

原 著

沖縄県の豚，鶏におけるコリスチン耐性遺伝子保有 腸内細菌科細菌及びカルバペネム耐性 腸内細菌科細菌の保有実態

柿田徹也^{1)†} 岡野 祥²⁾ 加藤峰史²⁾ 宮平勝人¹⁾ 高良武俊¹⁾
久場由真仁¹⁾ 仁平 稔¹⁾ 喜屋武向子¹⁾

1) 沖縄県衛生環境研究所 (〒904-2241 うるま市兼箇段 17-1)

2) 沖縄県中央食肉衛生検査所 (〒901-1202 南城市大里字大里 2015)

(2020年6月26日受付・2021年1月26日受理)

要 約

人や家畜での伝播が懸念されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 及びコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌について，薬剤耐性菌制御の指標とするため，2018年4月～2019年3月に沖縄県の豚，鶏における保有実態を調査した。CREは検出されず，コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-5*) を保有する *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia albertii*, *Klebsiella pneumoniae* が健康豚38.1%，食鳥検査で全部もしくは一部廃棄となった鶏40.8%から分離された。今回コリスチン耐性菌選択培地を使用したため陽性率が他の報告より高い傾向にあるが，県内へ広く浸潤しており，今後もその推移について継続したモニタリングが重要である。

——キーワード：鶏，コリスチン，腸内細菌科細菌，*mcr-1*，豚。

-----日獣会誌 74, 569～575 (2021)

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症は，人におけるグラム陰性菌による感染症の治療において最も重要な抗菌薬であるメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* 等の腸内細菌科細菌による感染症の総称である。広域β-ラクタム剤以外にも他の複数系統の薬剤に耐性であることが多く，また，耐性機序の一つであるカルバペネマーゼ遺伝子は伝達性プラスミド上に存在し，菌種を超えて耐性遺伝子が伝播することから，国際的に警戒感が強まっている [1]。

CREに代表される多剤耐性グラム陰性菌感染症に対して，ペプチド系抗菌薬であるコリスチンが最終救済薬 (last resort) として知られており，WHOはCritically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revisionにおいてコリスチンをグラム陰性桿菌に対するきわめて重要な抗菌薬として位置づけている。コリス

チンは人に対して腎毒性，神経毒性といった副作用を有することや，β-ラクタム系薬をはじめとする安全かつ有効な注射用抗菌薬が登場したことで使用頻度が減少し，日本では2004～2015年の間コリスチン注射薬 (コリスチンメタスルホン酸ナトリウム) の承認が取り消された。2015年には希少疾病用医薬品として再承認されたものの厳しい管理下で使用されている。一方，畜産分野では豚，鶏，牛を対象に発育促進，治療目的に飼料添加物及び動物用医薬品として使用されてきた。2015年に中国において細菌間で伝達可能なプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* が報告され，その後世界中で食用動物，食品，人から続々と検出され，国際的に注目されている [2]。コリスチン耐性遺伝子は現在 *mcr-1*～*10*まで報告されており，食肉を介して人へ伝播する可能性があるため，人の医療への影響が懸念されている [2, 3]。日本では，2007年に豚から分離された *E. coli* がすでに *mcr-1* を保有していたことが報告され [4]，

† 連絡責任者：柿田徹也 (沖縄県衛生環境研究所)

〒904-2241 うるま市兼箇段 17-1

☎ 098-987-8222 FAX 098-987-8210

E-mail : kakitatt@pref.okinawa.lg.jp

2017年に初めて人の糞便より *mcr-1* 保有 *E. coli* の検出が報告された [5]. このような状況で2017年に食品安全委員会により「家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性に関する食品健康影響評価」が実施され、その結果をもとに、農林水産省は飼料添加物としてのコリスチンの使用を2018年7月に禁止し、動物用医薬品としては第二次選択薬として位置づけた.

2015年に *mcr-1* の報告が成された後、人の医療分野でもコリスチン耐性遺伝子保有 CRE の検出が世界中で報告されるようになった [6, 7]. 国内においても輸入事例と考えられる症例報告も存在し、効果のある抗菌薬に限られるため治療が困難となっている [8].

日本において、家畜における CRE, コリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の保有実態に関する報告は少ない [4, 9, 10]. よって今回、それらの家畜における保有実態を明らかにし、沖縄県における薬剤耐性菌コントロールの指標とするため、また、畜産分野におけるコリスチン耐性 CRE 出現のリスク評価の一助とするため、沖縄県の豚、鶏について CRE, コリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の保有状況調査を行い、分離株について解析した.

材料及び方法

2018年4月～2019年3月に沖縄県内と畜場、食鳥処理場各1カ所において豚360頭、肉用鶏346羽の盲腸便を採取した. 豚はと畜検査において異常がみられなかった個体、肉用鶏は食鳥検査において全部廃棄もしくは一部廃棄となった個体を対象とした. 盲腸便の採取は、内臓摘出後腸管を個体ごとに分け、盲腸表面をアルコールにて消毒後、滅菌されたメスにて切開し、滅菌スプーンを用いて実施した. 採材は豚、鶏それぞれ毎月1回または2回実施し、豚は45農場、鶏は3農場27鶏舎を対象とした. 豚については農場を沖縄本島北部地域、中部地域、南部地域に区分し陽性率の比較を行った. 鶏については農場の地域が限定されていたため、農場間での陽性率の比較を行った. なお、各陽性率については、 χ^2 検定を実施し、有意差が認められた場合、テューキーの多重比較検定を用いて対比較を行った.

CRE の検出は Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Rectal Swabs を参考に実施した. すなわち、薬剤感受性 (一般細菌・ディスク法) キット (KB ディスク® ‘栄研’ メロベネム, 栄研化学(株), 東京) を1枚加えた TSB 培地 (栄研化学(株), 東京) 5ml に盲腸便を1白金耳量接種し、35°C で一晩培養した. この増菌液をマッコンキー寒天培地 (栄研化学(株), 東京) へ接種後、KB ディスク® ‘栄研’ メロベネムを

置いて35°Cで一晩培養し、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における CRE の届出基準 (<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-140912-1.html>), (参照2020-06-25) を参考に阻止円22mm以内の集落の有無を観察した.

コリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の検出は、盲腸便をコリスチン1 μ g/ml加乳糖ブイヨン培地 (栄研化学(株), 東京) 10ml に1白金耳量接種し、37°Cで一晩培養した. 増菌液を SuperPolymyxin 培地, すなわち、硫酸コリスチン3.5 μ g/ml, ダプトマイシン10 μ g/ml, アムホテリシン B 5 μ g/ml を加えた EMB 寒天平板培地 (栄研化学(株), 東京) に1白金耳量接種し、37°Cで24時間培養した [11]. 発育集落について、アルカリ熱抽出にてDNAを抽出し、コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1*, 2, 3, 4, 5 を標的とした Multiplex PCR を実施した [12]. *mcr-1* の陽性コントロールには琉球大学病院より分与された RYU2912C-1 (accession No. LC228070) からアルカリ熱抽出したDNAを用いるとともに、検出された遺伝子については前述の *mcr-1*, 2, 3, 4, 5 を標的とした Multiplex PCR のプライマーを用いたシーケンシングにより当該遺伝子を同定した. 菌種は *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. albertii* を標的とした Multiplex PCR によって同定し、本法で同定できなかった株は TSI 培地 (日水製薬(株), 東京), LIM 培地 (日水製薬(株), 東京), シモンズクエン酸塩培地 (栄研化学(株), 東京) における生化学性状試験と 16S rRNA のシーケンシングにより同定した [13, 14].

また、薬剤感受性試験は *mcr-1* 保有 *E. coli* (豚由来155株、鶏由来133株) を対象とした. なお、Super-Polymyxin 培地上で異なるコロニー性状を示した菌株が複数認められた場合、前述同様コリスチン耐性遺伝子の検出と菌種同定を実施し、*mcr-1* 保有 *E. coli* と同定されたものを1頭羽につき最大2株供試した. アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフェピム (CFPM), メロベネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), スルバクタム/アンピシリン (SBT/ABPC), アミカシン (AMK), ゲンタマイシン (GM), レボフロキサシン (LVFX), シプロフロキシサシン (CIP), テトラサイクリン (TC), チゲサイクリン (TGC), スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST), ホスホマイシン (FOM) の計14薬剤ディスク (栄研化学(株), 東京) を用いて KB 法を実施した. CTX 耐性と判定された株について、発育集落からアルカリ熱抽出により DNA を抽出し、基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子である TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8 group, CTX-M-9 group について PCR を実施した [15, 16]. また、微量液体希

表1 豚及び鶏盲腸便から分離された腸内細菌科細菌のコリスチン耐性遺伝子保有状況

腸内細菌科細菌 菌種	コリスチン 耐性遺伝子	豚 (頭)			鶏 (羽)		
		検体数(頭)	陽性数(頭)	陽性率 (%)	検体数(羽)	陽性数(羽)	陽性率 (%)
<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-1</i>		135 ^{a,b,c}	37.5		124 ^d	35.8
	<i>mcr-1</i> 及び <i>mcr-3</i>		1	0.3		0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>mcr-1</i>	360	11 ^a	3.1	346	42 ^d	12.1
	<i>mcr-1</i> 及び <i>mcr-5</i>		0	0		1	0.3
<i>Escherichia albertii</i>	<i>mcr-1</i>		2 ^b	0.6		0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-1</i>		1 ^c	0.3		0	0

a : うち 11 頭は同一個体から *mcr-1* 保有 *E. coli*, *mcr-1* 保有 *E. fergusonii* 両方検出
 b : うち 1 頭は同一個体から *mcr-1* 保有 *E. coli*, *mcr-1* 保有 *E. albertii* 両方検出
 c : うち 1 頭は同一個体から *mcr-1* 保有 *E. coli*, *mcr-1* 保有 *K. pneumoniae* 両方検出
 d : うち 26 羽は同一個体から *mcr-1* 保有 *E. coli*, *mcr-1* 保有 *E. fergusonii* 両方検出

表2 鶏におけるコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の農場毎の陽性率の比較

農場	検体数(羽)	陽性数(羽)	陽性率 (%)	陽性率(陽性数 / 検体数)の差 [WSD]		
				A 農場	B 農場	C 農場
A 農場	111	70	63.1	-	0.29 [0.16]*	0.37 [0.15]*
B 農場	116	40	34.5	0.29 [0.16]*	-	0.08 [0.14]
C 農場	119	31	26.1	0.37 [0.15]*	0.08 [0.14]	-

* : Tukey の多重検定により有意差あり (比較する 2 群の陽性率の差 > WSD : Wholly significant difference)

積法 (抗菌薬濃度 : 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64µg/ml) によりコリスチンの最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, KB 法, MIC は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準 (CLSI M100 ED30) に従い判定した.

成 績

CRE については, 豚, 鶏全検体においてマッコンキー寒天培地上のメロペネムディスク阻止円 22mm 以内にコロニーは分離されなかった.

一方, コリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌は豚, 鶏ともに採材を行ったすべての月で分離され, 豚では 137 頭 (38.1%) から, 鶏では 141 羽 (41.8%) から検出された. *mcr-1* 保有 *E. coli*, *E. fergusonii* が豚と鶏から, *mcr-1* 保有 *E. albertii*, *K. pneumoniae*, *mcr-1* 及び *mcr-3* 保有 *E. coli* が豚から, *mcr-1* 及び *mcr-5* 保有 *E. fergusonii* が鶏から分離された (表 1). 豚では 45 農場中 33 農場 (73.3%), 鶏は 3 農場中 3 農場 (100%), 27 鶏舎中 25 鶏舎 (92.6%) で陽性となった. このうち, 同一農場から複数の採材期間で分離されたのが, *mcr-1* 保有 *E. coli* は豚 14 農場 (31.1%), 鶏 3 農場 (100%) 13 鶏舎 (48.1%), *mcr-1* 保有 *E. fergusonii* は豚 1 農場 (2.2%), 鶏 3 農場 (100%) 4 鶏舎 (14.8%) あった. また, *mcr-1* 保有 *E. coli* 及び *E. fergusonii* が両方検出された豚が 11 頭 (6 農場), 鶏が 26 羽 (3 農場 9 鶏舎), *mcr-1* 保有 *E. coli* 及び *E. albertii*

が両方検出された豚が 1 頭, *mcr-1* 保有 *E. coli* 及び *K. pneumoniae* が両方検出された豚が 1 頭であった. 豚における地域別の陽性頭数は, 沖縄本島北部地域が 221 頭中 87 頭 (41.2%), 中部地域が 72 頭中 26 頭 (36.1%), 南部地域が 77 頭中 24 頭 (31.2%) であり, χ^2 検定の結果, 地域別の陽性率に有意差はなかった. 鶏における農場別の陽性率は A 農場で 63.1%, B 農場で 34.5%, C 農場で 26.1% であり, A 農場と B 農場, A 農場と C 農場に有意差があり, B 農場と C 農場間には有意差はなかった (表 2).

mcr-1 保有 *E. coli* の薬剤感受性試験の結果をもとにアンチバイオグラムを作成した (図 1). なお, 豚 20 頭, 鶏 9 羽において SuperPolymyxin 培地上で異なるコロニー性状を示した *mcr-1* 保有 *E. coli* が複数分離されたため, それぞれ 1 頭羽につき 2 株ずつ供試した. ABPC に対し豚由来株 78.1%, 鶏由来株 53.4%, TC に対し豚由来株 95.5%, 鶏由来株 75.2%, ST に対し豚由来株 78.1%, 鶏由来株 18.8% が耐性であった. LVFX に対し, 豚由来株 11.0%, 鶏由来株 4.5%, CIP に対し豚由来株 9.7%, 鶏由来株 4.5% が耐性であった. CTX に対し豚由来 1 株 (0.6%) が耐性であった. この CTX 耐性株は ABPC, GM, LVFX, CIP, TC, ST 計 7 剤に耐性を示し, ESBL 遺伝子検出 PCR により, CTX-M-9 group 遺伝子が検出された.

コリスチンの MIC は豚由来 67 株 (43.2%), 鶏由来 106 株 (79.7%) が 4µg/ml, 豚由来 84 株 (54.2%),

豚、鶏におけるコリスチン耐性菌, CRE 保有実態

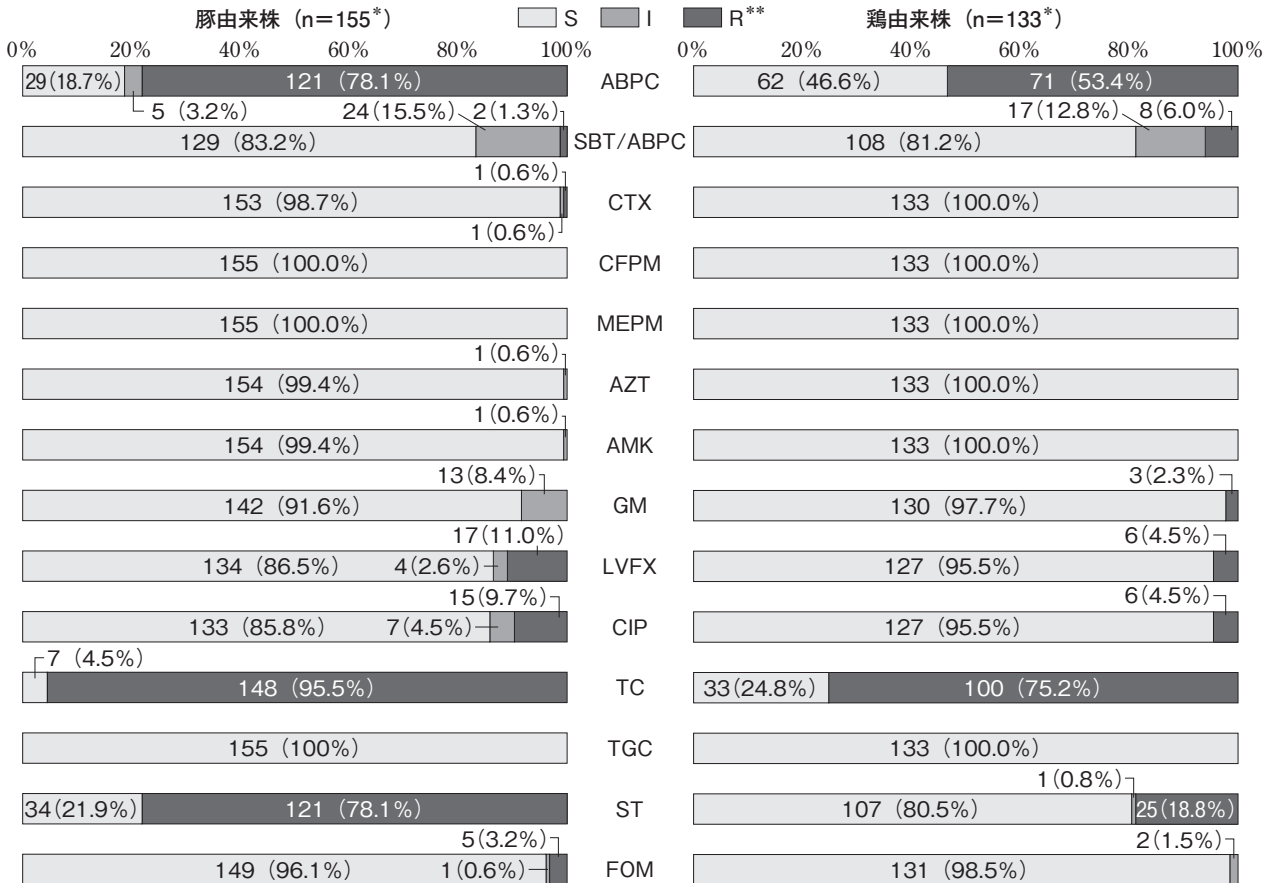


図1 *mcr-1* 保有 *E. coli* の薬剤感受性試験結果に基づくアンチバイオグラム

ABPC: アンピシリン

SBT/ABPC: スルバクタム/アンピシリン

CTX: セフトキシム

CFPM: セフェピム

MEPM: メロペネム

AZT: アズトレオナム

AMK: アミカシン

GM: ゲンタマイシン

LVFX: レボフロキサシン

CIP: シプロフロキサシン

TC: テトラサイクリン

TGC: チゲサイクリン

ST: スルファメトキサゾールトリメトプリム

FOM: ホスホマイシン

*: コロニー性状の異なる *mcr-1* 保有 *E. coli* が検出された豚 20 頭, 鶏 9 羽において 1 頭羽につきそれぞれ 2 株を供試

** : S は感性, I は中間, R は耐性

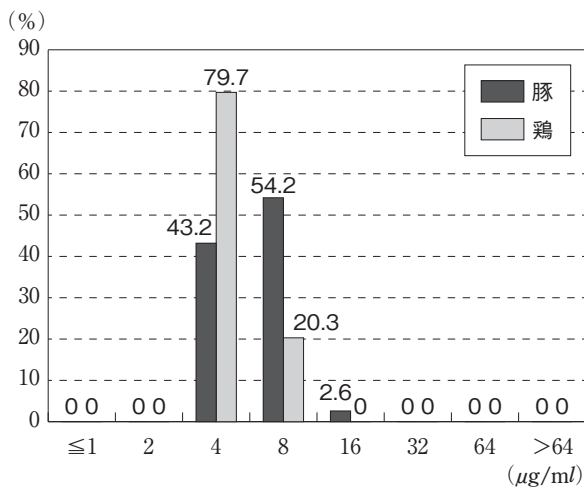


図2 豚、鶏から分離された *mcr-1* 保有 *E. coli* の MIC (豚 n=155*, 鶏 n=133*)

* コロニー性状の異なる *mcr-1* 保有 *E. coli* が検出された豚 20 頭, 鶏 9 羽において 1 頭羽につきそれぞれ 2 株を供試

鶏由来 27 株 (20.3%) が 8µg/ml, 豚由来 4 株 (2.6%) が 16µg/ml (図2) を示した。

考 察

近年, 国外では家畜由来コリスチン耐性遺伝子保有 CRE の検出が報告されている [17]. 今回, 豚, 鶏から CRE は分離されず, 現状では沖縄県の養豚, 養鶏といった畜産分野においてコリスチン耐性 CRE の出現リスクは低いと考えられた. しかし, 糞便からの CRE の分離培養方法は確立されておらず, 今回は CDC 法を参考に CRE 以外の細菌を効率的に排除するためマッコンキー寒天培地にディスクを置いて CRE を選択する方法を採用したが, 阻止円径 22mm より外部にも CRE が集落を形成することが報告されており, CRE の存在を完全に否定することはできない [18]. 今後, CRE の分離培養方法のさらなる検討が必要である.

一方で, コリスチン耐性腸内細菌科細菌については,

mcr-1, *mcr-3*, *mcr-5*といった多様なコリスチン耐性遺伝子とそれらを保有する *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. albertii*, *K. pneumoniae* が検出された。本研究と同様、コリスチン耐性菌選択培地を使用した報告では、エクアドルにおいて *mcr-1* 保有 *E. coli* の陽性率は豚が 47.1%、鶏が 46.9% であり、本研究とおおむね同様の割合を示した [19]。一方、国内においては、*mcr-1* 保有 *E. coli* の陽性率は、健康な豚において 0.97~2.4%、健康なブロイラーにおいて 0.69% と報告されている [9, 10]。また、国内における人由来 *E. coli* からの *mcr-1* 陽性率は 0~0.6% であるとの報告がある [9, 20]。これらの報告では、非選択培地によって分離された *E. coli* の分離株における陽性率 (コリスチン耐性遺伝子保有 *E. coli* 菌株数 / *E. coli* 菌株数) を算出している。一方、本研究では、家畜におけるコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の存在とその浸潤状況を明らかにするため、検出感度を重視してコリスチン耐性菌選択培地である SuperPolymyxin 培地を使用し、検体における陽性率 (コリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌陽性頭数 / 検査頭数) を算出した。このため、本研究と国内の報告では陽性率が大きく異なると考えられる。

また、*mcr-1* 保有 *E. coli*, *E. fergusonii* は同一農場から複数の採材期間で分離されていることから、農場内に定着している可能性も考えられるため、今後継続したモニタリングが必要である。加えて、*mcr-1* 保有 *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. albertii*, *K. pneumoniae* は同一個体から複数菌種分離されており、異なる菌種間でプラスミド伝達が起きている可能性が考えられるため、今後さらなる解析が必要である。

豚におけるコリスチン耐性腸内細菌科細菌の地域別の陽性率の比較について有意差は認められず、沖縄本島全域に一樣に浸潤していることが示唆された。一方で、鶏の農場ごとの陽性率の比較については A 農場が他の 2 農場と比較して有意に陽性率が高かった。農場によって鶏の飼養状況やコリスチンの使用状況、鶏舎構造による交差汚染リスクが異なる可能性があるため、今後精査が必要である。

豚、鶏由来 *mcr-1* 保有 *E. coli* の薬剤感受性試験について、ABPC、TC の耐性率が高い値を示した。Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM, https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-3.html, 参照 2020-09-24) によると、農場における家畜由来大腸菌の薬剤耐性率は 2011~2015 年において、ABPC は豚が 22.1~44.8% (平均 29.8%)、ブロイラーが 41.8~55.8% (平均 46.5%)、TC は豚が 53.8~64.2% (平均 58.4%)、ブロイラーが 45.5~61.1% (平均 52.6%) と報告されている。本研究で分離された豚、鶏由来 *mcr-1* 保有 *E. coli*

の ABPC、TC に対する耐性率は JVARM よりも高い傾向にあるが、耐性率や薬剤使用量の県別のデータがないため、その原因についてはさらなる検討が必要である。一方で、第 4 世代セファロスポリンである CFPM やカルバペネム系抗菌薬である MEPM、コリスチンと同様多剤耐性菌に対して広域スペクトルを持つ TGC には 100% 感受性であった。また、豚由来 CTX 耐性 *E. coli* が 1 株分離された。病原体が *mcr-1* とその他薬剤耐性遺伝子を同時保有した場合、治療をより困難にするという報告がある [21]。*mcr-1* 保有 ESBL 産生 *E. coli* の割合は本研究では 0.6% と低い値であったものの、ESBL 産生遺伝子を保有し多剤耐性化していたことから、豚から人への拡大には注意が必要である。

コリスチンのブレイクポイントは CLSI, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) とともに MIC > 2 μ g/ml と設定されている。今回の研究では豚、鶏由来 *mcr-1* 保有 *E. coli* における全分離株のコリスチンの MIC が 4 μ g/ml 以上であり、コリスチンに対して耐性と判定された。過去の報告によると、日本国内における人、豚糞便、豚肉、鶏肉由来 *mcr-1* 保有 *E. coli* の MIC は 2~16 μ g/ml 以上と幅がみられるが、今回の研究における MIC は豚由来株が 4~16 μ g/ml、鶏由来株が 4~8 μ g/ml であり、既報と比較して高度耐性を示した株はなかった [4, 5, 9, 20, 22-24]。

今回の研究において、沖縄県の豚、鶏におけるコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌の高い保菌率と沖縄本島における広範囲な浸潤が確認された。コリスチンは現在飼料添加物としての使用が禁止されたため、家畜への使用量は大幅に減少しているものの、今後もコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌のリスクを把握するため、その保菌率の推移をモニタリングしていく必要がある。

本研究における *mcr-1* の陽性コントロール株 RYU2912C-1 を分与いただいた琉球大学病院の藤田次郎教授、仲松正司特命助教、上地幸平氏に深謝する。

引用文献

- [1] Logan LK, Weinstein RA : The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace, *J Infect Dis*, 215, S28-36 (2017)
- [2] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J : Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect Dis*, 16, 161-168 (2016)
- [3] Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z : Identification of novel mobile colistin resistance gene

- mcr-10*, Emerg Microbes Infect, 9, 508–516 (2020)
- [4] Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M : Colistin-resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007–2014, Emerg Infect Dis, 22, 1315–1317 (2016)
- [5] Tada T, Uechi K, Nakasone I, Shimada K, Nakamatsu M, Kirikae T, Fujita J : Emergence of a colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harboring *mcr-1* in Japan, Int J Infect Dis, 63, 21–22 (2017)
- [6] Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN : Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Lancet Infect Dis, 16, 287–288 (2016)
- [7] Yao X, Doi Y, Zeng L, Lv L, Liu JH : Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1, Lancet Infect Dis, 16, 288–289 (2016)
- [8] Uchida H, Tada T, Sugahara Y, Kato A, Miyairi I, Kirikae T : A clinical isolate of *Escherichia coli* co-harboring *mcr-1* and *bla_{NDM-5}* in Japan, J Med Microbiol, 67, 1047–1049 (2018)
- [9] Fukuda A, Sato T, Shinagawa M, Takahashi S, Asai T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y : High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan, Int J Antimicrob Ag, 51, 163–164 (2018)
- [10] Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M : Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food-producing animals in Japan, Antimicrob Agents Ch, 61, e02057–16 (2016), (online), (DOI: 10.1128/AAC.02057–16), (accessed 2020–08–25)
- [11] Nordmann P, Dortet L, Poirel A : Universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram-negative isolates, J Clin Microbiol, 54, 1395–1399 (2016)
- [12] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS : Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes, Eurosurveillance, 23, 17–00672 (2018), (online), (DOI: 10.2807/1560–7917.ES.2018.23.6.17–00672), (accessed 2018–03–02)
- [13] Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW : Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China, Appl Environ Microb, 72, 3832–3845 (2006)
- [14] Lindsey RL, Garcia-Toledo L, Fasulo D, Gladney LM, Strockbine N : Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*, J Microbiol Meth, 140, 1–4 (2017)
- [15] Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y : A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, FEMS Microbiol Lett, 184, 53–56 (2000)
- [16] Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y : PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, Antimicrob Agents Chemother, 50, 791–5 (2006)
- [17] Peng Z, Li X, Hu Z, Li Z, Lv Y, Lei M, Wu B, Chen H, Wang X : Characteristics of carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and MCR-1 from pig farms in China, Microorganisms, 7, 482 (2019)
- [18] Workneh M, Wang R, Kazmi AQ, Chambers KK, Opene BNA, Lewis S, Goodman K, Tamma PD, Carroll KC, Milstone AM, Simner PJ : Evaluation of the direct MacConkey method for identification of carbapenem-resistant gram-negative organisms from rectal swabs: reevaluating zone diameter cutoffs, J Clin Microbiol, 57, e01127–19 (2019), (online), (DOI: 10.1128/JCM.01127–19), (accessed 2021–01–22)
- [19] Yamamoto Y, Calvopina M, Izurieta R, Villacres I, Kawahara R, Sasaki M, Yamamoto M : Colistin-resistant *Escherichia coli* with *mcr* genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador, BMC Research Notes, 12, 121 (2019)
- [20] Sato T, Fukuda A, Usui M, Shinagawa M, Shiraishi T, Tamura Y, Takahashi S, Yokota SI : Isolation of a *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* isolate from a human clinical setting in Sapporo, Japan, J Glob Antimicrob Re, 13, 20–21 (2018)
- [21] Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, Zhou H, Lei L, Li HY, Doi Y, Fang Y, Ren H, Zhong LL, Shen Z, Zeng KJ, Wang S, Liu JH, Wu C, Walsh TR, Shen J : Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: An epidemiological and clinical study, Lancet Infect Dis, 17, 390–399 (2017)
- [22] Tada T, Uechi K, Nakasone I, Nakamatsu M, Satou K, Hirano T, Kirikae T, Fujita J : Emergence of IncX4 plasmids encoding *mcr-1* in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in Japan, Int J Infect Dis, 75, 98–100 (2018)
- [23] Nishino Y, Shimojima Y, Suzuki Y, Ida M, Fukui R, Kuroda S, Hirai A, Sadamasu K : Detection of the *mcr-1* gene in colistin-resistant *Escherichia coli* from retail meat in Japan, Microbiol Immunol, 61, 554–557 (2017)
- [24] Ohsaki Y, Hayashi W, Saito S, Osaka S, Taniguchi Y, Koide S, Kawamura K, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N : First detection of an *Escherichia coli* strain harboring the *mcr-1* gene in retail domestic chicken meat in Japan, Jpn J Infect Dis, 70, 590–592 (2017)

Prevalence of Mobile Colistin Resistance Gene-positive *Enterobacteriaceae*
and Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Swine
and Broiler Chicken in Okinawa

Tetsuya KAKITA^{1)†}, Sho OKANO²⁾, Takashi KATO²⁾, Masato MIYAHIRA¹⁾,
Taketoshi TAKARA¹⁾, Yumani KUBA¹⁾, Minoru NIDAIRA¹⁾
and Hisako KYAN¹⁾

1) *Department of Biological Sciences, Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment,
17-1 Kanekadan, Uruma-shi, 904-2241, Japan*

2) *Chuo Meat Hygiene Inspection Center, 2015 Ozato Ozato, Nanjo-shi, 901-1202, Japan*

SUMMARY

Infectious diseases caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) and mobile colistin resistance gene-positive *Enterobacteriaceae* have attracted attention in the medical and animal husbandry fields. In this study, we investigated the prevalence of CRE and mobile colistin resistance gene-positive *Enterobacteriaceae* in swine and broiler chicken in Okinawa as an indicator of resistant bacterial control. Although CRE was not detected, mobile colistin resistance genes *mcr-1*, *mcr-3*, and *mcr-5* in *Enterobacteriaceae* such as *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia albertii*, and *Klebsiella pneumoniae* were found in 38.1% (137/360) and 41.8% (141/346) of the healthy swine and diseased broiler chickens, respectively. Because bacterial strains were isolated using SuperPolymyxin medium, a selection medium for colistin-resistant strains, the positive rate might be higher than those previously reported. Colistin resistance gene-positive *Enterobacteriaceae* are widely found in Okinawa; therefore, it is essential to monitor their prevalence.

— Key word : broiler chicken, colistin, *Enterobacteriaceae*, *mcr-1*, swine.

† Correspondence to : Tetsuya KAKITA (*Department of Biological Sciences, Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment*)

17-1 Kanekadan, Uruma-shi, 904-2241, Japan TEL 098-987-8222 FAX 098-987-8210

E-mail : kakitatt@pref.okinawa.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 569 ~ 575 (2021)