

Actinobacillus pleuropneumoniae の 生物型及び血清型について

伊藤博哉 ((独)農研機構 動物衛生研究所)

Ito, H. (2010). *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes and serotypes

ALL about SWINE 36, 2-9

1. はじめに

出血性及び線維索性肺炎を主徴とする豚胸膜肺炎は世界各国で多発し、養豚業に多大な経済的損失を与えている (13, 19)。その起因菌である *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) は、莢膜を保有するグラム陰性の小桿菌であるが、しばしば多形性を示す。またウレアーゼ、マンニットの分解、CAMP テスト、血液寒天上での溶血性は、いずれも陽性といった性状を示す (19)。

本菌は、発育の際のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD) 要求性の有無に基づき、2つの生物型に型別される (56)。NAD 要求性の生物型 1 は、かつては *Haemophilus pleuropneumoniae*、一方、NAD 非要求性の生物型 2 は、かつては *Pasteurella haemolytica*-like organism に分類され別菌種とされていた。しかし、DNA 相同性試験および生化学的・生物学的性状試験の成績から、共に *Actinobacillus* 属に移し、同一菌種の App に再分類された (56)。

App にはこれまでに 15 の血清型の存在が知られている (4, 50)。血清型 1 及び 5 はさらに 2 つの亜型 (それぞれ 1a, 1b 及び 5a, 5b) に型別される (26, 47) が、臨床細菌学的観点からみると亜型の型別の重要性は低い (14)。生物型 1 では、

血清型 14 を除くすべての血清型の分離が報告されている (14)。一方生物型 2 では、血清型 2, 4, 7, 9, 11, 13, 14 のみが分離されている (14, 35, 50)。また両生物型ともに、型別不能の株も存在する (22, 23, 35)。

2. 異なる生物型間及び異なる血清型間の病原性の違いについて

生物型 1 は胸膜肺炎を呈した豚の肺から頻繁に分離されるが、生物型 2 は散発的にしか分離されない。また実験感染の成績から生物型 2 は血清型 1 よりも病原性が弱いと考えられていた (24)。そのため生物型 1 のみが重要であると考えられてきており、App に関して得られる情報は、ほとんど生物型 1 に関するものである。以降特に記載のない場合は、生物型 1 についての知見である。しかし、胸膜肺炎症例から生物型 2 が純培養的に分離された報告はいくつかある (10, 35, 43)。著者の知る限り日本での生物型 2 の分離報告は、学会での口頭発表とそれに対する追加発言の計 2 県 2 例の報告のみである (43)。米国では、実験感染で胸膜肺炎が再現できた生物型 2 の株 (血清型 1 及び 8 の両方に凝集する型別不能株) の分離報告がある (10)。さらにごく最近のスペイン

Actinobacillus pleuropneumoniae の生物型及び血清型について

での7年にわたる調査報告によると、典型的な急性胸膜肺炎を呈した豚の肺から分離された App のうち生物型2の割合は、比較的高率(8.9%~39.4%(平均25.3%))であった(35)。そして、それらのほとんどは純培養的に分離された(血清型は2, 4, 7, 11)(35)。以上のことから、生物型2は、生物型1のような衛星現象等の簡便な同定の鍵となる性状を持たないため、生物学的・生化学的性状では識別しにくい *Actinobacillus suis* 等の他のパストレラ科細菌として誤認されてきた例が多いのかもしれない。事実、豚胸膜肺炎を疑う症例の検査を行う場合、多くの人が生物型1を意識しすぎている傾向が強すぎると思う。

App は、異なる血清型間で病原性に差が認められる(13, 14, 19)。一方、同一の血清型の株間でも病原性に差が認められる事もわかっている。すなわち、日本や欧州では血清型2による胸膜肺炎の発生例が多く、それらによる被害が問題となっているが(14, 44, 45, 63)、北米では血清型2は少数分離されるものの、血清型2による胸膜肺炎は問題となっていない(14)。その原因としては、後述する ApxI~ApxIII の3種の Apx 毒素のうち、日本や欧州で分離される血清型2は ApxII 及び ApxIII を分泌するが、北米で分離される血清型2は ApxII しか分泌しないことが一つの理由として考えられている(14)。

3. 血清型別の意義について

App 分離株の血清型別は、世界各国で実施されている。その理由としては上記のように、異なる血清型で病原性に差があることがあげられる(13, 14, 19)。さらに、豚胸膜肺炎用のワクチンは異なる血清型間での有効性が期待できず(61)、全て

の血清型に有効なワクチンはない(61, 62)。したがって、分離された株の血清型別を行うことは、各農場におけるワクチンプログラムを検討するうえで重要な検査であると言える。また一般的に、血清型1, 5, 9, 11は他の血清型よりも病原性が強いと言われており、分離株の病原性の強さを推定するうえでも、血清型別の実施意義がある(13, 14, 19)。

4. 疫学

App は後述するように、主に荚膜多糖の構造および抗原性にに基づき15の血清型に型別されるが(54)、分離される株の血清型は、国、地域、農場でそれぞれ異なる(7)。日本では血清型2が最も多く、次いで血清型5及び1が多い。最近の文献によると上記3つの血清型で全体の88%以上を占めている(44, 45, 63)。日本では血清型4, 10, 13及び14の分離報告はなく、その他の血清型では散発的な分離報告例がある。1980及び90年代の北米では血清型1及び5の分離率が高かったが(7)、最近のカナダのオンタリオ州での抗体調査によれば、病原性がより低い血清型7や12にシフトしていた(33)。これは検査によるモニタリング、バイオセキュリティの強化や管理手法の向上によるものと推察されている(33)。デンマークでは肺または扁桃から分離された App の90%以上が血清型2, 6または12である(15)。オーストラリアでは血清型15が最も流行しており(4, 7)、イギリスや中国では血清型3(7)、スペインでは血清型4(7)の分離が多いというように他国とは異なる特徴を示す国もある。その他の国々で流行している血清型の情報は、総説があるので、それを参照されたい(7)。日本で最も

分離頻度の高い血清型 2 は全国各地で分離されるが、血清型 1 や 5 の分離の有無及び分離率は地域によって差がある。

同一時期に 1 農場で複数の血清型の App の分離報告例はある (5)。また 1 個体からの複数の血清型の App の分離報告例もある (5)。なお App は非常に宿主特異性が高く豚以外からの分離報告はまれである。珍しい例としては、血清型 5 の株が羊の関節炎から分離されている。

5. 血清型に関与する抗原について

不活化した各血清型参考株の全菌体を免疫して作製した型別用特異抗血清は、ポリクローナルな抗体を含むため、異なる血清型間で交差反応がしばしば認められ、型別不能となることがある (11, 36, 37, 41, 42, 49, 60)。そのため、どの抗原が血清型に関与しているかを明らかにするための研究が多数行なわれた。その結果、App の血清型は主に莢膜多糖の抗原性にに基づき型別されることが、莢膜多糖の詳細な構造及び抗原性解析の研究で明らかとなった (3, 34, 53, 54, 55)。さらに、莢膜多糖だけではなく、リポ多糖 (LPS) も血清型を決定する重要な抗原である (3, 34, 53, 54, 55)。特に血清型 1, 9, 11 の間 (36, 42)、血清型 3, 6, 8, 15 の間 (41, 55, 60)、血清型 4, 7 間 (37) では、交差反応がしばしば認められる。これは LPS の構造が、それぞれの血清型間で、同一または非常に類似しているためである (3, 54, 55)。また外膜タンパク質にも各血清型間で交差する抗原性を示すものもあり、従来の血清型別法では、複数の抗原が血清型別に影響を与える。

以上の知見から、大腸菌やサルモネラで使用されている (K):O:H という血清型命名方式と同様

に、App においても K:O を使用した血清型命名方式が提唱された (表 1) (3)。野外分離株のほとんどは表 1 に示す K:O 型である。しかし、例数は少ないが K1:O7 (11)、K2:O7 (49)、K15:O12 (29) 等、例外的な珍しい株も国外では分離されている。これらの株は従来の血清型別では複数の型別用抗血清と反応する型別不明の株と同定される可能性があり、K:O による血清型の命名方式はこれらの例外的な株に対応できる。しかし、K 抗原及び O 抗原を型別可能な特異的抗血清の入手や、莢膜や LPS の構造を決定することは一般の検査室では困難であるため、新たに提唱された K:O による血清型命名方式は普及していない。

表 1. App の莢膜及び LPS (O 抗原) の抗原性に基いた血清型命名法 (Betnon ら (2) の表 3 に新たな情報 (34, 53, 55) を加筆し、改変)

莢膜血清型	K:O 命名法
1	K1:O1 ^a
2	K2:O2 ^b
3	K3:O3
4	K4:O4
5a	K5a:O5
5b	K5b:O5
6	K6:O6(O3 と類似した LPS)
7	K7:O4(O4 と類似した LPS)
8	K8:O3
9	K9:O9(O1 と類似した LPS)
10	K10:O10
11	K11:O1
12	K12:O12
13	K13:O13
14	K14:(O14?)
15	K15:O3 ^c

^a 北米及び欧州で K1:O7 の分離報告例あり (1, 11)

^b 欧州で K2:O7 の分離報告例あり (49)

^c 欧州で K15:O12 の分離報告例あり (29)

Actinobacillus pleuropneumoniae の生物型及び血清型について

6. 血清型別の検査法について

スライド凝集試験 (38, 58) 及び共凝集試験 (40) 等が、分離株の迅速・簡便な血清型別の検査法として広く用いられている。しかし、交差反応が認められた時は、より特異性の高い手法である間接赤血球凝集試験 (39) や免疫沈降試験 (41) を行うことが推奨されている。手技が多少煩雑であるためそれほど普及していないが、被検菌株から抽出した LPS を抗原、参考株を免疫して作製した抗血清を抗体に用いたイムノプロット法が、O (LPS) 抗原の型決定に使用されることがある。この方法は、特に例外的な株である血清型 K2:O7 や他血清型との交差反応の多い血清型 15 の野外分離株の検査等、一部の例外のみに使用されている (44, 60)。

7. 血清型を推測可能な代替手法について

7-1 Apx 毒素の遺伝子型別用 PCR

App は、重要な病原因子かつ感染防御抗原である 4 種の Apx 毒素 (ApxI, ApxII, ApxIII 及び ApxIV) を産生し、菌体外に分泌する (8, 13, 19)。ApxIV はすべての血清型が分泌する種特異的な毒素である (58)。一方、ApxI, ApxII, ApxIII 及びそれらの遺伝子保有パターンは各血清型で異なり、おおむね血清型特異的であると言われている (表 2) (2, 8, 9)。3 つの Apx 毒素の遺伝子のうちどれを保有しているかを検査する遺伝子型別用の multiplex PCR も開発されている (9, 17)。さらに、ApxI 分泌株は非分泌株よりも病原性がより強いと言われている。以上のことから Apx 毒素の遺伝子型別用 PCR は、分離株の血清型 (群) 及び毒性の程度の推定に役立つ (13, 14, 19)。

表 2. App の各生物型及び血清型における各種 apx 毒素遺伝子の保有の有無 (2, 8, 9, 14, 35)

生物型	血清型	apx 毒素遺伝子			
		apxI	apxII	apxIII	apxIV
1	1	+	+	-	+
	2	-	+	+	+
	3	-	+	+	+
	4	-	+	+	+
	5a, 5b	+	+	-	+
	6	-	+	+	+
	7	-	+	-	+
	8	-	+	+	+
	9	+	+	-	+
	10	+	-	-	+
	11	+	+	-	+
	12	-	+	-	+
	13	?	?	?	+
	15	-	+	+	+
	2	2	-	+	-
4		-	+	-	+
7		-	+	-	+
9		-	+	-	+
11		-	+	-	+
13		-	+	-	+
14		+	-	-	+

7-2 外膜リポ蛋白質 OmlA の遺伝子型別用 PCR

OmlA はすべての App が発現する種特異的な抗原であり、PCR による種特異的な同定・検出法が開発されている (16, 17, 21, 52)。しかも OmlA には遺伝学及び抗原性に多様性があり、5 つの遺伝子型及び 3 つの抗原型に分かれる (17, 21, 52)。さらに、App の各血清型株の OmlA の遺伝子型はおおむね血清型特異的である (17, 21, 52)。すなわち、PCR-RFLP または multiplex PCR で、App 生物型 1 は、①血清型 1, 9, 11, 12 (I 型)、②血清型 2, 8, (12) (II 型)、③血清型 3, 6, 7, (8), (12)、

15 (III型), ④血清型4 (IV型), ⑤血清型5, 10 (V型)の5型に型別できる(17, 21, 52)。したがって、分離した株のOmlAの遺伝子型別を実施すれば、日本での流行している生物型1血清型1, 2, 5のいずれであるか、おおよその見当がつく。

生物型2のOmlAの遺伝子型については少数例しか調べられていない(17, 20)。筆者らは生物型2血清型2, 13及び14の*omlA*遺伝子の全塩基配列を決定した(20)。生物型2血清型14の*omlA*遺伝子は、I型に属する血清型12の*omlA*遺伝子と最も相同性が高かった(20)。一方、生物型2血清型2及び13の*omlA*遺伝子は、III型に属する血清型3参考株の*omlA*遺伝子と最も相同性が高かった(20)。同じ血清型2であっても、生物型1と2の株で*omlA*遺伝子型が異なることは、興味深い。

7-3 莢膜多糖合成遺伝子型別用 PCR

現在までに血清型1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12の莢膜多糖合成に関わる遺伝子が同定されている(26)。莢膜多糖合成には、2~5の遺伝子群が必要であり、その遺伝子構造及び塩基配列から3つのタイプに型別される(26)。さらに莢膜多糖合成遺伝子の塩基配列を利用して設計した特異プライマーによる血清型1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12の同定・検出用のPCR法が開発された(1, 18, 25, 32, 59, 64, 65)。上記のようにAppの血清型は主に莢膜(K)抗原の抗原性で規定されることから、血清型別代替法として、最もふさわしい方法かもしれない。日本で分離されるAppのほとんどが血清型1, 2, 5のいずれか(88%以上)である(44, 45, 63)状況をふまえ、筆者は既報のプライマーを利用し、血清型1, 2, 5型の莢膜合成遺伝子を標的とした multi-

plex PCR法を開発した(22, 23)。この方法を用いると1本, 1回のPCRで、分離株が血清型1, 2, 5あるいはそれらの血清型以外の株かを識別できる。

8. 血清型特異的な血清学的診断法による抗体検査について

豚胸膜肺炎の生前診断として、抗体検査による血清学的診断がよく実施されている。補体結合反応(CF)は、血清型特異的な抗体検査法であり、どの血清型のAppがその農場および豚群に浸潤しているか推察できる。CFはかつて血清診断法のgold standardであったが、感度が低いこと、操作が煩雑なことから現在はELISAが主流となっている(13)。血清型または血清型群特異的な抗体検査用のELISA抗原には、長鎖LPS、莢膜または全菌体が使用されている(5, 13)、養豚先進国であるデンマークのSPF農場では、血清型特異的なELISAを用いて、血清型2, 6については毎月、血清型12については1年に4回、血清型1, 5, 7, 10は年に1回モニタリングを行っている(13)。一方、血清型に関係なくApp種特異的に抗体を検出する方法も開発されているが、今回その説明は省く。

9. Appと血清学的交差の認められる細菌について

健康豚の扁桃、肺、肝臓(12)や豚の肉芽腫性リンパ節炎(51)から*Actinobacillus porcitosillarum*が分離され、新菌種として提唱されている(12)。この細菌は発育にNADを要求するなど生物学的・生化学性状が酷似しており、当初はApp生物型1と誤認された(12)。しかも、*A. porcitosillarum*は、App血清型1, 9または12の

特異抗血清と反応することから (12, 51), 抗体検査による豚胸膜肺炎対策の妨げになると考えられている (12)。なお本菌は病豚からの分離例は上記のリンパ節炎症 (51) の一例のみであり, この株を用いた再感染実験による再現試験も行われていない。一方, 健康豚から分離された株の実験感染による成績では, 非病原性である事が示唆されている (12)。

一方, *Actinobacillus lignieresii* の豚からの分離報告はこれまでになく, 同定や血清学的診断の際に大きな問題とはならないが, 牛から分離される *A. lignieresii* は App 血清型 4 及び 7 と血清学的に交差する LPS を保有する (31)。さらに馬から分離された *A. lignieresii* (*Actinobacillus genomospecies 1*) は, App 血清型 3 特異抗血清と交差反応する (6)。したがって, 血清型別は, App と上記の細菌とを識別するための信頼できる方法とはいえない。

10. 血清型による薬剤感受性の違いについて

血清型 2 よりも血清型 1, 5 では薬剤 (特にテトラサイクリン系抗菌剤) 耐性の株が多いと報告されているが (44, 45, 63), その理由は不明である。

11. これまでに報告例の少なかった血清型 13 ~ 15 について

これまでに血清型 13 及び 14 の分離報告例は少ない。これはいずれの血清型も生物型 2 であることから, 他のパストレラ科細菌と混同していることが理由かもしれない。しかし近年北米では, 生物型 1 血清型 13 の株の分離例があった (14)。また生物型 1 血清型 15 は, オーストラリアでは最

も頻繁に分離される血清型である (4)。日本でも, 近年血清型 15 の分離報告例が多くなっている (30, 45, 60)。To らは, 日本, オーストラリア及びアルゼンチンで分離された血清型 15 の抗原及び遺伝子解析を行い, 血清型 15 には少なくとも 2 つ以上のタイプが存在することを報告した (60)。血清型 15 は血清型 3, 6, 8 と類似した LPS を保有するため, 血清型 3, 6, 8 と血清学的に交差反応し (56, 60), さらに血清型 7 及び 12 とも交差反応する株がある (60)。オーストラリアで分離された血清型 15 は, 分離当初は血清型 12 と誤同定されていたが, 後の解析により血清型 12 ではなく新しい血清型 15 に再型別された経緯がある (4)。このように血清型 15 は, 他の血清型と交差反応する例が多く, 他の血清型と誤認されてきた可能性が高いようである。

12. おわりに

App の生物型 2 の病原性及び疫学や, 全血清型に有効なワクチンの開発等, まだまだ解明・解決すべき点が多い。今後さらに App の病原性及び感染防御に関する研究等を発展させて, 本菌による豚胸膜肺炎対策の一助としていく必要がある。

13. 引用文献

1. Angen, O. et al. 2008. *Vet. Microbiol.* **132**: 312-318.
2. Beck, M. et al. 1994. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2749-2754.
3. Beynon, L.M. et al. 1993. *Eur. J. Biochem.* **214**: 209-214.
4. Blackall, P.J. et al. 2002. *Vet. Microbiol.* **84**: 47-52.

5. Broes, A. et al. 2007. *J. Swine Health Prod.* **15**: 264-269.
6. Christensen, H. 2002. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1239-1246.
7. Dubreuil, J. D. et al. 2000. *Anim. Health Res. Rev.* **1**: 73-93.
8. Frey, J. 1995. *Trends Microbiol.* **3**: 257-261.
9. Frey, J. et al. 1995. *Mol. Cell. Probes* **9**: 277-282.
10. Frank, R.K. et al. 1992. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 270-278.
11. Gottschalk, M. et al. 2000. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**: 444-449.
12. Gottschalk et al. 2003. *Vet. Microbiol.* **92**: 87-101.
13. Gottschalk, M and Taylor, D.J. 2006. pp.563-576. *In: Disease of swine*, 9th ed. (Straw, B.E. et al. eds.) Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
14. Gottschalk, M. 2009. *Proc. 4th Congr Asian Pig Vet. Soc.*: 120-123.
15. Grondahl-Hansen, J. et al. 2003. *Vet. Microbiol.* **96**: 41-51.
16. Gram, T. and Ahrens, P. 1998. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 443-448.
17. Gram, T. et al. 2000. *Vet. Microbiol.* **75**: 43-57.
18. Hussy, D. et al. 2004. *Vet. Microbiol.* **99**: 307-310.
19. 伊藤博哉 1997. *臨床獣医* **15**: 28-33.
20. Ito, H. 2000. *Proc. 2nd Int. Vet. Vaccines Diagn. Conf.*: p61
21. Ito, H. 2008. *JARQ* **42**: 261-266.
22. Ito, H. 2010. *J. Vet. Med. Sci.* **72** 印刷中
23. Ito, H. and Morioka, K. 2009. *Proc. 4th Congr Asian Pig Vet. Soc.*: p423
24. Jacobsen, M.J. et al. 1996. *Vet. Microbiol.* **49**: 159-168.
25. Jessing, S.G. et al. 2003. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4095-4100.
26. Jessing, S.G. et al. 2008. *Vet. Microbiol.* **129**: 350-359.
27. Jolie, R.A. et al. 1994. *Vet. Microbiol.* **38**: 329-349.
28. Kamp, E.M. et al. 1994. *Infect. Immun.* **62**: 4064-4065.
29. Klausen, J. et al. 2007. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**: 244-249.
30. Koyama, T. et al. 2007. *J. Vet. Med. Sci. Vet.* **69**: 961-964.
31. Lebrun, A. et al. 1999. *Vet. Microbiol.* **65**: 271-282.
32. Lo, T.M. et al. 1998. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1704-1710.
33. MacInnes, J.I. et al. 2008. *Can. J. Vet. Res.* **72**: 242-248.
34. MacLean, L.L. et al. 2004. *Infect. Immun.* **72**: 5925-5930.
35. Maldonado, J. et al. 2009. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**: 854-857.
36. Mittal, K.R. 1990. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 535-539.
37. Mittal, K.R. and Bourdon, S. 1991. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1344-1347.
38. Mittal, K.M. et al. 1982. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1019-1023.
39. Mittal, K.M. et al. 1983. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 787-790.

Actinobacillus pleuropneumoniae の生物型及び血清型について

40. Mittal, K.M. et al. 1983. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1351-1354.
41. Mittal, K.R. et al. 1988. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 985-989.
42. Mittal, K.R. et al. 1993. *Res. Vet. Sci.* **55**: 179-184.
43. 宮前千史ら 1991 第111回日本獣医学会講演要旨集 p179
44. 守岡綾子ら 2006. 日本獣医師会雑誌 **59**: 815-819.
45. Morioka, A. et al. 2008. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1261-1264.
46. Nielsen, R. 1984. *Nord. Vet. Med.* **36**: 221-234.
47. Nielsen, R. 1986. *Acta Vet. Scand.* **27**: 49-58.
48. Nielsne, R. and O'Connor, P.J. 1984. *Acta Vet. Scand.*, **25**: 96-106.
49. Nielsen, R. et al. 1996. *Acta Vet. Scand.* **37**: 327-336.
50. Nielsen, R. et al. 1997. *Vet. Microbiol.* **54**: 35-46.
51. Ohba et al. 2007 *J. Comp. Pathol.* **137**: 82-86
52. Osaki, M. et al. 1997. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 213-215.
53. Perry, M.B. and MacLean, L.L. 2004. *Carbohydr. Res.* **339**: 1399-1402.
54. Perry, M.B. et al. 1990. *Serodiagn. Immunother. Inf. Dis.* **4**: 299-308.
55. Perry, M.B. et al. 2005. *Biochem. Cell. Biol.* **83**: 61-69.
56. Pohl, S. et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 510-514.
57. Rapp, V.J. et al. 1985. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 185-192.
58. Schaller, A. et al. 1999. *Microbiology* **145**: 2105-2116.
59. Schuchert, J.A. et al. 2004. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4344-4348.
60. To, H. et al. 2009. *Proc. 4th Congr. Asian Pig Vet. Soc.*: 127
61. Tumamao, J.Q. et al. 2004. *Aust. Vet. J.* **82**: 370-374.
62. Tumamao, J.Q. et al. 2004. *Aust. Vet. J.* **82**: 773-780.
63. Yoshimura, H. et al. 2002. *Vet. Res. Commun.* **26**: 11-19.
64. Zhou, L. et al. 2008. *Vet. Rec.* **162**: 648-652.
65. Zhou, L. et al. 2008. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 800-803.