ・陽性判定:S/P比 \geq 0.2

図5 PFGEによる遺伝子型別 材料と方法

図7 浸潤状況調査 材料と方法

PFGEでは、農場毎に多様な泳動パターンが確認され、県内には様々な株が浸潤している状況が確認された。また、八重山地域の一部の農場では2年間に渡って、同一由来株が流行していたことが推察された。(図6)。

抗体陽性率は17% (22/140) であり、Mb 抗体陽性個体は県内全域で確認された。特に八重山地域の抗体陽性率が最も高く (31%)、2 カ月齢から抗体陽性個体が確認された (図8、図9)。

抗体保有状況

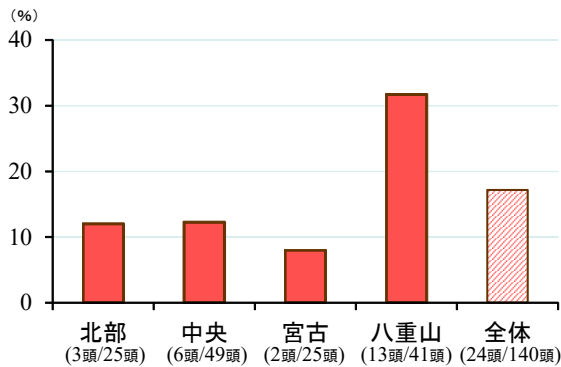


図8 浸潤状況調査成績 抗体保有状況

抗体陽転が確認された月齢

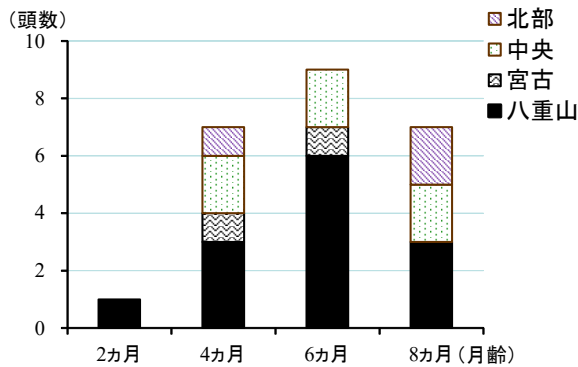


図9 浸潤状況調査成績 抗体陽転が確認された月齢

【発生農場における追跡調査】

平成 29 年 1 月から Mb による肺炎が流行している農場において、対策の効果検証のため、継続的に抗体・抗原検査を実施した (図 1 0)。

発生農場における追跡調査

- ・黒毛和種繁殖農場 (母牛60頭、子牛24頭)
- ・平成28年1月、12月に他県から導入 (外部導入は20年ぶり)
- ・平成29年1月～子牛の事故率増加、肺炎で子牛2頭が死亡
- ・死亡子牛および同居牛検査: *M.bovis*による肺炎が主原因

対策 (逆性石けん噴霧消毒/週1~2回、発症牛の隔離) の効果検証

1~9ヵ月齢子牛の抗体・抗原検査を継続的に実施

図10 発生農場における追跡調査

8 月の流行ピーク時には、抗体価は高値を示し、

分離率も高値を示した。しかし、それ以降抗体価および分離率は徐々に低下すると共に臨床症状を呈する個体は減少し、対策の効果が確認された (図 1 1)。

成績

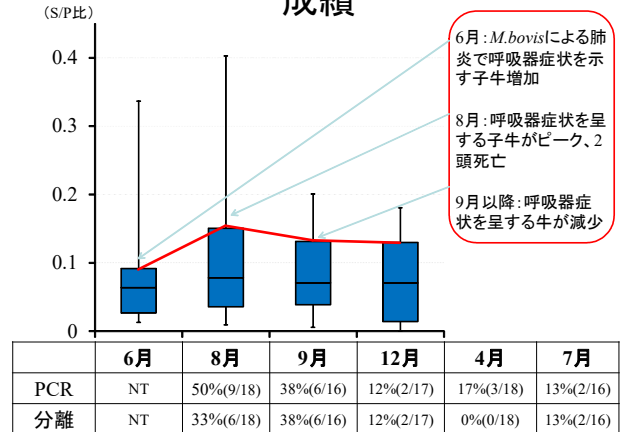


図 1 1 抗体価・PCR・分離率の推移

【まとめ】

本県で分離された Mb の大部分が LCM、ERFX および TML に高感受性を示したが、マクロライド系一次選択薬である EM、TMS に耐性を示した。一部の株は ERFX に対して耐性 (MIC=32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示した。ERFX は牛呼吸器病の二次選択薬であるため、今後も薬剤感受性状況を把握し、薬剤の適正使用により耐性菌の出現を防止することが重要と考える。

浸潤状況調査から、Mb が県内全域に浸潤し、抗体陽性率に地域差が認められた。今後は地域別に侵入経路対策を目的とした詳細な疫学調査を実施する必要があると考える。