

沖縄県における子牛下痢由来腸管毒素原性大腸菌と 志賀毒素産生大腸菌の薬剤耐性と耐性遺伝子

又 吉 正 直[†]

沖縄県八重山家畜保健衛生所 (〒907-0022 石垣市大川99)

(2009年9月28日受付・2010年3月30日受理)

要 約

1996年～2009年に沖縄県全域の27頭の子牛下痢由来の腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 14株と志賀毒素産生大腸菌 (STEC) 14株の合計28株について12種類の薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子の保有状況を調べた。ETECの薬剤耐性パターンはABPC-SM-KM-OTC-CP-NA (1株), ABPC-SM-OTC-CP-NA-ST (1株), ABPC-SM-OTC-CP-ST (6株), SM-KM-OTC-NA (1株) およびSM-OTC-CP-ST (5株), STECの薬剤耐性パターンはABPC-SM-KM-OTC (2株), ABPC-SM-OTC-ST (1株), SM-GM-ST (1株) およびSM-OTC (6株) であった。耐性遺伝子型ではETECは6種類, STECは8種類に型別された。本調査により, 薬剤耐性パターンが同一でも薬剤耐性遺伝子型が異なった株が存在することが明らかになった。

—キーワード: 薬剤耐性遺伝子, 腸管毒素原性大腸菌, 志賀毒素産生大腸菌。

----- 日獣会誌 63, 620～624 (2010)

腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*: ETEC) による子牛の下痢は, 7日齢以内に好発し, 耐熱性エンテロトキシンによる重篤な脱水により急激な経過で損耗するきわめて死亡率の高い疾病である [1-2]。また, 志賀毒素産生大腸菌 (*Shigatoxin-producing Escherichia coli*: STEC) に属する血清型 O26 および O111 大腸菌は, 幼齢期の子牛に出血性腸炎や下痢をもたらす [2-4]。牛や豚の ETEC による下痢はワクチン投与による予防対策がとられているが, 発症した場合は抗菌剤が使用されることが多い。また, STEC による下痢は ETEC と異なりワクチンがなく, 発症日齢も幅広いことから抗菌剤による治療が重要となっている。このため, ETEC と STEC の薬剤耐性株の分布状況や薬剤耐性を把握することは, 大腸菌症対策に有用であると考えられる。今回, 沖縄県全域で分離された ETEC 株と STEC 株について抗菌剤に対する耐性表現型および耐性遺伝子型について解析したので報告する。

材 料 お よ び 方 法

供試菌株: 1996年から2009年までに沖縄県内の9市町村, 21農場由来の27頭の黒毛和種において下痢を呈した子牛 (2～31日齢) の直腸便から分離した ETEC

14頭由来14株および STEC 13頭由来14株 (O26: 10株, O111: 4株) の合計27頭由来28株を用いた。また, いずれの子牛においても, 材料採取に至るまでの期間, 治療を目的とした抗菌薬の投与は行われなかった。

供試菌株の病原因子検出: ETEC 株の線毛抗原 F5 (K99) の検出は腸管毒素原性大腸菌線毛抗血清 (デンカ生研株, 東京) を用い, スライド凝集反応で調べた。大腸菌耐熱性エンテロトキシン (ST) および STEC 株のベロトキシン産生性は細菌毒素検出キット (コリスト EIA 「生研」 (デンカ生研株, 東京) および VTEC-RPLA 「生研」 (デンカ生研株, 東京) を用いて調べた。

供試菌株の病原遺伝子検査: ETEC 株の F5 (K99) 遺伝子 [5] および耐熱性毒素遺伝子 *st I* [6] の保有の確認は既報により PCR で行った。STEC 株の *stx*₁, *stx*₂ および *eae* の検出は既報 [7] により PCR で行った。

供試菌株の血清型別: O 群血清型別および H 血清型別は病原性大腸菌免疫血清 (デンカ生研株, 東京) を用いた。

薬剤感受性試験: 臨床検査標準委員会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準 [8] に準じたメーカーの使用説明書に基づき行った。供試薬剤はアンピシリン (ABPC 10 μ g), ストレプトマイシン (SM 10 μ g),

[†] 連絡責任者: 又吉正直 (沖縄県家畜衛生試験場)

〒900-0024 那覇市古波蔵112 ☎098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail: matayoma@pref.okinawa.lg.jp

表1 子牛下痢由来ETEC・STECの耐性パターンと耐性遺伝子保有状況

| 区分 | 耐性パターン | 耐性遺伝子 | 分離年 | 農場 | 菌株No. | 株数(%) | 血清型(株数) | |
|--------------|---|---|---|-----------|----------|--------------|--------------|--------------|
| ETEC | ABPC-SM-KM-OTC-CP-NA | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> | 1996年 | A | 1 | 1 (7.1) | ONT (1) | |
| | ABPC-SM-OTC-CP-NA-ST | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> | 2005年 | D | 9 | 1 (7.1) | ONT (1) | |
| | ABPC-SM-OTC-CP-ST | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> | 2002年 | B | 4, 5, 8 | 3 (21.4) | OUT (3) | |
| | | | | | 3, 6 | 2 (14.3) | OUT (2) | |
| | | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> | 2009年 | H | 14 | 1 (7.1) | OUT (1) | |
| | SM-KM-OTC-NA | <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>tetB</i> | 1996年 | A | 2 | 1 (7.1) | OUT (1) | |
| SM-OTC-CP-ST | <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> | 2002年 | C, F, G | 7, 12, 13 | 3 (21.4) | OUT (3) | | |
| | | 2007年 | | | | | | |
| | | 2006年 2007年 | E, F | 10, 11 | 2 (14.3) | ONT (2) | | |
| STEC | ABPC-SM-KM-OTC | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>aphA1</i> , <i>aac3-IV</i> , <i>tetA</i> | 1996年 | A | 18 | 1 (7.1) | O111 : H-(1) | |
| | ABPC-SM-OTC-ST | <i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aac3-IV</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> | 2005年 | O | 22 | 1 (7.1) | O26 : H-(1) | |
| | | | 2007年 | R | 26 | 1 (7.1) | O26 : H11(1) | |
| | SM-GM-ST | <i>strA</i> , <i>aadA</i> , <i>sul1</i> | 2007年 | Q | 24 | 1 (7.1) | O26 : H11(1) | |
| | SM-OTC | <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> | ND | 1996年 | I | 15 | 1 (7.1) | O111 : H-(1) |
| | | | <i>aadA</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i> | 1996年 | J | 16 | 1 (7.1) | O111 : H-(1) |
| 1996年 | | | K | 17 | 1 (7.1) | O26 : H-(1) | | |
| 2008年 | | | S, T | 27, 28 | 2 (14.3) | O26 : H11(2) | | |
| | <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> | 2007年 | R | 25 | 1 (7.1) | O26 : H11(1) | | |

ABPC：アンピシリン，SM：ストレプトマイシン，KM：カナマイシン，OTC：オキシテトラサイクリン
 CP：クロラムフェニコール，NA：ナリジクス酸，ST：スルファメトキサゾール／トリメトプリム
 OUT：自家凝集，ONT：供試血清に凝集せず，ND：検出されず

カナマイシン (KM 30 μ g)，ゲンタマイシン (GM 10 μ g)，セファゾリン (CEZ 30 μ g)，オキシテトラサイクリン (OTC 30 μ g)，コリスチン (CL 10 μ g)，クロラムフェニコール (CP 30 μ g)，ナリジクス酸 (NA 30 μ g)，ホスホマイシン (FOM 50 μ g)，スルファメトキサゾール／トリメトプリム (ST 23.75/1.25 μ g) (以上SNディスク，日本製薬(株)，東京) およびエンロフロキサシン (ERFX 5 μ g) (栄研化学(株)，東京) の12薬剤を用いた。

薬剤耐性遺伝子の保有状況：既報 [9-14] により以下の薬剤耐性遺伝子の検出をPCRで行った；ABPC耐性遺伝子 (*bla*_{TEM})，SM耐性遺伝子 (*strA*, *strB*, *aadA*, *aadB*)，KM耐性遺伝子 (*aadB*, *aphA1*)，GM耐性遺伝子 (*aadB*, *aac(3)-IV*)，OTC耐性遺伝子 (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*)，CP耐性遺伝子 (*catA1*, *cmlA*, *floR*)，ST耐性遺伝子 (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA14*, *dfrA17*) およびサルファ剤耐性遺伝子 (*sul1*, *sul2*)。

成 績

供試菌株の由来と血清型：ETECによる下痢発症子牛の14頭のうち13頭(92.9%)が2～3日齢であり，1頭は6日齢であった。ETECのO群血清型別では自己凝集が8株で供試のO群血清との反応が確認されなかった株が6株であった。STECによる下痢発症は5日～31日齢で認められ，14日以内の個体が9頭(69.2%)であった。STECはO26 : H11が6株と最も多く，次にO26 : H-が4株，O111 : H-が3株，O111 : H19が1株であった。

病原因子検出：ETECはすべての株でF5 (K99) 線毛とST Iが検出された。STECのVTはすべての株がVT1と型別された。

病原遺伝子検査：ETECはすべての株でK99遺伝子と*st I*遺伝子が検出された。STECはすべての株で*stx*₁遺伝子のみが検出された。*eae*遺伝子はO111 : H-の1株を除くすべてのSTECが保有していた。

薬剤感受性：EPECではすべての株が供試したいずれかの薬剤に耐性を示した。薬剤別の耐性率は、SM耐性およびOTC耐性が100%，以下CP耐性92.9%，ST耐性85.7%，ABPC耐性57.1%，NA耐性21.4%，KM耐性14.3%であった。STECでは14株中10株(71.4%)がいずれかの薬剤に耐性を示した。薬剤別の耐性率は、SM耐性が71.4%，以下OTC耐性64.3%，ABPC耐性21.4%，KM耐性14.3%，ST耐性14.3%およびGM耐性7.1%であった。いっぽう、CEZ, CL, FOMおよびERFXの4薬剤にはEPECおよびSTECのすべての供試株が感受性であった。薬剤耐性パターンは、EPECではABPC-SM-KM-OTC-CP-NA(1株)、ABPC-SM-OTC-CP-NA-ST(1株)、ABPC-SM-OTC-CP-ST(6株)、SM-KM-OTC-NA(1株)およびSM-OTC-CP-ST(5株)の5種類に区分され、STECはABPC-SM-KM-OTC(2株)、ABPC-SM-OTC-ST(1株)、SM-GM-ST(1株)およびSM-OTC(6株)の4種類に区分された(表1)。

薬剤耐性遺伝子の保有状況：薬剤耐性遺伝子の検出状況を表1に示した。SM耐性24株中22株(91.7%)が*strA*, 20株(83.3%)が*strB*, 2株(8.3%)が*aadA*を保有していた。由来別にはEPECでは1タイプ(*strA-strB*)に区分され、STECでは4タイプ(*strA*, *strA-strB*, *strA-aadA*, *aadA*)に区分された。KM耐性4株すべての株が*aphA1*を保有していた。GM耐性1株では*aac(3)-IV*および*aadB*は検出されなかった。OTC耐性23株中18株(78.3%)が*tetB*, 6株(26.1%)が*tetA*で、2株(8.7%)が*tetA*および*tetB*を保有していた。由来別にはEPECでは2タイプ(*tetA-tetB*, *tetB*)に区分され、STECでは3タイプ(*tetA*, *tetB*, *tetA-tetB*)に区分された。ST耐性株では、EPEC12株はすべてが*dfrA1*を保有していたが、STEC2株は4種類の耐性遺伝子のいずれも検出されなかった。CP耐性13株およびABPC耐性11株はすべての株がそれぞれ*catA1*および*bla_{TEM}*を保有していた。サルファ剤耐性遺伝子は*sul1*が12株、*sul2*が1株検出された。また1株のSTEC(No. 15)からはいずれの耐性遺伝子も検出されなかった。EPECおよびSTECとも薬剤耐性パターンが同一でも薬剤耐性遺伝子型が異なる株が認められた。

考 察

EPEC株とSTEC株の薬剤別耐性ではCPとSTに対する耐性が高率に認められた。CPは人に対する再生不良性貧血などの副作用を引き起こすことが明らかになり[15]、国内では1998年に食用動物に対する使用が中止されている。近年、病畜由来大腸菌では、健康畜由来大腸菌に比べCPに対し高い耐性率が認められている[16]。その原因として、Haradaら[17]はフロルフェ

ニコールやチアンフェニコールの使用による交差耐性やインテグロンなどによる共耐性への関与を示唆している。両薬剤は牛の細菌性肺炎の治療薬として承認されているが、細菌性下痢の治療薬としては承認されていない。このことから、EPECにおいてCP耐性が分布する原因としては、交差耐性の関与は少ないものと推察された。牛のEPECでは、耐熱性エンテロトキシンと薬剤耐性遺伝子が同じRプラスミド上に存在することが報告されている[18, 19]。又吉ら[20]は沖縄県内の豚由来EPECにおいてエンテロトキシン遺伝子とCPおよびSTを含む薬剤耐性の接合伝達を認めている。今回、EPECでのみCPおよびSTに対して高い耐性率を示したことは、牛由来EPECにおいても豚由来EPECと同様のRプラスミドが関与している可能性が示唆された。

今回の耐性遺伝子型の解析から、EPECとSTECは異なるST耐性機構であること、またTC耐性やSM耐性で多様な耐性遺伝子が分布することが認められた。EPECでは、2002年～2007年に分離された4農場(C, E, F, G)由来株で耐性パターンと耐性遺伝子型が同一であったことから、疫学的な関連性があることが示唆された。STECでは同一血清型の株で耐性パターンは同一でも耐性遺伝子型の異なった株(No. 15および16, No. 25および27, 28)が認められた。これらのことから、耐性遺伝子型別は病原性大腸菌の疫学解析のマーカーの一つとして利用できることが推察された。

病原性大腸菌の薬剤耐性の動向を把握することは、臨床分野への情報還元や公衆衛生的観点からも重要と考えられる。今後、本調査の成績とPFGE法やRAPD法などの分子疫学的手法とを比較検討し、解析を進めていく予定である。

引用文献

- [1] Nagy B, Fekete PZ : Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine, J Med Microbiol, 295, 443-454 (2005)
- [2] 中澤宗生 : 牛の大腸菌性下痢, 獣医感染症カラーアトラス, 見上 彪監修, 第2版, 4-6, 文永堂出版, 東京 (2006)
- [3] Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'Brien AD : Bovine infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157 : H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, Kaper JB, et al eds, 1st ed, 261-267, ASM press, New York (1998)
- [4] Lee JH, Hur J, Stein BD : Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. Vet J, 176, 205-209 (2008)
- [5] Kwon D, Kim O, Chae C : Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrhetic piglets in Korea. J Vet Diang Invest, 11, 146-151 (1999)

- [6] Abe A, Obata H, Matsushita S, Yamada S, Kudoh Y, Bangtrakulnonth A, Ratchtrachenchat OA, Danbara H : A sensitive method for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction using multiple primer pairs. *Zbl Bakteriologie*, 277, 170-178 (1992)
- [7] Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J : Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ζ*). *J Clin Microbiol*, 42, 645-651 (2004)
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI M100-S17, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania (2007)
- [9] Aarestrup FM, Lertworapreecha M, Evans MC, Bangtrakulnonth A, Chalermchaikit T, Hendriksen RS, Wegener HC : Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *J Antimicrob Chemother*, 52, 715-718 (2003)
- [10] Chuanchuen R, Padungtod P : Antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand. *J Vet Med Sci*, 71, 1349-1355 (2009)
- [11] Travis RM, Gyles CL, Reid-Smith R, Poppe C, McEwen SA, Friendship R, Janecko N, Boerlin P : Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. *J Antimicrob Chemother*, 58, 173-177 (2006)
- [12] Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S : Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother*, 56, 485-490 (2005)
- [13] Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J : Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 : K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3214-3221 (2003)
- [14] Keyes K, Hudson C, Maurer J, Thayer S, White DG, Lee MD : Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 421-424 (2000)
- [15] Yunis AA : Chloramphenicol toxicity : 25 years of research. *Am J Med*, 87, 44N-48N (1989)
- [16] Harada K, Asai T, Kojima A, Oda C, Ishihara K, Takahashi T : Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J Vet Med Sci*, 67, 999-1003 (2005)
- [17] Harada K, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Takahashi T : Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am J Vet Res*, 67, 230-235 (2006)
- [18] Sekizaki T, Terakado N, Ueda H, Hashimoto K : Isolation and characterization of plasmids encoding heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli* of cattle origin. *Jpn J Vet Sci*, 44, 619-627 (1982)
- [19] Harnett NM, Gyles CL : Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 46, 428-433 (1985)
- [20] 又吉正直, 中澤宗生 : 子豚由来腸管毒素原性大腸菌の薬剤耐性, β -lactamase産生性, 耐性遺伝子, Rプラスミドおよびプラスミドプロファイル. *日獣会誌*, 54, 913-919 (2001)

Antimicrobial Susceptibility and Resistance Genes Among Enterotoxigenic
Escherichia coli and Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Isolated
from Diarrheic Calves, in Okinawa Prefecture

Masanao MATAYOSHI[†]

Yaeyama Livestock Animal Hygiene Service Center, 99 Ookawa, Ishigaki, 907-0022, Japan

SUMMARY

Twenty-eight strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and shigatoxin producing *E. coli* (STEC) isolated from 27 diarrheic calves between 1996 and 2009 in Okinawa Prefecture, were investigated for antimicrobial susceptibility and antimicrobial resistance genes. The ETEC isolates (n=14) showed five antimicrobial resistance patterns : ABPC-SM-KM-OTC-CP-NA (one strain), ABPC-SM-OTC-CP-NA-ST (one), ABPC-SM-OTC-CP-ST (six), SM-KM-OTC-NA (one) and SM-OTC-CP-ST (five). STEC isolates (n = 14) showed four drug-resistance patterns : ABPC-SM-KM-OTC (two), ABPC-SM-OTC-ST (one), SM-GM-ST (one) and SM-OTC (six). These results suggested that ETEC and STEC isolates were identified for six and eight resistance genotypes, respectively, and ETEC/STEC isolates with the same resistance phenotypes often have different resistance genotypes.

—Key words : Drug resistance gene, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Shigatoxin-producing *Escherichia coli*.

[†] Correspondence to : Masanao MATAYOSHI (*Okinawa Prefectural Institute of Animal Health*)

112 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan

TEL 098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail : matayoma@pref.okinawa.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 620 ~ 624 (2010)