

短 報

## 牛から分離される *Mannheimia* 属菌の PCR による同定法の確立

勝田 賢<sup>1)</sup> 小嶋 暢<sup>2)</sup> 富山美奈子<sup>3)</sup> 佐藤裕夫<sup>4)</sup> 三上 修<sup>1)</sup>

- 1) 農研機構・動物衛生研究部門  
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
- 2) 山形県中央家畜保健衛生所  
〒 990-2161 山形県山形市漆山 736
- 3) 青森県十和田家畜保健衛生所  
〒 034-0093 青森県十和田市西十二番町 19-23
- 4) 岩手県中央家畜保健衛生所  
〒 020-0605 岩手県滝沢市砂込 390-5

連絡担当者：勝田 賢  
Tel & Fax : 029-838-7925  
E-mail : katsuda@affrc.go.jp

### [要 約]

PCR 法による *Mannheimia* 属菌 5 菌種の菌種同定法を検討し、良好な成績が得られたので報告する。今回確立した PCR は *Mannheimia* 属の参照株を含め、供試した全ての菌株で 16SrRNA 解析の結果と一致した同定結果が得られた。このことから *recN* 遺伝子をターゲットにした PCR 法は *Mannheimia* 属を同定するため有用な方法と考えられる。

**キーワード**： *Mannheimia* 属菌、生化学的性状、16SrRNA 解析、血清型別

*Mannheimia haemolytica* は、牛呼吸器病の主要原因菌の 1 つである [6]。本菌はパストレラ科に属するグラム陰性短桿菌であり、莢膜の抗原性により 12 種類の血清型に分類されている [5]。また、本菌には複数の生物型が存在し、*M. haemolytica complex* とも呼ばれていた。近年、16S rRNA の塩基配列や DNA-DNA hybridization などの解析により、*M. haemolytica complex* には少なくとも、5 菌種 (*M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. haemolytica*, *M. ruminalis*, *M. varigena*) が含まれることが報告された [4]。我々は以前に、16SrRNA

解析結果との比較により、生化学的性状試験を用いた同定キットで *M. haemolytica* と同定された菌株の 6.5% は *M. haemolytica* 以外の菌種であり、生化学性状検査キットだけで *Mannheimia* 属菌を正確に同定することは困難であることを報告した [8]。

近年、Alexander らが、*M. haemolytica*、*M. glucosida* および *M. ruminalis* の 3 菌種を同定可能な multiplex-PCR 法を報告した [2]。この multiplex-PCR 法は、*Mannheimia* 属菌を同定するために非常に有用なツールと考えられるが、牛に病原性が認められる *M. varigena* と *M. granulomatis* は同定できない。また、16SrRNA 解析は菌種同定に非常に有効な手法であるが、本解析を実施するためには、機器

受付：2015 年 12 月 16 日  
受理：2016 年 5 月 25 日

の整備が必要であり、また、外部委託にはコストがかかるなどの問題点がある。このため *Mannheimia* 属の 5 菌種を菌種レベルで同定可能な PCR 法の確立が必要と考えられる。今回、*Mannheimia* 属菌の *recN* 遺伝子を対象に PCR 法による菌種同定を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

参照株としてパストレラ科に属する細菌の内、*Mannheimia* 属の基準株 5 株 (*M. haemolytica* NCTC 9380T, *M. glucosida* CCUG 38457T, *M. varigena* CCUG 38462T, *M. granulomatis* CCUG 45422T and *M. ruminalis* CCUG 38470T)、参照株 6 株 (*M. granulomatis* CCUG 26828, *M. granulomatis* CCUG 38473, *M. granulomatis* CCUG38474, *M. granulomatis* CCUG46479 *M. ruminalis* CCUG 38466 and *M. ruminalis* CCUG 38471)、*Bibersteinia trehalosi* ATCC29703 株、*Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27089 株および *Pasteurella multocida* CCUG37250 株を用いた。また、2000 年から 2015 年に国内の牛から分離され 16SrRNA の塩基配列解析 (約 1,500bp) により同定した *Mannheimia* 属の野外分離株 263 株を供試した。なお、16SrRNA の塩基配列解析は既報に準じて実施した [4]。全ての菌株は 30% グリセリンを添加した tryptic soy broth (Becton, Dickinson and Company, USA)、1ml に濃厚浮遊させ -80℃ に冷凍保存し、必要に応じて 5% 羊血液寒天培地を用い、好気性下で 37℃、24 時間培養し試験に供した。PCR プライマーは *M. glucosida*、*M. granulomatis*、*M. haemolytica*、*M. ruminalis* および *M. varigena* の *recN* 遺伝子を対象にして Genetyx ver. 10 software (Genetyx, Tokyo, Japan) を用いて検索し決定した。(表 1)。PCR 反応は鋳型 DNA に PCR 反応液 (1 × PCR buffer, 0.2mM each dNTP, 0.5μM each primer および 1.25U の Taq gold DNA polymerase) を加え 20μl とし、95℃ 10 分間反応後、95℃ / 30 秒、62℃ / 30 秒、72℃ / 30 秒を 25 サイクル行い、最後に 72℃ で 7 分間反応を行った。また、Alexander らの Multiplex-PCR [2] も合わせて実施した。*recN* 遺伝子の菌種内および菌種間での相同性については *M. glucosida* 11 株、*M. granulomatis* 10 株、

*M. haemolytica* 10 株、*M. ruminalis* 7 株および *M. varigena* 10 株を用いて PCR 産物のダイレクトシーケンスにより塩基配列の決定を実施した。

今回検討した *recN* 遺伝子を対象とした PCR は *Mannheimia* 属 5 菌種の基準株および参照株を特異的に検出可能であり、*Mannheimia* 属以外のパストレラ科細菌の参照株と非特異的な反応は認められなかった。また、供試した 263 株の野外株で 16SrRNA 解析の結果と一致した成績が得られ、*Mannheimia* 属 5 菌種が同定可能と考えられた。また、*recN* 遺伝子の菌種内相同性は 99.2% ~ 100.0% であり、菌種間での相同性は 75.5% ~ 98.7% であった。

既報の Multiplex-PCR [2] との比較では *M. granulomatis* 1 株の結果を除いて一致した成績が得られた (表 2)。本菌株は既報の Multiplex-PCR では *M. haemolytica* と同定されたが、生化学的性状検査では *M. granulomatis* の基準株と D-キシロース分解の 1 項目を除いて一致した性状を示しており、16SrRNA 解析でも *M. granulomatis* の基準株と 99.5% と非常に高い相同性を示した。このことから、今回確立した PCR と既報の PCR で結果が一致しなかった菌株は *M. granulomatis* と考えられる。Guenther ら [7] は、*Mannheimia* 属菌 5 菌種を同定可能な Real-time PCR 法を報告しているが、供試菌株数が非常に少なく、*M. haemolytica* と *M. glucosida* の区分が困難なケースが認められ、加えて専用機器も必要なことから実用的ではないと考えられる。

今回、*recN* 遺伝子を対象に、*Mannheimia* 属菌 5 菌種を同定可能な PCR 法を確立した。*Mannheimia* 属の同定には、既報の Multiplex-PCR が我が国では広く用いられているが、本法は、牛呼吸器病の主要原因菌として重要な *M. haemolytica* と家畜の上部気道やルーメン等に常在している *M. glucosida* および *M. ruminalis* と区別することを目的としており、牛に病原性を示す *M. varigena* と *M. granulomatis* は対象とされていない。*M. granulomatis* は牛の皮下脂肪織炎から分離され、シカの気管支肺炎や結膜炎の原因菌であり [4]、近年、牛の潜在性乳房炎に関与することも報告されている。*M. varigena* は牛の口腔、

ルーメン、腸管などに常在しており、肺炎、乳房炎および敗血症の原因菌として、また、豚の腸炎、肺炎、敗血症の原因となることが知られており [3]、我が国でも子牛の壊死性腸炎、敗血症、化膿性髄膜炎などの症例が報告されている [1, 9]。

今回我々が確立した PCR 法は 16SrRNA による解析結果と完全に一致した成績が得られており、*Mannheimia* 属の 5 菌種全てを同定可能な方法であり、本属菌の野外分離株の同定に有用な方法となると考えられる。

## 引用文献

1. 阿部祥次, 小池新平, 半田真明, 蓼沼亜矢子, 田中理栄子, 市川 優, 湯澤裕史. 2013. *Mannheimia varigena* 感染による化膿性髄膜炎及び肺炎の多発性巣状壊死を呈した和牛子牛の 1 例. 日獣会誌. 66 : 248-251.
2. Alexander, T.W., Cook, S.R., Yanke, L.J., Booker, C.W., Morley, P.S., Read, R.R., Gow, S.P. and McAlister, T.A. 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. Vet. Microbiol. 130: 165-175.
3. Angen, O., Ahrens, P. and Bisgaard, M. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet. Microbiol. 84:103-114.
4. Angen, O., Mitters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E. and Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:67-86.
5. Biberstein, E.L 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*, In: Bergam, T., Norris, J.R. (eds.), Methods in Microbiology, vol. 10: Academic Press, London, pp. 253-269.
6. Frank, G. 1989. Pasteurellosis of cattle, In: Adlam CF, Rutter JM (eds.), *Pasteurella* and Pasteurellosis, Academic Press, London pp. 197-222.
7. Guenther, S., Schierack, P., Grobbel, M., Lubke-Becker, A., Wiele, LH. and Ewers, C. 2008. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. J. Microbiol. Method
8. 勝田 賢, 小嶋 暢, 富山美奈子, 佐藤裕夫, 三上 修. 2015. 牛から分離される *Mannheimia* 属菌の野外実態と生化学的性状について. 家畜感染症学会誌. 4 : 81-86.
9. 又吉正直, 片桐慶人, 安富祖誠, 相澤真紀, 大城 守, 津波 修. 2010. *Mannheimia varigena* が分離された早産子牛の敗血症. 日獣会誌. 63 : 275-277.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for identification of genus *Mannheimia*.

genus <i>Mannheimia</i>	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
<i>M. haemolytica</i>	(F <sup>a</sup> ) gggctatgcttgggtatcgctc	112
	(R <sup>b</sup> ) gccataaataagcagggtatgtgg	
<i>M. glucosida</i>	(F) ccttactatgcagccaaccag	180
	(R) gatattgccccactctcgaag	
<i>M. gramulomatis</i>	(F) tagccggaaggattgagcaaga	379
	(R) tctacaagtcagccccattggag	
<i>M. varigena</i>	(F) agcattgcctgttcgcaactg	514
	(R) agaactcgcttcttgcacctga	
<i>M. ruminalis</i>	(F) gatgcactaggcttatgtttgggt	299
	(R) agcaactgaggtgcgtgttg	

<sup>a</sup> Forward primer

<sup>b</sup> Reverse primer

Table 2. Results of identification of field isolates by PCR

Genus <i>Mannheimia</i>	16S rRNA	No. of isolates	
		Multiplex PCR*	PCR in this study
<i>M. haemolytica</i>	198	199	198
<i>M. glucosida</i>	10	10	10
<i>M. ruminalis</i>	4	4	4
<i>M. varigena</i>	28	Reject	28
<i>M. gramulomatis</i>	5	Reject (4)	5
		<i>M. haemolytica</i> (1)	
<i>Mannheimia</i> sp.	18	Reject	Reject

\* Identification by multiple PCR (Alexander, TW. 2008).

## PCR identification of *Mannheimia* species isolated from cattle

Ken Katsuda<sup>1)</sup>, Toru Ojima<sup>2)</sup>, Minako Tomiyama<sup>3)</sup>, Yasuo Sato<sup>4)</sup> and Osamu Mikami<sup>1)</sup>

1) National Institute of Animal Health, NARO, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan.

2) Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Center, 736 Urusiyama, Yamagata, 990-2161, Japan.

3) Aomori Prefecture Towada Livestock Hygiene Service Center, 19-23 Nishi-Nijyuubantyou, Towada, 034-0093, Japan.

4) Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa, 020-0605, Japan.

Representative Author: Ken KATSUDA

TEL & FAX: 029-838-7925

E-mail: katsuda@affrc.go.jp

### [Summary]

Reinvestigation of *Mannheimia haemolytica*-like organisms resulted in reclassification of these organisms and a new genus, *Mannheimia*, containing at least 5 species (*M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. varigena*, *M. granulomatis* and *M. ruminalis*) was established. The aim of the present study was to design a PCR assay to identify genus *Mannheimia*.

The validity of the PCR assay was examined against 8 reference strains of the family *Pasteurellaceae*. Additionally, 263 isolates of genus *Mannheimia* were screened using PCR. The PCR assay positively identified all genus *Mannheimia*, as confirmed by 16S rRNA analysis.

The PCR assay required no additional phenotypic tests for identification of genus *Mannheimia* and become effective tool for the proper identification of these organisms.

**Key words:** Biochemical identification, *Mannheimia* species, PCR, 16S rRNA analysis

