

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 有機栽培圃場の野菜および有機肥料の細菌学的研究 (第20回日本食品微生物学会抄録集・1999年10月)
- 2) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その1. 動物腸内容物を使用しない有機肥料 (第27回日本防菌防黴学会抄録集・2000年5月)
- 3) 上田成子, 丸山務, 桑原祥浩: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その2. 堆肥 (第21回日本食品微生物学会抄録集・2000年10月)
- 4) 上田成子, 丸山務, 桑原祥浩: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その3. 鶏糞含有有機肥料 (第21回日本食品微生物学会抄録集・2000年10月)
- 5) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 各種有機肥料における腸管病原菌の生残性と消長 (第28回日本防菌防黴学会抄録集・2001年5月)
- 6) 上田成子, 桑原祥浩: 有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について (第71回日本衛生学会抄録集・2001年4月)

2. 論文発表

学会発表1)～4) 論文投稿中

Raw materials of organic compost

Material	Ratio of materials	
	winter	summer
Chaff	20	35
Sawdust	20	35
Raw bovine feces	10	20
Dry bovine feces	10	20
Pig feces	20	non
Corn-Soybean dust	10	30
Peanut shell	60	10
White earth	1	non
Oil-containing white earth	3	10
Sludge from slaughter house	7	15

Occurrences of indicator-microbes in raw materials of compost

Material	season	Total aerobes*	coliforms*	Fecal E. coli**	Enterococci**	Lactic bacteria*	Yeasts*	Molds*
Chaff	winter	6.8	5.4	>110	460	5.6	6.9	4.8
	summer	7.0	6.4	>110	2400	6.3	6.7	5.2
Sawdust	winter	7.1	6.6	>110	24	7.3	7.9	4.9
	summer	3.4	3.2	< 0.3	<0.3	4.7	4.5	4.5
RBF ¹⁾	winter	8.6	5.4	>110	460000	7.1	7.0	5.6
	summer	8.7	7.4	>110	110000	8.5	7.8	4.2
DBF ²⁾	winter	8.5	6.7	>110	11000	7.3	7.7	5.4
	summer	6.1	4.0	>110	93	6.5	6.5	4.7
C-S dust ³⁾	winter	5.9	4.9	4.3	240	6.0	6.5	4.3
	summer	6.2	5.0	1.5	1100	6.2	6.1	4.2
Peanut-S ⁴⁾	winter	8.1	6.8	>110	460	6.3	7.5	5.3
	summer	5.8	4.4	0.3	43	5.5	5.8	4.1
W-earth ⁵⁾	winter	5.5	4.6	>110	240	5.2	6.4	3.7
	summer							
Oil-WE ⁶⁾	winter							
	summer		2.7	>110	0.9	3.7	3.5	2.8
S-sludge ⁷⁾	winter							
	summer	3.7	6.3	>110	46000	7.7	6.6	4.9

* Plate counts: Log of cfu/g; ** MPN/g

1) Raw bovine feces; 2) Dry bovine feces; 3) Corn-Soybean dust; 4) Peanut shell;

5) White earth; 6) Oil-containing white earth; 7) Sludge from slaughter house.

Biotypes of coliform bacteria isolated from raw material

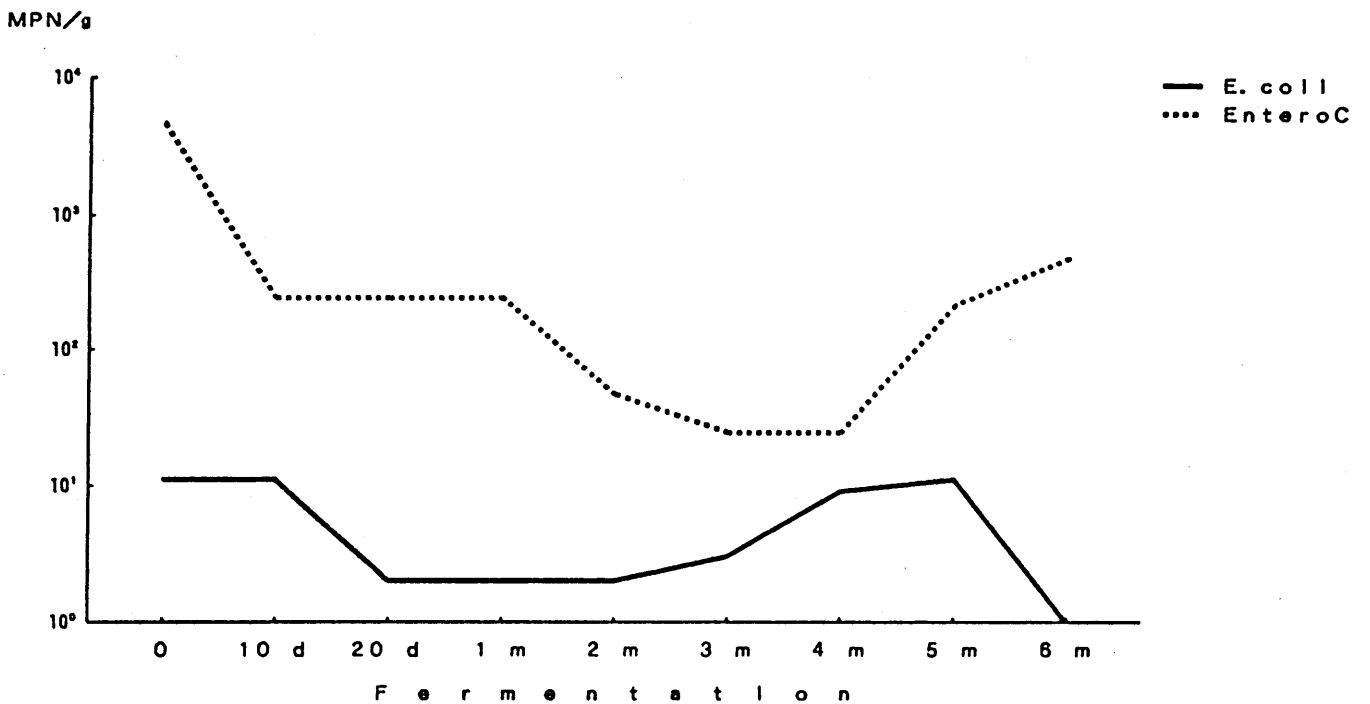
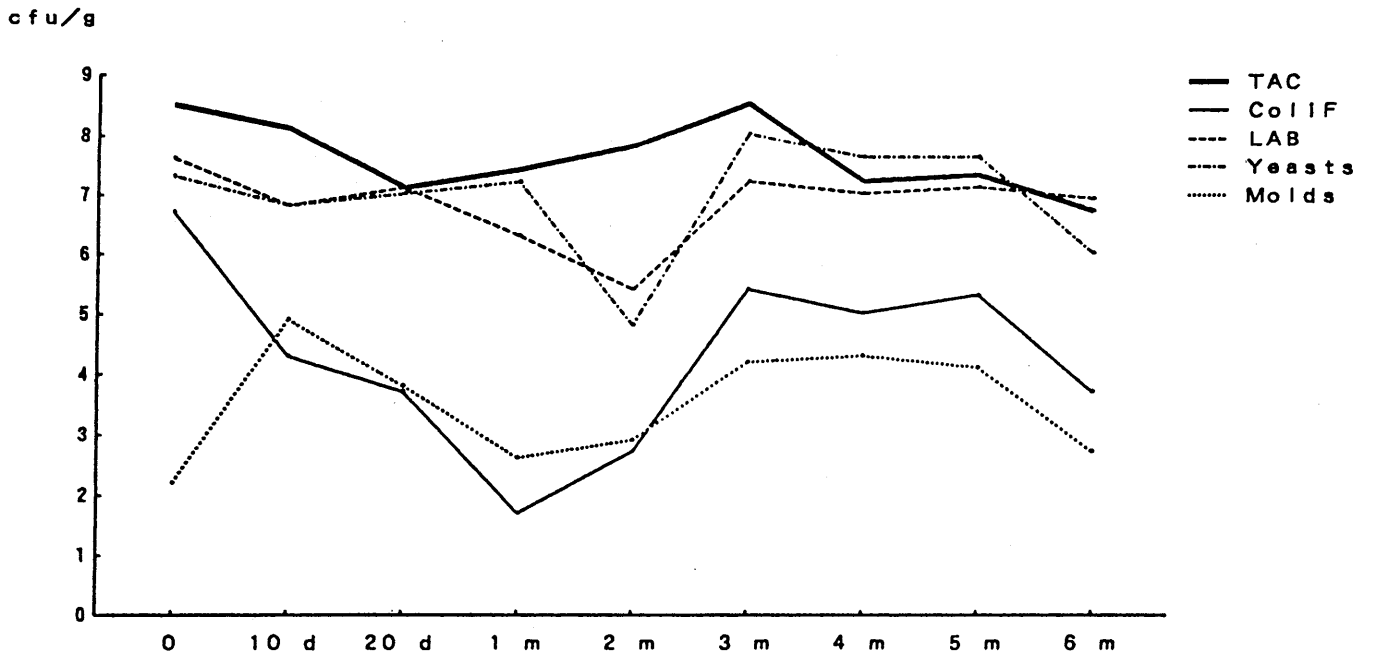
Material		No. of test strains	<i>E. coli</i>			other species
			I	II	III	
Chaff	winter	6	4			2
	summer	6	6			
Sawdust	winter	6	4			2
	summer	3				3
RBF ¹⁾	winter	6	3			3
	summer	6	6			
DBF ²⁾	winter	6	4			2
	summer	6	6			
Pig feces	winter	6	3			3
C-S dust ³⁾	winter	6	1			5
	summer	6	6			
Peanut-S ⁴⁾	winter	6	3			3
	summer	3				3
W-earth ⁵⁾	winter	6	4			2
Oil-WE ⁶⁾	summer	6	6			
S-sludge ⁷⁾	summer	6	5		1	

- 1) Raw bovine feces; 2) Dry bovine feces;
 3) Corn-Soybean dust; 4) Peanut shell;
 5) White earth; 6) Oil-containing white earth;
 7) Sludge from slaughter house.

Water activity and pH of raw materials
of compst

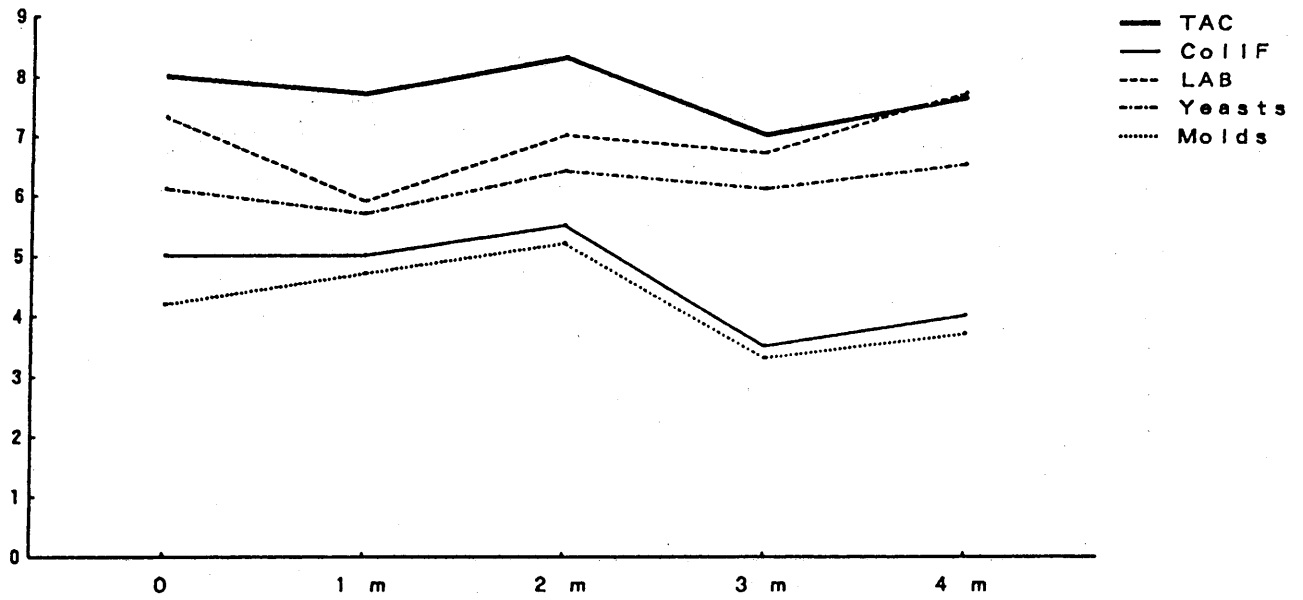
		Aw value	pH value
Chaff	winter	0.736	6.2
	summer	0.747	5.9
Sawdust	winter	0.996	4.8
	summer	0.666	4.3
RBF ¹⁾	winter	0.987	7.2
	summer	0.983	7.1
DBF ²⁾	winter	0.993	7.9
	summer	0.967	7.2
Pig feces	winter	0.989	7.4
C-S dust ³⁾	winter	0.762	6.3
	summer	0.633	6.3
Peanut-S ⁴⁾	winter	0.778	6.0
	summer	0.738	6.3
W-earth ⁵⁾	winter	0.746	6.5
Oil-WE ⁶⁾	summer	0.488	6.3
S-sludge ⁷⁾	summer	0.978	6.0

- 1) Raw bovine feces; 2) Dry bovine feces;
3) Corn-Soybean dust; 4) Peanut shell;
5) White earth; 6) Oil-containing white earth;
7) Sludge from slaughter house.

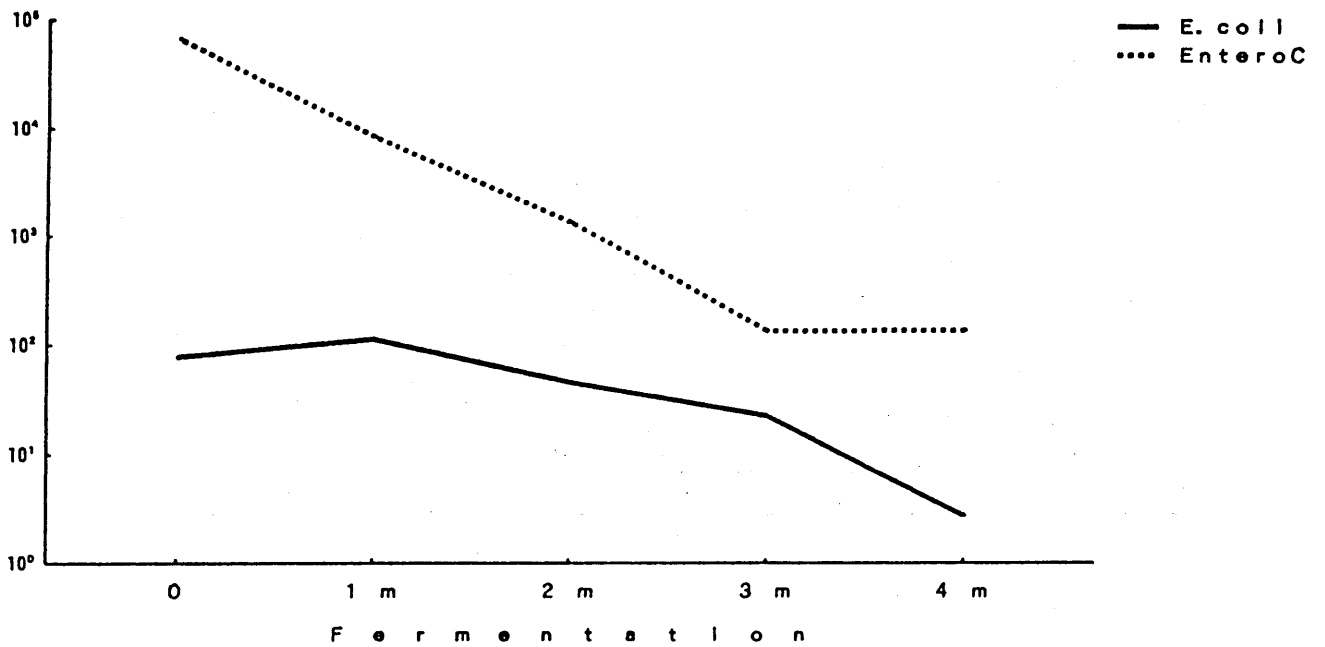


Changes in indicator-microbial counts during fermentation of compost in winter.

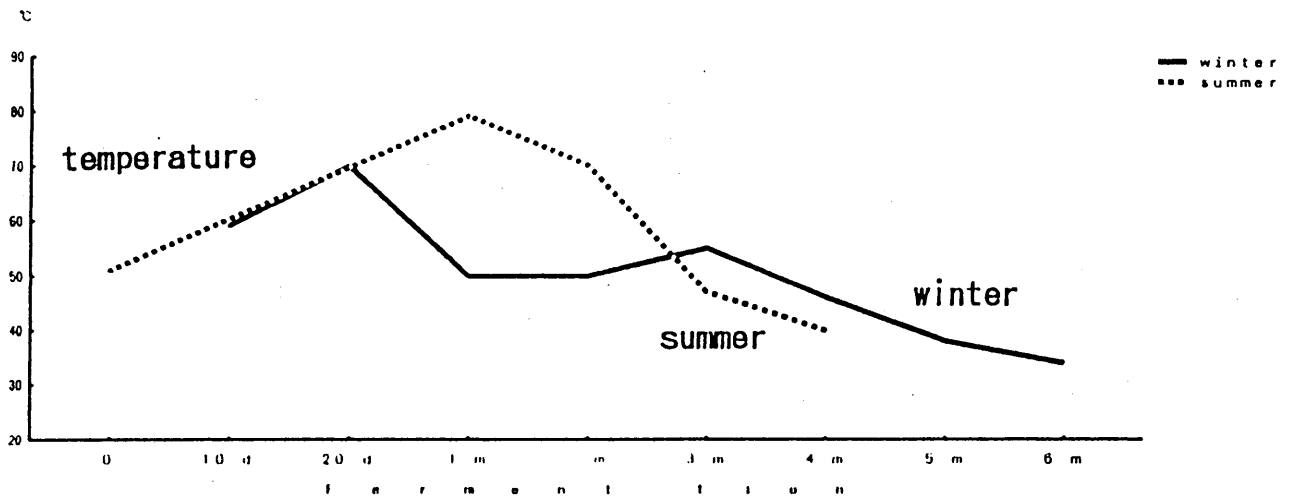
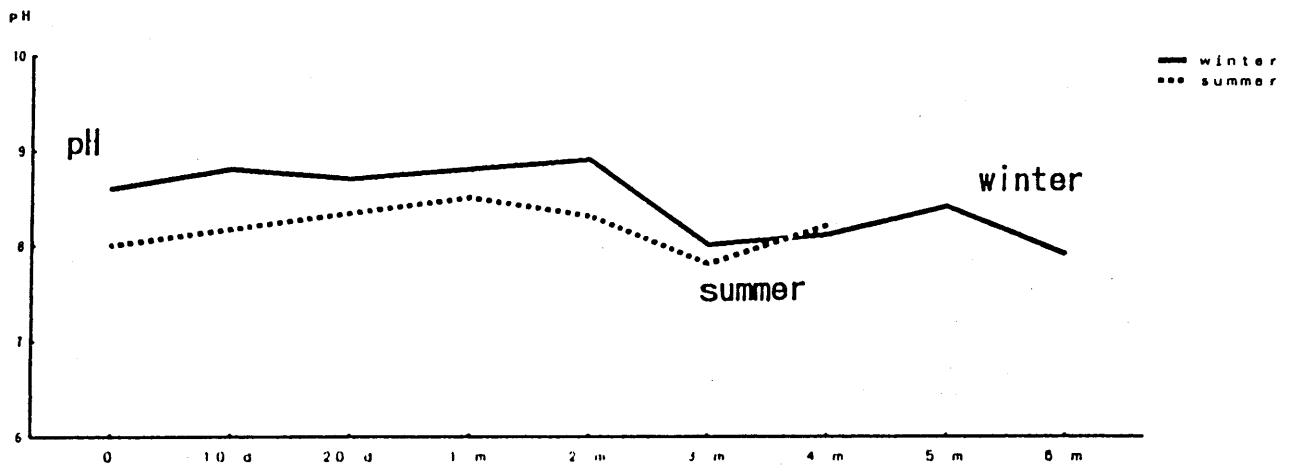
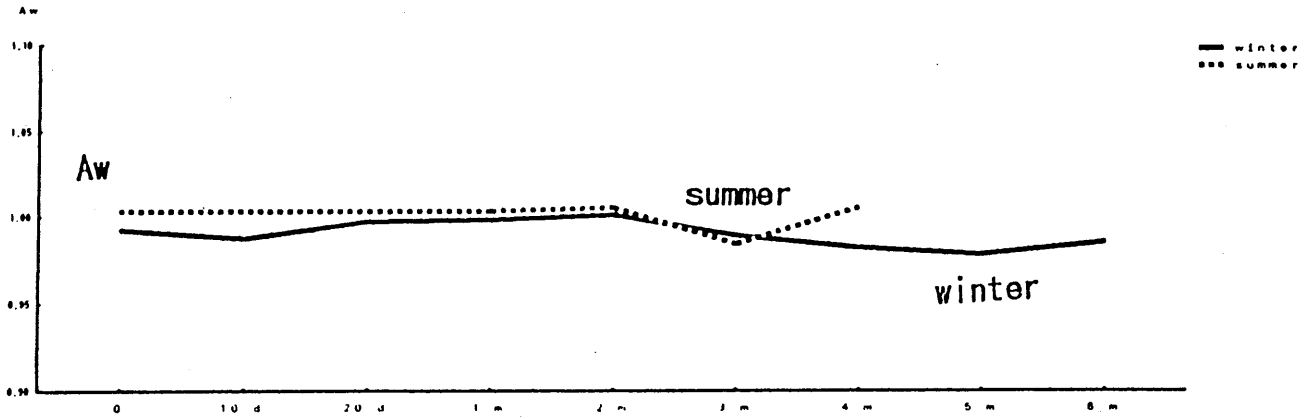
cfu/g



MPN/g



Changes in indicator-microbial counts during fermentation of compost in summer.



Changes in Aw, pH and temperature during fermentation of compost in winter and summer.

Biotypes of coliform bacteria isolated from compost during fermentation.

after fermentation		No. of test strains	<i>E. coli</i>			other species
			I	II	III	
0 day	winter	6	6			
	summer	5 4	4 4		3	7
10 days	winter	6	4			2
	summer					
20 days	winter	3				3
	summer					
1 month	winter	3				3
	summer	1 8	1 0	1		7
2 months	winter	3				3
	summer	1 5	1 0			5
3 months	winter	6	3		1	2
	summer	3 6	1 5		2	1 9
4 months	winter	6	4			2
	summer	1 8	4			1 4
5 months	winter	6			3	3
6 months	winter	6				6

Serovars of *Escherichia coli* strains from raw materials
and compost-intermediate

Season	Source	Serovar
winter	compost:10 day after fermentation ¹⁾	0146:H21 (EPEC?)
summer	corn-soybean dust ²⁾	028ac:HUT (EIEC?)
	Sludge from slaughter house ¹⁾	0125:H19 (EPEC?)
	Sludge from slaughter house ¹⁾	08:HUT (ETEC?)
	compost:1 mo. after fermentation ²⁾	018:HUT (EPEC?)

- 1) identified among fecal *E. coli* cultures.
2) identified among coliform cultures.

有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について

研究協力者 上田 成子 女子栄養大学助教授

研究要旨：各種有機肥料から分離された腸球菌のバンコマイシン耐性遺伝子の保有について検討した。その結果、VCM (バンコマイシン) およびTEIC (テイコプラニン) に高度耐性とされているVan A 遺伝子などを保有する腸球菌が検出され生食野菜への二次汚染も否定できず、さらに生食野菜のVRE の実態調査が必要であることが思料された。

A. 研究目的

有機野菜は安全・健全な食材として世界各国で生産量が増加傾向にある。しかしながらこれら農産物の生産にあたってはGAP (Good Agricultural Practices) に基づいた衛生管理のなされた栽培方式が各国で推奨される傾向にある。演者らはこれまでに有機栽培に使用される市販合成有機肥料、さらに有機肥料の原材料や製造工程における腸管病原菌を含む衛生微生物の検討をおこなってきた。これら有機肥料から時に病原大腸菌やSalmonellaが検出され、栽培野菜への二次汚染の可能性を示唆した。また、腸球菌は土壌、水などの生活環境中に広く生息するが、主にヒトおよび動物の腸管内が生活部位である。本菌の多くは日和見感染症をもたらす、感染様式は内・外因性感染症である。本菌感染症の治療には本菌の自然耐性から治療薬は種類が限られ、バンコマイシンに耐性化すると有効な抗菌剤はない。1998年には輸入鶏肉から高度耐性のVRE が検出されている。本報告では堆肥、動物腸内容を含む有機肥料および動物腸内容を含まない有機肥料の原材料および製造工程から分離された腸球菌のバンコマイシン耐性菌とその遺伝子について検討した。

B. 研究方法

①各種有機肥料からの腸球菌の定量検出および種の同定：腸球菌の定量検出はAC-EF 寒天培地(日水) 系を用いてMPN 法により行った。EF寒天培地上の定型的コロニーを無作為に釣菌・純培養した。さらにこれら菌株はカタラーゼ、6.5 % NaCl BHIでの成育の有無などの生化学性状を検討した。腸球菌の同定はアピストレプト20 (ピオリュエ) を用いて行った。② VREの判定：Enterococcusel™ Agar with Vancomycin, 8 µg/m l (BBL) を用いて行った。③VRE 遺伝子の検討：バンコマイシン耐性を有した

107 菌株についてVRE 遺伝子の検討をPCR (Polymerase Chain Reaction) 法により検討した。本実験に用いたPrimerは Van A (5'-GGGAAAACGACAATTGC-3', 5'-GTACAATGCGCCGTTA-3': 732 bp)、Van B (5'-ATGGGAAGCCGATAGTC-3', 5'-GATTCGTTCTCGACC-3': 635 bp)、Van C-1 (5'-GGTATCAAGGAAACCTC-3', 5'-CTCCGCCATCATAGCT-3': 822 bp)、Van C-2/3 (5'-CTCCTACGATTCTCTTG-3', 5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3': 439 bp) の4 種である。PCR 増幅条件はDenaturation : 94 °C、Annealing: 55°C、Polymerization: 72 °Cで35 回繰り返した。

C. 結果および考察

各種有機肥料に分布する腸球菌数はMPN 値で0.3 ~ 460,000 の範囲にあった。堆肥、動物腸内容物を含む、動物腸内容物を含まないそれぞれの有機肥料から分離した腸球菌のVRE の検出率は25% (60/240)、5% (9/170)、22% (73/333) であり、ほぼ5 ~ 25% の範囲で検出された。また、VRE のうちVRE 遺伝子の保有率は全体で75% (107/142) であった。これらの試験した菌株の主な遺伝子型はVan C-1 60% (64)、Van C-2/3 25% (27)、Van C-1 + C-2/3 7% (8) であった。VCM (バンコマイシン) およびTEIC (テイコプラニン) に高度耐性とされているVan A 遺伝子の保有株は試験菌株のうち 5% (5 菌株) みられた。なお、VRE 遺伝子保有菌は主にE. faecium、E. gallinarum、E. faecalisであった (Table 1.)。

D. 結論

以上のように高度耐性の遺伝子を有するVRE が検出されたことは生食野菜への二次汚染も否定できず、さらに生食野菜のVRE の実態調査が必要であることが思料された。

Table 1. *Enterococcus* spp. and their Vancomycin resistant genes from various organic fertilizers.

<i>Enterococcus</i> spp.	Numbers examined (%)	Responsible gene				
		Van A	Van C-1	Van C-2/3	Van C-1 + C-2/3	Van A + C-2/3
<i>E. faecium</i>	68 (64)		47	15	3	3
<i>E. gallinarum</i>	19 (18)		16	1	2	
<i>E. faecalis</i>	10 (9)	5	1	1	3	
<i>E. durans</i>	1 (1)			1		
<i>E. avium</i>	3 (3)			3		
Unidentified	6 (6)			6		
Total	107 (100)	5 (5)	64 (60)	27 (25)	8 (7)	3 (3)

E. 研究発表

1. 学会発表 (有機野菜および有機肥料関連)

- 1) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 有機栽培圃場の野菜および有機肥料の細菌学的研究 (第20回日本食品微生物学会抄録集・1999年10月)
- 2) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その1. 動物腸内容物を使用しない有機肥料 (第27回日本防菌防黴学会抄録集・2000年5月)
- 3) 上田成子, 丸山務, 桑原祥浩: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その2. 堆肥 (第21回日本食品微生物学会抄録集・2000年10月)
- 4) 上田成子, 丸山務, 桑原祥浩: 有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究 その3. 鶏糞含有有機肥料 (第21回日本食品微生物学会抄録集・2000年10月)
- 5) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 各種有機肥料における腸管病原菌の生残性と消長 (第28回日本防菌防黴学会抄録集・2001年5月)
- 6) 上田成子, 桑原祥浩: 有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について (第71回日本衛生学会抄録集・2001年4月)

2. 論文発表

学会発表1)~4)論文投稿中

PCR 法による食品および糞便中の病原性
Yersinia enterocolitica 検出に関する研究

研究協力者 上田 成子 女子栄養大学助教授

研究要旨：PCR 法による食品および糞便中の病原性 *Yersinia enterocolitica* の検出方法の有効性について基礎的検討を行った。Primerは細胞付着性遺伝子である *ail* が最も効果的であった。食品、糞便、血液およびふきとり試料の直接検出では何れも 10^{3-5} 個/ml の菌数が存在すれば検出可能であったが、鋭敏性に欠くことから増菌培養による方法を検討した結果、BHI あるいは Trypticase soy broth (抗菌剤添加・非添加培地) を用い、37°C、6 時間培養することによって 10^{3-5} 個 /ml 以上存在すれば検出可能であった。従来の検出法はほぼ1～2 週間を要したが、本報告法は2 日間で検出可能であった。

A. 研究目的

Yersinia enterocolitica は食肉、乳・乳製品、魚介類、野菜などの食品や動物の腸内容物さらに水に分布し、ある型の菌はヒト腸管病原菌や Zoonosis 菌となる。WHO の1997年の報告によるとデンマークの *Yersiniosis* の罹患率は人口10万当たり18人であり、*Salmonellosis*、*Campylobacteriosis* に次で高い罹患率である。本感染症予防のために正確・鋭敏・迅速・簡便な検査法が要求される。本菌検出法の公定法は本菌の低温成育の特性を利用した低温増菌培養などが加味され、判定までに1～2 週間を要し、迅速性に欠ける。演者らはこれまでにいくつかの腸管病原菌の PCR (Polymerase Chain Reaction) による検出法の有効性について検討してきた。本報告では単独 PCR 法の系を用いた検出法の有効性に関して検討を行った。

B. 研究方法

①Primerの検討：本実験に用いたPrimerはVirF-1, 2, *ail*-1, 2, *yad*-1, 2, *inva*-1, 2, *rfb*-1, 2, *rfb*-1, 2, *YC*-1, 2, *YE*-1, 2, *YP*-1, 2, *Yad A* 2-1, 2-*Yad A* 3-1, 2 の10種である (Table 1)。PCR 増幅条件は Denaturation: 94 °C、Annealing: 55°C、Polymerization: 2 °C で35回繰り返した。②Primerの特異性の検討：試験に用いた菌株は病原性 *Y. enterocolitica* 03・10 菌株、05・5菌株、09・5菌株、08・5菌株および013・2 菌株の27菌株であり、非病原性 *Y. enterocolitica* の20菌株に加えて *Y. frederiksenii*、*Y. intermedia*、*Y. philomiragia*、*Y. pseudotuberculosis*、*Y. ruckeri*、*Y. rohdei* を用いた。Enteropathogenic *E. coli* 0127:H21、Enteroinvasive *E. coli* 0124: HNM、Enterotoxigenic *E. coli* ST<、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7 (VT1 & VT2)、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7 (VT2) をはじめとする14種の大腸菌、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*Vibrio parahaemolyticus*、*A. hydrophila*、*S. aureus* (毒素型 A、B、C、D、E、

H、TSST-1およびMRSA)、*B. cereus*をはじめとする芽胞形成桿菌8種の合計35菌株を用いた。③各種材料への接種実験：各種食品、ふきとり材料、糞便および血液のうち食品および糞便は10% 乳剤を、血液は全血を用いた。食品はレタス、キャベツ、カイワレ等の野菜やその調理品、果実加工品の23種、卵および卵調理品2種、牛乳、チーズ、ヨーグルトの3種、豚肉をはじめとする食肉およびその調理加工品6種の計34種を用い、それぞれに *Y. enterocolitica* を接種し試験した。

④増菌用培地および培養温度・時間の検討：BHI (Difco)、BHI + Cefulodin (4 μg/ml)、Novobiocin (2.5 μg/ml)、Trypticase soy broth (Difco)、Trypticase soy broth + Cefulodin (4 μg/ml)、Novobiocin (2.5 μg/ml) の4種を用い25と37°Cで0、2、4、6、8 および24時間培養した。なお接種菌量は 10^2 個/mlとした。また、レタス、カイワレ等をはじめとする6種の植物性食品、豚肉、レバー、牛乳、などの4種の動物性食品の計10種の食品および調理食品を用いて検討した。⑤食品の加熱および凍結・融解による遺伝子検出に及ぼす影響：数種の食品を用いて55°Cで25分加熱後と、-80 °Cで30分の凍結と65°Cで2 分間の加熱を1～6 回繰り返した後の遺伝子検出の影響を検討した。なお全試験における *Y. enterocolitica* の菌数測定はCIN 寒天培地 (Difco) を用いた。

C. 結果および考察 ①Primerは菌の種、属間での病原性 *Y. enterocolitica* の特異性を検討した結果、*ail* が最も効果的であった (Table 2, 3, 4, 5, 6, 7)。②食品、ふきとり材料、糞便および血液に接種した *Y. enterocolitica* の検出感度はいずれも 10^{3-5} 個/ml であった (Table 8, 9, 10, 11)。③ 増菌培地としてBHI あるいは Trypticase soybroth (抗菌剤添加・非添加培地) を用い、37°C、6 時間で培養することによって 10^{3-5} 個 /ml 存在すれば検出可能であった (Table 12, 13, 14, 15)。④食品の加熱および凍結・融解による遺

伝子検出に及ぼす影響は加熱において菌の死滅がみられたが遺伝子検出に影響をおよぼさず、さらに凍結・融解でも影響しなかった。

D. 結論

以上の結果、病原性 *Y. enterocolitica* は PCR 法による直接あるいは増菌培養による方法は 24~48 時間以内に検出可能であった。さらに本菌が 10 個でも検出可能である免疫磁気ビーズ（自家製）と PCR 法併用による検出法についても検討中である。

E. 研究発表（PCR 法関連）

1. 論文発表

- 1) 上田成子, 桑原祥浩(1999). PCR 法による食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出法の検討. 防菌防黴誌. 27(7), 25-30.
- 2) 上田成子, 品川邦汎, 桑原祥浩(1999). PCR法による食品からの毒素産生性ブドウ球菌の検出. 防菌防黴誌. 27(8), 17-22.
- 3) Shigeko UEDA and Yoshihiro KUWABARA(2000). The magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Salmonella* from Food and fecal Samples. Biocontrol Science 5(1), 25-32
- 4) Shigeko UEDA and Yoshihiro KUWABARA(2001). Detection of Verocytotoxin- Producing *Escherichia coli* 0157 by Polymerase Chain Reaction Assay After Immunomagnetic Separation- Plating. Biocontrol Science, 6(1) 43-47

2. 学会発表

- 1) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: 免疫磁気ビーズ法と PCR 法による食品および糞便中の *Listeria monocytogenes* の検出に関する研究 (第77回日本食品衛生学会抄録集・1999年5月)
- 2) 上田成子, 桑原祥浩, 丸山務: PCR 法による食品および糞便中の *Listeria monocytogenes* 検出に関する研究 (第20回日本食品微生物学会抄録集・1999年10月)
- 3) 上田成子, 中嶋 洋, 福島 博, 桑原祥浩, 丸山務: PCR 法による食品および糞便の病原性 *Yersinia enterocolitica* 検出に関する研究 (第21回日本食品微生物学会抄録集・2000年10月)

Table 1. Oligonucleotide primers used to indentify Yersinia enterocolitica by PCR assay.

primer No.	name	sequence(5' - 3')	Amplicon (bp)	Target gene
1-1 2	virF-1 ²⁾ 2	TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAC	591	•virulence plasmid
2-1 2	ail-1 ³⁾ 2	ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG	170	•cell adhesion
3-1 2	yad A-1 2	AAG GCA TTG GGA GAT TCG GC AGT GCC AGC CGC AAG ATG TG	288	•plasmid borne virulence
4-1 2	inva -1 2	CTA TTG GTT ATG CGC AAA GC TGG AAG TGG GTT GAA TTG CA	359	•invasion locus
5-1 2	rfb B-1 2	CGG TAT CGT CAA CAT CAA TGC GAC TCT GTC TAT AAA CAC CAG	253] ail, inv, virF
6-1 2	rfb C-1 2	CGC ATC TGG GAC ACT AAT TCG CCA CGA ATT CCA TCA AAA CCA CC	405	
7-1 2	YC :1 2	CTG TGG GGA GAG TGG GGA AGT TTG G GAA CTG CTT GAA TCC CTG AAA ACC G	570	•Specific detection of pathogenic <u>Y. enterocolitica</u>
8-1 2	YE :1 2	CTG TCT TCA TTT GGA GCA TTC GCA ACA TAC ATC GCA GCA ATC	159	•Enterotoxin
9-1 2	YP :1 2	CTT GGC TGA TGG CAC GAT TCG TCA CCT GAC CCT GAT	440	•Invasion
10-1 2	Yad A 2 :1 2	TAA GAT CAG TGT CTC TGC GGC A TAG TTA TTT GCG ATC CCT AGC AC	530] •Located on the virulence plasmid
	Yad A 3 :1 2	GCG TTG TTC TCA TCT CCA TAT GC GGC TTT CAT GAC CAA TGG ATA CAC		

Table 2. Pathogenic Y. enterocolitica strains examined and result of PCR with ail and VirF (1) .

Species	Serovar	Biovar	Sources	Primer	
				ail	VirF
<u>Pathogenic Y. enterocolitica</u>					
1. Pa	241	03	B4	Patient, Japan	+ -
2. Pa	260	03	B4	Patient, Japan	+ +
3. Pa	263	03	B4	Patient, Japan	+ +
4. Pa	265	03	B4	Patient, Japan	+ +
4. Pa	266	03	B4	Patient, Japan	+ -
6. Pa	2491	03	B3	Patient, Japan	+ +
7. Pa	2643	03	B3	Patient, Japan	+ -
8. Pa	2666	03	B3	Patient, Japan	+ +
9. Pa	2672	03	B4	Patient, Japan	+ +
10. Pa	2718	03	B3	Patient, Japan	+ +
11. D	121	05	B2	Dog, Japan	+ -
12. F	3	05	B2	Pig, Japan	+ -
13. SW	13744	05	B2	Pig, Japan	+ +
14. Pa	177	09	B2	Patient, Japan	+ +
15. S9	176	09	B2	Pig, China	+ +
16. S9	168	09	B2	Pig, China	+ +
17. S9	169	09	B2	Pig, China	+ +
18. S9	170	09	B2	Pig, China	+ -
19. WA		08	B1B	Patient, USA	+ +
20.	8081	08	B1B	Patient, USA	+ +
21. A	2635	08	B1B	Patient, USA	+ +
22. Pa	12986	08	B1B	Patient, Japan	+ -
23. YE	91001	08	B1B	Patient, Japan	+ -
24. WA	285	013a, 13b	B1B	Patient, USA	+ -
25. WA	1568	013a, 13b	B1B	Patient, USA	+ -

Table 3. Non Pathogenic *Y. enterocolitica* strains examined and result of PCR with ail and VirF (2).

Species	Serovar	Biovar	Sources	Primer	
				ail	VirF
None Pathogenic <i>Y. enterocolitica</i>					
1. Pa	10645	05	Patient, Japan	—	—
2. Pa	10685	UT	Patient, Japan	—	—
3. Pa	10797	UT	Patient, Japan	—	—
4. Pa	10847	UT	Patient, Japan	—	—
5. Pa	11322	06	Patient, Japan	—	—
6. Pa	11945	UT	Patient, Japan	—	—
7. Pa	11946	UT	Patient, Japan	—	—
8. Pa	12059	UT	Patient, Japan	—	—
9. Pa	12330	UT	Patient, Japan	—	—
10. Pa	12982	013, 7	Patient, Japan	—	—
11. Pa	9202	05	Patient, Japan	—	—
12. R	396	UT	Rat, Japan	—	—
13. R	999	UT	Rat, Japan	—	—
14. R	1558	014	Rat, Japan	—	—
15. R	1689	014	Rat, Japan	—	—
16. W1a	312	05	Wild animal	—	—
17. W1a	318	014	Wild animal	—	—
18. W1a	340	014	Wild animal	—	—
19. W1a	400	04	Wild animal	—	—
20. W1a	921	013, 7	Wild animal	—	—

Table 4. Specificity of various primers for detection of Yersinia enterocolitica.

Serovar/Source	Primer ¹⁾									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<u>Y. enterocolitica</u> 03 from patient	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
03 patient	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
05 patient	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
05 rat	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
08 patient	-	+	±	+	-	-	-	+	-	-
08 ATCC 23715	-	+	±	+	±	-	+	+	-	-
09 patient	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
09 patient	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
013 patient	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
013 patient	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<u>Y. pseudotuberculosis</u> 4b	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>Y. frederiksenii</u> ATTC 29912	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<u>Y. ruckeri</u> JCM 2429	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<u>Y. rohdei</u> JCM 7376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Y. intermedia</u> JCM 7579	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<u>Y. philomiragia</u> ATTC 25015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1) 1:Virf 1-2 ,2:ail 1-2 ,3:yadA 1-2 ,4:in 1-2 ,5:rfb B1-2 ,6:rfb C1-2
7:YC 1-2 ,YE 1-2 ,YP 3-4 and yad A 2-1,2-yad A 3-3-4 were used as primers

Table 5. Other Yersinia spp. strains examined
and result of PCR with ail and VirF (3)

Species	Primer	
	ail	VirF
<u>Y. pseudotuberculosis</u>	—	+
<u>Y. frederiksenii</u> ATCC 29912	—	—
<u>Y. rohdei</u> JCM 7376	+	—
<u>Y. ruckeri</u> JCM 2429	—	—
<u>Y. intermedia</u> JCM 7579	—	—
<u>Y. philomiragia</u> ATCC 25015	—	—

Table 6. Specificity of ail primer for detection of Y. enterocolitica (1).

Strains	Type/serovar/source / No.	ail 1-2
Gram negative bacteria		
<u>E. coli</u>	1- EPEC 0127:H21	-
	2- EIEC 0124:HNM	-
	3- ETEC ST & LT	-
	4- VTEC 0157:H7	-
	5- VTEC 0157:H7	-
	6- VTEC 0157:H7	-
	7- VTEC 0111:HNM	-
	8- VTEC 026 :HNM	-
	9- V517	-
	10- IFO 3301	-
	11- ATCC 43888	-
	12- from food	-
<u>K. aerogenes</u>	from food	-
<u>C. freundii</u>	from patient	-
<u>S. Enteritidis</u>	from patient	-
<u>S. Typhimurium</u>	from patient	-
<u>V. parahaemolyticus</u>	from food	-
<u>Y. enterocolitica</u>	03(biotype 4)	+
<u>A. hydrophila</u>	ATCC 7966	-