

特集

呼吸器感染症の最新診断法の評価

Q 熱*

岸本 寿男**
小川 基彦**
安藤 秀二**

Key Words : Q fever, *Coxiella burnetii*, diagnosis

はじめに

Q 熱は重要な人獣共通感染症であり、欧米では、市中肺炎における非定型病原体のひとつとして一般に認知されている。一方、日本では、まだ診断法の一般化や診断基準の標準化が十分なされていないため、実態の把握が遅れている。国内でもこれまでの疫学的な検討やサーベイランスの成績から、稀な疾患ではないと考えられるが、感染症法の4類全数報告疾患として発生動向調査で報告される数は年に10~40例程度にとどまっている。これが実態を反映しているかどうかは検討の必要がある。ここでははじめに簡単にQ熱の現状に触れ、とくにQ熱の現在の診断法における評価と課題、最新の診断法について述べてみたい。

Q熱について

1935年オーストラリアの屠畜場従業員の間で流行した原因不明の熱性疾患として発見され、のちにリケッチアの一種 *Coxiella burnetii* による感染症であることが明らかにされた。Q熱という病名は、「Query fever=不明熱」に由来している。*C. burnetii* は従来リケッチア科コクシエラ属に分類されていたが、最近の遺伝子学的な解析

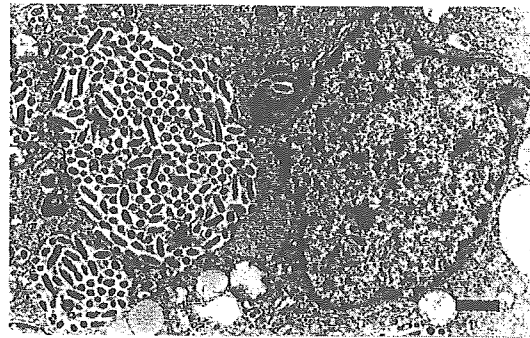


図1 マウス脾臓中の *Coxiella burnetii* (元静岡県環境衛生科学研究所・長岡宏美博士提供)

による新たな分類ではレジオネラ目コクシエラ科コクシエラ属に変更された。*C. burnetii* は細胞内でのみ増殖できる偏性細胞内寄生細菌で、人工培地では増殖できない。小桿菌で、その大きさは $0.2 \sim 0.4 \times 1.0 \mu\text{m}$ 、一般細菌の球菌の $1/2 \sim 1/4$ である。多型性を示し、増殖時の菌の形態には大型菌体 (large cell variant; LCV) と小型菌体 (small cell variant; SCV) とがある (図1)。ともに感染性があり、LCVは浸透圧に対し抵抗性が低いが、SCVは芽胞様構造を示し、熱、乾燥、消毒等に抵抗性のため、環境中で長期間安定である。そのため、ほかのリケッチアのように菌の伝播にダニなどのベクターを必要としない。また、本菌はI相菌およびII相菌とよばれている腸内細菌に似た相変異を起こす。I相菌は野外株で菌体

* Diagnosis of Q fever.

** Toshio KISHIMOTO, M.D., Ph.D., Motohiko OGAWA, V.D., Ph.D. & Shuji ANDO, V.D., Ph.D.: 国立感染症研究所ウイルス第一部(〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1); Laboratory of Chlamydia & Rickettsia, Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, JAPAN

表面にリポ多糖(LPS)を保有し、I相菌を発育鶏卵や培養細胞を用いて長期継代し弱毒化した株でLPSを保有しないII相菌となる¹⁾²⁾。このI相菌およびII相菌が血清診断には重要である。

Q熱の感染様式と病態

自然界では多くの動物やダニが本菌を保有しており、感染動物の尿、糞、乳汁などに排泄され、環境を汚染する。ヒトへの感染源は主に家畜や愛玩動物の排泄物であり、これらに汚染された環境中の粉塵やエアロゾルを吸入し感染する。稀にウシやヒツジの未殺菌の乳製品・生肉などを摂食し感染することもある。感染動物は通常不顕性感染で無症状であるが、妊娠しているウシやヒツジが感染すると、胎盤で爆発的に増殖し流産や死産を起こすこともある。このため、菌を大量に含む胎盤や羊水が原因となったヒトの集団感染が諸外国で多く報告されている。また、ネコの出産や流産に関連した感染もあり、本邦ではネコとの関連が示唆される例が多い。一方で、ヒトからヒトへの感染はほとんど起こらない。

病態は大きく急性と慢性に分けられる。急性型の潜伏期は一般的には2~3週間で、感染量が多いと短くなる。症状は発熱、頭痛、筋肉痛、全身倦怠感、呼吸器症状などで、インフルエンザ様である。主症状が肺炎、肝炎、あるいは発熱主体等で、「肺炎型」「肝炎型」「不明熱型」の3つのパターンがみられ、その臨床像は多彩である。皮疹がみられることは稀である。検査所見では、CRP、肝酵素(GOT, GPT)の上昇、血小板減少、貧血などがみられる。また、急性型の2~10%は心内膜炎を主徴とする慢性型に移行するといわれており、適切な治療をしないと難治性となる³⁾⁴⁾。海外では、急性Q熱患者が回復後しばらくして倦怠感、不眠、関節痛などを訴え、数か月~数年の間持続し、急性Q熱後症候群と診断される症例が報告されているが、まだ実態は不明な点が多い⁵⁾。

Q熱の疫学

*C. burnetii*は欧米においては市中肺炎の数%程度を占める一般的な起炎菌としてよく認識されているが、本疾患の国内における実態や病像に

関しては疫学的なデータが不足している。Q熱は、1999年施行の感染症法で4類全数届出感染症に指定され、2003年の改正後は新4類として規定された疾患であり、1999~2003年まで毎年それぞれ12人、23人、40人、43人、8人の患者が報告された。これらの報告症例では感染源が特定できない症例が多く、また、すべて確定例といえるか否かについても、診断の根拠が定かでないものもあり議論の余地が残されている。渡辺らは、市中肺炎での検討で400例中Q熱と確定診断されたものが5例(1.3%)存在したと報告しており、疑い例を入れると3~4%程度存在するとしている⁶⁾⁷⁾。われわれの市中肺炎の調査でも168例中3例(1.8%)が血清学的に陽性であった。このことから、日本の市中肺炎の1~4%はQ熱が関与している可能性が推察される。一方われわれは、オーストラリアの農場視察に行った畜産関係者3人が同時に感染した急性Q熱の輸入症例についての診断と経過観察の経験をしている。全例肺炎を欠く肝炎型であり、比較的軽症な例でも血清抗体価の上昇はIgG 1,024倍以上と非常に高値を示し、全例典型的な免疫応答を呈していた。この点は国内例ではしばしば境界領域の抗体価で判定に迷うことが多いことと対照的であった⁸⁾⁹⁾。このようにQ熱は、日本における存在が明らかになりつつある一方でまだまだ多くの課題が残されている。

感染症法による取扱い

Q熱は4類全数報告疾患であり、診断した医師はただちに最寄りの保健所に届け出ることになっている。報告のための基準は以下の通りである。診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたもの、①病原体の検出(例:血液などからの病原体の分離など)②病原体の遺伝子の検出(例:PCR法など)③病原体に対する抗体の検出[例:間接蛍光抗体法(IF)法で抗体価が4倍以上の上昇など]となっている。

わが国のQ熱における課題

以下の点の解明が今後の課題としてあげられ

表1 Q熱の診断法

病原体分離	実験小動物(マウス・モルモット), 発育鶏卵(SPF)(卵黄囊内接種), 培養細胞(BGM・HEL細胞)
抗原検出法	蛍光抗体法(ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体), Giménez染色
遺伝子検出法	PCR(<i>com1</i> ・ <i>htpB</i> ・ <i>QpH1</i> プラスミド・ <i>QpRS</i> プラスミド), Real time PCR法, LAMP法
血清抗体価測定	間接蛍光抗体法(IF法), 酵素抗体法(ELISA法), イムノブロット法(Western Blotting)

る。①実態がまだ十分把握されていない。②感染源と感染経路が不明な例が多い。③国内症例の多くは外国症例と異なり抗体上昇が著明でないが、それは非特異反応や過去の感染をover diagnosisしていないか、あるいは日本の症例が株の特殊性のため従来の抗原に対する抗体価が上昇しにくいのか現時点では不明。④簡便で客観性と再現性の高い診断システムが確立されていない。⑤ELISA法の血清抗体測定キットでの単独の診断には限界がある。⑥慢性疲労症候群様患者における急性Q熱後症候群の実態解明。⑦食品等を介した感染の潜在的危険性の検証。これらを早急に検討し解明する必要がある。このなかでもやはり診断法の標準化が優先されるべき課題と考えられる。

診断法の現状と評価

Q熱の診断法には病原体検出法と血清抗体測定法がある¹⁰⁾(表1)。

1. 病原体検出法

病原体検出法には、分離培養法と抗原検出法、遺伝子検出法がある。なお、病原体検査マニュアル(国立感染症研究所・地方衛生研究所・編)に現時点で推奨されるQ熱検査の詳細を記載しているので参照を薦める¹¹⁾。

(1)分離培養法

急性期のヒト材料(血液, 血清, 咽頭スワブ等)から分離をすることがもっとも信頼性が高いが、実験小動物や発育鶏卵, 培養細胞などを用いるため、煩雑で経験を要する。小動物を用いた分離にはマウスやモルモットが利用可能であるが主にマウスが用いられる。免疫抑制をしたマウスの腹腔に臨床材料を接種し、3週間飼育後に解剖して採取した血液, 脾臓から分離株の同定をする。陰性の場合には脾臓を乳剤にして新たなマウスの腹腔内に接種し、同様の操作を3代繰り返して最終判定をする。同定はマウス脾臓のギムザ染色, 免疫蛍光抗体法によるが、最終的に

はマウスの血清抗体価測定をし、陽性を示した場合、PCR法による遺伝子検出, さらに電子顕微鏡による菌体の確認等を行う。ちなみに動物からの材料では血液, 血清, 乳, 脾臓, 胎児, 胎盤, 臍ぬぐい液などが用いられる。発育鶏卵を用いる場合は、卵黄囊内接種によって菌を増殖させる。細胞培養ではBGM(buffalo green monkey: アフリカミドリザル腎臓)細胞などを用いる。これらの操作はいずれもP3レベルの感染実験が可能な設備を要するため、施行可能な施設は限られる¹¹⁾¹²⁾。

(2)抗原検出法

菌を含むと思われる臨床検体を直接Giménez染色やギムザ染色, あるいは免疫蛍光抗体法で染色することは可能ではあるが、通常診断としては不確実であり、実際にはまず行われぬ。上記の分離培養後の同定としての使用には限定される。

(3)遺伝子検出法

PCR法による特異遺伝子の検出がもっとも感度と特異性に優れており有用な方法である。これまでに報告されている*C. burnetii*に特異的なプライマーの標的遺伝子には、heat shock proteinをコードする*htpB*遺伝子, *QpH1*プラスミドおよび*QpRS*プラスミド, 外膜蛋白をコードする*com1*, super oxide dismutaseをコードする遺伝子などがあるが、現在はもっとも感度・特異性に優れた*com1*遺伝子が主に利用されている¹¹⁾¹²⁾。われわれは、主に全血のバフィーコート分画から検出を行っており、急性極期には血清中からの検出も可能である。遺伝子検出法はさらに迅速性と簡便性が求められており、われわれはこれまでに多量の検体の同時処理が可能で、簡便かつ迅速な新しい検出法の確立を目的にTaqMan probeを用いたreal time PCRによる検出法の開発および評価を行った。これまでに得られた結果からは、感度も従来のnested PCR法と同等であった。また、LAMP法を用いた*C. burnetii*の検出法につ

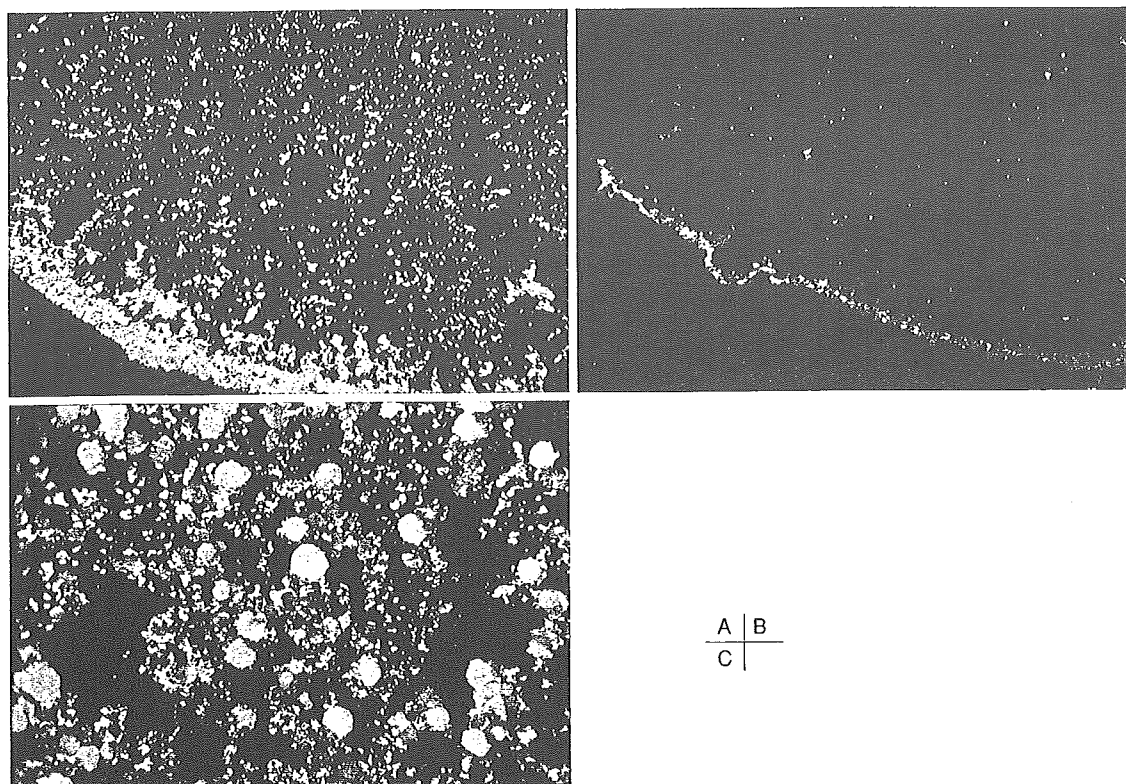


図 2

- A : 陽性, *C. burnetii* NineMile II 相菌精製粒子と急性 Q 熱患者由来血清との反応. 黄緑色の蛍光粒子が一樣に多数観察される.
- B : 陰性, *C. burnetii* NineMile II 相菌精製粒子と陰性血清との反応.
- C : 陽性, *C. burnetii* NineMile II 相菌感染Vero細胞と急性 Q 熱患者由来血清との反応. 黄緑色の蛍光粒子が, 細胞内には封入体状に, 細胞外にも散在して観察される. (倍率は撮影のためすべて400倍)

いても検討を行っている¹³⁾. *com 1*を標的として LAMPの基本プライマーを設計し, さらにloop primerを添加することで検出時間を20~30分短縮することができた. これらの系により*C. burnetii* Nine Mile株のgenomic DNAを65℃の等温で30分以内に検出できた. 検出感度は6個/testで, 対照であるnested PCR法と同等であった. これら2つの検出法はいずれも特異性が高く, *C. burnetii*の迅速検出に有用であると考えられ, 今後臨床での応用と評価が期待される.

2. 血清抗体測定法

(1) 間接蛍光抗体法 (IF法)

血清抗体価測定の標準法としては間接蛍光抗体法(IF法)が推奨される. 急性型では, まずII相菌に対する抗体が上昇し, その後I相菌に対する抗体が上昇する. 一般に, I相菌よりII相菌に対

する抗体価が高くなるため, 急性型の確定診断には, II相菌を主に用い, 場合によっては双方を用いて, 原則的には急性期と回復期のペア血清でのIgG抗体価の4倍上昇を認めることやIgMの高値の証明によって行われる. 抗原としては精製抗原を用いる方法が標準的であるが, II相菌を感染させたVeroあるいはBGM細胞を用いる場合もある(図2)¹¹⁾. 感染細胞を用いる場合, 細胞内の封入体状のものと, 細胞外に散在する粒子との両者が同時に蛍光を発しているものを陽性とみなし, 細胞外の粒子が反応しないものは非特異反応と考える. 抗体価は最初の感染から数か月~数年持続する. 陽性判定は, ペア血清で4倍以上の抗体価の上昇があったものとする. 単独血清での判定は難しいことが多い. ペア血清での有意な上昇がみられるまでにかなり長期間

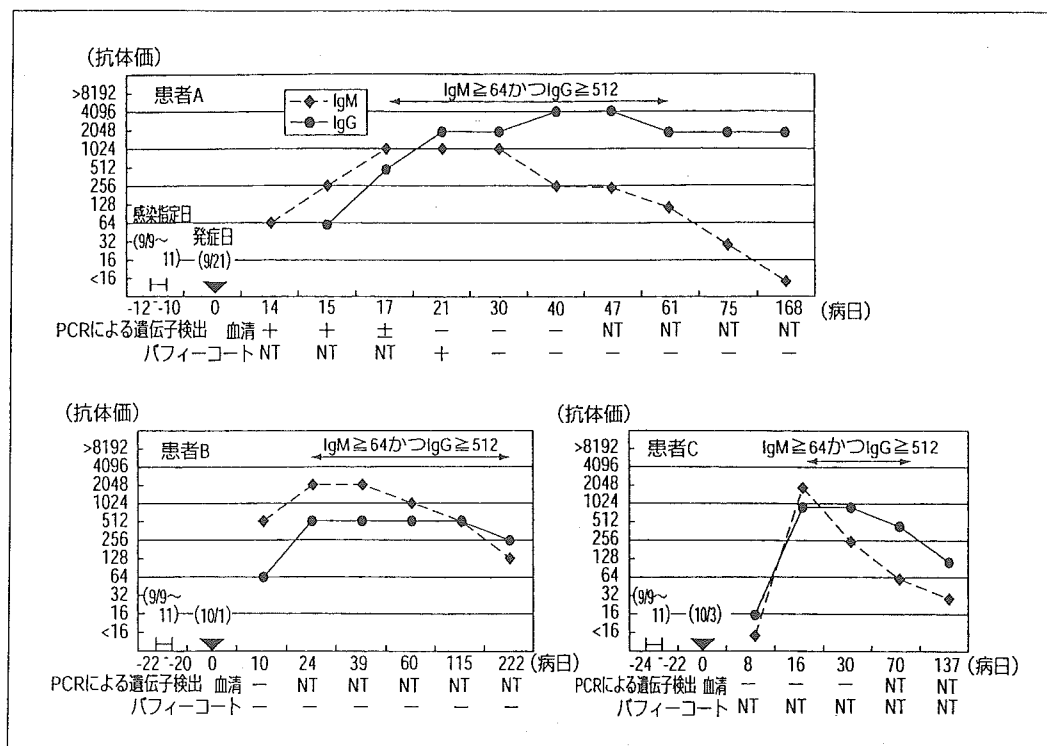


図3 *Coxiella burnetii* II 相菌に対する抗体価の推移と血中からの遺伝子検出結果

を要する例もあり、Q熱を強く疑う例では経過を追って抗体を測定することが望ましい。一方、慢性型の確定診断では、I相菌およびII相菌に対する高い抗体価がみられ、一般にI相菌の抗体価がII相菌の抗体価より高いことから判定される。また、急性Q熱後症候群の患者では全般的に抗体価が低めであるといわれている。

(2) 酵素免疫抗体法 (ELISA法)

最近輸入キットであるELISAキット (PanBio社製) による抗体測定も行われるようになってきた。同キットのinstruction paperでは、IgM抗体価に対する判定に関しては以下のように記載されている。なお、以下に同法の単位であるインデックス値 (ID) と記す。「IgM抗体価がID 10以下は陰性、ID 20以上は確実に陽性である。ID 10~20の例はlow positiveであって“may suggest a recent infection”であり、この場合は7~14日後に再検を行ってpositiveであることを確認するが、その際±50%以上の変動が有意義である。」また、IgG抗体価に関しては「ID 9以下は陰性、ID 11以上は陽性であって最近あるいは過去の感染を

示唆する。ID 9~11のサンプルでは再検を薦めるが、同じような結果が得られた場合にはほかの異なる方法での再検がほかの患者の検体での検討を薦める。」と記載している。この判定基準に添った場合は大きな問題はないと考えられるが、実際にはわれわれの市中肺炎例での検討ではIgG ID 11を超える値を示す症例の場合でも、Western Blotting (WB) 法で27kDaの*C. burnetii* 特異蛋白に反応する特異抗体が陰性のものもあり、本キット単独での判定には慎重を期する必要があると考えている。以下にその検討を行った事例を示す。

IF法の診断基準およびELISAキットの特異性の評価

1. Q熱の輸入症例における継時的検討⁹⁾¹⁴⁾

オーストラリアの農場視察旅行に参加した畜産関係者3名が現地で感染し、帰国後発症した典型的な急性Q熱の症例で、患者の協力を得て長期間抗体価推移を検討することができた (図3)。全例、IF法で*C. burnetii* II相菌に対するIgMおよび

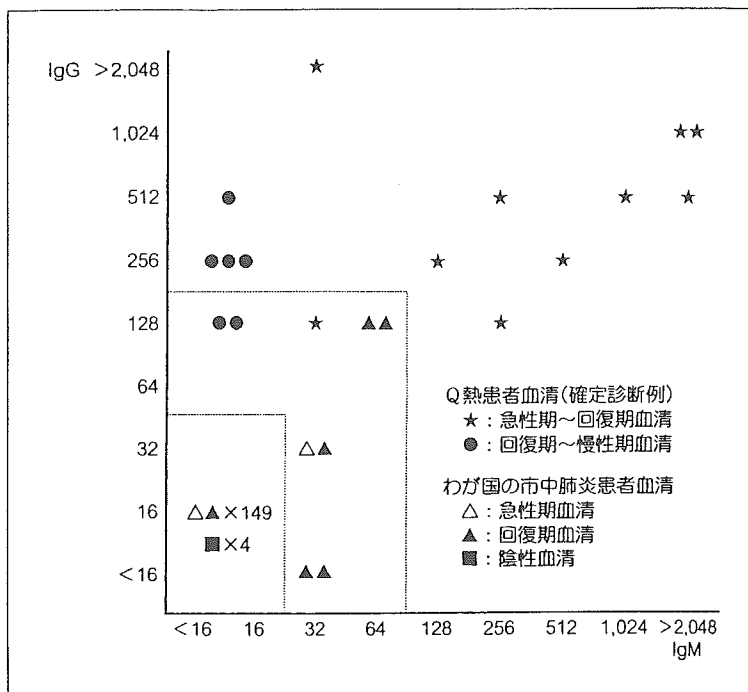


図4 間接蛍光抗体法による抗体価の分布と診断基準

間接蛍光抗体法による抗体価を、横軸にIgM抗体、縦軸にIgG抗体としてプロットした。IgM \geq 128倍 and/or IgG \geq 256倍にはQ熱患者(確定診断例)13例が含まれ、ELISAおよびウエスタンブロッティング(WB)ですべての検体が陽性であった。また、IgM \leq 16倍 and IgG \leq 32倍には市中肺炎患者血清298例で陰性コントロール4例が含まれ、ELISAおよびWBですべての検体が陰性であった。これらの2つの領域の間である「IgM32~64倍 and/or IgG64~128倍」を保留領域としたところ、Q熱患者血清3例および肺炎患者血清6例(うち2例は同一患者のペア血清)が含まれ、ELISAおよびWBの結果、陽性と陰性例が混在することが示された。

びIgG抗体が急性期と比較して回復期で4倍以上上昇し、IgMおよびIgG抗体価の最高値は、それぞれ1,024~2,048倍および512~4,096倍と高い値を示した。また、これまでの報告を参考に、シングル血清での仮の診断基準として「IgM \geq 64かつIgG \geq 512」をあてはめると、患者Aでは45病日間、患者Bでは199病日間および患者Cでは122病日間で陽性と診断され、診断基準として実用的であることが示唆された。また、輸入ELISAキットを使用してIF法と比較した。IgGおよびIgM抗体ともに、添付のプロトコルに従ってID>11を陽性とした。その結果、IgG抗体では15検体およびIgM抗体では17検体が陽性で、IF法の仮の診断基準「IgM \geq 64かつIgG \geq 512」に対するELISAの感度(ELISA陽性/IF陽性)は93%および100%

であった。しかし、特異性(ELISA陰性/IF陰性)をみると、IgG抗体では100%、IgM抗体では40%であった。次に、ELISAとIF法で抗体検出の時期と推移をみたところ、IgG抗体についてはほとんど差はなかったが、IgM抗体では2例でELISAがより長期間にわたって検出可能であった。ここで用いた血清では、本ELISAキットによるQ熱抗体測定はほぼIF法と同様の推移を示し、また、感度も同等と思われた。しかし、IgM抗体の特異性に関しては、さらに検討が必要であることが示唆された。

2. わが国の市中肺炎患者における検討¹⁴⁾

次に、前項の結果を踏まえて、IF法のシングル血清での診断基準およびELISAキットの特異性について、Western Blotting(WB)を参考に比較

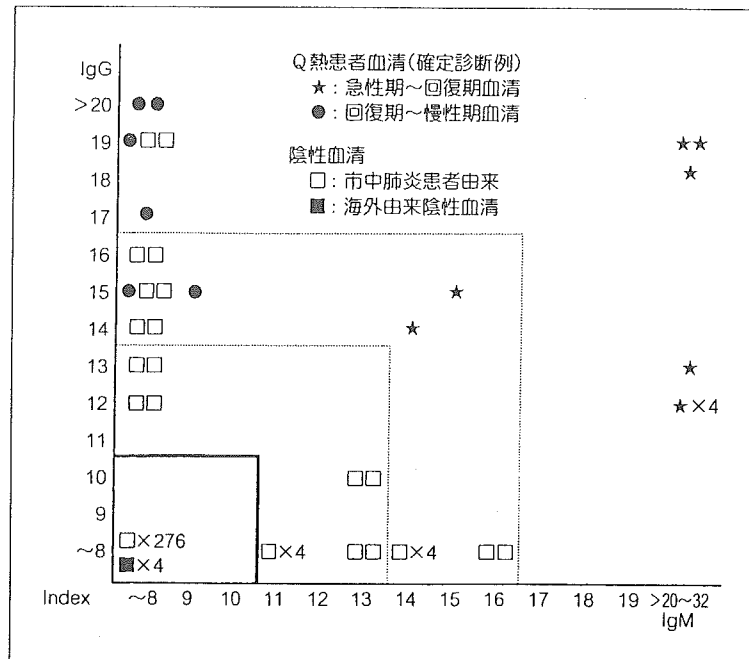


図5 ELISAによる抗体価の分布と診断基準

ELISAによる抗体価をインデックス値で、横軸にIgM抗体、縦軸にIgG抗体としてプロットした。多くの陰性検体(IF法およびWB陰性)が、インデックス値>11で陽性となった。仮にカットオフ値をひき上げて>14や>17で陽性としても、14~17の間に陽性と陰性検体が混在し、多くの擬陽性や擬陰性の結果を出してしまうことが示された。

検討した。血清は、わが国の市中肺炎患者(以下肺炎患者)の急性期血清150検体および回復期血清154検体(うち150例はペア血清)、陽性コントロールとして外国の研究機関由来Q熱患者血清(確定診断例)および前項の輸入3症例を含む16検体、陰性コントロール血清4検体、計324検体を使用した。前項と同様に、IF法はNine Mile II 相菌を抗原とした。ELISAにはPanBio社のキットを使用した。Q熱に対する特異抗体の保有を確認するため全血清でWBを行い、Q熱コクシエラに特異的な27kDa外膜蛋白質に対する抗体の有無をみた。

IF法でIgM \geq 128倍 and/or IgG \geq 256倍の検体は13例であり、そのうち4例のIgG抗体はELISAおよびWBで陽性であり、また、残り9例のIgMおよびIgG抗体はともにELISAおよびWBで陽性であった(図4)。これらの13例はすべてQ熱患者血清であった。一方、IgM \leq 16倍 and IgG \leq 32倍の検体は153例で、すべての検体でIgMおよび

IgG抗体はELISAおよびWBで陰性であった。これには、陰性コントロール血清4例、肺炎患者の急性期および回復期血清計298例が含まれていた。そこで、これらの2つの中間領域である「IgM32~64倍 and/or IgG64~128倍」を保留領域としたところ、Q熱患者血清3検体および肺炎患者血清6例(うち2例は同一患者のペア血清)が含まれた。Q熱患者血清3例のIgG抗体はELISAおよびWBで陽性であった。また、肺炎患者のペア血清2例のIgM抗体価はELISAおよびWBで陽性であったが、抗体価の変動がみられなかったため可能性例とした。また、別の肺炎患者2例のIgM抗体はWBでのみ陽性であり、疑い例とした。残りの肺炎患者2例のIgMおよびIgG抗体はともにELISAおよびWBで陰性であった。

今回の解析から、IF法では保留領域を設定し、その領域の検体について複数の方法で検討することが精度の高い血清診断を行うためには重要であることが示唆された。すなわち、単一のカッ

トオフ値の設定では、擬陽性や擬陰性の結果を排除することが難しいことを示している。

次に、ELISAの結果をもとに判定をみると、多くの陰性検体(IF法およびWB陰性)が、ID>11を示し、陽性と判定されてしまうことが明らかになった(図5)。また、仮にカットオフ値をひき上げて>14や>17で陽性としても、14~17の間に陽性と陰性検体が混在し、多くの擬陽性や擬陰性の結果を出してしまうことが明らかになった。今後、わが国において輸入ELISAキットを単独で使用するためには、検体数を増やしてカットオフ値の変更などの検討が必要であろう。あるいはベア血清でのIDの変化幅を、IF法の4倍の変化に相当する有意な変化幅として設定することも検討する価値があると考えられる。いずれにしてもELISAキットの結果のみでの確定診断の判定には現状では問題があることを指摘したい。

おわりに

これまでのわれわれの検討から、わが国におけるQ熱患者の精度の高い血清診断には、既存のIF法、輸入ELISAキットおよびWBのすべてを行うことが理想的である。しかし、現実には、もっとも特異性の高いと思われるWBは煩雑で労力を要し診断には不向きであるため、可能なかぎりIF法およびELISAを併用して双方の結果が陽性であることを確認することが望ましく、そうすることで比較的高い精度で診断が可能になると思われる。また、すべての検体について、両法を用いることが困難であれば、本稿の検討のように擬陽性や擬陰性の結果を効率よく減らすために保留領域を設定し、その領域の検体のみを複数の方法で再検査するという方法も考えられる。しかし、やはり、今後わが国におけるQ熱の現状の把握には、本症を簡便に診断できる精度の高い血清診断キットの開発とあわせて、新たな遺伝子検出法などを併用した新しい診断基準の設定が必要であり、臨床家と研究者の連携のもとに早急な検討が望まれる。

文 献

- 1) Marrie TJ. Q fever volume 1 The disease. Boca Raton : CRC press ; 1990.
- 2) Williams JC, Thompson HA. Q fever : The biology of *Coxiella burnetii*. Boca Raton : CRC press ; 1991.
- 3) Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine* 2000 ; 79 : 109.
- 4) Hirai K, To H. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *J Vet Med Sci* 1998 ; 60 : 781.
- 5) Marmion BP, Shannon M, Maddocks I, et al. Protracted debility and fatigue after acute Q fever. *Lancet* 1996 ; 347 : 977.
- 6) 渡辺 彰, 平井克哉, 白石廣行, ほか. Q熱による呼吸器感染症の国内での発症状況および病像に関する研究. In : 厚生科学研究・研究補助金, 新興・再興感染症研究事業, 平成12年度研究報告書並びに平成10~12年総合研究報告書. 2002. p. 1.
- 7) 高橋 洋, 渡辺 彰. Q熱の呼吸器感染症における位置づけ—サーベイランス成績を含めて—. *化学療法の領域* 2004 ; 20 : 716.
- 8) 河本知秀, 小川基彦, 岸本寿男, ほか. 海外の屠畜場および農場を視察後同時発症したQ熱患者3症例. *日本感染症学雑誌* 2003 ; 76 : 1030.
- 9) 小川基彦, 河本知秀, 川本 歩, ほか. 急性Q熱の輸入3症例における血清抗体価の推移と*Coxiella burnetii*遺伝子検出の長期検討. *日本感染症学雑誌* 2003 ; 77 : 127.
- 10) Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 1823.
- 11) リケッチア感染症診断マニュアル・病原体検査マニュアル. 国立感染症研究所, 地方衛生研究所全国協議会・編. 2001.
- 12) 長岡宏美. Q熱コクシエラ症の分離培養法およびPCR検出法の意義と問題点. *化学療法の領域* 2004 ; 20 : 707.
- 13) Momoda T, Ogawa M, Kojima T, et al. Sensitive and Rapid Detection of *Coxiella burnetii* by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), a Novel DNA Amplification Method. *American Society for Microbiology 104th General Meeting* ; 2004 May 24 : New Orleans, LA, USA ; 2004.
- 14) 小川基彦, アグス・ステイヨノ, 岸本寿男. Q熱の抗体価測定の意義と問題点. *化学療法の領域* 2004 ; 20 : 711.

動物における腸管出血性大腸菌の疫学

中澤 宗生*¹⁾ 秋庭 正人*²⁾

腸管出血性大腸菌はヒトと動物に共通する病原体であり、zoonotic *Escherichia coli* の筆頭である。本菌は牛を含む食用動物がある頻度で健康保菌しており、食品製造の原材料汚染や水源汚染をとおして、あるいは保菌動物との接触を介してヒトに健康被害を与える。よって、予防には保菌源対策が重要であり、動物とその飼育環境での本菌の生態を把握し、微生物生態学に基づいた農場におけるバイオセキュリティシステムの構築が重要である。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 / 疫学 / 人獣共通感染症

I はじめに

大腸菌のなかで、下痢原性大腸菌¹⁾と称される一群は特殊な病原因子を保有し、下痢や、ときとして重篤な合併症を引き起こす。下痢原性大腸菌には、宿主特異的に感染する毒素原性大腸菌、腸管組織侵入性大腸菌、腸管凝集性大腸菌などと、宿主非特異的に感染する腸管出血性大腸菌 (enterohaemorrhagic *E. coli*: EHEC)、腸管接着微絨毛消滅性大腸菌 (attaching and effacing *E. coli*: AEEC、腸管病原性大腸菌の一部はこのカテゴリーに属す) があり、後二者は人獣共通感染性大腸菌²⁾ (zoonotic *E. coli*) と考えられており、公衆衛生上重要な病原体である。

本文では、動物の EHEC を含む大腸菌感染症、zoonotic *E. coli* の保菌実態、保菌抑制対策などについて述べる。

II 動物の大腸菌感染症

動物の大腸菌感染症は原因菌や感染・発病機序の違いから、下痢原性大腸菌の腸管感染症である

大腸菌性下痢と大腸菌性腸管毒血症(浮腫病)、病原大腸菌の全身感染症である大腸菌性敗血症と大腸菌性髄膜炎、局所感染症である大腸菌性乳房炎、子宮内膜炎、尿路感染症などの病型に分けられる。

1. 大腸菌性下痢

幼獣期の牛、豚では毒素原性大腸菌による下痢の発生頻度が高いが、一部に EHEC や AEEC も腸管感染に関与する。通常、志賀毒素 (Stx) を産生する大腸菌は志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) と総称されるが、STEC は病原性が強い EHEC¹⁾ とそれが不定な non-pathogenic STEC³⁾ に分けて考える必要がある。EHEC と AEEC は、共に *eaeA* 遺伝子を含む病原性遺伝子群 (LEE: locus of enterocyte effacement) を保有するが、non-pathogenic STEC はそれをもたない。LEE は外膜蛋白 intimin や種々の分泌蛋白の産生を制御し、本菌の大腸粘膜への付着に関与して AE (attaching and effacing; 菌の上皮細胞への密着と微絨毛の消失、図 1) 病変を形成させる。牛の下痢由来 EHEC は Stx1 産生株が

Epizootiology of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in animals

* Muneo Nakazawa, Masato Akiba 動物衛生研究所 安全性研究部ズーノーシス研究室

¹⁾ 室長 ²⁾ 主任研究員

多いが、牛の腸粘膜には Stx に対するレセプターが存在しないことから、本毒素の牛に対する下痢活性は極めて弱いものと推測され、EHEC と AEEC による下痢の発現は AE 病変の形成に伴う組織障害に起因すると考えられる。牛の EHEC と共通する血清型菌がヒトの症例からもしばしば分離されており⁴⁾、人獣共通病原体としても重要視される。

牛の EHEC 感染症は 4 週齢未満の子牛に見られ、ウイルス、原虫などとの混合感染が多い。水様性下痢と重度の脱水を主徴とする毒素原性大腸菌感染症とは異なり、EHEC 感染症の典型例では粘液便や血便の排泄が特徴であり、脱水は軽度である。原因菌の主な O:H 血清型は O5:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O113:H21, O121:H19, O145:H- などであり、O157:H7 の関与は小さい。概して無症状の牛も EHEC を保菌しており、診断に際しては腸管の病理組織検査を行い AE 病変の有無を調べる必要がある。

一般に大腸菌性下痢の発症には生体側の要因が大きく影響し、例えば、EHEC O157:H7 の 10^{10} 個を牛に投与すると、生後 1～10 日齢の子牛では回腸から直腸にかけて投与菌の定着、AE 病変の形成、下痢発症があるが、4 週齢以上の子牛では腸病変も下痢もない。牛は生後間もなく本菌の感染を受けると AE 病変が形成され下痢を起こすが、日齢の経過とともに抵抗性を獲得し、本菌が消化管に入っても単なる保菌状態に留まるものと考えられる。

AEEC⁵⁾ は Stx やエンテロトキシンを産生しないが *eaeA* 遺伝子を保有し、牛をはじめヒト、霊長類、豚、羊、山羊、ウサギ、イヌ、ネコ、鳥類などにも感染する極めて宿主域の広い宿主非特異的な病原体といえる。子牛の AEEC 感染では下痢は軽度であるが、慢性化する傾向があり保菌源となる。子牛での調査では 445 頭中 75 頭 (16.9%) が AEEC を保菌しており、O 群血清型は O15, O26, O35, O49, O51, O63, O74, O76, O109, O115, O117, O138, O145, O153 などであった。また、豚の AEEC として O26, O45, O108 などがある。ヒトの腸管病原性大腸菌と動物の AEEC には共通する血清型が存在する。

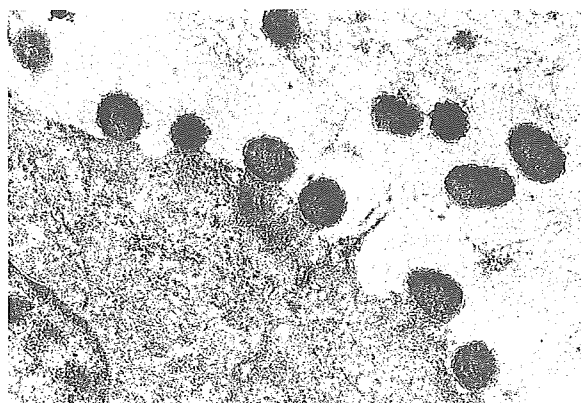


図1 腸管出血性大腸菌 O5:H- の感染で子牛の大腸粘膜に形成された AE 病変

AE (attaching and effacing) 病変は腸粘膜上皮細胞への大腸菌の密着と微絨毛の消失を特徴とし、EHEC や AEEC に属する大腸菌の感染に共通して観察される。

2. 大腸菌性腸管毒血症 (浮腫病)

本症は STEC の特定血清型菌の感染によって産生された毒素 Stx2e が吸収され、標的組織を障害することで発病する。浮腫病は志賀毒血症の典型であり、病態はヒトの EHEC 感染症に合併する溶血性尿毒症症候群、急性脳症などと類似性がある。分離頻度の高い O:H 血清型は O139:H1, O141:H4, O2:H-, O138:H14 などである。原因菌は付着因子として intimin をもたないが、線毛 F18 を産生する。STEC O139:H1 や O141:H4 によるヒトの症例は見あたらないが、O139:H1 はヒト由来株化細胞 HEp-2 に強力に付着することを示しており、ヒトへの感染性を否定できない。また、ヒト症例と豚から Stx2e 産生 O101 が分離されており⁴⁾、両者の関連性に興味もたれる。

一方、ヒト由来 EHEC O157:H7 の 10^9 個を生後間もない無菌豚に経口投与すると、本菌は主に大腸に AE 病変を形成し、下痢が起こると同時に志賀毒血症に陥り運動失調、痙攣などの中枢神経症状も観察される⁶⁾。

III 腸管出血性大腸菌の保菌実態

1. EHEC O157 の保菌

本菌の保有宿主としては牛が重要であり、保菌

特集 腸管出血性大腸菌感染症の現状と対策

調査の中心となっている。国内の調査⁷⁾では、牛飼育農場の O157 汚染率 11.8%，保菌率 0～13.5% (平均 6.5%) であり、牛の種類、飼育形態などにより分離率が異なっている。とくに肉用牛の保菌率は 13.5% であり、搾乳牛の 1.8% に比べ高率であった。おそらく飼育施設の衛生状態、給餌飼料の違いなどが保菌率に関係しているものと考えられる。

また、米国においてほぼ同時期に実施されたト畜場搬入牛の EHEC O157 保菌調査⁸⁾では、327 頭中 91 頭 (27.8%) の糞便から本菌が分離されている。内蔵摘出前のト体表面の汚染は 341 頭中 148 頭 (43.4%) にみられ、剥皮過程などでの糞便や体毛からの二次汚染と考えられた。しかし、内臓摘出後、除菌処理 (有機酸による洗浄、温湯処理、蒸気による低温殺菌など) された枝肉の汚染は 330 頭中 6 頭 (1.8%) に低下している。この成績は米国の肉牛の保菌率が予想以上に高いことを示しており、しかも、除菌処理後においても約 2% の枝肉に本菌の汚染が認められたことになる。事実、毎年のように米国農務省食品安全検査局の通常検査で汚染ひき肉やステーキ肉が摘発され、製品のリコールが行われている。

表 1 に諸外国で報告された牛 EHEC O157 の保菌率をまとめて示した。保菌率に違いはあるものの、調査したいずれの国でも高率に分離されてお

表 1 牛の腸管出血性大腸菌 O157 の保菌率

国名	牛の用途	採材場所	保菌率 (%)
日本	肉牛 / 乳牛	ト畜場	0～13.5
米国	肉牛	ト畜場	28
	肉牛	農場	23
スコットランド	肉牛	農場	7.3～10.0
イングランド	肉牛	農場	6.0～25.0
	肉牛	ト畜場	4.7
デンマーク	乳牛	農場	21.4
フィンランド	肉牛	農場	10.3～38.5
スウェーデン	肉牛	ト畜場	1.2
オーストラリア	肉牛	農場	0.3～0.4
	乳牛	農場	2.5

第 4 回国際腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2000 年、京都) で発表された成績をまとめた。

り、牛が本菌の主要な保有体であることを裏付けている。しかし、牛の EHEC O157:H7 の *stx* 型をみると、表 2 のとおり *stx2c* 単独産生菌が 57% を占めている。ヒトの症例株の約 78% が *stx2* あるいは *stx1* と *stx2* 産生株であることからすると、牛 EHEC O157 株のすべてがヒトに対して病原性を有するとは言い難く、多様性があることが窺える⁹⁾。

一方、EHEC O157 保菌牛の排菌状況を観察すると、間欠的に 1～2 カ月間排菌し、その後培養陰性となる例が多く、本菌は牛の定住菌というよりはむしろ通過菌であり、汚染環境からの再感染を繰り返しながら、環境の清浄化にともない保菌・排菌が終息する。また、保菌牛の糞便 1g あたりの菌数は $10^0 \sim 10^4$ 個であり、少数菌の検出には免疫磁気ビーズ法の併用が必須である。本菌は口腔スワブ (だ液) から分離されるが、これは反芻による第 1 胃内容からの汚染あるいは飼槽、水槽、床、壁などの飼育環境からの汚染と考えられる¹⁰⁾。小児が牧場で保菌牛に舐められることは zoonosis の視点から避けるべきである。

牛以外でこれまでに EHEC O157 が分離された動物として、羊、山羊、豚、馬、ポニー、イヌ、ネコ、シカ、イノシシ、アライグマ、ネズミ、ノウサギ、オポッサム、オランウータン、ハト、カモメ、ガチョウ、アヒル、七面鳥などがある。国内の養豚場 59 農場中 4 農場 (6.8%)、健康豚 346 頭中 4 頭 (1.2%) から EHEC O157 が分離されており、そのフェージ型は牛やヒト株と共通するこ

表 2 腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素 (*stx*) 型

<i>stx</i> 型	ヒト由来株 (%)	牛由来株 (%)
<i>stx1</i>	6* (4.6)	5 (5.5)
<i>stx2</i>	56 (43.1)	3 (3.3)
<i>stx1, stx2</i>	45 (34.6)	14 (15.4)
<i>stx2c</i>	23 (17.7)	52 (57.1)
<i>stx1, stx2c</i>	0	9 (9.9)
<i>stx2, stx2c</i>	0	8 (8.8)
	130 (100)	91 (100)

著者らの未発表成績

* 菌株数

とから、豚も本菌の潜在的保有宿主である¹¹⁾。また、米国では調査した豚の2%から、英国では0.3%から、南米チリでは15.7%から本菌が分離されており、チリではヒトへの感染源として豚肉が重要視されている。

2. STECの保菌

国内の牛の調査¹²⁾では、糞便の増菌培養後のPCRで358頭中225頭(63%)が*stx*遺伝子を保有し、実際分離培養では358頭中79頭(22%)からSTEC株が得られた。分離株のO群は25種以上に及び、その多くはヒト株と共通していた。この状況は海外でも同様で牛の*stx*遺伝子保有率は70%³⁾、STECの分離率は2~34%であり^{4, 13)}、本菌は腸内細菌叢の一部を構成するcommensal(偏共生体)と考えられる。これまでに牛から分離されたSTECのO:H血清型は250以上にも及ぶ⁴⁾。

一方、国内の山羊のSTEC保菌率は、農場レベルで52%、個体レベルで31%、任意に釣菌した大腸菌の*stx*陽性率は1,361株中204株(15%)であった。このうち*eaeA*陽性のEHECはO103:H2とO111:H-の5株(2.5%)にとどまった。また羊のSTECは調査した3農場すべてから分離され、個体レベルの保菌率は51.4%、任意に釣菌した大腸菌の*stx*陽性率は370株中102株(28%)であり、EHECは存在しなかった。山羊、羊のSTEC保菌率は海外¹⁴⁾と同様に高く、とくに羊は半数以上の個体から本菌が分離された。

豚のSTEC保菌率は農場レベルで33%、個体レベルで14%であった。分離STECの毒素型は*stx2e*単独産生株が大半を占め、ヒト株のそれとは血清型を含め大きく異なった。しかし、*stx1*保有のO91:H-のようにヒト、牛、山羊、羊などに共通する菌株も見いだされた。

概して山羊、羊、豚のSTECは牛に比べ、*eaeA*保有株が少ないことから、zoonotic riskは低いものと思われる。しかし、山羊や羊からしばしば*eaeA*陰性のO5:H-、O91:H-、O128:H-、O146:H21などが分離されるが、これらと同一性状の菌がヒト症例からも分離されており⁴⁾、山羊や羊のリスクを無視することはできない。表3に動物から分離されたEHECを含むSTECの主な

性状を示した。なお、鶏のSTEC保菌に関する報告は少なく、保有体とは見なされていない。

IV EHEC O157の分子疫学

分子疫学的解析法のうち、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は有用な遺伝子型別法である。牛O157に関する成績では、菌株間の識別力の指標であるシンプソンのD値(Simpson's D index)はPFGE型別が0.987、ファージ型別(PT型)が0.884、毒素遺伝子型別(*stx*型)が0.560であり、前二者が優れていた¹⁵⁾。これを基に、グローバルな視点からの疫学情報を得るため、国内の牛由来91株と米国の牛由来415株を比較したところ、日本で1996年に分離された3株は、米国で1994年に分離された6株と、極めて近縁であることが明らかとなった¹⁶⁾。PFGE型とPT型の識別力が極めて高いことからすると、この成績はO157が共通の媒介物(例えば、飼料原料など)を介して大陸間を移動し、国内の牛群に拡がった可能性を示唆している。

一方、著者らは自然保菌牛から経時的に収集した分離菌のPFGE型(遺伝子型)が、時間の経過とともに変化する現象を見だし、実験的にも再現に成功した¹⁷⁾。おそらく、O157に溶原化しているバクテリオファージ間の組換えや、ファージによるDNAの水平伝達などが関与しているものと思われるが、これは本菌が動物消化管内で容易に変異することを示しており、極めて多様な遺伝子型の出現に関連していると考えられる。他方、O157:H7、O26:H11などを保菌する動物との接触感染によるヒトの症例が散見されるが、原因調査においては、疫学情報の収集とともに、患者および推定感染源から分離された、菌株間の同一性を証明することが必要となる。この場合、動物消化管内で原因菌の遺伝子型が短期間で変化することを十分認識しておく必要がある。

V EHEC O157の排菌制御

牛の保菌率が予想以上に高いことから^{7, 8)}、生産段階における排菌抑制対策の必要性が強く訴えられている。確かに、農場から本菌を排除することが根本的な対策であるが、様々な困難性のため

表3 動物から分離された志賀毒素産生性大腸菌の主な性状

○群	菌株数	stx1	stx2	stx1, stx2	eaeA	牛	山羊	羊	豚	○群	菌株数	stx1	stx2	stx1, stx2	eaeA	牛	山羊	羊	豚
O1	3	3				○	○			O109	1	1			1	○			
O2	10	7	3*			○	○		○	O111	6	6			6	○			○
O5	17	8		9	8	○	○			O112	4	4*							
O6	1	1				○	○			O113	10	7	3			○			○
O8	2		1(1*)			○	○		○	O116	1	1				○			
O15	1	1				○	○			O119	1	1				○			
O22	10		2	8	1	○	○			O121	4	2(2*)			2	○			○
O26	15	15			15	○	○			O123	4	3*				○			○
O27	13	3	1	9		○	○			O125	2	2				○			○
O46	3		1	3		○	○			O127	1	1				○			○
O48	1		1			○	○			O128	13	4	9			○			○
O55	1		1	1	1	○	○			O139	20	20*							○
O74	1		1			○	○			O141	12	12*							○
O75	4			4		○	○			O145	10	7			2	○			○
O76	1	1				○	○			O146	9	9				○			○
O77	1	1				○	○			O153	2	2				○			○
O78	3	3				○	○			O156	1	1			1	○			○
O80	1		1			○	○			O157	91	5	63	23	91	○			○
O81	1			1		○	○			O158	7	1		6		○			○
O82	2		2			○	○			O160	1			1		○			○
O84	10	10			10	○	○			O161	1			1		○			○
O88	1		1			○	○			O162	1	1				○			○
O91	19	2	2	15		○	○			O165	3	2	1	1	2	○			○
O98	1	1				○	○			O166	1	1				○			○
O100	7		7*			○	○			O174	18	18				○			○
O103	4	4			4	○	○			OUT	10	2	3(3*)	2		○			○
O104	1		1*			○	○			ラフ型	12	8	4			○			○

著者らの未発表成績, * stx2e, OUT: ○ 群型別不能, ○: 菌株の由来動物

に各国とも苦慮しているのが実情である。現状では牛が保有する大腸菌全体のレベルを低下させ、牛自体と飼育環境中の菌数を減少させる方法が現実的であると思われる。

1. 飼料による排菌制御

牛の糞便中に存在する大腸菌の数や性質は、給餌する飼料の影響を受けることが知られている。そこで、給餌飼料の違いによる EHEC O157 の定着性の差を調べた¹⁰⁾。濃厚飼料あるいは乾草給餌牛に本菌を投与し排菌状況を見ると、表 4 に示すように、濃厚飼料給餌牛での EHEC O157 の排菌数は投与後 5 日目に $10^{6.6}$ 個および $10^{7.3}$ 個に達し、以後漸減しつつ投与後 32 日および 35 日目まで間欠的に排菌がみられた。しかし、乾草給餌牛では投与後 1 日目に $10^{2.5}$ 個および $10^{0.6}$ 個の排菌が認

められたものの投与後 7 日目以降、本菌は分離陰性となった。これは粗飼料給餌による本菌制御の可能性を示すものと考えられた。

新たな実験保菌牛に対して乾草を給餌した場合の排菌抑制効果をさらに検討した¹⁰⁾。その結果は図 2 に示すように、50%の濃厚飼料を含む普通飼料給餌から乾草 100%給餌に変更した No. 5 と No. 6 牛の排菌数は、変更 2 日目から顕著に減少し始め、変更 5 日目以降投与菌は検出限界以下となった。一方、対照の普通飼料給餌 No. 7 牛は 3 日目頃から、No. 8 は 5 日目頃から排菌数の漸減がみられたが、菌投与後 15 日目まで 10^1 個/g のレベルで排菌が継続した。このことから、乾草給餌は濃厚飼料を 50%含む普通飼料給餌に比べ、短期間で本菌の排菌数を減少させた。

表 4 牛の給餌飼料と腸管出血性大腸菌 O157 排菌の関係

牛番号	給餌飼料	EHEC O157 の排菌		VFA 量 (mM)*
		期間(日)	最高排菌数(個/g)	
No.1	濃厚飼料	32	$10^{6.8}$	63.32
No.2	濃厚飼料	35	$10^{7.3}$	40.66
No.3	乾草	7	$10^{2.5}$	19.86
No.4	乾草	1	$10^{0.6}$	16.64

* EHEC O157 投与直前の糞便の揮発性脂肪酸 (VFA) 量を示す。

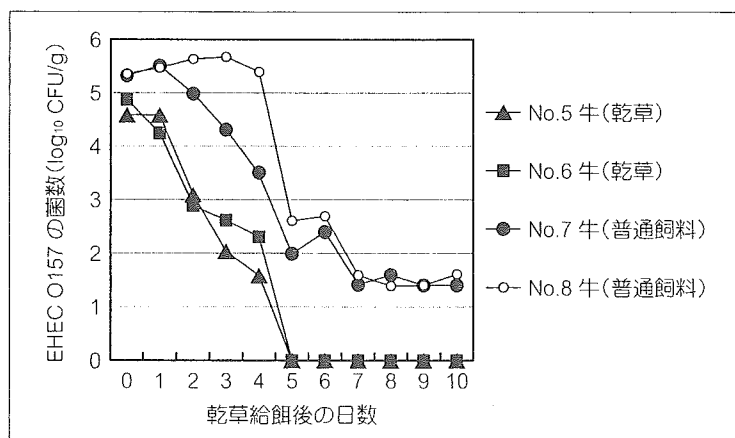


図 2 普通飼料給餌から乾草に変更後の EHEC O157 の排菌状況

普通飼料給餌から乾草 100%給餌に変更した No. 5 と No. 6 牛の排菌数は、変更 2 日目から顕著に減少し始め、変更 5 日目以降投与菌は検出限界以下となった。普通飼料給餌 No. 7 牛は 3 日目頃から、No. 8 は 5 日目頃から排菌数の漸減がみられたが、その後も 10^1 個/g のレベルで排菌が継続した。

特集 腸管出血性大腸菌感染症の現状と対策

限られた頭数での成績ではあるが、濃厚飼料は牛の消化管内での大腸菌の増殖を促進し、逆に粗飼料はそれを抑制したことから、粗飼料の適切な給餌によって EHEC O157 の排菌を制御できる可能性が示された。今回観察された菌数減少の機序は明らかでないが、乾草は濃厚飼料に比べデンプン質の含有率が低いことから、消化管内での EHEC O157 を含む細菌の増殖に必要な栄養素の枯渇が関係しているかもしれない。

2. 生菌製剤による排菌制御

EHEC O157 自然保菌牛に対する市販生菌製剤の除菌効果は不定であるが、実験保菌牛では試作生菌製剤の排菌抑制効果が認められている¹⁹⁾。すなわち、健康な牛から分離した乳酸産生菌である *Streptococcus bovis* と *Lactobacillus gallinarum* から生菌製剤を試作し、4頭の実験保菌牛に給餌し EHEC O157 排除効果を調べたところ、糞便への O157 の排菌は完全に阻止され、再排菌も認められなかった。糞便の揮発性脂肪酸(VFA)濃度を定量したところ、排菌阻止は、生菌製剤投与をきっかけとした VFA、とくに酢酸濃度の急激な上昇と相関していた。しかし、自然保菌牛を対象とした本生菌剤の給餌では、明らかな EHEC O157 排除効果は認められなかった。このことから、生菌製剤を用いて農場レベルで EHEC O157 保菌牛を減少させるためには、再感染を防止するための飼育環境の清浄化対策(敷料交換、清掃・消毒の徹底など)を併用することが必要であると考えられた。

3. 免疫学的手法による排菌制御

牛用の EHEC O157 のワクチン開発は、intimin や分泌タンパクが候補抗原として検討されている。米国農務省動物疾病センターでは「食べるワクチン」として、タバコに intimin 遺伝子を組み込んだトランスジェニック植物を作り、牛に給餌し、EHEC O157 の排菌阻止効果や抗体産生能を調べているが、これまでのところ、満足のいく成績は得られていない(E.Nystrom, 私信)。

VI おわりに

今後も O157 を含む EHEC 感染症の重要性は変わらないと思われる。本菌の保菌動物が地球規模

で存在し、O157 感染予防ワクチンが未開発の現状からすると、生産段階での制御は排菌に影響する要因を解析し、牛自体と飼育環境中の菌数を減少させるための管理技術の確立が重要であると考ええる。大腸菌の変幻自在さからすると、完全に本菌を撲滅することは不可能であり、共存していかなければならない。したがって、農畜産品の安全性を確保するために、生産現場から処理・加工、流通、消費に至るフード・チェーンのあらゆる段階における衛生管理システムを構築し、確実に実行するとともに、生産者・消費者に衛生知識を啓発していくことが大切であると思う。

文献

- 1) Nataro JP, Kaper JB : Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11 : 142-201, 1998
- 2) Wasteson Y : Zoonotic *Escherichia coli*. Acta Vet Scand 95 (Suppl) : 79-84, 2001
- 3) Pradel N, et al. : Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. J Clin Microbiol 38 : 1023-1031, 2000
- 4) Bettelheim KA : Serotypes of VTEC. <http://www.microbionet.com.au./vteccable.htm>, Accessed May 10, 2004
- 5) Knutton S : Attaching and effacing *Escherichia coli*. "Escherichia coli in domestic animals and humans" Gyles CL, ed. CAB International, Oxon, 1994, p567-591
- 6) Tzipori S, et al. : The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect Immun 63 : 3621-3627, 1995
- 7) Omoe K, et al. : Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle at slaughter houses and farms in Japan, and genetic characteristics of isolates. Proceeding of the ninth international symposium on toxic micro-organisms (UJNR). Tokyo, 2002, p110-121
- 8) Elder RO, et al. : Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during process-

- ing. Proc Natl Acad Sci USA 97 : 2999-3003, 2000
- 9) McNally A: Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. Infect Immun 69 : 5107-5114, 2001
- 10) Nakazawa M, et al. : Some aspects on the ecology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in farm animals. Proceeding of the ninth international symposium on toxic micro-organisms (UJNR). Tokyo, 2002, p87-109
- 11) Nakazawa M, et al. : Swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 in Japan. Emerg Infect Dis 5 : 833-834, 1999
- 12) Kobayashi H, et al. : Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl Environ Microbiol 67 : 484-489, 2001
- 13) Hornitzky MA, et al. : Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. Appl Environ Microbiol 68 : 6439-6445, 2002
- 14) Blanco BJ, et al. : Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157 : H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. Exp Biol Med (Maywood) 228 : 345-451, 2003
- 15) Akiba M, et al. : Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 (H⁻) isolates from cattle in Japan. Epidemiol Infect 122 : 337-341, 1999
- 16) Akiba M, et al. : A comparison of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle in Japan and the USA by molecular biological methods. Epidemiol Infect 125 : 221-224, 2000
- 17) Akiba M, et al. : Clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected cattle. FEMS Microbiol Lett 184 : 79-83, 2000
- 18) 中澤宗生, 鮫島俊哉: 乾草給餌による牛の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の排菌抑制. 感染症誌 77 : 635-636, 2003
- 19) Ohya T, et al. : Use of a trial probiotic product in calves experimentally infected with *Escherichia coli* O157. Jpn Agri Res Quarterly 37 : 189-194, 2001

National Veterinary Assay Laboratory, Tokyo

A National Surveillance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals in Japan

M. KIJIMA-TANAKA^{1,3}, K. ISHIHARA¹, A. KOJIMA¹, A. MORIOKA¹, R. NAGATA¹, M. KAWANISHI¹, M. NAKAZAWA², Y. TAMURA¹ and T. TAKAHASHI¹

Addresses of authors: ¹National Veterinary Assay Laboratory, Tokyo, 185-8511; ²National Institute of Animal Health, Tsukuba 305-0856, Japan; ³Corresponding author: Tel.: +81 423 21 1841; fax: +81 423 21 1769; E-mail: mayumik@nval.go.jp

With 4 tables

Received for publication April 20, 2005

Summary

To assess the public health risk, the prevalence and anti-microbial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) among food-producing animals were studied throughout Japan. Faecal samples were collected from healthy animals of 272 cattle, 179 pigs, and 158 broilers on 596 farms in all 47 Japanese prefectures. STEC were isolated from 62 (23%) cattle and 32 (14%) pig samples but from no chicken samples. Of the bovine isolates, 19 belonged to serotypes frequently implicated in human disease (O157:H7/non-motile (NM)/H not typeable, O26:NM/H11/H21/H not typeable, O113:H21, and O145:NM). The *eae* genes were observed in 37% of bovine isolates; among them one O145:NM and all four O157 isolates possessed *eae-γ1*, and one O145:NM, one O103:H11, and all five O26 isolates possessed *eae-β1* gene. Among the swine isolates, *stx2e* were dominant, and serotypes frequently implicated in human diseases or *eae*-positive isolates were not observed. Bovine isolates showed less anti-microbial resistance, but six isolates of O26:NM/H11 and O145:NM were multi-resistant and may need careful monitoring. Swine isolates showed various resistance patterns; chloramphenicol resistance patterns were more common than in bovine isolates. This first national study of STEC in the Japanese veterinary field should aid our understanding of Japan's STEC status.

Introduction

The emergence and dissemination of anti-microbial-resistant bacteria in food-producing animals have created public health concern because of the possibility of transmission via food from animals to humans. The WHO Global Principles for the Containment of Anti-microbial Resistance in Animals Intended for Food (WHO, 2000) were recently published. These principles aim to prevent the overuse of anti-microbials in food animals, thereby decreasing the prevalence of resistant bacteria, and to establish programs to monitor anti-microbial resistance in zoonotic food-borne pathogens.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are well recognized as important food-borne pathogens causing a variety of clinical syndromes, including diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome. Cattle have been implicated as principle reservoirs of STEC (Beutin et al., 1993; Blanco et al., 1997, 2004; Kobayashi et al., 2001; Orden et al., 2002; Leomil et al., 2003), and other food-producing animals such as sheep, goats and pigs have been demonstrated to carry STEC (Beutin et al., 1993; Heuvelink et al., 1998; Blanco et al., 2003;

Eriksson et al., 2003). STEC serotype O157:H7 is the dominant serotype associated with human disease worldwide, and O157:H-, O26:H11/H-, O5:H-, O91:H21/H-, O103:H2, O111:H-, O113:H21, O118:H16 and O145:H- are also frequently implicated in disease (Gyles et al., 1998; Fukushima et al., 2000; Eklund et al., 2001; <http://www.microbion-et.com.au/vtactable.htm>). STEC strains of different serotypes have been increasingly isolated from healthy domestic animals, although numerous other serotypes of STEC are either associated with disease at low frequency or have not been implicated in disease (Gyles et al., 1998; Fukushima et al., 2000). Besides serotype, other virulence factors such as the Shiga toxin type (Stx1 or Stx2) and the presence of the *eae* gene, which corresponds to adhering intimin, have been described in STEC (Beutin et al., 1995; Gyles et al., 1998; Oswald et al., 2000), and these virulence factors should be taken into account.

Kim et al. (1994) reported an increased prevalence of resistant STEC O157 in patients in Washington State, and several recent studies have documented anti-microbial resistance in STEC (Meng et al., 1998; Yamamoto and Wakisaka, 1998; Eklund et al., 2001; Schroeder et al., 2002; Bettelheim et al., 2003; Mercado et al., 2004). Some researchers have speculated that the use of anti-microbials in food-producing animals leads to the development of anti-microbial resistance in pathogenic bacteria, which can then reach humans via the food chain (Aarestrup and Wegener, 1999; Van den Bogaard and Stobberingh, 1999; Wegener, 2003). However, data on the emergence and dissemination of anti-microbial-resistant STEC in food-producing animals are still limited, and a survey of anti-microbial resistance in STEC in the veterinary field is urgently needed.

In cooperation with the Livestock Hygiene Service Centres of all 47 prefectures across Japan, the Japanese Veterinary Anti-microbial Resistance Monitoring System (JVARM) was formed in response to international concern about the impact of anti-microbial resistance on public health. Here, we discuss the prevalence of STEC in groups of major food-producing animals across Japan, as determined under JVARM, together with their virulence properties and anti-microbial susceptibility. This is the first national survey of STEC in the veterinary field in Japan.

Materials and Methods

Sampling of faeces

Sampling was carried out by the Livestock Hygiene Service Centres of all 47 prefectures across Japan from June 1999 to

March 2001. Fresh faecal samples were collected from healthy beef cattle (mainly 8–24 month-old of cattle), pigs and broilers on farms. Farms were selected by each prefecture's centre from among those farms that had taken informed consent for this study; in general, four to twelve farms per animal species were selected in each prefecture, and finally a total of 596 farms were selected from all 47 prefectures (268 farms of 47 prefectures for cattle, 176 farms of 46 prefectures for pigs, and 152 farms of 43 prefectures for broilers). One fresh faecal sample (in the case of cattle or pigs) or one mixed faecal sample (in the case of broilers) was collected at each farm. Faecal samples were placed in sterile plastic specimen tubes on ice and transported to our laboratory (June to December 1999) or to the Livestock Hygiene Service Centres of 12 prefectures (October 2000 to March 2001) for bacterial isolation within 3 days.

Isolation of STEC

Approximately 1 g of each faecal sample was incubated for 18 h at 37°C with 9 ml of trypticase soya broth (BBL, Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA) containing vancomycin (6 mg l⁻¹; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) or modified *E. coli* broth (Kyokuto Seiyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan) containing novobiocin (20 mg l⁻¹; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). One loop of this enrichment culture was further incubated with 1 ml of trypticase soya broth (BBL) for 4 h at 37°C; the culture was then boiled for 10 min, and 5 µl was used for PCR in a total reaction volume of 50 µl. STEC were screened with a pair of *stx* common primers (Table 1) in accordance with the PCR method of Ohashi et al. (1993). Amplification was performed in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) for 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C, with a final extension at 72°C for 10 min. PCR-positive enrichment cultures were then streaked onto desoxycholate, hydrogen sulphate, lactose agar (Eiken Co. Ltd., Tokyo, Japan) and sorbitol MacConkey agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with cefixime (0.05 mg l⁻¹) and potassium tellurite (2.5 mg l⁻¹; Mast Diagnostics, Bootle, Merseyside, UK) (CT-SMAC). Up to 96 candidate *E. coli* colonies were chosen and examined for the presence of *stx* genes by the same PCR technique. We also picked up sorbitol-negative coliform colonies that appeared on the CT-SMAC. *Stx*-positive isolates were inoculated onto nutrient agar (Eiken), purified by

subculture, and confirmed to be *E. coli* strains by conventional biochemical tests and by API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in the case of the finally chosen strains. One *stx*-positive isolate (or, if there appeared to be variability in characteristics, two isolates) was chosen from each faecal sample and subjected to further study as described below.

Virulence-associated characterization of STEC isolates

To assess virulence properties, we examined the STEC isolates for serotype, *stx* gene type and presence of the *eae* gene. O anti-sera for serotyping were purchased from the *E. coli* Reference Laboratory, University of Santiago de Compostela, Spain, and H anti-sera from Denka Seiken, Tokyo, Japan. Serotyping was performed by the methods described by the manufacturers. We tested for serotypes O1 to O175, as well as 22 commercially available H-types (H2, 4–7, 9–12, 16, 18–21, 27, 28, 34, 40–42, 45 and 51). The presence of the *stx1*, *stx2* and *eae* genes were investigated by PCR in accordance with the methods of Ohashi et al. (1993) and Gannon et al. (1993) (Table 1). Amplification of the *eae* gene was performed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The methods used to amplify the *stx1* and *stx2* genes were identical with that used to identify the *stx* common gene. For *stx2*-positive isolates, *stx2e* gene was further tested according to the methods of Johnson et al. (1990). For *eae*-positive isolates, *eae-β1* and *eae-γ1* genes were tested according to Blanco et al. (2004).

Anti-microbial susceptibility testing

Eighteen widely used anti-microbial agents approved in Japan as veterinary medicines were tested. The MIC of each isolate was determined by a standardized agar dilution method, as described by the Japanese Society of Chemotherapy (Mitsuhashi et al., 1981). Isolate was grown in Mueller-Hinton broth (Difco) for 18 h at 37°C. The concentration of the inoculum was adjusted to give approximately 10⁶ cfu ml⁻¹ in saline, and the inoculum was spotted onto a Mueller-Hinton agar plate (Difco) containing serial 2-fold dilutions of the anti-microbial agent, using a multipoint inoculator that delivered a 5-µl sample. The plate was incubated for 20 h at 37°C. The MIC was defined as the lowest concentration at which no visible growth was observed. *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*

Table 1. Primers used in this study

Primer	Target gene	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
VT com (forward)	<i>stx</i> (<i>stx1</i> and <i>stx2</i>)	CGG ACA GTA GTT ATA CCA C	171	Ohashi et al. (1993)
VT com (reverse)		CTG CTG TCA CAG TGA CAA		
VT1 (forward)	<i>stx1</i>	CAA CAC TGG ATG ATC TCA G	349	Ohashi et al. (1993)
VT1 (reverse)		CCC CCT GAA CTG CTA ATA		
VT2 (forward)	<i>stx2</i>	ATC AGT CGT CAC TCA CTG GT	404	Ohashi et al. (1993)
VT2 (reverse)		CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		
VTe-a (forward)	<i>stx2e</i>	CCT TAA CTA AAA GGA ATA TA	230	Johnson et al. (1990)
VTe-b (reverse)		CTG GTG GTG TAT GAT TAA TA		
AE 9 (forward)	<i>eae</i>	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC	815	Gannon et al. (1993)
AE 10 (reverse)		GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG		
EA-B1-F (forward)	<i>eae-β1</i>	CGC CAC TTA ATG CCA GCG	811	Blanco et al. (2004)
EAE-B (reverse)		CIT GAT ACA CCT GAT GAC TGT		
EAE-FB (forward)	<i>eae-γ1</i>	AAA ACC GCG GAG ATG ACT TC	804	Blanco et al. (2004)
EAE-C1 (reverse)		AGA ACG CTG CTC ACT AGA TGT C		

ATCC 35218, *E. coli* NIHJ, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 209P and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used for quality control. Breakpoints were those described previously (Kijima-Tanaka et al., 2003).

Results

Isolation of STEC

A total of 609 faecal samples (272 from cattle, 179 from pigs and 158 from broilers) were collected from 596 farms of all 47 prefectures across Japan. STEC were isolated from 62 bovine faecal samples (23%) and 25 swine samples (14%). Three of the positive bovine samples had different serotypes or *stx* types of STEC, so we chose two isolates each from these three samples. Finally, we chose 65 bovine isolates and 25 swine isolates for further study. Of these isolates, 23 bovine STEC were isolated in prefecture laboratories and the remainder were isolated in our laboratory. These isolates originated from a wide area of Japan: the bovine isolates from 32 prefectures and the swine ones from 17 prefectures. Overall, bovine and swine STEC were present in all eight districts (Hokkaido-Tohoku, Kanto, Chubu, Tokai, Kinki, Chugoku, Shikoku and Kyushu-Okinawa) of Japan. No STEC was found in the 158 broiler faecal samples.

Virulence-associated characterization of STEC

Serotypes and other virulence-associated characteristics of STEC are shown in Table 2. For the bovine isolates, 65 isolates could be classified into 32 serotypes. Among them, nine isolates belonged to the serogroups of O157 and O26, which are most frequently detected as causal agents of human diseases. All of these isolates possessed the *eae* genes; *eae-γ1* for all O157, and *eae-β1* for all O26 isolates. Three isolates belonged to the O113:H21 serotype and seven to O145:NM, which serotypes were also frequently implicated in human diseases. *Eae* gene was not detected from O113:H21 isolate, and *stx* and *eae* genes including *eae*-subtypes were varied in O145:NM isolates (Table 2). For the other 46 bovine isolate, *stx2*-positive, *eae*-negative isolates were dominant (25 isolates). *Eae*-genes were observed for 13 isolates, of these, one was *eae-β1* of O103:H11 isolate, and the other 12 were not *eae-β1* nor *eae-γ1*. Geographically, two isolates of O157:H7, two isolates of O84:NM and four isolates of O174:H21 were derived from different farms in the same prefecture, and for the other isolates of identical serotypes, the geographical origins were from far-spaced prefectures, each other.

The swine isolates belonged to 15 serotypes, including three not typeable isolates. The serotypes and other virulence-factor genotypes were quite different from those of the bovine isolates. Serotypes of frequently implicated in human diseases, or *eae*-positive isolates were not observed in swine isolates. *Stx* type was *stx2* in 24 of 25 isolates, and many of them (18 isolates) were *stx2e*, which was associated with oedema diseases in pigs (DeGrandis et al., 1989). For the six O100:NM isolates from five far-spaced prefectures, *stx2* type was not *stx2e*.

Anti-microbial resistance

The MICs of the STEC isolated are shown in Table 3. MIC distributions range, MIC₅₀ (MIC values that inhibit 50% of

the isolates tested) and MIC₉₀ (MIC values that inhibit 90% of the isolates tested) and rates of resistance were generally higher in swine isolates than in bovine ones. High rates of resistance were observed against sulphadimethoxine (68% pigs and 55% cattle), oxytetracycline (64 and 32%) and dihydrostreptomycin (44 and 31%), followed by ampicillin and kanamycin (11–16%). For chloramphenicol, higher rates of resistance were observed among the swine isolates (48%) but low rates among the bovine isolates (3%). Trimethoprim resistance showed a similar tendency. Rates of resistance to the other anti-microbials were ≤4%. Resistance to cephalosporins (cefazolin, cefuroxime and ceftiofur), quinolones (nalidixic acid, oxolinic acid, enrofloxacin, and ofloxacin) and bicozamycin was not observed.

Anti-microbial resistance patterns of STEC are shown in Table 4. Twenty-seven bovine isolates (42%) were susceptible to all 18 anti-microbials assayed (data not shown). Fifteen isolates (23%) showed single resistance and 23 (35%) showed multiple resistance. Among the multi-resistant isolates, six (O26:H11, O26:NM, and four isolates of O145:NM) were serotypes frequently implicated in human disease. Multiple resistance was also frequently observed in O2:NM and O174:NM/H21 isolates: among these, four O2:NM isolates from far-spaced prefectures, and three O174:H21 isolates from different farms in the same prefecture and one O174:H21 isolate from far-spaced prefectures showed identical resistance patterns. The most frequent resistance pattern of the bovine isolates was sulphadimethoxine–oxytetracycline–dihydrostreptomycin resistance, and additional patterns of resistance to kanamycin and/or ampicillin were also frequently observed.

Fifteen of the 25 swine isolates (60%) showed multiple resistance and seven (28%) showed single resistance (Table 4). Only three isolates (12%) were susceptible to all anti-microbials. The swine isolates showed various resistance patterns including resistance to as many as seven anti-microbials. The resistance patterns were different from those of the bovine isolates, and patterns including chloramphenicol were more common than with the bovine isolates.

Discussion

In Japan, rates of human STEC infection abruptly increased in 1996 because of a large-scale outbreak of O157 infection in Sakai city: government records of STEC isolation from human cases increased to 3022 in that year and have been kept at about 2000 a year since then (<http://idsc.nih.gov/iasr/index.html>). O157:H7 was the dominant serotype in those cases, followed by O26:H11. And about 90% of human isolates belonged to serogroups O157 and O26. In our study, a total of nine of bovine isolates belonged to O157 or O26, and all of these isolates possessed the *eae* genes of *eae-γ1* for O157, and *eae-β1* for O26 isolates. Special attention should be given to these isolates to follow their rates of prevalence and anti-microbial resistance. We also detected three O113:H21 isolates and seven O145:NM isolates in cattle; these isolates were also frequently implicated in human cases followed by O157 or O26. Our O113:H21 isolates lacked the *eae* gene, and this is commonly observed in the literature on O113:H21 strains from human disease (Gyles et al., 1998; Paton et al., 1999). Further studies of virulence factors such as *lpfA*_{O113} (Doughty et al.,

Table 2. Virulence-associated characteristics of STEC isolated from food-producing animals in Japan

Source	Serotype ^a	No. of isolates	No. of isolates with the following genes ^b :			
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 + stx2</i>	<i>eae</i>
Cattle	O157:H7	3	1	1	1	3 (<i>γI</i>)
	<u>O157:H NT</u>	1	0	1	0	1 (<i>γI</i>)
	O26:NM	2	2	0	0	2 (<i>βI</i>)
	<u>O26:H11</u>	1	0	0	1	1 (<i>βI</i>)
	<u>O26:H21</u>	1	1	0	0	1 (<i>βI</i>)
	<u>O26:H NT</u>	1	1	0	0	1 (<i>βI</i>)
	<u>O113:H21</u>	3	0	3	0	0
	<u>O145:NM^c</u>	7	3	4	0	2 (<i>βI</i> (1), <i>γI</i> (1))
	O1:H45	1	0	1	0	0
	O2:NM	7	0	7	0	1
	O8:NM	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O15:H NT	1	0	1	0	0
	O22:H NT	3	0	1	2	0
	O46:H NT	1	0	0	1	0
	O46:H11	1	0	0	1	0
	O74:NM	1	1	0	0	1
	O84:NM	5	5	0	0	5
	O88:NM	1	0	1	0	0
	O98:NM	1	1	0	0	1
	O103:H11	1	1	0	0	1 (<i>βI</i>)
	O113:H11	1	0	0	1	0
	O113:H19	2	0	2	0	0
	O113:NM	2	0	1	1	0
	O116:NM	1	0	1	0	0
	O119:H16	1	0	1	0	0
	O119:NM	2	2	0	0	2
	O146:NM	1	1	0	0	0
	O165:NM	2	1	0	1	2
O174:H21	6	0	6	0	0	
O174:NM	2	0	2	0	0	
NT:H NT	1	0	1	0	0	
Rough:NM	1	1	0	0	0	
	Total^d	65	21 (32.3)	35 (53.8)	9 (13.8)	24 (36.9)
Pigs	O2:NM	2	0	2 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O2:H NT	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O8:H19	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O91:H NT	1	1	0	0	0
	O100:NM	6	0	6	0	0
	O100:H NT	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O104:NM	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O121:NM	2	0	2 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O121:H10	2	0	2 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O123:H NT	3	0	3 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O141:H4	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	O141:H NT	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	NT:NM	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	NT:H28	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
	NT:H NT	1	0	1 (<i>stx2e</i>)	0	0
		Total	25	1 (4.0)	24 (96.0)	0 (0.0)

^aNM, non-motile isolates. NT, not typeable isolates with O1 to O175 anti-sera, or with commercially available 22 H anti-sera. Bold and underlined serotypes are serotypes frequently implicated in human disease. Two isolates of O157:H7, two isolates of O84:NM and four isolates of O174:H21 were derived from different farms in the same prefecture, and for the other isolates of identical serotypes, the geographical origins were from widely separated prefectures.
^b*Stx2e* gene was tested for *stx2*-positive isolate, *eae-βI* and *eae-γI* genes were tested for *eae*-positive isolates. Number in parentheses is number of isolate, and no number means 'all' corresponding isolates.
^cVirulence-factor genotypes of O145:NM isolates were as follows; three isolates of *stx2*, two isolates of *stx1*, one isolate each of *stx1-eae-γI* and *stx2-eae-βI*.
^dNumbers in parentheses are percentages of the total isolates from the respective sources.

2002) might be required for these isolates. For the other 46 bovine isolates, *stx2*-positive and *eae*-negative STEC were mostly prevalent as 25 isolates. These results are consistent with those of earlier reports that *stx2*-positive, *eae*-negative STEC are dominant in healthy calves and might be components of their normal intestinal flora (Beutin et al., 1995;

Blanco et al., 1997). And although *eae*-genes were observed for 13 isolates, *eae* subtype was not *eae-βI* nor *eae-γI* except one O103:H11 isolate. Some reports indicated that human or bovine isolates of STEC O103 were closely associated with *eae-e* (Oswald et al., 2000; Blanco et al., 2004), but our O103:H11 isolate reacted with *eae-βI* primers like O103:H2 isolates of