

原著論文

## 分子生物学的手法を用いた牛の心内膜炎に關与する細菌の検索

森川真子<sup>1)\*</sup> 渡邊謙一<sup>1)</sup> 古林与志安<sup>1)</sup> 猪熊 壽<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> 帯広畜産大学獣医学研究部門

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11

現所属:

\* : 愛知県農業共済組合 〒442-0811 愛知県豊川市馬場町宮脇165

\*\* : 東京大学農学部 動物医療センター 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

連絡責任者氏名: 猪熊 壽

連絡先: 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学農学部 動物医療センター

TEL: 03-5841-5421 FAX: 03-5841-8012

E-mail: ainokuma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

### 【要 約】

牛の心内膜炎病変形成に關与する培養困難な細菌を明らかにする目的で、心内膜炎の疣贅物を対象として、分子生物学的手法を用いた菌種同定を行った。病理解剖によって心内膜炎と確定診断されたホルスタイン種牛22症例由来の疣贅物を材料とし、好気性および嫌気性細菌培養のほか、16S rRNA 遺伝子を標的とする broad-range PCR とシーケンス解析により細菌の検出と種の同定を行った。細菌培養では *Streptococcus* spp. が最も多くの症例から分離され、次いで *Pseudomonas* spp.、*Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*)、*Staphylococcus* spp.、*Corynebacterium* spp.、*Acinetobacter* spp. が分離された。一方で、分離培養できなかった *Helcococcus ovis* (*H. ovis*) がシーケンス解析では22例中6症例(27.3%)で検出され、また *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*)、*Peptoniphilus indolicus* (*P. indolicus*) および *Pseudomonas* spp. の遺伝子も検出された。さらに *H. ovis* 特異的 PCR では15症例(68.1%)、*T. pyogenes* 特異的 PCR では13症例(59.1%)、*Streptococcus* spp. 特異的 PCR では4症例(18.2%)、*F. necrophorum* 特異的 PCR では3症例(13.6%)が陽性を示した。牛の心内膜炎病変形成には、従来から報告されている細菌に加えて、*H. ovis*、*F. necrophorum* および *P. indolicus* が關与している可能性が示唆された。

キーワード: 心内膜炎、原因菌、PCR、シーケンス

心内膜炎は血液中に侵入した細菌が心内膜に付着・増殖することで疣贅物を形成し、弁の閉鎖不全や弁口部の狭窄による循環障害を引き起こす [4, 5, 13, 16]。また、血流を介し疣贅物から細菌が全身に播種し二次的な化膿性病変の原因となる [5, 13, 16]。牛の疣贅性心内膜炎

病変から細菌培養により分離される主要な細菌として *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) や *Streptococcus* spp.、*Staphylococcus* spp. が知られている [5, 13, 16]。しかし、血液寒天培地を用いた24時間程度の好気または嫌気培養では分離できない細菌や培養に長時間を要する細菌が心内膜炎に關与している場合には、原因菌が見逃される可能性が大いにある。培養困難な細菌の検出にシーケンス解析技術が医学・獣医学

受付: 2020年4月16日

受理: 2020年5月20日

領域で用いられている [11]。本法を用いて *Bartonella bovis* や *Helcococcus ovis* (*H. ovis*) の遺伝子が牛の心内膜炎病変から検出されている [1, 6, 7, 15, 20]。しかし、これまで牛の心内膜炎臨床例について、分子生物学的方法を用いて病変形成に関与する細菌が検索されたことはない。そこで、本研究では心内膜炎と診断された牛22症例の疣贅物を材料に、16S rRNAの塩基配列解析および種または属特異的PCRを実施し、心内膜炎病変形成に関与する細菌を検索することを目的とした。

### 材料および方法

#### 供試牛および疣贅物の処理

2006年4月～2017年10月に病性鑑定のため帯広畜産大学に搬入され、病理解剖によって心内膜炎と確定診断された牛のうち、疣贅物がマイナス30℃に保存され、かつ細菌培養データが保存されていた22症例を用いた。症例はいずれも十勝管内に飼養されていたホルスタイン種雌牛で、月齢は9～123(平均57)であった。主な臨床所見としては心内膜炎に由来すると思われるうっ血性心不全症状や心雑音のほか、跛行または関節腫脹、肺音粗励、乳房炎などが認められた(表1)。疣贅物をディスポーザブルのメス刃によって細断後、QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて定法に従いDNAを抽出し、解析までマイナス30℃で保存した。疣贅物の細菌培養については、株式会社第一岸本臨床検査センター(札幌市)に委託して実施した。すなわち細断した疣贅物を5%羊血液寒天培地にスタンプし、好気および嫌気条件下において37℃で17～20時間培養釣菌した。その後分離された純培養菌について、各種性状確認培地を用いた生物学的性状解析および生化学的性状を解析し、属または種を同定した。なお、複数の弁に疣贅物が認められた症例については、材料毎にDNA抽出と細菌培養を行ったが、結果は症例ごとにまとめて記載した。

#### Broad-range PCR とシーケンス解析

Broad-range PCRによる細菌検索にはユニバーサルプライマー8UA/1485Bを用いて細菌の16S rRNA遺伝子約1400 bpの塩基配列を

増幅した(表2) [10]。陽性検体についてはQIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いてPCR産物を精製した後、その4μlをSequence mix (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) 0.5 μl、buffer 2.0 μl、シーケンスプライマー(10 pmol/μl) 1.0 μl、蒸留水2.5 μlに添加してシーケンス反応を行った。ダイレクトシーケンスでは600～700 bpしか決定できないため、約1400 bpの長さの配列決定を目的として前述の8UA、1485Bのほか、シーケンスプライマーとして8UAの5'末端から519番目の塩基の位置に3'側へ519Fを、また5'側へ519Rを、さらに8UAの5'末端から907番目の塩基の位置3'側へ907Fを設計した(表3)。シーケンス反応後はABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列はBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いて、既知遺伝子配列との相同性を検索した。約1400 bpの塩基配列と、既知の菌種の16S rRNA遺伝子との配列類似性が98.7%より高い場合に当該菌種と同定した [19]。

#### 特異的 PCR

各疣贅物材料については、前項で抽出したDNAを鋳型とし、*H. ovis*、*T. pyogenes*、*Streptococcus* spp.および*Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*)を特異的に増幅する、種特異的または属特異的PCRを既報に従って実施した [2, 9, 14, 20]。使用したプライマーを表2に示す。

### 結果

#### 細菌培養検査

細菌培養検査結果を表1に示す。細菌培養では*Streptococcus* sp.が8症例(36.4%)から分離され最も多くを占めた。次いで*Pseudomonas* sp.4症例(18.1%)、*T. pyogenes*と*Staphylococcus* sp.各3症例(13.6%)、*Corynebacterium* sp.と*Acinetobacter* sp.が各2症例(9.5%)から分離された。その他、*Micrococcus* sp.、*Xanthomonas maltophilia*、*Escherichia coli*、*Enterococcus faecalis*、*Proteus vulgaris*、*Myroides odoratus*、

表1 心内膜炎病畜の情報及び汚贅物の細菌検査結果

No.	月齢	心内膜炎以外の臨床症状		Broad range PCR とシーケンス	種または属特異的PCR		細菌培養		
		肺音 粗励	その他の 病態		<i>H. ovis</i>	<i>T. pyogenes</i> <i>Streptococcus</i> spp.		<i>F. necrophorum</i>	
1	89	○	-	TV, MV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	-	-	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
2	105	○	-	TV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	+	-	<i>Trueperella pyogenes</i>
3	13	○	-	PV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	46	○	○	MV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	+	-	<i>Pasteurella multocida</i>
5	9	-	-	TV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	-	+	分離されず
6	123	-	○	鼻出血 PV, MV, AV	<i>Helcococcus ovis</i>	+	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Myroides odoratus</i>
7	50	○	-	TV	<i>Trueperella pyogenes</i>	-	-	-	<i>Trueperella pyogenes</i>
8	65	○	-	TV	<i>Trueperella pyogenes</i>	-	+	-	<i>Trueperella pyogenes</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Escherichia coli</i>
9	64	○	-	TV, PV, MV	<i>Trueperella pyogenes</i>	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.
10	71	-	-	発熱 TV	<i>Trueperella pyogenes</i>	+	+	-	<i>Streptococcus</i> sp.
11	28	○	-	PV, MV	<i>Trueperella pyogenes</i>	+	+	-	<i>Alcaligenes</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.
12	27	○	-	皮下膿瘍 PV	<i>Trueperella pyogenes</i>	-	+	-	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Achoromobacter xylosoxidans</i>
13	9	-	-	TV	<i>Streptococcus</i> sp.	-	+	-	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus</i> sp.
14	52	-	-	TV	<i>Streptococcus</i> sp.	-	-	+	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus</i> sp.
15	29	○	-	TV	<i>Streptococcus</i> sp.	+	-	+	分離されず
16	48	-	-	放線菌症 PV	<i>Streptococcus</i> sp.	+	-	+	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.
17	57	○	○	PV, MV, AV	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Peptoniphilus indolicus</i>	+	+	+	<i>Micrococcus</i> sp.
18	83	○	○	TV	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+	-	<i>Actinomyces</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
19	35	-	○	下痢 TV	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+	+	<i>Acinetobacter</i> sp.
20	79	○	-	TV	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	-	<i>Xanthomonas maltophilia</i> <i>Streptococcus</i> sp.
21	66	○	-	TV	<i>Alysiella</i> sp.	-	+	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
22	97	-	○	胸壁膿瘍 PV	種の同定に至らず	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

a) TV: 三尖弁, MV: 僧帽弁, PV: 肺動脈弁, AV: 大動脈弁

表2 本研究に用いたプライマーの塩基配列

用途・プライマー名	配列 (5' → 3')	文献
<b>Broad-range PCR</b>		
8UA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	10
1485B	TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC	10
<b>シーケンス反応</b>		
519F	CAG CMG CCG CGG TAA T	新規
519R	ATT ACC GCG GCK GCT G	新規
907F	AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG	新規
<b><i>Helcococcus ovis</i> 特異的PCR</b>		
Hel-1F	ACA CAT GCA AGT TGA ACG A	18
Hel-1R	GCG ATA TCT AAG TGT CAT AAG GT	18
<b><i>Truperella pyogenes</i> 特異的PCR</b>		
ploF	CGA TCC CTC TGG TGT ACT TGC	2
ploR	GCT TGA CAA AAA TCT GGC GTC C	2
<b><i>Streptococcus</i> spp. 特異的PCR</b>		
Str1	GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC	12
Str2	ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG	12
<b><i>Fusobacterium necrophorum</i> 特異的PCR</b>		
TP1	TCT ACG TAT GCC TCA CGG AT	9
TP2	ATC CTC ATC CTC ATA TTC CT	9

*Achoromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp., *Pasteurella* sp., *Actinomyces* sp. が各1症例 (4.8%) から分離された。

### Broad-range PCR とシーケンス解析

Broad-range PCRとシーケンス解析の結果を表1に示す。Broad-range PCRでは検索した22症例全てで陽性反応が認められた。PCR産物のシーケンス解析により同定された菌種としては、*H. ovis*と*T. pyogenes* が最も多く各6症例 (27.3%) から検出された。次いで*Streptococcus* sp.が4症例 (18.2%)、*F. necrophorum* が3症例、*Peptoniphilus indolicus* (*P. indolicus*)、*Pseudomonas* sp.および *Alysiella* sp.が各1症例 (4.6%) から検出された。症例22の疣贅物由来の塩基配列ではシーケンスに複数の波形が出現し解析不能であった。

### 種または属特異的 PCR

22症例の心内膜炎疣贅物を材料とした種または属特異的 PCR の結果を表に示す。22症例中、*H. ovis* 特異的 PCR では 15 症例 (68.2%)、*T. pyogenes* 特異的 PCR では 13 症例 (59.1%)、*Streptococcus* spp. 特異的 PCR では 4 症例

(18.2%)、*F. necrophorum* 特異的 PCR では 3 症例 (13.6%) が陽性を示した。特異的 PCR で 2 種類に陽性を示したものは 22 症例中 9 症例 (40.9%) で、うち *H. ovis* と *T. pyogenes* が 6 症例 (27.3%)、*H. ovis* と *Streptococcus* spp. が 2 症例 (9.1%)、*H. ovis* と *F. necrophorum* が 1 症例 (4.6%) であった。3 種類が陽性を示したものは 2 症例 (9.1%) で、いずれも *H. ovis*、*T. pyogenes* および *F. necrophorum* であった。

### 考察

本研究では、培養に長時間を要する細菌や生化学性状のみによる同定が難しい細菌も含めて、牛の心内膜炎に関与する菌を明らかにすることを目的として、分子生物学的方法を用いて、心内膜炎症例の疣贅物から細菌遺伝子の検出を試みた。なお、細菌検出にあたって、従来法である細菌培養検査を併用したところ、*Streptococcus* sp. が最多 8 症例 (38.1%) で分離され、次いで *Pseudomonas* sp. (19.1%)、*T. pyogenes* (14.3%)、*Staphylococcus* sp. (14.3%) が分離された。これらの細菌は牛の心内膜炎の主要起因菌とされているが [5, 13, 16]、本研究においても分離細菌の多くを占めた。

一方、分子生物学的手法を用いた細菌検索では、22 症例全てで broad-range PCR が陽性を示し、また、ダイレクトシーケンスによるシーケンス解析により 21 症例で細菌の属あるいは種を同定できた。とくに、*H. ovis* は *T. pyogenes* と並び最も優勢に検出された (27.3 %)。さらに、*H. ovis* 特異的 PCR では 22 症例中 15 症例 (68.2 %) が陽性を示した。これらのことから、*H. ovis* が牛の心内膜炎病変形成に関与する主要な菌種の一つであると考えられた。*H. ovis* はカタラーゼ陰性通性嫌気性のグラム陽性球菌で、発育が極めて遅く [20]、培養のみによる検索ではこれまで見逃されてきたと考えられる。本菌は、牛のほか、めん羊、馬、豚の化膿性病変からも分離されており [1, 6, 7, 15, 17, 21]、我が国の広範囲な地域の家畜に分布していると思われる。今回 *H. ovis* が検出された症例ではいずれも他の細菌との混合感染が認められているため、心内膜炎の病態形成における本菌の役割については明確にはできなかった。

分子生物学的手法により *F. necrophorum* および *P. indolicus* が検出された症例は、いずれも細菌培養でこれらの細菌が検出されなかった。*F. necrophorum* と *P. indolicus* は、どちらも偏性嫌気性細菌であり、専用容器以外での保管や輸送等、検体の取扱いが不適切であると培養陰性になることもある [10]。また、治療として抗菌薬が先行投与されている場合にも培養陰性となることがある [12]。*F. necrophorum* は牛の常在菌であり、後大静脈血栓症、肝膿瘍、子牛のジフテリー、趾間腐乱等の化膿性疾患の原因菌として知られている [3]。一方、*P. indolicus* はグラム陽性偏性嫌気性球菌で、人の皮膚、消化管、産道の細菌叢を構成し、眼科領域や皮膚軟部組織感染症で分離される [8, 18]。これまで医療および獣医療分野において、心内膜炎材料から *P. indolicus* が分離・検出されたことはなく、牛における病原性は不明である。

*T. pyogenes* と *Streptococcus* sp. は好気培養によって比較的容易に分離できる細菌であるが、今回培養陰性で PCR で検出されたものは、*T. pyogenes* で 12 検体、*Streptococcus* sp. で 2 検体であった。細菌培養では生菌しか分離できないのに対し、PCR では生菌と死菌両方の DNA を検出可能である、今回培養陰性となった検体

では、細菌検査に提出するまでの時間や材料の保管方法に問題があった可能性も考えられた。一方、細菌培養により分離されたにもかかわらず特異的 PCR が陰性であった検体が *T. pyogenes* (No.7) と *Streptococcus* sp. (No.8, 9, 10, 12, 13 および 20) において認められた。これは分離菌の遺伝子性状の違いにより、用いたプライマーセットで増幅されなかった可能性が考えられたが、今回は分離株の塩基配列を決定しておらず詳細は分からなかった。

Broad-range PCR 陽性を示したが、塩基配列が決定できなかったものが 1 症例あったが、その原因はシーケンス結果に複数の波形が重なったためであり、複数種の細菌遺伝子が増幅されたことが考えられた。今回の結果から、疣贅物形成には複数の細菌が関与することが明らかであり、broad-range PCR で複数の細菌が同時に増幅されることは十分生じうるとされるため、クローニングまたは 16S rRNA メタゲノム解析を用いた塩基配列決定も必要と考えられる。なお、今回 broad-range PCR とシーケンスにより、単独の菌種だけが優勢に増幅された原因については、材料中の細菌の DNA 量の差が反映される、あるいは菌種により増幅効率が異なることも考えられたが、確定はできなかった。

今回の検索結果から、牛の心内膜炎に関与する細菌として、従来から報告されている *Streptococcus* sp.、*Pseudomonas* sp.、*T. pyogenes*、*Staphylococcus* sp. に加えて、*H. ovis*、*F. necrophorum* および *P. indolicus* が関与している可能性が示唆された。とくに、*H. ovis* は高率に検出されており、今後その病原性を検討する必要がある。また、心内膜炎等に関与する細菌の検索には、培養だけでなく PCR やシーケンス解析の併用が有用であることが確認された。

## 引用文献

- [1] Colins, M.D., Falsen, E., Foster, G., Monasterio, L.R., Dominguez, L., Fernandez-Garazabal, J.F. 1999. *Helcococcus ovis* sp. nov., a gram-positive organism from sheep. *Int. J. Syst. Bac.* 49: 1429-1432.
- [2] Hijazin, M., Ulbegi-Mohyla, H, Alber, J., Lämmler, C., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., Zschöck, M. 2011.

- Molecular identification and further characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine mastitis and from various other origins, *J. Dairy. Sci.* 94: 1813-1819.
- [3] 菊池直哉. 2013. バクテロイデス科と感染症, 獣医微生物学 第3版. (関崎 勉, 高井伸二, 堀本泰介, 望月雅美 編). 文永堂出版, 東京, pp 91-93.
- [4] 北川 均. 2014. 細菌性心内膜炎. 獣医内科学 第2版 大動物編. (日本獣医内科学アカデミー 編). 文永堂出版, 東京, pp 52-53.
- [5] 黒澤 隆. 2002. 心内膜炎. 主要症状を基礎にした牛の臨床. (前出吉光, 小岩政照 監修) DAIRYMAN, 北海道, pp 86-91.
- [6] Kutzer, P., Schulze, C., Engelhardt, A., Wieler, L.H., Nordhoff, M. 2008. *Helcococcus ovis*, an emerging pathogen in bovine valvular endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3291-3295.
- [7] 森本和秀, 久保田泰徳, 藤田敦子, 川本千代実, 茨木義弘. 2006. *Helcococcus ovis* が分離された牛の疣贅性心内膜炎の1症例. 日獣会誌. 59. 325-328.
- [8] Murdoch, D. A. 1998. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 81-120.
- [9] Narongwanichgarn, W., Naoaki, M., Jin, J. H., Amoako, K. K., Kawaguchi, E., Shinjo, T., Haga, T., Goto, Y. 2003. Specific detection and differentiation of two subspecies of *Fusobacterium necrophorum* by PCR. *Vet. Microbiol.* 91: 183-195.
- [10] 小栗豊子. 2011. 微生物検査材料の採取と保存. 臨床微生物検査ハンドブック 第4版. (小栗豊子編集) 三輪書店, 東京, pp 35-43.
- [11] 大楠清文, 江崎孝行. 2008. 感染症診断におけるシーケンス解析技術の適応. 日本臨床微生物誌. 18: 163-176.
- [12] 大楠清文, 江崎孝行. 2013. 遺伝子解析技術を活用した感染症診断の実践. 小児感染免疫. 25: 55-62.
- [13] Peek, S. F., McGuirk, S. M. 2008. Endocarditis. *Diseases of dairy cattle* 3<sup>rd</sup> ed. (Dievrs, T. J. and Peek, S. F. eds), Saunders Elsevier, St. Louis, 60-64.
- [14] Picard, F. J., Ke, D., Boudreau, D. K., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette, M., Roy, P. H., Bergeron, M. G. 2004. Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 Streptococcal species, *J. Clin. Microbiol.* 42: 3686-3695
- [15] Post, K.W., Rushton, S. D., Billington, S. J. 2003. Valvular endocarditis associated with *Helcococcus ovis* infection in a bovine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 473-475.
- [16] Reef, V. B., McGuirk, S. M. 2015. Valvular Heart Disease. *Large Animal Internal Medicine* 5<sup>th</sup> ed. (Smith, B. P. ed.), Mosby Elsevier, St. Louis, 436-441.
- [17] Rothschild, C. M., Oaks, J. L., Schaupp, J. K., Rurangirwa, F. R., Sellon, D. C., Hines, M. T. *Helcococcus ovis* isolated from a pulmonary abscess in a horse. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2224- 2226.
- [18] Song, Y., Liu, C., Finegold, S. M. 2007. *Peptoniphilus gorbachii* sp. nov., *Peptoniphilus olseni* sp. nov. and *Anaerococcus murdochii* sp. nov. isolated from clinical specimens of human origin, *J. Clin. Microbiol.* 45: 1746-1752.
- [19] Stackebrandt, E., Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, *Microbiol. Today.* 4: 152-155.
- [20] 吉田桂子, 古川一郎, 相川勝弘, 荒木美緒, 横田宏一郎, 廣井恵津子, 佐多辰, 松阪龍雄. 2015. 牛および豚の疣贅性心内膜炎から分離された *Helcococcus ovis* の性状および迅速・特異的同定法としてのPCR法の開発, 日獣会誌. 68: 523-529.
- [21] Zhang, Y., Cui, J., Parkinson, A., Hayes, J. Ott, K., Byrum, B. 2009. Isolation of *Helcococcus ovis* from sheep with pleuritis and bronchopneumonia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 164-166.

## Molecular survey of bacteria associated with bovine endocarditis

Mako Morikawa<sup>1)\*</sup>, Ken-ichi Watanabe<sup>1)</sup>, Yoshiyasu Kobayashi<sup>1)</sup>, Hisashi Inokuma<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Department of Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Present address

\*: Aichi Prefecture Agricultural Mutual Aid Association 165 Miyawaki, Baba-machi, Toyokawa, Aichi 442-0811, Japan

\*\* : Veterinary Medical Center, Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, 1-2-1 Yayoi, Bukyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Corresponding to: Hisashi Inokuma

Veterinary Medical Center, Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo, 1-2-1 Yayoi, Bukyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

TEL: 03-5841-5421, FAX: 03-5841-8012, E-mail: ainokuma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

### **[Abstract]**

In order to identify bacteria involved in bovine endocarditis, vegetations from endocarditis in Holstein cows were analyzed using molecular biology techniques. A combination of broad-range PCR and sequence analysis for the 16S rRNA gene, as well as aerobic and anaerobic bacterial cultures, were used to detect and identify bacteria in vegetations obtained from 22 cases of endocarditis confirmed at autopsy. *Streptococcus* spp. was the most frequently isolated bacteria from cultures, followed by *Pseudomonas* spp., *Truperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp, and *Acinetobacter* spp. *Helcococcus ovis* (*H. ovis*), which was not isolated from cultures, was detected in 6 cases (27.3%) by broad-range PCR and sequence analysis. *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), *Peptoniphilus indolicus* (*P. indolicus*), and *Pseudomonas* spp. were also detected by broad-range PCR and sequence analysis. Species- or genus-specific PCR revealed that 15 cases (68.1%) were positive for *H. ovis*, 13 cases (59.1%) for *T. pyogenes*, 4 cases (18.2%) for *Streptococcus* spp., and 3 cases (13.6%) for *F. necrophorum*. Our findings suggest that, in addition to previously reported bacteria, *H. ovis*, *F. necrophorum*, and *P. indolicus* may be involved in the formation of endocarditis lesions in cattle.

**Keywords:** endocarditis, etiology, PCR, sequence