

# 鶏コクシジウム症の種鑑別におけるマルチプレックス qPCR 法の活用

中央家畜保健衛生所 ○佐藤 俊介、永野 由佳、印丸 美紀、樋口 真

## 1 背景と目的

鶏コクシジウム症は *Eimeria* 属原虫によって引き起こされる腸管疾患であり、主に糞便検査と病理学的検査で診断される。それぞれ病原性が異なる 7 種が報告されている。種の鑑別手法として、オーシストの形態観察やコンベンショナル PCR 法 (cPCR) 等があるが、混合感染もある中、多種鑑別は作業が煩雑であり難しい[1]。今回、マルチプレックス qPCR 法 (mqPCR) を活用し、迅速・簡便な種鑑別検査が可能となったため報告する。

## 2 材料と方法

(1) mqPCR の設計：海外の文献を参考に *E. acervulina* (Ea)、*E. maxima* (Ema)、*E. necatrix*(En)、*E. tenella*(Et)と *E. brunetti* (Eb)、*E. mitis* (Emi)、*E. praecox* (Ep)、*Clostridium perfringens* (CP、混合感染が多いため参考として追加設計) の 4plex 2 セット作製した (表 1) [2-4]。

シングルプレックスとマルチプレックスの比較は、陽性 DNA (表 2) を 10 倍階段希釈して各 3 回測定した標準曲線を用いて実施。

表 1 mqPCR の設計

set	標的	標的遺伝子	5'標識	3'標識	参考論文
A	En	SCARマーカー	FAM	QSY	Blake et al. (2008)
	Ea	SCARマーカー	VIC		Blake et al. (2008)
	Ema	SCARマーカー	ABY		Blake et al. (2006)
	Et	SCARマーカー	JUN		Blake et al. (2008)
B	Emi	ITS-2	FAM	QSY	Morgan et al. (2009)
	Eb	ITS-2	VIC		Morgan et al. (2009)
	Ep	ITS-2	ABY		Morgan et al. (2009)
	CP	16S rRNA	JUN		Wise et al. (2005)

表 2 陽性 DNA

Epを除く6種	DNAフラグメント合成 (10 <sup>7</sup> copies/μL)
Ep	腸内容物核酸抽出物 (濃度不明)
CP	菌液核酸抽出物 (10 <sup>7</sup> cfu/mL)

(2) 検査時間及び費用の比較：mqPCR と cPCR[5]について比較した。

(3) 野外検体を用いた mqPCR の検証：過去 5 年の病性鑑定事例で鶏コクシジウムが関与した、20 症例 (肉用 15 戸、平飼い採卵 2 戸、ケージ採卵 3 戸) 49 羽のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 腸管プール検体を材料とし、mqPCR を行った (CP を除く)。また、病理組織所見と併せて分析した。

## 3 結果

(1) シングルプレックスとマルチプレックスの比較では、標準曲線の傾き、相関係数、PCR 効率に有意差は認められなかった (図 1、図 2、P>0.05)。

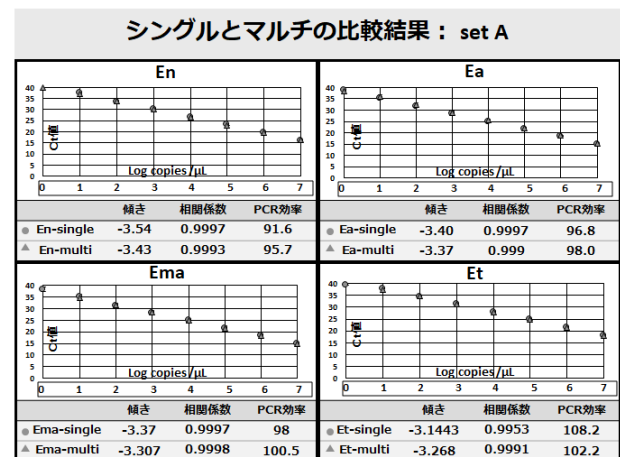


図 1 シングルとマルチの比較結果 (set A)

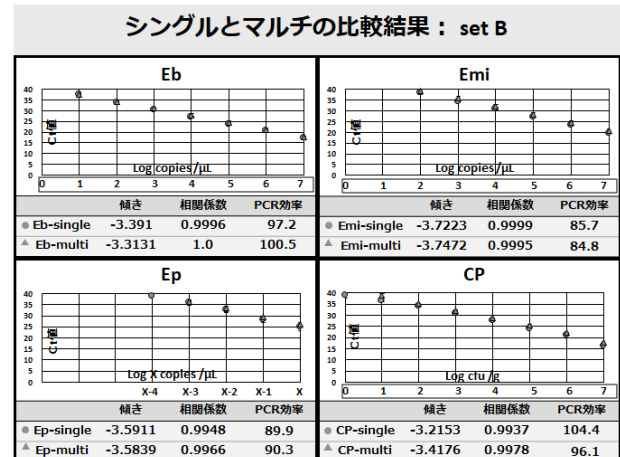


図 2 シングルとマルチの比較結果 (set B)

(2) 1 検体あたりの検査費用及び延べ時間は、mqPCR が 515 円及び 2.5 時間、cPCR が 827 円及び 23 時間であった (図 3)。

(3) 症例別陽性率は 7 種それぞれ Ea 70%、Et 60%、En 20%、Eb 15%、Ema・Emi・Ep 0%であり、混合感染は 55%、単一感染は 40%であった。鶏種別では、肉用 Ea 80%、Et 67%、Eb 13%、En 7%、平飼い採卵 En 100%、Ea 50%、ケージ採卵 Et 67%、En 33%、Ea 33%、Eb 33%であった (ケージ採卵 3 戸中 1 戸は全種不検出) (図 4)。不検出を除き、十二指腸に病変を認めた検体は全て Ea 陽性であり、盲腸に病変を認めた検体は 86%が Et 陽性であった (図 5)。

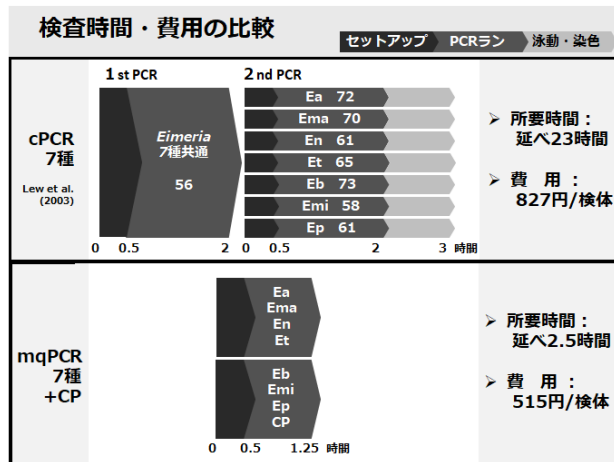


図 3 検査時間と費用の比較

鶏種	飼養形態	En	Ea	Et	Eb	Ema	Emi	Ep
1			36.34	36.78				
2			32.94					
3			28.34					
4			34.25	31.54				
5			35.52	35.64				
6		33.59	36.43	33.32	36.81			
7				34.92	39.77			
8	肉用鶏	平飼い	30.94					
9			33.93					
10			32.31	30.38				
11			30.29					
12				28.26				
13			34.93	25.96				
14			30.53	31.89				
15				35.42				
16		平飼い	30.8	33.96				
17			31.68					
18	採卵鶏							
19		ケージ	34.53	35.03	30.59	36.54		
20				32.2				
症例別陽性率(%)		20	70	60	15	0	0	0

図 4 野外検体を用いた mqPCR の結果

#### 4 考察

mqPCR は有用であり、cPCR と比して、簡便に種鑑別が可能であった。検出率は Ea、Et が高く、種特異的寄生部位病変との一致率も高かった。また、近年認知が広まってきた Eb が低率ながら確認された。本症の予防として抗コクシジウム剤が利用されるが、薬剤耐性獲得の問題もあり、生ワクチンやプレバイオティクスでの予防が重視されている。本法を活用し種を鑑別することで、病原性リスク評価と適切なワクチン選択を可能にし、本症の防除に役立てていきたい。今後は、早期の診断のために腸管生材料や糞便を活用しデータを積み重ねていくとともに、遺伝子量と OPG や CFU (CP) の相関を確認して定量性についても検証していきたい。

#### 引用文献

- [1] 鶏病研究会：鶏病研究会報 Vol. 52、No. 3、167-174 (2016)
- [2] Damer P. Blake et al. Avian Pathology. 37 (1) :89-94 (2008)
- [3] J.A.T. Morgan et al. Molecular and Cellular Probes. 23:83-89 (2009)
- [4] Mark G Wise et al. Appl Environ Microbiol. 71 (7) :3911-3916 (2005)
- [5] A.E.Lew et al. Vet Parasitol. 112 (1-2) :33-50 (2003)

種	飼養形態	十二指腸	Ea	空回腸	En	盲腸	Et	Eb	
1			36.3			+	⇒ 36.8		
2		+	⇒ 32.9						
3		+	⇒ 28.3						
4			34.3			+++	⇒ 31.5		
5		+	⇒ 35.5			+	⇒ 35.6		
6			36.4	+	34.0	+	⇒ 33.3	36.8	
7						+	⇒ 34.9	39.8	
8	肉用鶏	平飼い	++	⇒ 30.9					
9			+	⇒ 33.9					
10			+	⇒ 32.3		+	⇒ 30.4		
11			+	⇒ 30.3					
12						++	⇒ 28.3		
13			+	⇒ 34.9	+	+++	⇒ 26.0		
14			++	⇒ 30.5	+	++	⇒ 31.9		
15						+	⇒ 35.4		
16		平飼い	+	⇒ 34.0	++	30.8	+		
17				++	31.7				
18	採卵鶏					±			
19		ケージ	+	⇒ 35.0		34.5	+	⇒ 31.0	36.5
20						+++	⇒ 32.2		

図 5 mqPCR の結果と腸病変スコアの比較