

牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離された *Helcococcus ovis* の性状及び迅速・特異的 同定法としての PCR 法の開発

吉田桂子^{1)†} 古川一郎²⁾ 相川勝弘²⁾ 荒木美緒¹⁾ 横田宏一郎³⁾
廣井恵津子¹⁾ 佐多 辰¹⁾ 松阪龍雄¹⁾

- 1) 神奈川県食肉衛生検査所 (〒243-0022 厚木市酒井 892-1)
2) 神奈川県衛生研究所 (〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1)
3) 神奈川県平塚保健福祉事務所 (〒254-0051 平塚市豊原町 6-21)

(2012年3月29日受付・2015年5月25日受理)

要 約

神奈川県食肉衛生検査所において牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離され、簡易同定キットで *Gemella* 属, *Granulicatella* 属あるいはピリドキサル依存性グラム陽性球菌と同定された17株の16S rDNAの塩基配列を解析したところ、すべてが *Helcococcus ovis* (*H. ovis*) と同定された。これより本菌は牛ばかりでなく豚の疣贅性心内膜炎の原因菌となることが示唆された。また、*H. ovis* を分離した牛の疣贅部の免疫染色では、疣贅部に *H. ovis* の存在を確認することができた。さらに、2組のプライマーを用いた *H. ovis* に特異的な PCR 法を開発し、上記の17株及び他のグラム陽性球菌27株を用いて検討したところ、検討した17株は特異的に *H. ovis* と同定された。これより、本 PCR 法は *H. ovis* の迅速同定法として有用であると考えられた。

——キーワード： *Helcococcus ovis*, PCR 法, 迅速同定法, 豚, 疣贅性心内膜炎。

-----日獣会誌 68, 523~529 (2015)

牛の疣贅性心内膜炎からは *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 等が、豚からは *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* 等の細菌が分離される [1]。近年、*Helcococcus ovis* (*H. ovis*) が、牛の疣贅性心内膜炎から分離されたことから、その原因菌の一つとして注目されている [2, 3]。 *H. ovis* は、1999年にめん羊の膿瘍から初めて分離された通性嫌気性のグラム陽性球菌で [4]、*Staphylococcus aureus* 周囲の衛星現象、ピリドキサル依存性の特徴を有している [2]。しかしながら API 20 Strep 等の簡易同定キットを使用した場合、*Granulicatella adiacens* [5] あるいは *Gemella morbillorum* と同定されるため [6]、本菌の同定には慎重な配慮が必要とされる。

現在、*H. ovis* の同定には、栄養要求性を考慮した培

養、生化学性状、16S rRNA をコードする塩基配列 (16S rDNA) の解析あるいは免疫染色等が用いられるが、これらを用いた同定には数日間を要することから、と畜検査に適した本菌の迅速同定法の開発が求められている。

今回、牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離され、過去にピリドキサル依存性グラム陽性球菌、*Granulicatella adiacens* あるいは *Gemella morbillorum* として同定され、保存されていた菌株について生化学性状を再検討するとともに、その16S rDNAの塩基配列を解析した。さらに、*H. ovis* の迅速同定を目的として、*H. ovis* に特異的な PCR 法を今回開発したので、その有用性について検討した。また、*H. ovis* が分離された牛の疣贅部について免疫染色を実施し、その病変形成における *H. ovis* の関与の可能性を検討した。

† 連絡責任者(現所属)：吉田桂子 (神奈川県厚木保健福祉事務所)

〒243-0004 厚木市水引 2-3-1 ☎ 046-224-1111 FAX 046-225-4146
E-mail : yoshida.awm@pref.kanagawa.jp

表1 牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離された 17 株の簡易同定キットによる同定菌種と生化学性状

株 (No.)	保存菌名	由来 (産地, 分離年)	簡易同定キットによる 同定菌種		ピリド キサル ル依存 性	衛星* 現象	CBPA 培地 での発育			16S rDNA 相同性 (%)**
			API 20 Strep	rapid ID 32 STREP			好気	嫌気	5% CO ₂	
1	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (不明, 1998 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
2	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (不明, 1999 年)	<i>G. morbillorum</i>	NI	-	-	+	+	+	99%
3	<i>G. morbillorum</i>	牛 (神奈川県, 2001 年)	NI	NI	-	-	+	+	+	99%
4	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (静岡県, 2003 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
5	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (山梨県, 2003 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
6	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (神奈川県, 2003 年)	<i>G. adiacens</i>	NI	+	+	+	+	+	99%
7	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (神奈川県, 2003 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
8	<i>G. morbillorum</i>	牛 (静岡県, 2003 年)	<i>G. adiacens</i>	NI	+	+	+	+	+	99%
9	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (神奈川県, 2003 年)	<i>G. adiacens</i>	NI	+	+	+	+	+	99%
10	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (静岡県, 2003 年)	NI	<i>G. vaginalis</i>	+	+	+	+	+	99%
11	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (山梨県, 2003 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
12	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (静岡県, 2004 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
13	<i>G. morbillorum</i>	牛 (静岡県, 2004 年)	NI	<i>G. vaginalis</i>	+	+	+	+	+	99%
14	ピリドキサル依存性グラム陽性球菌	牛 (神奈川県, 2009 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
15	<i>G. morbillorum</i>	豚 (愛知県, 2005 年)	<i>A. urinae</i>	NI	+	+	+	+	+	99%
16	<i>G. morbillorum</i>	豚 (千葉県, 2005 年)	NI	NI	+	+	+	+	+	99%
17	<i>G. adiacens</i>	豚 (茨城県, 2006 年)	NI	NI	+	+	-	+	+	99%

+ : 陽性 - : 陰性

G. morbillorum : *Gemella morbillorum* *G. adiacens* : *Granulicatella adiacens* *A. urinae* : *Aerococcus urinae**G. vaginalis* : *Gardnerella vaginalis* NI (Not identified) : 同定不能* *Staphylococcus aureus* ATCC6538P 株 ** *Helcococcus ovis* CCUG 37441 株

材料及び方法

供試菌 : 1998 年 4 月 ~ 2009 年 4 月に神奈川県食肉衛生検査所において牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離され、ピリドキサル依存性グラム陽性球菌 (11 株), *Gemella morbillorum* (5 株) 及び *Granulicatella adiacens* (1 株) と同定され、保存されていた 17 株を使用した (表 1)。

細菌学的検査 : 保存菌株はグラム染色後、カタラーゼ試験及びチトクローム試験用濾紙 (日水製薬 (株), 東京) を用いたオキシダーゼ試験を行った。さらに、

Kutzer ら [2] の方法に準じたバンコマイシン感受性試験 (BD センシ・ディスク・バンコマイシン 30, 日本ベクトン・ディッキンソン (株), 東京), ピリドキサル塩酸塩添加コロンビアヒツジ血液寒天培地 (CBPA) (Columbia agar base, Merck, Germany・ヒツジ脱繊維血液, (株)日本バイオテスト研究所, 東京・pyridoxal HCl, CALBIOCHEM, Germany) を用いたピリドキサル依存性試験及び好気, 嫌気 (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学 (株), 東京), 5% CO₂ 濃度 (アネロパック・CO₂, 三菱ガス化学 (株), 東京) 条件下における培養試験を実施するとともに *Staphylococcus aureus*

表2 牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離された17株のapi ZYMにおける性状

生化学性状	株 No.																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
アルカリフォスファターゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
エステラーゼ (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
エステラーゼリパーゼ (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
リパーゼ (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ロイシンアリルアミダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
バリンアリルアミダーゼ	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
シスチンアリルアミダーゼ	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
トリブシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-キモトリブシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
酸性フォスファターゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ナフトール-AS-BI- フォスフォヒドロラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-ガラクトシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-ガラクトシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-グルクロニダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-グルコシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-グルコシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
α-マンノシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-フコシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : 陽性 - : 陰性

ATCC6538P (SA) 及び当所で保存している *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus suis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus bovis*, *Kocuria rhizophila* を用いた衛星現象の有無を検討した. さらに, 簡易同定キット (API 20 Strep 及び rapid ID 32 STREP, シスメックス・バイオメリユー(株), 東京) 及び酵素活性試験用キット (api ZYM, シスメックス・バイオメリユー(株), 東京) を用いて各種生化学性状を比較検討した.

遺伝学的検査: PCR 法に用いた各菌の鋳型 DNA は, すべてアルカリ熱抽出法により行った. すなわち 50 μl の精製水に菌体を浮遊させ, 50 μl の 25mM NaOH を加えて 100°C で 10 分間加熱後, 8 μl の 1M Tris-HCl (pH7.0, シグマアルドリッチジャパン合同(株), 東京) を用いて中和し, 13,000rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清を鋳型 DNA とした.

供試菌株の 16S rDNA 領域の上流部約 500bp について, ユニバーサルプライマー 27f (5'-AGAGTTTGATCTM TGGCTC-3') 及び 519r (5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3') を用いた PCR 法で DNA を増幅した [7, 8]. 得られた PCR 産物を精製後 (QIAquick PCR Purification Kit, (株)キアゲン, 東京), ダイターミネーター法 (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems, 東京) により塩基配列を解析した. 得られた塩基配列は, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により GeneBank

表3 *H. ovis* 検出用 PCR の特異性の検討に使用したグラム陽性球菌

No.	菌種	由来	株数
1	<i>Streptococcus suis</i>	豚の分離菌	2
2	<i>Streptococcus bovis</i>	牛の分離菌	2
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	牛, 豚, 人の分離菌及び ATCC6538P	7
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	1
5	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	豚の分離菌	2
6	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	牛の分離菌	2
7	<i>Streptococcus hyicus</i>	豚の分離菌	1
8	<i>Streptococcus intermedius</i>	牛及び豚の分離菌	2
9	<i>Streptococcus porcinus</i>	豚の分離菌	2
10	<i>Streptococcus acidominimus</i>	豚の分離菌	1
11	<i>Streptococcus pyogenes</i>	人の分離菌	1
12	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	豚の分離菌	1
13	<i>Enterococcus faecium</i>	人の分離菌	3
合計			27

に登録された *H. ovis* の塩基配列と比較し, その相同性を確認した.

***H. ovis* 特異的 PCR 法:** *H. ovis* 基準株 CCUG37441 の 16S rDNA の塩基配列 (Genbank accession No. Y16279) を基に, *H. ovis* 検出用として He1-1F/R (Forward : 5'-ACACATGCAAGTTGAACGA-3', Reverse : 5'-GCGATATCTAAGTGTGTCATAAGGT-3',

表4 疣贅性心内膜炎から高頻度に検出される細菌等による衛星現象

菌株 No.	<i>Sta. aureus</i>	<i>Sta. epidermidis</i>	<i>Str. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>Str. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>Str. suis</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Str. bovis</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ : 衛星現象陽性

159bp), *H. ovis* の 16S rDNA の塩基配列確認用として Hel-2F/R (Forward : 5'-CACATGCAAGTTGAAC GAGA-3', Reverse : 5'-CAAGTAATCCAGTATC TGAACCT-3', 591bp) の 2 組のプライマーを設計した. PCR 反応液は, 20pmol のプライマーを各 0.2 μ l (終濃度 : 0.2 μ M), 10X Ex Taq buffer (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., 大津, 以下 TaKaRa) を 2 μ l (Mg²⁺ 終濃度 : 2mM), dNTP mixture (TaKaRa) を 1.6 μ l (dNTP 終濃度 : 0.2mM), TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を 0.5U, 鋳型 DNA を 2 μ l, さらに精製水を加えて反応液量を 20 μ l とした. 反応条件は, 熱変性 94°C, 30 秒間, アニール 60°C, 1 分間, 伸張反応 72°C, 1 分間, 反応サイクルは 35 回とした. 増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動法により分析した.

本 PCR 法の特異性については, 神奈川県食肉衛生検査所及び神奈川県衛生研究所に保存されていたグラム陽性球菌 13 菌種 27 株 (表 3) を用いて検討した.

病理学的検査 : 2011 年 6 月及び 9 月に *H. ovis* が分離された牛の疣贅部 (2 検体) を検体とした. 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び免疫染色を行った. 免疫染色の一次抗体は抗 *H. ovis* 家兎血清 (広島県西部家畜健所衛生所より分与) [3] を用い, 二次抗体及びストレプトアビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体法による染色は, 市販のキット (ヒストファイン SAB-PO[®] キット, ㈱ニチレイ, 東京) を用いた.

成 績

細菌学的検査 : 今回検討した 17 株は, すべて通性嫌気性グラム陽性の単球菌あるいは短連鎖球菌であった. 供試菌株の主な生化学性状は, カタラーゼ陰性, オキシダーゼ陰性, バンコマイシン感受性であった. API 20 Strep による菌種同定では, *Granulicatella adiacens* (3 株), *Gemella morbillorum* (1 株), *Aerococcus urinae* (1 株) となり, 12 株が同定不能であった. さらに, Rapid ID 32 strep では, 2 株のみが *Gardnerella vaginalis* と同定され, その他はすべて同定不能となり, 両キットの結果が一致した株はなかった (表 1). また, api ZYM による 17 株の生化学性状は, ほぼ共通したパターンを示した (表 2).

CBPA 培地の発育試験では, 株 No. 17 のみ好気条件下の 72 時間培養でも発育が認められなかったが, その他の株はすべて 48 時間までに発育し, 5% CO₂ 培養で最も旺盛な発育を示した. SA を用いた衛星現象及びピリドキサル依存性は, 17 株中 15 株に認められたが, 株 No. 2 及び株 No. 3 では確認されなかった (表 1). また, と畜検査において疣贅性心内膜炎から高頻度に検出される細菌等に対する衛星現象は, *Str. bovis* と No. 4 及び No. 17 の 2 株の間には認められなかったものの, 他の 7 菌種と今回検討した 17 株の間において確認された (表 4).

DNA シーケンス : 供試菌 17 株の 16S rDNA の塩基配列すべてが *H. ovis* 基準株 CCUG3744 (No. Y16279) と 99% 以上の相同性を示した (表 1).

***H. ovis* 特異的 PCR 法 :** 今回開発した PCR 法では,

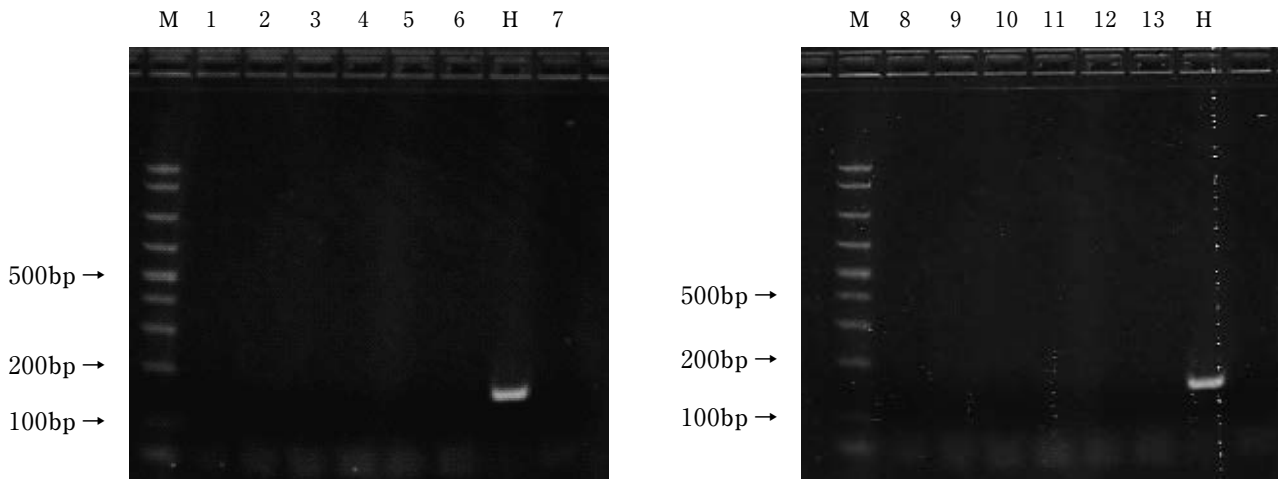


図 1A Hel-1F/R を使用した PCR による *H. ovis* の同定

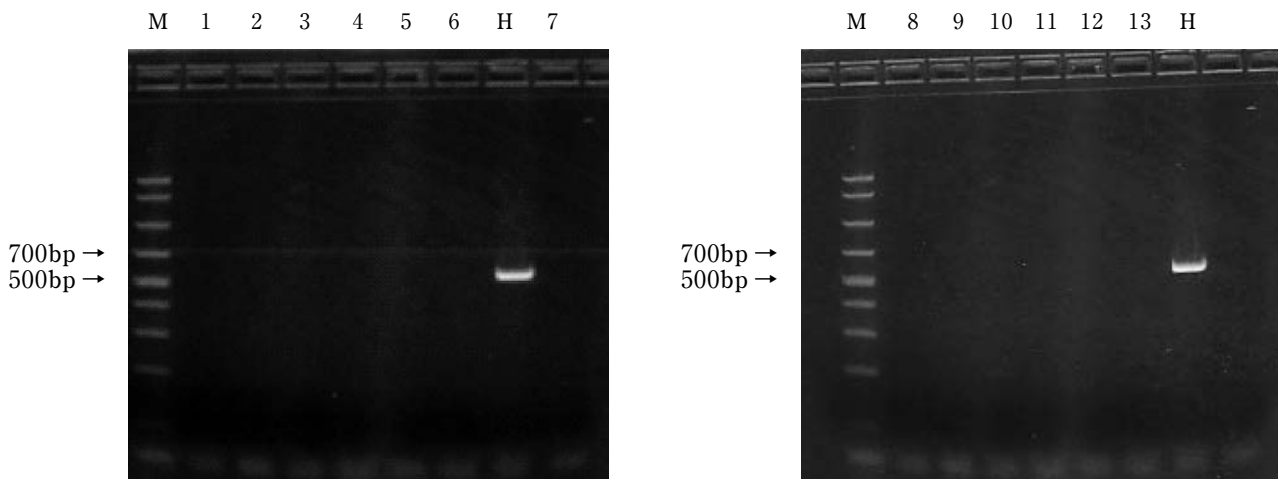


図 1B Hel-2F/R を使用した PCR による *H. ovis* の同定

M: 分子量マーカー, 1: *Streptococcus suis*, 2: *Streptococcus bovis*, 3: *Staphylococcus aureus*,
 4: *Staphylococcus epidermidis*, 5: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*,
 6: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, 7: *Streptococcus hyicus*, 8: *Streptococcus intermedius*,
 9: *Streptococcus porcinus*, 10: *Streptococcus acidominimus*, 11: *Streptococcus pyogenes*,
 12: *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, 13: *Enterococcus faecium*, H: *Helcococcus ovis*

対象とした 17 株すべてにおいて 159bp と 591bp の位置に *H. ovis* に特異的なバンドが認められたのに対し、他のグラム陽性球菌 13 菌種 27 株では、特異的なバンドは認められなかった (図 1A, 1B)。

病理学的検査: HE 染色では、壊死した炎症細胞とともにマクロファージに貪食された球菌が認められた。免疫染色では、HE 染色と同様の部位に抗 *H. ovis* 免疫血清に対して陽性反応を示す球菌が認められた。

考 察

牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離され、*Gemella morbillorum* あるいは *Granulicatella adiacens* として保存されていた 17 株は、16S rDNA 領域の塩基配列解

析において *H. ovis* の基準株と 99% 以上の相同性を示した。また、生化学性状も既報の *H. ovis* のもの [2] とほぼ一致していたことから、今回対象とした 17 株はすべて *H. ovis* と同定された。Collins ら [4] は、2003 年に牛の疣贅性心内膜炎から *H. ovis* を初めて分離しているが、本研究により、1998 年にはわが国にも *H. ovis* を原因とする牛の疣贅性心内膜炎が存在していたことが明らかとなった。

これまでに *H. ovis* は、めん羊の胸膜炎・気管支肺炎 [9]、牛の疣贅性心内膜炎、肺膿瘍 [2, 3] 及び馬の肺膿瘍 [5] から分離されている。今回、豚の疣贅性心内膜炎から分離された菌も *H. ovis* と同定されたことから、本菌は牛のみならず豚の疣贅性心内膜炎の原因菌となる

ことが示唆された。

免疫染色においても牛の疣贅部内に *H. ovis* の存在を確認できたことから、本菌が疣贅性心内膜炎の原因菌となることが確認された。今後は豚の疣贅性心内膜炎についても同様な検討を行い、牛と豚の本病変形成における相違点など詳細な検討が必要であると思われた。

国内では *H. ovis* は、広島県 [3] で牛の疣贅性心内膜炎から分離されているのみである。今回、当所で *H. ovis* が分離された動物は、神奈川、山梨、静岡、愛知、千葉、茨城から搬入されていたことから、本菌は広範な地域に分布しており、牛及び豚の疣贅性心内膜炎の原因となっているものと思われた。

現在、当所における疣贅性心内膜炎の検査では、トリプテケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン(株)）を使用した好気培養及び ABHK 寒天培地（日水製薬(株)）を使用した嫌気培養を行っているが、*H. ovis* は ABHK 寒天培地の嫌気培養でのみ微小コロニーとして発育する。一方、好気培養では SA 等による衛星現象が確認されたことから、共生菌が存在した場合には他の培養条件でもコロニーを形成するものと思われる。そのため、*H. ovis* であったにもかかわらず過去に同定不能または他の嫌気性球菌として処理されていた可能性がある。

H. ovis は *Staphylococcus aureus* による衛星現象とピリドキサル依存性がおもな特徴とされているが、これらの現象は継代を続けると消失することが報告されている [2]。今回、供試した 17 株中 2 株（株 No. 2, No. 3）においても衛星現象及びピリドキサル依存性は認められなかった。しかしながら、16S rDNA の塩基配列解析及び今回開発した *H. ovis* 特異的 PCR 法では *H. ovis* と同定されたことから、継代培養により生化学性状が変異した可能性も考えられた。

16S rDNA の塩基配列解析あるいは免疫染色による *H. ovis* の同定には、おおむね 1～2 日間を要する。今回、本菌の迅速同定法として 2 組のプライマーを用いた *H. ovis* に特異的な PCR 法を開発し、検討したところ、いずれも約 4 時間程度で本菌を特異的に同定することができた。*H. ovis* は市販の細菌同定キットでは菌種同定

ができないため、今回開発した PCR 法は、本菌の迅速かつ特異的な同定法として有用であると考えられた。また、過去に牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離された未同定の株を精査することで、わが国の牛や豚における心内膜炎の重要な起因菌としての *H. ovis* の意義が明らかになるものと考えられる。

最後に抗 *H. ovis* 家兔免疫血清を分与していただいた広島県西部家畜保健衛生所病性鑑定部の皆様に深謝する。

引用文献

- [1] 宇根有美：心内膜炎，動物病理学各論，日本獣医病理学会編，第 2 版，11-13，文永堂出版，東京（2010）
- [2] Kutzer P, Schulze C, Engelhardt A, Wieler LH, Nordhoff M : *Helcococcus ovis*, an emerging pathogen in bovine valvular endocarditis, J Clin Microbiol, 46, 3291-3295 (2008)
- [3] 森本和秀, 久保田泰徳, 藤田敦子, 川本千代美, 茨木義弘 : *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 (2006)
- [4] Collins MD, Falsen E, Foster G, Monasterio LR, Dominguez J, Fernandez-Garazabal JF : *Helcococcus ovis* sp. nov, a Gram-positive organism from sheep, Int J Syst Bac, 49, 1429-1432 (1999)
- [5] Rothschild CM, Oaks JL, Schaupp JK, Rurangirwa FR, Sellon DC, Hines MT : *Helcococcus ovis* isolated from a pulmonary abscess in a horse, J Clin Microbiol, 42, 2224-2226 (2004)
- [6] 相川勝弘, 小沢由美, 久島昌平, 沢谷広志, 阿部矩久, 平田 清 : 牛の疣状心内膜炎 7 例から分離されたビタミン B₆ 依存性レンサ球菌, 食品衛生研究, 43, 47-54 (1993)
- [7] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG : Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, Appl Environ Microbiol, 64, 795-799 (1998)
- [8] Lane DJ : 16S/23S rRNA sequencing, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Stackebrandt E, et al eds, 115-175, John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom (1991)
- [9] Zhang Y, Cui J, Parkinson A, Hayes J, Ott K, Byrum B : Isolation of *Helcococcus ovis* from sheep with pleuritis and bronchopneumonia, J Vet Diagn Invest, 21, 164-166 (2009)

Characterization of *Helcococcus ovis* Isolated from Bovine and Swine Valvular
Endocarditis and Development of PCR for Rapid and Specific
Identification of the Organism

Keiko YOSHIDA^{1)†}, Ichiro FURUKAWA²⁾, Katsuhiko AIKAWA²⁾, Mio ARAKI¹⁾,
Koichiro YOKOTA³⁾, Etsuko HIROI¹⁾, Shin SATA¹⁾ and Tatsuo MATSUZAKA¹⁾

- 1) *Meat Inspection Station, Kanagawa Prefectural Government, 892-1 Sakai, Atsugi-shi, 243-0022, Japan*
- 2) *Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki-shi, 253-0087, Japan*
- 3) *Hiratsuka Public Health and Welfare Center, 6-21 Toyoharacho, Hiratsuka-shi, 254-0051, Japan*

SUMMARY

At the Meat Inspection Station, Kanagawa Prefectural Government, 17 strains isolated from bovine and swine valvular endocarditis previously identified as *Gemella*, *Granulicatella* or pyridoxal-dependent Gram-positive coccus by commercial identification kits, were all identified as *Helcococcus ovis* (*H. ovis*) by a sequence analysis of the 16S rDNA. The data indicates that *H. ovis* may therefore cause not only bovine valvular endocarditis, but also swine valvular endocarditis. Furthermore, *H. ovis* was also detected by immunostaining in the warts from which the organism had been isolated. In addition, we developed *H. ovis* specific PCR, and all the 17 strains examined were specifically identified as *H. ovis* and discriminated from 27 other strains of gram-positive cocci. This PCR method is therefore considered to be a useful tool for the rapid identification of *H. ovis*.

— Key words : *Helcococcus ovis*, PCR, rapid identification, swine, valvular endocarditis.

† Correspondence to (Present address) : Keiko YOSHIDA (Atsugi Public Health and Welfare Center)

2-3-1 Mizuhiki, Atsugi-shi, 243-0004, Japan

TEL 046-224-1111 FAX 046-225-4146 E-mail : yoshida.awm@pref.kanagawa.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 523 ~ 529 (2015)
