

## 原 著

## 腸管外病原性大腸菌による哺乳豚の大規模死亡事例

渡戸英里<sup>1)†</sup> 稲葉七巳<sup>2)</sup> 小松徹也<sup>1)</sup> 杉江建之介<sup>1)</sup>  
井田雄三<sup>1)</sup> 芝原友幸<sup>3),4)</sup> 楠本正博<sup>3)</sup>

- 1) 愛知県中央家畜保健衛生所 (〒444-0805 岡崎市美合町地藏野 1-306)
- 2) 愛知県東部家畜保健衛生所 (〒441-8113 豊橋市西幸町古並 51-1)
- 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
- 4) 大阪府立大学大学院生命科学研究所 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北 1-58)

(2020年11月2日受付・2021年4月30日受理)

## 要 約

愛知県内の1養豚場で、哺乳豚の下痢を伴う死亡が増加し、アンピシリン、オキシテトラサイクリンによる治療で改善せず、約3週間で経産母豚6腹由来の哺乳豚95頭中50頭が死亡した。死亡哺乳豚4頭を剖検したところ、病理組織学的検査では、全身臓器に大腸菌O7抗原陽性のグラム陰性桿菌を伴う重度化膿性漿膜炎が認められた。細菌培養では、全頭の全身臓器から大腸菌O7株が分離された。以上から、本症例を大腸菌O7株による腸管外病原性大腸菌感染症と診断した。分離されたO7株は多剤耐性を示し、PCRでCMY-2型AmpC  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子の保有が確認された。本例は、感受性薬剤のエンロフロキサシンの投与により沈静化したことから、農場内で頻回使用されていた薬剤による選択圧が発端となり、重篤化に繋がった可能性が考えられた。

——キーワード：AmpC, CMY-2, ExPEC, O7, 哺乳豚。

-----日獣会誌 74, 623~630 (2021)

大腸菌症は、特定の病原因子を持つ大腸菌による感染症であり、豚においては毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) による新生期下痢や離乳後下痢、志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) による浮腫病、腸管外病原性大腸菌 (extraintestinal pathogenic *E. coli*: ExPEC) による敗血症や尿路感染症に大別される [1, 2]。新生豚における敗血症は、国内でも古くより早発性大腸菌症として知られ、死亡率も高いことが報告されているが [1, 3]、近年、詳細な症例報告は少なく、特定の病原因子や感染経路等、未解明な点が多く残されている。また、ExPECは豚以外の畜種や人にも感染し、第3~4世代セファロスポリン系抗菌薬を分解する基質特異性拡張型  $\beta$ ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL) 産生株や AmpC 型  $\beta$ ラクタマーゼ産生株も報告されていることから [4]、薬剤耐性 (AMR) 対策の観

点でも注視していく必要がある。今回、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する大腸菌 O7 株による ExPEC 感染症で、哺乳豚が多数死亡する事例に遭遇したので、詳細を報告する。

## 材料及び方法

**発生農場：**本症例は、母豚20頭を飼養する愛知県内の一貫経営農場で発生した。発生状況については、2018年6月11日病性鑑定立ち入り時及び9月3日結果説明時に聞き取り調査を行った。当該農場では3年ごとの抗体検査で豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルス抗体陰性を確認しており、PRRS ワクチンを接種していなかった。

**死亡哺乳豚の剖検及び病理組織学的検査：**死亡哺乳豚4頭 (No. 1, 2: 18日齢, No. 3, 4: 11日齢) を剖検し、試験に供試した。主要臓器を10%緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキ

† 連絡責任者：渡戸英里 (愛知県中央家畜保健衛生所)

〒444-0805 岡崎市美合町地藏野 1-306

☎ 0564-57-8243 FAX 0564-57-8241

E-mail: eri\_watando@pref.aichi.lg.jp

シリニン・エオジン (HE) 染色, グラム染色及び免疫組織化学的染色 (immunohistochemistry : IHC) を施して鏡検した. IHC は一次抗体に大腸菌 O7 抗血清 (Statens Serum Institut, Denmark) を用い, 市販キット (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI), (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) の手順に従って実施した.

**ウイルス学的検査:** 哺乳豚の糞便を用い, 豚流行性下痢ウイルス (porcine epidemic diarrhea virus : PEDV), 豚伝染性胃腸炎ウイルス (transmissible gastroenteritis virus : TGEV) 及びロタウイルスについて遺伝子検査 [5-7] を実施した.

**死亡哺乳豚の細菌検査:** 無菌的に採取した肺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 脳, 小腸粘膜及び血液を直接塗抹法により, 羊血液寒天培地 (日水製薬(株), 東京), チョコレート寒天培地 EX II (日水製薬(株), 東京) 及び DHL 寒天培地 (日水製薬(株), 東京) に塗布し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した. DHL 寒天培地でピンク色を示したコロニーを選択し, 大腸菌特異遺伝子を標的とした PCR 法 [8, 9] により同定を行った. PCR は, 用いた酵素 (TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase, タカラバイオ(株), 滋賀) のプロトコールに従い, 98°C 10 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分の反応を 30 サイクルの条件で行った.

**母豚及び種雄豚の大腸菌検査:** 母豚の糞便 16 検体及び種雄豚の糞便 3 検体を直接塗抹法により, DHL 寒天培地に塗布し, 37°C, 24 時間, 好気培養した. 菌株の同定は死亡哺乳豚由来株と同様に実施した.

**O 群血清型別:** 大腸菌及びボイド赤痢菌の市販抗血清 (デンカ生研(株), 東京及び Statens Serum Institut, Denmark) を用いた凝集反応により, 型別を実施した.

**病原性関連遺伝子及び病原性遺伝子の検査:** 死亡哺乳豚由来 O7 株 19 検体及び母豚由来 O7 株 1 検体を試験に供試した. 表 1 に示す ExPEC 関連因子 15 種 [10, 11] 及び下痢原性因子 12 種 [12] を PCR 法により検索した.

**パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析:** 死亡哺乳豚由来 O7 株 6 検体 (No. 1 肝臓, No. 2 脾臓, No. 3 腎臓, No. 4 肺・肝臓・小腸) 及び母豚由来 O7 株 1 検体を試験に供試した. 既報 [13] に従いサンプルプラグを作成後, 市販の制限酵素 (Xba I, タカラバイオ(株), 滋賀) で 37°C, 6 時間反応させた. 泳動装置 (CHEF-DR III, Bio-Rad, U.S.A.) を用い, 14°C の ×0.5 Tris-borate-EDTA (TBE) 緩衝液中で, 電圧 6.0V/cm, パルスタイム 5~50sec の条件下で 22 時間泳動した [14, 15]. Hunter ら [16] の手法に従い, DNA サイズマーカーには *Salmonella* Braenderup H9812 を使用した. PFGE パターン分類は Tenover ら [17] の基準に従った.

表 1 検索した病原性及び病原性関連遺伝子

病原因子		
ExPEC 関連因子	コリシン V プラスミドオ ペロン遺伝子	<i>cva/cvi</i>
	付着因子	<i>afa, F17, papC</i>
	毒素	<i>cnf2, cdtB, vat, astA</i>
	血清抵抗性	<i>iss</i>
	血球凝集能	<i>tsh</i>
	鉄捕捉因子	<i>iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2</i>
下痢原性 因子	付着因子	<i>F4, F5, F6, F41, F18, eae</i>
	毒素	<i>LT, STa, STb, Stx1, Stx2e, EAST1</i>

**multilocus sequence typing (MLST) 解析:** 死亡哺乳豚及び母豚から検出された O7 株すべてについて, 大腸菌の sequence type (ST) を決定した. ST は, 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*) を PCR で増幅後精製し, シークエンス解析により解読した塩基配列をデータベース (<https://pubmlst.org/>) で照合することにより決定した [18].

**薬剤感受性試験:** 死亡哺乳豚由来 O7 株 19 検体及び母豚由来 O7 株 1 検体を試験に供試した. アンピシリン (ABPC), アモキシシリン (AMPC), ピペラシリン (PIPC), セファゾリン (CEZ), セフロキシム (CXM), セフトオフル (CTF), セフォタキシム (CTX), セフトジジム (CTZ), セフェピム (CFPM), セフォキシチン (CFX), モクサラクタム (LMOX), アズトレオラム (AZT), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), オキシテトラサイクリン (OTC), ドキシサイクリン (DOXY), ST 合剤 (ST), ナリジクス酸 (NA), エンロフロキサシン (ERFX), オルビフロキサシン (OBFX), ノルフロキサシン (NFLX) 及びクロラムフェニコール (CP) の 25 薬剤を用いて薬剤感受性試験を実施した. ABPC, AMPC, PIPC, CEZ, CXM, CTX, CTZ, CFPM, CFX, LMOX, AZT, IPM, MEPM, SM, KM, GM, OTC, DOXY, ST, NA, NFLX, CP はセンシディスク (Becton, Dickinson and Company, U.S.A.), CTF, ERFX, OBFX は VKB ディスク (栄研化学(株), 東京) をそれぞれ用いたディスク拡散法を実施した.

第 3 世代セファロsporin 系薬剤 (CTF, CTX, CTZ) に耐性が認められた株については, AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学(株), 東京) を用い, AmpC/ESBL 産生菌鑑別試験を実施した. また, *bla*<sub>CMY-2</sub> について, PCR 法による β ラクタマーゼの遺伝子型別

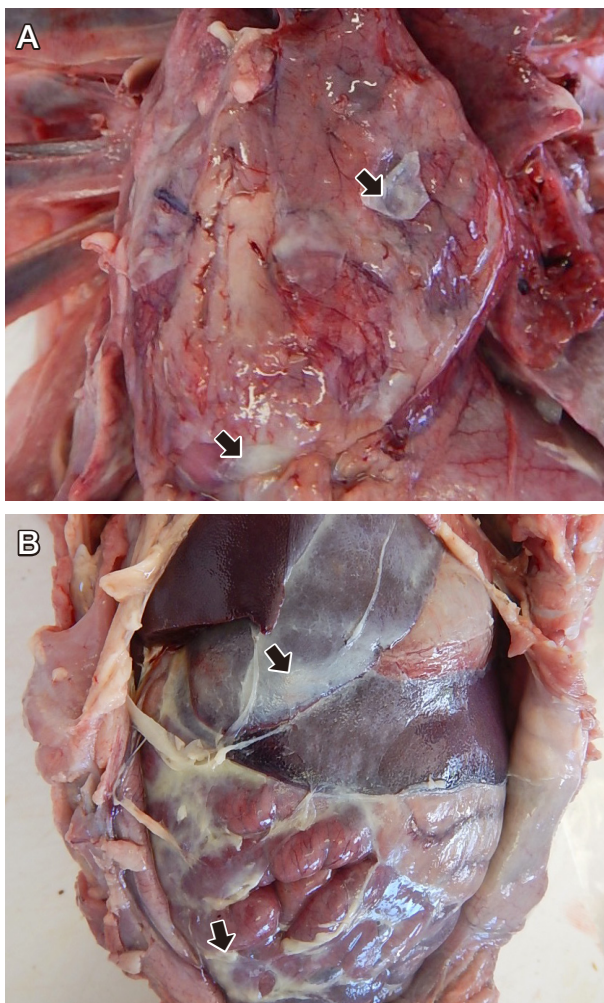


図1 No. 2 (A: 胸腔, B: 腹腔)  
 広範囲にわたり線維素(矢印)の付着が認められる。

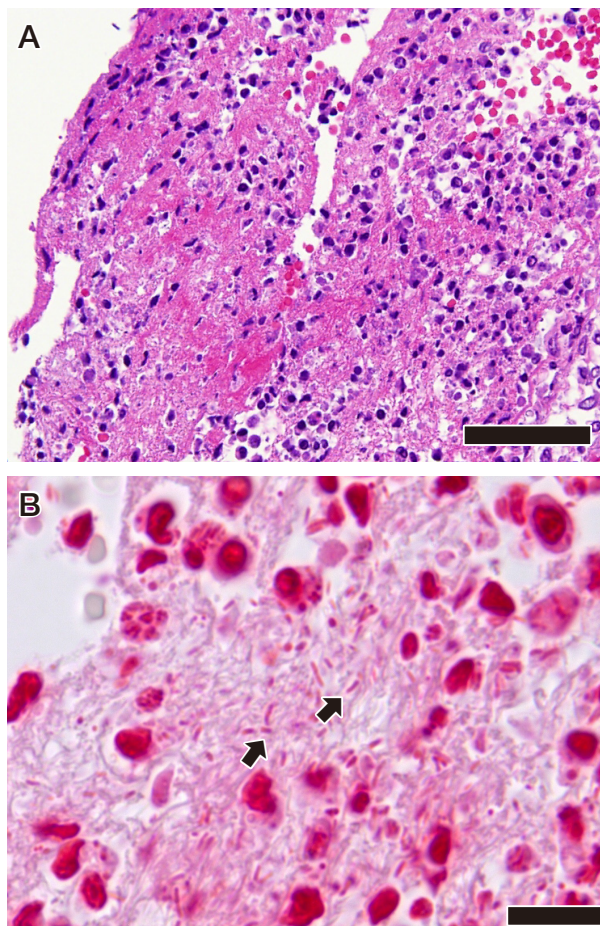


図2 No. 2 肺胸膜  
 A: 高度に肥厚し, 炎症細胞の浸潤, 線維素の析出, 菌体の浸潤を伴う。(HE 染色 Bar=50 $\mu$ m)  
 B: 炎症部に一致して多数のグラム陰性桿菌が認められる。(グラム染色 Bar=10 $\mu$ m)

[19] を実施した。

### 成 績

**発生状況:** 聞き取り調査の結果, 10日齢前後の哺乳豚にクリーム状の下痢が散発し, 死亡数が増加した。ABPC, OTCによる治療を行ったが改善は認められず, 2018年5月25日からERFXの投与を開始した6月15日までの約3週間に, 6腹(すべて経産)由来の哺乳豚95頭中50頭(53%)が死亡した。発症豚の母豚には, 食欲低下が認められた個体もあり, 産褥熱を呈した2頭は, ABPCの2回投与により改善した。分娩房を含む豚舎環境は衛生的に管理され, 分割授乳や里子も実施しており, 発病に関連したと類推される管理失宜については確認することができなかった。

**死亡哺乳豚の剖検及び病理組織学的検査成績:** 剖検では, 4頭すべての胸腔及び腹腔内に線維素の析出が認められた(図1)。No. 1, 4には腹水の貯留, No. 1, 3には鼠径リンパ節や浅頸リンパ節の腫脹もみられた。組織

所見では, 肝臓, 腎臓, 肺, 消化管の漿膜や腹膜は肥厚し, 好中球主体の炎症細胞浸潤, 線維素の高度析出, グラム陰性桿菌からなる細菌塊が多数みられた(図2)。また, 同部位で血管炎や血管周囲炎も観察された。大腸菌O7抗血清を用いたIHCでは, グラム陰性桿菌に一致して陽性反応が認められた(図3)。

**ウイルス学的検査成績:** PEDV, TGEV及びロタウイルスの遺伝子はいずれも検出されなかった。

**死亡哺乳豚の細菌検査成績:** 表2に示すとおり, 羊血液寒天培地, チョコレート寒天培地EX II及びDHL寒天培地のいずれにおいても大腸菌様のコロニーが純培養的に分離された。分離された大腸菌はすべて非溶血性だった。

**母豚及び種雄豚の大腸菌検査成績:** 母豚の糞便16検体及び種雄豚の糞便3検体より, 大腸菌23株が分離された(表2)。

**O群血清型別成績:** 死亡哺乳豚由来23株中19株がO7と型別された。その他の分離株は, 血清型O23と

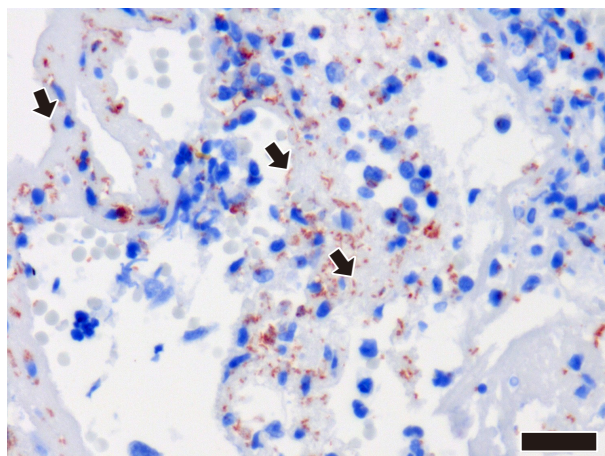


図3 No. 2 肺胸膜  
グラム陰性桿菌は大腸菌 O7 抗血清に対し陽性反応 (矢頭) を示す。(IHC 染色 Bar=20 $\mu$ m)

O86 がそれぞれ 1 株, 型別不能が 2 株であった。母豚及び種雄豚由来 23 株については, 母豚由来 1 株のみが O7 と型別された。その他の分離株は, 母豚からは血清型 O22, O75, O88, O89, O98 及び O113 が 1 株ずつで, 残り 12 株は型別不能であり, 種雄豚からは血清型 O38, O179 及び OSB16 が 1 株ずつで, 残り 1 株は型別不能であった (表 2)。

**病原性関連遺伝子及び病原性遺伝子の検査成績:** O7 に型別された死亡哺乳豚 19 株及び母豚由来 1 株から共通して ExPEC 関連因子 (*cva/cvi*, *astA*, *iss*, *iucD*, *fyuA*, *iutA*, *irp1*, *irp2*) 及び下痢病原性因子 (*EAST1*) が検出された (表 2)。

**PFGE による分子疫学的解析成績:** 供試した 7 株は, PFGE において全株同一泳動パターンを示した (図 4)。

**MLST 解析成績:** 供試した 20 株はすべて ST38 に型別された (表 2)。

**薬剤感受性試験成績:** 死亡哺乳豚及び母豚由来の O7 株は共通して 25 薬剤中 14 薬剤 (ABPC, AMPC, PIPC, CEZ, CXM, CTF, CTX, CAZ, CFX, SM, OTC, DOXY, ST, CP) に耐性を示し, CFPM, LMOX, AZT, IPM, MEPM, KM, GM, NA, ERFX, OBFX, NFLX には感受性を示した。O7 株は, AmpC/ESBL 産生菌鑑別試験において, AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼ産生株と判定され, PCR 法による  $\beta$  ラクタマーゼの遺伝子型別において, *bla*<sub>CMY-2</sub> 遺伝子が検出された。

## 考 察

死亡哺乳豚から大腸菌 O7 株が分離され, 23 株中 19 株が同一性状を示した。病理検査では全身臓器に重度化膿性漿膜炎が認められ, IHC では O7 抗原が検出された。以上から, 本症例を O7 株による ExPEC 感染症と診断

M 1 2 3 4 5 6 7 M

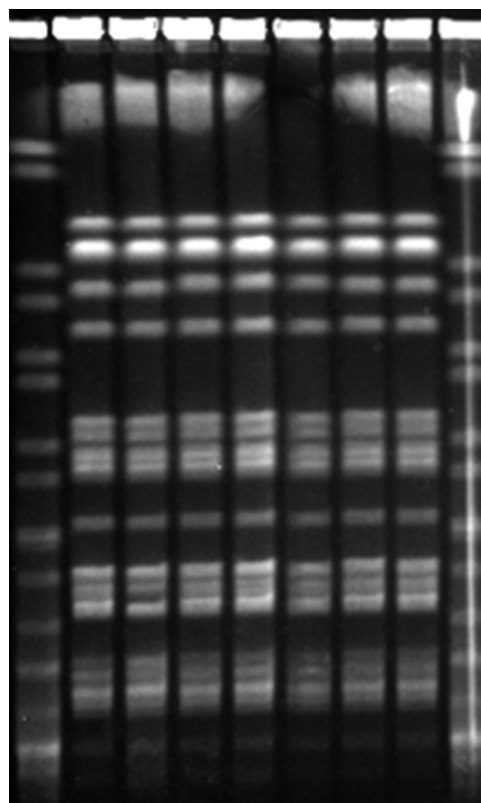


図4 死亡哺乳豚及び母豚由来大腸菌血清型 O7 株の PFGE 泳動像  
1: 死亡哺乳豚 No. 1 肝臓由来株  
2: 死亡哺乳豚 No. 2 脾臓由来株  
3: 死亡哺乳豚 No. 3 腎臓由来株  
4: 死亡哺乳豚 No. 4 肺由来株  
5: 死亡哺乳豚 No. 4 肝臓由来株  
6: 死亡哺乳豚 No. 4 小腸由来株  
7: 母豚 No. 3 糞便由来株  
M: *Salmonella* Braenderup H9812

した。また, 母豚由来 1 株が O7 に型別され, 病原性関連遺伝子保有パターン, 薬剤耐性パターン及び MLST が死亡哺乳豚由来株と完全に一致した。さらに, 死亡哺乳豚由来 O7 代表 6 株と母豚由来 O7 株が PFGE で同一泳動パターンを示したことから, 死亡哺乳豚由来 O7 株と母豚由来 O7 株は同一由来であり, 死亡哺乳豚は母豚から感染を受けたことが推察された。

大腸菌 O7 株は豚の ExPEC 感染症の一般的な血清型として記載はなく [1, 2], 国内の豚由来病原性大腸菌 967 株の調査 [20] では, O7 は 3 株のみ検出され, そのすべてが下痢由来株であった。一方で, 大腸菌 O7 株は人の ExPEC 感染症では一般的な血清型であり [21], 人と家畜で共通に分離される血清型の 1 つである可能性が示された。

原因菌は ETEC と異なり非溶血性で, 既報と合致していた [2, 22]. ExPEC 感染症の原因となる病原因子

表2 分離大腸菌の血清型・病原性関連遺伝子プロファイル・MLST

血清型	病原性関連遺伝子プロファイル	MLST	株数	分離由来	由来豚
O7	<i>cva/cvi, astA, iss, iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2, EAST1</i>	ST38	2	肺, 肝臓	哺乳豚 1
UT	NT	NT	1	脾臓	
O86	NT	NT	1	小腸	
O7	<i>cva/cvi, astA, iss, iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2, EAST1</i>	ST38	3	肺, 脾臓, 肝臓	哺乳豚 2
UT	NT	NT	1	小腸	
O7	<i>cva/cvi, astA, iss, iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2, EAST1</i>	ST38	7	肺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 脳, 血液	哺乳豚 3
O23	NT	NT	1	小腸	
O7	<i>cva/cvi, astA, iss, iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2, EAST1</i>	ST38	7	肺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 脳, 小腸	哺乳豚 4
O113	-	NT	1		母豚 1
O7	<i>cva/cvi, astA, iss, iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2, EAST1</i>	ST38	1		母豚 3
O22	-	NT	1		母豚 4
UT	<i>tsh</i>	NT	1		母豚 5
UT	<i>fyuA, irp1, irp2</i>	NT	1		母豚 7
O98	<i>iutA, iucD</i>	NT	1		母豚 8
O88	<i>tsh</i>	NT	1		母豚 9
UT	<i>tsh</i>	NT	1		母豚 10
O89	-	NT	1	糞便	母豚 11
UT	<i>tsh</i>	NT	1		母豚 13
O75	-	NT	1		母豚 15
UT	-	NT	8		母豚 1, 2, 3, 6, 7, 12, 14, 16
O179	-	NT	1		種雄豚 1
OSB16*	-	NT	1		種雄豚 2
O38	-	NT	1		種雄豚 3
UT	-	NT	1		

- : 遺伝子非検出, NT : 検査未実施, UT : 型別不能

\*OSB16 : *Shigella boydii* type16 (ボイド赤痢菌 16 型)

は特定されていないが、鶏では *cva/cvi, vat, iss, tsh, iucD, irp2* [23, 24], 牛では *afa, F17, cnf2, cdtB, fyuA, iutA, irp1, irp2* [25], 豚では *ompA, fimH, vat, traT, iutA* [26] の保有率が、病畜由来株で高い

と報告されている。特に、鉄捕捉因子は ExPEC 感染症の病原性との関連が指摘されている [27]。本症例の原因菌も、コリシン V プラスミドオペロン遺伝子 (*cva/cvi*)、毒素 (*astA*) に加え、血清抵抗性 (*iss*) や複数の鉄捕捉因子 (*iucD, fyuA, iutA, irp1, irp2*) を保有しており、血中で増殖しやすい性質により、哺乳豚に全身感染を引き起こしたと考えられた。

原因菌は第 3 世代セファロスポリン系抗菌薬を含む多剤 (ABPC, AMPC, PIPC, CEZ, CXM, CTF, CTX, CAZ, CFX, SM, OTC, DOXY, ST, CP) に耐性を示し、調査の結果、*bla<sub>CMY-2</sub>* を保有する AmpC  $\beta$  ラクタマーゼ産生株と判明した。本症例は感受性薬剤の ERFX の投与により沈静化し、農場内で下痢及び産褥熱発症時の治療に ABPC を頻回使用していたことが AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼ産生株である今回分離された O7 株の選択圧となった可能性が考えられた。

ExPEC 感染症は子豚の生理的免疫不全と初乳の摂取失宜に関連して発症し、菌側の要因よりも宿主側の条件が密接に関連する [1] とされており、ExPEC 関連因子は子豚の共生大腸菌からも検出されたとする報告 [28] がある。今回、初乳の摂取や血清抗体について詳細な調査はできなかったが、母豚に食欲低下や産褥熱が認められた以外、飼養衛生管理面で大きな問題は認められなかった。木崎ら [29] は、大腸菌 O166 による哺乳豚の ExPEC 感染症の症例について、農場の一部の哺乳豚において初乳を介した受動免疫の獲得が不十分だったことを指摘している。本症例も母豚に不調が認められたことから、泌乳量が低下していた可能性があり [30]、子豚への初乳を介した免疫付与にばらつきが生じた可能性が疑われた。

原因菌は MLST で ST38 に型別された。ExPEC の中で、ESBL 産生菌が多く含まれ、世界的に問題となっている型は ST131 であるが、ST38 も、ST131 に比べると頻度は少ないものの、CTX-M-9 型、CTX-M-14 型、CTX-M-15 型などの ESBL 産生菌をはじめとする多剤耐性菌が含まれる ST として挙げられており、OXA-48 型カルバペネマーゼや NDM-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌も見つかっている [4, 31]。今回分離された O7 株は、検査の結果、ESBL 及びカルバペネマーゼ産生株であることは否定されたが、家畜でも以前より報告されている CMY-2 型 AmpC  $\beta$  ラクタマーゼ産生株だった [13, 32]。MLST データベースにおいて、ST38 は、人、鶏を中心に、少数ではあるが、家畜 (牛、豚)、伴侶動物などのさまざまな材料から分離され、ST38 かつ O7 の株もカナダの鶏から分離されている。*bla<sub>CMY-2</sub>* を保有する ST38 も、人、鶏、牛、鶏肉などのさまざまな材料から分離された報告がある [33, 34]。今回分離された O7 株の農場への侵入経路は不明であり、これらの

株が畜種を越えて伝播するかについては、今後情報を集積していく必要があると思われる。

本症例の細菌学的検索に協力いただいた宮崎県宮崎家畜保健衛生所 吉田恵理苗氏、鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 馬籠麻美氏、病理組織学的検索に協力いただいた農研機構・動物衛生研究部門の小林 勝技師、嶋田恵美技師に深謝する。また、本報告をまとめるにあたり、助言いただいた京都府中丹家畜保健衛生所 吉崎康二郎氏、栃木県県央家畜保健衛生所 土合理美氏、長野県松本家畜保健衛生所 徳武慎哉氏に感謝する。

## 引用文献

- [1] 中澤宗生：大腸菌病，豚病学，柏崎 守他編，第四版，328-337，近代出版，東京（1999）
- [2] Fairbrother JM, Gyles CL : Colibacillosis, Diseases of swine, Zimmerman JJ, et al eds, 11th ed, 807-834, John Wiley & Sons, West Sussex (2019)
- [3] 浪岡茂郎：子豚の大腸菌症，日獣会誌，36，178-185（1983）
- [4] Pitout JD : Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance, *Front Microbiol*, 3, 9 (2012), (online), (DOI: 10.3389/fmicb.2012.00009), (accessed 2020-05-22)
- [5] Park SJ, Moon HJ, Luo Y, Kim HK, Kim EM, Yang JS, Song DS, Kang BK, Lee CS, Park BK : Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses, *Virus Genes*, 36, 95-104 (2008), (online), (DOI: 10.1007/s11262-007-0164-2), (accessed 2020-05-20)
- [6] Paton D, Ibata G, Sands J, McGoldrick A : Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus, *J Virol Methods*, 66, 303-309 (1997), (online), (DOI: 10.1016/s0166-0934(97)00055-4), (accessed 2020-05-20)
- [7] Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle, *Arch Virol*, 157, 1063-1069 (2012), (online), (DOI: 10.1007/s00705-012-1271-5), (accessed 2020-05-20)
- [8] 山中啓一郎，民谷栄一：食の安全安心のためのオンサイト診断技術の開発，浦上財団研究報告，19，151-157（2012），（オンライン），（<https://www.urakamizaidan.or.jp/research/jisseki/2010/vol19urakamif-15tamiya.pdf>），（参照 2020-05-22）
- [9] Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM : Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil, *Appl Environ Microb*, 66, 844-849 (2000), (online), (DOI: 10.1128/aem.66.2.844-849.2000), (accessed 2020-05-22)
- [10] Ojima T, Hirano K, Honda K, Kusumoto M : Development of a multiplex PCR assay for rapid virulence factor profiling of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from cattle, *J Microbiol Methods*, 128, 31-33 (2016), (online), (DOI: 10.1016/j.mimet.2016.07.001), (accessed 2020-05-22)
- [11] Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH : Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction, *Avian Dis*, 49, 269-273 (2005), (online), (DOI: 10.1637/7293-102604r), (accessed 2020-05-22)
- [12] Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J : Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia, *Vet J*, 174, 176-187 (2007), (online), (DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.05.019), (accessed 2020-05-22)
- [13] Akiba M, Uchida I, Nishimori K, Tanaka K, Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Ohya T, Ito H : Comparison of *Salmonella enterica* serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified fragment length polymorphism fingerprinting, *Vet Microbiol*, 92, 379-388 (2003)
- [14] Liesegang A, Tschäpe H : Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains, *Int J Med Microbiol*, 291, 645-648 (2002)
- [15] 和田昭仁，寺嶋 淳，渡辺治雄：パルスフィールド電気泳動法（PFGE）による分子疫学的同定法，日本細菌学雑誌，52，763-775（1997）
- [16] Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E : Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard, *J Clin Microbiol*, 43, 1045-1050 (2005)
- [17] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol*, 33, 2233-2239 (1995)
- [18] Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M : Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective, *Mol Microbiol*, 60, 1136-1151 (2006)
- [19] Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K : Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3533-3537 (2005), (online), (DOI: 10.1128/aac.49.8.3533-3537.2005), (accessed 2020-05-22)
- [20] 楠本正博，岩田剛敏，秋庭正人：国内における新たな多剤耐性病原性大腸菌系統の出現，日本豚病研究会報，68，24-28（2016）
- [21] Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW : Extraintesti-

- nal pathogenic *Escherichia coli*, Foodborne Pathog Dis, 4, 134-163 (2007), (online), (DOI: 10.1089/fpd.2007.0087), (accessed 2020-05-22)
- [22] Nielsen NC, Bille N, Riising HJ, Dam A : Polyserositis in pigs due to generalized *Escherichia coli* infection, Can J Comp Med, 39, 421-426 (1975)
- [23] 木口陽介, 小嶋 暢, 遠藤千春, 齋藤友佳, 楠本正博 : プロイラーから分離された大腸菌の $\beta$ ラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究, 日獣会誌, 67, 739-746 (2014)
- [24] Kawano M, Yaguchi K, Osawa R : Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan, Microbiol Immunol, 50, 961-966 (2006)
- [25] 菅原 克, 松本裕一, 壁谷昌彦, 大西英高, 稲見健司, 穂積愛美, 佐藤敦子, 井戸徳子 : 子牛の腸管外病原性大腸菌感染症とPCRによる分離株の病原関連遺伝子の検索についての報告, 日獣会誌, 65, 689-693 (2012)
- [26] Zhu Y, Dong W, Ma J, Yuan L, Hejair HM, Pan Z, Liu G, Yao H : Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China, BMC Vet Res, 13, 94 (2017), (online), (DOI: 10.1186/s12917-017-0975-x), (accessed 2020-05-22)
- [27] Karch H, Schubert S, Zhang D, Zhang W, Schmidt H, Olschläger T, Hacker J : A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages, Infect Immun, 67, 5994-6001 (1999)
- [28] Bok E, Kozańska A, Mazurek-Popczyk J, Wojciech M, Baldy-Chudzik K : Extended phylogeny and extraintestinal virulence potential of commensal *Escherichia coli* from piglets and sows, Int J Environ Res Public Health, 17, 366 (2020), (online), (DOI: 10.3390/ijerph17010366), (accessed 2020-05-22)
- [29] 木崎あゆみ, 高橋真紀, 昆野雄介, 熊谷芳浩, 昆野 勝, 佐藤裕夫 : 腸管外病原性大腸菌 O166 による哺乳豚の線維素化膿性髄膜炎, 日獣会誌, 67, 747-753 (2014)
- [30] 石井泰明 : 豚の産前・産後の事故防止 一特に飼養管理(衛生管理を含む)を中心として一, 豚病研究会報, 35, 13-16 (1999)
- [31] Shaik S, Ranjan A, Tiwari SK, Hussain A, Nandanwar N, Kumar N, Jadhav S, Semmler T, Baddam R, Islam MA, Alam M, Wieler LH, Watanabe H, Ahmed N : Comparative genomic analysis of globally dominant ST131 clone with other epidemiologically successful extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages, mBio, 8, e01596-17 (2017), (online), (DOI: 10.1128/mBio.01596-17), (accessed 2020-05-22)
- [32] Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T : Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan, Acta Vet Scand, 53, 52 (2011), (online), (DOI: 10.1186/1751-0147-53-52), (accessed 2020-05-22)
- [33] Pietsch M, Irrgang A, Roschanski N, Brenner Michael G, Hamprecht A, Rieber H, Käsbohrer A, Schwarz S, Rösler U, Kreienbrock L, Pfeifer Y, Fuchs S, Werner G, RESET Study Group : Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany, BMC Genomics, 19, 601 (2018), (online), (DOI: 10.1186/s12864-018-4976-3), (accessed 2020-05-22)
- [34] Berg ES, Wester AL, Ahrenfeldt J, Mo SS, Slettemeås JS, Steinbakk M, Samuelsen Ø, Grude N, Simonsen GS, Løhr IH, Jørgensen SB, Tofteland S, Lund O, Dahle UR, Sunde M : Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *IncK/bla<sub>CMY-2</sub>* resistance plasmids, Clin Microbiol Infec, 23, 407.e9-407.e15 (2017), (online), (DOI: 10.1016/j.cmi.2016.12.035), (accessed 2020-05-22)

High Mortality in Suckling Piglets Caused by Extraintestinal Pathogenic  
*Escherichia coli*

Eri WATANDO<sup>1)†</sup>, Nanami INABA<sup>2)</sup>, Tetsuya KOMATSU<sup>1)</sup>, Kennosuke SUGIE<sup>1)</sup>,  
Yuzo IDA<sup>1)</sup>, Tomoyuki SHIBAHARA<sup>3),4)</sup> and Masahiro KUSUMOTO<sup>3)</sup>

- 1) *Aichi Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center, 1-306 Jizono, Miaicho, Okazaki, 444-0805, Japan*
- 2) *Aichi Prefectural Tobu Livestock Hygiene Service Center, 51-1 Konami, Nishimiyukicho, Toyohashi, 441-8113, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 4) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinkuorai Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*

SUMMARY

Fifty out of 95 suckling piglets, which were from six parous sows, died with diarrhea within 3 weeks on a swine farm in Aichi Prefecture. We examined four dead piglets. Severe purulent serositis was observed in multiple organs, and *Escherichia coli* O7 antigens were detected in the lesions by immunohistochemical staining. We isolated *E. coli* O7 strains from almost all organs. The results indicated that the mortality of the suckling piglets was caused by infection of extraintestinal pathogenic *E. coli* O7. All O7 strains were multi-drug resistant and testing produced CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase. The disease outbreak was successfully stopped by administration of ERFX, one of the effective antimicrobials for O7 strains. It appeared that the selective pressure caused by the drugs used frequently on the farm may have contributed to the initiation or severity of the disease. — Key words : AmpC, CMY-2, ExPEC, O7, suckling piglet.

† Correspondence to : Eri WATANDO (*Aichi Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center*)

*1-306 Jizono, Miaicho, Okazaki, 444-0805, Japan*

*TEL 0564-57-8243 FAX 0564-57-8241 E-mail : eri\_watando@pref.aichi.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 623 ~ 630 (2021)*