

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉及び野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌及び

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

（2）低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

要 旨

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 0157 だけではなく 0157 に次ぎ日本での主要な血清型である 026 及び 0111 を対象に含め検討した。昨年度の結果から、ノボビオシン加 mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のペロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1～2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。本年度は、各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を中心に行った。その結果、0157、026 及び 0111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。また、その際には DNA 抽出をアルカリ抽出法や各種 DNA 抽出キットを使用することが必要であることが明らかになった。以上から、腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、さらに検討し妥当な方法を確認することが望まれる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所	工藤由起子、瀬川優子
埼玉衛生研究所	大塚佳代子
愛知県衛生研究所	平松礼司
東京都健康安全研究センター	矢野一好、小西典子
日本食品分析センター	田中廣行、土屋 禎
東海大学海洋学部	小沼博隆

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌による食中毒は血清型 O157 によるものが多いが、日本では毎年血清型 O26 及び O111 による患者も多く報告されている。血清型 O157 については世界的にも患者が多く検査法の開発が進み複数機関で有効であることが評価された方法が示されている。しかし、血清型 O26 及び O111 については適切な方法が開発されておらず、食品検査、食中毒調査などにおいて適切な行政措置をとることが難しい。このため、食品検査や食中毒調査において感度と特異性に優れた検査方法を開発する必要がある。昨年度、本研究ではノボピオシン加 mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で 1～2 時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であるとの結論を得た。本年度は、これを軸にさらに増菌方法及び遺伝子検出法の検討を中心に行った。遺伝子検出法は、特に迅速で感度が比較的高いことから各種手法が開発されており、腸管出血性大腸菌においては、その特徴であるベロ毒素を検出対象に LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法、リアルタイム PCR 法などが普及し始めている。しかし、今回対象として含まれる血清型 O26 及び O111 については、報告が少ない。本研究ではこれら血清型にも対応することも含め検討した。

B. 研究方法

1. 培養法と遺伝子検出法の比較

検体：牛ひき肉に菌接種または非接種とし各血清型について各条件ごとに 3 検体を作製した。

一般生菌数の確認：標準寒天培地

大腸菌群数：DESO 培地にて混釈培養

各検体 25g をストマッカー袋に分配した。

実験方法のフローを図 1 に示す。

菌株：O157 (No. 212)、O26 (No. 26015)、O111 (No. 97353)

各菌株を TSB 10 ml にて 35-37°C 18 時間培養し、PBS または生理食塩水で 10^{-6} 希釈 (約 500cfu/ml) 及び 10^{-7} 希釈 (約 50cfu/ml) した。 10^{-7} 希釈液 0.2 ml (約 10 cfu) を接種菌液とし、ただちに検体に接種した。袋の外から手で良く菌液と検体を馴染ませた。N-mEC 培地を加え、培養を開始した。TSA 10 枚に 10^{-7} 希釈液 0.2 ml ずつ塗抹し接種菌数を確認した。

培養方法：

検体入りのストマッカー袋に N-mEC 培地 (Merck) 225ml を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～24 時間培養した。培養液 0.05ml をネジロマイクロチューブに移し、LAMP 法に供した。また、1ml ずつ 2 本のマイクロチューブに移し、1 本は免疫磁気ビーズ、1 本は直接塗抹用に供した。さらに、2ml を予備としてネジロマイクロチューブに移した。

遺伝子検出法：

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を使用した。腸管出血性大腸菌 VT スクリーニングキット (栄研化学) を用いマニュアルに従いリアクションを行った。Loopamp リアルタイム濁度測定装置にて 65°C で 60 分間反応を行った。

「判定」：陰性；濁度の上昇なし，陽性；濁度の上昇

免疫磁気ビーズ(IMS)法(血清型 O157、O26、O111)：

マニュアル(デンカ生研)に従い免疫磁気ビーズ濃縮を行った。最終浮遊液 20 μ l ずつ画線した。

分離平板培地：

腸管出血性大腸菌の血清型 O157、O26 及び O111 の各菌株について下記の分離平板培地にて培養し集落の形態を確認した上で実験に供試した。

血清型 O157：CT-SMAC, BCM0157, BD クロモアガー-O157, クロモアガー-O157TAM

血清型 O26：CT-RMAC レインボーアガー, CT-RX026

血清型 O111：CT-SMAC, CT-RMAC, レインボーアガー, XMG, ソルボース加 MacConkey, DHL

直接分離法：

10 ml を上記各平板 1 枚に画線した。

菌株の確認法：

各平板につき疑わしい集落を 5 個以上釣菌(もし、全て陰性ならさらに 10 個(最大 15 コロニー以上)した。血清(O157, O26, O111)にて凝集反応を確認した。

2. 各種遺伝子検出法の検討

食品増菌液に腸管出血性大腸菌の各種希釈菌液を接種し、培養法(直接塗抹法、免疫磁気ビーズ法)及び遺伝子検出法の検出限界を比較検討した。

牛挽肉及びカイワレダイコンを N+mEC (Merck)にて食品のみを 42 $^{\circ}$ C 20 時間培養した。接種菌株として血清型 O157 (No. 212: VT1& 2 産生)、血清型 O26 (No. BFR 26015: VT1& 2 産生)及び血清型 O111 (No. ESC4: VT1& 2 産生)を TSB にて 37 $^{\circ}$ C 18 時間培養し 10⁻⁷まで食品培養液にて 10

段階希釈した。それを検体とし、直接塗抹法及び免疫磁気ビーズ法による分離培養及び遺伝子検出を行った。分離培地として血清型 O157;CT-SMAC、血清型 O26 ; CT-RX026、血清型 O111 ; CT-SMAC, CT-RX026, DHL を使用した。遺伝子検出のための DNA 抽出法は熱抽出法(100 $^{\circ}$ C 5 min)及び PrepMan 抽出法(600 μ l を 200 μ l に濃縮)を行った。遺伝子検出法としては、LAMP 法(LAMPVPT screening キット)、TaqMan プローブ法(ABI 7500)、サイクリング・プローブ法(SmartCycler)、ハイブリダイゼーションプローブ法(LightCycler)の計 4 種類を使用した。

3. 各種 DNA 抽出法の検討

各種 DNA 抽出方法の比較を行った。菌株を TSB にて 37 $^{\circ}$ C 18 時間培養し、これを PBS で 10⁻⁷まで 10 段階希釈した。牛挽肉またはアルファアルファの NmEC での 42 $^{\circ}$ C 増菌液 900 μ l に、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 希釈菌液 0.1 ml を添加し、これをサンプルとした(予想菌濃度：10⁵、10⁴、10³、10² cfu/ml)。DNA 抽出は以下の 6 種類を行った。

ア. 熱抽出

各サンプル 100 μ l をねじ口チューブまたは PCR チューブに採り、10,000Xg 10 分間遠心し、上清を除く。TE 100 μ l を添加し、再浮遊させ、ヒートブロック、サーマルサイクラーなどで 100 $^{\circ}$ C 10 分間加熱した。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000Xg 10 分間遠心した上清を新たなチューブに移し、テンプレートとした。

イ. アルカリ抽出

サンプル 100 μ l を 10,000Xg 10 分間遠心し、上清を除いた。50 mM NaOH を 100 μ l 添加して再浮遊させ、ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱し、処理液 50 μ l を 1 M Tri-HCl(pH 7.0) 8 μ l で中和してテンプレートとした。

ウ. PrepMan (ABI)

参考まで：サンプル 1 ml をねじ口チューブに採り、室温で 16,000Xg 3 分間遠心し、上清を除いた。PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を 200 μ l 添加し、再浮遊させ、ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱した。加熱したサンプルを室温まで冷却し、16,000Xg 3 分間遠心した上清 50 μ l を新たなチューブに移し、滅菌水を 200 μ l 添加して 5 倍希釈し、テンプレートとした。

エ. DEXPAT (Takara)

サンプル 200 μ l をねじ口チューブに採り、10,000Xg 5 分間遠心して上清を除いた。均一にした DEXPAT を 250 μ l 添加し、1 分間ボルテックス後、ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱した。加熱後、室温まで冷却し、室温で 12,500Xg 10 分間遠心した上清をテンプレートとした。

オ. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

サンプル 200 μ l を 1.5 ml 容マイクロチューブに採り、10,000Xg 5 分間遠心して上清を除いた。PBS を 200 μ l 添加し、再浮遊させ、Binding Buffer を 200 μ l、Proteinase K を 40 μ l 添加し、直ちに混和してヒートブロックで 70°C 10 分間加温した。イソプロパノールを 100 μ l 添加し、混和後、Collection Tube に装着された High

Filter Tube に全量を移して 8,000Xg 1 分間遠心した。Filter Tube を新たな Collection Tube に装着し、Inhibitor Removal Buffer を 500 μ l 添加して 8,000Xg 1 分間遠心した。Filter Tube を新たな Collection Tube に装着し、Wash Buffer を 500 μ l 添加して 8,000Xg 1 分間遠心してフロースルーを除いた。Wash Buffer を完全に除去するために、13,000Xg 10 秒間遠心し、Filter Tube を 1.5 ml 容マイクロチューブに装着し、70°C に温めた Elution Buffer を 200 μ l 添加した。8,000Xg 1 分間遠心したフロースルーをテンプレートとした。16,000Xg 3 分間遠心した上清 50 μ l を新たなチューブに移し、滅菌水を 200 μ l 添加して 5 倍希釈し、テンプレートとした。

カ. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

サンプル 200 μ l を 1.5 ml 容マイクロチューブに採り、10,000Xg 5 分間遠心して上清を除いた。Buffer ATL を 180 μ l に再浮遊させ、Proteinase K を 20 μ l 添加し、混和後、ヒートブロックで 56°C 1 時間加温した。Buffer AL を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 15 秒間混和後ヒートブロックで 70°C 10 分間加温した。96~100%エタノールを 200 μ l 添加し、ボルテックスで 15 秒間混和後、Collection Tube に装着された Spin Column に全量を移した。6,000Xg 1 分間遠心し、Spin Column を新たな Collection Tube に装着した。Buffer AW1 を 500 μ l 添加し、6,000Xg 1 分間遠心して Spin Column を新たな Collection Tube に装着した。Buffer AW2 を 500 μ l 添加し、20,000Xg 3 分間遠心して Spin Column を 1.5 ml 容マイクロチューブに装着した。Buffer

AE を 200 μ l 添加し、室温に 1 分間置いた。6,000Xg 1 分間遠心したフロースルーをテンプレートとした。

PCR 法は VT screening キット (タカラ) を用い、1 チューブあたり 50 μ l の系で行った(template は 5 μ l)。PCR 後に増幅産物のアガロースゲル電気泳動法 (3%アガロース(Nusiv3:1)) による確認を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 培養法と遺伝子検出法の比較

血清型 O157 については、全検体から検出された (表 1)。しかし、血清型 O26 については、LAMP 法及びビーズ法で肉では 9 検体中 7 検体から検出された。また、血清型 O111 については、9 検体中 6 検体から検出された。これらのことから、本研究で用いた増菌方法は O157 の検出には優れていることが再確認されたが、O26 及び O111 については若干抑制が働くことが考えられた。我々の他研究において、O26 については本研究で用いた増菌方法が優れていた結果や O111 には抑制が比較的強い結果が得られている (詳細略)。菌株によっても増殖性が異なり、O157 と同一の増菌方法でどの血清型でもごく少量の菌数あっても完全に検出できる方法を見いだすことは困難かもしれない。しかしながら、今後さらに条件を検討しより優れた方法を見いだすことが期待される。

2. 各種遺伝子検出法の検討

血清型 O157, O26 及び O111 のいずれにおいても、牛挽肉における熱抽出方法で

はいずれの遺伝子検出方法でも-5 希釈段の菌液において陰性を示した (表 2)。また、-4 及び 3 希釈段の菌液においても Smart cycler 及び Light cycler では検出できないことが多かった。これらは直接塗抹法及び免疫磁気ビーズ法では検出されていたため、検出感度としては許容できないものと判断される。しかし、DNA 抽出キットのひとつである PrepMan による効果的な DNA 抽出を行ったところ、全ての条件で検出感度が著しく改善された。また、他の DNA 抽出キットにおいても同様の改善が期待できる (詳細略)。このため、PrepMan 等の DNA 抽出キットを使用すればいずれの遺伝子検出法においても優れた感度で検出が可能であると考えられた。また、カイワレ大根については-4 及び 3 希釈段の菌液において直接塗抹法での検出が難しい結果であったが、熱抽出法でも-4 希釈段の菌液において検出され、牛挽肉よりは DNA の抽出効率が高いまたは食品成分の DNA 増幅反応抑制物質が少ないものと考えられた。また、PrepMan を用いたところより一層検出感度が上昇したものもあった。以上のことから、DNA 抽出キットの使用をすれば高感度で検出が可能であることが示された。

3. 各種 DNA 抽出法の検討

血清型 O157 及び O26 において、アルファルファ及び牛挽肉のいずれも菌濃度が 10^4 cfu/ml 以上で試験した 2 検体の両方がどの抽出方法でも陽性を示した (表 3)。 10^3 cfu/ml においてもアルカリ抽出法はアルファルファ及び牛挽肉において両血清

型で2検体のいずれもが陽性を示した。また、牛挽肉の方が比較的検出率が悪く菌体からの DNA 抽出効率が芽野菜よりも難しいことが示された。これは牛挽肉中の脂肪分や血液成分が菌体からの DNA 抽出を阻害していることや DNA 増幅反応の阻害物質が除去されるためであることが考えられた。また、アルファルファにおいて High pure (Roche) 及び QIAamp (Qiagen) の DNA 抽出方法は、いずれの血清型でも 10^2 cfu/ml まで2検体の両方が陽性であった。これは、これらの DNA 抽出方法がほかのものと異なりカラムを使った DNA 精製段階も含むためより効率的な DNA 抽出が行えたものと考えられる。

D. 結論

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 O157 だけではなく O157 に次ぎ日本での主要な血清型である O26 及び O111 を対象に含め検討した。昨年度の結果から、ノボビオシン加 mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で1~2時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。本年度は、各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を中心に行った。その結果、O157、O26 及び O111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。また、その際には DNA 抽出をアルカリ抽出法や各種 DNA 抽出キットを使用すること

が必要であることが明らかになった。以上から、腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、さらに検討し妥当な方法を確認することが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection*. 133:1043-8, 2005.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. *Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea*, 41-52, 2005.

Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. *J. Sci. Food Agri.* 85:2354-2361, 2005.

2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成17年度食品衛生監視員等研修会. 平成17年6月28日. さいたま市.

型で2検体のいずれもが陽性を示した。また、牛挽肉の方が比較的検出率が悪く菌体からの DNA 抽出効率が芽野菜よりも難しいことが示された。これは牛挽肉中の脂肪分や血液成分が菌体からの DNA 抽出を阻害していることや DNA 増幅反応の阻害物質が除去されるためであることが考えられた。また、アルファルファにおいて High pure (Roche) 及び QIAamp (Qiagen) の DNA 抽出方法は、いずれの血清型でも 10^2 cfu/ml まで2検体の両方が陽性であった。これは、これらの DNA 抽出方法がほかのものと異なりカラムを使った DNA 精製段階も含むためより効率的な DNA 抽出が行えたものと考えられる。

D. 結論

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 O157 だけではなく O157 に次ぎ日本での主要な血清型である O26 及び O111 を対象に含め検討した。昨年度の結果から、ノボビオシン加 mEC 培地での選択増菌培養後に培養液中のベロ毒素遺伝子を遺伝子検出方法で1～2時間以内に検出し、陽性検体では各血清型に応じた免疫磁気ビーズ濃縮法を行い選択分離培養することが迅速で感度の良い方法であると考えられた。本年度は、各種遺伝子検出法の応用及び検体からの効果的な DNA 抽出方法の検討を中心に行った。その結果、O157、O26 及び O111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。また、その際には DNA 抽出をアルカリ抽出法や各種 DNA 抽出キットを使用すること

が必要であることが明らかになった。以上から、腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示された。増菌培養については、血清型によって適切な方法が異なることが考えられるため、さらに検討し妥当な方法を確認することが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y. Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection*. 133:1043-8, 2005.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. *Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea*, 41-52, 2005.

Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. *J. Sci. Food Agri.* 85:2354-2361, 2005.

2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成17年度食品衛生監視員等研修会. 平成17年6月28日. さいたま市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

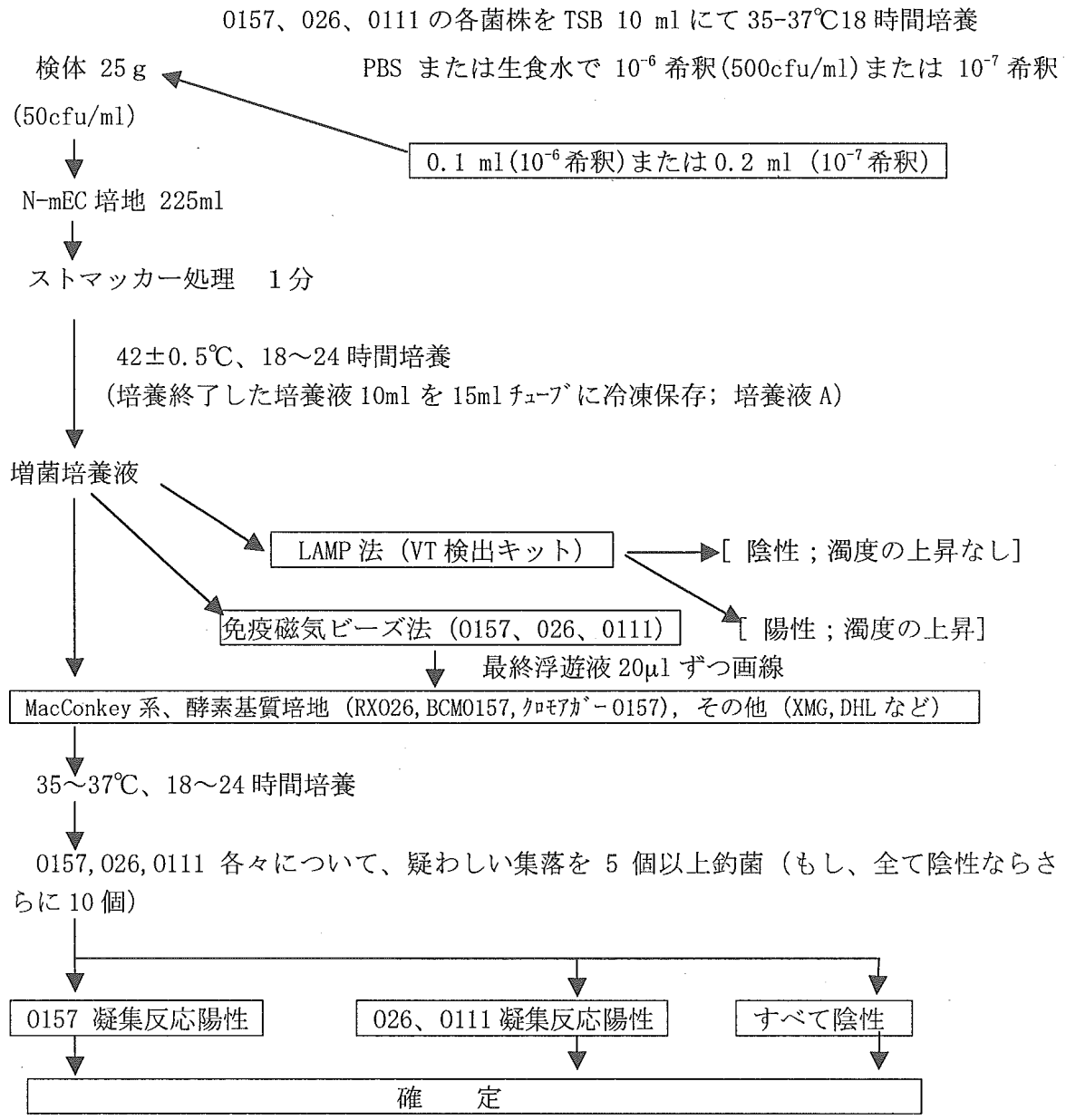


図1 検出法フロー

表1 血清型O157、O26およびO111の検出結果

血清型	食品	菌数	培養法		LAMP法
			直接法	ビーズ法	
O157	牛挽肉	低菌数	9	9	9
		未接種	0	0	1
O26	牛挽肉	低菌数	6	7	7
		未接種	0	0	0
O111	牛挽肉	低菌数	6	6	6
		未接種	0	0	0

表2 遺伝子検査法の感度の比較結果

(1) 血清型0157 (VT1, 2産生)

遺伝子検出法	牛挽肉						カイワレ大根						
	熱抽出			PrepMan			熱抽出			PrepMan			
	菌液希釈段	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5
試験菌数 (cfu/tube)	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	
LAMP VTs	+	+	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
ABI 7500 VT1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ABI 7500 VT2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
SmartCycler (VT1)	+	-	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
SmartCycler (VT2)	-	-	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
LightCycler (VT1)	-	-	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
LightCycler (VT2)	-	-	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
培養法	直接法			ビーズ法			直接法			ビーズ法			
	菌液希釈段	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4
	試験菌数 (cfu/ml)	5.5×10^4	5.5×10^3	5.5×10^4	5.5×10^3	5.5×10^4	5.5×10^3	5.5×10^4	5.5×10^3	5.5×10^4	5.5×10^3	5.5×10^4	5.5×10^3
CT-SMAC	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	

(2) 血清型026 (VT1, 2産生)

遺伝子検出法	牛挽肉						カイワレ大根						
	熱抽出			PrepMan			熱抽出			PrepMan			
	菌液希釈段	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5
試験菌数 (cfu/tube)	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	
LAMP VTs	+	+	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
ABI 7500 VT1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ABI 7500 VT2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
SmartCycler (VT1)	-	-	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	-	
SmartCycler (VT2)	-	+	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	-	
LightCycler (VT1)	-	-	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
LightCycler (VT2)	-	-	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
培養法	直接法			ビーズ法			直接法			ビーズ法			
	菌液希釈段	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4
	試験菌数 (cfu/ml)	1.8×10^4	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^3
CT-SMAC	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	

(3) 血清型0111 (VT1, 2産生)

遺伝子検出法	牛挽肉						カイワレ大根						
	熱抽出			PrepMan			熱抽出			PrepMan			
	菌液希釈段	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-3	-4	-5
試験菌数 (cfu/tube)	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	137.5	13.8	1.4	412.5	41.3	4.1	
LAMP VTs	+	+	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
ABI 7500 VT1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ABI 7500 VT2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SmartCycler (VT1)	-	-	-	NT	+	+	+	+	-	NT	+	+	
SmartCycler (VT2)	-	-	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
LightCycler (VT1)	-	-	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
LightCycler (VT2)	-	+	-	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+	
培養法	直接法			ビーズ法			直接法			ビーズ法			
	菌液希釈段	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4	-3	-4
	試験菌数 (cfu/ml)	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^4	4.0×10^3	4.0×10^4	4.0×10^3
CT-SMAC	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	

表3 DNA抽出法の検出感度試験結果

(1) O157

アルファルファ培養液

DNA抽出方法	培養液1ml中のO157菌数			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
1 熱抽出	2/2	2/2	1/2	0/2
2 アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	1/2
3 PrepMan (ABI)	2/2	2/2	(1) /2	0/2
4 DEXPAT (TAKARA)	2/2	2/2	(2) /2	0/2
5 High Pure (Roche)	2/2	2/2	2/2	2/2
6 QIAamp (QIAGEN)	2/2	2/2	2/2	2/2

() : 非常に薄いバンドで土と判定したもの、陽性数/供試数

牛挽肉培養液

DNA抽出方法	培養液1ml中のO157菌数			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
1 熱抽出	2/2	2/2	0/2	0/2
2 アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2
3 PrepMan (ABI)	2/2	2/2	1/2	0/2
4 DEXPAT (TAKARA)	2/2	2/2	2/2	0/2
5 High Pure (Roche)	2/2	2/2	1/2	0/2
6 QIAamp (QIAGEN)	2/2	2/2	1/2	0/2

(2) O26

アルファルファ培養液

DNA抽出方法	培養液1ml中のO26菌数			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
1 熱抽出	2/2	2/2	2/2	1/2
2 アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2
3 PrepMan (ABI)	2/2	2/2	1/2	0/2
4 DEXPAT (TAKARA)	2/2	2/2	2/2	0/2
5 High Pure (Roche)	2/2	2/2	2/2	2/2
6 QIAamp (QIAGEN)	2/2	2/2	2/2	2/2

牛挽肉培養液

DNA抽出方法	培養液1ml中のO26菌数			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
1 熱抽出	2/2	2/2	0/2	0/2
2 アルカリ抽出	2/2	2/2	2/2	0/2
3 PrepMan (ABI)	2/2	2/2	0/2	0/2
4 DEXPAT (TAKARA)	2/2	2/2	1/2	0/2
5 High Pure (Roche)	2/2	2/2	0/2	0/2
6 QIAamp (QIAGEN)	2/2	2/2	1/2	0/2

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌による食材汚染の
スクリーニングにおけるPCR法の適用

研究要旨

下痢原性大腸菌を食品から適確に検出・分離する方法を開発するため、増菌培地として食品衛生検査指針に新たに追加されたチオグリコレート加緩衝ペプトン水（STG-BPW）と、FDAの2段培養法を用いてその増菌効果を比較した。また、増菌後の培養液を試料とする効率的なスクリーニング方法を確立する目的で、8種類の病原遺伝子を標的として、志賀毒素産生性大腸菌・腸管毒素原性大腸菌・腸管病原性大腸菌・腸管侵入性大腸菌・腸管凝集接着性大腸菌・分散接着性大腸菌・EAST1遺伝子保有大腸菌、計7グループの下痢原性大腸菌に対するマルチプレックスPCR法の応用を試みた。その結果、大腸菌群検出率はFDAの2段増菌法（48/115、42%）が、STG-BPW（34/115、30%）より高い値を示した。FDA法では特に国内産品の大腸菌群陽性率（29/52、56%）が外国産食材（19/63、30%）よりも高かったが、その一因としては外国産品の多くが冷凍品であったために損傷菌の割合が高かった可能性があると考えられる。PCR法についてもFDA法による増菌培地から多くの陽性例が検出された（FDA法25検体、STG-BPW20検体）。両増菌法あわせて37検体（37/115、32%）がPCRにおいて陽性反応を示したが、国内産品の陽性率が（30/52、58%）、外国産品（7/63、11%）より高かった。

研究協力者

西川禎一 大阪市立大学

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC）O157:H7は、1982年に米国で発生した2つの集団食中毒事件

A. 目的

の原因菌として発見された。1977年に、Konowalchukらはベロ (Vero) 細胞を死滅させるベロ毒素 (Verotoxin, VT) の存在を報告しており、EHECがVTを産生したことから、この毒素が急激に注目を集めることとなり、発見当初はベロ毒素産生性大腸菌 (VT-producing *E. coli*, VTEC) と報告されることも少なくなかった。しかしながら、志賀赤痢菌が産生する毒素として古くから知られていた志賀毒素 (Shigatoxin, STX) とVTが類似の毒素であることを、1983年にO'Brienらが報告し、1996年にこれらの毒素を志賀毒素群と呼ぶことが提唱されたため、現在では志賀毒素産生性大腸菌 (Shigatoxin-producing *E. coli*, STEC) と呼ばれる。STECには多くの血清型菌が含まれ、いずれもがヒトの下痢症や下痢症に続発して起こる溶血性尿毒症症候群 (HUS) の原因になりうると考えられるが、中でも血清群O157・O26・O111などはヒトに強い感染力を有し、出血性大腸炎の集団発生をしばしば起こすことから、腸管出血性大腸菌 (EHEC) として他のSTECと区別され注意されている。

腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) は、コレラ菌が産生するコレラ毒素と類似した易熱性エンテロトキシン (LT) や、ヒトの生理的な消化管分泌調節因子であるGuanylinに類似の耐熱性エンテロトキシン (ST) を産生して下痢症を引き起こす。1961年にはETECの存在が既に実験的に示唆されており、

古くから知られる下痢原性大腸菌の1種である。しかしながら、新しい血清型菌O169:H41が1991年にわが国で初めて報告され¹⁴⁾、その後急速に広まり最近では米国CDCからも主要な下痢原性大腸菌として報告されるなど⁵⁾、その制御は食品衛生上の新しい課題となっている。

これらの下痢原性大腸菌による集団感染症を予防するには、食品や環境などの汚染状況を疫学的・生態学的に調査し、汚染源の除去と汚染経路の遮断を同時に実行することが最も有効な方法である。しかしながら、患者由来の臨床検体のような病原菌が優勢を占める試料と異なり、食品や環境から採取された検査材料中では非病原性の常在菌が絶対多数を占めている。したがって、これらの検体から食中毒菌を検出するには、①食中毒菌の選択的な増菌培養、②培養後の増菌培地中に目的とする病原体が含まれているか否かを高い精度で迅速にスクリーニングする手法、③スクリーニングで陽性と判定された検体から病原体を的確に分離培養する方法、を揃えることが必須である。

本研究は、増菌培地中のETECおよびSTECの有無をスクリーニングする方法を検討することを目的とする。O157の強い病原性と、世界各地で集団発生を起こした感染性の高さから、免疫学的手法を応用した種々の迅速検査キットがすでに開発されている。特にイムノクロマト法は簡便で高い感度を示している。しかしながら、これらの手法では、検出対象がO157に限定されるため他の血清型のSTECやETECには応用できない。また、O157群であれば、O157:H7あるいはO157:H-以外の病原性の無い血清

型菌であっても陽性に反応するなどの短所がある。一方、STXやLTおよびSTなどの毒素を検出するキットがあり、これらを用いれば理論的には菌体の血清型にかかわらずスクリーニングできる。しかしながら、産生された毒素の検出を介して間接的に判定するため、増菌培養液中に少数しか含まれないSTECやETECを検知するには感度が不十分である。

遺伝子増幅（PCR）法は、検出対象とする遺伝子を特異的に増幅することで非常に鋭敏な検出を可能にする。生菌のみならず死菌でもDNAさえあれば検出される点を問題視する意見もあるが、増菌後のスクリーニングに用いた場合には死菌の影響は原理的に無視できるほど小さく、その感度の良さからますます多用される傾向にある。そこで本研究では、EHECとETECおよび腸管組織侵入性大腸菌（enteroinvasive *E. coli*, EIEC）を同時に検査するために伊藤ら⁶が開発し、最新の食品衛生検査指針⁷にも掲載されているmultiplex PCR法の食品検査への適用を検討した。また、腸管病原性大腸菌（enteropathogenic *E. coli*, EPEC）⁸、腸管凝集接着性大腸菌（enteroaggregative *E. coli*, EAggEC）⁹および分散接着性大腸菌（diffusely adherent *E. coli*, DAEC）¹⁰の検出を目的とするPCR法も合わせて試みた。さらに、使用する増菌培地として、同指針に新たに追加されたチオグリコレート加緩衝ペプトン水¹¹とFDAの2段培養法¹²を比較した。

B. 方法

1. 供試菌株と検査材料

我々が臨床例から分離した大腸菌10株と英国Central Public Health LaboratoryのH. R. Smith博士より分与されたETEC、EPECおよびEIEC各1株、計13株を陽性対照として試験に供した（表1）。大阪府内を流通する、動物性食材55品、植物性食材60品を購入し検体とした。

2. 使用培地

1. ブレインハートインフュージョン（BHI）ブイヨンおよびEMB寒天はOXOID社のものを、DHL寒天培地は日水製薬のものを調整使用した。

2. トリプトンフォスフェイトブイオン（TP）：蒸留水1ℓにTryptone 20g、K₂HPO₄ 2g、KH₂PO₄ 2g、NaCl 5g、Tween80 1.5mlの割合で混合し、オートクレーブで滅菌（121℃・15分）した。

3. チオグリコレート加緩衝ペプトン水（BPW-STG）：蒸留水1ℓにBuffered Peptone Water（OXOID）20gとチオグリコール酸ナトリウムを5g添加し、オートクレーブで滅菌（121℃・15分）した

3. 増菌培養

1. FDAの二段培養法

検体10gとBHI培地90mlを、ストマッカーを用いてよく混和させてから、37℃で3時間培養した。残渣を除いたサンプルを別の滅菌バッ

グに移し、等量の TP 培地と混和してから 44.0°C で 20 時間培養した。培養液 11ml につき 80% グリセロール 1ml を加えて -80°C で保管した。

2. BPW-STG による培養法

検体 10g と BPW-STG 培地 90ml を、ストマッカーを用いてよく混和させてから、37°C で 18 時間培養した。培養後は上記のように保管した。

4. マルチプレックス遺伝子増幅法 (PCR) による下痢原性大腸菌病原遺伝子の検出

増菌培地 1ml をマイクロチューブに採り、遠心後の沈査に蒸留水 100 μ l を加えて沸騰水中で 10 分間加熱し、遠沈後の上清を鋳型 DNA サンプルとした。病原遺伝子の検出は、EIEC の侵入性に関与する遺伝子 *invE* と STEC の STX 遺伝子 *stx* および ETEC の ST 遺伝子 *est* と LT 遺伝子 *elt* を同時検出するテトラプレックス PCR⁶⁾、DAEC の細胞付着因子遺伝子 *afa*¹⁰⁾ と新しい毒素 EAST1 の遺伝子 *astA*⁹⁾ を標的とするデュプレックス PCR、EPEC の細胞接着関連遺伝子 *eae*⁸⁾ と EA g g EC の細胞接着因子の発現調節遺伝子 *aggR* を標的とするデュプレックス PCR、以上 3 種のマルチプレックス PCR を組み合わせて行った。使用したプライマーと PCR 条件は表 2 に示したとおりである。増幅には TaKaRa PCR Cycler PERSONAL (タカラバイオ) を用いた。

PCR 産物は、常法に従いアガロースゲ

ル電気泳動後にエチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下で可視化された DNA バンドの移動度に基づいて増幅産物のサイズを推定し同定した。

5. PCR 法の検出感度試験

1. 混合阻害実験

マルチプレックス PCR において、ターゲットとなる各菌株のうち、1 株について PBS で 5⁰~5⁶ の 5 倍段階希釈液をつくった。この 5 倍段階希釈液と、同時に検出する他の標的遺伝子を有する菌株の培養菌液を、それぞれ同量ずつ混合し、それぞれから DNA 試料を準備し、PCR を行った。

2. 増菌培養液中の食品微生物による阻害

各種下痢原性大腸菌の培養液を、食品検体を増菌した培養液を用いて各々 10⁰~10⁵ に段階希釈し、各試料から DNA を抽出し、PCR を行った。

3. ETEC を添加した食品に対する検出感度

豚ミンチ肉 5 検体を用い、10g あたりの接種菌数が約 1~100cfu になるように ST 産生 ETEC O166:H27 (菌株番号 E7476) を接種した。陰性対照としては、食品希釈用 PBS を添加した。接種後、FDA 二段培養法により増菌培養を行い、得られた増菌培養液から DNA 試料を抽出し、PCR を行った。

C. 結果および考察

1. 各増菌培養法の大腸菌群検出率

培養後の増菌培地を EMB 寒天培地に画線塗抹し、培養後に大腸菌群様コロニーの有無を比較したところ、FDA 二段培養法が BPW-STG 法より高い大腸菌群検出率を示した。食品群別でみると、野菜類などの植物性食品よりも、動物性食品の陽性率が高くなり、肉類は 80%近い陽性率を示した(図1)。国内産の食品は、外国産食品に比べ総じて高い陽性率を示した(図2)。その理由としては、FDA 二段培養法では冷凍品での検出率が極端に低下する傾向があり(図3)、外国産の食品では冷凍品の占める割合が高かったためと考えられる。

BPW-STG 法は、損傷菌に主眼を置いて開発された増菌培地であり、冷凍品と非冷凍の間で検出率に大きな差が見られなかった(図3)。FDA 法に比べて全体的な大腸菌群検出率は低かったが、冷凍品ではやや高い検出率を示した。EMB 寒天による大腸菌群検査の結果を見る限りにおいては、食品検査に当たっては FDA 法を利用し、冷凍品については BPW-STG 法を併用することも考慮する価値があると判断される。

2. 各病原遺伝子のマルチプレックス PCR

法による検出感度

マルチプレックス PCR において、標的となる下痢原性大腸菌が単独で存在する場合、標的となる下痢原性大腸菌が複数同時に混在する場合、食品検体から得た増菌培養液を用いて種々の食品微生物が混在する中に標的となる下痢原性大腸菌を添加した場合、以上3種の状況下で検

出限界を検討した。

標的となる下痢原性大腸菌が単独で存在する場合、その種類により差はあるものの生菌数で $10^5 \sim 10^6 / \text{m l}$ 程度以上の菌数があればほぼ検出可能であった(表3)。しかしながら、ETEC の *elt* 検出には $10^7 / \text{m l}$ 程度の菌を必要とした。テトラプレックス PCR では LT のプライマー濃度が低く設定されており、そのために感度が低下した可能性も考えられる。テトラプレックス PCR における8種の各プライマー濃度については再検討の余地があるかもしれない。また、他の下痢原性大腸菌が混在する場合、例えばテトラプレックス PCR において混在する4種の下痢原性大腸菌の内の1種のみ菌数が低い場合、あるいはデュプレックス PCR において2種の下痢原性大腸菌の内の1種のみ菌数が低い場合には、1種の下痢原性大腸菌を検査する時に比べて感度が低下し $10^6 \sim 10^7 / \text{m l}$ 程度の菌数を必要とした(表3)。ただし、*astA* については、*afa* 遺伝子を有する DAEC が $10^9 / \text{m l}$ 程度共存する条件下においても $10^5 / \text{m l}$ 程度の *astA* 保有菌を検出することができた。

種々の食品微生物を含む増菌培養液に、純培養した1種類の下痢原性大腸菌を添加したが、PCR の感度は純培養の場合とほぼ同様に $10^5 \sim 10^6 / \text{m l}$ 程度まで検出できた(表4)。そこで、ブタミンチ肉に ETEC 0166:H27 を接種し、増菌培養を行った場合の検出限界を調べた。接種菌数が検体 10g 中約 100 cfu

の場合 5 検体中 4 検体が陽性を示したが、10 cfu では2検体、1 cfu では全て陰性となり、初期菌数の減少とともに陽性率も減少した。

3. マルチプレックス PCR 法による市販食材の下痢原性大腸菌汚染スクリーニング

全 115 検体中、EMB 寒天培地に何らかの細菌集落がみられたものは、FDA 二段培養法で 84 検体、STG-BPW 培養法で 88 検体と、STG-BPW 培養法が多かった。しかしながら、これら検体のうち EMB 寒天上で大腸菌群様のコロニーを示した検体、また PCR 試験で下痢原性大腸菌の存在を示した検体の割合は、FDA 二段培養法の方が高かった (表 5)。BPW-STG 培養法の場合、大腸菌群試験で陽性を示した検体よりも、陰性を示した検体において PCR 陽性反応が高率に見られた。BPW-STG 法は、冷凍品など損傷菌の存在が推測される検体から EHEC 0157 を増菌する優れた方法として開発された方法であり¹¹⁾、前述のように本研究でも冷凍品の増菌では BPW-STG 法が優れている可能性も示唆された。しかしながら、PCR の結果なども考慮すると増菌培養法の選定に当たっては FDA 法が優先されるべきと考える。

全 115 検体中、PCR 試験で陽性を示したものは 37 検体であり、全体の約 30%にあたる。37 検体のうち 10 検体からは二種の病原遺伝子が検出された (表 6)。陽性を示した食品としては、肉類が最も多く、次いで、カイワレも

やしなどの水耕栽培野菜、小松菜、ほうれん草などの土付きの野菜類が多くを占めた。また、PCR 試験で陽性を示したのは、全国産食品 52 検体中 30 検体 (58%)、外国産食品では全 63 検体中 7 検体 (11%) であり、国内産が高い陽性率を示したが、これは国内産の高い大腸菌群の汚染率と関連したものと考えられる。

今回、PCR を用いたスクリーニングによって、市販食材が種々の下痢原性大腸菌によって汚染されている可能性が示唆された。菌を分離できていないことや、PCR の陽性判定を増幅された DNA 産物のサイズのみによって判定しているため、偽陽性の可能性を否定できないが、食材の下痢原性大腸菌汚染について本格的なスクリーニングの必要性を示したものと理解される。

D. 文献

- 1) Nishikawa, Y., Helander, A., Ogasawara, J., Moyer, N.P., Hanaoka, M., Hase, A., and Yasukawa, A. (1998) Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41, *Epidemiol. Infect.*, 121, 31-42.
- 2) Nishikawa, Y., Hanaoka, M., Ogasawara, J., Moyer, N.P., and Kimura, T. (1995) Heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41 in Japan, *Emerg Infect Dis*, 1, 61.
- 3) Hamada, K., Oshibe, T., Tsuji, H., Yoshida, S., and Aoki, Y. (2000)

- Outbreaks of heat stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169 in the Kinki district in Japan: genotypic comparison by pulsed-field gel electrophoresis of isolates from two outbreaks in 2000 with isolates from four outbreaks in 1997-1998, *Jpn J Infect Dis*, 53, 174-176.
- 4) Ando, K., Itaya, T., Aoki, A., Saito, A., Masaki, H., and Tokumaru, Y. (1993) An outbreak of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41, *Jpn J Food Microbiol*, 10, 77-81.
- 5) Beatty, M. E., Bopp, C. A., Wells, J. G., Greene, K. D., Puhr, N. D., and Mintz, E. D. (2004) Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States, *Emerg Infect Dis*, 10, 518-521.
- 6) Itoh, F., Ogino, T., Itoh, F., and Watanabe, H. (1992) Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheagenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers, *Jpn. J. Clin. Med.*, 50, 343-347.
- 7) Anonymous (2004) Byougensei daichoukin. In *Syokuhin eisei kensa shishin biseibutsu hen*, (l. Ministry of health, and welfare ed.), pp. 168-179, *Nihon syokuhin eisei kyokai*, Tokyo.
- 8) Paton, A. W., and Paton, J. C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*, *J Clin Microbiol*, 36, 598-602.
- 9) Yamamoto, T., Wakisaka, N., Sato, F., and Kato, A. (1997) Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 147, 89-95.
- 10) Le Bouguenec, C., Lalioui, L., Du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S., Selvarangan, R., Nowicki, B. J., Germani, Y., Andremont, A., Gounon, P., and Garcia, M. I. (2001) Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of *afa* adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens, *J. Clin. Microbiol.*, 39, 1738-1745.
- 11) Sata, S., Fujisawa, T., Osawa, R., Iguchi, A., Yamai, S., and Shimada, T. (2003) An improved enrichment broth for isolation of *Escherichia coli* O157, with specific reference to starved cells, from radish sprouts, *Appl Environ Microbiol*, 69, 1858-1860.

表 1. 供試菌株リスト

分類	株番号	血清型	保有病原遺伝子
EHEC	96-98-83	O157:H7	<i>stx1, stx2</i>
EHEC	96-98-83/1	O157:H7	<i>stx1</i>
EHEC	No. 3001	O157:H7	<i>stx2</i>
EHEC	No. 46	O157:H7	<i>stx2vha</i>
ETEC	YN-1		
	O169:H41	<i>est</i>	
ETEC	V96	O25:H-	<i>est</i>
ETEC	V27	O6 : H16	<i>elt, est</i>
ETEC	E5798	O7:H18	<i>elt</i>
EPEC	E2348/69	O127 :	
H6	<i>eae</i>		
EIEC	E35990	O143:H-	<i>invE</i>
EAggEC	V546	OUT :	
HUT	<i>aggR</i>		
DAEC	V64	O1:H4	<i>afa</i>
EAST1EC	96-127-23		
	O166:H15	<i>astA</i>	

表 2. PCR used in this study

標的遺伝子	プライマー(5'---3')	最終プライマー濃度 (μ M)	PCR 条件	PCR 産物	文献
<i>elt</i>	AGCAGGTTTCCACCAGGATCACCA GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	0.062 0.062	94°C 30sec, 47°C 1min, 72°C 1.5min 35 cycles	132bp	6
<i>est</i>	TTTATTTCTGTAATTGTCCTT ATTACAACACAGTTCACAG	0.5 0.125	94°C 30sec, 47°C 1min, 72°C 1.5min 35 cycles	171bp	6
<i>stx</i>	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTCGCTC	0.125 0.125	94°C 30sec, 47°C 1min, 72°C 1.5min 35 cycles	228bp	6
<i>invE</i>	ATATCTCTAATTTCCAATCGCGT GATGGCGAGAAATTATATCCCG	0.125 0.125	94°C 30sec, 60°C 1min, 72°C 1.5min 35 cycles	382bp	6
<i>eae</i>	GACCCGGCACAAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	0.2 0.2	94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 40sec 30 cycles	384bp	8
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	0.3 0.3	94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 40sec 30 cycles	111bp	9
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	0.4 0.4	94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 40sec 30 cycles	254bp	10
<i>afa</i>	AGAACTGCTGGTATGTGGCT GTTGGATAAGCGAAGAACGTTG	0.2 0.2	94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 40sec 30 cycles	393bp	11