

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 井口 純

平成 27 ( 2015 ) 年 3 月

## 目次

|   |    |
|---|----|
| I. 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<br>その食中毒予防・迅速対応に資する<br>情報ネットワーク基盤構築に関する研究 | 1  |
| (資料1) MP-1+ (プラス) 詳細プロトコール                                      |    |
| (資料2) <i>E. coli</i> O-genotyping PCR 詳細プロトコール                  |    |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表  | 37 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷  | 38 |

## 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 宮崎大学農学部・准教授  
研究協力者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員  
中村 寛海 大阪市立環境科学研究所・研究主任

### 研究要旨

稀な遺伝子型や稀な血清型の病原大腸菌による突発的な事例の発生にも対応可能な検査体制を整えておくことは、感染拡大を防ぐ為の迅速な対応を取る上で必要である。また稀なタイプの病原大腸菌の出現や侵入を含めた動向をモニタリングすることは、我が国における食の安全を確保する上で重要である。本研究では現在のところ事例発生件数は少ないものの、今後流行の恐れがある病原大腸菌に注目し、その遺伝学的特徴の解析と検査体制の整備に向けた研究を行った。地方衛生研究所などの協力により全国各地で家畜、食品、ヒトなどから分離された non-O157, O26, O111 腸管出血性大腸菌(非典型的 EHEC)、腸管病原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌について、O 血清群の遺伝子タイプ (O-genotype) および病原関連遺伝子の保有パターンを確認した。平成 25 年度の研究で実施した 584 株の解析に 233 株を加えた計 817 株を用いた。726 株の非典型的 EHEC から 98 種類の O-genotype が確認されたことにより、その多様性が認められた。一方で、重症者由来株と動物由来株間で同じ病原関連遺伝子保有パターンを示す 10 種類の O-genotype が確認された。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(伝播)している可能性が示唆された。さらに、従来の手法では O-genotype が決定しなかった非典型的 EHEC の O 抗原合成遺伝子領域の解析を行い、5 種類の新規 O-genotype を特定した。それぞれを特異的に判定する PCR 法を開発し、新規 O-genotype 株の汚染実態も明らかとなった。以上の結果は、我が国における EHEC の汚染状況や動向を把握する上での重要な基盤データになる。O-genotype の判定は、菌株間のクローン性(系統的関連性)の推測に有効であり、上述した基盤データと分離菌株の判定結果を基に、その病原因子や分離履歴を推測・照合することが可能となる。さらに事例発生時には原因細菌の汚染源や汚染範囲を特定する為の有効な検査手法になる。本研究では検査体制の整備と継続的な情報収集を目指し、*E. coli* O-genotyping PCR などの遺伝学

的検査法を広く公開し、複数機関で実施できる体制を整備した。

## A. 研究目的

2011年に腸管出血性大腸菌(EHEC) 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。発生当時、輸入食品や海外渡航者などを介したEHEC O104の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抗血清判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。結果として我が国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体制を整えておく必要であると考えられた。

EHECの主要なO血清群はO157、O26、O111(=典型的EHEC)である。これら典型的EHECについては、食品や臨床検体からの効果的な検出・分離法が開発・実用化されており、家畜や食品における汚染実態や分離菌株の遺伝学的特徴についても多くの研究成果が報告されている。一方で、上記以外のO血清群に属するEHEC(=非典型的EHEC)による感染事例も数多く報告されている。重症化事例が比較的多いことから、次に注目されるO血清群としてはO103、O121、O145、O165が挙げられる。さらに上記以外にも80種類を超えるO血清群に属するEHECが我が国で確認されており、その一部は血便やHUSといった重症化事例からも分離されている。このような非典型的EHECの汚染実態やその遺伝学的特徴については研究や調査が一部では進んでいるものの

情報が少ない状況にある。上述したドイツでの集団事例の経験も踏まえ、稀なタイプのEHECであっても汚染実態や事例発生状況を正しく把握し、予防や迅速な対応を行うための検査態勢を整備しておくことは我が国における食の安全や国民の健康を守る上で必要であると考えられる。

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非典型的EHECに注目し、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、『病原因子』と『血清型』の遺伝学的特徴を網羅的に解析し、その情報をデータベース化するとともに、検査現場で実用可能な遺伝学的検査法の整備を行った。志賀毒素産生性の獲得により重症化株への変貌が懸念される腸管病原性大腸菌(EPEC)と腸管凝集付着性大腸菌(EAEC)についても菌株を収集して同様の解析を行い、包括的な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を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

本研究では2006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(726株)、EPEC(14株)、EAEC(77株)の計817株を用いた(表1)。分与元は下記に示す。基本的に一集団事例からは代表株1株(同一集団または同一検体から異なるO-genotype株が分離されている場合は、各タイプ1株)を使用した。非典型的EHEC

を由来源別に見ると、ヒト由来 380 株、ウシ由来 307 株、ウシ以外の動物由来 18 株、食品由来 13 株、由来源不明 8 株であった。分与元：大阪府立公衆衛生研究所、沖縄県衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、北九州市環境科学研究所、さいたま市健康科学研究センター、愛媛県立衛生環境研究所、横浜市衛生研究所、岡崎市保健所、岡山県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、岐阜県保健環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、宮城県保健環境センター、熊本県保健環境科学研究所、熊本市環境総合センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター、香川県環境保健研究センター、佐賀県衛生薬業センター、埼玉県衛生研究所、三重県保健環境研究所、山口県環境保健センター、滋賀県衛生科学センター、鹿児島県環境保健センター、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、静岡県環境衛生科学研究所、静岡市環境保健研究所、石川県保健環境センター、仙台市衛生研究所、千葉県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生試験所、大阪市立環境科学研究所、大分県衛生環境研究センター、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、島根県保健環境科学研究所、東大阪市環境衛生検査センター、徳島県立保健製薬環境センター、奈良県保健研究センター、姫路市環境衛生研究所、富山県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、福島県衛生研究所、北海道立衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、川崎市立井田病院、日本微生物研究所、以上 53 機関。

下記の遺伝学的な試験は、Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ)により精製

した菌株 DNA (10ng/μl) を使用した。

## 2. 既知病原関連遺伝子の分布解析

全株について、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：*stx1* (志賀毒素 1 型)、*stx2* (志賀毒素 2 型、4 種類の亜型：*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*)、*eae* (型分泌系接着因子インチミン)、*aggR* (凝集性付着線毛転写活性因子)、*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* (EAEC 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、遺伝子の保有を PCR により調べた。

本研究で実施した PCR のプライマー配列および反応条件などは表 2 に示す。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-genotype の判定

大腸菌 O 血清群の遺伝学的な判定 (O-genotype) には、我々のグループが厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究 (H24-26、研究代表者：大西真 国立感染症研究所 細菌第一部・部長) で開発した、ほぼ全ての O 血清群を遺伝学的に判定出来る PCR 法 (*E. coli* O-genotyping PCR システム) を用いた。本法は 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キ

ットからなっており(表 4-7)、デンマーク国立血清研究所由来の大腸菌全 O 血清群参考株を用いてその妥当性と特異性が確認されている。PCR による増幅産物は 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、増幅サイズを確認した。

(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 のプロファイル

#### (1) 概要

*stx1*・*stx2*・*eae* の保有パターンを表 8 に示す。ヒト由来株で主要なパターンは *stx1* 単独(30%)、*stx2* 単独(28%)、*stx1+eae*(23%)であるのに対し、ウシ由来株では *stx2* 単独が全体の 68%を占めた。*eae* 保有率はヒト由来株で 41%(157 株)、ウシ由来株で 30%(91 株)であった。*bfpA*、*aggR*、*elt*、*est*、*ipaH* を保有する菌株は、*elt* 保有の 1 株(無症状保菌者由来株)を除いて認められなかった。*E. coli* O-genotyping PCR により 98 種類 O-genotype が確認された。また 145 株では O-genotype が判定出来なかった(OgUT: PCR 産物が得られなかった)。

#### (2) 重症者由来株の特徴

有症者由来 135 株から 42 種類の O-genotype が確認された(表 9)。そのうち血便または溶血性尿毒症症候群を呈した患者(重症者)由来 63 株からは 26 種類の O-genotype が確認された。重症者由来株と同じ O-genotype がウシ由来株

から 16 種類(O5、O28ac/O42、O45、O84、O88、O91、O103、O107/O117、O109、O113、O115、O163、O172、O174、O177、O182)、その他の動物から 3 種類〔ブタ由来株から 1 種類(O177)、シカ由来株から 2 種類(O5 および O141)〕確認された(表 9)。食品由来株(O9、O22、O130、O130、O150)から有症者由来株と共通する O-genotype は確認されなかった。

10 種類の O-genotype では、重症者由来株と同じ病原関連遺伝子保有パターンを示すウシ由来株が確認された(O103、O113、O163、O177、O182、O45、O5、O84、O88、O28ac/O42)(表 10)。そのうち 6 種類(O103、O177、O182、O45、O5、O84)では *eae* が陽性であった。残る 4 種類(O113、O163、O88、O28ac/O42)では *eae* が陰性である一方で *saa* が陽性であった。

### 2. EPEC および EAEC のプロファイル

EPEC では 10 種類の O-genotype(O49、O56、O108、O109、O125、O128、O145、O177、O156、O184)が確認され、OgUT は 3 株であった。一方 EAEC では 22 種類の O-genotype が確認され(O25、O39、O44、O86、O92、O99、O104、O11、O111、O114、O125、O126、O127、O128、O130、O131、O154、O175、O176、O181、O90/O127、O17/O44/O73/O77/O106)。OgUT は 6 株であった。EPEC と EAEC では *astA* がそれぞれ 4 株(29%)と 17 株(22%)で、*iha* がそれぞれ 3 株(21%)と 22 株(29%)で保有が確認された。EPEC の 3 株で *ehx* の保有が確認された。その他 *stx*、*ipaH*、*cdtV*、*subAB*、*saa*、*papC* は EPEC と EAEC の全てで陰性であった。

### 3. 検査キットの開発と実用化

#### (1) MP-1 + ( プラス )

EHEC における主要 7 種類の O 血清群 ( O157、O26、O111 に加え、O103、O121、O145、O165 ) と 3 種類の病原遺伝子 ( *stx1*、*stx2*、*eae* ) を 1 本のチューブで反応・検出できる PCR キットを開発した。さらに、全 O 血清群参考株および対象 O 血清群に属する野生株 ( 各 10 株 ) を用いて特異性の確認を行った。本キットは各機関で自家調整できるように、国立感染症研究所が発表している「EHEC 検査・診断マニュアル」の次回改訂版に掲載する予定である ( 資料 1 )。さらにプライマー配列や反応液組成などを調整し、上記手法の特異性や検出感度を改良した市販 PCR キット「EHEC ( O antigens ) PCR Typing Kit」( タカラバイオ、RR133A ) の開発に協力した。

#### (2) *E. coli* O-genotyping PCR

*E. coli* O-genotyping PCR により得られる O-genotype の同一性は、分離菌株間の系統的関連性をスクリーニングする手法として有効である。

本手法の詳細 ( 資料 2 ) については供試菌株の分与元機関と共有すると同時に、研究室ホームページでも広く公開した ( [http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/iguchi/iguchi\\_lab/O-genotyping.html](http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/iguchi/iguchi_lab/O-genotyping.html) )。さらに、国立感染症研究所・細菌第一部、大阪府公衆衛生研究所・感染症部、動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域の 3 機関には *E. coli* O-genotyping PCR を行う為の全プライマーセットおよび全 O 血清群参考株の陽性コントロール DNA を配布し、それぞれの機関で行われている家畜や食品、ヒト患者から分離される病原大腸菌の調査・研究での試験的実用を開始した。

### 4. 新規 O-genotype の発見と PCR 検査法の開発

重症者から分離された非典型的 EHEC で、O-genotype が判定不能だった 5 株について、O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列を決定して解析した。その結果、それぞれの O 血清群に対して特異性が高いとされる *wzx* ( O 抗原ユニット輸送タンパク ) および *wzy* ( O 抗原合成タンパク ) 遺伝子の塩基配列相同性が既知のものに対して 50% 以下であり、それぞれが新規の O-genotype として判断された ( ON3、ON6、ON8、ON10、ON31 )。新規 O-genotype を特異的に検出できる PCR 法を開発し、O-genotype が判定不能だった 145 株について確認したところ、ON3 が 11 株、ON6 が 8 株、ON8 が 28 株、ON10 が 6 株、ON31 が 4 株確認された。( 新規 O-genotype の配列情報および PCR プライマー配列は未発表のため、本報告では省略する )。そのうち 4 種類の O-genotype ( ON3、ON6、ON8、ON10 ) ではウシ糞便由来株を含んでいた。中でも ON8 はウシ由来株の中で O113 ( 55 株 ) の次に多いタイプとなった。

#### D. 考察

本研究では家畜・野生動物、食品およびヒトより分離された非典型的 EHEC、EAEC、EPEC からなる計 800 株以上の 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。合計 113 種類の O-genotype が確認されたことにより、その多様性が認められた一方で、同一 O-genotype 株の分布とそれぞれが保有する病原遺伝子のパターンも明らかとなった。非典型的 EHEC においては、重症者由来株と同

じ O-genotype がウシやその他動物由来株から 17 種類が確認された。さらにそれぞれの O-genotype 内で重症者由来株と同一遺伝子プロファイルを示すウシやその他動物由来株が 10 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(伝播)している可能性が示唆された。重症者から分離された 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。株間の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。

本研究で使用した菌株の中に 2011 年のドイツ集団事例でみられた EHEC と EAEC 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 (O166: 無症状保菌者由来) が確認された。

*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が確認されている。判定の簡便性や迅速性そして分類能を考えると、O-genotyping による分類は病原大腸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 株については重症者由来株を中心に O 抗原合成遺伝子領域の解析を行い、5 種類の新規 O-genotype を確認した。その配列情報を基にそれぞれの O-genotype を識別する PCR 法を開発し、その汚染実態も明らかとなった。中でも ON8 はウシ糞便や食品から広く分離されており、広く動物-ヒト間で分布(伝播)している

可能性が示唆された。残る OgUT 株についても O 抗原合成遺伝子領域の解析を進め、新規 O-genotype であった場合にはその判定法を順次開発する予定である。

本研究により、非典型的 EHEC を中心とする病原大腸菌の遺伝学的特徴が明らかとなった。これら情報は我が国における EHEC の汚染状況や動向を把握する上での基盤データセットになると考えられた。

## E. 結論

家畜・野生動物、食品、ヒトより分離された病原大腸菌の遺伝学的特徴とその汚染状況を明らかにした。さらに大腸菌の O 血清群を遺伝学的に判定出来る手法 (*E. coli* O-genotyping PCR など) を整備し、広く情報を公開した。以上の成果は、流行の恐れがある病原大腸菌の汚染状況を把握すると共に、事例発生時の迅速な対応をサポートする有効な手法になると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) **Iguchi A**, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* (in press)
- 2) **Iguchi A**, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. (2015) A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22(1):101-7
- 3) Mekata H, **Iguchi A**, Kawano K, Kirino Y,



Kobayashi I, Misawa N. (2014) Identification of O-serotypes, -genotypes and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of food protection* 8: 1269-1274

4) von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, **Iguchi A**, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with significant long-term global distribution. *Nature Genetics* 46(12):1321-1326

#### 学会発表

1) **井口純**、同種内の細分類に利用されるゲノム多型、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)

2) 秋吉充子、**井口純**、*E. coli* と *Shigella* 間で見られる O 抗原合成遺伝子領域の共通性、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)

3) 伊豫田淳、**井口純**、斉藤剛仁、勢戸和子、磯部順子、石原朋子、石島希、EHEC Working Group、大西真、血清診断法と *E. coli* O-genotyping PCR 法による HUS 患者由来 EHEC O76:H7 の分離、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)

4) 石原朋子、伊豫田淳、**井口純**、大西真、日本における健常者由来腸管出血性大腸菌の解析、第 88 回日本細菌学会総会、2015. 3. 26-28 (岐阜市)

5) **Iguchi A**, A complete view of the genetic diversity of the *E. coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. International Workshop on Emerging Approaches for Typing, Detection, and Characterization of *Escherichia coli*. 2015 3. 9-10 (アメリカ・ペンシルベニア州立大学)

6) **井口純**、細菌ゲノム研究のフロンティア、第 7 回日本暖地畜産学会、2014. 10. 26 (宮崎市)

7) **井口純**、秋吉充子、吉崎美和、EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)

8) 秋吉充子、加藤結子、中村寛海、**井口純**、O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)

9) 加藤結子、大畠律子、河合央博、西本清仁、佐々木麻里、成松浩志、秋吉充子、中嶋洋、緒方喜久代、伊豫田淳、石原朋子、大西真、**井口純**、ウシ由来 STEC の O-genotype を含めた遺伝学的特徴解析、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)

10) **井口純**、中村寛海、O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014. 7. 15-16 (京都市)

G. 知的財産権の出願

なし

表 1. 供試菌株の種類

| 分離源     | EHEC | EPEC | EAEC |
|---------|------|------|------|
| ヒト      | 380  | 9    | 77   |
| ウシ      | 307  | 4    | 0    |
| ウシ以外の動物 | 18   | 1    | 0    |
| 食品      | 13   | 0    | 0    |
| 不明      | 8    | 0    | 0    |
| Total   | 726  | 14   | 77   |

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 <sup>c</sup> | Reference   |
|-------------------------|---------|-------------------------------|-----------|------------------|---|
| <i>stx1<sup>a</sup></i> | LP30    | CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG         | 348       | 58-30s           | Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250                 |
|                         | LP31    | CACCAGACAATGTAACCGCTG         |           |                  |   |
| <i>stx2<sup>b</sup></i> | LP43    | ATCCTATTCGGGAGTTTACG          | 584       |                  | Cebula et al (1996) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250                 |
|                         | LP44    | GCGTCATCGTATACACAGGAGC        |           |                  |   |
| <i>stx2c</i>            | stx2c_F | GCGGTTTTATTTGCATTAGT          | 124       | 53-30s           | Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.                   |
|                         | stx2c_R | AGTACTCTTTCCGGCCACT           |           |                  |   |
| <i>stx2d</i>            | stx2d-F | GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT      | 175       | 53-30s           | Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.                   |
|                         | stx2d-R | CAGCAAATCCTGAACCTGACG         |           |                  |   |
| <i>stx2e</i>            | stx2e_F | ATGAAGAAGATGTTTATAGCG         | 267       | 53-30s           | Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.                   |
|                         | stx2e_R | TCAGTTAACTTCACCTGGGC          |           |                  |   |
| <i>stx2f</i>            | stx2f_F | AGATTGGGCGTCATTCCTGGTTG       | 428       | 53-30s           | Osek et al (2003) J Appl Microbiol 95, 1217-1225.                   |
|                         | stx2f_R | TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC      |           |                  |   |
| <i>ehxA</i>             | hlyAF   | GCATCATCAAGCGTACGTTCC         | 534       | 53-30s           | Paton and Paton (1998) J. Clin. Microbiol. 36: 598-602              |
|                         | hlyAR   | 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    | GCGACAGATTATACCGTGC           | 450       | 53-30s           | Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059        |
|                         | JW11    | CGGTCTCTATATCCCTGTT           |           |                  |   |
| <i>est (st)</i>         | JW14    | ATTTTMTTCTGTATTRCTT           | 190       | 53-30s           | Stacy-Phipps et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1054-1059        |
|                         | JW7     | CACCCGGTACARGCAGGATT          |           |                  |   |
| <i>cdtV</i>             | cdtV_F  | TTCATTGTTGCGCTCCTG            | 755       | 53-1m            | Cergole-Novella MC et al. (2007), FEMS Microbiol. Lett. 274:329-334 |
|                         | cdtV_R  | TTTATAAGCTGGTATCCTG           |           |                  |   |
| <i>subAB</i>            | subAB_F | GTGTACAGGACTCATGG             | 783       | 55-1m            | Newton HJ et al. (2009) Emerg. Infect. Dis. 15: 372-380             |
|                         | subAB_R | ATCACCAGTCCACTCAG             |           |                  |   |
| <i>astA</i>             | EAST11a | CCATCAACACAGTATATCCGA         | 111       | 55-30s           | Yamamoto and Echeverria. (1996). Infec. Immun. 64: 1441-1445        |
|                         | EAST11b | GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT         |           |                  |   |
| <i>ipaH</i>             | ipalIII | GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC | 600       | 55-30s           | Sethabutr et al. (2000). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 37: 11-16.  |
|                         | ipalIV  | GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC    |           |                  |   |

|             |        |                           |       |        |   |
|-------------|--------|---------------------------|-------|--------|---|
| <i>bfpA</i> | EP1    | AATGGTGCTTGGCGCTTGCTGC    | 326   | 55-30s | Gunzburg et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33: 1375-1377        |
|             | EP2    | GCCGCTTTATCCAACCTGGTA     |       |        |   |
| <i>aggR</i> | aggR_F | CTAATTGTACAATCGATGTA      | 308   | 42-30s | Czeczulin et al. (1999). Infec. Immun. 67: 2692-2699            |
|             | aggR_R | 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>  | iha-I  | CAGTTCAGTTTCGCATTACCC     | 1,305 | 55-1m  | Schmidt et al (2001) IAI 69: 6863-6873                          |
|             | iha-II | GTATGGCTCTGATGCGATG       |       |        |   |
| <i>neuC</i> | neu1   | AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG    | 676   | 60-30s | Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376 |
|             | neu2   | GGTGGTACATCCCGGGATGTC     |       |        |   |
| <i>papC</i> | pap1   | GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG | 328   | 60-30s | Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376 |
|             | pap2   | ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA |       |        |   |
| <i>fimA</i> | fimA1  | CGGCTCTGTCCCTSAGT         | 500   | 52-30s | Moulin-Schouleur et al (2007) J. Clin. Microbiol. 45: 3360-3376 |
|             | fimA2  | GTCGCATCCGCATTAGC         |       |        |   |

<sup>a</sup> 亜型の検出範囲は *stx1a* および *stx1c* (*stx1d* は検出不可)

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

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

表 3. 大腸菌病原関連遺伝子 PCR の反応液組成

|  | 組成 ( $\mu$ l ) | 最終濃度        |
|--|----------------|-------------|
| PCR grade water                                  | 7.475          |             |
| 5x KAPA Extra Buffer (without Mg <sup>2+</sup> ) | 3              |             |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)                         | 1.5            | 2.5mM       |
| dNTP mix (10mM each dNTP)                        | 0.45           | 0.3mM       |
| primer F (10 $\mu$ M)                            | 0.8            | 0.5 $\mu$ M |
| primer R (10 $\mu$ M)                            | 0.8            | 0.5 $\mu$ M |
| KAPA Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)            | 0.075          | 0.4U        |
| Template DNA                                     | 1              |             |
| total  | 15 $\mu$ l     |             |

表 4. *E. coli* O-genotyping PCR に用いたプライマーの配列など

| O-genotype | 関連する O 血清群 | 標的遺伝子         | プライマー名     | プライマー配列 (5'-3')            | サイズ (bp) | 参照                                      |
|------------|------------|---------------|------------|----------------------------|----------|---|
| Og1        | O1         | <i>wzx</i>    | Og1-PCR_F  | GTGAGCAAAAGTGAATAAGGAACG   | 1098     | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og1-PCR_R  | CGCTGATACGAATACCATCCTAC    |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og3        | O3         | <i>wzy</i>    | Og3-PCR_F  | GAATGAGTGCCACAATGGCTA      | 571      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og3-PCR_R  | GCAGAAAGAATGGACACGCAT      |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og4        | O4         | <i>wzx</i>    | Og4-PCR_F  | TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC   | 664      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og4-PCR_R  | AATAATTTGCTATACCCACACCCCTC |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og5        | O5         | <i>wzy</i>    | Og5-PCR_F  | AGGGCAATCTTCCGTAATGA       | 566      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og5-PCR_R  | CCTCTGGGCTATAAACCAACC      |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og6        | O6         | <i>wzy</i>    | Og6-PCR_F  | GGATGACGATGTGATTTGGCTAAC   | 783      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og6-PCR_R  | TCTGGGTTTGTGTGTATGAGGC     |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og7        | O7         | <i>wzx</i>    | Og7-PCR_F  | CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC  | 610      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og7-PCR_R  | TGGCTTCGAGATTAACCTATTCT    |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og8        | O8         | <i>orf469</i> | Og8-PCR_F  | CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG  | 448      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og8-PCR_R  | GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG  |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og9        | O9         | <i>wzt</i>    | Og9-PCR_F  | CGTCGGCAAGCGTATAAATA       | 1235     | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og9-PCR_R  | CCCAGAAATCCATGCTC          |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og10       | O10        | <i>wzy</i>    | Og10-PCR_F | GCTGGAGTTGCAGGTGCTATA      | 546      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og10-PCR_R | AAGGGGCAGGAATGGAAGTA       |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og11       | O11        | <i>wzy</i>    | Og11-PCR_F | ATTAATGGGGCCAGATGGAGT      | 509      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og11-PCR_R | ATTGCGCTGGGATGAATACA       |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og12       | O12        | <i>wzy</i>    | Og12-PCR_F | CAATGGGGTTGTCGTATCAAA      | 885      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og12-PCR_R | AAAAATGCCCATAGGACCA        |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og15       | O15        | <i>wzy</i>    | Og15-PCR_F | TGGCAATGGATTGGTATCT        | 608      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og15-PCR_R | AGGGAAGAACCCTCTCTAA        |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og16       | O16        | <i>wzx</i>    | Og16-PCR_F | GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG   | 302      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og16-PCR_R | GTTAGAGGATAATAGCCAAGCGG    |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og19       | O19        | <i>wzy</i>    | Og19-PCR_F | ATAAGCGCGAGCTTAGCTCTT      | 389      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og19-PCR_R | CACAACACGGCGCTAAGTAAA      |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og21       | O21        | <i>wzx</i>    | Og21-PCR_F | CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG   | 209      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og21-PCR_R | TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC   |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |
| Og22       | O22        | <i>wzx</i>    | Og22-PCR_F | TGTCGCCACTACTTTCCGCGTTTA   | 458      | Fratamico PM. et al.                    |
|            |            |               | Og22-PCR_R | AGCCCATGACATTACTACGGCACT   |          | Food Analytical Methods. 2009 2:169-179 |
| Og23       | O23        | <i>wzy</i>    | Og23-PCR_F | TCGTGGTAATGGAGGAGATG       | 427      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og23-PCR_R | TGCCTTCTCGGCTCTGTATA       |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og24       | O24        | <i>wzx</i>    | Og24-PCR_F | TGGGATTTATGCGGTTGCTT       | 233      | Iguchi A. et al.                        |
|            |            |               | Og24-PCR_R | TGCGAGAAGAGGAGTAGTCGA      |          | J Clin Microbiol. 2015 accepted         |
| Og25       | O25        | <i>wzy</i>    | Og25-PCR_F | AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCCG  | 230      | Li D. et al.                            |
|            |            |               | Og25-PCR_R | GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC  |          | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7       |

|        |       |     |              |                       |      |                                 |
|--------|-------|-----|--------------|-----------------------|------|---------------------------------|
| Og26   | O26   | wzx | Og26-PCR_F   | GGGGTGGGTACTATATTGG   | 241  | Paddock Z. et al.               |
|        |       |     | Og26-PCR_R   | AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA |      | Vet Microbiol. 2012 156:381-8   |
| Og27   | O27   | wzy | Og27-PCR_F   | AACCTATGGGAAGCTCTGGA  | 382  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og27-PCR_R   | ACACACAGGCAACAACATCGA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og28ab | O28ab | wzy | Og28ab-PCR_F | AAGCGCAGTGGATCTCGTT   | 446  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og28ab-PCR_R | ACCACCATGCGCATAGTAAT  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og29   | O29   | wzy | Og29-PCR_F   | TGCTCCCTGCTGGTGGTTATA | 260  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og29-PCR_R   | TAGTCAAGCCTGGTCTAAT   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og30   | O30   | wzy | Og30-PCR_F   | GAATGGGAGGGATATCAGAA  | 894  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og30-PCR_R   | TTGCGCTACCCTGAATAGCAT |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og32   | O32   | wzy | Og32-PCR_F   | TCCCAACCTGTTGCTTTAA   | 452  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og32-PCR_R   | CAGCCAGACCAGTAGAGGAAA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og33   | O33   | wzy | Og33-PCR_F   | GGGGCTGGTGTGTTATTAT   | 783  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og33-PCR_R   | TCACCTACGACCAATGCAGAA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og34   | O34   | wzy | Og34-PCR_F   | TGCTTCTGGGGGAGTTTA    | 247  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og34-PCR_R   | AATGGCATATTCGTGCCATC  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og35   | O35   | wzy | Og35-PCR_F   | TGCAGGTGCTCAATTGGTT   | 303  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og35-PCR_R   | CCATCCAAATACGGAGCAATT |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og36   | O36   | wzy | Og36-PCR_F   | AATCCCAGGGATGGTTATCA  | 292  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og36-PCR_R   | TATAGAGAATGGCACACGCTG |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og37   | O37   | wzy | Og37-PCR_F   | TTCGCCCTGAAGGAGAATT   | 683  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og37-PCR_R   | TTATGCGCTCCCATCCAA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og38   | O38   | wzy | Og38-PCR_F   | TCGCCATTGTTACCCAGT    | 822  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og38-PCR_R   | ATTCGAAAGTGCTGGAAAG   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og39   | O39   | wzy | Og39-PCR_F   | GGATGGAGCGGAATACTGATT | 667  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og39-PCR_R   | CAAACCAACCGGCATAATA   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og40   | O40   | wzy | Og40-PCR_F   | ACGGTAATAGCTTAGGGCAA  | 1082 | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og40-PCR_R   | CGAGCTACCCAATATGCTGCT |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og41   | O41   | wzx | Og41-PCR_F   | TGGATCGCTGTTATTGG     | 942  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og41-PCR_R   | CGCCACCCCTTGTATATAAA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og43   | O43   | wzy | Og43-PCR_F   | TTTTGGTGCAACTTGCAT    | 1041 | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og43-PCR_R   | GCTTTACCCATTGTAGCGAA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og45   | O45   | wzy | Og45-PCR_F   | GTCCCCAGGGTTGTGTATG   | 916  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og45-PCR_R   | AATAAGGGAGCCCGCAT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og48   | O48   | wzy | Og48-PCR_F   | TATGGTCTGCTTTCTCCAA   | 793  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og48-PCR_R   | AGGAATTGCAGTTGTTCCGA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og49   | O49   | wzy | Og49-PCR_F   | AGTTGCCTTTCTTGGGTGA   | 789  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og49-PCR_R   | TCGTATCCAATTAAGCCAGCC |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og51   | O51   | wzy | Og51-PCR_F   | CCATGAGGGAAACAATGTTG  | 583  | Iguchi A. et al.                |
|        |       |     | Og51-PCR_R   | TTTTCCCTTGCTCTCGATA   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted |
| Og52   | O52   | wzm | Og52-PCR_F   | TTTGGTCGACGTTAGT      | 543  | Feng L. et al.                  |

|      |     |     |            |                           |      |   |
|------|-----|-----|------------|---------------------------|------|---|
|      |     |     | Og52-PCR_R | CAACTCGTGGGAAGATGA        |      | J Bacteriol. 2004 186:4510-9.             |
| Og53 | O53 | wzy | Og53-PCR_F | AAGCTCAAGGGGCATGTTTT      | 806  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og53-PCR_R | TTCCCCTAACCCCTGCACATA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og54 | O54 | wzy | Og54-PCR_F | TGGCAATATATGCGTTTGTGA     | 351  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og54-PCR_R | TGTGGACCACGTCCAACCTC      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og55 | O55 | wzy | Og55-PCR_F | TCCTTATTTGTGTCGGGGG       | 207  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og55-PCR_R | CCAGGAAAGCTGCCAATTATC     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og56 | O56 | wzx | Og56-PCR_F | CTTGGGGTTTGAAGTTGGAT      | 250  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og56-PCR_R | TGCTAATAACAATGCGCCTG      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og58 | O58 | wzy | Og58-PCR_F | TAGGTGCAAGTCCTATGTGGG     | 1046 | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og58-PCR_R | TAGCCTGGCAGCACAGAGTTT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og59 | O59 | wzy | Og59-PCR_F | TGATCCAGCGGGTGAATATT      | 783  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og59-PCR_R | ACACCTGGGTTGAACCTCTCCA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og60 | O60 | wzm | Og60-PCR_F | TAGGTGCGGCATGGCTAATAT     | 443  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og60-PCR_R | GAATTGGCCAACATCACGAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og61 | O61 | wzy | Og61-PCR_F | ATCTCAGACCGTCCGGATATT     | 487  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og61-PCR_R | GCATCGAACCGGGGCTATA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og63 | O63 | wzy | Og63-PCR_F | ATTCGGTGCTGCTGGAATTA      | 995  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og63-PCR_R | TGAACATTATGCCACCGATG      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og64 | O64 | wzy | Og64-PCR_F | TGGCAATACAAGTCTGATGC      | 727  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og64-PCR_R | AGGGCGTTACCGGATAGAAAT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og65 | O65 | wzy | Og65-PCR_F | TGTTGGCGCTGGTTTTATGTT     | 381  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og65-PCR_R | CCCATAATTGCACCCGATAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og66 | O66 | wzy | Og66-PCR_F | CGAGCAAATTAATCCAC         | 301  | Cheng J. et al.                           |
|      |     |     | Og66-PCR_R | TCAACACTAAACGAAACG        |      | J Microbiol. 2007 45:69-74.               |
| Og69 | O69 | wzy | Og69-PCR_F | ACCTGGCTTTGGAGTTGATGA     | 653  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og69-PCR_R | TAGCCAATGGTAGTCGACCAA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og70 | O70 | wzy | Og70-PCR_F | CTTGCAAAGGCACAAATCT       | 393  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og70-PCR_R | CCTTCCGTCTGCCAATAAAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og71 | O71 | wzx | Og71-PCR_F | GCATTATTAGCCACTCAA        | 344  | Hu B. et al.                              |
|      |     |     | Og71-PCR_R | AGCCGTATCATTAGAGCAGA      |      | FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 59:161-9 |
| Og74 | O74 | wzy | Og74-PCR_F | TCCAAAGGTGATATGTTGGCA     | 289  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og74-PCR_R | TATGCGCAGGAAAGTCAATG      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og75 | O75 | wzy | Og75-PCR_F | GAGATATACATGGGAGGTAGGCT   | 511  | Li D. et al.                              |
|      |     |     | Og75-PCR_R | ACCCGATAATCATATTCTTCCCAAC |      | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7         |
| Og76 | O76 | wzy | Og76-PCR_F | TGGCTTTTATGGCGATATGTG     | 457  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og76-PCR_R | TTGTGAGTATAAGCCCCCAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |
| Og78 | O78 | wzx | Og78-PCR_F | GGTATGGGTTTGGTGGTA        | 992  | Liu B. et al.                             |
|      |     |     | Og78-PCR_R | AGAATCACAACTCTCGGCA       |      | Vet Microbiol. 2010 142:373-8             |
| Og79 | O79 | wzy | Og79-PCR_F | AAATGGTCGTGACGCGAAA       | 333  | Iguchi A. et al.                          |
|      |     |     | Og79-PCR_R | TTGTCTGTACGCCCTGAAAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted           |

|       |      |            |             |                           |      |                                   |
|-------|------|------------|-------------|---------------------------|------|-----------------------------------|
| Og80  | O80  | <i>wzy</i> | Og80-PCR_F  | TGGTGTGATTCCACTAGCGT      | 285  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og80-PCR_R  | CGAGAGTACCTGGTTCCCAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og81  | O81  | <i>wzy</i> | Og81-PCR_F  | TGGTAGGTTTGGTGGTGAAT      | 329  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og81-PCR_R  | GGACGGATGACAAATGCGATA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og82  | O82  | <i>wzx</i> | Og82-PCR_F  | TCCCTATTTAACCGGGTCT       | 538  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og82-PCR_R  | TGAATCCCTAAAACCTCGGCTT    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og83  | O83  | <i>wzx</i> | Og83-PCR_F  | GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG   | 362  | Li D. et al.                      |
|       |      |            | Og83-PCR_R  | TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC |      | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7 |
| Og84  | O84  | <i>wzx</i> | Og84-PCR_F  | GTTGGCATATCAATTGGGGTT     | 775  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og84-PCR_R  | CGTTCCAAGAAGCACTCCAGT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og85  | O85  | <i>wzy</i> | Og85-PCR_F  | TTCGGAGGAGATCTCGATGT      | 388  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og85-PCR_R  | TTCCATCATTCCCAGCTTGT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og86  | O86  | <i>wzy</i> | Og86-PCR_F  | GAGTTATTTGGTTCACCTT       | 731  | Liu B. et al.                     |
|       |      |            | Og86-PCR_R  | TAGCCCACCTATGAATAGAGC     |      | Vet Microbiol. 2010 142:373-8     |
| Og87  | O87  | <i>wzy</i> | Og87-PCR_F  | GGATGAATGGGGAAAAGCAA      | 167  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og87-PCR_R  | TCACGCGTAAATCTTCAATCC     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og88  | O88  | <i>wzy</i> | Og88-PCR_F  | CTGCGCTTGGAGCATTCTAT      | 781  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og88-PCR_R  | GGCGGAAACTTTCATATGC       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og91  | O91  | <i>wzy</i> | Og91-PCR_F  | GCCTGCGATACCAGTATCCTT     | 953  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og91-PCR_R  | CCCCATAATTGGGATCATAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og92  | O92  | <i>wzt</i> | Og92-PCR_F  | TATTCGCGTGAATGCTCTT       | 233  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og92-PCR_R  | CAACGGGCTCTTCCATAAA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og93  | O93  | <i>wzy</i> | Og93-PCR_F  | AAAGTGCCGATATGCGAA        | 229  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og93-PCR_R  | CCACATAAGCTTGAGTTGCGT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og95  | O95  | <i>wzt</i> | Og95-PCR_F  | ATGCTCCATTCTTGTCTGC       | 272  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og95-PCR_R  | AACAGCCAAAGCTTCGTCGAT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og96  | O96  | <i>wzy</i> | Og96-PCR_F  | TTAGGAGGTTTCAAAGCGG       | 938  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og96-PCR_R  | TGGTATCGGAATGCATTGCT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og97  | O97  | <i>wzt</i> | Og97-PCR_F  | AGGCAGATCGTCCACAGTCA      | 184  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og97-PCR_R  | ACAGGATAAATGCCAGCCAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og98  | O98  | <i>wzy</i> | Og98-PCR_F  | TCCAGGCAAATGCAAGTCTT      | 1139 | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og98-PCR_R  | TGCTGTTGTCTTGGAGGATA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og99  | O99  | <i>wzt</i> | Og99-PCR_F  | TATCGTCCCGCATTCTTA        | 226  | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og99-PCR_R  | ATAGCGGCGATCTAAAGGGAT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og100 | O100 | <i>wzy</i> | Og100-PCR_F | TATGGGGGGCGAATTAGGTAT     | 1006 | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og100-PCR_R | ACCTGCCAGGACGAAAGAAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og102 | O102 | <i>wzy</i> | Og102-PCR_F | TCCGGTAAGTATCTTACGGCA     | 1025 | Iguchi A. et al.                  |
|       |      |            | Og102-PCR_R | GCACCAAATAGCGAAATACCA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted   |
| Og103 | O103 | <i>wzx</i> | Og103-PCR_F | TAAGTACGGGGTGCTTTTTT      | 716  | Paddack Z. et al.                 |
|       |      |            | Og103-PCR_R | AAGCTCCCAGCAGCTATAA       |      | Vet Microbiol. 2012 156:381-8     |
| Og104 | O104 | <i>wzx</i> | Og104-PCR_F | AAGGCAGTAGCACGTTTAGCC     | 993  | Iguchi A. et al.                  |

|         |        |     |               |                          |      |  |
|---------|--------|-----|---------------|--------------------------|------|--|
|         |        |     | Og104-PCR_R   | AATAGCTGCGCCTAAAGCTGA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og105   | O105   | wzy | Og105-PCR_F   | GCTGTTGGTATTGCTTTTTGG    | 246  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og105-PCR_R   | TGCGCTGCCACTTAAATCAA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og108   | O108   | wzy | Og108-PCR_F   | AGCTTCCTGTCTACGGTTGA     | 647  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og108-PCR_R   | CCATCCCATCACCAAATTGA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og109   | O109   | wzy | Og109-PCR_F   | GGATAATGGGGTGGTTTTT      | 409  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og109-PCR_R   | GCTTCCCATCCTTGCAGATAT    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og110   | O110   | wzy | Og110-PCR_F   | CCTTGGATAGGAGCGTTTAT     | 493  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og110-PCR_R   | ACAACCAAAGCCCGTTATCA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og111   | O111   | wzx | Og111-PCR_F   | CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT     | 451  | Paddack Z. et al.                      |
|         |        |     | Og111-PCR_R   | AACGCAAGACAAGGCAAAAC     |      | Vet Microbiol. 2012 156:381-8          |
| Og112ab | O112ab | wzy | Og112ab-PCR_F | CGGGTTAACAGCCCATTTTT     | 241  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og112ab-PCR_R | CAGCCCCCATTTACCAGTAAT    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og112ac | O112ac | wzx | Og112ac-PCR_F | CTGTCCTTTTGCGCGAATTA     | 1180 | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og112ac-PCR_R | AAATCCCAGAGCAAGGGTAGA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og113   | O113   | wzy | Og113-PCR_F   | GCATGTATGATGCATAGCTTCGCC | 419  | DebRoy C. et al.                       |
|         |        |     | Og113-PCR_R   | TGATATCGTTGCTAACCACCCA   |      | Appl Environ Microbiol. 2004 70:1830-2 |
| Og114   | O114   | wzy | Og114-PCR_F   | TCCAAGCCCATTTATTTGG      | 553  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og114-PCR_R   | TCTGATGCTGGCATCACACTC    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og115   | O115   | wzy | Og115-PCR_F   | CGTCGTGATGTGCATTGTTT     | 327  | Wang Q. et al.                         |
|         |        |     | Og115-PCR_R   | GCAACTAAACGCCTCTTT       |      | Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.       |
| Og116   | O116   | wzx | Og116-PCR_F   | TCCTGCAATGACACTGACGAA    | 156  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og116-PCR_R   | ATAATCCCAATACCGCCAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og119   | O119   | wzx | Og119-PCR_F   | GTTAACAATCAGCTCGATAAAC   | 650  | Liu B. et al.                          |
|         |        |     | Og119-PCR_R   | TTTGCAAGTAAACACCCTAAAC   |      | Vet Microbiol. 2010 142:373-8          |
| Og120   | O120   | wzx | Og120-PCR_F   | TATGGGAGTGGGTTATGCA      | 329  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og120-PCR_R   | ATGGCGTCCAAGAGGATAGAT    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og121   | O121   | wzy | Og121-PCR_F   | CAAATGGGCGTTAATACAGCC    | 193  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og121-PCR_R   | TTCCACCCATCCAACCTCTAA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og125   | O125   | wzy | Og125-PCR_F   | TGAATGCTTTGGCGAAAGT      | 210  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og125-PCR_R   | CTCGTCTTGAACCTACCAGCA    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og126   | O126   | wzy | Og126-PCR_F   | ATGGACCTGATAAAGCATCG     | 645  | Wang Q. et al.                         |
|         |        |     | Og126-PCR_R   | AACTTAATACGACCGGAAA      |      | Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.       |
| Og128   | O128   | wzy | Og128-PCR_F   | ATGATTCTTACGGAGTGC       | 782  | Li Y. et al.                           |
|         |        |     | Og128-PCR_R   | CTCTAACCTAATCCCTCCC      |      | J Clin Microbiol. 2006 44:4376-83.     |
| Og130   | O130   | wzy | Og130-PCR_F   | TAGCCCGTCAATCCAACTTA     | 944  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og130-PCR_R   | CGCCAACAAATATAGGAACCC    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og131   | O131   | wzy | Og131-PCR_F   | AAATTGGATTGCCTGCCCT      | 238  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og131-PCR_R   | AAAGATGCAACCGCCTGTC      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og132   | O132   | wzy | Og132-PCR_F   | GGCGTGAGAACCACTTCAATA    | 215  | Iguchi A. et al.                       |
|         |        |     | Og132-PCR_R   | AAACCAGTTCCACCCAACAA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |



|       |      |             |             |                            |      |  |
|-------|------|-------------|-------------|----------------------------|------|--|
| Og133 | O133 | <i>wzy</i>  | Og133-PCR_F | TCTGCGTTATGGCAACTGTCA      | 1017 | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og133-PCR_R | CACTCGCAAACGCTCACATT       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og136 | O136 | <i>wzy</i>  | Og136-PCR_F | TGTTGAAGGTGGCGTAATAGC      | 210  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og136-PCR_R | AAATACACGCCCATCAATG        |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og138 | O138 | <i>wzy</i>  | Og138-PCR_F | CTGCATGGTTCCTTTCTGTCA      | 267  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og138-PCR_R | CGGACAAAATGGCCAATACG       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og139 | O139 | <i>wzy</i>  | Og139-PCR_F | TACGCATTCGTGAACGAGGAT      | 287  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og139-PCR_R | CATCCCGACCGATAAAAGAA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og140 | O140 | <i>wzy</i>  | Og140-PCR_F | CTGCGCATGCAATTTCTTTG       | 409  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og140-PCR_R | AAACCGATCCTAGCCGGAA        |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og141 | O141 | <i>wzy</i>  | Og141-PCR_F | TTCGGGTGCTTATAGTTGGG       | 745  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og141-PCR_R | CGAAAATCGGTAAGCTATGGA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og142 | O142 | <i>wzy</i>  | Og142-PCR_F | TGGCCCTGCATCATTTTTTC       | 538  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og142-PCR_R | GGGCACGTTGACGTAATCTAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og143 | O143 | <i>wzy</i>  | Og143-PCR_F | TGGCTGCATGCTCTTTTT         | 500  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og143-PCR_R | ATATACCCCTCCGAGGACAAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og144 | O144 | <i>wzx</i>  | Og144-PCR_F | CGATGCAGATTAATTCAGCCT      | 406  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og144-PCR_R | AACTGTGGCTCATGCCAATA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og145 | O145 | <i>wzy</i>  | Og145-PCR_F | TTCGCGCACAGCATGGTTAT       | 132  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og145-PCR_R | TACAATGCACCCGAAACAGT       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og146 | O146 | <i>wzx</i>  | Og146-PCR_F | CGCCACAATTACCATGGGA        | 801  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og146-PCR_R | CCCCCTCCAGGCAAAATTACA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og147 | O147 | <i>wzy</i>  | Og147-PCR_F | TGGAAATGCTCTCATTCCATTTGCCT | 399  | DebRoy et al.                          |
|       |      |             | Og147-PCR_R | GATGACATTACCCAACCAGAACC    |      | Foodborne Pathog Dis. 2010 7:1407-1414 |
| Og148 | O148 | <i>wzx</i>  | Og148-PCR_F | TGGCAACCATTTGTCTTGCA       | 865  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og148-PCR_R | CCCCAAGCCCATATAATAGTAA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og149 | O149 | <i>wzy</i>  | Og149-PCR_F | TTTGGTGCAGATACTCAGA        | 709  | Han W. et al.                          |
|       |      |             | Og149-PCR_R | GAACAATAGATGCGATACAA       |      | Appl Environ Microbiol. 2007 73:4082-8 |
| Og150 | O150 | <i>wzx</i>  | Og150-PCR_F | ACCACCGGGATATGAACATGA      | 1089 | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og150-PCR_R | AGTCCAAGCAACCAACCAA        |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og152 | O152 | <i>wzy</i>  | Og152-PCR_F | AGGCGCTGATTACTTCCGATA      | 568  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og152-PCR_R | ACCTACCCCACTTCCGATTTT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og154 | O154 | <i>wzx</i>  | Og154-PCR_F | TCCGACACAGTTAGGTGCGTA      | 299  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og154-PCR_R | TAATCACCCGACAATAAGCC       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og155 | O155 | <i>wzy</i>  | Og155-PCR_F | ATGCCATAGGGCAATTTGATT      | 671  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og155-PCR_R | GAGCATCGTGACCTGATA         |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og156 | O156 | <i>wzy</i>  | Og156-PCR_F | GGAAAATGGAACATTTAGCGG      | 236  | Iguchi A. et al.                       |
|       |      |             | Og156-PCR_R | TCGGAGTGCCAACCAAAATA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted        |
| Og157 | O157 | <i>rfbE</i> | Og157-PCR_F | CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC    | 296  | Bertrand R. and Roig B.                |
|       |      |             | Og157-PCR_R | TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG   |      | Water Res. 2007 41:1280-6              |
| Og158 | O158 | <i>wzy</i>  | Og158-PCR_F | CTGCGGTATTACCCAGAACAA      | 693  | Iguchi A. et al.                       |

|       |      |     |             |                       |      |                                  |
|-------|------|-----|-------------|-----------------------|------|----------------------------------|
|       |      |     | Og158-PCR_R | ACGCATTGATGCATTTCT    |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og159 | O159 | wzy | Og159-PCR_F | TGTGTATGTTAGCGGGGTAA  | 298  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og159-PCR_R | AGTCGGTTCATTTGTTGCA   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og160 | O160 | wzx | Og160-PCR_F | TGTTTCAGGGGCTTGAAAAG  | 333  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og160-PCR_R | CAACTTGATACGTTGTCCCA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og161 | O161 | wzx | Og161-PCR_F | TATGTTGGCGGATATTCGGT  | 349  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og161-PCR_R | AGGCAACGGATGGAATTGAT  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og163 | O163 | wzy | Og163-PCR_F | GCAATCTTGAAGCCAGAACCT | 342  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og163-PCR_R | AAGATGTTCCACTCCCTGCAA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og165 | O165 | wzx | Og165-PCR_F | GGCGTAAATAAAATATGGGGG | 1042 | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og165-PCR_R | GCCCTCTAACAAACGAATTGT |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og166 | O166 | wzy | Og166-PCR_F | TTCATAGCTGGCCTCCTTGTT | 462  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og166-PCR_R | TCTATTGCGCGAATCCTTTCT |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og167 | O167 | wzy | Og167-PCR_F | TCAGGGCAATTACAATCCTT  | 403  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og167-PCR_R | TCGCGCATAGAATAGCATGTC |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og168 | O168 | wzy | Og168-PCR_F | AGTGAGCCTGCTGCATTATGT | 282  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og168-PCR_R | ACGCTGCTGGATACTATCCGA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og169 | O169 | wzx | Og169-PCR_F | GCCGGTCAACAATCGTAAT   | 221  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og169-PCR_R | GCCGCTTAAACAATTGCTTTC |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og170 | O170 | wzy | Og170-PCR_F | TTGCGTTCGGAATTGTTACTC | 271  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og170-PCR_R | AATCCAACACCCGCATTTTG  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og171 | O171 | wzy | Og171-PCR_F | AGCGGTGTGGTCTGTCTTTT  | 212  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og171-PCR_R | TGAATCCGAGGGGTATCAAA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og172 | O172 | wzx | Og172-PCR_F | TGGGGGTGTGGTATGTTTTT  | 1108 | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og172-PCR_R | AATGCTCCCTGAATCCTGTT  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og173 | O173 | wzy | Og173-PCR_F | TTCAAAGTCTCTGGAGGGA   | 606  | Wang Q. et al.                   |
|       |      |     | Og173-PCR_R | TGGCTGAGACTTGACTATTTT |      | Mol Cell Probes. 2010 24:286-90. |
| Og174 | O174 | wzy | Og174-PCR_F | CGGAAGTCGGACTGCTATTTT | 541  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og174-PCR_R | TATGTGACCTAGCACACCCAA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og175 | O175 | wzy | Og175-PCR_F | TTCGAAGTACCTGCTTT     | 690  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og175-PCR_R | TGTATCCCCCAAACCATCAT  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og176 | O176 | wzy | Og176-PCR_F | TTGGCGTGCCAGGTATATATC | 809  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og176-PCR_R | TGACAGAGCTATCCCCTTGA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og177 | O177 | wzy | Og177-PCR_F | CCGATACACCGGATGGATTAT | 427  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og177-PCR_R | AAGCCAGTACCCAGAACAGGA |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og179 | O179 | wzy | Og179-PCR_F | ACGGGCTGATTATTTGTCTCT | 608  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og179-PCR_R | AAACAAGACCCCTTGCCATA  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og180 | O180 | wzy | Og180-PCR_F | TGGCATCAACGAATGATGCA  | 744  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og180-PCR_R | TTGCCATGCTTCACCAATA   |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |
| Og181 | O181 | wzy | Og181-PCR_F | AGGACTCCGATTTACTACCGC | 261  | Iguchi A. et al.                 |
|       |      |     | Og181-PCR_R | ACAGCGAATGCAACAATTGG  |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted  |

|        |                          |     |              |                           |      |                                      |
|--------|--------------------------|-----|--------------|---------------------------|------|--------------------------------------|
| Og182  | O182                     | wzy | Og182-PCR_F  | CGGTGATGGTTCTATTCTTGG     | 510  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og182-PCR_R  | TGCTTGACCAACTGTGTTA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| Og183  | O183                     | wzx | Og183-PCR_F  | CGTGGTAACCAATTCGCAA       | 666  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og183-PCR_R  | GGAATAACGAACGGTTTACA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| Og184  | O184                     | wzy | Og184-PCR_F  | TTCTGGTCACCAGAGCTTGAT     | 964  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og184-PCR_R  | TCCTGCCCTCACAATGGATAT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| Og185  | O185                     | wzy | Og185-PCR_F  | TGGTCGGTTGCCTGTTTTT       | 254  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og185-PCR_R  | CTGACCGATAAAAGCCAACA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| Og187  | O187                     | wzy | Og187-PCR_F  | CTTCTGTTGGTCTGCTTTGT      | 828  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og187-PCR_R  | AAAATGAACCGGTCTCGCTA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp1  | O20, O137                | wzy | Og137-PCR_F  | GGGATAGGTTTATTGTTGCA      | 1007 | Wang Q. et al.                       |
|        |                          |     | Og137-PCR_R  | GTTAGCCATCCACCAAGGTA      |      | Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.     |
| OgGp2  | O28ac, O42               | wzx | Og28ac-PCR_F | GGTAATACACTTGCTGTGGTGGGT  | 218  | Fratamico PM. et al.                 |
|        |                          |     | Og28ac-PCR_R | ATGATTGACCATCCCAGCCGTAT   |      | Can J Microbiol. 2010 56:308-16      |
| OgGp3  | O118, O151               | wzy | Og118-PCR_F  | GTGGGAGTCTGAATCAAGTTGCGA  | 344  | Liu Y et al.                         |
|        |                          |     | Og118-PCR_R  | AGCAACCTTACCCAATCCTAAGGG  |      | Foodborne Pathog Dis. 2008 5:449-457 |
| OgGp4  | O90, O127                | wzy | Og127-PCR_F  | TTCATCTCCGCTGGGAATACA     | 451  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og127-PCR_R  | AATTGGTGACGCTGGAATGA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp5  | O123, O186               | wzy | Og186-PCR_F  | TTTCAACAGGTTCGAATGCC      | 362  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og186-PCR_R  | CCCACCAATACCACTGGAATA     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp6  | O46, O134                | wzy | Og46-PCR_F   | TTAACTGGTTCAAGGACGGG      | 445  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og46-PCR_R   | TGACCGTTATTGCAAGCGAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp7  | O2, O50                  | wzx | Og2-PCR_F    | TGGCCTTGTTGCATATACTGCGGA  | 813  | Fratamico PM. et al.                 |
|        |                          |     | Og2-PCR_R    | TCACGAGCTGAGCGAACTGTTCA   |      | Can J Microbiol. 2010 56:308-16      |
| OgGp8  | O107, O117               | wzy | Og117-PCR_F  | TGTTCTCCACTGCGATCATAGGT   | 518  | Liu Y et al.                         |
|        |                          |     | Og117-PCR_R  | ACATAGAGTACCCGACACCATCAC  |      | Mol Cell Probes. 2007 21:295-302.    |
| OgGp9  | O17, O44, O73, O77, O106 | wzy | Og44-PCR_F   | GAGGGGCGGATACATTTGTA      | 849  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og44-PCR_R   | ATACCACAGCGGGATGAAGTT     |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp10 | O13, O129, O135          | wzy | Og13-PCR_F   | TGGTGGTGGAAAGATTACTGGA    | 774  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og13-PCR_R   | CCAACAAGAACGTCGCTAAA      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp11 | O153, O178               | wzy | Og153-PCR_F  | TCGGTAACGGCTTTGCATTA      | 703  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og153-PCR_R  | AACCCAGCCAATAGCAAAA       |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp12 | O18ab, O18ac             | wzx | Og18ab-PCR_F | GTTCCGGTGGTTGGATTACAGTTAG | 551  | Li D. et al.                         |
|        |                          |     | Og18ab-PCR_R | CTACTATCATCCTCACTGACCACG  |      | J Microbiol Methods. 2010 82:71-7    |
| OgGp13 | O124, O164               | wzx | Og124-PCR_F  | AGTCACCGCATGAATGATT       | 270  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og124-PCR_R  | GCATTAAGTGCGTCTGAATT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp14 | O62, O68                 | wzy | Og62-PCR_F   | TCATGGTGGTCATCAAGCTTT     | 548  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og62-PCR_R   | ACAATGCTGGATGAAATGCC      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |
| OgGp15 | O89, O101, O162          | wzt | Og89-PCR_F   | TCTGTTGGACATCGCTCTAGG     | 198  | Iguchi A. et al.                     |
|        |                          |     | Og89-PCR_R   | AATGCTAATCTCACGCGCAT      |      | J Clin Microbiol. 2015 accepted      |

表 5. *E. coli* O-genotyping PCR における各マルチプレックス PCR キットのプライマー組み合わせ

| マルチ<br>プレッ<br>クス<br>PCR | プライマー名      | 関連する O 血清群 | O-genotype | サイズ<br>(bp) | 混和するプライマー( 100 μM )<br>の組成 forward/reverse (μl) |
|-------------------------|-------------|------------|------------|-------------|---|
| MP-1                    | Og165_PCR   | O165       | Og165      | 1042        | 160/160   |
|                         | Og103-PCR   | O103       | Og103      | 716         | 80/80   |
|                         | Og111-PCR   | O111       | Og111      | 451         | 80/80   |
|                         | Og157-PCR   | O157       | Og157      | 296         | 160/160   |
|                         | Og26-PCR    | O26        | Og26       | 241         | 80/80   |
|                         | Og121_PCR   | O121       | Og121      | 193         | 80/80   |
|                         | Og145_PCR   | O145       | Og145      | 132         | 80/80   |
|                         |             |            | TE         |             | 2080  |
|                         |             |            | Total      |             | 3520  |
| MP-2                    | Og112ac_PCR | O112ac     | Og112ac    | 1180        | 80/80   |
|                         | Og148_PCR   | O148       | Og148      | 865         | 80/80   |
|                         | Og158_PCR   | O158       | Og158      | 693         | 80/80   |
|                         | Og114_PCR   | O114       | Og114      | 553         | 80/80   |
|                         | Og144_PCR   | O144       | Og144      | 406         | 80/80   |
|                         | Og159_PCR   | O159       | Og159      | 298         | 80/80   |
|                         | Og169_PCR   | O169       | Og169      | 221         | 80/80   |
|                         |             |            | TE         |             | 2400  |
|                         |             |            | Total      |             | 3520  |
| MP-3                    | Og1_PCR     | O1         | Og1        | 1098        | 80/80   |
|                         | Og146_PCR   | O146       | Og146      | 801         | 80/80   |
|                         | Og119_PCR   | O119       | Og119      | 650         | 80/80   |
|                         | Og142_PCR   | O142       | Og142      | 538         | 80/80   |
|                         | Og167_PCR   | O167       | Og167      | 403         | 80/80   |
|                         | Og74_PCR    | O74        | Og74       | 289         | 80/80   |
|                         | Og125_PCR   | O125       | Og125      | 210         | 80/80   |
|                         |             |            | TE         |             | 2400  |
|                         |             |            | Total      |             | 3520  |
| MP-4                    | Og63_PCR    | O63        | Og63       | 995         | 80/80   |
|                         | Og6_PCR     | O6         | Og6        | 783         | 80/80   |
|                         | Og126_PCR   | O126       | Og126      | 645         | 80/80   |
|                         | Og143_PCR   | O143       | Og143      | 500         | 80/80   |
|                         | Og27_PCR    | O27        | Og27       | 382         | 80/80   |
|                         | Og168_PCR   | O168       | Og168      | 282         | 80/80   |
|                         | Og136_PCR   | O136       | Og136      | 210         | 80/80   |
|                         |             |            | TE         |             | 2400  |

|      |            |                          |        |       |         |
|------|------------|--------------------------|--------|-------|---------|
|      |            |                          |        | Total | 3520    |
|      | Og78_PCR   | O78                      | Og78   | 992   | 80/80   |
|      | Og128_PCR  | O128                     | Og128  | 782   | 80/80   |
|      | Og15_PCR   | O15                      | Og15   | 608   | 80/80   |
|      | Og166_PCR  | O166                     | Og166  | 462   | 80/80   |
| MP-5 | Og161_PCR  | O161                     | Og161  | 349   | 80/80   |
|      | Og29_PCR   | O29                      | Og29   | 260   | 80/80   |
|      | Og55_PCR   | O55                      | Og55   | 207   | 80/80   |
|      |            |                          |        | TE    | 2400    |
|      |            |                          |        | Total | 3520    |
|      | Og91_PCR   | O91                      | Og91   | 953   | 80/80   |
|      | Og86_PCR   | O86                      | Og86   | 731   | 80/80   |
|      | Og152_PCR  | O152                     | Og152  | 568   | 80/80   |
| MP-6 | Og8_PCR    | O8                       | Og8    | 448   | 80/80   |
|      | Og115_PCR  | O115                     | Og115  | 327   | 80/80   |
|      | Og25_PCR   | O25                      | Og25   | 230   | 80/80   |
|      |            |                          |        | TE    | 2560    |
|      |            |                          |        | Total | 3520    |
|      | Og137_PCR  | O20, O137                | OgGp1  | 1007  | 80/80   |
|      | Og44_PCR   | O17, O44, O73, O77, O106 | OgGp9  | 849   | 80/80   |
|      | Og153_PCR  | O153, O178               | OgGp11 | 703   | 80/80   |
|      | Og18ab_PCR | O18ab, O18ac             | OgGp12 | 551   | 80/80   |
| MP-7 | Og127_PCR  | O90, O127                | OgGp4  | 451   | 160/160 |
|      | Og118_PCR  | O118, O151               | OgGp3  | 344   | 80/80   |
|      | Og124_PCR  | O124, O164               | OgGp13 | 270   | 80/80   |
|      | Og28ac_PCR | O28ac, O42               | OgGp2  | 218   | 80/80   |
|      |            |                          |        | TE    | 2080    |
|      |            |                          |        | Total | 3520    |
|      | Og9_PCR    | O9                       | Og9    | 1235  | 80/80   |
|      | Og41_PCR   | O41                      | Og41   | 942   | 80/80   |
|      | Og33_PCR   | O33                      | Og33   | 783   | 80/80   |
|      | Og108_PCR  | O108                     | Og108  | 647   | 80/80   |
|      | Og174_PCR  | O174                     | Og174  | 541   | 80/80   |
| MP-8 | Og60_PCR   | O60                      | Og60   | 443   | 80/80   |
|      | Og54_PCR   | O54                      | Og54   | 351   | 80/80   |
|      | Og80_PCR   | O80                      | Og80   | 285   | 80/80   |
|      | Og92_PCR   | O92                      | Og92   | 233   | 80/80   |
|      |            |                          |        | TE    | 2080    |
|      |            |                          |        | Total | 3520    |
| MP-9 | Og98_PCR   | O98                      | Og98   | 1139  | 160/160 |

|       |           |                 |        |      |         |
|-------|-----------|-----------------|--------|------|---------|
|       | Og96_PCR  | O96             | Og96   | 938  | 80/80   |
|       | Og59_PCR  | O59             | Og59   | 783  | 80/80   |
|       | Og69_PCR  | O69             | Og69   | 653  | 80/80   |
|       | Og82_PCR  | O82             | Og82   | 538  | 80/80   |
|       | Og177_PCR | O177            | Og177  | 427  | 80/80   |
|       | Og71_PCR  | O71             | Og71   | 344  | 160/160 |
|       | Og95_PCR  | O95             | Og95   | 272  | 80/80   |
|       | Og93_PCR  | O93             | Og93   | 229  | 80/80   |
|       |           |                 | TE     |      | 1760    |
|       |           |                 | Total  |      | 3520    |
|       | Og172_PCR | O172            | Og172  | 1108 | 80/80   |
|       | Og88_PCR  | O88             | Og88   | 781  | 80/80   |
|       | Og37_PCR  | O37             | Og37   | 683  | 80/80   |
|       | Og117_PCR | O107, O117      | OgGp8  | 518  | 80/80   |
|       | Og23_PCR  | O23             | Og23   | 427  | 80/80   |
| MP-10 | Og163_PCR | O163            | Og163  | 342  | 80/80   |
|       | Og170_PCR | O170            | Og170  | 271  | 80/80   |
|       | Og99_PCR  | O99             | Og99   | 226  | 80/80   |
|       | Og116_PCR | O116            | Og116  | 156  | 80/80   |
|       |           |                 | TE     |      | 2080    |
|       |           |                 | Total  |      | 3520    |
|       | Og150_PCR | O150            | Og150  | 1089 | 80/80   |
|       | Og30_PCR  | O30             | Og30   | 894  | 80/80   |
|       | Og84_PCR  | O84             | Og84   | 775  | 80/80   |
|       | Og183_PCR | O183            | Og183  | 666  | 80/80   |
|       | Og75_PCR  | O75             | Og75   | 511  | 80/80   |
| MP-11 | Og113_PCR | O113            | Og113  | 419  | 80/80   |
|       | Og160_PCR | O160            | Og160  | 333  | 80/80   |
|       | Og138_PCR | O138            | Og138  | 267  | 80/80   |
|       | Og132_PCR | O132            | Og132  | 215  | 80/80   |
|       |           |                 | TE     |      | 2080    |
|       |           |                 | Total  |      | 3520    |
|       | Og40_PCR  | O40             | Og40   | 1082 | 80/80   |
|       | Og45_PCR  | O45             | Og45   | 916  | 80/80   |
|       | Og13_PCR  | O13, O129, O135 | OgGp10 | 774  | 80/80   |
|       | Og7_PCR   | O7              | Og7    | 610  | 80/80   |
| MP-12 | Og182_PCR | O182            | Og182  | 510  | 80/80   |
|       | Og109_PCR | O109            | Og109  | 409  | 80/80   |
|       | Og79_PCR  | O79             | Og79   | 333  | 80/80   |
|       | Og181_PCR | O181            | Og181  | 261  | 80/80   |

|       |           |                 |        |       |       |
|-------|-----------|-----------------|--------|-------|-------|
|       | Og171_PCR | O171            | Og171  | 212   | 80/80 |
|       |           |                 |        | TE    | 2080  |
|       |           |                 |        | Total | 3520  |
|       | Og58_PCR  | O58             | Og58   | 1046  | 80/80 |
|       | Og12_PCR  | O12             | Og12   | 885   | 80/80 |
|       | Og141_PCR | O141            | Og141  | 745   | 80/80 |
|       | Og179_PCR | O179            | Og179  | 608   | 80/80 |
|       | Og11_PCR  | O11             | Og11   | 509   | 80/80 |
| MP-13 | Og140_PCR | O140            | Og140  | 409   | 80/80 |
|       | Og81_PCR  | O81             | Og81   | 329   | 80/80 |
|       | Og56_PCR  | O56             | Og56   | 250   | 80/80 |
|       | Og21_PCR  | O21             | Og21   | 209   | 80/80 |
|       |           |                 |        | TE    | 2080  |
|       |           |                 |        | Total | 3520  |
|       | Og43_PCR  | O43             | Og43   | 1041  | 80/80 |
|       | Og187_PCR | O187            | Og187  | 828   | 80/80 |
|       | Og180_PCR | O180            | Og180  | 744   | 80/80 |
|       | Og173_PCR | O173            | Og173  | 606   | 80/80 |
|       | Og110_PCR | O110            | Og110  | 493   | 80/80 |
| MP-14 | Og147_PCR | O147            | Og147  | 399   | 80/80 |
|       | Og120_PCR | O120            | Og120  | 329   | 80/80 |
|       | Og185_PCR | O185            | Og185  | 254   | 80/80 |
|       | Og89_PCR  | O89, O101, O162 | OgGp15 | 198   | 80/80 |
|       |           |                 |        | TE    | 2080  |
|       |           |                 |        | Total | 3520  |
|       | Og102_PCR | O102            | Og102  | 1025  | 80/80 |
|       | Og38_PCR  | O38             | Og38   | 822   | 80/80 |
|       | Og64_PCR  | O64             | Og64   | 727   | 80/80 |
|       | Og51_PCR  | O51             | Og51   | 583   | 80/80 |
|       | Og61_PCR  | O61             | Og61   | 487   | 80/80 |
| MP-15 | Og70_PCR  | O70             | Og70   | 393   | 80/80 |
|       | Og35_PCR  | O35             | Og35   | 303   | 80/80 |
|       | Og34_PCR  | O34             | Og34   | 247   | 80/80 |
|       | Og97_PCR  | O97             | Og97   | 184   | 80/80 |
|       |           |                 |        | TE    | 2080  |
|       |           |                 |        | Total | 3520  |
|       | Og133_PCR | O133            | Og133  | 1017  | 80/80 |
| MP-16 | Og2_PCR   | O2, O50         | OgGp7  | 813   | 80/80 |
|       | Og149_PCR | O149            | Og149  | 709   | 80/80 |
|       | Og5_PCR   | O5              | Og5    | 566   | 80/80 |

|       |             |            |         |      |         |
|-------|-------------|------------|---------|------|---------|
|       | Og22_PCR    | O22        | Og22    | 458  | 80/80   |
|       | Og19_PCR    | O19        | Og19    | 389  | 80/80   |
|       | Og16_PCR    | O16        | Og16    | 302  | 80/80   |
|       | Og105_PCR   | O105       | Og105   | 246  | 80/80   |
|       | Og87_PCR    | O87        | Og87    | 167  | 80/80   |
|       |             |            |         | TE   | 2080    |
|       |             |            | Total   |      | 3520    |
| MP-17 | Og100_PCR   | O100       | Og100   | 1006 | 80/80   |
|       | Og176_PCR   | O176       | Og176   | 809  | 80/80   |
|       | Og175_PCR   | O175       | Og175   | 690  | 80/80   |
|       | Og3_PCR     | O3         | Og3     | 571  | 80/80   |
|       | Og76_PCR    | O76        | Og76    | 457  | 80/80   |
|       | Og85_PCR    | O85        | Og85    | 388  | 80/80   |
|       | Og66_PCR    | O66        | Og66    | 301  | 160/160 |
|       | Og112ab_PCR | O112ab     | Og112ab | 241  | 80/80   |
|       |             |            |         | TE   | 2080    |
|       |             |            | Total   |      | 3520    |
| MP-18 | Og104_PCR   | O104       | Og104   | 993  | 80/80   |
|       | Og53_PCR    | O53        | Og53    | 806  | 80/80   |
|       | Og155_PCR   | O155       | Og155   | 671  | 80/80   |
|       | Og62_PCR    | O62, O68   | OgGp14  | 548  | 80/80   |
|       | Og32_PCR    | O32        | Og32    | 452  | 80/80   |
|       | Og65_PCR    | O65        | Og65    | 381  | 80/80   |
|       | Og154_PCR   | O154       | Og154   | 299  | 80/80   |
|       | Og131_PCR   | O131       | Og131   | 238  | 80/80   |
|       |             |            |         | TE   | 2240    |
|       |             |            | Total   |      | 3520    |
| MP-19 | Og184_PCR   | O184       | Og184   | 964  | 80/80   |
|       | Og48_PCR    | O48        | Og48    | 793  | 80/80   |
|       | Og39_PCR    | O39        | Og39    | 667  | 80/80   |
|       | Og10_PCR    | O10        | Og10    | 546  | 80/80   |
|       | Og28ab_PCR  | O28ab      | Og28ab  | 446  | 80/80   |
|       | Og186_PCR   | O123, O186 | OgGp5   | 362  | 160/160 |
|       | Og36_PCR    | O36        | Og36    | 292  | 80/80   |
|       | Og156_PCR   | O156       | Og156   | 236  | 80/80   |
|       |             |            |         | TE   | 2080    |
|       |             |            | Total   |      | 3520    |
| MP-20 | Og130_PCR   | O130       | Og130   | 944  | 80/80   |
|       | Og49_PCR    | O49        | Og49    | 789  | 80/80   |
|       | Og4_PCR     | O4         | Og4     | 664  | 80/80   |



|           |           |       |     |       |
|-----------|-----------|-------|-----|-------|
| Og52_PCR  | O52       | Og52  | 543 | 80/80 |
| Og46_PCR  | O46, O134 | OgGp6 | 445 | 80/80 |
| Og83_PCR  | O83       | Og83  | 362 | 80/80 |
| Og139_PCR | O139      | Og139 | 287 | 80/80 |
| Og24_PCR  | O24       | Og24  | 233 | 80/80 |
|           |           |       | TE  | 2240  |
|           |           | Total |     | 3520  |

表 6. マルチプレックス PCR の反応液組成

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| PCR grade water                     | 14.42 |
| 5x KAPA Extra Buffer (without Mg2+) | 6     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)           | 3     |
| dNTP mix (10 mM each dNTP)          | 0.9   |
| multiplex primer mix (表 5 参照)       | 3.52  |
| KAPA Taq DNA polymerase (5 U/μl)    | 0.16  |
| Template DNA                        | 2     |
| total                               | 30 μl |

表 7. マルチプレックス PCR の反応条件

|                         |      |        |           |
|-------------------------|------|--------|-----------|
| 1. Initial Denaturation | 94°C | 1 min  | 25 cycles |
| 2. Denaturation         | 94°C | 30 sec |           |
| 3. Annealing            | 58°C | 30 sec |           |
| 4. Extension            | 72°C | 1 min  |           |
| 5. Final Extension      | 72°C | 2 min  |           |

表 8. 非典型的 EHEC の *stx1*・*stx2*・*eae* 保有パターン

| 分離源     | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1+stx2</i> | <i>stx1</i><br>+ <i>eae</i> | <i>stx2</i><br>+ <i>eae</i> | <i>stx1+stx2</i><br>+ <i>eae</i> | total |
|---------|-------------|-------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------|
| ヒト      | 114         | 106         | 31               | 86                          | 37                          | 6                                | 380   |
| ウシ      | 8           | 208         | 47               | 28                          | 16                          | 0                                | 307   |
| ウシ以外の動物 | 2           | 15          | 0                | 1                           | 0                           | 0                                | 18    |
| 食品      | 0           | 11          | 1                | 0                           | 1                           | 0                                | 13    |
| 不明      | 3           | 2           | 1                | 0                           | 2                           | 0                                | 8     |

表 9. 有症者由来 EHEC 株に見られた O-genotype とその分布

|           | ヒト-重症 | ヒト-有症者 | 無症状保菌者 | ウシ | その他動物 |
|-----------|-------|--------|--------|----|-------|
| O103      | 13    | 10     | 1      | 4  | 0     |
| O165      | 9     | 2      | 0      | 0  | 0     |
| O121      | 5     | 3      | 1      | 0  | 0     |
| O28ac/O42 | 3     | 0      | 3      | 2  | 0     |

|               |   |   |    |    |   |
|---------------|---|---|----|----|---|
| O177          | 2 | 0 | 1  | 4  | 1 |
| O107/O117     | 2 | 0 | 1  | 1  | 0 |
| O115          | 2 | 1 | 3  | 1  | 0 |
| O5            | 2 | 3 | 0  | 2  | 1 |
| O118/151      | 2 | 3 | 1  | 0  | 0 |
| O145          | 2 | 8 | 0  | 0  | 0 |
| O163          | 1 | 0 | 3  | 12 | 0 |
| O84           | 1 | 0 | 11 | 3  | 0 |
| O88           | 1 | 0 | 0  | 2  | 0 |
| O45           | 1 | 0 | 2  | 1  | 0 |
| O141          | 1 | 0 | 0  | 0  | 1 |
| O119          | 1 | 0 | 3  | 0  | 0 |
| O15           | 1 | 0 | 2  | 0  | 0 |
| O109          | 1 | 1 | 4  | 16 | 0 |
| O174          | 1 | 1 | 3  | 16 | 0 |
| O172          | 1 | 1 | 0  | 1  | 0 |
| O123/186      | 1 | 1 | 5  | 0  | 0 |
| O55           | 1 | 1 | 3  | 0  | 0 |
| O113          | 1 | 2 | 6  | 55 | 0 |
| O182          | 1 | 2 | 2  | 6  | 0 |
| O183          | 1 | 2 | 9  | 0  | 0 |
| O91           | 1 | 4 | 16 | 1  | 0 |
| O128          | 0 | 3 | 5  | 0  | 0 |
| O8            | 0 | 2 | 5  | 17 | 1 |
| O156          | 0 | 2 | 7  | 11 | 0 |
| O63           | 0 | 2 | 0  | 0  | 0 |
| O2/50         | 0 | 1 | 1  | 3  | 0 |
| O100          | 0 | 1 | 0  | 2  | 0 |
| O146          | 0 | 1 | 4  | 1  | 3 |
| O98           | 0 | 1 | 2  | 1  | 0 |
| O108          | 0 | 1 | 1  | 0  | 0 |
| O126          | 0 | 1 | 0  | 0  | 0 |
| O112ab        | 0 | 1 | 1  | 0  | 0 |
| O24           | 0 | 1 | 0  | 0  | 0 |
| O66           | 0 | 1 | 0  | 0  | 0 |
| O69           | 0 | 1 | 3  | 0  | 0 |
| O76           | 0 | 1 | 3  | 0  | 0 |
| O89/O101/O162 | 0 | 1 | 3  | 0  | 0 |

表 10. 重症者由来 EHEC 株と同じ遺伝学的特徴を持つウシまたはシカ由来株

| strain ID | O-genotype | stx1 | stx2 | eae | stx2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
|-----------|------------|------|------|-----|-------|-----|------|-------|-----|-----|------|--------|---------|
| EHO-11    | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-22   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-4    | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-35   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-33   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-16   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-17   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| EH23-26   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140318   | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0022     | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0103     | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0121     | O103       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | stx1 | stx2 | eae | stx2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| OT-310    | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140250   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140259   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140269   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140273   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140277   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140290   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140292   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140293   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140296   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140302   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140311   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140316   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140323   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140338   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140340   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0013     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0017     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0061     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0062     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0064     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0128     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0133     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0134     | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |

|           |            |      |      |     |       |     |      |       |     |     |      |        |         |
|-----------|------------|------|------|-----|-------|-----|------|-------|-----|-----|------|--------|---------|
| OT-291    | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| OT-292    | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140166   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140181   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140190   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140191   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140192   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140193   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140223   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140245   | O113       | -    | +    | -   | +     | +   | +    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | six1 | six2 | eae | sic2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHO-28    | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140253   | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140260   | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0025     | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0036     | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0041     | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0066     | O163       | -    | +    | -   | +     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | six1 | six2 | eae | sic2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHO-13    | O177       | -    | +    | +   | +     | +   | -    | -     | -   | +   | -    | ヒト     | 重症      |
| EHOUT19   | O177       | -    | +    | +   | +     | +   | -    | -     | -   | +   | -    | ヒト     | 重症      |
| A0110     | O177       | -    | +    | +   | +     | +   | -    | -     | -   | +   | -    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | six1 | six2 | eae | sic2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHO-34    | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ヒト     | 重症      |
| OC-32     | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| OC-35     | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| A0111     | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| OT-295    | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| A140227   | O182       | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | six1 | six2 | eae | sic2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHOUT41   | O45        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140312   | O45        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | six1 | six2 | eae | sic2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHO-74    | O5         | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ヒト     | 重症      |
| EHOUT01   | O5         | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ヒト     | 重症      |

|           |            |      |      |     |       |     |      |       |     |     |      |        |         |
|-----------|------------|------|------|-----|-------|-----|------|-------|-----|-----|------|--------|---------|
| A0120     | O5         | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| A140237   | O5         | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | ウシ     | -       |
| EOG34-7   | O5         | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | -   | +    | シカ     | -       |
| strain ID | O-genotype | stx1 | stx2 | eae | stc2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| EHOUT46   | O84        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140297   | O84        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| EHOUT31   | O84        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A0002     | O84        | +    | -    | +   | -     | +   | -    | -     | -   | +   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | stx1 | stx2 | eae | stc2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| OT-116    | O88        | +    | +    | -   | -     | +   | -    | -     | +   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140288   | O88        | +    | +    | -   | -     | +   | -    | -     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| strain ID | O-genotype | stx1 | stx2 | eae | stc2c | ehx | cdtV | subAB | saa | iha | fimA | Origin | Symptom |
| OT-4      | O28ac/O42  | -    | +    | -   | -     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ヒト     | 重症      |
| A140230   | O28ac/O42  | -    | +    | -   | -     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |
| A140231   | O28ac/O42  | -    | +    | -   | -     | +   | -    | +     | +   | +   | +    | ウシ     | -       |

表 11 . EHEC における新規 O-genotype の分布

|      | ヒト-重症 | ヒト-有症者 | 無症状保菌者 | ウシ | その他動物 | 食品 |
|------|-------|--------|--------|----|-------|----|
| ON3  | 1     | 1      | 2      | 7  | 0     | 0  |
| ON6  | 1     | 1      | 1      | 4  | 1     | 0  |
| ON8  | 1     | 0      | 8      | 19 | 0     | 1  |
| ON10 | 1     | 1      | 2      | 2  | 0     | 0  |
| ON31 | 1     | 1      | 2      | 0  | 0     | 0  |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 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  |
|---|--|----------------------------------|----------|-----------|------|
| <u>Iguchi A</u> , Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic <i>E. coli</i> Working Group in Japan                                      | <i>Escherichia coli</i> O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping  | Journal of Clinical Microbiology | In press |           |      |
| <u>Iguchi A</u> , Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR  | A complete view of the genetic diversity of the <i>Escherichia coli</i> O-antigen biosynthesis gene cluster  | DNA Research                     | 22       | 101-107   | 2015 |
| Mekata H, <u>Iguchi A</u> , Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N   | Identification of O-serotypes, -genotypes and virulotypes of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> isolates including non-O157 from beef cattle in Japan | Journal of Food Protection       | 8        | 1269-1274 | 2014 |
| von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, <u>Iguchi A</u> , Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G | Identification of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) clades with significant long-term global distribution   | Nature Genetics                  | 46       | 1321-1326 | 2014 |

資料 1

EHEC 検査・診断マニュアル 原稿 (案)

7大0血清群+*stx1/stx2/eae*のマルチプレックスPCR検査法【MP-1+(プラス)】

EHECの主要7種類0血清群(0157、026、0111、0103、0121、0145、0165)の判定にはマルチプレックスPCR法が利用できる。本法は3種類のEHEC病原遺伝子(*stx1*、*stx2*、*eae*)の保有も同時に判定できる。

プライマー配列

| 0血清群 | 標的遺伝子           | プライマー配列(F)               | プライマー配列(R)                | PCR産物のサイズ | 参考文献 |
|------|-----------------|--------------------------|---------------------------|-----------|------|
| 0165 | <i>wzx_0165</i> | GGCGTAAATAAAATATGGGGG    | GCCCTCTAACAAACGAATTGT     | 1042 bp   | 1)   |
| 0103 | <i>wzx_0103</i> | TAAGTACGGGGTGCTTTTT      | AAGCTCCCAGCACGTATAA       | 716 bp    | 2)   |
| 0111 | <i>wzx_0111</i> | CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT     | AACGCAAGACAAGGCAAAAC      | 451 bp    | 2)   |
| 0157 | <i>rfbE</i>     | CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC  | TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG  | 296 bp    | 3)   |
| 026  | <i>wzx_026</i>  | GGGGTGGGTACTATATTGG      | AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA     | 241 bp    | 2)   |
| 0121 | <i>wzy_0121</i> | CAAATGGGCGTTAATACAGCC    | TTCCACCCATCCAACCTCTAA     | 193 bp    | 1)   |
| 0145 | <i>wzy_0145</i> | TTCGCGCACAGCATGGTTAT     | TACAATGCACCGCAAACAGT      | 132 bp    | 1)   |
|      | <i>eae</i>      | CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC | CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG | 881 bp    | 4)   |
|      | <i>stx2</i>     | ATCCTATTCCGGGAGTTTACG    | GCATCATCGTATACACAGGAGC    | 584 bp    | 5)   |
|      | <i>stx1</i>     | CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG    | CACCAGACAATGTAACCGCTG     | 348 bp    | 5)   |

反応液組成

1) TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を使用した場合 (Total 30 μl)

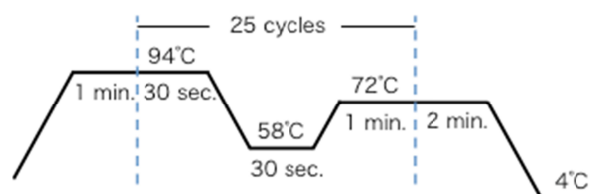
| 試薬など                                 | 組成 (μl)          |
|--------------------------------------|------------------|
| 10 × Ex Taq Buffer                   | 3                |
| dNTP Mixture (2.5mM each)            | 3                |
| Primer (0157 と 0165)                 | (最終濃度 : 0.53 μM) |
| Primer ( <i>stx1</i> と <i>stx2</i> ) | (最終濃度 : 0.13 μM) |
| Primer (その他すべて)                      | (最終濃度 : 0.27 μM) |
| TaKaRa Ex Taq (5units/μl)            | 0.2              |
| Template DNA (精製DNAの場合は10 ng/μl)     | 2                |
| PCR grade Water                      | (up to 30 μl)    |

2) KAPATaq EXtra (日本ジェネティクス)を使用した場合 (Total 30 μl)

| 試薬など   | 組成 (μl)          |
|--|------------------|
| 5 × KAPATaq EXtra Buffer (Mg <sup>2+</sup> free) | 6                |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>                           | 3                |
| dNTP Mix (10mM each)                             | 0.9              |
| Primer (0157 と 0165)                             | (最終濃度 : 0.53 μM) |

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| Primer ( <i>stx1</i> と <i>stx2</i> ) | (最終濃度 : 0.13 μM) |
| Primer (その他すべて)                      | (最終濃度 : 0.27 μM) |
| KAPA Taq Extra DNA ポリメラーゼ (5U/μl)    | 0.16             |
| Template DNA (精製 DNA の場合は 10 ng/μl)  | 2                |
| PCR grade Water                      | (up to 30 μl)    |

## 反応条件

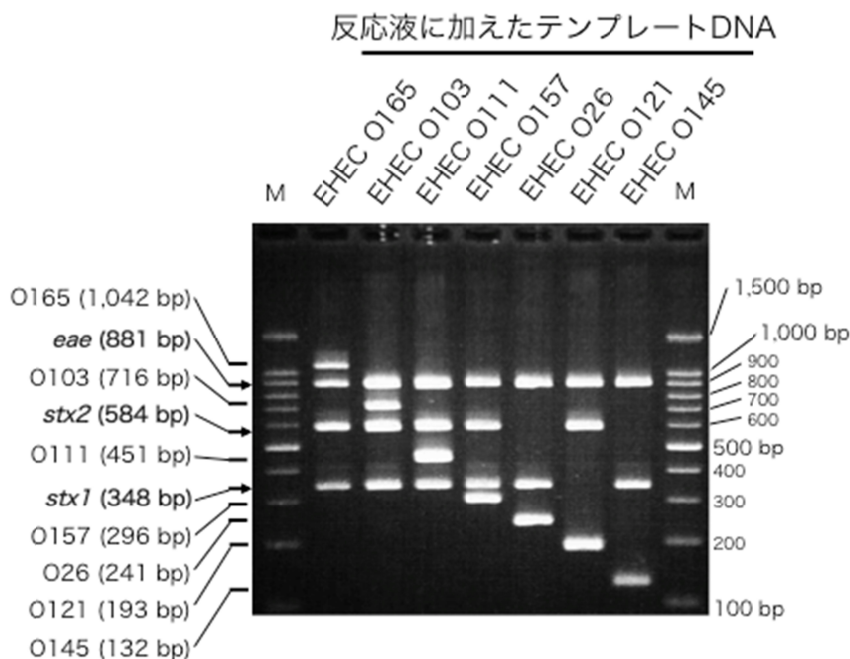


## 電気泳動

増幅産物をゲル上で十分に展開して確認する。一例として、0.5 × TBE buffer / 2% Agarose L03 (TaKaRa) / Mupid-2plus (100V) であれば、35～45 分間泳動する。

## 泳動像

(PCR 反応液 2 μl をローディングバッファーと混和して泳動)



## その他

- 1) 単離菌株のテンプレート DNA についてはキット等により精製した DNA に加え、アルカリポイル法、ポイル法 (10 分間) 菌体の直接添加 (コロニーPCR) でも判定できる。
- 2) 糞便や食品検体に含まれる EHEC も高濃度であれば本法で検出できるが、検体によっては非特異的バンドが出現するので注意が必要である。
- 3) *stx* サブタイプの検出能については、本編の表 3 (Cebula ら) を参考のこと。



- 4) 本手法の特異性や検出感度を改良したキット「EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (RR133A)」がタカラバイオから販売されている。

〔文献〕

- 1) 井口純、秋吉充子、吉崎美和．EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価．第 35 回日本食品微生物学会学術総会要旨 p.65
- 2) Paddock Z, Shi X, Bai J, Nagaraja TG. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol.* 2012 156:381-8
- 3) Bertrand R, Roig B. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-application to municipal wastewater. *Water Res.* 2007 41:1280-6
- 4) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 2000 68:64-71
- 5) Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 33:248-50

## *E. coli* O-genotyping PCR

### 大腸菌 O 血清群 PCR 検査法-フルスクリーニング用

宮崎大学 農学部 畜産草地科学科 衛生微生物学分野 准教授 井口純

(2015.2.26 版)

#### はじめに

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は、原因細菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となり、重要な検査項目の一つとなっている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) (兼 WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*) により現在のところ O1 から O188 までが定められており、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) が認められている。ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌 (EHEC) の O 血清群は O157、O26、O111、O103、O145、O121、O165 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。国立感染症研究所の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なくとも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O 血清群が分離される事例も複数報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、過去に事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、検査現場では稀な O 血清群にも対応した検査法を備え、事例発生時に早期対応できる態勢を整えておくことが望まれる。しかし、SSI から販売されている O 血清群完全判定用抗血清試薬のセットは高価であるために地方衛生研究所などの検査現場で揃えることは経済的に難しい。国内メーカーからも抗血清試薬は販売されているが主要な 50 種類に限られている。また血清学的な凝集反応試験は、菌株によって交差反応や非特異的凝集、不凝集などが起こることも知られており、その不鮮明さや煩雑性の解消が課題となっている。

O 抗原の合成に関わる遺伝子 (10 から 20 個程度) は染色体上の特定遺伝子座にクラスター (O 抗原合成遺伝子領域) を形成している (図 1)。この領域における比較解析から、O 血清群の違いにより糖転移や糖鎖輸送に関わる遺伝子の相同性がオースログ間で大きく異なることが知られている。近年ではこれら塩基配列の多様性を利用した、それぞれの O 血清群を特異的に判定できる遺伝学的手法 (PCR 法、リアルタイム PCR 法、ハイブリダイゼーション法など) が開発されている。しかしそれら手法の多くは病原大腸菌に関連性の高い一部の O 血清群のみを標的としたものであり、稀な O 血清群をカバーした網羅的な判定手法は存在しなかった。

宮崎大学・農学部・井口研究室のグループは、大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の網羅的な比較解析結果を基に (図 2、図 3) ほぼ全ての大腸菌 O 血清群を遺伝学的に判定出来る PCR 検査法 (*E. coli* O-genotyping PCR) を開発した。本法は 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キットで構成されており (図 4) O 血清群全参考株を用いた評価によってその特異性と妥当性が確認された。本法は分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられる。

# O抗原コード領域

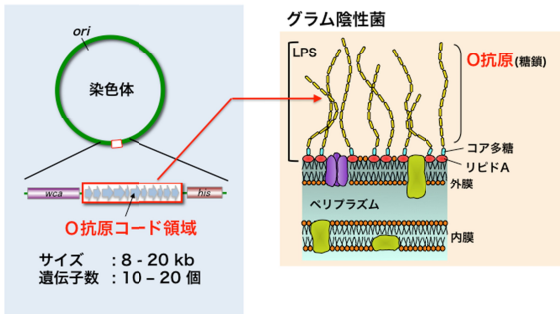


図 1

## O抗原コード領域のグループ化

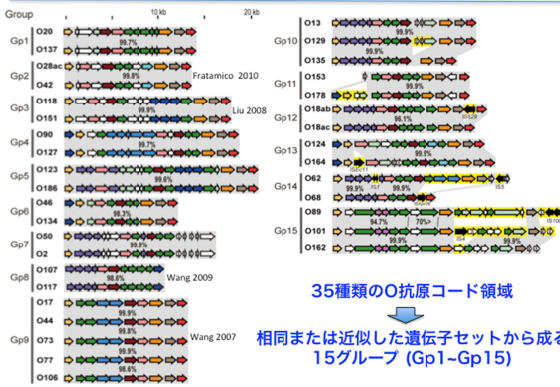


図 2

## 表現型と遺伝子型の関係

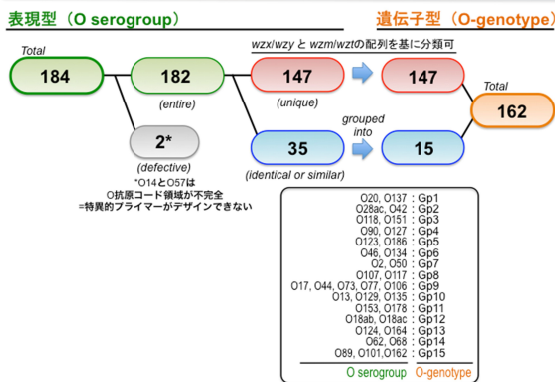
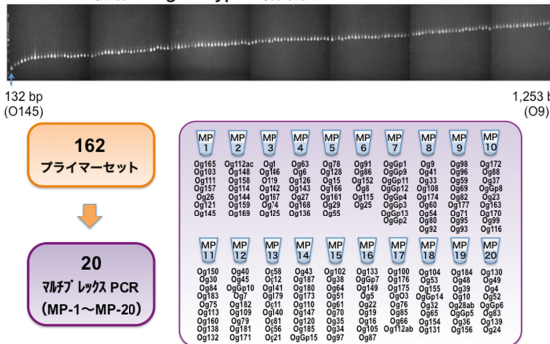


図 3

## マルチプレックスPCRのデザイン

162種類の O-genotype に特異的なPCRプライマーをデザイン



## 材料と方法

### 試薬など（井口研で使用しているもの）

- ・ プライマー：北海道システムサイエンス、簡易カラム精製（TE バッファーで希釈）
- ・ PCR 反応試薬：KAPA Taq Extra PCR Kit（KK3009、日本ジェネティクス）
- ・ DNA 精製キット：Wizard Genomic DNA purification kit（プロメガ）
- ・ サーマルサイクラー：GeneAmp PCR システム 9700（アプライドバイオシステムズ）または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch*（タカラバイオ）
- ・ 電気泳動槽：Mupid-exu
- ・ 泳動用ゲル：agarose L03（5003、タカラバイオ）
- ・ ローディングバッファー：10× Loading Buffer（9157、タカラバイオ）
- ・ サイズマーカー：GeneDirex 100bp DNA Ladder RTU（GeneDirex 社）

### テンプレート DNA の準備

- ・ キットによる精製 DNA の場合、10ng/μl に調整したものを使用（長期保存する場合には精製した DNA が望ましい。-20℃ で保存）
- ・ アルカリ熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる。

#### アルカリ熱抽出

LB プロス培養液（o/n）200 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去  
50mM NaOH 170μl を添加  
100℃ -10min 加熱  
1M Tris-HCl（pH7.0）30μl を加え、3-4 回タッピング  
10,000g-10min 遠心  
上清をテンプレート DNA として使用

- ・ 熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる（長期保存には適していない）

#### 熱抽出

LB プロス培養液（o/n）1,000 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去  
TE バッファー250 μl を添加  
100℃ -10min 加熱  
10,000g-10min 遠心  
上清をテンプレート DNA として使用

## プライマー

表 1 および表 2 参照

### 反応液組成

|  | X1    | X22      |
|--|-------|----------|
| PCR grade water                                  | 14.42 | 317.24   |
| 5x KAPA Extra Buffer (without Mg <sup>2+</sup> ) | 6     | 132      |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                        | 3     | 66       |
| dNTP mix (10 mM each dNTP)                       | 0.9   | 19.8     |
| multiplex primer mix (表 2 参照)                    | 3.52  | (各 3.52) |
| KAPA Taq DNA polymerase (5 U/μl)                 | 0.16  | 3.52     |

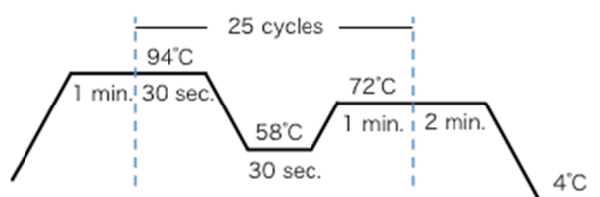
|              |            |            |
|--------------|------------|------------|
| Template DNA | 2          | 44         |
| Total        | 30 $\mu$ l | 30 $\mu$ l |

\*フルスクリーニング (MP-1~MP-20 + gyrB + ネガコン、計 22 反応チューブを使用) を行う場合は、プライマーを除く反応液 (X22) を調整し、PCR 反応チューブに 26.48  $\mu$ l ずつ分注後、プライマーミックス 3.52  $\mu$ l を加える。

\*gyrB プライマーも 3.53  $\mu$ l / 反応チューブに調整済み

## 反応条件

図 5、全反応に対して統一した反応条件



## 電気泳動

- 0.5  $\times$  TBE buffer / 2% アガロースで、35~45 分間泳動する。  
(増幅産物がゲル上で十分に展開できれば、他の方法でも問題無い)
- PCR 反応液 2  $\mu$ l をローディングバッファーと混和して泳動する。

## 増副産物の確認

エチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ml) 200ml で染色 (10 分間)、水洗 (10 分間) 後、UV トランスイルミネーター上で確認する。PCR 産物サイズと Og タイプの対応は表 2 参照。

## その他

- 十分に単離された菌株を使用する。
- 判定結果は Og タイプ (OgXX) で表記する。
- OgXX と O 血清群の対応は 1 対 1。OgGpXX と O 血清群の対応は表 1 参照。
- プライマーは 96 穴プレートに 100  $\mu$ l 程度小分けしたものを準備しておくで効率よく反応液の調整が行える。乾燥やコンタミには注意。井口研での操作手順は下図の通り。

図 6

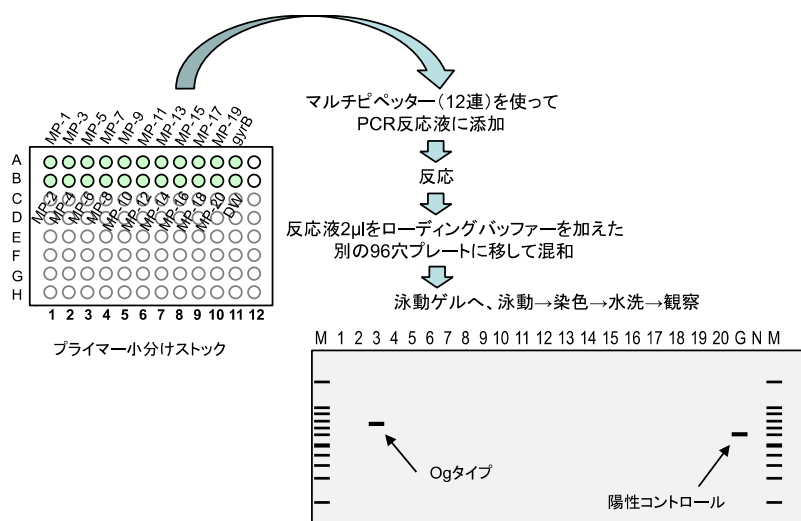
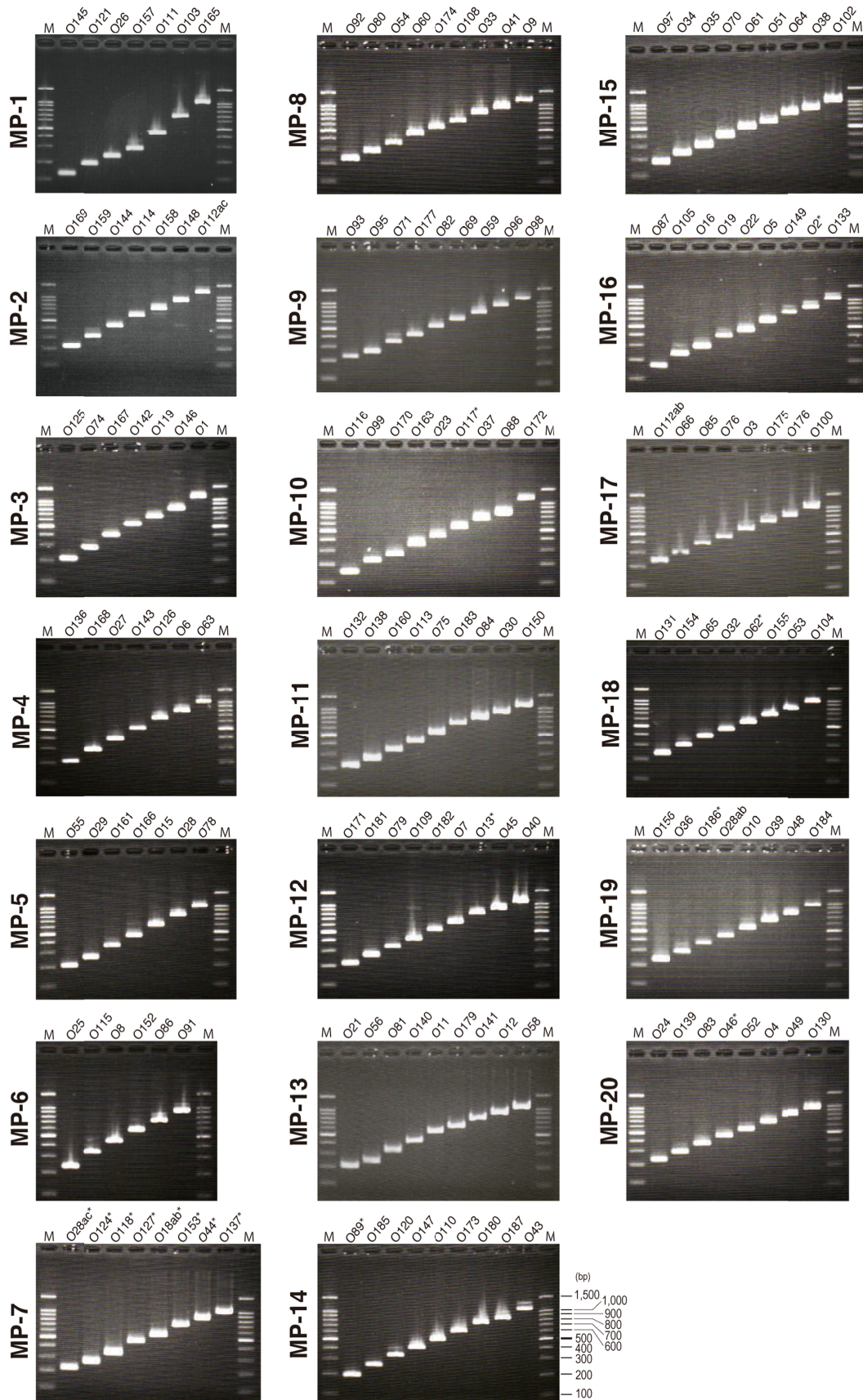


図7、MP-1 から MP-20 の泳動パターン



## 参考文献

**Iguchi A**, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. **A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster.** DNA Research 22(1):101-7 (2015)

**Iguchi A**, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. ***Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping.** Journal of Clinical Microbiology (Accepted)