

201327053A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と

その食中毒予防・迅速対応に資する

情報ネットワーク基盤構築に関する研究

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 井口 純

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

総括研究報告

流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と

その食中毒予防・迅速対応に資する

情報ネットワーク基盤構築に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的調査と

その食中毒予防・迅速対応に資する情報ネットワーク基盤構築に関する研究

研究代表者 井口 純 宮崎大学 IR 推進機構 特任助教

研究要旨

我が国においては O157 や O26、O111 といった O 血清群に属する腸管出血性大腸菌 (EHEC) が病原大腸菌を原因とする食中毒事例の大半を占めるが、それ以外の O 血清群に属する EHEC (非典型的 EHEC) による散発事例や食品汚染が複数報告されている。また 2011 年にドイツで発生した EHEC と腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) のハイブリッド型 O104 による集団感染事例のように、稀なタイプの病原大腸菌による突発的な事例も発生している。本研究では非典型的 EHEC、EAggEC、腸管病原性大腸菌に焦点を絞り、家畜、野生動物、食品、ヒト患者などの横断的サンプルから分離された菌株について、遺伝学的な特徴の解析を行った。菌株のクローン性 (系統的単一グループ) を識別する手法としては O 血清群の遺伝学的なタイピング法 (*E. coli* O-genotyping PCR) を用いた。584 株の解析を行い 113 種類の O-genotype を確認した。18 種類の O-genotype では家畜・野生動物とヒト-有症患者の両方からの分離が確認された。その中の 9 種類では同じ O-genotype 内で相同な病原関連遺伝子プロファイルが認められたことから、それぞれのクローン株が動物やヒトに広く分布 (汚染) していると推測された。これらの情報を用いて、今後は情報共有データベースの構築や新規分類手法の開発を行い、流行の恐れがある病原大腸菌の継続的な監視システムを構築していきたい。

A. 研究目的

ヒトや食品の移動範囲がグローバル化し、一昼夜にして世界中を駆け巡ることが可能となっている。それに伴

い世界各国で発生する感染事例にも注意を払わなければならない時代となった。腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia*

coli: EHEC) を含む病原大腸菌による食中毒事例は世界各地で発生しており、一部の患者は重症化して死亡することから最も注意が必要な食中毒細菌の1つとして挙げられる。大腸菌の菌体抗原(O抗原)を標的とした血清学的な分類法は、菌株の系統グループや病原性を予測するゴールド・スタンダードな手法として現在でも検査室や研究機関で広く利用されている。現在のところ WHO の大腸菌レファレンスセンターであるデンマーク国立血清研究所(Statens Serum Institut: SSI)では、184種類の大腸菌O血清群[3種類の亜型(O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac)と6種類の欠番(O31、O47、O67、O72、O94、O122)を含むO1からO187まで]が定められている。我が国においてEHEC感染症患者から分離される菌株のO血清群はO157、O26、O111が大半を占めるが、それ以外にも多様なO血清群株が確認されている。2007年から2011年にかけて日本で分離されたEHECのO血清群は90種類に上り、その一部は重症化事例からも分離されている。

2011年に病原大腸菌O104による大規模な集団食中毒事例がドイツを中心として発生し、旅行者を含む4,000名以上の感染者と50名以上の死者を出した。O104のゲノム構造は

腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*: EAggEC)が保有する接着遺伝子とEHECが保有する毒素遺伝子、さらに多剤耐性遺伝子を併せ持った「ハイブリッド型」と呼ばれる非常に稀な特徴を持っていた。後の調査で、O104の感染源はサラダなどに利用されるスプラウト(発芽野菜)であると結論づけられた。発生当時、O104の輸入食品や海外渡航者などを介した日本への侵入が懸念されたが、O104はマイナーなO血清群であることから同定試薬もごく一部の機関でしか保有しておらず、遺伝学的な検出法も確立されていなかったことから、国内検査機関の多くはO104を特定する術が無い状況であった。結果としてO104の国内への侵入は確認されなかったが、稀なタイプの病原大腸菌による突発的な事例発生にも対応可能な検査体制を整えておく必要であると考えられた。以上のような状況において、新しいタイプの病原大腸菌の出現や侵入を日常的に監視し、我が国における食の安全を確保する必要があると考えられた。

本研究では、事例報告数は少ないものの散発事例や食品汚染が報告されている、(1) O157、O26、O111以外のEHEC(非典型的EHEC)、(2) 腸管病原性大腸菌(enteropathogenic *E.*

coli: EPEC)、(3) EAggEC に注目した。食品や家畜、ヒトなどのフードチェーンに関わる横断的なサンプルから分離された菌株について遺伝学的な特徴を網羅的に解析し、それらの情報を基に病原大腸菌の食中毒予防・迅速対応に資する情報共有ネットワーク基盤の構築、および実用可能な遺伝学的検査系の開発を目指した。

B. 研究方法

1) 供試菌株

本研究では 2007 年以降に国内で家畜・野生動物糞便、食品、ヒト糞便（下痢症などの有症患者および無症状保菌者を含む）から分離された非典型的 EHEC (542 株)、EPEC (10 株)、EAggEC (32 株) の計 584 株を使用した (表 1)。基本的に一集団事例からは最大 2 株を使用し、一検体からは 1 株のみ (O-genotype が異なる場合は各タイプ 1 株) を使用した。下記の遺伝学的な試験には市販キットなどにより精製した DNA (10ng/ μ l) を使用した。

2) 既知病原関連遺伝子の分布解析

大腸菌でこれまでに報告されている 21 種類の病原関連遺伝子について、供試菌株の遺伝子保有を PCR により調べた。まずは EHEC のマーカー遺伝子である *stx1* (志賀毒素 1 型)、*stx2*

(志賀毒素 2 型)、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f* (*stx2* 亜型 4 種類)、EPEC/EHEC のマーカーである *eae* (Ⅲ型分泌系接着因子インチミン)、EAggEC のマーカーである *aggR* (凝集性付着線毛転写活性因子) について調べた。さらに、*ehxA* (EHEC ヘモリジン)、*elt* (易熱性エンテロトキシン)、*est* (耐熱性エンテロトキシン)、*cdtV* (細胞膨化致死毒素)、*subAB* (サブチラーゼ様細胞毒素)、*astA* (EAggEC 耐熱性毒素)、*ipaH* (組織侵入性因子)、*bfpA* (束状線毛アドヘジン)、*saa* (STEC 自己凝集性アドヘジン)、*iha* (IrgA 類似アドヘジン)、*neuC* (K1 莢膜合成酵素)、*papC* (P 線毛)、*fimA* (I 型線毛) について調べた。加えて、大腸菌であることの確認のために *gyrB* (DNA ジャイレース) の大腸菌特異的配列を標的としたプライマーを使用した。

上記遺伝子を標的としたプライマー配列および反応条件などは表 2 に示す (*gyrB* プライマー配列は未発表の為、詳細は省略する)。PCR には KAPATaq EXtra PCR キット (日本ジェネティクス) を使用した。反応液組成は表 3 に示す。

3) O 血清群の遺伝学的分類

大腸菌 O 血清群の遺伝学的な判定は、162 種類のプライマーセット (表

4) からなる 20 種類のマルチプレックス PCR (*E. coli* O-genotyping PCR) システム (表 5) を用いて行った。なお、研究代表者が開発したプライマー配列については現在未発表の為、詳細は省略する。PCR による増幅およびその産物のサイズは QIAXCEL DNA Screening Kit (キアゲン) またはゲル電気泳動により確認した。増幅が確認された反応液については SSI 参考株を用いた陽性コントロール PCR 産物と並べて再泳動し、増幅サイズの確認を行った。

(倫理への配慮) ヒト由来株については、既に連結不可能匿名化されている情報のみを用いて研究を行った。

C. 研究結果

1) 非典型的 EHEC の病原関連遺伝子プロファイル

非典型的 EHEC について菌株の分離源を、「家畜・野生動物」、「食品」、「ヒト-有症患者」、「ヒト-無症状保菌者」の 4 種類に分けて病原関連遺伝子の保有をまとめた (図 1)。*stx1* 陽性株は家畜・野生動物分離株において 24%であったのに対し、ヒト-有症患者および無症状保菌者分離株ではそれぞれ 60%と 65%であった。一方で *stx2* 陽性株は家畜・野生動物分離株で 86%であったのに対し、ヒト-有症患者お

よび無症状保菌者分離株ではいずれも 45%であった。*eae* はヒト-有症患者分離株において 64%であったのに対し、家畜・野生動物および無症状保菌者分離株ではいずれも 18%であった。家畜・野生動物分離株では *stx2c* および *cdtV* が他の分離源グループと比べて高頻度に確認された。無症状保菌者より分離された EHEC O_g166 (*stx2* および *eae* 陽性) 1 株では毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*: ETEC) のマーカーである *elt* が陽性であった。本研究で使用した EHEC 株の中で *est*、*ipaH*、*bfpA*、*aggR* を保有数する菌株は一株も見られなかった。

stx1、*stx2*、*eae* の保有パターンをみると (表 6)、家畜・野生動物分離株では 153 株中 104 株 (68%) で、食品分離株では 11 株中 10 株 (91%) で *stx2* のみ陽性であった。一方、ヒト-有症患者分離株では 135 株中 51 株 (38%) で *stx1* + *eae* 陽性、ヒト-無症状保菌者分離株では 238 株中 92 株 (38%) で *stx1* のみ陽性であった。*eae* 陽性株は家畜・野生動物分離株で 18% (27/153)、ヒト-無症状保菌者分離株では 18% (42/238) であった。一方、*eae* が陽性のヒト-有症患者分離株は 64% (86/135) であった。

2) 非典型的 EHEC の O-genotype と

保有病原関連遺伝子の特徴

本研究で使用した非典型的 EHEC から 96 種類の O-genotype が確認された (表 7)。さらに 3 種類の混合 O-genotype (Og5/Og75、Og9/OgC14、Og74/Og24) が確認された。判定不能 (O-genotype untypeable : OgUT) は 97 株であった。

家畜・野生動物とヒト・有症患者分離株の両方で確認された O-genotype は、Og5、Og8、Og84、Og88、Og91、Og98、Og103、Og109、Og113、Og115、Og146、Og156、Og163、Og172、Og174、Og177、Og182、OgC10 の 18 種類であった (表 7)。その中で家畜・野生動物とヒト・有症患者分離株間で同じ遺伝子プロファイルが確認されたものは、Og5、Og8、Og91、Og103、Og113、Og156、Og163、Og177、Og182 の 9 種類であった (表 7)。さらに家畜・野生動物と重症 (血便または HUS) 患者分離株間で O-genotype と遺伝子プロファイルが同じものが Og5、Og84、Og103、Og113、Og163、Og177、Og182 の 7 種類でみられた (表 8)。家畜・野生動物とヒト・有症患者分離株の両方で確認された 18 種類の O-genotype 株のうち、*eae* が陽性のものは Og5、Og84、Og98 (一部陰性)、Og103、Og109、Og115 (家畜・野生動物のみ陽性)、Og156、Og172 (ヒト分離株のみ陽性)、

Og177 (一部陰性)、Og182 の 10 種類であった (表 8)。

3) EPEC および EAggEC の O-genotype と病原関連遺伝子プロファイル

EPEC では 7 種類の O-genotype が確認され、OgUT は 2 株であった (表 7)。一方 EPEC では 15 種類の O-genotype が確認され、OgUT は 4 株であった (表 7)。EHEC と共通して確認された EPEC の O-genotype は Og109 のみであった。一方 EHEC と共通して確認された EAggEC の O-genotype は Og86、Og126、Og130、Og131、Og175 の 5 種類であった。EAggEC 全 32 株において、*astA* 陽性は 31%、*iha* 陽性は 38%、*neuC* 陽性は 13%、*fimA* 陽性は 56% であり、残る全ての病原関連遺伝子は陰性であった (データ未掲載)。

D. 考察

本研究から、家畜・野生動物、食品およびヒトより分離された非典型的 EHEC、EAggEC、EPEC の O-genotype およびその病原関連遺伝子プロファイルが明らかとなった。非典型的 EHEC においては、同じ O-genotype 内で同一遺伝子プロファイルを示す菌株が 9 種類の O-genotype で確認された。これらは

それぞれ同一クローンである可能性があり、広く動物・ヒト間で分布（汚染）している可能性が示唆された。詳細な系統関係を明らかにする為には multilocus sequence typing (MLST) やパルスフィールドゲル電気泳動パターン解析が必要であると考えられた。EHEC においては O157、O26、O111 に次いで分離報告数の多い O103 や、*eae* 陰性 EHEC の中で分離報告数の多い Og91 が家畜・野生動物とヒト・有症患者から分離された。ヒトにおいて重症化事例が報告されている O-genotype 株については、その保菌動物や食品への汚染状況について特に注意する必要があると考えられた。

2011 年のドイツ集団事例でみられた EHEC と EAaggEC のハイブリッドタイプは認められなかったが、*stx2*、*eae* そして *elt* を併せ持つ EHEC と ETEC のハイブリッドタイプ株 (Og166 : 無症状保菌者由来) が確認された。

本研究では *E. coli* O-genotyping PCR を用いて 113 種類の O-genotype を確認した。*E. coli* O-genotyping PCR の判定結果と従来の血清学的手法による判定結果との対応については現在評価を進めており、一部を除いて合致することを確認している。判定の簡便性や迅速性そして分類能を考

えると、O-genotyping による分類はヒト病原大腸菌感染症起因菌の追跡や調査を行う際のスクリーニング的手法として有効であると考えられた。

OgUT 株については重症患者由来株を中心に O 抗原合成遺伝子領域の解析を進めている。現在、いくつかの新規 O 抗原合成遺伝子領域の存在を確認しており、その配列情報を元に未定型 O 血清群にも対応した O-genotyping PCR 法の開発に取り組んでいる。この新規 PCR 法を用いることにより、今回の研究で OgUT と判定された菌株の細分類が可能になると予想された。

感染症対策に資する情報として、事例報告数は少ないものの散発事例や食品汚染が報告されている稀なタイプの病原大腸菌についても、O-genotype や病原関連遺伝子保有の詳細を解析しておくことは、汚染状況や今度の動向を把握する上で重要であると考えられた。

E. 結論

家畜・野生動物、食品、ヒトより分離された、流行の恐れがある病原大腸菌の遺伝学的特徴解析を実施した。今後は本研究で得られた結果を基に、情報共有データベースの構築や新規分類手法の開発を行い、継続的な監視システムを構築することが必要である。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1) 井口 純 大腸菌 O 抗原コード領域を標的とした分類手法 "*E. coli* O-genotyping" 第 87 回日本細菌学会総会、2014. 3. 26-28 (東京)

2) 井口 純 *in vitro* および *in silico* による大腸菌 O 血清群の遺伝学的判定法開発の試み 第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014. 2. 1-2 (名古屋)

3) 秋吉 充子、井口 純、伊豫田 淳、勢戸 和子、大西 真 "*E. coli* O-genotyping" の実用性評価 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)

4) 中村 寛海、井口 純、藤原 敦史、伊豫田 淳、長谷 篤、小笠原 準 ウシ由来 STEC の遺伝学的特徴と系統的關係について 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)

5) 井口 純、秋吉 充子、伊豫田 淳、勢戸 和子、大西 真 *E. coli* O-genotyping PCR により判定できな

かった STEC 株の O 抗原コード領域の解析 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)

6) 井口 純、伊豫田 淳、勢戸 和子、大西 真 "*E. coli* O-genotyping PCR" の実用化に向けて 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)

7) 大岡 唯祐、勢戸 和子、河野 喜美子、小林 秀樹、井口 純、他 14 名 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム及びゲノム比較解析 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)

8) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M Development of a DNA-based system for the identification of almost all recognized *E. coli* O serogroups Applied Bioinformatics and Public Health Microbiology 2013, 2013. 5. 15-17(イギリス・ケンブリッジ)

H. 知的財産権の出願

なし

表 1. 供試菌株の種類の種類

	家畜・野生動物	食品	ヒト	計
非典型的 EHEC	153	11	378	542
EPEC	0	1	9	10
EAggEC	0	0	32	32
計	153	12	419	584

表 2. 大腸菌病原関連遺伝子の判定に用いたプライマー配列および反応条件

Target Gene	Primer	Sequence (5'-3')	size (bp)	PCR ^c	Reference
<i>stx1^a</i>	LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348	58-30s	Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG			
<i>stx2^b</i>	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584		Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC			
<i>stx2c</i>	<i>stx2c_F</i>	GCGGTTTTATTGCATTAGT	124	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	<i>stx2c_R</i>	AGTACTCTTTTCCGGCCACT			
<i>stx2d</i>	<i>stx2d-F</i>	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	<i>stx2d-R</i>	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>stx2e</i>	<i>stx2e_F</i>	ATGAAGAAGATGTTTATAGCG	267	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	<i>stx2e_R</i>	TCAGTTAAACTTCACCTGGGC			
<i>stx2f</i>	<i>stx2f_F</i>	AGATTGGGCGTCATTCACTGGTTG	428	53-30s	Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.
	<i>stx2f_R</i>	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC			
<i>ehxA</i>	<i>hlyAF</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	53-30s	Paton and Paton (1998) J. Clin. Microbiol. 36: 598-602
	<i>hlyAR</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	53-30s	Oswald et al (2000) Infec. Immun. 68: 64-71
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG			
<i>elt (lt)</i>	TW20	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	53-30s	Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059
	JW11	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
<i>est (st)</i>	JW14	ATTTTTMTTCTGTATRTCTT	190	53-30s	Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059
	JW7	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>cdtV</i>	<i>cdtV_F</i>	TTCATTGTTGCGCTCCTG	755	53-1m	Cergole-Novella MC et al. (2007), FEMS Microbiol. Lett. 274:329-334
	<i>cdtV_R</i>	TTTATAAGCTGGTATCCTG			
<i>subAB</i>	<i>subAB_F</i>	GTGTACAGGACTCATGG	783	55-1m	Newton HJ et al. (2009) Emerg. Infect. Dis. 15: 372-380
	<i>subAB_R</i>	ATCACCAGTCCACTCAG			
<i>astA</i>	EAST11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	55-30s	Yamamoto and Echeverria. (1996). Infec. Immun. 64: 1441-1445
	EAST11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT			

<i>ipaH</i>	<i>ipaIII</i>	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	600	55-30s	Sethabutr et al. (2000). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 37: 11-16.
	<i>ipaIV</i>	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
<i>bfpA</i>	EP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326	55-30s	Gunzburg et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1375-1377
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>aggR</i>	<i>aggR_F</i>	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	42-30s	Czeczulin et al. (1999). Infec. Immun. 67: 2692-2699
	<i>aggR_R</i>	ATGAAGTAATTCTTGAAT			
<i>saa</i>	SAAD_F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	55-30s	Adrienne W. Paton et al, (2002), J. Clin. Microbiol. 40:271-274
	SAAD_R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>iha</i>	<i>iha-I</i>	CAGTTCAGTTTCGCATTACCC	1,305	55-1m	Schmidt et al (2001) IAI 69: 6863-6873
	<i>iha-II</i>	GTATGGCTCTGATGCGATG			
<i>neuC</i>	<i>neu1</i>	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	60-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	<i>neu2</i>	GGTGGTACATCCCGGGATGTC			
<i>papC</i>	<i>pap1</i>	GACGGCTGTA CTGCAGGGTGTGGCG	328	60-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	<i>pap2</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>fimA</i>	<i>fimA1</i>	CGGCTCTGTCCCTSAGT	500	52-30s	Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376
	<i>fimA2</i>	GTCGCATCCGCATTAGC			
<i>gyrB</i>	<i>gyrB-F</i>		622	55-30s	unpublished data
	<i>gyrB-R</i>				

^a 亜型の検出範囲は *stx1a* および *stx1c* (*stx1d*は検出不可)

^b 亜型の検出範囲は *stx2a*, *2b*, *2c*, *2d*, *2e*, *2g* (*stx2f*は検出不可)

^c アニーリングにおける温度 (°C) と時間 (s : 秒、m : 分) を示す。PCR は (94°C-30 秒、アニーリング、72°C-1 分) を 25 サイクル行った。

表 3. PCR 反応液の組成

	組成 (μl)	最終濃度
PCR grade water	7.475	
5x KAPA Extra Buffer (without Mg ²⁺)	3	
MgCl ₂ (25mM)	1.5	2.5mM
dNTP mix (10mM each dNTP)	0.45	0.3mM
primer F (10 μM)	0.8	0.5 μM
primer R (10 μM)	0.8	0.5 μM
KAPA Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.075	0.4U
Template DNA	1	
total	15 μl	

表 4. O-genotyping に用いた PCR プライマー

O-genotype	Associated O serogroup	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Size (bp)	Reference
Og1	O1	Og1-PCR_F	GTGAGCAAAAGTAAAATAAGGAACG	<i>wzx</i>	1098	Li D. et al. (2010)
		Og1-PCR_R	CGCTGATACGAATACCATCCTAC			
Og3	O3	Og3-PCR_F		<i>wzy</i>	571	unpublished data
		Og3-PCR_R				
Og4	O4	Og4-PCR_F	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	<i>wzx</i>	664	Li D. et al. (2010)
		Og4-PCR_R	AATAATTTGCTATACCCACACCCTC			
Og5	O5	Og5-PCR_F		<i>wzy</i>	566	unpublished data
		Og5-PCR_R				
Og6	O6	Og6-PCR_F	GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC	<i>wzy</i>	783	Li D. et al. (2010)
		Og6-PCR_R	TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC			
Og7	O7	Og7-PCR_F	CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC	<i>wzx</i>	610	Li D. et al. (2010)
		Og7-PCR_R	TGGCTTCGAGATTAACCTATTCT			
Og8	O8	Og8-PCR_F	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	<i>orf469</i>	448	Li D. et al. (2010)
		Og8-PCR_R	GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG			
Og9	O9	Og9-PCR_F		<i>wzt</i>	1235	unpublished data
		Og9-PCR_R				
Og10	O10	Og10-PCR_F		<i>wzy</i>	546	unpublished data
		Og10-PCR_R				
Og11	O11	Og11-PCR_F		<i>wzy</i>	509	unpublished data
		Og11-PCR_R				
Og12	O12	Og12-PCR_F		<i>wzy</i>	885	unpublished data
		Og12-PCR_R				
Og15	O15	Og15-PCR_F		<i>wzy</i>	608	unpublished data
		Og15-PCR_R				
Og16	O16	Og16-PCR_F	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	<i>wzx</i>	302	Li D. et al. (2010)
		Og16-PCR_R	GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG			
Og19	O19	Og19-PCR_F		<i>wzy</i>	389	unpublished data
		Og19-PCR_R				
Og21	O21	Og21-PCR_F	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG	<i>wzx</i>	209	Li D. et al. (2010)
		Og21-PCR_R	TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC			
Og22	O22	Og22-PCR_F	TGTCGCCACTACTTTCCGCGTTTA	<i>wzx</i>	458	Fratamico et al. (2009)
		Og22-PCR_R	AGCCCATGACATTACTACGGCACT			
Og23	O23	Og23-PCR_F		<i>wzy</i>	427	unpublished data
		Og23-PCR_R				

Og24	O24	Og24-PCR_F Og24-PCR_R		wzx	233	unpublished data
Og25	O25	Og25-PCR_F Og25-PCR_R	AGAGATCCGTCTTTTATTGTTTCGC GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	wzy	230	Li D. et al. (2010)
Og26	O26	Og26-PCR_F Og26-PCR_R	GGGGGTGGGTACTATATTGG AGCGCCTATTTCAAGAAAGA	wzx	241	Paddack et al. (2012)
Og27	O27	Og27-PCR_F Og27-PCR_R		wzy	382	unpublished data
Og28ab	O28ab	Og28ab-PCR_F Og28ab-PCR_R		wzy	446	unpublished data
Og29	O29	Og29-PCR_F Og29-PCR_R		wzy	260	unpublished data
Og30	O30	Og30-PCR_F Og30-PCR_R		wzy	894	unpublished data
Og32	O32	Og32-PCR_F Og32-PCR_R		wzy	452	unpublished data
Og33	O33	Og33-PCR_F Og33-PCR_R		wzy	783	unpublished data
Og34	O34	Og34-PCR_F Og34-PCR_R		wzy	247	unpublished data
Og35	O35	Og35-PCR_F Og35-PCR_R		wzy	303	unpublished data
Og36	O36	Og36-PCR_F Og36-PCR_R		wzy	292	unpublished data
Og37	O37	Og37-PCR_F Og37-PCR_R		wzy	683	unpublished data
Og38	O38	Og38-PCR_F Og38-PCR_R		wzy	822	unpublished data
Og39	O39	Og39-PCR_F Og39-PCR_R		wzy	667	unpublished data
Og40	O40	Og40-PCR_F Og40-PCR_R		wzy	1082	unpublished data
Og41	O41	Og41-PCR_F Og41-PCR_R		wzx	942	unpublished data
Og43	O43	Og43-PCR_F Og43-PCR_R		wzy	1041	unpublished data
Og45	O45	Og45-PCR_F		wzy	916	unpublished

		Og45-PCR_R				data
Og48	O48	Og48-PCR_F		wzy	793	unpublished
		Og48-PCR_R				data
Og49	O49	Og49-PCR_F		wzy	789	unpublished
		Og49-PCR_R				data
Og51	O51	Og51-PCR_F		wzy	583	unpublished
		Og51-PCR_R				data
Og52	O52	Og52-PCR_F	TTTGGTCGCAGCGTTAGT	wzm	543	Feng et al.
		Og52-PCR_R	CAACTCGTGGGAAGATGA			(2004)
Og53	O53	Og53-PCR_F		wzy	806	unpublished
		Og53-PCR_R				data
Og54	O54	Og54-PCR_F		wzy	351	unpublished
		Og54-PCR_R				data
Og55	O55	Og55-PCR_F		wzy	207	unpublished
		Og55-PCR_R				data
Og56	O56	Og56-PCR_F		wzx	250	unpublished
		Og56-PCR_R				data
Og58	O58	Og58-PCR_F		wzy	1046	unpublished
		Og58-PCR_R				data
Og59	O59	Og59-PCR_F		wzy	783	unpublished
		Og59-PCR_R				data
Og60	O60	Og60-PCR_F		wzm	443	unpublished
		Og60-PCR_R				data
Og61	O61	Og61-PCR_F		wzy	487	unpublished
		Og61-PCR_R				data
Og63	O63	Og63-PCR_F		wzy	995	unpublished
		Og63-PCR_R				data
Og64	O64	Og64-PCR_F		wzy	727	unpublished
		Og64-PCR_R				data
Og65	O65	Og65-PCR_F		wzy	381	unpublished
		Og65-PCR_R				data
Og66	O66	Og66-PCR_F	GGAGCAAATTAATCCAC	wzy	301	Cheng et al.
		Og66-PCR_R	TCAACACTAAACGAAACG			(2007)
Og69	O69	Og69-PCR_F		wzy	653	unpublished
		Og69-PCR_R				data
Og70	O70	Og70-PCR_F		wzy	393	unpublished
		Og70-PCR_R				data

Og71	071	Og71-PCR_F Og71-PCR_R	GCATTATTAGCCACTTCAA AGCCGTATCATTTAGAGCAGA	wzx	344	Hu et al. (2010)
Og74	074	Og74-PCR_F Og74-PCR_R		wzy	289	unpublished data
Og75	075	Og75-PCR_F Og75-PCR_R	GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT ACCCGATAATCATATTCTTCCAAC	wzy	511	Li D. et al. (2010)
Og76	076	Og76-PCR_F Og76-PCR_R		wzy	457	unpublished data
Og78	078	Og78-PCR_F Og78-PCR_R	GGTATGGGTTTGGTGGTA AGAATCACAACCTCTCGGCA	wzx	992	Liu B et al. (2010)
Og79	079	Og79-PCR_F Og79-PCR_R		wzy	333	unpublished data
Og80	080	Og80-PCR_F Og80-PCR_R		wzy	285	unpublished data
Og81	081	Og81-PCR_F Og81-PCR_R		wzy	329	unpublished data
Og82	082	Og82-PCR_F Og82-PCR_R		wzx	538	unpublished data
Og83	083	Og83-PCR_F Og83-PCR_R	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	wzx	362	Li D. et al. (2010)
Og84	084	Og84-PCR_F Og84-PCR_R		wzx	775	unpublished data
Og85	085	Og85-PCR_F Og85-PCR_R		wzy	388	unpublished data
Og86	086	Og86-PCR_F Og86-PCR_R	GAGTTATTTTGGTTCACCOCTT TAGCCCACCTATGAATAGAGC	wzy	731	Liu B et al. (2010)
Og87	087	Og87-PCR_F Og87-PCR_R		wzy	167	unpublished data
Og88	088	Og88-PCR_F Og88-PCR_R		wzy	781	unpublished data
Og91	091	Og91-PCR_F Og91-PCR_R		wzy	953	unpublished data
Og92	092	Og92-PCR_F Og92-PCR_R		wzt	233	unpublished data
Og93	093	Og93-PCR_F Og93-PCR_R		wzy	229	unpublished data
Og95	095	Og95-PCR_F		wzt	272	

		Og95-PCR_R			unpublished data
Og96	O96	Og96-PCR_F Og96-PCR_R		wzy	938 unpublished data
Og97	O97	Og97-PCR_F Og97-PCR_R		wzt	184 unpublished data
Og98	O98	Og98-PCR_F Og98-PCR_R		wzy	1139 unpublished data
Og99	O99	Og99-PCR_F Og99-PCR_R		wzt	226 unpublished data
Og100	O100	Og100-PCR_F Og100-PCR_R		wzy	1006 unpublished data
Og102	O102	Og102-PCR_F Og102-PCR_R		wzy	1025 unpublished data
Og103	O103	Og103-PCR_F Og103-PCR_R	TAAGTACGGGGTGCTTTTT AAGCTCCCGAGCACGTATAA	wzx	716 Paddock et al. (2012)
Og104	O104	Og104-PCR_F Og104-PCR_R		wzx	993 unpublished data
Og105	O105	Og105-PCR_F Og105-PCR_R		wzy	246 unpublished data
Og108	O108	Og108-PCR_F Og108-PCR_R		wzy	647 unpublished data
Og109	O109	Og109-PCR_F Og109-PCR_R		wzy	409 unpublished data
Og110	O110	Og110-PCR_F Og110-PCR_R		wzy	493 unpublished data
Og111	O111	Og111-PCR_F Og111-PCR_R	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT AACGCAAGACAAGGCAAAAC	wzx	451 Paddock et al. (2012)
Og112ab	O112ab	Og112ab-PCR_F Og112ab-PCR_R		wzy	241 unpublished data
Og112ac	O112ac	Og112ac-PCR_F Og112ac-PCR_R		wzx	1180 unpublished data
Og113	O113	Og113-PCR_F Og113-PCR_R	GCATGTATGATGCATAGCTTCGCC TGATATCGTTCGCTAACCAACCA	wzy	419 DebRoy et al. (2004)
Og114	O114	Og114-PCR_F Og114-PCR_R		wzy	553 unpublished data
Og115	O115	Og115-PCR_F	CGTOGTGATGTGCATTGTTT	wzy	327

		Og115-PCR_R	GCAACACTAAACGCCTCTTT			Wang et al. (2010)
Og116	O116	Og116-PCR_F Og116-PCR_R		wzx	156	unpublished data
Og119	O119	Og119-PCR_F Og119-PCR_R	GTTAACAATCAGCTCGATAAAC TTTGCAAGTAAACACCCTAAAC	wzx	650	Liu B. et al. (2010)
Og120	O120	Og120-PCR_F Og120-PCR_R		wzx	329	unpublished data
Og121	O121	Og121-PCR_F Og121-PCR_R		wzy	193	unpublished data
Og125	O125	Og125-PCR_F Og125-PCR_R		wzy	210	unpublished data
Og126	O126	Og126-PCR_F Og126-PCR_R	ATGGACCTGATAAAGCATCG AACTTAATACGACCGGAAA	wzy	645	Wang et al. (2010)
Og128	O128	Og128-PCR_F Og128-PCR_R	ATGATTTCTTACGGAGTGC CTCTAACCTAATCCCTCCC	wzy	782	Li Y et al. (2006)
Og130	O130	Og130-PCR_F Og130-PCR_R		wzy	944	unpublished data
Og131	O131	Og131-PCR_F Og131-PCR_R		wzy	238	unpublished data
Og132	O132	Og132-PCR_F Og132-PCR_R		wzy	215	unpublished data
Og133	O133	Og133-PCR_F Og133-PCR_R		wzy	1017	unpublished data
Og136	O136	Og136-PCR_F Og136-PCR_R		wzy	210	unpublished data
Og138	O138	Og138-PCR_F Og138-PCR_R		wzy	267	unpublished data
Og139	O139	Og139-PCR_F Og139-PCR_R		wzy	287	unpublished data
Og140	O140	Og140-PCR_F Og140-PCR_R		wzy	409	unpublished data
Og141	O141	Og141-PCR_F Og141-PCR_R		wzy	745	unpublished data
Og142	O142	Og142-PCR_F Og142-PCR_R		wzy	538	unpublished data
Og143	O143	Og143-PCR_F		wzy	500	

		Og143-PCR_R				unpublished data
Og144	O144	Og144-PCR_F		wzx	406	unpublished data
		Og144-PCR_R				data
Og145	O145	Og145-PCR_F		wzy	132	unpublished data
		Og145-PCR_R				data
Og146	O146	Og146-PCR_F		wzx	801	unpublished data
		Og146-PCR_R				data
Og147	O147	Og147-PCR_F	TGGAAATGCTCTCATTCCATTTGCCT	wzy	399	DebRoy et al. (2010)
		Og147-PCR_R	GATGACATTACCCAAACCAGAACC			
Og148	O148	Og148-PCR_F		wzx	865	unpublished data
		Og148-PCR_R				data
Og149	O149	Og149-PCR_F	TTTGGTGCAGATACTCAGA	wzy	709	Han et al. (2007)
		Og149-PCR_R	GAACAATAGATGCGATACAA			
Og150	O150	Og150-PCR_F		wzx	1089	unpublished data
		Og150-PCR_R				data
Og152	O152	Og152-PCR_F		wzy	568	unpublished data
		Og152-PCR_R				data
Og154	O154	Og154-PCR_F		wzx	299	unpublished data
		Og154-PCR_R				data
Og155	O155	Og155-PCR_F		wzy	671	unpublished data
		Og155-PCR_R				data
Og156	O156	Og156-PCR_F		wzy	236	unpublished data
		Og156-PCR_R				data
Og157	O157	Og157-PCR_F	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	<i>rfbE</i>	296	Bertrand et al. (2007)
		Og157-PCR_R	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG			
Og158	O158	Og158-PCR_F		wzy	693	unpublished data
		Og158-PCR_R				data
Og159	O159	Og159-PCR_F		wzy	298	unpublished data
		Og159-PCR_R				data
Og160	O160	Og160-PCR_F		wzx	333	unpublished data
		Og160-PCR_R				data
Og161	O161	Og161-PCR_F		wzx	349	unpublished data
		Og161-PCR_R				data
Og163	O163	Og163-PCR_F		wzy	342	unpublished data
		Og163-PCR_R				data
Og165	O165	Og165_PCR_F		wzx	1042	unpublished

		Og165-PCR_R				data
Og166	O166	Og166-PCR_F		wzy	462	unpublished
		Og166-PCR_R				data
Og167	O167	Og167-PCR_F		wzy	403	unpublished
		Og167-PCR_R				data
Og168	O168	Og168-PCR_F		wzy	282	unpublished
		Og168-PCR_R				data
Og169	O169	Og169-PCR_F		wzx	221	unpublished
		Og169-PCR_R				data
Og170	O170	Og170-PCR_F		wzy	271	unpublished
		Og170-PCR_R				data
Og171	O171	Og171-PCR_F		wzy	212	unpublished
		Og171-PCR_R				data
Og172	O172	Og172-PCR_F		wzx	1108	unpublished
		Og172-PCR_R				data
Og173	O173	Og173-PCR_F	TTCAAAGTGCTCTGGAGGGA	wzy	606	Wang et al.
		Og173-PCR_R	TGGCTGAGACTTGACTATTTT			(2010)
Og174	O174	Og174-PCR_F		wzy	541	unpublished
		Og174-PCR_R				data
Og175	O175	Og175-PCR_F		wzy	690	unpublished
		Og175-PCR_R				data
Og176	O176	Og176-PCR_F		wzy	809	unpublished
		Og176-PCR_R				data
Og177	O177	Og177-PCR_F		wzy	427	unpublished
		Og177-PCR_R				data
Og179	O179	Og179-PCR_F		wzy	608	unpublished
		Og179-PCR_R				data
Og180	O180	Og180-PCR_F		wzy	744	unpublished
		Og180-PCR_R				data
Og181	O181	Og181-PCR_F		wzy	261	unpublished
		Og181-PCR_R				data
Og182	O182	Og182-PCR_F		wzy	510	unpublished
		Og182-PCR_R				data
Og183	O183	Og183-PCR_F		wzx	666	unpublished
		Og183-PCR_R				data
Og184	O184	Og184-PCR_F		wzy	964	unpublished
		Og184-PCR_R				data

Og185	O185	Og185-PCR_F Og185-PCR_R		wzy	254	unpublished data
Og187	O187	Og187-PCR_F Og187-PCR_R		wzy	828	unpublished data
OgC1	O18ab, O18ac	OgC1-PCR_F OgC1-PCR_R	GTTCGGTGGTTGGATTACAGTTAG CTACTATCATCCTCACTGACCACG	wzx	551	Li D. et al. (2010)
OgC2	O20, O137	OgC2-PCR_F OgC2-PCR_R	GGGATAGGTTTATTGTTGCA GTTAGCCATCCACCAAGGTA	wzy	1007	Wang et al. (2010)
OgC3	O28ac, O42	OgC3-PCR_F OgC3-PCR_R	GGTAATACACTTGCTGTGGTGGGT ATGATTGACCATCCAGGCCGTAT	wzx	218	Fratamico et al. (2010)
OgC4	O118, O151	OgC4-PCR_F OgC4-PCR_R	GTGGGAGTCTGAATCAAGTTGCGA AGCAACCTTACCCAATCCTAAGGG	wzy	344	Liu Y et al. (2008)
OgC5	O153, O178	OgC5-PCR_F OgC5-PCR_R		wzy	703	unpublished data
OgC6	O90, O127	OgC6-PCR_F OgC6-PCR_R		wzy	451	unpublished data
OgC7	O124, O164	OgC7-PCR_F OgC7-PCR_R		wzx	270	unpublished data
OgC8	O123, O186	OgC8-PCR_F OgC8-PCR_R		wzy	362	unpublished data
OgC9	O46, O134	OgC9-PCR_F OgC9-PCR_R		wzy	445	unpublished data
OgC10	O2, O50	OgC10-PCR_F OgC10-PCR_R	TGGCCTTGTTGATATACTGCGGA TCACGAGCTGAGCGAAACTGTTCA	wzx	813	Fratamico et al. (2010)
OgC11	O107, O117	OgC11-PCR_F OgC11-PCR_R	TGTTCTCCACTGCGATCATAGGT ACATAGAGTACCCGACACCATCAC	wzy	518	Liu Y et al. (2007)
OgC12	O62, O68	OgC12-PCR_F OgC12-PCR_R		wzy	548	unpublished data
OgC13	O13, O129, O135	OgC13-PCR_F OgC13-PCR_R		wzy	774	unpublished data
OgC14	O89, O101, O162	OgC14-PCR_F OgC14-PCR_R		wzt	198	unpublished data
OgC15	O17, O44, O73, O77, O106	OgC15-PCR_F OgC15-PCR_R		wzy	849	unpublished data