

図 3. 地衛研機能強化の PREDEDE-PROCEED MODEL (2)

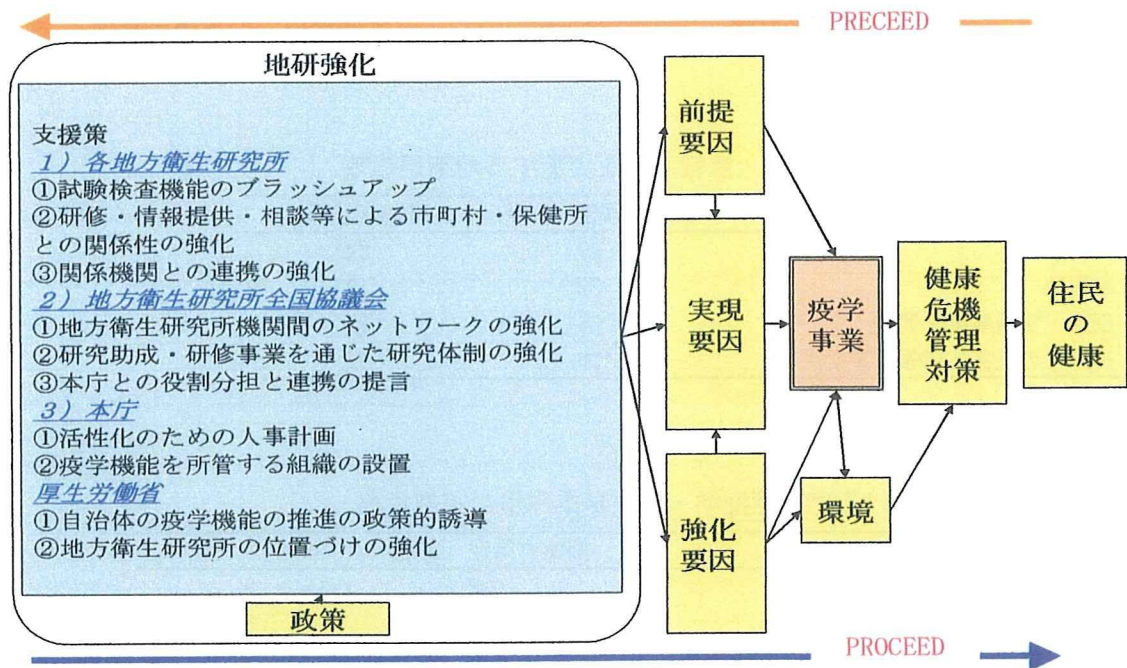


図 4. 機能強化の PREDEDE-PROCEED MODEL (3)

表 1-1. 事例調査項目概要

基本的事項	1 事業名	人材育成	1 活動のための研修の有無	
	2 分野		2 研修内容	
	3 担当組織		3 具体的な受講者	
	4 事業案件数等		4 事業に特定した人材の採用の有	
	5 事業予経常経費は含まず			
	6 従事人員及び職種			
	7 関連音本庁の関連する部課等		関係行政機関	1 連携した関係機関名
	8 使用機器			2 連携の内容
政策支援状況	1 支援した政策(事業名)	関係研究機関	1 連携した研究機関名	
	2 具体的内容		2 連携の内容	
	3 行政効果の評価指標			
	4 活用された疫学的技術			
実地疫学部門	1 活用した情報内容	地衛研ネットワークの活用	1 地衛研ネットワークの活用の有無	
	2 担当部科		2 有り→活用した効果	
	3 情報の入手方法(事業名等)		3 無し→今後の展望	
試験検査部門	1 活用した試験検査情報	研究結果への反響	1 マスコミの報道	
	2 担当部科		2 住民からの問い合わせ	
	3 情報の入手方法(事業名等)		3 議会での質問	
所属の支援体制	1 研究推進方針の有無	包括的分析	1 研究推進の促進要因	
	2 担当職員の配置増の有無		2 研究推進の阻害要因	
	3 予算流用の有無		3 他地研での実現可能性	

表 3-1. 回答数と感染症疫学・情報事業を実施する地衛研の数

質問項目	都道府県型 (ヶ所)	市型 (ヶ所)
送付数	47	24
回答数	32	19
疫学・情報事業を実施	29	12
感染症の疫学・情報事業を実施	29	12

表 3-2. 地衛研における感染症疫学・情報事業内用と実施状況

質問項目	都道府県型 (ヶ所)	市型 (ヶ所)
感染症発生動向調査業務を実施	28	9
積極的疫学調査業務を実施	5	5
予防接種関連情報の収集解析業務を実施	4	1
感染症疫学関連の研修業務を実施	5	2

表 3-3. 地衛研に設置されている疫学・情報専管部門の設置状況と設置体制

質問項目		都道府県型 (ヶ所)	市型 (ヶ所)
疫学・情報事業を専管する部門を設置		17	2
職員	1人	2	0
	2人	2	0
	3人	1	0
	4人	3	0
	5人	4	0
	6人	2	0
	7人	2	1
	8人	0	1
	10人	1	0
専属医師が所属		3	1
予算	0円	1	0
	40万円	1	0
	133万円	1	0
	146万円	1	0
	200万円	1	0
	478.6万円	1	0
	800万円	1	0
	回答なし	10	2
	パソコンの設置		17
カラーレーザープリンタの設置		12	1
プリンタ (カラー・モノクロ) なし		3	1
スキャナの設置		10	2

表 3-4. 調査 2 の回答者数と各地衛研に設置されている感染症情報センター概要

自治体	回答人数 (人)		IDSC設置場所	IDSC専任職員 (人)	IDSC兼任職員 (人)
	本庁・保健所	地衛研			
A	3	0	地衛研	11	0
B	5	2	地衛研	5	0
C	0	7	地衛研	6	1
D	0	3	地衛研	0	2
E	0	5	その他	-	-

表 3-5. 所属自治体の政策決定のために役立っていると考えられる IDSC の業務

a. 平時業務

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
サーベイランスで得られた情報の提供	67	100	100	100	100	80
サーベイランスで得られた情報以外の疫学情報	0	60	50	43	0	0
検査結果情報	33	100	100	57	33	20
事例などから得られる新たな知見	100	60	100	29	0	0
最新の科学的知見	100	60	50	0	33	0
他自治体や全国の情報（患者発生状況など）	67	20	100	43	67	40
自治体本庁との情報交換会議	33	0	50	29	0	0

政策決定に役立っていると考えられる業務を選択した職員のn数に占める%を示した

b. 新型インフルエンザ対応

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
サーベイランスで得られた情報の提供	100	100	100	100	100	60
サーベイランスで得られた情報以外の疫学情報	33	40	50	71	67	0
検査結果情報	67	80	100	43	67	40
集団発生の探知や確認	67	40	50	43	33	40
事例などから得られる新たな知見	67	40	50	14	0	20
最新の科学的知見	67	0	50	43	33	20
他自治体や全国の情報（患者発生状況など）	0	40	50	71	33	40
自治体本庁との情報交換会議	0	0	50	14	0	0

政策決定に役立っていると考えられる業務を選択した職員のn数に占める%を示した

表 3-6. IDSC に設置が必要だと考える感染症発生動向調査業務

a. 平時業務

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
リアルタイムな集計情報(週報など)の還元	*100	*100	*100	*100	*100	*100
患者に関する詳細な情報の還元	100	100	50	71	67	60
メディア対応等への説明に使うための患者情報の提供	*67	40	*50	71	33	60
感染症対策に係る行政活動の根拠となるデータの提供	*100	100	*100	*100	100	*100
今後の流行注意や予防方法などを情報提供するリーフレットや啓発資料の作成	100	100	*100	57	33	80
検査結果の還元	*100	*100	*100	57	67	80
サーベイランスの方法に対する助言(定点設定やサーベイランス対象疾患など)	*100	80	*100	86	100	60
本庁との情報交換会議	—	—	*100	86	67	60
保健所との情報交換会議	—	—	*100	86	67	60

「優先的に設置すべき」、「設置すべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置すべき」、「設置すべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置すべき」と回答したものがn数の50%以上

b. 新型インフルエンザ対応

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
リアルタイムな集計情報(週報など)の還元	*100	*100	*100	*100	*100	*100
患者に関する詳細な情報の還元	100	40	50	*71	33	40
メディア対応等への説明に使うための患者情報の提供	67	20	*50	71	67	60
感染症対策に係る行政活動の根拠となるデータの提供	100	100	*100	*100	100	80
今後の流行注意や予防方法などを情報提供するリーフレットや啓発資料の作成	100	100	100	57	0	80
検査結果の還元	*100	*100	*100	71	67	80
サーベイランスの方法に対する助言(定点設定やサーベイランス対象疾患など)	100	60	*100	71	100	80
本庁との情報交換会議	—	—	*100	100	67	60
保健所との情報交換会議	—	—	*100	86	67	60

「優先的に設置すべき」、「設置すべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置すべき」、「設置すべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置すべき」と回答したものがn数の50%以上

表 3-7. IDSC に設置が必要だと考える積極的疫学調査業務

a. 平時業務

業務内容	保健所・本庁(%)		地方衛生研究所(%)			
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
集団発生の探知と当該保健所・本庁への連絡	*67	20	*50	86	0	20
情報センターとして情報（疫学データの集約・解析等）に特化した業	*100	*100	*100	*100	100	*100
疫学部門として疫学調査の方法や質問票に関する専門的助言	67	80	*100	*100	67	*100
感染拡大防止や消毒方法など感染症対策における専門的助言	67	60	*100	100	33	80
調査員としての人的支援（専門的支援は実施しない）	33	60	*100	57	0	80

「優先的に設置すべき」、「設置すべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置するべき」、「設置すべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置するべき」と回答したものがn数の50%以上

b. 新型インフルエンザ対応

業務内容	保健所・本庁(%)		地方衛生研究所(%)			
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
集団発生の探知と当該保健所・本庁への連絡	*67	20	*50	57	33	0
情報センターとして情報（疫学データの集約・解析等）に特化した業	*100	60	*100	*100	100	*100
疫学部門として疫学調査の方法や質問票に関する専門的助言	*67	80	*100	*100	67	80
感染拡大防止や消毒方法など感染症対策における専門的助言	67	40	*100	100	33	80
調査員としての人的支援（専門的支援は実施しない）	33	40	*100	57	0	60

「優先的に設置するべき」、「設置するべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置するべき」、「設置するべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置するべき」と回答したものがn数の50%以上

表 3-8. IDSC に設置が必要だと考える研修業務

a. 平時業務

研修対象	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
保健所職員	*100	*100	*100	*100	*100	80
県庁職員	*100	40	*50	86	100	80
その他の貴自治体職員	100	40	50	86	33	60
貴自治体以外の職員 (医療機関、学校、福祉施設など)	67	60	100	71	33	60
他自治体職員	33	40	50	43	0	60

研修内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
新型インフルエンザ	100	*100	*100	*100	67	*80
発生状況に関する説明	100	80	*100	*86	100	80
積極的疫学調査の方法	*100	60	*100	*100	67	80
対策方法・指針の説明	67	60	50	86	0	60
記述疫学の方法	100	60	*100	86	67	60
解析疫学の方法	100	80	*100	86	67	60
集団発生の早期探知	*100	100	*50	100	67	60
各疾患の解説	67	20	*100	100	67	60
予防方法	100	80	*100	*100	33	80

「優先的に設置すべき」、「設置すべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置すべき」、「設置すべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置すべき」と回答したものがn数の50%以上

b. 新型インフルエンザ対応

研修対象	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
保健所職員	*100	*100	*100	*100	*100	60
県庁職員	*100	60	*100	*86	100	60
その他の貴自治体職員	67	40	*100	86	67	40
貴自治体以外の職員 (医療機関、学校、福祉施設など)	67	80	*100	71	33	60
他自治体職員	33	60	*50	29	0	40

研修内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
新型インフルエンザ	100	*100	*100	*100	100	80
発生状況に関する説明	*100	80	*100	*100	*100	*80
積極的疫学調査の方法	100	80	*100	*100	67	80
対策方法・指針の説明	67	60	100	*100	67	60
記述疫学の方法	67	80	*100	*86	33	60
解析疫学の方法	67	80	*100	*86	33	60
集団発生の早期探知	*100	60	*50	*100	100	60
各疾患の解説	33	60	*100	*100	33	40
予防方法	100	80	*100	*100	100	60

「優先的に設置すべき」、「設置すべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置すべき」、「設置すべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置すべき」と回答したものがn数の50%以上

表 3-9. IDSC に設置が必要だと考える情報発信業務

a. 平時業務

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
国内のメディア情報	100	100	*100	71	67	60
海外のメディア情報	*100	80	*100	71	67	60
厚生労働省などからの通知	100	40	50	71	33	80
感染研による感染症発生動向の還元資料	*100	*100	*100	*100	*100	80
他県の感染症発生状況	*100	60	*100	86	67	*80
国際機関や海外機関 (WHOやCDC) などの発表資料	*100	100	*50	100	67	80
日本語で記された専門的文献やデータ	*100	60	*100	86	0	40
英文で記された専門的文献やデータ	100	60	50	57	0	40

「優先的に設置するべき」、「設置するべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置するべき」、「設置するべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置するべき」と回答したものがn数の50%以上

b. 新型インフルエンザ対応

業務内容	保健所・本庁(%)			地方衛生研究所(%)		
	A (n=3)	B (n=5)	B (n=2)	C (n=7)	D (n=3)	E (n=5)
国内のメディア情報	100	80	*100	*71	67	40
海外のメディア情報	*100	60	*100	71	67	80
厚生労働省などからの通知	100	40	50	71	33	80
感染研による感染症発生動向の還元資料	*100	*100	*100	*100	*100	40
他県の感染症発生状況	100	80	*100	*86	67	80
国際機関や海外機関 (WHOやCDC) などの発表資料	*100	100	*50	86	67	40
日本語で記された専門的文献やデータ	*100	80	*100	71	33	40
英文で記された専門的文献やデータ	100	60	*50	57	0	40

「優先的に設置するべき」、「設置するべき」、「設置しなくてよい」の3段階で回答を求め、表の各数値は、「優先的に設置するべき」、「設置するべき」と回答した職員のn数に占める%を示した

*「優先的に設置するべき」と回答したものがn数の50%以上

表 3-10. 保健所と本庁が求める IDSC の業務（優先設置業務と設置推奨業務）

業務種別	優先設置業務*	設置推奨業務**
平時		
感染症発生動向調査	リアルタイムな集計情報（週報など）の還元 検査結果の還元	患者に関する詳細な情報の還元 感染症対策に係る行政活動の根拠となるデータの提供 今後の流行注意や予防方法などを情報提供するリーフレットや啓発資料の作成 サーベイランスの方法に対する助言（定点設定やサーベイランス対象疾患など）
積極的疫学調査	情報センターとして情報（疫学データの集約・解析等）に特化した業務 保健所職員への研修	該当なし
情報発信	感染研による感染症発生動向の還元資料	国内のメディア情報 海外のメディア情報 国際機関や海外機関（WHOやCDC）などの発表資料
新型コロナウイルス対応時		
感染症発生動向調査	リアルタイムな集計情報（週報など）の還元 検査結果の還元	感染症対策に係る行政活動の根拠となるデータの提供 今後の流行注意や予防方法などを情報提供するリーフレットや啓発資料の作成
積極的疫学調査	該当なし	該当なし
研修	保健所職員への研修	該当なし
情報発信	感染研による感染症発生動向の還元資料	該当なし

* 「優先的に設置すべき」と「設置するべき」と回答した合計の職員数が2自治体ともに80%以上

** 「優先的に設置するべき」と回答した職員数が2自治体ともに50%以上

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 20 年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y	Comprehensive and Rapid Real-Time SYBR Green I PCR Detection of Food-borne Pathogens in Feces from 21 Bacterial Food Poisoning Cases in Shimane Prefecture, Japan.	Int. J. Microbiol.		http://www.hindawi.com/journals/ijmb/aip.917623.html	2009
伊藤雅、山下照夫、都築秀明、椛島由佳、藤浦明、長谷川晶子、長谷聡子、榮賢司、皆川洋子	Human parechovirusの検出ならびに同定方法の検討.	愛知県衛生研究所報	58	1-8	2008
伊藤雅、山下照夫、皆川洋子	ヒトパレコウイルス感染症	臨床検査	53(1)	105-110	2009

平成 21 年度
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
野村千枝，尾花裕孝，織田肇	健康危機対応を目的とした食品中有害重金属等の迅速分析法の検討.	食品衛生学雑誌	50(5)	253-255	2009
芦塚由紀，岡本華菜，山本重一，中川礼子	マイクロウェーブ分解装置を用いた重金属の迅速分析法の検討	福岡県保健環境研究所年報	36	61-66	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Research Article

Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Foodborne Outbreaks

Hiroshi Fukushima, Kazunori Katsube, Yoshie Tsunomori, Ryoko Kishi, Junko Atsuta, and Yuko Akiba

Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 582-1 Nishihamasada, Matsue City, Shimane 690-0122, Japan

Correspondence should be addressed to Hiroshi Fukushima, fukushima-hiroshi@pref.shimane.lg.jp

Received 4 November 2008; Revised 19 December 2008; Accepted 4 February 2009

Recommended by Todd R. Callaway

A set of four duplex SYBR Green I PCR (SG-PCR) assay combined with DNA extraction using QIAamp DNA Stool Mini kit was evaluated for the detection of foodborne bacteria from 21 foodborne outbreaks. The causative pathogens were detected in almost all cases in 2 hours or less. The first run was for the detection of 8 main foodborne pathogens in 5 stool specimens within 2 hours and the second run was for the detection of other unusual suspect pathogens within a further 45 minutes. After 2 to 4 days, the causative agents were isolated and identified. The results proved that for comprehensive and rapid molecular diagnosis in foodborne outbreaks, Duplex SG-PCR assay is not only very useful, but is also economically viable for one-step differentiation of causative pathogens in fecal specimens obtained from symptomatic patients. This then allows for effective diagnosis and management of foodborne outbreaks.

Copyright © 2009 Hiroshi Fukushima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

The introduction of real-time PCR in foodborne outbreak investigations provides an opportunity for rapid detection of pathogens in food and clinical settings [1]. The benefits to public health administration from rapid real-time PCR assays are most notable after comprehensive and rapid detection of bacteria. The results can quickly inform a public health administrator about the causative pathogens of foodborne outbreak, allowing a more accurate, effective, and timely response. Abubakar et al. [2] implied in the Health Technology Assessment program (now part of the National Institute for Health Research, UK) that the feasibility of conversion to rapid methods such as multiplex PCR and DNA microarrays is dependent on localized considerations, including the community prevalence rates for specific pathogens, the skill base, and subsequent training costs for laboratory staff and spare capacity available to ensure adequate laboratory space for new equipment. Although these tests look promising, further studies are necessary to assess their usefulness [2].

Apart from saving time, real-time PCR is sensitive, highly specific and offers the potential for quantification [3]. The risk of cross-contamination is significantly reduced, and high-throughput performance and automation are possible since no post-PCR manipulations are required [4]. In principle, two different chemistries are available for real-time detection of PCR products: fluorescent probes that bind specifically to certain DNA sequences and fluorescent dyes that intercalate into any double-stranded DNA. Fluorescent-probe based real-time PCR (TaqMan PCR) studies to detect causative pathogens from foodborne outbreaks in feces using TaqMan probes have been carried out [3–6]. TaqMan PCR assays require the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid criteria. Use of simple, cheaper double-stranded DNA-binding dye SYBR green I for detection of PCR amplicons (SG-PCR) overcomes this limitation. Therefore, real-time PCR could be applied without the need for fluorescent probes [7]. In the absence of probes, the specificity of the reaction is determined on the basis of the melting temperature (T_m). The advantages of SG-PCR over TaqMan PCR include the relative simplicity and

reduced cost of SYBR Green I compared to TaqMan probes [8]. Recently, the application of SG-PCR for the detection of foodborne bacteria in different samples has been increased [1, 9–12]. Duplex SG-PCR assays have been carried out to detect causative bacteria in feces from foodborne outbreaks [4, 10, 13].

We previously reported a set of four duplex SG-PCR assays for one-step differentiation of 8 genes of foodborne pathogens in DNA extracted from 5 feces using 32 capillary tubes of LightCycler (Roche). The first run was for the detection of 8 main foodborne pathogens and the second run was for the other pathogens. We reported here that improved diagnostic duplex SG-PCR assays were upgraded with new highly sensitive primer pairs for 11 foodborne pathogens. These assays successfully identified the causative pathogens of foodborne outbreaks caused by enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, *astA*-positive *E. coli*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, or *Staphylococcus aureus* in 21 cases from 2002 to 2007. This assay is simple, rapid, inexpensive, reliable as well as suitable for comprehensive, rapid detection of causative pathogens in foodborne outbreaks.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial Strains. The 27 foodborne bacteria used in this study are *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and enteroaggregative *E. coli* (EAEC)), *Shigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Providencia alcalifaciens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Vibrio cholerae*, TDH-positive *V. parahaemolyticus*, TRH-positive *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, emetic *Bacillus cereus*, enterotoxigenic *B. cereus*, and *Clostridium perfringens* (Table 1). Bacterial cultures and viable-cell counting were described in a previous report [10]. For template DNA of each foodborne pathogen as a PCR control, 200 μ L of each bacterial culture (10^8 CFU/mL) was treated with a QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) in the same procedure as the following stool treatments.

2.2. Primer Design. The 22 primer pairs used in this study for the detection of *E. coli* (EIEC, EPEC, EHEC, ETEC, and EAEC), *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. alcalifaciens*, *C. jejuni*, *C. coli*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, *P. shigelloides*, *S. aureus*, *C. perfringens*, and *B. cereus* were described in our previous reports [10, 13] for cases 1 to 19. The newly designed 22 primer pairs listed in Table 2 were used for cases 19 to 21. In this study, 10 primer pairs (marked with * in Table 2) were newly designed or selected from earlier publications (see Table 2 references). The 4 primer pairs (*ces*, *yadA-X*, *CCceuE*, and *aggR-Z*) were newly designed. The *ces* primer was constructed from cereulide synthetase gene of emetic *B. cereus* [4], the *yadA-X* primer from *yadA* gene on

the plasmid present in virulent *Yersinia* spp. [24], the *CCceuE* primer from *ceuE* gene encoding of a lipoprotein component of a binding-protein-dependent transport system for the siderophore enterochelin of *C. coli* [25], and the *aggR-Z* primer from *aggR* gene encoding of a transcriptional activator for EAEC aggregative adherence fimbria I expression [26]. To determine the specific primers *ces*, *yadA-X*, *CCceuE*, and *aggR-Z*, the genes of *ces*, *yadA*, *ceuE*, and *aggR* that were expected to be unique were selected with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program within GenBank and were designed by Biosearch Technologies Inc. (USA). Other primer pairs were those used in earlier publications (see Table 2 references). All oligonucleotide primers were synthesized by Invitrogen (Yokohama, Japan) or Biosearch Technologies Inc. (USA).

2.3. Duplex SG-PCR with Feces. Feces (1 g) from 5 patients were weighed aseptically from the mass sample collected for virological inspection, placed into sterile tubes, and homogenized with 9 mL of distilled water. Then, 200 μ L of stool suspension was treated with a QIAamp DNA Stool Mini kit. For real-time PCR, we used SYBR *Premix EX Taq* (Takara, Japan), 32 glass capillary tubes, and a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) as described by the manufacturer. Duplex SG-PCR was performed using 32 glass capillary tubes with 4 groups of 2 primer sets on the LC instrument for each run. Analysis of each group of primer pairs was made in 8 glass capillary tubes; each of which included 1 negative DNA control consisting of PCR-grade water, 2 positive controls, and template DNA from 5 feces. The first run of duplex SG-PCR was analyzed using 4 primer sets selected from 11 primer sets described in our previous reports [10, 13]. The newly first run primer set including *ae* plus *FemB*, *AB* plus *EAST1*, *Tdh* plus *Ces-TM*, and *StyInva* plus *GAP* (see Table 2) was used for analysis of cases 19 to 21. The second run was analyzed using 4 primer sets selected from the following primer sets: *LT* plus *AHH1*, *STa* plus *PSG*, *aggR-Z* plus *virA*, *SG* plus *PAG* and the third run using *yadA-X* plus *CCceuE*, and *hlyA* plus *Trh*. The *ae*A-positive samples were analyzed by simple PCR using primers *JMS1* and *JMS2*. Each reaction tube contained 10 μ L of SYBR *Premix EX Taq*, 6.8 μ L of PCR-grade H_2O , 0.4 μ L of both forward and reverse primers (10 μ M) for the target gene of two foodborne pathogens, and 2 μ L of template DNA in a 20 μ L PCR mixture. The assay cycling profile was 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 5 seconds and then annealing at 60°C for 20 seconds. Fluorescence signals were measured once per cycle at the end of the extension step. After PCR amplification, a melting temperature curve analysis was done. Next, the LightCycler PCR products were cooled to 65°C and then heated to 95°C at a rate of 0.1°C per second. The fluorescence signals obtained were continuously monitored to confirm amplification specificity during 1 hour of analysis. The products' melting temperature peaks were calculated by performing 10 or more assays per sample and were based on the initial fluorescence curve found by plotting the negative derivative of fluorescence over temperature

TABLE 1: Bacterial strains assayed by SYBR Green I PCR

Bacterial strains	Sources ^c	PCR results with each primer set (see Table 2)																							
		eae	JMS1	JMS2	LT	STa	EAST-1	aggR-Z	virA	StyInva	yadA-X	PAG	PSG	AB	CC	ceuE	hlyA	tdh	trh	AHH1	FemB	ces-TM	SG	GAP	
<i>Escherichia coli</i> -EPEC O55 (<i>eaeA</i>)	EC-2736 ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EPEC O153 (<i>eaeA</i> and <i>astA</i>)	EC-2649 ^b	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EHEC O26:H11(<i>Stx1</i>)	SE-02005	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EHEC O157:H7 (<i>Stx2</i>)	SE020025	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EHEC O157:H7 (<i>Stx1</i> and <i>Stx2</i>)	SE-02027	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -ETEC O148 (LT, ST and <i>astA</i>)	EC-3515 ^b	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -ETEC O169 (ST and <i>astA</i>)	EC-4725 ^b	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EAEC O111 (<i>aggR</i> and <i>astA</i>)	EC-4131 ^b	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> -EIEC O124:HNM (<i>virA</i>)	EA32 ^a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	I00031	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Sal-2339	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> O3/B4	Pa241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLE 1: Continued.

Bacterial strains	Sources ^a	PCR results with each primer set (see Table 2)																		
		STa	EAST-1	aggR-Z	virA	StyI	yadA-X	PAG	PSG	AB	CC	ceuE	hlyA	tdh	trh	AHHI	FemB	ces-TM	SG	GAP
<i>Y. pseudotuberculosis</i> O4b	SP988	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	NIID124 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	NIID123 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	SC 009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	SC 011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1	ATCC14035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O139	NIID63-93 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae non-O1</i>	SVP84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. para-haemolyticus</i> O3:K6 (tdh)	SVP02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. para-haemolyticus</i> O3:K6 (trh)	NIIDK4 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> O1	ATCC7966	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	SS 05 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Emetic Bacillus cereus</i>	No.127 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	No.1 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	H2 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aStrain kindly donated by K. Sugiyama^a, Shizuoka Prefectural Institute of Public Health, Shizuoka; J. Yatsuyanagi^b, Akita Prefectural Institute of Public Health, Akita; M. Tamura and E. Arakawa^c, ^dOther strains except for ATCC numbers are our own collections.

TABLE 2: 22 pairs of specific primers for SYBR Green I PCR

Primer set for duplex PCR	Species and subgroups	Target gene	Name	Forward or revers	PCR primers primers' sequences (5' - 3')	GenBank accession no.	location	Product size (bp)	T_m values ^a	References	
First run	1 <i>Escherichia coli</i> EPEC and EHEC	<i>eaeA</i>	* ^b eae	F2	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	Z11541	899-924	106	83.2 ± 0.2	[14]	
				R	CTCATGGCGGAATAGCCGTTA		1000-979				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	* FemB	fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	AF106850	277-299	93	80.8 ± 0.3	[15]	
				rv	TGCGCAACACCCCTGAACIT		370-351				
	2 <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> - specific DNA	* AB	F	CTGAATTTGATACCITTAAGTGCAGC	AL111168	381135	86	79.1 ± 0.4	[8]	
				R	AGGCACGCCCTAAACCTATAGCT		381185				
				S	GCCATCAACACAGTATATCC	L11241	63-82	106	84.9 ± 0.6	[16]	
	EAEC	<i>astA</i>	EAST-1	AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		168-148				
				F	GGTACTAAATGGCTGACATC	X54341	601-582	251	81.6 ± 0.3	[17]	
	3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Tdh199	R	CCACTACCACICTCATATGC		351-370				
				F	GATGTTTGGCAGCATGCAA	DQ360825	8689-8707	65	80.4 ± 0.1	This study	
	Emetic <i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	* ces-TM	R	CTTTCGGCGTGATACCCATT		8793-8734				
				F	TCGTCAITCCAITTACCTACC	M90846	167-186	119	81.3 ± 0.4	[5]	
	4 <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	* <i>StyinvA</i>	JHO-2- right	AAACGTTGAAAAAACTGAGGA		285-234				
				JHO-3-left	GGTTCATTAATTTGAAAACCTGGTG	X81849	583-604	154	78.3 ± 0.4	[18]	
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP	11			712-736				
				12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC						

TABLE 2: Continued.

Primer set for Species and duplex PCR subgroups	Target gene	Name	Forward or revers	PCR primers primers' sequences (5' - 3')	GenBank accession no.	location	Product size (bp)	T _m values ^a	References
Second and third runs	5 ETEC (ST)	St1a	F	GCTAATGTTGGCAATTTTATTCTCTGTA	M25607	294-321	190	78.5 ± 0.2	[19]
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	PSG	R	AGGATTACAACAAGTTTCACAGCAGTAA	AJ300545	483-456	68	83.1 ± 0.2	[13]
6 EAggEC	<i>aggR</i>	* aggR-Z	F	TGAATCGACACGCCAGAGTTC	Z18751	304-284	97	79.5 ± 0.3	This study
	<i>virA</i>	virA	R	GATGCCCTGATGATAATATACGGAA	D26468	432-454 358-382	215	82.4 ± 0.3	[20]
7 <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	* AHH1	F	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACA	CP000462	1589-1622 1813-1788	133	89.8 ± 0.4	[21]
	ETEC (LT)	LT	R	TGATGACTAATCTCGTAAGCCCTCC	S60731	1653360-82 1653492-73	132	82.0 ± 0.3	[22]
8 <i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>gyrB</i>	PAG	38F	GAGGGCTGGATGCGGTGTG	AJ300547	38-56	73	81.0 ± 0.2	[13]
	Enterotoxigenic B. <i>cereus</i>	* SG	110R	ACCGTCACGGCGGATTA	DQ153257	110-92	152	82.7 ± 0.4	[23]
9 <i>Yersinia enterocolitica</i> Y	<i>yadA</i>	* yadA-X	F	GCATCTTTAAGCCCTTCGGTC	XI3882	2101-2123 2252-2231	100	81.6 ± 0.2	This study
	<i>pseudotuberculosis</i>	* CCeuE	R	CTTTAAACAGCTTGTTCAGCCA	X88849	1465-1487	91	81.1 ± 0.3	This study
10 <i>Vibrio cholerae parahaemoliticus</i>	<i>hlyA</i>	hlyA	2272-F	CCAGTATTCAGGATCAAGATAAATGATTT	X51746	3513-3531 3603-3575	71	82.4 ± 0.1	[13]
	<i>trh</i>	Trh	250-F	GGCTCAAAAATGGTTAAGCG	DQ359748	2272-2291 2342-2323	250	81.1 ± 0.1	[17]
Singl PCR	EHEC (Stx 1)	Stx1	251-R	CATTTCCGCTCATATGC	EF441598	256-274 505-487	95	81.1 ± 1.0	[12]
	EHEC (Stx 2)	Stx2	R	GTCACAGTAACAAACCGTAACA	EF441616	509-488 415-437	108	81.7 ± 0.3	[12]
			F	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA		140-157			
			R	CGACCCCTCTTGAACATA		247-228			
				GATAGACATCAAGCCCTCGT					

a: Average ± standard deviation of T_m values of 10 tests; b: * new selected or designed primer

versus temperature. To quantify target bacteria in feces, DNA samples extracted with the QIAamp DNA Stool Mini kit from target bacteria were used to form a standard curve. Two microliters of a serial 10-fold dilution of DNA (Easy Dilution from Takara, Japan) were prepared and analyzed under the conditions specified above.

2.4. Duplex SG-PCR Analysis in 21 Foodborne Outbreaks. 21 foodborne outbreak cases examined by duplex SG-PCR in Shimane Prefecture, Japan from 2002 to 2007 are shown in Table 3.

3. Results and Discussion

3.1. Duplex SG-PCR Procedures. We previously reported duplex SG-PCR assays for detection of 19 species of foodborne pathogens using 22 primer pairs [10, 13]. After that, more accurate duplex SG-PCR assays were designed by 10 more sensitive and specific primers including 6 primers (FemB, AB, ces-TM, Styinva, SG, and AHH1) selected from earlier publications (see references in Table 2) and 5 new primers (eae, aggR-Z, yadA-X, and CCceuE) constructed in this study. The new primer set was used for cases 19 to 21. Real-time SG-PCR procedures using 22 primer pairs for the detection of 15 bacterial species, including 5 *E. coli* subgroups, were developed for the duplex assay. The primer sequence, target, SG-PCR product size, T_m values (mean plus standard deviation from a range of 10 assays), specificities, and references are summarized and listed in Tables 1 and 2. The primer virA detects virA gene of *Shigella* spp. and EIEC; the primer eae detects eaeA gene of EPEC and EHEC, and the primer EAST-1 detects astA gene of EAEC and ETEC. Primer hlyA detected hlyA gene of *V. cholerae* strains O1 and O139 as well as non-O1 strains. The primer SG for the detection of nheB (nonhemolytic enterotoxin B) gene of *B. cereus* cross-reacts with enterotoxigenic and emetic strains and the primer ces-TM detects cereulide synthetase gene of emetic strain of *B. cereus*. The nheB and ces gene positive strains were identified with emetic strains and the nheB gene positive and ces gene negative strains with enterotoxigenic strains. A new primer yadA-X for *Yersinia* adhesion reacts with virulent *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, but not with nonpathogenic strains of *Yersinia* spp. (data not shown). Other primers, including new primers aggR-Z and CCceuE, specifically detect each gene of EAEC and *C. coli*. Food-borne Outbreak Investigation Report (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>), Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan during 2005 to 2007 shows that 97% of foodborne outbreaks were caused by the following 7 species of foodborne pathogens: *S. enterica* (58.3%), *C. jejuni* (15.2%), TDH-producing *V. parahaemolyticus* (8.3%), *S. aureus* (7.2%), *C. perfringens* (3.6%), emetic *B. cereus* (1.6%), EHEC (2.9%), and other virulent *E. coli* (2.1%) which include astA-positive *E. coli* which is a strain of *E. coli* that does not possess any diarrheagenic characteristics except the EAEC heat-stable toxin 1 (EAST1) gene and is frequently isolated in diarrhea outbreaks [27]. Using of 4 primer sets of 2 primer pairs,

including newly selected or designed 6 primer pairs, for the detection of 7 main foodborne pathogens and astA-positive *E. coli* in the first run of duplex SG-PCR brought out the comprehensive, rapid, and sensitive detection of causative pathogens in foodborne pathogens to cases 19 to 21 (Table 2 and Figures 1 and 2). The second run of duplex SG-PCR used 4 primer sets and the final run utilized 2 primer sets selected from the remaining 4 primer pairs. The primers JMS1 and JMS2 were used for the single PCR detection of stx1 and/or stx2 genes from the eaeA gene-positive samples for the confirmation of EHEC. Figures 1 and 2 show the T_m curves of the duplex SG-PCR products of the template DNA samples in each run. In duplex SG-PCR assay with two primer pairs, each PCR product was generated with a different T_m curve. These could be resolved in a LightCycler by using T_m curve analysis when a target bacterium was present in the reaction tube.

3.2. Using Duplex SG-PCR for Identification of the Causative Agent in 21 Foodborne Outbreaks. Table 3 shows epidemiological and clinical investigations in 21 foodborne outbreaks examined by duplex SG-PCR analysis in Shimane Prefecture, Japan from 2002 to 2007. From samples of feces, we used a combination of duplex SG-PCR assay with DNA extraction using a QIAamp DNA Stool Mini kit. The SG-PCR assay is rapid, specific, and sensitive as a detection technique. The DNA extraction of 5 stool specimens with the QIAamp DNA Stool Mini kit was carried out within 1 hour and it effectively removed inhibitors present in feces. The duplex SG-PCR assay was also carried out within 1 hour. The 7 species (listed previously) of foodborne bacteria, which included 3 groups of *E. coli*, were detected from 111 (58.1%) of 191 feces in 21 cases by duplex SG-PCR. Then these causative agents were isolated and identified after 2 to 4 days. With the exception of two cases (cases 10 and 11), the first run of duplex SG-PCR confirmed the presence of a pathogen in 54 (58.1%) of 93 feces in 19 (90.5%) cases within 2 hours. The exceptions were case 10 where a confirmation test was necessary to detect the eaeA gene of EHEC O26 and case 11 where astA-positive *E. coli* was detected on the third run. In the first run, DNA samples extracted from 5 feces (1, 3, 4, or 7 feces in 6 cases) of symptomatic patients were used and the causative pathogens were detected from 1 to 5 samples: 1 (in 8 cases: 1, 2, 4, 7, 8, 15, 19, and 21), 2 (in 3 cases: 9, 13, and 20), 3 (in 3 cases: 16, 18, and 21), 4 (in 3 cases: 5, 6, and 17), and 5 samples (in 3 cases: 3, 12, and 14). Then the causative pathogens were later isolated in a routine laboratory. In cases 11 and 12, *C. perfringens* or *C. jejuni* was detected by duplex SG-qPCR with more than 10^5 CFU/g feces from only 1 sample and *C. perfringens* was then also isolated from only 1 of 46 samples and *C. jejuni* from only 1 of 16 samples by culture method. Therefore, the infections with both these pathogens were determined to be sporadic cases and they were immediately eliminated as causative pathogens in cases 11 and 12. It was confirmed that duplex SG-PCR analysis of 5 feces collected from symptomatic patients was ultimately the most effective screening method for foodborne pathogens in foodborne outbreaks [10, 13].