

第 2 部

牛伝染性リンパ腫ウイルス遺伝子検査方法の検討

東部家畜保健衛生所 ○水谷直子、大町雅則 他

【はじめに】

地方病性牛伝染性リンパ腫 (Enzootic Bovine Leukosis: EBL) は、牛伝染性リンパ腫ウイルス (Bovine Leukemia Virus: BLV) の感染に起因する牛の伝染病で、牛に全身性のリンパ性腫瘍を引き起こす[1]。BLV に感染した牛のうち、数%は数か月～数年の無症状期を経て EBL を発症し、残りは臨床的には健康な無症状キャリアーや持続性リンパ球増多症を呈する[2]。BLV 感染は、EBL 以外の疾病発生リスクを高め、治癒に悪影響を及ぼし、生産性を低下させている可能性が示唆されている[3]。BLV の感染拡大の原因は、垂直伝播（胎盤、産道及び経乳）と水平伝播（汚染された注射針、直腸検査用手袋の連続的利用等による人為的な伝播、吸血昆虫の媒介等）であり、公共牧場では水平感染を未然に防ぐ対策が必要である。

本県の公共牧場における預託事業は6か月以上の牛を対象としているが、本年度からキャトルブリーディングステーションが開設されたことにより1週齢以上の子牛が預託対象予定となる。現在、預託前検査として抗体検査を実施しているが、今後は6か月齢未満の子牛については遺伝子検査を実施することとなる。遺伝子検査には、定性的遺伝子検査 (cPCR 法) と、淘汰の優先順位づけに利用される定量的遺伝子検査 (qPCR 法) があり (図1)、病性鑑定マニュアルには、cPCR 法が記載されているものの、cPCR 法は、白血球分離の前処理過程があり手技が煩雑であることや電気泳動により判定するためコンタミネーションのリスクが高いことが課題であり、預託時検査の多検体処理には適していない (図2)。そこで、前処理や電気泳動の過程がない定量的遺伝子検査 (qPCR 法) にて、cPCR 法と同等の結果が得られるか比較検討した。また、抽出法について、近年当所に導入した自動核酸抽出装置と用手抽出での比較も行なった (図3)。

遺伝子検査

①cPCR ・陽性/陰性を判定 ・感染状況がわからない農場におけるスクリーニング検査 ・新生子牛、導入牛、預託放牧牛の感染確認 ⇒ 定性的 遺伝子検査法	②qPCR ・感染牛群の中で対策の優先順位を決定する際に使用 ・陽性率が高い農場で特に有効 ⇒ 定量的 検査遺伝子検査法
--	---



陰性



低リスク牛



高リスク牛

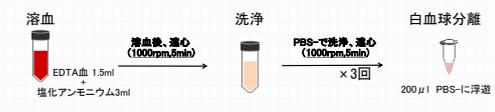
今回、子牛の預託前検査として実施→cPCR

cPCRの課題

検査法	材料	前処理	抽出方法	溶出量	判定
定性	分離白血球 (EDTA血 1.5ml)	溶血処理・白血球分離	電気泳動		

PCR増幅産物のキャリアーオーバーコンタミネーション

前処理: 塩化アンモニウム法



- 前処理過程 [溶血処理・白血球分離]があり、**手技が煩雑**
→1検体で少なくとも30分程度要する
- 電気泳動判定のため、PCR増幅産物のキャリアーオーバーコンタミネーションのリスクの増大

図1 定性検査と定量検査について

図2 定性検査法の課題

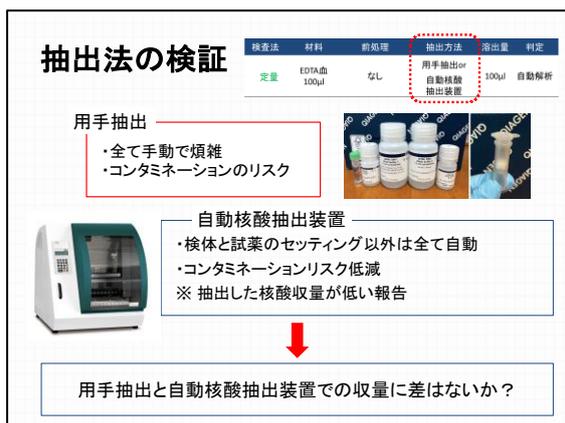


図3 抽出法の検証

【材料及び方法】

牛伝染性リンパ腫対策を実施している2農場、計103頭の血液を検体として用い、抗体検査(ELISA法)、cPCR法及びqPCR法の各検査を行い、検査結果の比較を行った。抗体検査は、牛伝染性リンパ腫エライザキット((株)ニッポンジーン)にて実施した。cPCR法は、EDTA血1.5mlから塩化アンモニウムにより溶血して得た白血球を乳剤として、抽出キット(DNeasy Blood&Tissue Kit、(株)キアゲン)を用いて60μlで溶出し、BLV遺伝子に特異的なnestedPCR(Fechnerらの方法)を実施した。qPCR法は、自動核酸抽出装置(maglead 12gc)及び抽出キット(MagDEA Dx SV)(共にPSS(株))を用いてEDTA血100μlからDNAを100μl溶出し、LTR領域を標的としたリアルタイムPCRキット(CoCoMo-BLV検出キット)を用いた。

また、自動核酸抽出装置と上述の抽出キットにて、EDTA血100μlからそれぞれ抽出した検体を用いて、リアルタイムPCRキット(CoCoMo-BLV検出キット)でコピー数(copies/10⁵cell)を算出した。

【結果】

(1) 検査結果の比較

各検査の結果を図4に示した。全103検体の内、ELISA法で21検体が陽性であった。この21検体の内、qPCRは全検体陽性であったが、cPCRでは1検体で陰性であった。この1検体について、cPCR及びqPCR用に抽出したDNAのプロウイルス量を算定した結果、極めて少ない量が算出された(図5)。また、ELISA陰性検体は両検査方法で全検体陰性となったが、qPCRでは3検体で非特異反応が確認された。この非特異反応は、コピー数は確認されたものの、リポーター蛍光が増幅していないことから非特異と判断した。

	ELISA	cPCR	qPCR
陽性	21	20	21
陰性	82	83	82
合計	103	103	103

		cPCR				qPCR			
		+	-	計		+	-	計	
ELISA	+	20	1	21	ELISA	+	21	0	21
	-	0	82	82		-	0	82	82
計		20	83	103	計	21	82	103	

図4 ELISAとcPCR/qPCRの結果比較

検体	LTR	DRA	プロウイルス量 (copies/10 ⁵ cells)
qPCR 抽出物	7.628	20,383.72	37
cPCR 抽出物	-	-	19

図 5 cPCR で陰性判定された 1 検体のプロウイルス量

(2) 抽出法の比較

抽出法の比較では、2 方法間の相関係数は 0.9696 と強い相関を示した (図 5)。

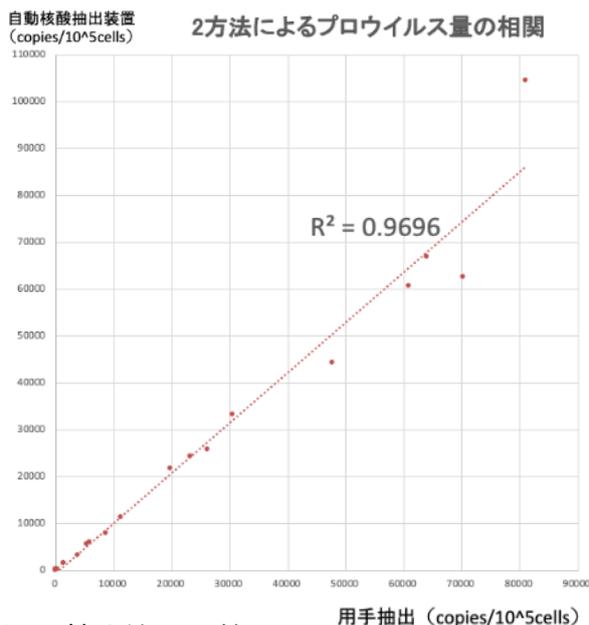


図 5 抽出法の比較

【考察】

ELISA 陽性で cPCR 法で陰性であった 1 検体は、プライマー塩基配列のミスマッチやプロウイルス量が極めて少なかったことから、定性検査では検出限界以下で陰性判定されたと考えられた。また、qPCR 法で見られた非特異反応は、蛍光の増幅波形から容易に判断できた。また、抽出法の比較で、2 方法間で強い相関を示したことから、自動核酸抽出装置は用手抽出に十分代替できると考えられた。

今回の検査で、自動核酸抽出装置を用いて実施した qPCR 法は ELISA 陽性検体を全て検出でき、病性鑑定マニュアルに記載されている cPCR 法と遜色ない結果を示した qPCR 法による検査にて十分代替できると考えられた。今後、自動核酸抽出装置を用いた定量検査法を活用して、BLV 対策を実施していきたい。

[1] 小山弘之:牛白血病, 動物の感染症, 清水悠紀臣ら編, 第 1 版, 115-117, 近代出版, 東京(2002)

[2] 地方病性牛白血病 (EBL) と清浄化に向けた取り組み事例, 公益社団法人 中央畜産会

[3] 柿沼清市ら: 牛白血病ウイルス感染搾乳牛における細胞性免疫低下が及ぼす他の疾病発生について, 家畜感染症学会誌 3 巻 4 号(2014)

豚熱発生農場における中和抗体保有状況

東部家畜保健衛生所 ○齋藤那美香、大町雅則

【はじめに】

本県では令和元年に野生イノシシからウイルスが確認されたことにより、農家へのワクチン接種を実施している。しかし、令和3年5月に本県3例目、8月に4例目が発生した。この2事例の発生時検査における豚熱ウイルス中和抗体保有状況について報告する。

【発生の概要】

事例1（一貫、飼養頭数2,708頭）：令和3年5月10日、離乳豚舎での死亡頭数増加の届出を受け、斃死豚2頭及び同居豚6頭の精密検査を実施し、患畜と確定された。その後、殺処分前検査を各豚舎10頭実施した。

事例2（繁殖、飼養頭数1,693頭）：令和3年7月8日に隣接県系列農場での発生を受け、疫学関連家畜飼養農場に指定され、移動制限解除の検査（全62頭）で、2頭から特異遺伝子が確認された。鑑定殺2頭及び同居豚10頭の精密検査を実施し、患畜と確定された。さらに殺処分前検査を各豚舎10頭実施した。

【ワクチン接種歴】

ワクチンプログラムにそって、令和元年11月に哺乳豚以外に全て初回接種、繁殖豚にはその6ヶ月後に2回目、1年後に3回目を実施していた。初回接種時の豚熱抗体を持たない繁殖豚を第1世代、この第1世代から移行抗体を持って生まれてきた繁殖豚を第2世代としている。

（1）事例1

初回接種後、離乳豚は30日齢以降で接種を行っていたが、ワクチン接種済みの母豚から生まれた子豚は移行抗体価が高かったため、徐々に後ろ倒しし、60日齢以降の接種に変更していた。繁殖豚及び候補豚の追加接種は、ワクチン接種を開始した6ヶ月後の令和2年5月に令和元年11月生まれまでの豚に接種を行い、さらに6ヶ月後の11月に令和2年5月生まれまでの豚に接種を行った。そのため、発生時には、令和2年6月以降生まれの繁殖豚は追加未接種であった（図1）。

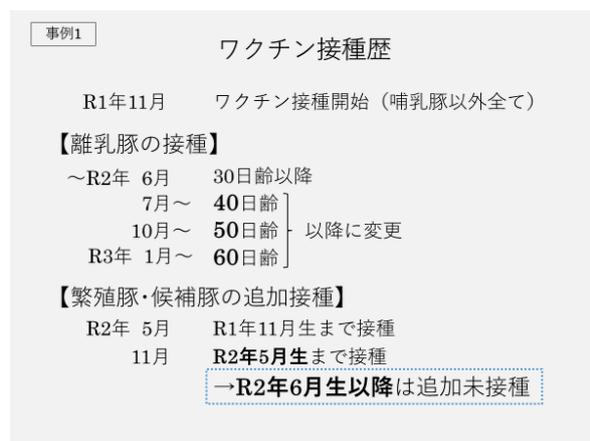


図1. 事例1のワクチン接種歴

(2) 事例2

初回接種後、離乳豚は当初30日齢以降で接種を行っていたが、子豚の移行抗体価が高く、接種日齢を後ろ倒しにしたため、令和2年8月以降は、隣県系列農場の移動後に接種することとなった。繁殖豚及び候補豚の追加接種は、隣県の候補豚育成農場から約7ヶ月齢で本県に移動した後、2週間以内に接種していた。令和3年8月の時点で、令和2年10月以前に生まれた豚には3回接種、11月以降に生まれた豚には2回接種していた(図2)。

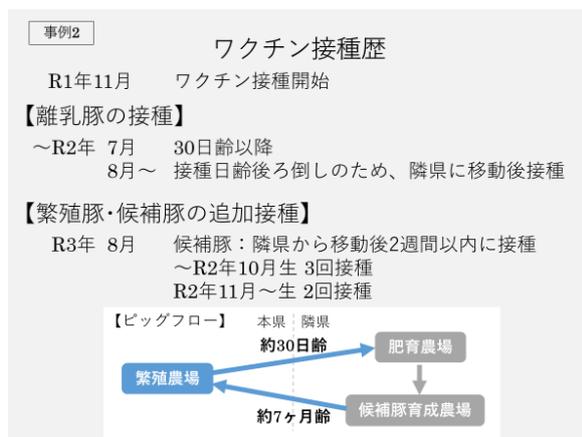


図2. 事例2のワクチン接種歴

【中和抗体の保有状況】

(1) 事例1

ワクチンにより感染防御できるとされる中和抗体価2倍以上の個体は、母豚28/30頭(93.3%)、肥育豚157/165頭(95.2%)であり、群免疫付与率の指標80%を上回っていた(表1)。しかし、離乳豚19頭(25~78日齢、ワクチン未接種)が、殺処分前検査で特異遺伝子が確認され、中和抗体価は16倍以下であった。移行抗体で感染防御できるとされる中和抗体価16倍未満のワクチン未接種豚は48/96頭(50.0%)であった(図3)。母豚では4/30頭(13.3%)が中和抗体価16倍未満であった。母豚の世代や追加接種の有無で区分すると、中央値は第1世代15頭で512倍、第2世代世15頭で32倍であった。第2世代の追加接種をしていない母豚では、中和抗体価2倍未満の個体が22%認められた(図4)。この中和抗体価2倍未満の個体と同月に生まれた個体が、2021年3月から分娩を開始していた。

表1. 事例1の中和試験の結果

	検査頭数	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096<
母豚	30	2	0	1	1	3	3	3	2	4	6	3	1	1
(接種済)		(6.7)	(0.0)	(3.3)	(3.3)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(6.7)	(13.0)	(20.0)	(10.0)	(3.3)	(3.3)
肥育豚	165	8	11	11	12	14	26	29	7	12	15	7	6	7
(接種済)		(4.8)	(6.7)	(6.7)	(7.3)	(8.5)	(15.8)	(17.6)	(4.2)	(7.3)	(9.1)	(4.2)	(3.6)	(4.2)
離乳豚	96	11	7	15	15	18	11	9	8	1	1	0	0	0
(未接種)		(11.5)	(7.3)	(15.6)	(15.6)	(18.8)	(11.5)	(9.4)	(8.3)	(1.0)	(1.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
合計	291	21	18	27	28	35	40	41	17	17	22	10	7	8
		(7.2)	(6.2)	(9.3)	(9.6)	(12.0)	(13.7)	(14.1)	(5.8)	(5.8)	(7.6)	(3.4)	(2.4)	(2.7)

単位：頭数 (%)

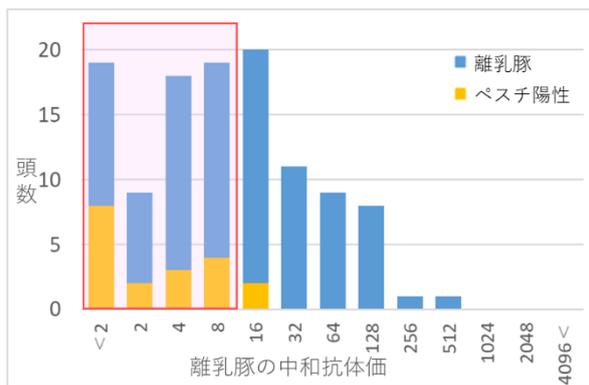


図 3. 事例 1 の離乳豚の中和抗体価

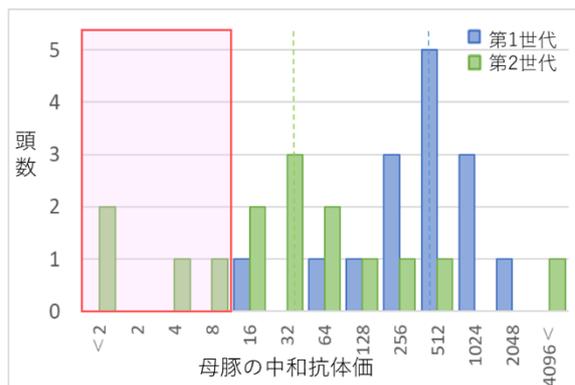


図 4. 事例 1 の母豚の中和抗体価

(2) 事例 2

中和抗体価 2 倍以上の個体は、母豚 102/102 頭 (100.0%) であり、群免疫付与率の指標である 80%を上回っていた (表 2)。一方、離乳豚 4 頭 (44~61 日齢、ワクチン未接種) は、移動制限解除検査及び殺処分前検査で特異遺伝子が確認され、中和抗体価は全頭 16 倍未満であった。中和抗体価 16 倍未満のワクチン未接種豚は 5/10 頭 (50.0%) であった (図 5)。母豚では 3/102 頭 (2.9%) は中和抗体価 16 倍未満であり、中央値は第 1 世代 (70 頭) 及び第 2 世代 (32 頭) とともに 256 倍であった (図 6)。

表 2. 事例 2 の中和試験の結果

	検査頭数	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096<
母豚	102	0	0	1	2	2	4	10	21	23	24	8	4	3
(接種済)		(0.0)	(0.0)	(1.0)	(2.0)	(2.0)	(3.9)	(9.8)	(20.6)	(22.5)	(23.5)	(7.8)	(3.9)	(2.9)
離乳豚	20	4	3	4	4	2	0	2	0	1	0	0	0	0
		(20.0)	(15.0)	(20.0)	(20.0)	(10.0)	(0.0)	(10.0)	(0.0)	(5.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
合計	122	4	3	5	6	4	4	12	21	24	24	8	4	3
		(3.3)	(2.5)	(4.1)	(4.9)	(3.3)	(3.3)	(9.8)	(17.2)	(19.7)	(19.7)	(6.6)	(3.3)	(2.5)

単位：頭数 (%)

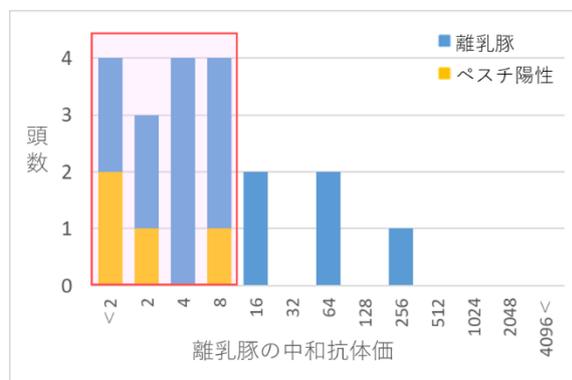


図 5. 事例 2 の離乳豚の中和抗体価

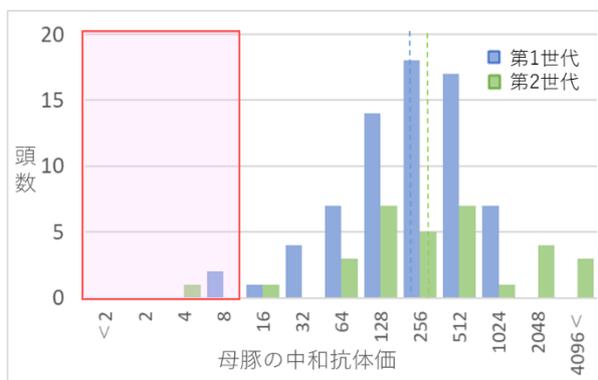


図 6. 事例 2 の母豚の中和抗体価

【まとめ】

本 2 事例では、母豚及び肥育豚において、ワクチンで感染防御できる中和抗体価 2 倍以上の割合は、ともに群免疫付与率の指標 80%を上回っていた。まず母豚の中和抗体価をみると、世代ごとの中央値は事例 1 では第 1 世代より第 2 世代で低くなり、事例 2 では第 1 世代と第 2 世代で同じ結果となり、農家ごとに異なる傾向がみられた。しかし、第 1 世代でも中和抗体価の低い個体は存在し、第 2 世代の抗体価 2 倍未満の母豚では、追加未接種のまま分娩していた母豚が存在しており、移行抗体の低い子豚が一定数産出されていたと推測される。次に離乳豚では、抗体価 16 倍未満の割合は事例 1、事例 2 ともに 50%であり、半数の個体は移行抗体が減少し、ウイルスに対する感受性個体であったと思われる。

ただし、中和試験の方法に用いる指示ウイルスの違いにより、以前の方法は現在の方法と比較して、少なくとも 2 倍高い補正が必要との知見が得られてきている。そのため、当初考えられていた感染防御可能な移行抗体価も 2 倍高く読み、32 倍で読む必要がある。実際に遺伝子が検出された個体は、25～78 日齢のワクチン未接種もしくは接種後間もない中和抗体価 32 倍未満の十分な抗体価を保持していない個体であった。そのため十分な抗体価を保持していない期間を可能な限り短くするため、接種時期の前倒しが必要であると考えられる。そして現在では、接種時期の検討を行い、日齢を前倒しした接種を開始している。

健常牛における *Clostridium perfringens* の分離率と薬剤感受性試験

東部家畜保健衛生所 ○土屋可奈 大町雅則

【はじめに】

Clostridium perfringens は健康な動物の消化管内常在菌であり、飼料の過給や急変等により、本菌が消化管内で急速に増加することで、急死や下痢を引き起こすことが知られている。一方、健常牛における本菌の保菌状況や薬剤耐性の獲得状況についてはほとんど調査されていない。

近年、薬剤耐性菌の出現が問題視されていることから、本菌についても薬剤耐性の有無を把握しておくことは重要である。

今回、健常牛から *C. perfringens* を分離し、分離率および薬剤感受性試験等の解析を実施したので、概要を報告する。

【材料および方法】

調査期間は、令和3年1月14日～12月21日までとした。

(1) 菌分離

県内1農場における健常黒毛和種の直腸便延べ457検体を用いた。内訳は、経産牛156頭、育成牛（5～10ヵ月齢）147頭、子牛（2ヵ月齢以下）154頭であった（育成牛と子牛で一部重複あり）。

分離培地には卵黄加CW寒天培地を用い、20倍希釈糞便液を100 μ l接種し、*C. perfringens* を疑うコロニーが認められなかった検体は陰性と判断した。

(2) 分離株の解析

分離株62株（内訳：子牛由来株42株、育成牛由来株15株、経産牛由来株5株）について以下の検査を実施した。

① 毒素型別 PCR

A～G型を識別可能なPCR [1] を実施した。

② 薬剤感受性試験

寒天平板希釈法で実施し、精度管理株として *E. coli* ATCC 25922 を用いた。使用薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、エンロフロキサシン（ERFX）、オキシテトラサイクリン（OTC）、カナマイシン（KM）、フロルフェニコール（FF）、エリスロマイシン（EM）を使用し、最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。被験菌用の培地にはGAM寒天培地を用い、精度管理株用にはミューラーヒントン寒天培地を使用した。

③ 薬剤耐性遺伝子の検索

マクロライド耐性遺伝子 (*erm(Q)*) [2]、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA(P)* [3]、*tetB(P)*、*tet(M)* [4]) について検索した。*tetB(P)* については動物衛生研究部門設計のプライマーを使用した。

④パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

薬剤耐性遺伝子保有株について、PFGE 解析を実施した。溶菌処理はムタノリシンを使用し、制限酵素処理には *Sma* I を用いた。泳動条件は 6V/cm, 0.5~40sec, 20 時間で行った [5]。

【結果】

(1) 菌分離

457 検体中 62 検体 (13.6%) から *C. perfringens* が分離された。分離率は経産牛 3.2%、育成牛 10.2%、子牛 27.3% であり、経産牛に対し子牛の分離率が有意に高かった ($p < 0.01$)。

(2) 菌株の解析

① 毒素型別 PCR

全株が 324bp のみにバンドを示し、 α 毒素のみを保有する A 型であった (図 1)。

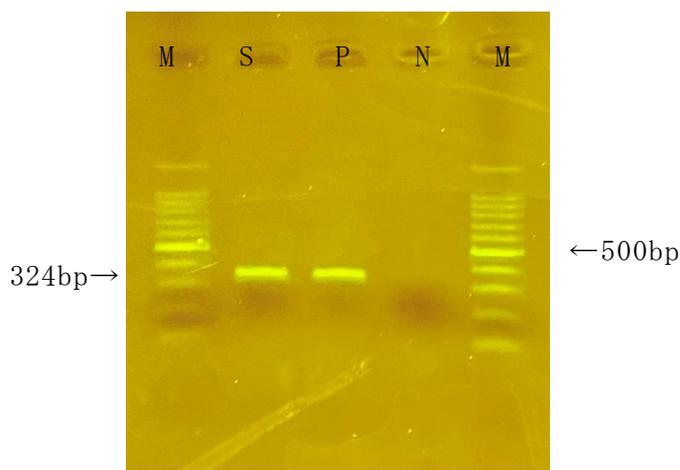


図 1. 毒素型別 PCR

② 薬剤感受性試験

KM に対しては自然耐性を持つため、分離株はいずれも高値を示した。ABPC、CEZ、ERFX、FF には耐性傾向は認められなかった。一方、OTC については、14 株が MIC=2~32 μ g/ml を示し、耐性傾向であった。また、EM に対する MIC が 128 μ g/ml と高値を示した株が 2 株確認された (表 1)。これら EM に耐性傾向を示した 2 株は、いずれも育成牛由来株であり、このうち 1 株は OTC にも耐性を示す多剤耐性株であった。

表 1. 各薬剤に対する MIC の分布

薬剤	MIC (μ g/ml)											
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
KM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	21	39
ABPC	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CEZ	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERFX	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FF	0	47	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTC	48	0	0	1	2	7	2	2	0	0	0	0
EM	0	4	55	1	0	0	0	0	0	2	0	0

③薬剤耐性遺伝子の検索

テトラサイクリン耐性遺伝子である *tetA(P)* 及び *tetB(P)* 保有株が 13 株、マクロライド耐性遺伝子である *erm(Q)* のみを保有する株が 1 株、*tetA(P)* 及び *erm(Q)* 保有株が 1 株認められた。

薬剤耐性遺伝子保有株のみが、薬剤感受性試験においても耐性傾向を示し、MIC と薬剤耐性遺伝子保有状況をまとめると下表のとおりであった (表 2)。

表 2. MIC と薬剤耐性遺伝子保有状況

OTC	MIC (μ g/ml)												計
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
耐性遺伝子(-)	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48
<i>tetA(P), erm(Q)</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>tetA(P), tetB(P)</i>	0	0	0	1	1	7	2	2	0	0	0	0	13
EM	MIC (μ g/ml)												計
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
耐性遺伝子(-)	0	4	55	1	0	0	0	0	0	0	0	0	60
<i>erm(Q), tetA(P)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>erm(Q)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

④PFGE

tetA(P)及び *tetB*(P) を保有していた 13 株について PFGE を実施したところ、9 月採材の 1 検体を除き、採材月が同じ検体は同一のパターンを示した (図 2)。

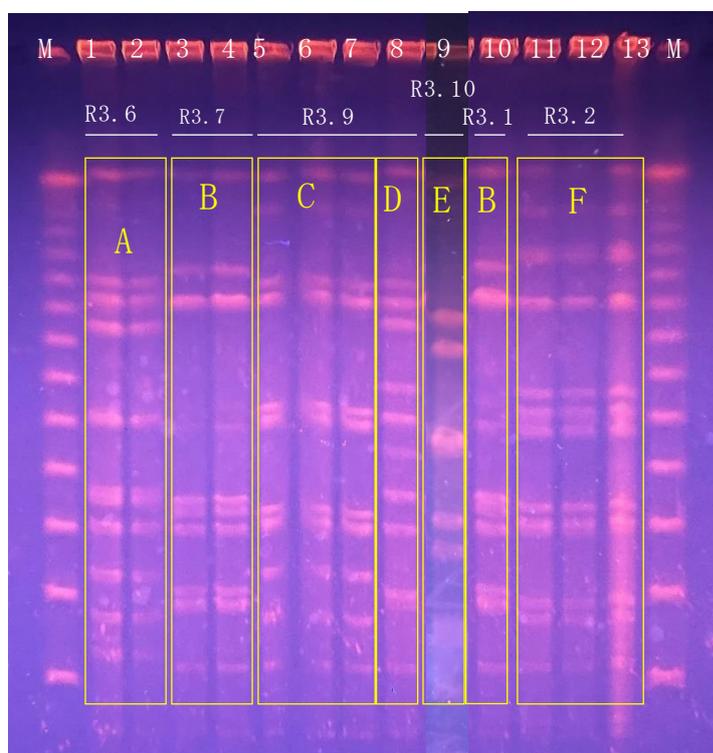


図 2. PFGE

表 3. 検体詳細

連番	採材日	採材日齢	PFGE型
1	R3. 6. 10	3	A
2	R3. 6. 24	15	A
3	R3. 7. 15	13	B
4	R3. 7. 15	18	B
5	R3. 9. 16	5	C
6	R3. 9. 16	5	C
7	R3. 9. 16	6	C
8	R3. 9. 16	9	D
9	R3. 10. 28	2	E
10	R3. 1. 14	18	B
11	R3. 2. 12	15	F
12	R3. 2. 12	19	F
13	R3. 2. 12	1,526	F

【まとめ及び考察】

菌分離の結果、健常牛からの *C. perfringens* 分離率は 13.6%であり、経産牛 (3.2%) に対し、子牛 (27.3%) で有意に高かったことから、腸内環境が安定するにつれて分離率が低下すると考えられた。

薬剤感受性試験では、OTC に耐性傾向を示した株が 14 株確認され、いずれもテトラサイクリン耐性遺伝子である *tetA*(P)のみ、もしくは *tetA*(P)及び *tetB*(P)を保有していた。また、EM にも耐性傾向を示す株が 2 株認められ、1 株は OTC にも耐性傾向を示す多剤耐性株であった。

当該農場では、子牛の治療に OTC を第一選択薬として使用していること、35 日齢前後の畜舎移動の際にマクロライド系薬剤を投与していることから、選択圧がかかり、これらの耐性菌が検出されたと考えられた。

PFGE 解析では、*tetA*(P)及び *tetB*(P)保有株が多様な PFGE 型を示したことから、同一の株が浸潤しているのではなく、薬剤耐性遺伝子が株間で伝達されている可能性があると考えられた。

テトラサイクリン耐性遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子は、いずれもプラスミド上にコードされており [6, 7]、耐性遺伝子が移動しやすく、他の株も耐性を獲得する可能性がある。

今回、多剤耐性株も検出されており、第一選択薬を変更するなど抗菌剤の慎重使用

が必要と考えられた。

【参考文献】

- [1] Julian I Rood, Vicki Adams, Jake Lacey, Dena Lyras, Bruce A McClane, Stephen B Melville, Robert J Moore, Michel R Popoff, Mahfuzur R Sarker, J Glenn Songer, Francisco A Uzal, Filip Van Immerseel. (2018) Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018 Oct;53:5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011. Epub 2018 Apr 20.
- [2] Luna, V.A., Heiken, M., Judge, K., Ulep, C., Van Kirk, N., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J. et al. (2002) Distribution of *mef(A)* in gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2513-2517.
- [3] Johanesen, P.A., Lyras, D., Bannam, T.L. and Rood, J.I. (2001) Transcriptional analysis of the *tet(P)* operon from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 183, 7110-7119.
- [4] Lorine Derongs, Céline Druilhe, Christine Ziebal, Caroline Le Maréchal, Anne-Marie Pourcher. (2020) Characterization of *Clostridium Perfringens* Isolates Collected from Three Agricultural Biogas Plants over a One-Year Period. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jul 29;17(15):5450.
- [5] Susan E. Maslanka, Jared G. Kerr, Glen Williams, James M. Barbaree, Loretta A. Carson, J. Michael Miller, and Bala Swaminathan. (1999) Molecular Subtyping of *Clostridium perfringens* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Facilitate Food-Borne-Disease Outbreak Investigations. *J Clin Microbiol*. 1999 Jul; 37(7): 2209-2214.
- [6] Trudi L. Bannam, Xu-Xia Yan, Paul F. Harrison, Torsten Seemann, Anthony L. Keyburn, Christopher Stubenrauch, Lakmini H. Weeramantri, Jackie K. Cheung, Bruce A. McClane, John D. Boyce, Robert J. Moore, Julian I. Rood. (2011) Necrotic Enteritis-Derived *Clostridium perfringens* Strain with Three Closely Related Independently Conjugative Toxin and Antibiotic Resistance Plasmids. *mBio* 2(5):e00190-11.
- [7] David I. Berryman, Michael Lyrastis, Julian I. Rood. (1994) Cloning and Sequence Analysis of *ermQ*, the Predominant Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 1994, p.1041-1046.