

魚病診断マニュアル

アユの *Edwardsiella ictaluri* 感染症の診断

保菌魚（種苗）からの検出

（平成 20 年 4 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。
- ・ 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、凍結保存する。
- ・ 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
- ・ 火炎滅菌用器具（アルコールランプ等）
- ・ アルコール綿
- ・ 魚体重測定用電子天秤
- ・ 滅菌缶



- ・ 滅菌綿棒
- ・ 50 ml 遠沈管または小試験管（滅菌済み）
- ・ ピペット（滅菌済み）
- ・ 三角フラスコ
- ・ 1.5 ml 容マイクロチューブ（滅菌済み）
- ・ SS 寒天培地



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（繊毛遺伝子上流部位）
- ・ 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

- ・ 遠心機および高速微量遠心機
- ・ 電子レンジ
- ・ インキュベータ
- ・ ブロックインキュベータ
- ・ PCR 関連機器・装置
- ・ オートクレーブ

3. 手技

(1) SS 液体培地（選択増菌培地）の作製



- ① 50 ml 遠沈管内で、市販の SS 寒天培地を蒸留水に溶解し、その後約 1,500 rpm、1 分間の遠心により、寒天を沈殿させる。ピペット等でその上清を三角フラスコに移す。



- ② フラスコにラップをかけ、電子レンジを使って、培地を軽く沸騰させる。ラップに孔を開けておくと、突沸を防ぐことができる。



- ③ 滅菌した遠沈管または小試験管に上記の SS 液体培地を無菌的に分注する。適量は 50 ml 遠沈管で 5 ml、小試験管で 3 ml 程度である。分注後は蓋をして、使用時まで冷蔵で保存する。

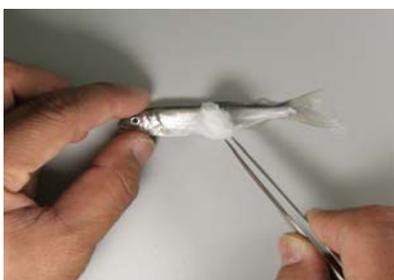
(2) 魚の解剖と増菌培養

検査魚のサイズにより、解剖の手技が異なる。

1) 全長 5cm 以上の検査魚の場合 (参考)



- ① 解剖器具をアルコールランプ等で火炎滅菌する。



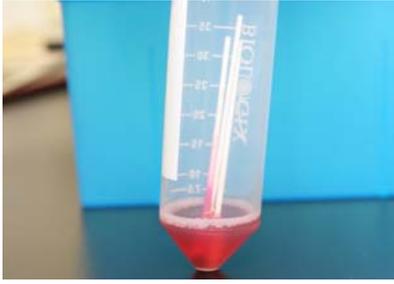
- ② きつく絞ったアルコール綿で、魚体表を拭く (軽く粘液を拭う程度)。



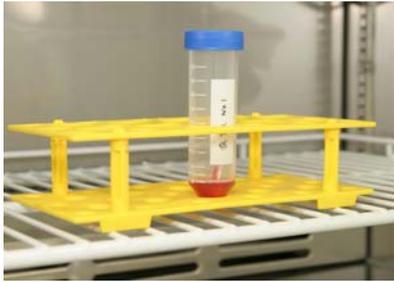
- ③ 火炎滅菌した解剖器具を用いて、肛門より前方の位置から、側線に沿って前方に切開し、開腹する。



- ④ 滅菌綿棒を用いて、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) を削ぎ取る。



- ⑤ SS 液体培地の入った遠沈管または小試験管に腎組織の付着した綿棒を移入する。同じロットの検査魚からの綿棒を 1 本の遠沈管にプールしても構わない。



- ⑥ 遠沈管（小試験管）の蓋が閉まるように、綿棒の先端を切り取り、蓋をして、25℃で24時間培養する。



- ⑦ 蓋を開け、遠沈管（小試験管）内の綿棒を除去し、滅菌缶に捨てる。



- ⑧ 再び蓋を閉め、軽く震とう攪拌して、細菌を懸濁させる。さらに、1,000 rpm (180 g)、3 分の遠心により組織片を沈殿させる（細菌は沈殿しない）。



- ⑨ 培地上清 1 ml を 1.5 ml のマイクロチューブに移入する。



- ⑩ 5,000rpm (2430 g) で5分間の遠心により、細菌を沈殿させ、ピペットを用いて、上清 (SS 培地) を除去する。



- ⑪ D.W. (遺伝子実験用) を 100 μ L 添加し、ピペッティングにより細胞を懸濁させる。



- ⑫ 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 (熱抽出)。

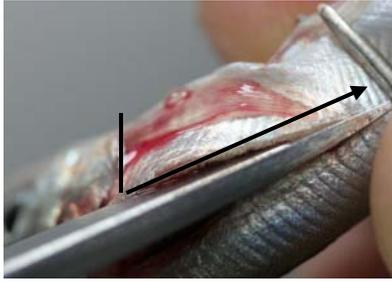


- ⑬ 10,000 rpm、5分間、4°C で遠心し、その上清を PCR 用テンプレートとする。

2) 全長 5cm 以下の検査魚の場合 (参考)



- ① 解剖ハサミを用いて、頭部後方より背骨に達するまで切断する。



- ② 消化管を傷つけないように気を付けながら、両腹側を側線に沿って切開する。



- ③ 体腎が露出したら、3-(2)-1)-④同様に綿棒で腎臓を削ぎ取る。矢印の先端が体腎部。以降、3-(2)-1)-⑤に続く。

(3) PCR 法による *E. ictaluri* の検出

作製した PCR 用テンプレートを用いて PCR を行う。反応液組成、プライマーの塩基配列、反応プログラムについては、病魚からの細菌検出を参照。

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。