

C. 研究結果

ウイルス濃縮方法の検討

コンニャクの煮物に抽出液として9倍容量の滅菌生理食塩水を加えてストマッカーでけん濁液を作製した。けん濁液に $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1mlのウイルス浮遊液を1/100容加えたウイルスかけん濁液を用いて濃縮方法の比較を行った(図1)。ウイルスかけん濁液を100倍濃縮し濃縮液中のウイルス感染価を測定し回収率を測定したところ、超遠心法では100%($10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1ml)回収できたが、ショ糖重層超遠心法(+ショ糖)では14.4%($10^{6.66}$ TCID₅₀/0.1ml)の回収率であった。ポリエチレングリコールによる濃縮法(PEG法)は6.8%($10^{6.33}$ TCID₅₀/0.1ml)の回収率であった。遠心式限外ろ過ユニット(アミコンウルトラ15)を用いた濃縮では分画分子量30,000以上(30K)および100,000以上(100K)どちらも100%の回収率であった。また、濃縮操作に超遠心法では約5時間、ポリエチレングリコール法では4時間要したのに対して、アミコンウルトラ15では30K、100Kともに30分前後で濃縮が可能であった。また、軟らかい食品を材料にけん濁液を作製したところ、いずれの方法でも十分な結果は得られなかった。検体のクロスコンタミネーションを避けるため操作がディスプレイの器具で濃縮可能であり、簡便性および迅速性の優れたアミコンウルトラ15を用いて濃縮することとした。

ウイルス抽出液の検討

ノロウイルスを含むウイルス性食中毒の原因食品の病原体の汚染は表面汚染と考え

られるため食品からの抽出液について検討した。アルミホイルにウイルス浮遊液($10^{4.3}$ TCID₅₀/0.1ml)0.01mlを塗付し安全キャビネット内で30分間風乾後、50mlの培養用遠心チューブに入れ10mlの滅菌した生理食塩水、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.2)あるいは1%Beef Extract加Tris・Glycine(100mM Tris, 50mM Glycine, pH9.5)緩衝液を加えて転倒混和し、抽出液中のウイルス感染価を測定し回収率を求めた(図2)。1%Beef Extract加Tris・Glycine(pH9.5)あるいはPBSでは添加ウイルスを回収できたが生理食塩水では転倒混和ではアルミホイルに付着したウイルスを回収することはできなかった。

ウイルス添加食品けん濁液からのウイルスの回収

各種食品2.5gにウイルス浮遊液($10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1ml)0.01mlを塗付し安全キャビネット内で30分間風乾後、9倍容の生理食塩水を加えフィルター付ストマッカー袋にて30秒間ストマッカーにて攪拌し食品けん濁液を作製した後フィルター部分よりけん濁液を回収し、さらに破砕物を除去するためにセルストレーナー(70 μ m)のフィルターでろ過後アミコンウルトラ15(100K)を用いて濃縮しウイルス感染価を測定し回収率を求めた(図3)。けん濁液の作製にストマッカーを使用した場合、回収率は肉団子20.4%、きんぴらごぼう15.8%、ホタテの煮物60.3%、昆布の佃煮15.8%、ポテトサラダ7.2%、サンドイッチの具(ゆで卵、トマト)15.8%であったが、

コールスローからは回収できなかった。また、ストマッカーを使用した場合食品の破砕物が発生しフィルターろ過および遠心式限外ろ過が困難であった。

食品の破砕物の発生を抑えるためにけん濁液の調整を振盪混和で行い、遠心式限外ろ過法あるいは超遠心法でウイルスの回収した(図4)。抽出液に生理食塩水を用いて食品けん濁液の作製を振盪機で行ったところ、遠心式限外ろ過法において被験食品からのウイルスの回収率は10%前後(8.4~14.8%)であったが、超遠心法ではほとんど回収することはできなかった(回収率0~2.1%)。濃縮前の抽出液中のウイルス価は限外ろ過法で得られたウイルス価の約100倍であることから、振盪混和では塗付したウイルスが食品から十分に再浮遊することができない、超遠心法では何らかの要因によりウイルスが濃縮・回収されないことが示された。

抽出液の検討を行うために食品けん濁液の調整を転倒混和で行い限外ろ過法でウイルスの回収を行った(図5)。食品の種類により回収率にばらつきが認められるが1%Beef Extract 加 Tris-Glycine (pH9.5)を用いて抽出した場合他の抽出液より回収率が良いと考えられた。

1%Beef Extract 加 Tris-Glycine (pH9.5)を抽出液として、各種食品からのウイルス回収を行った(表1、図6)。限外ろ過法でいずれの食品も濃縮前の100倍にウイルス価は濃縮されていたが、回収率は食品の種類によりばらつきが認められた(0.3~17%)。

D. 考察

ノロウイルスの食品汚染が表面汚染であると前提し食品からのウイルス添加回収試験を行ったが、食品へのウイルス浮遊液を塗付時にウイルスが食品中に浸透したため、適切な抽出法を見出す事ができなかった。食品からの抽出法としてストマッカーあるいは揉み出しが優れていると考えられたが、これらの操作では食品破砕物が多く発生し、PCRなどの核酸増幅法に与える影響が懸念される。

E. 結論

食品からのウイルス等の迅速簡便な抽出法および濃縮法を検討した。濃縮法としては食品けん濁液を遠心式限外ろ過法により濃縮する方法が簡便であった。抽出液は生理食塩水より1%Beef Extract 加 Tris-Glycine (pH9.5)等の緩衝能を有する抽出液の抽出効率が優れていた。抽出方法は、食品の種類により異なるが、30分間振盪、30分間転倒混和あるいはストマッカーを比較し、ストマッカーを用いた抽出法の効率が優れていたが、ストマッカー抽出による食品破砕が各種濃縮法に影響をおよぼした。

ノロウイルスの検出にリアルタイムPCR法が用いられていること、今回検討した抽出法(図7)がリアルタイムPCR法におよぼす影響を検討する。

F. 研究発表

<発表論文>

Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Ogura H,

Seto Y. Humoral immune responses against Norovirus infection of children. J. Med. Virol., 79:1187-1193. 2007.

<学会発表>

Seto Y., Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Ogura H, Humoral immune responses against Norovirus infection of infant. 3rd International Calicivirus Conference. November, 2007. Mexico.

Iritani N, Vennema H, Siebenga J, Siezen R, Renckens B, Seto Y. Kaida A, Koopmans M. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GGII2 Noroviruses. 3rd International Calicivirus Conference. November, 2007. Mexico.

G. 知的所有権の取得

なし

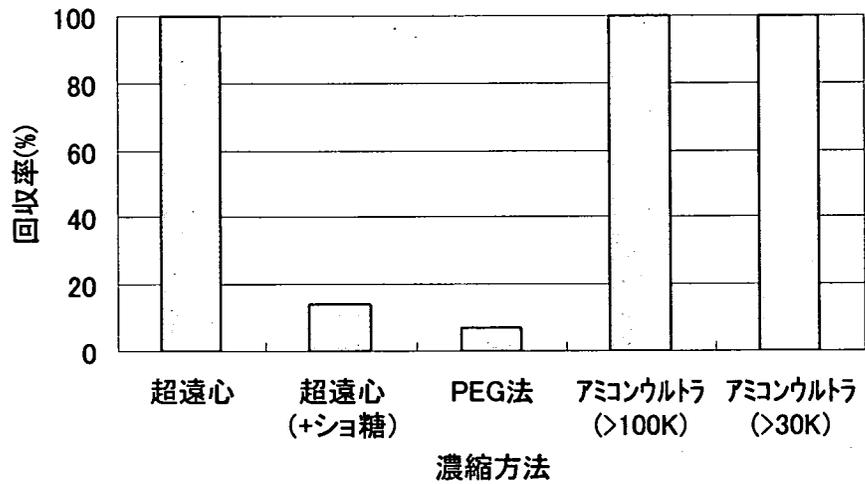


図 1. 食品抽出液からのウイルス濃縮方法の比較

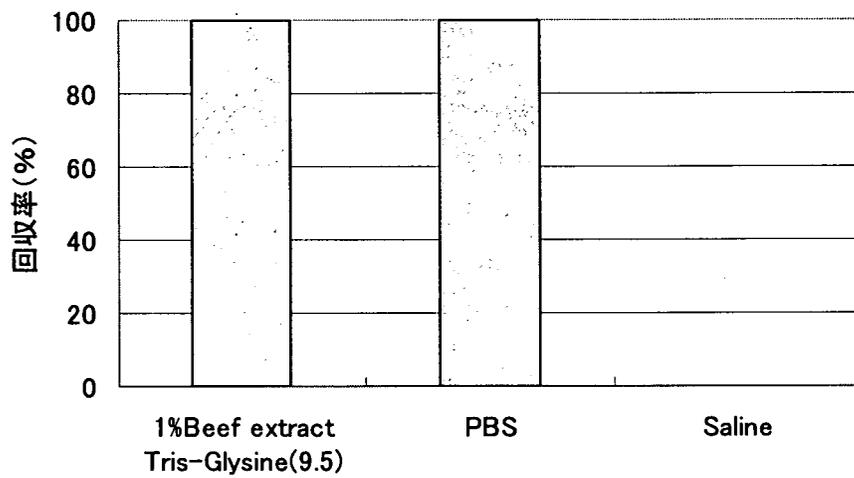


図 2 ウイルス抽出液の比較

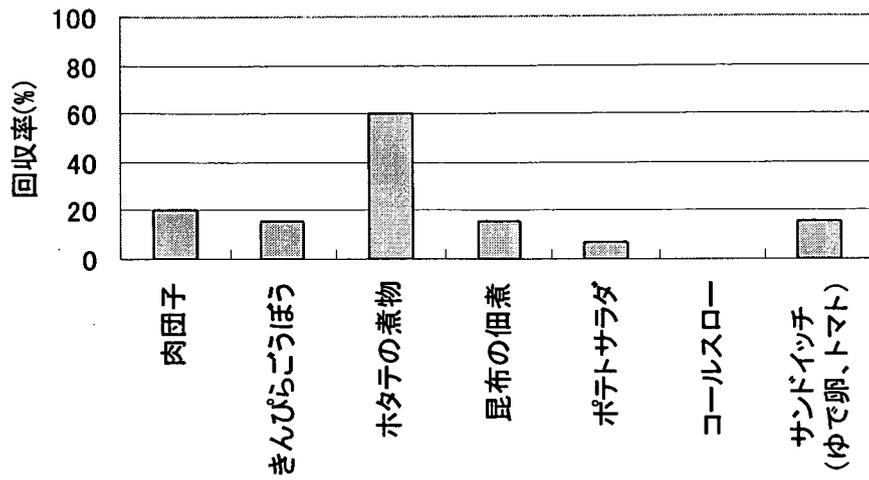


図3 各種食品からのウイルスの回収 (ストマッカー)

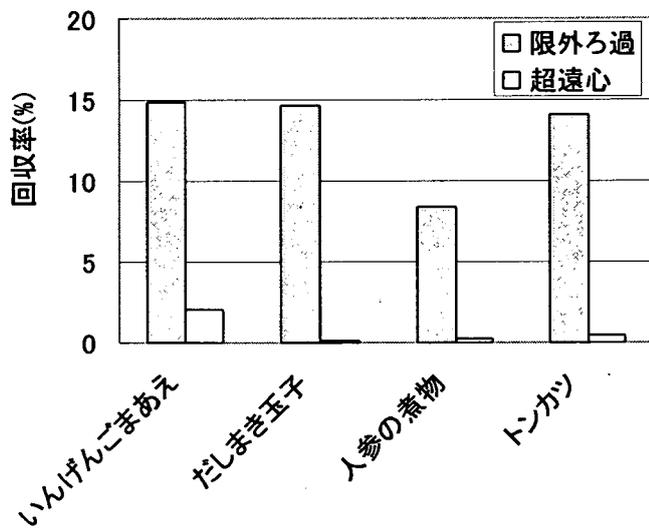


図4 食品からのウイルスの回収 (振盪)

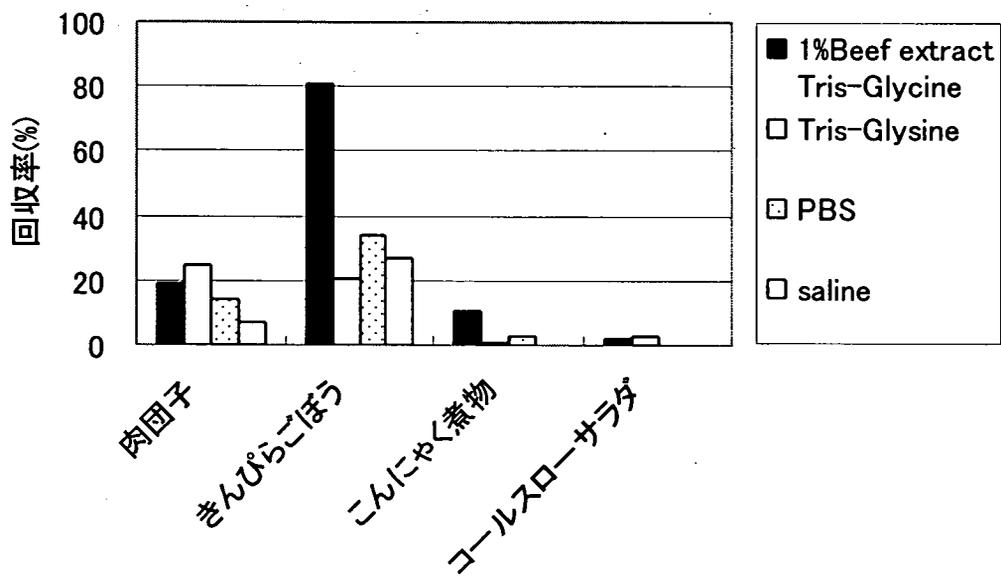


図5 抽出液の比較

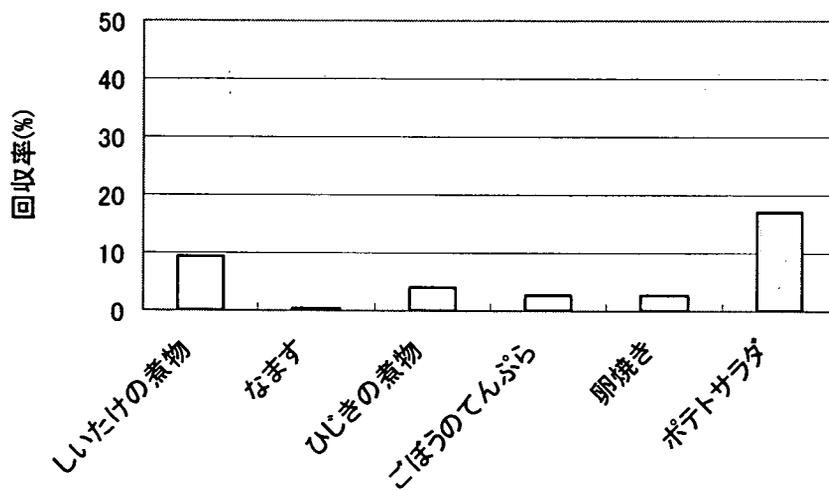


図6 各種食品からのウイルス回収結果

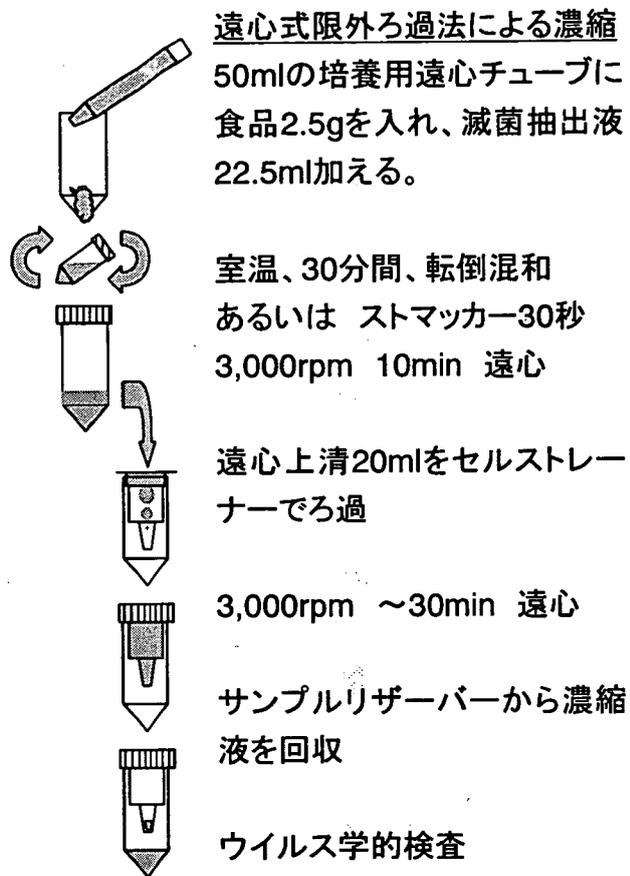


図7 食品からのウイルス抽出・濃縮法

平成 19 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)
分担研究報告書

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究
ノロウイルス迅速検査法の検討と評価

分担研究者 吉田 靖子 東京都健康安全研究センター
研究協力者 林 志直 東京都健康安全研究センター
森 功次 東京都健康安全研究センター
野口やよい 東京都健康安全研究センター
秋場 哲哉 東京都健康安全研究センター

研究要旨

食品材料からのノロウイルス検出感度を向上させるために、2nd リアルタイム PCR 法の検討を行った。通知法(リアルタイム PCR 法)によるノロウイルス GI 陽性例 6 件と陰性例 3 件および GII 陽性例 31 件と陰性例 5 件、合計 45 件について 2nd リアルタイム PCR 法を実施した。cDNA は通知法と同様に作成し、ノロウイルス GI は G1SKR/COG1F、GII は G2SKR/COG2F を用いて 1st PCR を実施し、得られた PCR 産物 5 μ l についてリアルタイム PCR 法を実施した。GI 陰性例 3 件中 2 件が 2nd リアルタイム PCR により陽性となったが、GII 陰性例では陽性化した材料は認められなかった。GI と GII の陽性材料 37 件では、20 件(54.1%)において 1,000 倍から 100 万倍の範囲で検出感度の上昇が確認された。しかし、GI 陽性例 6 件中 3 件と GII 陽性例 31 件中 5 件では、検出感度の向上が認められなかった。今回用いた増幅用プライマー部位に変異が発生していた可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、ノロウイルス(NV)性胃腸炎の集団発生においては、汚染された二枚貝を推定原因食とする事例は減少し、調理従事者による食品汚染や介護・医療従事者を介して流行が拡大する事例が増加している。現在、NV の検査は RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法(平成 15 年 11 月 5 日付厚生労働省通知法)など遺伝子診断法が広く用いられている。しかし、食品からのウイルス検査においては汚染ウイルス量が少ないこと

が予想され、検出感度の更なる向上が求められる。遺伝子診断法の検討に必要な NV の遺伝子情報を得るために、胃腸炎集団発生から検出された NV の遺伝子型別を行い、検査材料の一部について 2nd リアルタイム PCR 法を実施し、NV 検出感度を向上させることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検査材料

2007 年 4 月から 2008 年 1 月に都内で発

生した胃腸炎集団事例のふん便材料 4,215 件について、胃腸炎起因ウイルスの検索を実施した。2nd リアルタイム PCR 法の検討には、NVGI 陽性例 6 件と陰性例 3 件および GII 陽性例 31 件と陰性例 5 件、合計 45 件を用いた。

2. 方法

1) 胃腸炎ウイルスの検索

NV 検索は平成 15 年 11 月 5 日付厚生労働省通知に準じ、リアルタイム PCR 法によって行った。サポウイルス検索は Oka らのリアルタイム PCR 法(J. Med. Virol. 78, 1347~1353 (2006))、A 群および C 群ロタウイルスは、市販の ELISA、RPHA キットを用いて検索を行った。

2) NV の遺伝子型別

検出された NV の遺伝子型別は、SKR/SKF 領域の PCR 増幅産物をダイレクトシーケンシ、Katayama らの報告(Virol. 299, 225~239 (2002))に示された株を用いて系統樹解析を行った。

3) 2nd リアルタイム PCR 法

cDNA の作成は厚生労働省通知法と同様に、ランダムヘキサマーと逆転写酵素 (SuperScript II, Invitrogen) を用いて 30 μ l の反応系で行った。1st PCR には、得られた cDNA の一部 5 μ l を使用した。比較に用いたリアルタイム PCR 法にも同量の cDNA を使用した。NVGI はプライマー G1SKR/COG1F、GII は G2SKR/COG2F を用いて増幅を行い、Takara Ex Taq (1 U)、添付された緩衝液、dNTPs は添付書類に従って調整した。反応条件は 94 $^{\circ}$ C 5 分の後、94 $^{\circ}$ C 1 分・55 $^{\circ}$ C 1 分・72 $^{\circ}$ C 1 分を 40 回繰り返し、72 $^{\circ}$ C 5 分 1 回で行った。得られた PCR 産物 5 μ l について厚生労働省通知法に準じ、COG1F/R、

RING1-TP(a)、RING1-TP(b)あるいは COG2F/R、RING2-TP を用いて 2nd リアルタイム PCR 法を実施した(図 1)。

C. 研究結果

1. 胃腸炎集団発生からのウイルス検索

2007 年 4 月から 2008 年 1 月の間に胃腸炎集団事例のふん便材料 4,215 件について胃腸炎起因ウイルスの検索を行い、1,035 件(24.6%)からウイルスが検出された(表 1)。検出されたウイルスは NVGII が 955 件、NVGI が 56 件、NVGI+GII が 2 件、サポウイルス 15 件、A 群ロタウイルス 4 件、C 群ロタウイルス 3 件であった。

2. 検出された NV の遺伝子型

集団事例から NV が検出された集団事例のうちヒト-ヒト感染と判断された 56 事例の代表株について遺伝子型別を行った(表 2)。最も多かったのは GII.4 で 42 事例(75.0%)、次いで GII.13 が 8 事例(14.3%)、GI.4 が 2 事例の他、GII.2、GII.6、GII.9、GII.17 がそれぞれ 1 事例から検出された。

施設別(表 3)にまとめると、高齢者施設では 27 事例中 26 事例(96.3%)、病院内 6 事例中 5 事例(83.3%)が GII.4 であり、高い割合を示した。一方、保育園・幼稚園・小学校の事例では、GII.4 は 20 事例中 10 事例(50.0%)に留まり、低年齢層の施設においては GII.4 以外の遺伝子型検出例が認められた。

3. 2nd リアルタイム PCR 法による検出感度の向上

通知法(リアルタイム PCR 法)による NVGI 陽性例 6 件と陰性例 3 件および GII 陽性例 31 件と陰性例 5 件、合計 45 件について 2nd リアルタイム PCR 法を実施した(図 2)。NVGI

と GII の陽性材料 37 件では、20 件(54.1%)において 1,000 倍から 100 万倍の範囲で検出感度の上昇が確認された(表 4)。また、GI 陰性例 3 件中 2 件が 2nd リアルタイム PCR により陽性となったが、GII 陰性例では陽性化した材料は認められなかった。

D. 考察

都内で発生した胃腸炎集団事例から検出されるウイルスには、患者年齢層によって特徴が認められる。高齢者施設、病院から検出された NV の 90%以上を GII.4 が占めた。一方、保育園・幼稚園・小学校における事例では、GII.4 が検出された割合は 50%に留まり、NV 以外にもサポウイルス、A 群・C 群ロタウイルスが低年齢層から検出された。このため低年齢層における胃腸炎集団発生においては、NV に限らず幅広く胃腸炎ウイルスの検索を実施する必要性が認められた。

近年、NV 性胃腸炎集団発生の推定原因食にカキなどの二枚貝が占める割合は低下し、これに変わって調理従事者によって汚染された食品に起因する事例が増加している。食品のウイルス汚染量は少ないことが予測されるため、2nd リアルタイム PCR 法による検出感度の向上を試みたところ、37 件中 20 件(54.1%)に検出感度の向上が認められ、GI 陰性例 3 件中 2 件が陽性化した。全ての材料において検出感度の向上が確認されなかった原因として、プライマー設定部位における遺伝子変異が起きている可能性が示唆された。

E. 結論

2007/2008 流行期における東京都内での主流 NV の遺伝子型は GII/4 であった。2nd

リアルタイム PCR 法による検出感度の向上は 54.1%の検査材料において確認されたが、全ての材料に適用できていない。増幅に用いる最適なプライマーの検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

林 志直、森 功次、野口やよい、秋場哲哉、貞升健志、新開敬行、長島真美、長谷川道弥、田部井由紀子、吉田靖子、矢野一好：社会福祉施設の調理従事者からのノロウイルス検索、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007 年 10 月 21 日～23 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

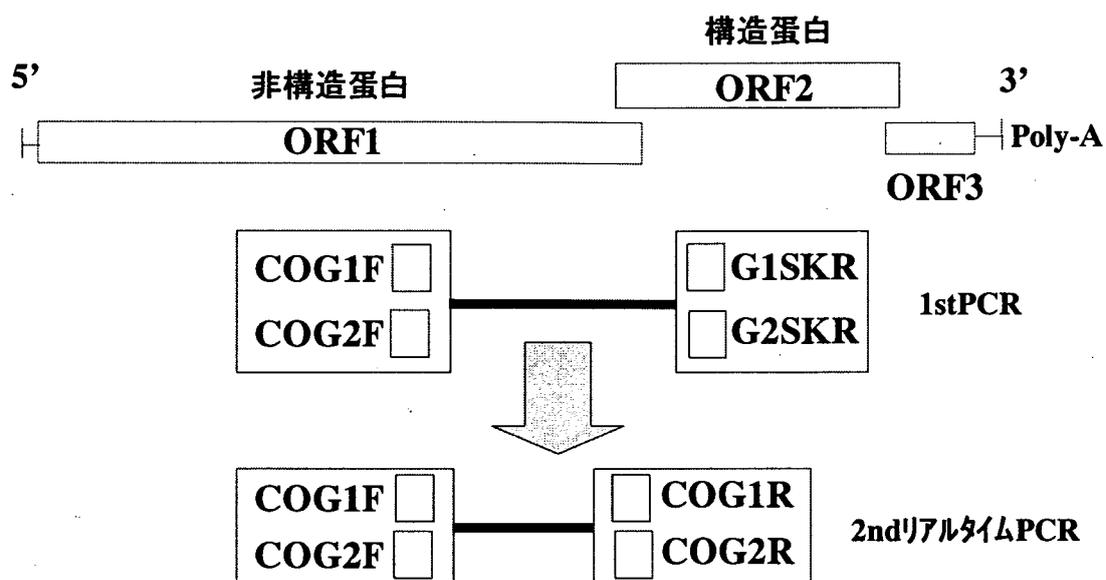


図1. 2ndリアルタイムPCR法に用いたプライマー

表 1. 東京都内の胃腸炎集団発生からのウイルス検索

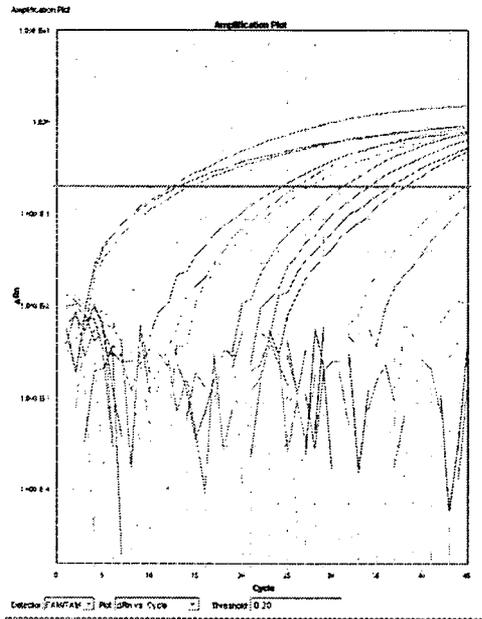
年月	7.4	5	6	7	8	9	10	11	12	8.1	合計
検体数	268	355	324	163	111	129	259	892	874	840	4,215
NoroGI			6	7				9	4	30	56
NoroGII	81	13	45	3	5	2	29	187	345	245	955
GI+GII										2	2
サポ			1	7			1	1	3	2	15
A口タ		3				1					4
C口タ			3								3
合計	81	16	55	17	5	3	30	197	352	279	1,035

表 2. 集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

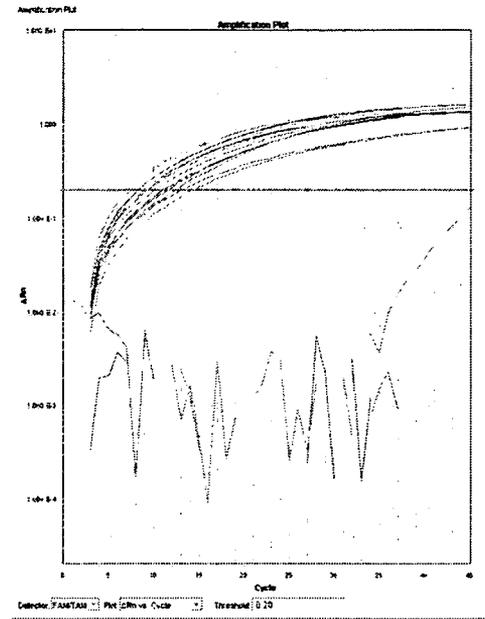
年月	2007.4	5	6	7	8	9	10	11	12	2008.1	合計
GI/4										2	2
GII/2			1								1
GII/4	2	1	1		1			8	14	15	42
GII/6									1		1
GII/9	1										1
GII-13	1		4	1	1				1		8
GII/17						1					1
合計	4	1	6	1	2	1	0	8	16	17	56

表 3. 集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型(施設別)

	高齢者	保育園等	病院	その他	合計
GI/4		2			2
GII/2				1	1
GII/4	26	10	5	1	42
GII/6		1			1
GII/9				1	1
GII/13		7	1		8
GII/17	1				1
合計	27	20	6	3	56



通知法



2nd リアルタイム法

図2. 2nd リアルタイムPCR法による検出感度の上昇

表4. 2nd リアルタイムPCR法による感度の変化

通知法結果	2ndリアルタイムPCR法によるコピー数の上昇					
	0	10 ³	10 ⁶	10 ⁷ ≤	合計	
G I	陽性	3	1	1	1	6
	陰性	1		2		3
G II	陽性	5	5	18	3	31
	陰性	5				5

Ⅲ 研究成果の刊行物に関する一覧表

Ⅲ 研究成果の刊行物に関する一覧表

- 1) K Seto, M Taguchi, K Kobayashi, S Kozaki. Biochemical and molecular characterization of minor serogroup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. *J. Vet. Med Sci.*, 69(12): 1215-1222, 2007 .
- 2) 浅尾 努 (2007) 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 (2) 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌、日本防菌防黴学会誌、35 : 401-410.
- 3) 浅尾 努、河合高生、久米田裕子、寺本忠司、石黒 厚、梅迫誠一、小笠原 準、高須一重、美野朋隆、日野亮一、齋藤利江、小崎俊司、山本茂貴 (2007) 食品の細菌学的試験法の現状と問題点 (日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告) 日本食品微生物学雑誌、24 : 134-143.
- 4) Y. Kasai, B. Kimura, Y. Tajima, and T. Fujii, Quantitative duplex PCR of *Clostridium botulinum* types A and B neurotoxin genes. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 48 (2007) 19-26.
- 5) S. Handa-Miya, B. Kimura , H. Takahashi, MSato, T. Ishikawa, K. Igarashi, T. Fujii.: Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan, *Int. J. Food Microbiol.* 117 (2007) 312-318
- 6) H. Takahashi, S. Handa, B. Kimura, M. Sato, A. Yokoi, S. Goto, I. Watanabe, T. Koda, K. Hisa, and T. Fujii: Development of Multilocus Single Strand Conformational Polymorphism (MLSSCP) Analysis of Virulence Genes of *Listeria monocytogenes* and Comparison with Whole Genome DNA Typing *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 274-284
- 7) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai , S. Morozumi, and T. Fujii: Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* in press (2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x)
- 8) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii: Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6 – 6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71, (2008) , 468-472.
- 9) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii: Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839-844.
- 10) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320.
- 11) K. Fujioka, P. Geis, M. Saito, H. Matsuoka: Visualization of Yeast Single-cells on Fabric Surface with a Fluorescent Glucose and Their Isolation for Culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 685-688 (2007).
- 12) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics. *Biocontrol Science*, 12, 31-34 (2007)

- 13) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka, N. Inagaki: A Real-time Method of Imaging Glucose Uptake in Single, Living Mammalian Cells. *Nat. Prot.* 2, 753-762 (2007)
- 14) H. Kodaka, S. Mizuochi, M. Saito, H. Matsuoka: Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1112-1118(2007).
- 15) Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, H. Matsuoka: An instant Cell Recognition System Using Microfabricated Coordinate Standard Chip Useful for Combinable Cell Observation with Multiple Microscopic Apparatus. *Microsc. Microanal.* 14, 1-7 (2008)
- 16) N. Iritani, T Seto, H Hattori, K Natori, N Takeda, H Kubo, T Yamano, M Ayata, H Ogura, Y Seto.: Humoral immune responses against Norovirus infection of children. *J. Med. Virol.* 79:1187-1193.(2007)
- 17) 松岡英明：微生物検査法のバリデーションの概略 “食品分析法の妥当性確認ハンドブック” (永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎、編) 第4章1節、サイエンスフォーラム (2007) pp189-198.
- 18) 松岡英明：技能試験の必要性和標準化の動向. *NISSUI TECHNOMEDIA* 7, 2-7 (2007)
- 19) 齊藤美佳子、松岡英明：微生物の迅速検出法. *日本防菌防黴学会誌* 36, 99-105 (2008).

IV 研究成果の刊行物・別刷

Biochemical and Molecular Characterization of Minor Serogroups of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Humans in Osaka Prefecture

Kazuko SETO¹⁾, Masumi TAGUCHI¹⁾, Kazuhiro KOBAYASHI¹⁾ and Shunji KOZAKI^{2)*}

¹⁾Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025 and ²⁾Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

(Received 28 May 2007/Accepted 2 August 2007)

ABSTRACT. We have investigated 37 minor serogroup Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains other than O157, O26, and O111 isolated from human specimens in Osaka prefecture to determine their serological and biochemical characteristics, virulence-associated genes, and clinical signs in patients. The same serotype strains were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The O antigen of 33 strains were typed into 10 serogroups; O28, O63, O65, O91, O103, O119, O121, O126, O165, and O177, and other 4 strains were not agglutinated with any serum. Four different Shiga toxin (Stx) types (1, 2, 2c, and 2f) were distributed in these isolates. The intimin gene was present in 83.8% of the strains and subtyped into intimin α , β , ϵ , and ζ . STEC O165, O177, and O178 isolated from hemolytic uremic syndrome (HUS) patients revealed atypical biochemical characters; negative reaction for lysine decarboxylase and gas production from glucose. Eleven strains including the isolates from HUS patients generated no colonies on cefixime-tellurite (CT)-sorbitol-MacConkey agar plates, since they showed high sensitivity (MIC \leq 1.25 μ g/ml) to potassium tellurite. The finding shows supportive information for use of the selective agar plates with and without CT supplement for the isolation of minor serogroup STEC. PFGE analysis revealed that the strains isolated from family cases were closely related within the respective family, and it was useful for epidemiological analysis of minor serogroup STEC.

KEY WORDS: biochemical characteristics, minor serogroup, PFGE, STEC, *stx*.

J. Vet. Med. Sci. 69(12): 1215-1222, 2007

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is known as an important cause of gastrointestinal disease in developed countries [5, 36, 42]. The public health impact of STEC infections is high because of their ability to cause secondary infections and systemic complications, such as hemolytic uremic syndrome (HUS) [3, 15, 23]. In Japan, STEC infection is classified as a category III notifiable infectious disease under the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) in compliance with the Law Concerning the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections (Infectious Diseases Control Law), and reporting by physicians is mandatory. More than 3,000 new symptomatic and asymptomatic cases of STEC infection are reported every year, although reports have decreased slightly when compared with the reports from 2004 [30]. In 2005, 1600 STEC isolates were reported from prefectural and municipal public health institutes (PHIs) to the Infectious Diseases Surveillance Center (IDSC) of the National Institute of Infectious Diseases (NIID). The ratio of O157 isolates was decreased from 75.4% in 1997 to 68.4% in 2005. O26 accounted for 22% and O111 for 4.6% of the total STEC isolates in 2005. In addition, serogroups other than O157, O26, and O111 increased from 33 isolates (9 serogroups) in 1997 to 52 isolates (14 serogroups) in 2005 [30, 31]. Recently there was

an outbreak of STEC O121 infections among school children in Chiba Prefecture [1]. Many effective and selective media are widely used in routine laboratory examination for the isolation of STEC O157 that have sorbitol-nonfermenting and β -glucuronidase-negative characteristics. Rhamnose and sorbose are also utilized as indicators for the isolation of STEC O26 and STEC O111, respectively [16, 41]. The biochemical characteristics of various other STEC serogroups have not yet been reported. In Osaka Prefecture, some cases of HUS caused by non-O157 STEC have been reported since 1997. The development of rapid and effective methods for the isolation of 'minor serogroup' (serogroup other than O157, O26, and O111) STEC are desirable to prevent secondary infections and analyze the infectious route. Methods for the detection of Stx, the cardinal virulence factors, directly from human stool or colonies on selective agar plate have been described [18, 24, 34], but these have been failures due to low sensitivity and false positives [8]. Isolation of STEC is required not only for reporting to NESID but also for epidemiological investigation.

Symptoms range from mild diarrhea to hemorrhagic colitis, and the infection may be complicated with HUS. STEC has been isolated from healthy individuals as well. It was suggested that the clinical outcome of STEC infection is associated with the Stx type and intimin, an outer membrane protein responsible for the intimate adherence between the bacteria and the intestinal epithelial cell membrane [7, 10, 13]. The finding that enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) hemolysin, called enterohemolysin, might act as a virulence factor in STEC O157, O26, and O111 was reported [6]. We

* CORRESPONDENCE TO: KOZAKI, S., Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan.
e-mail: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp

therefore investigated minor serogroup STEC that had been collected from human cases from 1996 to 2006 in Osaka Prefecture to characterize the isolates for their serotypes, virulence factors, and their correlation with disease. Furthermore, we applied pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to analyze the similarity of isolates in the same serotype. The aims of this study were also to describe the characteristics as indicator of effective detection of minor serogroup STEC and to evaluate the tools for epidemiological analysis.

MATERIALS AND METHODS

Strains: STEC identified to serogroups except O157, O26, and O111 were used in this study. These strains were isolated from 24 patients and 13 healthy carriers between January 1996 and December 2006. Their clinical features are summarized in Table 1.

Serotype identification: Serotyping of O antigen (lipopolysaccharide) and H antigen (flagellar) of motile strains was performed according to the agglutination test [32] using *Escherichia coli* antisera set 1 and set 2 (Denka Seiken, Tokyo, Japan). The strains untypeable with commercially available serum were identified at the National Institute of Infectious Disease. The H types of nonmotile strains were investigated for the flagellin genes (*fliC*) by PCR followed by *HhaI* digestion of *fliC* PCR products and evaluation of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns, as previously described [28].

Biochemical characterization: The strains were examined for biochemical properties using conventional methods [11]. The carbohydrate-fermenting ability was determined with pepton water containing Andrade's indicator (1%) and one of the following 14 carbohydrates (1%) (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan): adonitol, arabinose, dulcitol, glucose, inositol, lactose, maltose, mannitol, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, or xylose, after 3 days incubation at 37°C. The activity of β -glucuronidase was observed by inoculating on CLIG medium (Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo, Japan).

Typing of Shiga toxins and stx genes: Production of Stx1 and Stx2 was tested using a reverse passive latex agglutination test (VTEC-RPLA; Denka Seiken), according to the manufacturer's instructions. The detection and subtyping of *stx* genes was performed by *HincII* digestion of a 900 bp DNA product, which was obtained by PCR with primers Lin5' and Lin3' [2].

Detection and subtyping of intimin gene (*eae*): The *eae* genes were detected by PCR using primers caek1 and EA2 [26]. The subtyping of *eae* genes into intimin α , β , γ , ϵ , and ζ was performed by PCR with primer SK1 in combination with primers LP2 to LP6B [44].

Hemolytic phenotype and detection of EHEC hemolysin gene (*ehxA*): The hemolytic activity was assayed on enterohemolysin agar plates (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) containing washed sheep blood and 10 mM calcium chloride, and sheep blood agar plates (Kanto Chemical). Enterohemolysin is only observed on the enterohemolysin agar plate,

Table 1. Source and number of isolates and clinical features of individuals infected with minor serogroup STEC

Serotype	Number of			Symptoms ^{c)}				
	Family ^{a)}	Sporadic ^{b)}	Persons	AP	D	BD	HUS	None
O28:H20		1	1	1	1			
O63:H6	1	2	4	1	2			2
O65:NM ^{d)}	2		5	4	1	3		1
O91:H14		1	1					1
O103:H2	1	2	6	3	1	2		3
O103:H11		1	1	1		1		
O119:H4		1	1					1
O119:[H25] ^{e)}	1		3					3
O121:H19		4	4	3	1	3		
O126:H8		1	1		1			
O165:[HUT] ^{f)}		5	5	4	2	3	2	
O177:[HUT]		1	1	1		1	1	
OUT ^{g)} :H2		1	1					1
OUT:H14		1	1					1
OUT:H25		1	1	1	1			
OUT:[HUT]		1	1	1		1	1	

a) Family cases.

b) Sporadic cases.

c) AD: abdominal pain, D: nonbloody diarrhea, BD: bloody diarrhea, HUS: hemolytic uremic syndrome, None: asymptomatic.

d) Nonmotile and negative in the *fliC*-specific PCR.

e) An H type in brackets indicates the presence of non-motile (NM) strains, which were analyzed for their *fliC* type by PCR-RFLP.

f) HUT means untypeable with PCR-RFLP of *fliC*.

g) OUT means untypeable with antisera specific for O1 to O181.

and α -hemolysin reveals hemolysis on both agar plates [6]. Detection of *ehxA* was performed with primers hlyAF and hlyAR [35].

Growth on CT-SMAC and MIC of potassium tellurite: The growth of the strains was evaluated by comparing the colonies on MacConkey sorbitol agar (SMAC; Nissui, Tokyo, Japan) with and without CT supplements (cefixime; final 0.05 mg/liter and potassium tellurite; 2.5 mg/liter, ASKA Diagnostics, Tokyo, Japan). The bacterial solutions were adjusted to the 0.5 MacFarland standard (ca. 10^8 CFU/ml) with BBL Trypticase Soy Broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.). Ten microliter of the solution was applied to SMAC and CT-SMAC, and incubated for 20 hr at 37°C. The MIC of potassium tellurite (Dynal A. S., Oslo, Norway) was measured by the agar dilution method [22] using SMAC as a substitute for Mueller Hinton agar.

Antimicrobial susceptibility testing: The antimicrobial susceptibilities were determined by the disk diffusion method [29] with the following 12 antimicrobial agents (Becton, Dickinson and Company): ampicillin, cefotaxime, chloramphenicol, ciprofloxacin, fosfomycin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, ofloxacin, streptomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, and tetracycline.

PFGE: PFGE was performed according to the method of PulseNet Japan [43], using *Xba*I and *Bln*I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain was kindly provided by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [19]. FingerprintingII Version 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) was used for calculating the Dice similarity indices (tolerance 1.2%, unweighted pair group method using arithmetic averages) in the cluster analysis.

RESULTS

Serological diversity of STEC isolates: Of a total of 1,705 STEC strains, 1,519 O157 strains (89.1%), 136 O26 strains (8.0%), and 13 O111 strains (0.8%) were isolated during the period from January 1996 to December 2006. A total of 37 minor serogroup STEC strains were isolated from 5 family cases and 23 sporadic cases, and classified into 16 different O:H serotypes. Twenty-two motile strains belonged to the following 11 serotypes: O28:H20, O63:H6, O91:H14, O103:H2, O103:H11, O119:H4, O121:H19, O126:H8, O untypeable (OUT):H2, OUT:H14, and OUT:H25, and 15 other nonmotile strains were analyzed for their H type by *fliC*-specific PCR. Three strains belonging to O119 were identified as O119:[H25]. Although the same restriction pattern digested by *Hha*I was present in 7 strains belonging to serogroup O165, O177, and OUT, the pattern was not identical with any patterns that had been reported previously. Therefore these strains were designated as O165:[HUT], O177:[HUT], and OUT:[HUT]. Only serogroup O65 (5 isolates) was classified as O65:NM, because no amplification product was detected with the *fliC*-specific PCR (Table 1).

Clinical features: Twenty-four strains were isolated from patients, and the other strains were obtained from asymptomatic carriers (Table 1). HUS developed in 4 patients, and abdominal pain was the dominant symptoms in 20 patients. Bloody diarrhea and nonbloody diarrhea appeared in 14 and 10 patients, respectively. The serotypes isolated from HUS patients were O165:[HUT] (2 isolates), O177:[HUT], and OUT:[HUT]. The strains belonging to serotypes O91:H14, OUT:H2, and OUT:H14 were isolated from food-providing workers who showed no symptoms. The remaining asymptomatic carriers were family members of patients. O63:H6 (2 isolates) and O119:H4 were isolated from family members of STEC O157 patients. O119:[H25] (3 isolates) was isolated from family members of STEC O26 patients.

Biochemical characterization of isolates: The strains belonging to same serotypes showed the same results except for some carbohydrate fermentation results. The serotype O165:[HUT], O177:[HUT], and OUT:[HUT] strains revealed the most atypical phenotype, negative reaction for lysine decarboxylase and gas production from glucose. The serotype O119:[H25] and OUT:H25 strains were lysine decarboxylase-negative, and the serotype O65:NM strains did not produce gas from glucose. Sorbitol was not fermented in 5 serotypes; O63:H6, O119:[H25], O177:[HUT], OUT:H14, and OUT:H25. Four serotypes (O103:H11, O165:[HUT], O177:[HUT], OUT:[HUT]) and two serotypes (O119:H4, O165:[HUT]) were rhamnose-negative and xylose-negative, respectively. Although it is well known that STEC O157 is β -glucuronidase negative, the minor serogroup STEC strains were positive except for O65:NM, which was positive on day 2 (Table 2).

Characterization of virulence factors: The production of Stx1 and Stx2 was examined with the VTEC-RPLA assay, and *stx* genotypes of the strains were determined by PCR-RFLP (Table 2). The serotype O65:NM strains produced both Stx1 and Stx2. Either Stx1 or Stx2 was detected in the other strains. The *stx* types of all strains were identical to the Stx types. The production of Stx2 and presence of *stx2* were founded in 16 strains of 6 serotypes (O28:H20, O63:H6, O121:H19, O165:[HUT], O177:[HUT], and OUT:[HUT]). O28:H20 (1 strain), O165:[HUT] (3 strains), and OUT:[HUT] (1 strain) had *stx2c* in addition to *stx2*. Stx2 was also detected in O63:H6 (4 strains) carrying *stx2f*.

The *ea*e gene was detected in 31 strains (83.8%) belonging to 10 serotypes. In the *ea*e-positive strains, four intimin types, namely α , β , ϵ , and ζ , were detected (Table 2). Intimin ϵ was most frequent and detected in serotypes O103:H2, O121:H19, O165:[HUT], O177:[HUT], and OUT:[HUT]. Intimin α was found in O63:H6, β in O65:NM and O103:H11, and ζ in O119:[H25] and OUT:H25. The *ehxA* gene was detected in 31 strains including all except for 3 serotypes (O63:H6, O119:H4, and O126:H8), but eight strains, O165:[HUT], O177:[HUT], OUT:H14, and OUT:[HUT] showed no enterohemolytic activity. The 6 *ehxA* negative strains were negative for enterohemolytic activity (Table 2). There were no strains demonstrating α -hemolysis.