

第 314 回雑誌会

(June. 14th, 2019)

(1) **Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment**

Burow, E., Rostalski, A., Harlizius, J., Gangl, A., Simoneit, C., Grobbel, M., Kollas, C., Tenhagen, B and Kasbohrer, A.

Journal of Preventive Veterinary Medicine, **165**, 52-62 (2019).

Reviewed by H. Hiroki

養豚場において、抗菌薬による豚の病気の治療は薬剤耐性菌を発生させる原因となる。ヨーロッパ諸国では、豚の食肉生産率が高く、抗菌薬の使用量も多い。しかしながら、豚の抗菌薬による治療と薬剤耐性菌の発生における関係性を調査した研究は少ない。そこで本研究では、豚の生涯にわたる抗菌薬の使用が、薬剤耐性菌の発生に及ぼす影響について調査した。試料は、2015年4月から2016年10月において、ドイツに存在する29の養豚場から選定された58匹の母豚と、その母豚から出生した子豚406匹を対象とし、直腸から滅菌綿棒を用いて、ふん便を採取した。子豚は、ふん便を各期間（乳児期間、離乳期間、肥育期間、最終肥育期間、および屠殺期間）において1回ずつ、合計5回採取した。採取したふん便を滅菌生理食塩水に希釈してBTB乳糖加寒天培地に塗布し、37°Cで24時間培養した。培養後、生育したコロニーを単離し、イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いて細菌種を同定した。大腸菌と同定された株について、最小発育阻止濃度（MIC）法を用いて13種類の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施した。さらに、得られた結果から、Fisher検定とロジスティック分析を用いて試料間の関係性を評価した。

1剤以上に耐性を持つ大腸菌が検出された割合は、各期間において、それぞれ93% (374/403株)、100% (386/386株)、99% (337/339株)、99% (312/313株)、および98% (253/258株)であった。アンピシリンとテトラサイクリンにおける耐性菌は、子豚に治療を施す前に高確率で検出されたため、養豚場に普遍的に存在する可能性がある。さらに、 β -ラクタム系抗菌薬の耐性菌は、治療を受けた豚の方が、治療を受けていない豚と比較して、検出割合が有意に高かった ($p < 0.05$)。また、各抗菌薬の投与経路（飼料、水、注射、ドレンチャー）と子豚における耐性菌の発生割合について相関を確認した結果、Fisher検定では、いくつかの経路で有意な相関を示した ($p < 0.05$) が、ロジスティック分析においては相関が認められなかった。次に、母豚と子豚における耐性菌の検出割合を比較した結果、母豚が耐性菌を保有していた場合、子豚も同様の抗菌薬に高確率で耐性を示した。以上のことより、抗菌薬による治療と耐性菌の関係性は示された。今後も更なる

調査によるデータ蓄積が必要である。

(2) Multiplex PCR coupled with direct amplicon sequencing for simultaneous detection of numerous waterborne pathogens

Li, B., Saingam, P., Ishii, S. and Yan, T.

Applied Microbiology and Biotechnology, **103**, 953-961 (2019).

Reviewed by H. Shimizu

水環境中に存在する病原微生物による水系感染症は、世界中で問題となっている。現在、水環境中の潜在的リスクを監視するため、ふん便指標細菌（FIB）が用いられている。しかしながら、病原微生物は種類が多く、FIB の情報のみではその存在実態を把握することは困難である。そこで本研究では、水試料から病原細菌を一斉検出することを目的として、細菌の DNA を基に複数の病原細菌を検出するマルチプレックス PCR（mPCR）法と次世代シーケンシング（NGS）法を組み合わせた mPCR-NGS 法を検討した。供試菌株は、9 種類の病原細菌とし、16 種類の病原遺伝子を標的とした。病原細菌を培養し、DNA 抽出後、濃度を 3.4 ng/μL に調整した試料を作成した。次に、それぞれの標的遺伝子に特異性を示すプライマーを設計し、mPCR 法における特異性と最適アニーリング温度を検討した。そして、PCR 増幅産物について、NGS 法で病原遺伝子を検出した。また、3 つの都市河川から試料（SW1~3）を採取し、DNA 抽出後、mPCR-NGS 法によって、病原遺伝子を検出した。さらに、SW1~3 に以下に示す 3 つのグループの細菌の DNA を添加した試料（SWG1~3）を用いて、mPCR-NGS 法を行い、病原遺伝子を検出した：G1 (*Escherichia coli* K12, *E. coli* O157:H7, *Shigella flexneri*), G2 (*Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*), G3 (*Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*)。

設計したプライマーを用いて mPCR 法を行った結果、全ての標的遺伝子において DNA の増幅が確認され、最適アニーリング温度は 54°C であった。PCR 増幅産物を NGS 法によって解析した結果（mPCR-NGS 法）、*L. pneumophila* の *mip* 遺伝子と *V. cholerae* の *ctxA* 遺伝子以外の病原遺伝子が検出され、その相対存在量は 0.006~21.5%であった。検出頻度の違いが確認され、PCR 増幅効率の相違が原因であることが示唆された。SW1~3 を mPCR-NGS 法によって解析したところ、標的遺伝子はほとんど検出されなかった。また、DNA 抽出した SWG1~3 について mPCR-NGS 法で解析したところ、それぞれ添加した病原細菌の標的遺伝子が検出され、その相対存在量は 0.03~9.6%, 0.03~22.4%および 0.005~0.37%であった。以上のことから、mPCR-NGS 法によって水試料から水系病原菌を検出することが可能であることがわかった。しかし、PCR 増幅効率が異な

るといった問題も浮き彫りとなった。今後は、増幅効率を改善し、さらなる高感度検出を目指す必要がある。