

サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立（平成 25～26 年度）

稀な血清型 Agbeni が同定された 3 件のサルモネラ感染事例の解析

今野貴之 高橋志保 熊谷優子 檜尾拓子 和田恵理子 村山力則 八柳 潤

平成 25 年 8 月 27 日から 9 月 11 日にかけて、サルモネラ血清型 Agbeni (O13,23:g,m,[t]:-) の感染事例を 3 件確認した。稀な血清型が複数確認されたことから、3 株の抗原遺伝子について PCR 法により確認するとともに、薬剤感受性、パルスフィールドゲル電気泳動法による DNA パターンの比較解析を行った。3 株の解析結果はほぼ一致しており、事例間の関連性が疑われた。医療機関の情報から、感染源としてペットのミドリガメが推定されたため、爬虫類に起因するサルモネラ症について、感染症週報等を活用して注意喚起を行った。調査研究で行っている PCR 法は、複数の抗原遺伝子を同時に検出できるため迅速に血清型を推定することが可能である。また、本事例のように稀な血清型が同定された場合は、従来の血清型別法と組み合わせることにより正確な血清型の同定に役立つと考えられた。

1. はじめに

サルモネラは、ヒトに感染すると腸炎などを引き起こし、従来から最も重要な食中毒起因菌のひとつである。サルモネラに起因する健康被害の防止対策の構築には、食中毒及び感染症のサーベイランスが重要であり、それには血清型別による疫学的な解析は必須である。平成 25 年度からの調査研究事業では、サルモネラによる食中毒、感染症発生の際の迅速な検査体制の構築を目的に、サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法の検討を行っている。

サルモネラの血清型は、主に菌体表面の O 抗原と 2 つのべん毛抗原の組み合わせ (O:H1:H2) で決定され、これまでに 2,500 以上の血清型が報告されている。そのうち、ヒトに病原性を示す *Salmonella enterica* の亜種 I には、それぞれの血清型に固有の血清型名が付けられている。サルモネラの場合、この血清型名が菌種名のように使用される場合が多いのが特徴である。

ヒト由来サルモネラの検出数は、これまで Enteritidis 及び Infantis という血清型が常に上位を占めてはいるものの、それ以外の血清型も多く確認されている¹⁾。今回、その中でも稀なサルモネラ血清型 Agbeni の感染事例を 3 件確認し、調査研究事業で検討している遺伝子解析法を試行したので、その解析結果を報告する。また、稀な血清型が複数確認されたことから、薬剤感受性とパルスフィールドゲル電気泳動法に

よる DNA パターンの比較を行うとともに、医療機関から感染源等の情報を収集したので併せて報告する。

2. 材料と方法

2.1 菌株

菌株は、秋田厚生医療センター、市立秋田総合病院、秋田県総合保健事業団児桜検査センターの協力により分与を受けた。

2.2 血清型別

O 群別は、血液寒天培地上の菌を掻き取り、スライドガラス上で各 O 群血清と混和し、特異的な凝集反応を確認した。

H 型別は、増菌した BHI 培養液に 3%ホルマリン加生理食塩水を加えた抗原液と各 H 型血清を混和し、特異的な凝集反応を確認した。2 つ目の H 抗原を誘導するため、陽性となった H 型の血清を含む相誘導培地に菌を接種し、菌の運動性を確認した。

2.3 PCR 法によるサルモネラの確認及び抗原遺伝子の解析

サルモネラの確認は、サルモネラに特異的な *invA* 遺伝子と亜種 I に特異的とされる STM4057 遺伝子領域を対象にして、Lee ら²⁾の方法を改変して行った。抗原遺伝子の解析については、Franklin ら³⁾の方法を参考に O13 群の *wzx*、

Maurer ら⁴⁾の方法を参考に H1:g,m の *fliC*, H2;1 complex 及び H2:e,n complex の *fljB* を検出することにより行った。

2.4 薬剤感受性試験

アンピシリン, ホスホマイシン, ノルフロキサシン, ゲンタマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコールの 6 剤を対象に, ディスク法により行った。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析

サンプルプラグの調製は既報に従い行った⁵⁾。制限酵素は *XbaI* 及び *NotI* を使用した。泳動条件は, GenePath program 12 (*NotI*)もしくは 16 (*XbaI*) に従った。

3. 結果と考察

3.1 血清型 Agbeni の同定について

事例は, 平成 25 年 8 月 27 日から 9 月 11 日にかけて確認された。患者は 2 歳男児, 4 歳女児, 4 ヶ月の乳児で, 同一市内に在住していた。分離された 3 株は市販の抗血清を用いた血清型別で O13 群, H1 抗原が g,m, H2 抗原は検出されなかった。血清型を特定するため, Statens Serum Institute の抗血清を用いて O13 群の副抗原 (O22, O23) の検出を行ったところ, 3 株はいずれも O23(+)であり, 血清型 Agbeni と同定された (表 1)。Agbeni が確認された事例は非常に稀であり, 秋田県では今回初めてであった。国内では, 平成 21 年に東京都から 1 件報告がある⁶⁾。また, 海外では平成 23 年にカナダで患者 8 名の感染が確認され, 公衆衛生上の問題として注目された⁷⁾。稀な血清型であったことから, PCR 法によるサルモネラ及び亜種 I の確認と各抗原遺伝子の確認を併せて行った。3 株はいず

れもサルモネラに特異的な *invA* 遺伝子 (+), 亜種 I に特異的な STM4057 (+), O13 *wzx* (+), H1:g,m *fliC* (+), H2;1 及び H2:e,n *fljB* については(-)であることが確認された (図 1)。PCR 法でも従来の血清型別法と一致した結果が得られたことから, 迅速に血清型を推定することが可能な PCR 法は, 感染症の発生動向を把握する上で非常に有用であると考えられた。また, サルモネラの血清型別は, 煩雑で誤同定されるケースもあることから⁸⁾, 本事例のように稀な血清型が分離された場合には, PCR 法により抗原遺伝子の検出を行うことでより正確な血清型の同定が可能であると考えられた。

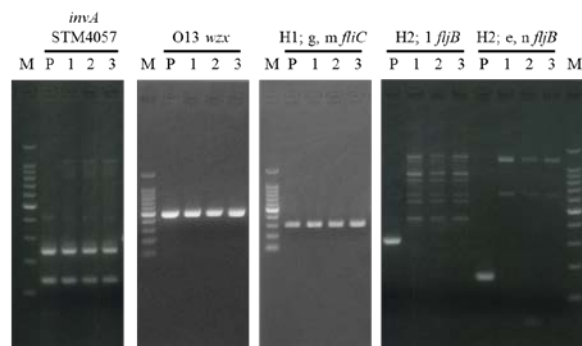


図 1 サルモネラの確認と抗原遺伝子の検出
invA (244 bp), STM4057 (137 bp), O13 *wzx* (502 bp), H1: g,m *fliC* (309 bp), H2; 1 complex *fljB* (294 bp), H2; e,n complex *fljB* (152 bp).
Lane M : 100 bp DNA size ladder (Takara),
P : positive control,
1: Sa2675, 2: Sa2680, 3: Sa2681

3.2 分離株の分子疫学的な解析

非常に稀な血清型が複数確認されたことから, 3 株の薬剤感受性試験と PFGE 法による菌の DNA パターンを比較した。薬剤感受性試験の結果, 3 株は供試した 6 剤にはいずれも感受性であった。また, PFGE 法の結果, 制限酵素として *NotI* を使用した場合はいずれも同一, *XbaI* を使用した場合は 1 株がバンド 1 本異なるのみであった (図 2)。今回, 患者同士の接点については不明であったが, 患者の発生地域は, 地理的に非常に近く, 関連性が疑われた。

医療機関からの情報によると, 初発の患者は直近にミドリガメを飼育し始めたとのことであり, 感染源としてはこのミドリガメが強く疑われた。

表 1 菌株と血清型別結果の詳細

菌株No. 受付日	患者情報			血清型別		
	年齢	性別		O	H1	H2
Sa2675 8/27	2	男児		O13, 23	g, m	-
Sa2680 9/5	4	女児		O13, 23	g, m	-
Sa2681 9/11	4ヶ月			O13, 23	g, m	-

爬虫類を原因とする感染事例は国内外で散見されている。爬虫類の中でも、特にミドリガメは子供のペットとして人気が高いが、そのサルモネラ汚染は高率で、様々な血清型のサルモネラの保菌が確認されている⁹⁾。平成25年8月12日には米国での子ガメを原因とする感染事例の多発を受け厚生労働省から注意喚起を促す通知が出されている。当センターでは今回の事例確認後、感染症情報センターの感染症週報に爬虫類に起因するサルモネラ症についてトピックスを掲載し、改めて注意喚起を行った。

サルモネラの感染源としては食肉や鶏卵がよく知られている。しかしながら、牛、豚、鶏等の家畜以外にも、イヌ・ネコ等のペット、カメ・ヘビ等の爬虫類など様々な動物でサルモネラの保有が確認されていることから、動物と接触する際にはサルモネラへの感染予防に注意を払うことが大切である。

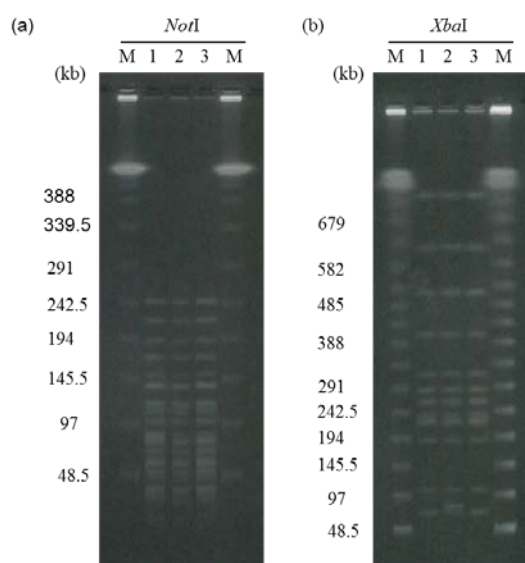


図2 PFGE法による菌のDNAパターンの比較

M: Size Marker,

1: Sa2675, 2: Sa2680, 3: Sa2681

参考文献

1) 国立感染症研究所ホームページ

<http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/bacteria-j.html>

ホーム>病原微生物検出情報 (IASR)>速報集計表・細菌

- 2) Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T, Nakadai A, Hirota Y, Hayashidani H: A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification., *Appl. Microbio.*, **107**, 2009, 805-811.
- 3) Franklin K, Lingohr EJ, Yoshida C, Anjum M, Bodrossy L, Clark CG, Kropinski AM, Karmali MA: Rapid genosertotyping tool for classification of *Salmonella* serovars, *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 2011, 2954-2965.
- 4) Maurer JJ, Lee MD, Cheng Y, Pedrosa A: An allelotyping PCR for identifying *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg, and Typhimurium, *J. Vis. Exp.*, **22**, 2011, 1-6.
- 5) Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ: Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 2006, 59-67.
- 6) 東京都感染症情報センター: 東京都において分離された赤痢菌およびサルモネラの菌種、血清型および薬剤感受性について、東京都微生物検査情報 (月報), **31**, 2009.
- 7) Taylor M, Brisdon S, Jeyes J, Stone J, Embree G, Paccagnella A, Hoang L, Galanis E: *Salmonella enterica* serovar Agbeni, *British Columbia, Canada*, 2011, *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 2012, 1542-1543.
- 8) Hendriksen RS, Mikoleit M, Carlson VP, Karlsmose S, Vieira AR, Jensen AB, Seyfarth AM, DeLong SM, Weill FX, Lo Fo Wong DM, Angulo FJ, Wegener HC, Aarestrup FM: WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007, 2009, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2729-2736.
- 9) 黒木俊郎, 石原ともえ, 伊東久美子, 宇根有美: ミシシippアカミミガメの *Salmonella* 保有実態, 病原微生物検出情報, **30**, 2009, 212-213.