

魚病診断マニュアル

アユの *Edwardsiella ictaluri* 感染症の診断

病魚からの検出

(平成 20 年 7 月 暫定版)

独立行政法人 水産総合研究センター

養殖研究所 魚病診断・研修センター

## 1. 注意事項

- ・ 生の魚体組織試料を扱う場合には、何らかの病原体がいる可能性を常に考え、検査後、殺菌・消毒できる場所で行う。
- ・ サンプルは症状を示す病魚または瀕死魚とする。死亡魚はできるだけ使用しない（生魚が入手できない場合にはできるだけ新鮮な死亡魚を選択する）。試料到着後、速やかに検査を行う。やむを得ず、後日検査する場合には、 $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結保存する。
- ・ 特定疾病が疑われる試料では、検査方法、供試細胞、検査組織・部位などは、各疾病のマニュアルに従う。
- ・ 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペット類を換える。
- ・ 検査を始める前には、アルコール綿等を用いて机上のほこりをよく拭き取る。
- ・ 試験管、シャーレ等の蓋を開ける際には、アルコールランプ（あるいはガスバーナー）付近で行い、出来るだけ空中落下菌の混入を避ける。

## 2. 必要な実験装置と試薬類

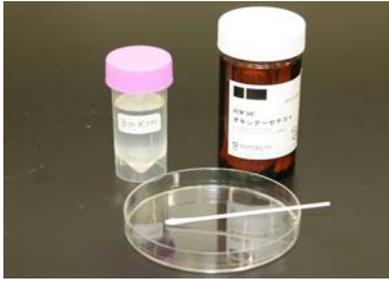
### 1) 試薬・実験器具



- ・ 解剖器具
- ・ 火炎滅菌用アルコールランプ（またはガスバーナー）
- ・ アルコール綿
- ・ 魚体重測定用電子天秤



- ・ 白金耳、白金線
- ・ トリプトソイ寒天培地；TS 寒天培地（あるいはトリプトソイ液体培地＋細菌培養用寒天）
- ・ 滅菌シャーレ
- ・ スライドグラス



- ・ チトクローム・オキシダーゼ試験棒（または試験紙）
- ・ 3%KOH 溶液



- ・ SIM 培地
- ・ コバック試薬
- ・ 小試験管
- ・ 白金線



#### PCR 関連試薬・器具一式

- ・ 酵素（TaKaRa EX Taq Hot Start Version 等）
- ・ プライマーセット（線毛遺伝子上流部位）
- ・ *E. ictaluri* 陽性対照（養殖研より配布）

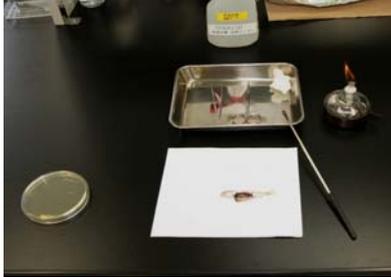
その他、PCR 関連器具

## 2) 実験機器・装置

- ・ インキュベータ
- ・ 遠心機または、高速微量遠心機
- ・ PCR 関連機器・装置
- ・ ブロックインキュベータ
- ・ オートクレーブ

### 3. 手技

#### (1) 菌分離



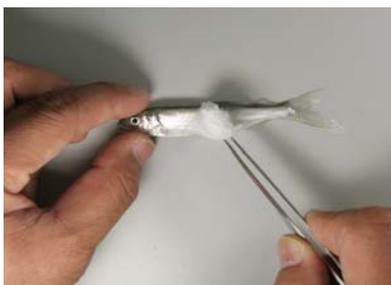
① 解剖器具、菌の分離培養に用いるTS寒天培地、白金耳、アルコールランプ（あるいはガスバーナー）、アルコール綿等を準備する。



② 解剖器具は火炎滅菌する。



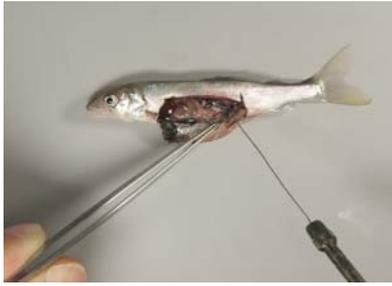
③ 病魚の体長・体重を測定・記録した後、症状を観察する。血液の混じった腹水に起因する腹部膨満等がアユの *E. ictaluri* 感染魚の症状の一つである。



④ きつく絞ったアルコール綿で体表を拭き、病魚の体表を殺菌する。



⑤ 消化管を傷つけないように、肛門前方からハサミを入れ、側線にそって鰓蓋付近まで腹腔壁を切開し、開腹する。腹水が溜まっている場合は、きつく絞ったアルコール綿で腹水を拭う。



- ⑥ 腎臓（体腎：背鰭基部後端の下方に位置する背骨の腹側に張り付いている）を露出させ、火炎滅菌した白金耳を挿入する。予め、白金線で腎臓表面の膜に孔を開けておくと白金耳を挿入しやすい。



- ⑦ トリプトソイ（TS）寒天培地に画線塗布する。



- ⑧ 25℃で48時間培養する。48時間後の培養コロニーは半透明の白色を示し、粘着性が無いのが特徴である。特徴的なコロニーが単一に多数形成していることを確認し、それらを以下の性状検査や遺伝子検査に用いる。

## (2) 性状検査

### 1) 菌のグラム鑑別試験 (劉の方法)



- ① 3%KOH 溶液を準備し、スライドガラス上に1滴滴下する。



- ② 48 時間培養した菌のコロニー数個を白金耳で掻き取り、スライドガラス上で KOH と混合する。

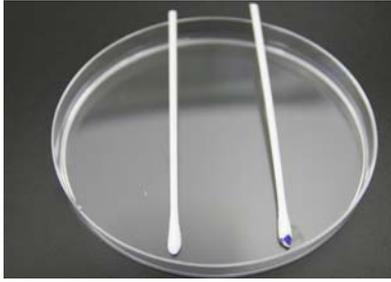


- ③ グラム陰性菌であれば、菌体が粘性を示し、白金耳を上下すると糸を引く。逆にグラム陽性菌は粘性を示さない。(E. ictaluri は、グラム陰性)

### 2) チトクローム・オキシダーゼ試験



- ① チトクローム・オキシダーゼ綿棒に寒天上の 48 時間培養菌のコロニーを付着する。  
試験紙タイプの場合には、試験紙を少量の蒸留水で湿らせ、その上に滅菌楊子等で掻き取ったコロニーを塗布する。



- ② 30 秒以内に菌の塗布部分が青色に変色するか否かを判定する。本菌の場合、青色に変色しない (*E. ictaluri* は、チトクローム・オキシダーゼ陰性)。

### (3) PCR 法による菌種の同定

#### 1) テンプレートの準備



- ① TS 寒天培地上で 48 時間培養した菌の 1 コロニーを白金耳あるいは滅菌楊子で軽く触れ、1.5 ml マイクロチューブ内の蒸留水 (遺伝子実験用) 100  $\mu$ L に懸濁する。

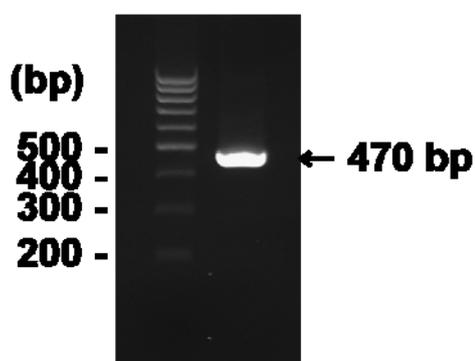


- ② ブロックインキュベータを用いて、100°C で 5 分間加熱する (DNA の熱抽出)

- ③ 10,000 rpm、5 分間遠心し、その上清を PCR 用のテンプレートとする。

## 2) PCR

- ・PCR反応液の組成について、プライマー\*以外はKHV病診断のPCR法に準じる。
- ・反応プログラムは表の通り。



- ④ 増幅産物の電気泳動像。分子量470 bp に陽性バンドが出現する。

\**E. ictaluri*検出用プライマーセット（線毛遺伝子上流に設計）

EDi-F : 5'-CAG-ATG-AGC-GGA-TTT-CAC-AG-3'

EDi-R : 5'-CGC-GCA-ATT-AAC-ATA-GAG-CC-3'

表 PCR 反応プログラム (TaKaRa ExTaq の場合)

	反応温度	反応時間	反応回数
酵素活性*	94°C	3分	x 1
熱変性	94°C	30秒	x 40
アニーリング	65°C	30秒	
伸長	72°C	1分	
最終伸長*	72°C	5分	x 1

\*使用するTaqのマニュアルに従う

### 参照：SIM 培地を用いた性状試験

本試験は腸内細菌属の性状試験として常用される試験であり、本菌と性状が近似する *Edwardsiella tarda* との簡易鑑別にも有用である。



① SIM 培地を指示書に従い、小試験管内に作製する。あるいは市販の生培地を購入する。

② 白金線（先端がループ状でないこと）を用いて、48 時間培養菌の数コロニーを掻き取り、培地の中央部に挿入し、試験管底から 1 cm 上方までせん刺する。

③ 25℃で 48 時間培養後、培地の色および濁りを観察する。硫化水素産生がある場合には、培地全体あるいはせん刺部位が黒変する。運動性陽性の場合には、せん刺部位以外の部分でも、培地の濁りを示す。

④ 次にコバック試薬を数滴試験管内に滴下し、試薬と接した培地面が赤変するか否かを観察する。赤変すればインドール陽性。写真左側が *E. tarda*、右側が *E. ictaluri*。



表. SIM 培地を用いた *Edwardsiella ictaluri* と *Edwardsiella tarda* の鑑別

	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
硫化水素産生能 (S)	±*	+**
インドール産生能 (I)	—	+
運動性 (M)	+ (W) ***	+

\* : 48 時間以内に判定した場合、陰性

\*\* : 海水魚に感染する *Edwardsiella tarda* の中には、硫化水素を産生しない型もある。

\*\*\* : せん刺部位より拡がって培地の濁りが観察される（培地全体の濁りには至らない）。

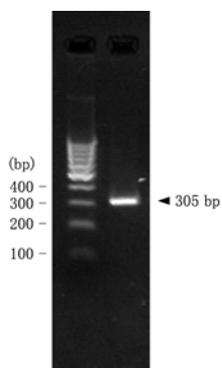
#### 4. 検査後の器具・機材の処理



- ① 細菌に汚染した器具、培養液等は滅菌缶に入れ、オートクレーブ処理する。オートクレーブできない器具や実験台はアルコール消毒する。
- ② 検査後の検体（魚）は焼却処分する。

参考：改良前（2008年4月版）のPCR

- ・PCR反応液の組成について、プライマー\*以外はKHV病診断のPCR法に準じる。
- ・反応プログラムは表の通り。



増幅産物の電気泳動像。分子量305 bpに陽性バンドが出現する。

\**E. ictaluri*検出用プライマーセット（線毛遺伝子上流に設計）

EI-F : 5'-TCA-ACA-TCC-ACC-AAA-TGG-3'

EI-R : 5'-CTA-TTA-CAG-ACA-ATC-AAG-3'

表 PCR 反応プログラム

	反応温度	反応時間	反応回数
酵素活性	94℃	3分	x1
熱変性	94℃	30秒	x40
アニーリング	52℃	30秒	
伸長	72℃	30秒	
最終伸長	72℃	5分	x1