

鼻腔スワブ プール検体検出の有効性検証

ー牛群モニタリングへの活用ー

有限会社 あかばね動物クリニック

イントロダクション

キヤノンメディカルシステムズ株式会社のウシ呼吸器病遺伝子検出キット Genelyzer™ KIT (以下、「本キット」) は呼吸器病の引き金となっている病原体の遺伝子 (下表の遺伝子検査対象微生物) を同時に検出でき、結果に基づいた対処 (ワクチンプログラムなど) の実施が可能である。しかしながら、大規模農場・牧場の全頭検査には、高額な検査費がかかることが課題となっている。全頭検査の検査費を低減する方法として、牛ウイルス性下痢ウイルスでは、血清検体を混合しプール血清として検出する方法が有効であることが知られている。

今回、本キットによる検出コスト削減の可能性を探るために、本キットおよびプレジジョン・システム・サイエンス株式会社 (以下PSS社) の全自動核酸抽出装置を用いて、鼻腔スワブ検体を混合したプール検体を検出する機会を得たため結果を報告する。

| 遺伝子検査対象微生物 | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|----------------|--------------------|--------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| 牛ウイルス性下痢ウイルスⅠ型 (BVDⅠ) | 牛ウイルス性下痢ウイルスⅡ型 (BVDⅡ) | 牛コロナウイルス (BCV) | 牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBR) | 牛RSウイルス (RS) | マイコプラズマ・ボビス (M.bov) | マイコプラズマ・ボヒライニス (M.brh) | マイコプラズマ・ディスパー (M.dis) | マンヘミア・ヘモリティカ (Mh) |

※略称をカッコ内に記載

〈検証概要〉

個体検体、プール2検体、プール5検体の検出結果について比較検証した。

〈方法〉

プール検体の検出は下図の通り実施した。



〈結果〉

プール5検体

プール5検体ですべて個体検体の結果と一致した。結果の概要は、下記の通り。

※下表以外の病原体遺伝子はすべて陰性一致

| A農場 | | | |
|--------|-------|-------|----|
| No. | M.brh | M.dis | Mh |
| 1 | + | + | + |
| 2 | - | + | - |
| 3 | + | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | + | + | - |
| プール5検体 | + | + | + |

| B農場 | | | | |
|--------|-------|-------|----|-----|
| No. | M.brh | M.dis | Mh | BCV |
| 1 | - | + | - | + |
| 2 | + | + | - | - |
| 3 | + | + | - | - |
| 4 | + | + | - | + |
| 5 | + | + | + | - |
| プール5検体 | + | + | + | + |

プール2検体

M.brh、M.dis、Mhにおいて、陽性および陰性が一致。BCVでは陽性3検体で不一致があった。結果の概要は、下記の通り。

※下表以外の病原体遺伝子はすべて陰性一致

| M.brh | 個体検体 | | Mh | 個体検体 | | | |
|--------|------|----|-----|--------|---|---|---|
| | + | - | | + | - | | |
| プール2検体 | + | 10 | 0 | プール2検体 | + | 6 | 0 |
| | - | 0 | 0 | | - | 0 | 4 |
| M.dis | 個体検体 | | BCV | 個体検体 | | | |
| | + | - | | + | - | | |
| プール2検体 | + | 10 | 0 | プール2検体 | + | 0 | 0 |
| | - | 0 | 0 | | - | 3 | 7 |

〈結果〉

すべての検出結果は、下記の通り。

個体検体
 プール2検体
 プール5検体

| A農場 | | | | | | | | | |
|------|------|-------|-----|-----|----|-------|-------|-------|----|
| No. | BVDI | BVDII | BCV | IBR | RS | M.bov | M.brh | M.dis | Mh |
| 1 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 1,2 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 3 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 3,4 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 5,6 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 8 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 7,8 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 9 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 9,10 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |

| B農場 | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|-----|-----|----|-------|-------|-------|----|
| No. | BVDI | BVDII | BCV | IBR | RS | M.bov | M.brh | M.dis | Mh |
| 21 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 22 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 25 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 21-25 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |

不一致検体の追加検出

BCV陽性の3検体については、再抽出し検出を実施、下表の結果を得た。不一致の要因として、検出限界および核酸抽出に用いる鼻腔スワブ検体の分取分画の違いが想定される。原因は、今後の追跡調査で明らかにしたい。

個体検体の検出結果(BCV)

※赤字:初回検出、黒字:再検出

| No. | 1 | 2 | 3 |
|-----|-----|-----|-----|
| BCV | +/- | +/- | +/- |

検出限界付近

鼻腔スワブ検体の分取分画の違い

| A農場 | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|-----|-----|----|-------|-------|-------|----|
| No. | BVDI | BVDII | BCV | IBR | RS | M.bov | M.brh | M.dis | Mh |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 11,12 | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 13 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 14 | - | - | + | - | - | - | - | + | - |
| 13,14 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 15,16 | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 17 | - | - | + | - | - | - | + | + | - |
| 18 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 17,18 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 19 | - | - | + | - | - | - | - | + | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 19,20 | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 13-17 | - | - | + | - | - | - | + | + | + |

不一致検体の再検出

| A農場 | | | | | | | | | |
|-----|------|-------|-----|-----|----|-------|-------|-------|----|
| No. | BVDI | BVDII | BCV | IBR | RS | M.bov | M.brh | M.dis | Mh |
| 14 | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 17 | - | - | + | - | - | - | + | + | - |
| 19 | - | - | + | - | - | - | - | + | - |

〈まとめ〉

今回、PSS社の全自動核酸抽出装置および、キヤノンメディカルシステムズ株式会社のウシ呼吸器病遺伝子検出キットを用い、プール検体の評価を試みた。

結果、BCVを除き、すべて一致した。検出確度をあげるためには、複数回検出することが望まれる。

今後、鼻腔スワブ プール検体のDNAチップ検出を定期的な牛群モニタリングとして利用することで、コストを低減しながらも網羅的な病原体遺伝子検出を行い、予防衛生プログラムの検討や、農場の異常兆候の検知に活用したい。

普及に向けては、1.鼻腔スワブ検体の混合から抽出までの手法確立、2.野外検体検出事例の積み重ね、が課題としてあげられる。

〈製品情報〉

抽出機器・試薬

プレジジョン・システム・サイエンス株式会社の製品を推奨
 機器: 全自動核酸抽出装置 magLEAD 6gC/12gC
 消耗品: magLEAD® Consumable Kit
 キット: MagDEA® Dx SV

遺伝子検出 (キヤノンメディカルシステムズ株式会社)

機器: DNA検査装置 Genelyzer II
 消耗品: ウシ呼吸器病遺伝子検出キット Genelyzer™ KIT A/BRDC-C (DGLK-0002A)

