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

又 吉 正 直^{1)*}

中 澤 宗 生²⁾

1) 沖縄県家畜衛生試験場 (〒900-0026 那覇市古波蔵112)

2) 農林水産省家畜衛生試験場 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-1)

(2001年2月7日受付・2001年9月3日受理)

要 約

1989～1998年に沖縄県で下痢症の子豚(1～43日齢)から分離した22農場, 35頭由来の腸管毒素原性大腸菌(ETEC) 79株について, 薬剤耐性, β -lactamase 産生性, 耐性遺伝子, 接合性Rプラスミドおよびプラスミドプロファイルによる解析を行った. 薬剤別の耐性率はストレプトマイシン (93.7%), オキシテトラサイクリン (87.3%), クロラムフェニコール (75.9%), カナマイシン (38.0%), ST合剤 (29.1%), アンピシリン (25.3%), ゲンタマイシン (2.5%) の順であった. 耐性型は16の型に分けられ, 7剤耐性(2株)をはじめ, 2剤以上の多剤耐性菌が73株(92.4%)を占めた. すべての薬剤に感受性のあった株は1株(1.3%)であった. アンピシリン耐性株はすべてアシドメトリー法(P/Cアーゼテスト)によりペニシリナーゼが検出された. β -lactamase 耐性遺伝子型は21株(26.6%)がTEM型に属し, また20株(25.3%)が*gyrA* 遺伝子を保有していた. 接合性Rプラスミドは41株(51.9%)で検出され, 接合伝達株は34株(85.0%)がドナー株と同じ耐性型を示した. プラスミドプロファイル解析では, すべての株が1～8種類のプラスミドを保有し, 農場特有の識別が可能であった.

——キーワード: 薬剤耐性, β ラクタマーゼ, 接合性R-プラスミド, 腸管毒素原性大腸菌, プラスミドプロファイル.

----- 日獣会誌 54, 913～919 (2001)

腸管毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC)による下痢は予防対策の一環としてワクチネーションとあわせて抗菌剤による投薬や治療が恒常的に行われている. 近年, 大腸菌をはじめとした腸内細菌については, 生産現場における薬剤の不適正な使用や乱用による耐性菌の出現が世界的にもきわめて深刻な問題となってきた. 動物由来の耐性菌による環境の汚染[25]や人体への影響[29]も危惧され, 現在さまざまな観点から論争中であることから, 薬剤耐性の動態を集積することは大腸菌症の予防対策に有用な情報をもたらし, また公衆衛生的見地からも意義があると考えられる. ETECの薬剤耐性については遺伝子レベルでの検討が少ないことから本試験では野外分離株の薬剤耐性, 耐性遺伝子, 薬剤耐性機構などについて解析した.

材 料 お よ び 方 法

供試菌株: 1989～1998年に沖縄県内全域で下痢症

の子豚(1～43日齢)の糞便から分離した14市町村, 22農場, 35頭由来のETEC 79株を用いた[14]. ETECは1頭の個体から3株以上分離されたものについては3株を上限に供試した. 供試菌は分離後, ドルセットの卵培地^{a)}に保存し試験に供した.

薬剤耐性試験: 日本化学療法学会標準法[17]に準拠し, 10薬剤についてMueller Hinton寒天培地^{b)}を用い, 寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した. 供試薬剤のうち, アンピシリン(ABPC)^{c)}, ストレプトマイシン(SM)^{c)}, カナマイシン(KM)^{c)}, ゲンタマイシン(GM)^{c)}, オキシテトラサイクリン(OTC)^{c)}, クロラムフェニコール(CP)^{c)}, コリスチン(CL)^{c)}, セフチオフル(CTF)^{c)}は常用標準製剤を, ST合剤(ST)^{d)}, オキシリン酸(OXA)^{e)}は力価検定済みの製品を供試し

a) 日水製薬, 東京. b) Difco Laboratories, U.S.A.

c) 農林水産省動物医薬品検査所, 東京.

d) 塩野義製薬, 大阪. e) 田辺製薬, 大阪.

*現所属: 沖縄県北部家畜保健衛生所(〒905-1152 名護市字伊差川31)

†連絡責任者: 又吉正直(沖縄県北部家畜保健衛生所)

〒905-1152 名護市字伊差川31 ☎0980-52-2939 FAX 0980-53-3311

た。すべての薬剤においてMIC 25 μ g/ml以上と判定された株を耐性とした [10]。

β -lactamase 産生性： β -lactamase の検出はクロモジェニックセファロスポリン法による Cefinase^{f)} とアシドメトリー法による BETA-LACTAMASE^{g)} および P/Cアーゼテスト^{h)} を用いて行った。

β -lactamase 遺伝子の検出：表1に示すTEM, SHV, Toho-1 および MEN-1 を増幅するプライマーを用いて、PCR法により β -lactamase 遺伝子型を決定した。

Double-Disk Synergy Test： β -lactamase 遺伝子が検出された株について、Jarlier ら [9] による方法に準拠して実施し、アモキシシリン-クラブラン酸ディスクⁱ⁾ 側に阻止帯の伸延が認められた株を Extended-Spectrum β lactamases (ESBLs) 産生菌と判定した。

gyrA 遺伝子の検出：小野寺ら [19] の報告に基づき作製したプライマーを用いPCR法により実施した。

接合性Rプラスミドの検出：薬剤耐性株（ドナー）と大腸菌 ML1410rif^r 株（レシピエント）をLB培地培養

菌液に0.5mlと2.5mlずつ混合し、37℃で1夜ゆるやかに振盪培養後、リファンピシン（50 μ g/ml）と耐性を示した供試薬剤（25 μ g/ml）を含むマッコンキー寒天培地^{a)}上に接種し、37℃で1夜培養後発育した菌（トランスコンジュガント）について薬剤耐性を調べ、またその一部の株については易熱性エンテロトキシン（LT）は逆受身ラテックス凝集反応法^{j)}、耐熱性エンテロトキ

表3 子豚由来ETECの薬剤耐性型と接合性Rプラスミド検出状況

薬剤耐性型	株数	Rプラスミド株数	R因子（株数）
ASKGOCSt	2	2	ASKGOCSt (1) OC (1)
ASKOCSt	1	1	O (1)
SKOCSt	12	11	SKOCSt (9) O (2)
ASKOC	6	0	
SOCSt	5	5	SOCSt (5)
ASOC	6	0	
SKOC	3	3	SKOC (2) SO (1)
ASKO	4	4	ASKO (2) AKO (1) SO (1)
ASC	1	0	
SKO	2	1	SKO (1)
SOC	19	6	SOC (6)
SOST	3	3	SOST (3)
OC	4	1	OC (1)
SO	4	2	SO (2)
SC	1	1	SC (1)
S	5	1	S (1)
感受性	1	0	
合 計	79	41	

ABPC：A；SM：S；KM：K；GM：G；OTC：O；CP：C；ST：St.

表1 β -lactamase 遺伝子検出用プライマー

遺伝子型	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ	引用文献
Toho-1	ACGCTACCCCTGCTATTT CCTTTCCGCCTTCTGCTC	780bp	[30]
TEM	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA TAATTGTTGCCGGAAGCTA	504bp	[1]
SHV	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT AGCAGGGCGACAATCCCGCG	626bp	[1]
MEN-1	AACTTGCCGAATTAGAGCGGC GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA	705bp	[2]

f) Becton Dickinson and Company, U.S.A.

g) Oxoid Limited, U.K. h) 昭和薬品化工, 東京.

i) 栄研化学, 東京. j) VET-RPLA, デンカ生研, 東京.

表2 子豚由来ETECのMICの分布

薬剤	MIC： μ g/ml											MIC ₅₀	MIC ₉₀
	≤0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100		
ABPC		1	1	19	37	1				5	15	3.13	>100
SM				2	1	1	1	5	5	7	57	>100	>100
KM			16	33							30	1.56	>100
GM	9	51	15	2				2				0.39	0.78
OTC			2	2	1	5			2	15	52	>100	>100
CP					4	14	1	1	1	10	48	>100	>100
CL	3	47	22	2		5						0.39	0.78
ST	1	4	13	33	2	3					23	1.56	>100
OXA	26	27	11	4	6	5						0.39	3.13
CTF	54	25										≤0.2	0.39

MIC₅₀：試験菌株の中で50%の株がMICを示す薬剤濃度 (μ g/ml)。

MIC₉₀：試験菌株の中で90%の株がMICを示す薬剤濃度 (μ g/ml)。

数字：菌株数。

ABPC：アンピシリン；SM：ストレプトマイシン；KM：カナマイシン；GM：ゲンタマイシン；OTC：オキシテトラサイクリン；CP：クロラムフェニコール；CL：コリスチン；ST：ST合剤；OXA：オキシリン酸；CTF：セフチオフル。

表4 β -lactamase 産生性と MIC

検 査 法	判定 (株数)	薬剤とMIC		判定 (株数)	薬剤とMIC	
クロモジェニックセ ファロスポリン法	+ (76)	ABPC	CTF	- (3)	ABPC	CTF
		MIC ₉₀	MIC ₉₀		MIC ₉₀	MIC ₉₀
Cefinase		>100	0.39		1.56	0.2
アシドメトリー法	+ (39)	ABPC	CTF	- (40)	ABPC	CTF
		MIC ₉₀	MIC ₉₀		MIC ₉₀	MIC ₉₀
Beta-lactamase		>100	0.39		3.13	0.39
アシドメトリー法		判定 (株数)		ABPC	CTF	
P/Cアーゼテスト				MICの範囲	MICの範囲	
		+・+ (2)		≥ 100	0.2~0.39	
		+・- (18)		≥ 100	0.2~0.39	
		-・+ (2)		3.13~6.25	0.2~0.39	
		-・- (57)		0.39~3.13	0.2~0.39

図1 ETECのプラスミドプロファイルⅠ (アルファベットは農場名, 数字は分離菌株)

図2 ETECのプラスミドプロファイルⅡ (アルファベットは農場名, 数字は分離菌株)

シン (ST) はELISA法^{k)}を用いて調べた。

プラスミドプロファイル解析：関崎の変法 [27] に準拠してプラスミドDNAを抽出し、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動し、常法に従い観察した。プラスミドサイズの測定は90kbのプラスミド保有の*E. coli* K12株と2~16kbのサイズの分子量マーカー^{l)}を基準にし

て解析した。

成 績

薬剤耐性試験：各薬剤に対するMICの分布を表2に

k) コリストEIA, デンカ生研, 東京。

l) スーパーコイルDNAラダー, Gibco BRL, U.S.A.

表5 プラスミドプロファイル, 薬剤耐性型および細菌学的性状

パターン	菌株No.	農場	プラスミド の 数	薬剤耐性型	O群型	エンテロ トキシン	分離年
1	1	A	8	SOS _t	141	ST	1989
2	4, 7	B	8	ASKO	20	ST	1989
3	8	C	6	SOC	8	ST	1989
4	11	D	6	SO	20	ST	1989
	19	G		SKOC	20	ST	1989
5	12	E	7	S	149	LT	1989
6	18	F	5	SKO	64	ST	1989
7	20	G	6	SO	20	ST	1989
8	21	H	1	ASKOC	8	LT	1989
9	23	I	3	SKOCSt	149	LT, ST	1993
	25	K	3	SKOC	149	LT, ST	1993
	27	L	3	SKOCSt	149	LT, ST	1993
10	24	J	4	ASKOC	8	LT	1993
11	29	M	6	ASKGOCSt	149	LT, ST	1993
12	31	F	4	SOC	149	LT, ST	1994
13	34	N	5	SOC	149	LT	1994
	43	N	5	ASC	149	LT	1994
	46	N	5	ASOC	149	LT	1994
14	37	O	6	SC	149	LT, ST	1994
	40	O	6	SOC	149	LT, ST	1994
15	49	P	5	ASKOC	149	LT	1996
16	52	Q	5	ASKOC	9	ST	1997
17	55	P	6	SO	8	LT	1997
18	57	R	7	SKO	149	LT	1997
19	60	R	4	SKOCSt	149	LT	1997
	66	S	4	SOCSt	149	LT	1997
	69	T	4	OC	149	LT	1997
20	72	U	5	SOC	149	LT	1997
21	78	V	5	SOCSt	149	LT	1998

ABPC : A; SM : S; KM : K; GM : G; OTC : O; CP : C; ST : St.

示した。OTCとSMはそれぞれ67株(84.8%)と64株(81.0%)でMICが $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ を示した。ABPC, KM, CPおよびSTは2峰性分布を示した。薬剤耐性型は7剤耐性の2株(2.5%)を最高に16のパターンに分けられた(表3)。最も多かったのはSM, OTC, CPの3剤耐性の19株(24.1%), 次いでSM, KM, OTC, CP, STの5剤耐性の12株(15.2%)であった。2剤耐性以上の多剤耐性が73株(92.4%)を占め, すべての薬剤に感受性を示した株は1株(1.3%)であった。

β -lactamase産生性: β -lactamase産生性は, Cefinaseでは陽性が76株(96.2%), 陰性が3株(3.8%)。BETA-LACTAMASEでは陽性が39株(49.4%), 陰性が40株(50.6%)であった。P/Cアーゼテスト(ペニシリナーゼ/セファロスポリナーゼ)では+/+が2株(2.5%), +/-が18株(22.8%), -/+が2株(2.5%), -/-が58株(73.4%)であった。それぞれの株のABPCとCTFの2薬剤に対するMICの分布を表4に示した。

β -lactamase遺伝子の検出: 21株(26.6%)でTEM遺伝子が検出された。他のToho-1, SHV,

MEN-1の遺伝子は検出されなかった。またP/Cアーゼテストでペニシリナーゼを産生する20株とTEM遺伝子を保有する21株は1株(No. 50)を除きすべて一致した。

*gyrA*遺伝子の検出: 20株(25.3%)で遺伝子が検出された。キノロン系薬剤であるOXAのMICで比較すると*gyrA*(+)と*gyrA*(-)とも0.2~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり遺伝子の保有とMICには関連は認められなかった。

Double-Disk Synergy Test: β -lactamase遺伝子が検出された21株の供試菌はすべて陰性であった。

接合性Rプラスミドの検出状況: 接合性Rプラスミドは79株中41株(51.9%)から検出され, その伝達因子は34株(85.0%)がドナー株と同じ耐性型を示した(表3)。確認された株の一部について, エンテロトキシン遺伝子の接合伝達試験の結果はLTでは11頭中5頭(45.5%), 30株中8株(26.7%), STでは14頭中9頭(64.3%), 27株中22株(81.5%)に伝達が認められた。

プラスミドプロファイル解析: 各農場由来の代表的な

株のプロファイルを図1, 2に示した。その結果, パターンは21種に区分された(表5)。G農場のNo. 19, 20は同一個体由来であるがバンドにかなりの違いが認められた。この2株は薬剤耐性に違いがあり, No. 19が4剤耐性株, No. 20が2剤耐性株であった。P農場のNo. 49, 55はまったく異なったパターンを示した。R農場のNo. 60, S農場のNo. 66, T農場のNo. 69は同一パターンを示し, またこのパターンはNo. 31, 34の株ともかなり類似していた。

考 察

薬剤耐性試験では7剤耐性の2株(2.2%)をはじめ, 2剤耐性以上の多剤耐性株が73株(92.4%)を占めた。全国各地で大腸菌を主体とする腸内細菌の多剤耐性化の傾向が指摘されているが[6, 7, 13], 今回の成績も同様な結果であった。薬剤別にみた耐性状況は, 特にSM, OTCの両薬剤にきわめて高率に耐性が認められ, それぞれ供試株の93.7%, 87.3%が耐性を示した。これは両薬剤とも開発後全国的に臨床分野で長期間使用されてきた実績があり, 今回もその影響があったものと考えられた。現場での使用頻度が比較的小さいと思われるCL, OXA, CTFの各薬剤について耐性株は検出されなかった。ETECの薬剤耐性状況を把握することは, 予防・治療指針の確立にきわめて有用であり, 薬剤の使用にあたっては適正な投与法を遵守し, 耐性菌の出現に直結しないような有効薬剤の選択を行うべきであると考えられる。

β -lactam剤であるABPCとCTFに対するMICの成績では β -lactamase産生株は非産生株より明らかに高値を示し, 高い相関が認められた。松永ら[15]は乳房炎由来の大腸菌の β -lactamase産生性をクロモジェニックセファロスポリン法とアシドメトリー法で比較した結果, 前者の感度が高かったが, 本試験でも同様の結果が得られた。一方, クロモジェニックセファロスポリン法は検出感度が非常に高いため微量の β -lactamase産生株でも検出できるが, 臨床問題となるのは比較的多量に産生する株であることや, 腸内細菌や緑膿菌感染症に使用される β -lactam剤に対する感受性試験結果をクロモジェニックセファロスポリン法で推測することは不適当とされる[21]。今回用いたP/Cアーゼテストはペニシリナーゼとセファロスポリナーゼを同時に検出でき, 陽性株のABPCのMICはすべて $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ で陰性株は $0.39 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあり, 検出感度とMICとの相関はきわめて高く, しかも短時間で判定可能なことから β -lactamaseを検出するスクリーニング法として臨床検査での有効な手段と考えられた。

国内では1995年からヒト由来株で腸内細菌を中心に第3世代のセファロスポリン系剤に高度耐性を示す

ESBLsの β -lactamaseが報告されるようになったが, 諸外国のようにTEMやSHV関連のESBLsはほとんど分離されず[20], むしろToho-1型の β -lactamaseがしばしば分離されている[12]。しかし, 動物由来株での実態についてはほとんど検討されていなかった。今回の陽性株はTEM型に分類されたもののDouble-Disk Synergy Testですべて陰性であったことからESBLs以外のいわゆるBush-Jacoby-Medirosの分類[3]における2bグループの β -lactamaseであることが示唆された。ヒト由来株の臨床分離菌から検出されるペニシリナーゼの95%以上がTEM型であるとされるが, 今回の陽性株もそれを裏付ける成績になった。

キノロン剤の作用点はDNAの超らせん構造の形成に働く酵素DNAgyraseであるが, そのキノロン耐性決定領域の変異を検出するのに, 近年PCR法が応用されている。今回20株で*gyrA*遺伝子が検出されたが, キノロン剤であるOXAのMICとの相関は認められなかった。その理由として, キノロン剤の耐性機構としてDNAgyraseの変異とは別に菌体内への薬剤透過性障害の機構も関与するため, 今回の比較的MICの高かった株はこの影響も考えられた。

接合性Rプラスミドは50.6%に認められた。これは国内の豚由来大腸菌の保有状況[6, 7, 24]に比較して高い傾向にあった。このうち4剤耐性以上の株でみると, 39株中25株(64.1%)で3剤耐性以下が39株中15株(38.5%)であることから耐性化が進むにしがたい接合性Rプラスミドの関与する例が多くなることが示唆された。一方, 5剤耐性株(ABPC・SM・KM・OTC・CP; 6株), 4剤耐性株(ABPC・SM・OTC・CP; 6株)などで接合性Rプラスミドを保有しない株も存在した。この原因としてはトランスポゾン[8, 26]や非接合性の小型プラスミドの関与が考えられた。伝達因子は34株(85.0%)がドナー株と同じ耐性型を示した。ETECの病原因子がプラスミドを介して他の非病原性大腸菌や腸内細菌に伝達すること[23], またエンテロトキシンと薬剤耐性遺伝子群を同時に保有するプラスミドの存在[5, 18]やノトバイオート豚の腸管内でのSTと多剤耐性プラスミドの同時伝達[22]の報告もある。今回の試験においても接合伝達試験により薬剤耐性遺伝子と同時にエンテロトキシンの伝達も認められたことから, 実際に野外においても他の非病原性大腸菌へ病原因子が伝達・拡散することが危惧される。

プラスミドプロファイルは感染源の推定や感染経路の疫学マーカーとして有用な資料を提供することでさまざまな病原菌に応用されている[4, 13, 16, 24, 28]。本試験での解析の結果, 農場ごとに特有のパターンを示し, 血清型やエンテロトキシンが同一の株でも薬剤耐性型とプロファイルを併用し解析することで株間の識別が可能

な例が多数認められた。たとえば、農場の異なる株で類似のプロファイルを示すパターン (No. 13, 19) があったが、これらは薬剤耐性型の違いで明確に区別できた。同一個体由来の株ではG農場 (No. 19, 20) を除きほぼ同一のパターンを示した。両株については薬剤耐性型の違いに基づく差違なのか、または別の要因があるかは今後検討を要するものと思われる。No. 23と27は血清型、エンテロトキシン、薬剤耐性が同一で、プロファイルも酷似しており、また分離年度と農場の地理的状況からも同一由来株から派生した可能性が示唆された。2回の発生があったF, N, P農場について比較すると、F農場とP農場の株は血清型、エンテロトキシンが異なることとプラスミドパターンに大きな違いがあることで由来のまったく異なるものであることが判明した。N農場の株は血清型、エンテロトキシンが同一であり、プラスミドパターンもほぼ同一であることから由来が同じ株の可能性はある。すなわち同農場では初回に分離されたETECが完全に排除されず、その後再感染したものと考えられた。その他の特徴としては、5剤耐性でもプラスミド数が1個の株 (No. 21) や単剤耐性でも7個のプラスミドを保有するなど薬剤耐性型とプラスミド数には関連性は認められなかった。血清型やエンテロトキシンが異なった株間では類似したパターンは認められなかった。また血清型やエンテロトキシンが同じ株でも、まったく異なるプロファイルになる例もあるが、酷似したパターンになる例 (No. 23, 27) もあることから、こうした株については今後、RAPD法やパルスフィールド電気泳動法などの他の遺伝学的手法ともあわせて解析する必要があると考えられた。

野外分離株のETECの薬剤耐性機構を解明することは、大腸菌症の予防・治療に際しての基礎的な情報を集積し、臨床現場での有効な活用をもたらすものと期待される。またエンテロトキシンなどの病原遺伝子を保有した耐性菌の環境への拡散も懸念されることから、今後こうした観点からの課題対応も必要であると考ええる。

引用文献

- [1] Arlet G, Phillippon A : FEMS Microbiol Lett, 82, 19-26 (1991)
- [2] Barthelemy M, Pedduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R : Biochim Biophys Acta, 1122, 15-22 (1992)
- [3] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA : Antimicrob Agents Chemother, 39, 1211-1233 (1995)
- [4] Danbara H, Komase K, Arita H, Abe H, Yoshikawa M : Infect Immun, 56, 1513-1517 (1988)
- [5] Gyles CL, Palchaudhuri S, Maas WK : Science, 198, 198-199 (1977)
- [6] 日越博信, 猪俣隆一 : 琉大農学報, 32, 133-141 (1985)
- [7] 細田紀子, 伊藤博哉, 鮫島俊哉, 浜岡隆文, 寺門誠致 : 日獣会誌, 43, 25-28 (1990)
- [8] 井上松久, 岡本了一 : 臨床と微生物, 20 (臨時増刊), 147-154 (1993)
- [9] Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A : Rev Infect Dis, 10, 867-878 (1988)
- [10] 家畜の耐性菌研究会 : 日獣会誌, 29, 90-92 (1976)
- [11] 片岡 康, 三谷賢治, 中澤宗生, 柏崎 守 : 日豚会誌, 25, 61-64 (1988)
- [12] Linton AH : J Antimicrob Chemother, 18, 189-197 (1986)
- [13] 又吉正直, 大城 守, 安富祖 誠, 国場 保 : 日獣会誌, 53, 279-284 (2000)
- [14] 又吉正直, 貝賀眞俊, 大城 聡, 中澤宗生 : 日獣会誌, 54, 595-600 (2001)
- [15] 松永敏幸, 鎌田信一, 柿市徳英, 内田和夫 : 日獣会誌, 45, 761-765 (1992)
- [16] Mayer LW : Clin Microbial Rev, 1, 228-243 (1988)
- [17] 日本化学療法学会MIC測定法改訂委員会 : Chemotherapy, 29, 76-79 (1981)
- [18] Ohmae K, Hamamoto S, Yonezawa S : Jpn J Vet Sci, 47, 125-128 (1985)
- [19] 小野寺昭一, 岸本幸一, 清田 浩, 後藤博一, 五十嵐宏, 川原 元, 大石幸彦, 岡崎武二郎, 吉田博明 : 感染症誌, 69, 511-516 (1995)
- [20] Roy C, Segura C, Turada M, Reig R, Hermida M, Ternel D, Foz A : Eur J Clin Microbiol, 4, 146-147 (1984)
- [21] 佐竹幸子 : クラスC β -ラクタマーゼ : 耐性菌感染症の理論と実際, 平松啓一編, 第1版, 39-43, 医薬ジャーナル社, 大阪 (1998)
- [22] Sekizaki T, Terakado N, Hashimoto K : Jpn J Vet Sci, 45, 255-257 (1983)
- [23] Smith HW, Halls S : J Gen Microbiol, 52, 319-334 (1968)
- [24] 高橋清人, 高橋直治, 渡辺妙子, 妹背 醇 : 日獣会誌, 44, 897-900 (1991)
- [25] 寺門誠致, 佐藤儀平, 齊田 清 : 薬剤耐性菌による環境汚染, 三橋 進, 他編, 第1版, 121-151, 学会出版センター, 東京 (1985)
- [26] 寺脇良郎 : 医学のあゆみ, 111, 868-875 (1979)
- [27] 内田郁夫 : プラスミド抽出法・アニマルバイオテクノロジー, 関崎 勉, 小松正憲, 杉本千尋, 他編, 第1版, 45-46, チクサン出版社, 東京 (1995)
- [28] Wachsmuth IK : Rev Infect Dis, 8, 682-692 (1986)
- [29] Wegener HC, Frimodt-Møller N : J Med Microbiol, 49, 111-113 (2000)
- [30] Yagi T, Kurokawa H, Arakawa Y : Antimicrob Agents Chemother, 41, 2606-2611 (1997)

Antimicrobial Resistance, β -lactamase Production, Drug-resistance Genes,
Conjugative R-plasmids, and Plasmid Profiles of Enterotoxigenic
Escherichia coli Isolated from Diarrheic Piglets
in Okinawa Prefecture

Masanao MATAYOSHI^{*†} and Muneo NAKAZAWA

^{*} Okinawa Prefectural Institute of Animal Health, Kohagura, Naha 900-0026, Japan

SUMMARY

Seventy-nine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from diarrheic piglets (aged 1 to 43 days) between 1989 and 1998 in Okinawa Prefecture were investigated for their antimicrobial resistance, β -lactamase production, drug-resistance genes (TEM, SHV, Toho-1, MEN-1, *gyrA*), R-plasmid properties, and plasmid profiles. Percentages of strains resistant to the following drugs were streptomycin (93.7%), oxytetracycline (87.3%), chloramphenicol (75.9%), kanamycin (38.0%), sulfamethoxazole-trimethoprim (29.1%), ampicillin (25.3%), and gentamicin (2.5%). All strains were susceptible to colistin (CL), oxolinic acid (OXA), and ceftiofur (CTF). The isolates demonstrated 16 drug-resistance patterns. Multiple resistance was demonstrated by 73 isolates (92.4%), of which all were resistant to at least 2 antimicrobial substances. Only 1 strain was susceptible to all the antimicrobial agents tested. β -lactamases (penicillinases) were detected by means of the acidometric method in all strains resistant to ampicillin. TEM genes were detected in 21 (26.6%) strains, and *gyrA* genes in 20 (25.3%) strains. Conjugated R-plasmids were found in 41 (51.9%) strains. An especially high frequency of resistance transfer was observed in multidrug-resistant strains. Several sizes (1~8) of plasmid DNA bands occurred in all strains. Plasmids from the same source displayed identical or similar profiles, whereas those from different sources showed distinct profiles. — Key words : antimicrobial resistance, β -lactamase, conjugative R-plasmids, enterotoxigenic *Escherichia coli*, plasmid profile.

^{*} Present address : Okinawa Prefectural Hokubu Livestock Hygiene Service Center, 31 Isagawa, Nago 905-1152, Japan

[†] Correspondence to : Masanao MATAYOSHI (Okinawa Prefectural Hokubu Livestock Hygiene Service Center)

31 Isagawa, Nago 905-1152, Japan TEL 0980-52-2939 FAX 0980-53-3311

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 913~919 (2001)

日本産業動物獣医学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎稲葉 右二 (元・日本大学生物資源科学部)
○梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)
澤田 勉 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
鈴木 慶信 (千葉県農業共済組合連合会西部家畜診療所)
内藤 善久 (岩手大学農学部)

【専門審査委員】

新城 敏晴 (宮崎大学農学部)
神尾 次彦 (動物衛生研究所原虫病研究室)
杉本 千尋 (帯広畜産大学原虫病研究センター)
小久江栄一 (東京農工大学農学部)
田浦 保穂 (山口大学農学部)

伊藤 壽啓 (鳥取大学農学部)
高鳥 浩介 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)
辻本 元 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
藤瀬 浩 (麻布大学獣医学部)

【編集幹事】

町田 登 (東京農工大学農学部)
(◎委員長, ○副委員長)

編集人 日本産業動物獣医学会
会長 浜名克己