平成 30~ 令和 2 年度 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)

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究 研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

Escherichia albertii の感染性・病原因子の解明 研究分担者 大岡唯祐 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科

研究要旨

新興下痢症起因菌 Escherichia albertii について、"感染性と病原因子の解 明"および"診断疫学マーカーの確立"を目的とし、これまでに取得したゲ ノム情報を用いて種特異的遺伝子群の網羅的な同定を行った。公開データ ベース上に登録されている 55株の E. albertii ゲノムから、本菌特異的な 遺伝子群の網羅的抽出を試み、同定された遺伝子群のうち、病原関連候補 12 遺伝子について遺伝子破壊株の作製と培養細胞への感染実験による病 原性を検討した。その結果、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えら れる遺伝子をいくつか同定した。さらに、その遺伝子群について発現条件 の解析を行った、高温、低栄養の条件下で発現が亢進することが明らかと なった。また、これとは別に、既知の病原因子である TccP について、配 列相同性の異なるバリアント(TccP4)を同定した。本菌の O 抗原合成系 遺伝子群コード領域(O-AGC)の多様性に関して、57株のゲノム配列の解 析を行い、本菌に O 抗原型が少なくとも 40 種類 (EAOg1-EAOg40) 存在 することを明らかにした。さらに、O-AGCに高度に保存されている wzx 遺 伝子の配列多様性を利用して PCR による O 抗原型タイピングツール (EAO-genotyping PCR)を開発した。鞭毛抗原(H抗原)の多様性に関し ても 243 株のゲノム情報を用いた解析を実施し、4 種類の fliC 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4)しか存在しないこと、いずれも本菌特有であることを明 らかにした。さらに、fliC 遺伝子の配列多様性を利用した EAHg 型タイピ ングツール (EAH-genotyping PCR) を開発した。

A. 研究目的

E. albertii は 2003 年に新たに命 名された新興下痢症起因菌の1つ である。近年、国内外で本菌の病原 性、特に下痢原性が周知され、海外 では食中毒発生リスクが懸念され ているが、既に日本では 2003 年以 降に食中毒が発生し、患者数 200 人 以上の事例も報告されている(日本 食品微生物学会雜誌 34;151-157, 2017)。*E. albertii* は、腸管病原性大 腸菌 (EPEC) や腸管出血性大腸菌 (EHEC) と共通の locus of enterocyte effacement (LEE 領域) に コードされる III 型分泌系などの病 原因子を保有することが分かって いるが、細胞侵入性を示すこと、集 団感染事例が多いなどの点で、 EPEC や EHEC と 感 染 性 や 病 原 機 構 などが異なる可能性が示唆されて おり、加えて、志賀毒素産生株によ る溶血性尿毒症症候群も発生して いることから、さらなる研究が求め られている。また、ニワトリ、ブタ、 ウシ、アヒルなど家畜において保菌 が報告されている (Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016)が、本菌の 発症菌量や主要な汚染食品は不明 である。

本研究では、本菌の感染性や病原 機構を理解し、より効果的に検出で きる検査法を確立することを目的 としており、それらを達成すること により、効果的な食中毒調査および 予防対策につなげることを最終目 標とする。

B. 研究方法

(1) 全ゲノム情報を基にした E.
 albertiiに保存されている遺伝子
 群の網羅的探索

これまでに取得している 29 株 の E. albertii 株の全ゲノム情報 (完全長配列3株、ドラフト配列 26株)、加えて、NCBI データベ ースに登録されている 26株(計 55株)について、国立遺伝学研究 所が提供している DFAST により 遺伝子アノテーションを行い、各 株の遺伝子レパートリーを同定 した。ドイツの患者由来株である CB9786株を参照株とし、遺伝子 長が 60%以上でありアミノ酸配 列相同性が 90%以上の保存性を 示す遺伝子を網羅的に抽出した。 また、同定された遺伝子群のうち、 他の *Escherichia* 属細菌に存在し ない遺伝子群も併せて検索した。

(2) 配列保存性の高い診断疫学マ ーカー候補遺伝子の抽出(図2 参照)

前出の *E. albertii* CB9786 株の 全ゲノム塩基配列に関して、 Escherichia 属細菌および近縁菌 種のゲノム塩基配列との比較を 行い、塩基配列相同性 80%以上の 配列が 100bp 以上保存されてい る領域を除去し、 E. albertii CB9786株にのみ存在する配列を 取得した。次に、E. albertii 55株 のゲノム情報に対して、塩基配列 相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定 した。最終的に、抽出された領域 に存在する遺伝子を検出し、塩基 配列保存性が 99%以上であるも のを診断疫学マーカー候補遺伝 子とした。

(3) 大規模ゲノム比較解析による
 E. albertii 特異的ゲノム特性の解明

NCBI データベース登録 57 株に 加え、EnteroBase website v1.1.2. (https:// enterobase.warwick.ac.uk) に登録されている 186 株の E. albertii 株について、全ゲノム高 精度進化系統解析と既知の E. albertrii 主要病原因子の保有状 況を調べた。進化系統解析は Prokkaでアノテーションした後、 Roary によりコア遺伝子の抽出 し、コア遺伝子全体で配列が同一 の 株 を 除 い て Maximumlikelihood tree を作成することに より行った。主要病原因子の検索 は、eae 遺伝子と eivG 遺伝子を、 それぞれ EPEC や EHEC の主要 病原因子である III 型分泌系をコ ードする locus of enterocyte effacement (LEE)領域と第2の III 型分泌系をコードするとされる ETT2 領域のマーカー遺伝子とし て、加えて、これまでに E. albertii の病原因子として同定されてい る stx2 遺伝子、cdtB 遺伝子、paa 遺伝子についてゲノム配列に対 する相同性解析を行い、保存性を 確認した。

(4)病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

遺伝子破壊には、当初、大腸菌
で汎用されている Wanner 法を採用したが、解析で用いた E.
albertii 株は2株ともプラスミド
や組換え用 PCR 産物などの DNA
取込効率が低かったため、
Wanner 法の改良を試みた。破壊
株の作製には全ゲノム配列決定
株であるヒト臨床分離株
HIPH08472株および EC06-170株、
トリ由来株である NIAH_Bird3株
の計3株を対象とし、標的遺伝子
をクロラムフェニコール遺伝子
(cat) と置換するため、各標的遺

伝子の前後の配列を含むプライ マーを用いて pKD3 プラスミド 上に存在する cat 遺伝子を PCR 増幅した。具体的には、相同組換 えにより遺伝子置換が可能とな るように、標的遺伝子の両末端約 50 bp の配列を付加したプライマ ーペアを設計した。PCR 増幅産物 を組換え酵素を発現するプラス ミドを形質転換した株に導入し、 標的部位への相同組換えにより クロラムフェニコール耐性を獲 得したクローンを取得した。取得 したクローンについては、標的部 位に正しく cat 遺伝子が挿入され ていることを標的周辺部に作成 したプライマーペアを用いた PCR により確認した。

(5)培養細胞への感染実験による 病原関連候補遺伝子の機能解析 項目(4)で作製した病原関連候 補遺伝子の遺伝子破壊株および 野生株について、各種培養細胞へ の感染実験を実施し、付着効率や 細胞生存能などへの当該遺伝子 の作用の有無を検討した。

 付着効率の検討:各菌株をLB 液体培地で一晩前培養し、24 well
 plate で confluent になるまで増殖
 させた培養細胞に MOI=10 で感
 染させた。感染後2時間で付着し

ていない菌を PBS により洗浄し、 新しい培地を添加後 2 時間でメ タノール固定・ギムザ染色を行い、 コロニー数をカウントした。 2) 細胞内生存能の検討:各菌株 を LB 液体培地で一晩前培養し、 24 well plate で confluent になる まで 増殖 させた 培養 細胞 に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加 後24時間した。その後、終濃度 200µg/mlの gentamicin で 15 分処 理することにより細胞外に存在 する菌を殺菌した。PBS で洗浄後、 1% Triton X-100 in PBS で処理す ることにより培養細胞を壊して 細胞内に存在する菌を放出させ、 クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に希釈液をまいて、37°C で16時間培養、コロニー数(培 養細胞内の生存菌数)をカウント した。

(6)病原関連候補遺伝子の発現条(6)病原関連候補遺伝子の発現条

各菌株を LB 液体培地で一晩前 培養し、異なる栄養条件(Tryptic Soy Broth [TSB]原液, 1/10 TSB 希 釈液)、培養温度 (37°C, 20°C)で 培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。昨年度の研究 において、付着能および細胞内生 存能への関与が示唆された病原 関連候補遺伝子を標的として、 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR (Takara)を用いてリアルタイ ム RT-PCR を実施し、ΔΔCt 法に より各培養条件における発現レ ベルを解析した。発現解析の内在 性コントロールには *rpoB* 遺伝子 を用いた。

(7) E. albertii における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の多様性および分布の解析

公開データベースに登録され ている *E. albertii* 243 株のゲノム 配列を対象として実施した。イン チミンをコードする eae 遺伝子 の多様性解析を行った。eae 遺伝 子は多様性が高いことが分かっ ているため、当該遺伝子の同定は その上下流に存在し、比較的配列 保存性の高い cesT 遺伝子, escD 遺伝子を blastn 解析により検出 して2遺伝子間の配列を抽出し、 IMC-GE (インシリコバイオロジ ー) ソフトウェアを用いて遺伝子 アノテーションを行った。インチ ミンサブタイピングには既知の インチミンサブタイプ 38 種類の アミノ酸配列に対する tblastn 解 析により実施し、95%未満の塩基 配列相同性を示した場合は新規 インチミンサブタイプと同定し た。

Tir および TccP はそれぞれ内部 および C 末端に複数のリピート 配列が含まれているため、ドラフ トゲノムから遺伝子の全長を得 ることが難しい。そのため、Tir に 関しては既知の Tir バリアント (V1-V5)の全長アミノ酸に対する 配列相同性 (97%以上)を、TccP (TccP1~TccP4 [TccP4 は本研究 で新たに同定])に関しては N 末 端 56 アミノ酸の配列相同性(97% 以上)を、それぞれ基準としてバ リアントタイピングを行った。

eae 遺伝子のサブタイプ, tir 遺 伝子および tccP 遺伝子のバリア ントについて株ごとの保有パタ ーンに規則性があるのかを調べ た。また、E. albertii 進化系統に おけるこれら 3 遺伝子の分布相 関についても解析した。

(8) 新規 TccP 様蛋白質[TccP4]の機能解析

項目(7)において同定された新 規 TccP バリアントをコードする *tccP4* 遺伝子を改良 Wanner 法に より遺伝子破壊した。遺伝子破壊 はヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を 保有)を対象とし、標的遺伝子を クロラムフェニコール耐性遺伝 子 (*cat*) あるいはカナマイシン耐 性遺伝子(kan)と置換するため、 各標的遺伝子の前後の配列を含 むプライマーを用いてそれぞれ pKD3 プラスミドと pKD4 プラス ミドに存在する cat 遺伝子と kan 遺伝子を PCR 増幅した。pSIM6プ ラスミドを形質転換した株に導 入し、標的部位への相同組換えに より耐性を獲得したクローンを 取得した。取得したクローンにつ いては、標的部位に正しく耐性遺 伝子が挿入されていることを標 的遺伝子周辺部に作成したプラ イマーペアを用いた PCR により 確認した。

作製した *tccP* 遺伝子バリアン ト(*tccP4* 遺伝子)の遺伝子破壊 株を Caco-2 細胞に感染させ、 TccP4を介したアクチン重合が起 こるかどうかを調べた。具体的に は、野生株および遺伝子破壊株を LB 液体培地で一晩前培養し、 DMEM 培地を入れた 24 well plate で confluent になるまで増殖させ た Caco-2 培養細胞に MOI=100 で 感染させた。感染 3 時間で付着し ていない菌を PBS により 3 回洗 浄し、新しい培地を添加後さらに
2時間培養したのち、4%パラホル ムアルデヒド in PBS 溶液で15分間固定した。PBS で3回洗浄後、
0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS 溶液で20分間膜処理をした。その後、DAPI(0.2µg/ml)溶液とActinstain 488 phalloidin 溶液でそれぞれ核とアクチンを染色し、蛍光顕 微鏡により観察した。

(9) E. albertii の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請 者が新たに決定したゲノム解析 株 57 株の配列情報について、0 抗原合成遺伝子領域(O-AGC)の 前後に存在することが分かって いる wcaM 遺伝子と hisI 遺伝子 を検索して O-AGC を同定し IMC-GE ソフトウェアを用いて 遺伝子アノテーションを行った。 既知の Escherichia/Shigella 属及 び近縁菌種の O 抗原合成遺伝子 領域との比較解析を行った。また、 *Escherichia/Shigella* 属の O 血清 群と類似した O-AGC を保有する 株については、該当する Escherichia/Shigella に対する O 血清を用いて交差性を確認した (図2)。

(10) EAO-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目(9)で同定した E. albertii の各 O-AGC に共通して保存され ている O-antigen flippase をコー ドする wzx 遺伝子ついて E. *albertii* 内および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で 見られる配列多様性を利用し、 PCR による O 抗原遺伝子型タイ ピングツール (EAO-genotyping) PCR)の開発を行った。また、そ のプライマーセットの中に E. *albertii* を特異的に検出可能なプ ライマーペアを加えることで、E. albertii の同定も同時に行うこと のできる検出系とした。構築した 検出系の検討として、日本国内で トリおよびヒトから分離された E. albertii 92 株を用いて EAOgenotyping PCR を行い、さらにデ ータベース上に登録されている 186 株のゲノム情報に対してプ ライマー配列を用いた in silico EAO-genotyping を実施すること により、本ツールの検出感度を検 討した。

(11) E. albertiiのH 抗原型の多様性解析

NCBI/GenBank/DDBJ などの公 開データベースに登録されてい る E. albertii 243 株のゲノム配列 を対象にフラジェリンをコード する fliC 遺伝子の多様性解析を 行った。実際には、fliC遺伝子は 多様性が高いため、その上下流に 位置し、大腸菌においても配列保 存性が高いとされている fliA/fliD 遺伝子を blastn 解析により検出 し、両遺伝子間の領域に含まれる fliC遺伝子を同定した。同定され た E. albertii の fliC遺伝子と既知 の大腸菌のフラジェリンコード 遺伝子との比較解析を行った。

(12) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目(11)で同定した E. albertii の各 fliC 遺伝子型について、その 配列多様性を利用し、PCR による H 抗原遺伝子型タイピングツー ル(EAH-genotyping PCR)の開発 を行った。また、そのプライマー セットの中に E. albertii を特異的 に検出可能なプライマーペアを 加えることで、E. albertii の同定 も同時に行うことの出来る検出 系とした。構築した検出系の検討 として、日本国内でトリおよびヒ トから分離された E. albertii 92 株を用いて EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

C. 研究結果

(1)全ゲノム情報を基にした種特 異的遺伝子群の網羅的探索

解析の結果、E. albertii に保存 性される遺伝子が 55 遺伝子同 定された。その中には、宿主細 胞接着への関与が考えられる繊 毛タンパク、蛋白分解酵素、III 型分泌装置により宿主細胞へ分 泌されるエフェクターのホモロ グ、細胞膨化致死毒素など既知 の病原関連因子の遺伝子ホモロ グが9個、また、フマル酸代謝 や基質輸送に関わる遺伝子群な どの遺伝子ホモログが2個、加 えて、機能未知の遺伝子も数多 く含まれていた。

(2) 配列保存性の高い診断疫学 マーカー候補遺伝子の抽出

E. albertii に特異的な領域と して、まず当研究グループで実 施した 29 株の比較解析および 近縁菌種とのゲノム比較解析か ら、118 領域(計 71,280 bp)を 抽出しており、本研究ではそこ に含まれる 34 遺伝子を解析対 象とした。NCBI データベースに 登録された E. albertii 26 株に対 して、blastn により各遺伝子の 保有および配列保存性を確認し た。その結果、全 55 株に共通し、 99%の塩基配列保存性を示す遺 伝子を計9個、診断疫学マーカ 一候補遺伝子として同定した。

(3) 大規模ゲノム比較解析による
 E. albertii 特異的ゲノム特性の解明

計 243 株のゲノム情報を基に、 全ゲノム高精度系統解析と主要 病原因子の分布の解析を行った。 系統解析の結果、*E. albertii* は大 きく 2 つのクレードに分かれる こと、分離地や分離源と系統関 係には相関がないことも明らか となった。主要病原因子の分布 についての解析からは、eae 遺伝 子(LEE 領域)と cdtB-II/III/V サ ブタイプ、paa遺伝子がほとんど の株で保存されており、過去の 分離株を用いた報告と一致して いた。第2の III 型分泌系をコー ドする ETT2 領域についても、ほ とんどの株でその領域が欠失し ている E. coli とは異なり、保存 性が高いことも明らかとなった。 また、過去の報告において、一部 の株で保有が示されている stx2 遺伝子が異なる系統に属する E. *albertii* 株において検出されるこ と、その保有と cdtB-I サブタイ プとの分布に相関が見られるこ とも明らかとなった(図2)。

(4)病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

E. albertii は DNA の形質転換 効率および DNA 組換え効率が 大腸菌と比べて低いため、比較 的、形質転換効率の高いヒト臨 床 由 来 EC06-170 株 と HIPH08472 株、トリ由来 NIAH Bird3株の3株に変更し、 加えて、形質転換した PCR 産物 の分解を抑制する酵素等を発現 させるプラスミドを使用するこ とにより、遺伝子破壊株を効率 良く取得できるようになった。 それにより、病原関連候補遺伝 子7遺伝子について、3株すべ てで破壊株を作製することがで きた。

(5)培養細胞への感染実験による 病原関連候補遺伝子の機能解析 項目(1)で作製した病原関連 候補遺伝子の遺伝子破壊株およ び野生株を用いて、培養細胞に 対する感染実験の実施を試みた 結果、付着および細胞内生存能 に関連すると考えられる遺伝子 を複数同定した(未公表データ のため詳細略)

(6) 病原関連候補遺伝子の発現条

件検討

宿主細胞への付着、細胞内生 存能に関わることが明らかとな った病原関連候補遺伝子につい て、リアルタイム RT-PCR を用 いた mRNA 発現の解析を行った。 その結果、付着および細胞内生 存能に関わることが示唆された A, B, C, D 遺伝子群が 37°C, 1/10 TSB 希釈液(高温・低栄養)の 培養条件下において mRNA レベ ルでより高い発現を示すことが 明らかとなった(図 3)。現在、 当該遺伝子の中でも細胞内生存 能に関わる可能性が示唆されて いる新規病原候補A遺伝子につ いて、ペプチド抗体を作製し、 タンパク質レベルでの発現と菌 体および感染細胞内での挙動に 関する解析を進めている。

(7) E. albertii における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の多様性

<u>インチミン</u>: 243 株のうち 241 株が eae 遺伝子陽性であり、その うちの 224 株が既知のインチミ ンサブタイプの中の 20 種類 (α8, β1, β3, ε1, ε3, ε4, ι2, ν, ξ, ο, ρ, σ1, σ2, τ, υ, N1, N2, N3, N4, N5) の うち、いずれかを保有していた。 残り 19 株うち、17 株には 3 種類 の新規サブタイプと N1 のバリ アントが含まれており、2 株は eae 遺伝子がスプリットしてい たため、サブタイプを同定出来 なかった。検出数の多かったサ ブタイプは、σ1 (62 株),12 (28 株),σ2 (21 株) であり、これら 3 つのサブタイプが E. albertii に 多いタイプであることが明らか となった (表 1)。

Tir: 243 株のうち 241 株が tir 遺伝子陽性であり、相同性解析 の結果、バリアントが 5 タイプ (V1, V2, V3, V4, V5) に分かれ ること、それぞれ 51 株, 21 株, 47 株,10株,112株であり、E. albertii では V1, V3, V5 が主要な バリアントであることが明らか となった(表 2)。また、この5つ のバリアントのうち、V1, V2は、 AE lesion 形成に先立つアクチン 重合形成において LEE 領域に III 型分泌系により宿主細胞へ移行 するエフェクタータンパク質の 1つである TccP を必要とするタ イプ (EHEC タイプ[Tir-Nck 非依 存的]) であり、V3-V5 は TccP を 必要としない (EPEC タイプ[Tir-Nck 依存的]) タイプであること も明らかとなった。

<u>TccP</u>: TccP はこれまで 3 つのバ リアント (TccP1, TccP2, TccP3) が同定されていたが、本解析に より新規バリアントとして TccP4 を同定した。243 株におい て、TccP1-TccP4 はそれぞれ、119 株,63 株,7 株,133 株が保有して おり、TccP1 と TccP4 が *E. albertii* において高頻度に分布している ことが明らかとなった (表 2)。

(8) E. albertii における付着因子イ ンチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の 分布

tir 遺伝子と eae 遺伝子を保有 する 241 株のうち 215 株(89.2%) が TccP バリアントを 1-3 コピー 保有していることも明らかとな った(表 3)。ここで、Tir が EPEC タイプであり TccP を保有しない Tir-Nck 依存的経路を示す株、Tir が EHEC タイプであり TccP を保 有する Tir-Nck 非依存的経路を 示す株、Tir が EPEC タイプであ りかつ TccP も保有する両経路を 使える株は、それぞれ、25株,71 株,144 であり、1 株のみどの経 路も使えない株が存在した(表 3)。また、全ゲノム高精度系統樹 にインチミン、Tir、TccPの分布

をプロットした結果、インチミ ンタイプ、Tirタイプ、TccPタイ プともに分布に系統的な相関は 見られなかった。また、大きく系 統の異なる clade1 と clade2 に同 じインチミンタイプが存在した ことから、種内で LEE 領域が水 平伝播しているあるいは eae 遺 伝子が組換えを起こしている可 能性が示唆された(図 4)。

(9) TccP バリアント(TccP4)の機能解析

本解析で新たに同定した TccP4 について、Tir-Nck 非依存的経路 を示す EHEC タイプの Tir を持 ち、TccP4 バリアントを保有する ヒト臨床分離株 K7756 株 (tccP4 遺伝子と tccP1 遺伝子を保有)を 用いて、遺伝子破壊株を用いた TccP4 の機能解析を行った。その 結果、tccP4 遺伝子および tccP1 遺伝子の両方を破壊した株にお いても Caco-2 細胞においてアク チン重合が観察された。

(10) E. albertii の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請 者が決定したゲノム解析株計 57 株について、O-AGC を同定、ア ノテーションを行った結果、*E*. albertii 株間の比較から、O-AGC は 40 種類 (EAOg1-40) に分かれ ることが明らかとなった(図 5)。 また、同定された O-AGC を Escherichia/Shigella 属の O-AGC と比較した結果、25種類(EAOg3, EAOg6, EAOg8, EAOg9-30) が Escherichia/Shigella 属の O-AGC と同じ遺伝子セットを保有して いた。中でも、特に7種類 (EAOg9-15) は塩基レベルで 98%以上の相同性を示し、E. albertii と Escherichia/Shigella 属 の全ゲノムレベルでの塩基配列 相同性が 90%程度であることか ら、これらの菌種間で O-AGC が 頻繁に水平伝播していることが 考えられた。また、E. coli や Shigella の O-AGC と遺伝子セッ トが類似し、配列相同性の高い O-AGC を保有する E. albertii は 該当する O 血清と交差反応を示 すことも明らかとなった(図 6)。

(11) EAO-genotyping PCR の開発 および実用性の検討

項目(10)で同定した 40 種類 の O-AGC に保存される wzx 遺伝 子の配列を抽出し、近縁菌種の wzx 遺伝子との系統解析を行っ た。その結果、O 抗原型間で wzx 遺伝子に塩基配列多様性がある ことが明らかとなった(図 7)。 そこで、この配列多様性を利用 し、40 種類の EAO 型を識別でき るプライマーセット (3 セット) を構築した。また、その中には E. coli や Shigella の wzx 遺伝子との 識別が出来ないものも存在した ことから、3プライマーセットそ れぞれに E. albertii 特異的遺伝 子領域を検出可能なプライマー セットを 1 組ずつ加え、O 抗原 型と種同定の両方が可能なシス テムとした (図 8,9)。このシス テムの有効性を検討するため、 国内および海外分離株(計278株) について、実際の PCR およびプ ライマー配列の相同性検索によ る in silico EAO-genotyping を実 施した結果、229株(82.4%)の EAO 型を同定することが出来た (図 10)。

(12) E. albertiiのH 抗原型の多様性解析

解析した 243 株のうち、215 株 において *fliC* 遺伝子を同定でき た。遺伝子多様性を解析するた め、既知の大腸菌 H 抗原(H1-H56 [H13, H22, H50 は欠番])のフラ ジェリンコード遺伝子との系統 解析を行った結果、*E. alberti*iの *fliC* 遺伝子は大腸菌のものとは 異なることが明らかとなった (図 11)。*E. albertii*の*fliC*遺伝 子のみで再解析した結果、本菌 には大きく 4 つの fliC 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在するこ とが明らかとなった(図 12)。 EAHg1-EAHg4を保有する株はそ れぞれ 54 株, 22 株, 46 株, 92 株 であり、E. albertii においては EAHg4 が高頻度に検出されるこ とがわかった。また、各 EAHg 型 が E. albertii 進化系統において どのように分布しているかを調 べて結果、各型が異なる進化系 統に散在していることが明らか となり (図 13)、*fliC* 遺伝子およ び鞭毛抗原遺伝子群が種内で頻 繁に組換えを起こしている可能 性が示唆された。

(13) EAH-genotyping PCR の開発 および実用性の検討

項目 (12) で同定した 4 種類の EAHg 型の配列多様性を利用し、 4 種類 EAH 型を識別できるマル チプレックス PCR 系を構築した。 また、その中には *E. albertii* 特異 的遺伝子領域を検出可能なプラ イマーセットを 1 組加え、H 抗 原型と種同定の両方が可能なシ ステムとした (図 14)。このシス テムの有効性を検討するため、 国内ヒト臨床分離株およびトリ 由来株(計92株)について、実 際のPCRを実施した結果、全株 のEAH型を同定することができ た。EAHg1-EAHg4はそれぞれ29 株,18株,15株,48株であり、in silicoで実施した215株での解析 結果と同様にEAHg4が高頻度に 存在することが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本研究では、E. albertii に特異的 な遺伝子群(特に病原関連遺伝子) や共通するゲノム領域を同定し、 本菌の病原機構解明と診断疫学マ ーカー同定、さらにそれを利用し た診断疫学ツールの開発を目的と して解析を進めた。

病原関連候補遺伝子の機能解析 については、当該遺伝子の破壊株 を作製し、宿主細胞への感染実験 により付着および感染細胞内増殖 能に関わる遺伝子を同定すること を目的としたが、E. albertiiの DNA 取り込みおよび組換え効率が非常 に低かったことから、遺伝子破壊 株の作製法改良などに時間を要し、 実験計画が遅れた。遺伝子破壊株 作製法の改良により、令和元年度 以降は順調に遺伝子破壊を行うこ とができ、その後の培養細胞への 感染実験による機能解析で付着お よび感染細胞内増殖能に関与する 遺伝子を同定することに成功した。 また、これら病原関連遺伝子の発 現条件を明らかにすることも出来 たが、抗体を用いたタンパク質レ ベルでの細胞内分布など、さらな る解析が必要である。また、これ らのタンパク質が作用する宿主側 因子についても同定を進める必要 がある。

EPEC や EHEC と 共通な 既知の 病 原因子として III 型分泌系とその エフェクタータンパク質に関連し た E. albertii での多様性解析およ び EHEC/EPEC との比較解析も進 め、E. albertii の種としての特徴も 見いだすことが出来た(論文投稿 準備中)。本解析で新たに同定され た新規 TccP バリアント (TccP4) に関して、遺伝子破壊株を用いた 機能解析を実施したが、遺伝子破 壊株においてもアクチン重合が観 察された。ここで、K7756株はド ラフトゲノム解析株であり、全ゲ ノム情報が明らかになっていない ため、TccP バリアントが他にも存 在する可能性が示唆されるため、 現在ナノポアシーケンスシステム MinION により全ゲノム配列の決 定を行い、他のバリアントの存在 有無を確認する必要がある。

ゲノム特性を利用した診断疫学 ツールの開発に関しては、本菌に おける O 抗原および H 抗原の多 様性を明らかにし、それぞれの違 いを利用したマルチプレックス PCRによる疫学ツールを構築する ことが出来た。O-AGC 解析では、 40 種類の EAO 型を同定したが、 約300株のゲノムおよび分離株を 用いた解析の結果、O抗原型を同 定出来ないものもあったため、今 後、多様性に関してさらなる解析 が必要であると考えられる。H抗 原に関しては、4種類の EAH 型を 同定し、さらに解析株約300株全 ての遺伝子型を同定することが出 来た。国内外の分離地域や由来の 異なる株を対象にした解析の結果 であることから、今後、解析対象 を増やして確認する必要はあるも のの E. albertii においては H 抗原 型の多様性はそれほど高くない可 能性が示唆された (論文投稿中)。

E. 結論

E. albertii の特性を解明するに あたり、本菌特異的遺伝子の特定 とそれを利用した疫学ツールの開 発を行うことが出来た。病原因子 に関しても本菌特異的因子を同定 することが出来たが、遺伝子破壊 株作製法の改良に時間を要したこ と、また、当該遺伝子の抗体作製 に苦慮したことなどから、機能解 析を完了することが出来ず、論文 化には至らなかった。今後、これ までの解析で得たデータをまとめ て学会発表を行うとともに、国際 科学雑誌での論文化を進める必要 がある。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

- G. 研究発表
 - 1. 論文発表

• <u>T. Ooka</u>, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of Escherichia albertii: their diversity and similarity to E. coli gene clusters and the development of an O-genotyping method. Microb. Genom, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.

• 大 岡 唯 祐 : 新 興 下 痢 症 起 因 菌

Escherichia albertii の特徴. 食品衛生研究. 70:19 – 35. 2020.

- 2. 学会発表
 - ・大岡唯祐,勢戸和子,小椋義 俊,井口純,中村佳司,後藤恭 宏,藺牟田直子,本田己喜子, 池田徹也,杉谷和加奈,今野貴 之,河野喜美子,<u>工藤由起子</u>, 村上光一,林哲也,西順一郎: 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii*のO抗原合成系の多様 性と遺伝子タイピング法の開 発.第23回腸管出血性大腸菌 感染症研究会(一般演題),松 山,2019.
- ・ <u>大岡唯祐</u>: ゲノムから見えてき た 新 興 下 痢 症 起 因 菌 *Escherichia albertii*の特性とそ の応用. 第 93 回日本細菌学会 総会(ワークショップ),名古 屋,2020.・大岡唯祐:新興下痢 症起因菌 *Escherichia albertii*に よる最近の食中毒の状況と検 査法. 令和 2 年度鹿児島県獣医 公衆衛生講習会,鹿児島,2020.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
 - 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

その他
 なし

表1:243株のインチ	ミンサブタイプ		
サプタイプ	株数		
αl (alphal)	0		
α2 (alpha2)	0		
α8 (alpha8)	6		
β1 (beta1)	12		
β2 (beta2)	0		
β3 (beta3)	7		
ε1 (epsilon1)	3		
ε2 (epsilon2)	0		
ε3 (epsilon3)	11		
ε4 (epsilon4)	2		
η (eta)	0		
η2 (eta2)	0		
γl (gammal)	0		
γ2 (gamma2)	0		
11 (iota1)	0		
12 (iota2)	28		
к (kappa)	0		
λ (lambda)	0		
μ (mu)	0		
v (nu)	12		
o (omicron)	11		
π (pi)	0		
ρ (rho)	15		
σ (sigma)	62		
-	21		
τ (tau)	5		
θ (theta)	0		
ξ (xi)	10		
υ (ypsilon)	1		
ζ (zeta)	0		
ζ3 (zeta3)	0		
C. rodentium	0		
N1.1	4		
N1.2	1		
N1.3	1		
N2	8		
N3	1		
N4	1		
N5	2		
N6 (新規)	1		
N7 (新規)	1		
N1.4 (新規)	3		
N8 (新規)	10		

表2 TirバリアントタイプとTccPバリアントの分布								
Tinタイプ	バリアント	株数						
111947	タイプ	計	TccP1	TccP2	TecP3	TccP4		
EHECタイプ	V1	51	47	1	0	32		
	V2	21	14	11	1	21		
	V3	47	1	42	5	42		
EPECタイプ	V4	10	1	1	0	8		
	V5	112	55	8	1	30		
非保	有	2	1	0	0	0		
計		243	119	63	7	133		

表3:TirタイプとTccPコ	ピー数の相関	関					
Tinタイプ	ᅪ	TccPバリアントのコピー数					
111/1/2	рI	0コピー	1コピー	2コピー	3コピー	4コピー	
EHECタイプ (V1, V2)	72	1	22	42	7	0	
EPECタイプ (V3, V4, V5	169	25	86	51	7	0	
Tir非保有	2	1	1	0	0	0	
‡r	243	27	109	93	14	0	



図1:O抗原コード領域解析のフローチャート



図 2:225 株の E. albertii 全ゲノム高精度進化系統樹および主要病原因子の分布



図3:異なる培養条件でのリアルタイム RT-PCR 結果



図4: E. albertii 進化系統における Tir および TccP の分布

nenotyne name	
SP140128*	
EAUgi NIAH Bird 2	(wcaM) galf
	galF wzx1 wzy 2 2 gmd_fcl_gmmmanC_2 manB_gnd_ugd
EAOr 1 IEC05-160	
EAU82 94389	wzy z z gino ici gininimarc z mans gilo ugo wzz hisi
1K020110014	galF 1 UT folA 1 wzy wzx 4 and ugd
FΔΩα? SP140148*	
LAUGO 24 EC03-127	(WCam) gair i OT min i Wzy Wzx 4 grid ugo Wzz
	galF_milB_milD_milA_gmd_fcl_gmm_manC_manB_milC_wzxwzy_6_2_1_galE_gnd_
EAnd INIAH_Bird 24	(weak cale mile mile and fc) commance mane mile way way 6, 2, 1, cale and und way bis
LAUg4 KF1 2010C-3449	
C CD4 40C40t	galf wzx wzy UT 1 glf 2 gnd ugd
	(wcaM) gne galF wzx wzy UT 1 glf 2 gnd ugd wzz hisl
	(weak) gne galF wzx wzy UT 1 glf 2 gnd ugd wzz hisl
L N//44	
EAOg6 L ^{SP140674*}	
ZG141049*	galF_nnaD_nnaB_nnaC_nnaA_wzx_52_wzy_1_glf_2_gnd_ugd
EC03-195	(wcaM) gne galF nnaDnnaB nnaC nnaA wzx 52 wzy 1 glf 2 gnd ugd wzz hisl
FΔOr7 CB10113	(wcaM) gne galF nnaDnnaB nnaC nnaA wzx 52 wzy 1 glf 2 gnd ugd wzz hisl
LAUSI 11301-2 NDDC107761	(wcaM) gne galF nnaDnnaB nnaC nnaA wzx 52 wzy 1 glf 2 gnd ugd wzz
	(weak) ane calF nnaDnnaB nnaC nnaA wix 52 wizy 1 alf 2 and uad wizz hisl
TW07627	
LV0-0 L HK18060+	grie 4 griu manc manb with 1 2 of with grid grid
EAUgo NIAH Bird 5	(wcah) grie gair 14 gria man man wxx 11 2 01 wy gaiz gria 2 dga wzz nisł
	(wcaM) galFwzx _wzy _25_wbwF _1_fnIA_qnIA_qnIB1wbwl _gnd _ugd _wzz hisi
EAOg9	(wcaM) galF wzx wzy 25 whwF 1 fnlA gnlA gnlB 1 (wbwl) gnd ugd wzz hisl
NCTC 9362	
FA0010 2013C-4143	(wcaM).galFUT_UTwzxwzy4_UT_glfgndugd_wzz_hisl
LAOGIO MODI-EC1724	
EAOg11 E G-3-3al	(wcaM) galF wzx UT wzy UT gnd ugd wzz
FΔΩα12 Γ 13538	(wcaM) galF wzx 2 wzy 2 mlB mlA gnd ugd wzz hisl
	(wcaM) gne galF milB milA wzx UT wzy 1 gmd fcl gmm manC 2 manB gnd ugd wzz hisl
EAUg 13 L NIAH_Bird 16	
EAOg14 [ZZG 12-3	(wcaM) galF mlB mlD mlAmiC wzx 1 2 wzy 1 1 manC manB gnd ugd wzz his
FΔOσ15 C 2012EL-1823B	(wcaM) galF rmlB rmlD rmlA rmlC 4 manC manB wzx 2 wzy 1.4 gnd ugd wzz hisl
L/ togit E	(wcaM) galF mlB mlA wzx 2 1.4 wzy 1.4 2 galE gnd ugd wzz hist
LAURIOI	(weak) cale mile mile wzy 2 1.4 wzy 1.4.2 cale and und
LAUGIU 20H38	(wcaM) galF milB milA wzx 2 1 4 wzy 1 4 2 galE gnd ugd
EAOg17 [20H38	(wcah) galF mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galE grd ugd (wcah) galF wzy 4 1.1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz his
EAOg17 [20H38 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPHRA72	(wcah) galF mlB mlA wzz 2 14 2 galE gnd ugd (wcah) galF wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisi (wcah) galF mlB mlD mlAmlCWbsx wzx wzy 2 1 14 manC manB gnd ugd wzz hisi
EAOg17 E P6-1 al EAOg18 E HIPH08472	(wcah) galF mlB mlA wzx 2 14 2 galE gnd ugd (wcah) galF wzy 4 1 1 manC manB UT wzx 2 gnd ugd wzz hisl (wcah) galF mlB mlD mlAmlCWbsX wzx wzy 2 1 14 manC manB gnd ugd wzz hisl (wcah) galF mlB mlD mlAmlC wzx 2 wzy 2 1 opd ugd wzz hisl
EAOg17 [20H38 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-30-1	(weak) galf mB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf grd ugd (weak) galf mB mlA mlC was wzz 2 grd ugd wzz hisl (weak) galf mB mlD mlAmlCVbsX wzz wzy 2 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weak) galf mB mlD mlAmlCVbsX wzz wzy 2 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weak) galf mB mlD mlAmlCVbsX wzz wzy 2 4 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weak) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz wzy 2 4 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weak) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz wzy 2 4 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl
EAOg17 E P6-1 al EAOg18 E HIPH08472 EAOg19 E U-30-1 EAOg20 E NIAH_Bird 3	(weah) galf mIB mIA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd (weah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mIB mID mIA mICWbsx wzz wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mIB mID mIA mICWbsx wzz wzy 2 1.1 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mIB mID mIA mICWbsx wzz UT wzy 2 1.4 gnd ugd wzz hisi
EAOg17 [20138 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-30-1 EAOg20 [NIAH_BIRG 3 EAO_01 [E005-44	(wcah) galf mIB mIA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd (wcah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 grd ugd wzz hisi (wcah) galf mIB mID mIAmICWbsX wzz wzy 2 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisi (wcah) galf mIB mID mIAmIC wzz 2 wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisi (wcah) galf mIB mID mIAmIC wzz 2 wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisi (wcah) galf mIB mID mIAmICWbsX wz UT wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisi (wcah) galf mIB mID mIAmICWbsX wz UT wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisi
EAOg17 [20H38 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-30-1 EAOg20 [NIAH_BIrd 3 EAOg21 [E00544 NIAH_BIrd 8	(wcah) galf mmB mnlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf gnd ugd (wcah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisi (wcah) galf mmlB mnlD mlA mlCNbsx wzz wzz wzz 1 1.4 manC manB gnd ugd wzz hisi (wcah) galf mmlB mnlD mlA mlCNbsx wzz 2 wzz 2 1 1.4 manC manB gnd ugd wzz hisi (wcah) galf mmlD mlA mlCNbsx wzz 2 2 gnd ugd wzz hisi (wcah) galf mmlD mlA mlCNbsx wzx 2 2 gnd ugd wzz hisi (wcah) galf wzx fnlA 2 wzy 2 gnd ugd wzz hisi (wcah) galf wzx fnlA 2 wzy 2 gnd ugd wzz hisi
EAOg10 [20138 EAOg17 [P6-1a] EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-36-1 EAOg20 [NAM_Bind 3 EAOg21 [NAM_Bind 8 EAOg21 [NAM_Bind 8 EAOg22 [HIPH1233	(weah) galf mmB miA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf miB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf miB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf miB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf wzx fniA 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf wzx fniA 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl
EAOg17 [2488 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U36-1 EAOg20 [NAH_BHd3 EAOg20 [NAH_BHd3 EAOg22 [HIPH1238 EAOg22 [HIPH1238	(weah) galf mrIB mrIA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galE grd ugd (weah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrID mIA mrIC/Wbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrIA wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mrIB mrIA wzx 2 2 wzy 4 grd UT ugd wzz hisl
EAOg17 [24438 EAOg17 [26-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-36-1 EAOg20 [MAH_BIrd 3 EAOg20 [MAH_BIrd 3 EAOg21 [EC05-44 NAH_BIrd 8 EAOg22 [HIPH1233 EAOg22] [7-3866	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd (weah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbbX wzx wzy 2 ml 1 4 manC manB gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wzx UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wzx UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wzx UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wzx UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wz 1 1 galf gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbX wz 1 1 manC manB and ugd wzz hisi
EAUGITU 2013 EAUGIT E P6-1 al EAUGITS E HIPHOBATZ EAUGITS E U36-1 EAUG2D E NUAH Bird 3 EAUG2D E NUAH Bird 3 EAUG2D E HIPHT233 EAUG22 E HIPHT233 EAUG22 E 07-386 EAUG22 E NUAH Bird 23	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wzz Wzy 2 y 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz Wzy 2 y 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz 0 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wlaz wfA wflB UT wzy 1 1 manG manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wlaz wfA wflB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wlaz wfA wflB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wlaz wfA wflB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisl wz hisl (weah) galf mlB mlA wz 2 2 wz wfA wflB UT wzy 1 1 manG wz 2 grd ugd wzz hisl
EAG910 29438 EAO917 E P6-1 al EAO918 E HIPH08472 EAO919 E U-36-1 EAO920 E NUAH Bird 3 EAO921 E E05-44 EAO921 E HIPH12338 EAO922 E HIPH12338 EAO9224 E NUAH Bird 23 EAO9242 E NUAH Bird 23 EAO925 E FCJEC468	(weah) galf mmB miA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd (weah) galf mmB miD miA miCVbbsX wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbbsX wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbbsX wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx 10 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA miCVbsX wzx 10 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA wzx 2 2 wzy UT 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA wzx 2 2 wzy 4 grd UT ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA wzx 2 2 wzy 4 grd UT ugd wzz hisi (weah) galf mmB miD miA wzx 1 4 grd felgmmmanC 2 manB grd ugd wzz hisi
EAOg17 [24438 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U36-1 EAOg20 [NAH_Bird 3 EAOg22 [HIPH1233 EAOg22 [HIPH1233 EAOg22 [HIPH1233 EAOg23 [07386 EAOg24 [NAH_Bird 3 EAOg25 [F04E048 EAOg25 [F04E048	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf god ugd (weah) galf mlB mlA mlCVbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx uT wzy 2 1.4 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx uT wzy 2 1.4 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx uT wzy 2 1.4 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx uT wzy 2 1.4 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA mcVbsx wzx uT wzy 2 2 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 2 2 god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 1 1 1 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 1 1 1 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 1 1 1 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 1 1 1 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 1 1 1 manC manB god ugd wzz hisi (weah) galf wzz 1 wzy 2 2 god ugd wzz hisi
EAUGITU 24438 EAUGITZ EACTOR EAUGITZ EAUGITU U34-1 EAUG20 E NUAH Bird 3 EAUG21 E E054-4 EAUG22 E HIPH1233 EAUG22 E HIPH1233 EAUG22 E F0-E0488 EAUG22 E F0-E0488 EAUG22 E F0-E0488 EAUG22 E F0-E0488 EAUG22 E E04E048 EAUG22 E F0-E0488	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd (weah) galf wzy 4 1 1 manC manB UT wzz 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wzz wzy 2 1 1 4 manC manB gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wzz UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wzz UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 1 4 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz UT wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz 1 wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz 1 wzy 2 2 gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWbsX wz 1 wzy 2 1 1 manC manB gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWb wz wiez hisi 1 wzy 1 1 manC manB gnd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCWb wz wz 1 wzy 2 1 2 galf gnd ugd wzz hisi
EAGET E 2013 EAGET E P6-1 al EAGET E P6-1 al EAGET E 1040-12 EAGET E 1040-12 E 1	(weah) galf mlB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx wzy 2 14 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx uT wzy 2 14 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 14 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 14 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx UT wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wiz 0 2 wzy 0 1 1 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wiz 0 2 wzy 0 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wiz 0 2 wzy 0 2 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wiz 0 2 2 wzy 0 0 1 1 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wiz 0 2 2 wzy 0 0 1 1 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wiz 0 2 2 2 galf galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wz 0 1 0 wzy 0 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz 0 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz 0 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz 0 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz 0 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz 0 2 1 2 galf gad dugd wz 0 hisi
EAGET E 24438 EAOET E P6-1 al EAOET E P6-1 al EAOET E 14440000 EAOET E 144400000 EAOET E 1444000000 EAOET E 1444000000000000000000000000000000000	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx wzy 2 1 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1 1 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzy UI 1 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfa wffA wffB UI wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wfa wffA wffB UI wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wz 2 1 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wfa wffA wffB UI wzy 2 1 0 wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz w 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz w 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wz 1 wzy 2 1 2 grd ugd wz hisl (weah) galf wz wz 0 wz 0 z 1 2 grd ugd wz hisl (weah) galf wz wz 0 z 1 2 grd ugd wz hisl
EAG910 20138 EAO917 E P6-1 al EAO918 E HIPH08472 EAO919 E U-36-1 EAO920 E NAM-Bird 3 EAO922 E HIPH1233 EAO922 E HIPH1233 EAO923 E 07-586 EAO924 E NAM-Bird 23 EAO926 E E2675 EAO926 E E2675 EAO927 E K1384 EAO928 E 2014C-4356 EAO929 E NAM-Bird 23	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx 4 grd UT ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx 4 grd UT wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx 1 wzy 2 2 wzy 1 1 2 galf grd (weah) galf mlB mlD mlAmiCVbsx wzx wyz 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzx wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi
EAUGITU 2013 EAUGITU 2013 EAUGITU 2014 EAUGITU 2014 EAUGI	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz wzy 2 1.4 1 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wzz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wz UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbax wz 1 max 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzy UT 1 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wioz wifa wfB UT wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wizz 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wizz 1 wzy 2 1 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz 1 wzy 2 1 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz 1 wzy 2 1 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz 1 wzy 2 1 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd grd wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) grd wzz wzy wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (w
EAGET E ANSA EAGET E P6-1 al EAGET E P6-1 al EAGET E HIPHOSATZ EAGET E U36-1 EAGET E U36-1 EAGET E HIPHOSATZ EAGET E HIPHOSATZ E HIP	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 2 1 4 uzy 1 4 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 2 uzz 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd UL ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 2 2 wzz 1 1 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 2 galf grd ugd wzz hisl (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 4 grd 1 4
EAGE10 [24438 EAGE17 [P6-1 al EAGE18 [HIPH08472 EAGE19 [U-36-1 EAGE20 [NUAH_Bind 3 EAGE21 [EG544 NUAH_Bind 8 EAGE21 [HIPH0386 EAGE22 [HIPH0386 EAGE24 [NUAH_Bind 23 EAGE25 [FG-EG488 EAGE26 [2475 EAGE26 [2475 EAGE26] EAGT5 EAGE27 [K734 EAGE26] EAGT5 EAGE28 [2446-4356 EAGE28] NUAH_Bind 23 EAGE29 [NUAH_BINd 25 EAGE29 [NUAH_BINd 25 EAGE29 [NUAH_BINd 25 EAGE29 [NUAH_BINd 25 EAGE20] EAGE43 EAGE20 [2646-4356 EAGE20] EAGE43 EAGE30 [2666-170	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1.4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 1.4 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzx 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlA wzz 2 2 wzz 4 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 wzy 2 1 1 galf grd (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 wzy 2 1 4 2 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 wzy 2 1 4 2 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 wzy 2 1 4 2 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 wzy 2 1 4 2 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 wzy 2 1 4 2 grd grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz 1 1 1 manC manB grd ugd wzz hisi
EAG910 [24438 EAO917 [P6-1 al EAO918 [HIPH08472 EAO919 [U-36-1 EAO920 [NuAH Bird 3 EAO921 [005-44 NuAH Bird 3 EAO922 [HIPH1338 EAO922 [HIPH1338 EAO922 [HIPH1338 EAO922 [HUAH Bird 23 EAO925 [FC-EC488 EAO926 [2475 EAO927 [K7384 EAO928 [244C-4356 EAO929 [NuAH Bird 23 EAO929 [V3-1 al	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1.1 1.4 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1.1 1.4 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1.4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 gad UT ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wizy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 wzy 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 1 wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 1 wzy 2 1 4 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz 1 4 wzy 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi
LAUGITU 2013 EAUGIT [P6-1 al EAUGIT [P6-1 al EAUGITU [V03-1 EAUGITU [V03-1 EAUGITU [V03-1 EAUGITU [V03-1 EAUGITU [V03-4 EAUGITU [V03-4	(weah) galf mlB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx wzy 2 wzy 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx wzy 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx v62 wlA wlB UT wzy 1 1 marC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx ws 2 2 2 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx ws 2 2 2 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx ws 2 2 2 wzy 2 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wz wz 2 2 2 wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wz wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf maB mlD mlAmlC wzz wz wzy 1 4 marC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf maB mlB mlAmlAmlC wzz wz
EAUGITU 2013 EAUGITU 2013 EAUGITU P6-1 al EAUGITU 1045-1 EAUGITU 1	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1.4 wzy 1.4 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx wzy 2 1.1 1.4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 wzy 2 1 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 uzy 2 1 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbbsX wzx uzy 2 2 gald ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx v62 wlA wlB UT wzy 1 1 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx v62 wlA wlB UT wzy 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx v62 wlA wlB UT wzy 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx v62 wlA wlB UT wzy 1 1 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wzy 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wzy 2 1 4 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy wzy 2 1 2 galf ugd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy wzy 2 1 4 2 galf ugd ugd wzz hisi
EAOg10 [2483 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-36-1 EAOg20 [NuAH_Bind 3 EAOg20 [NUAH_Bind 3 EAOg21 [F0544 NUAH_Bind 8 EAOg22 [HIPH1238 EAOg22 [HIPH1238 EAOg22 [HIPH1238 EAOg22 [HIPH1238 EAOg22 [Checkes EAOg22 [Checkes EAOg26 [E2675 EAOg26 [E2675 EAOg27 [K734 EAOg28 [2046-4356 EAOg28 [NUAH_Bind 25 EAOg30 [Z464-3 EAOg30 [(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx wzy 2 1 1 1 4 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1 4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 1 4 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI wzy 2 2 gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI wzy 2 1 1 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI wzy 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI Wzy 2 1 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI Wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI Wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI Wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzy VI I V wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx VI Wzy 2 1 4 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzy VI I V wzy 2 1 4 2 galf gad (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzy V VI V VI V VI V VI V VI VI VI VI VI VI
EAUGITU 20163 EAUGITU 20163 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20161 EAUGITU 20162 EAUGITU 20162 EA	(weah) galf mlB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 14 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 14 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz uzy 2 14 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 2 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wiez with wfB UT wzy 1 1 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wiez with wfB UT wzy 1 1 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wiez with wfB UT wzy 1 1 1 manC manB gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wiez with wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 2 galf gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 1 manC manB gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 1 manC manB gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 1 manC manB gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlB mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 1 manC manB gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlD mlAmlC wzz wzy 2 1 4 1 manC manB gand ugd wzz hisi (weah) galf malf mlB mlD mlAmlC wzz wzy wzy wzy wzy hisi (weah) galf gang malf malf mlAmlC wzz wzy wzy wzy wzy hisi (weah) galf gang malf malf mlB mlD mlAmlC wzz wzy wzy wzy hisi
LAUGITU 24438 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U36-1 EAOg20 [NIAH, Bird 3] EAOg20 [NIAH, Bird 3] EAOg20 [NIAH, Bird 3] EAOg22 [HIPH1233 EAOg22 [HIPH1233 EAOg23 [07-386 EAOg24 [NIAH, Bird 23 EAOg25 [F0-80-648 EAOg26 [E475 EAOg27 [KT384 EAOg28 [2446-4356 EAOg29 [NIAH, Bird 23 EAOg29 [NIAH, Bird 25 EAOg29 [NIAH, Bird 25 EAOg29 [NIAH, Bird 25 EAOg20 [245-16 EAOg23 [455-16 EAOg35 [245-16 EAOg35 [245-16] EAOg35 [245	(weah) galf mlB mlA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 1 1 1 4 marC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 1 1 1 4 marC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 1 4 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 1 4 grd Ull ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 1 4 grd Ull ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzz 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 0 1 wzy 2 1 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 2 1 wzy 2 wzy 1 wzy 2 wzy hisi (weah) galf maD mlAmlCVbsX wzy 2 1 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzy 2 2 1 wzy 2 wzy 2 wzy 1 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy 2 wzy 1 wzy
EAUGITU 2013 EAUGITU 2013 EAUGITU 2014 EAUGITU 2014 EAUGI	(weah) galf mlB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 1 a manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 a galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 a galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 wzy 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 2 wzy 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 4 gard U ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 4 gard U ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 2 wzy 2 1 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 2 wzy 1 4 gard U ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 2 wzy 1 4 gard U ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 4 gard U ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 1 4 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 2 galf gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 1 galf gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 1 1 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 1 4 1 manC manB gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy 2 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy wzy 2 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy wzy 2 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz wzy wzy 2 2 2 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 1 gard ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmiC wzz 2 wzy 2 1 1 gard ugd wzz hisi
LAUGITU 2013 EAUGIT [P6-1 al EAUGIT [P6-1 al EAUGIT [P6-1 al EAUGITU [U36-1 EAUGITU [U36-1 EAUGITU [U36-1 EAUGITU [07386 EAUGITU [0738	(weah) galf mlB mlA muC manB UT wzx 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx wzy 2 14 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 14 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 14 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 14 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 1 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 1 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 1 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx UT wzy 2 1 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 wzy 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 wzy 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 2 wzy UT 1 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 2 wzy UT 1 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 2 wzy UT 1 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 1 2 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 1 4 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 2 1 4 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 1 wzy 2 1 4 galf galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzx vz 1 4 uzy 14 1 manC manB galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzy 2 1 4 1 manC manB galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsx wzy 2 1 4 1 manC manB galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 1 2 galf a galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVb wzx wzy 2 2 2 galf ugd wzz
LAUGITU 24438 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U-38-1 EAOg20 [NIAH Bird 3] EAOg20 [NIAH Bird 3] EAOg22 [HIPH1233 EAOg22 [HIPH1233 EAOg23 [07-386 EAOg24 [NIAH Bird 23 EAOg25 [FO-EC468 EAOg26 [EA75 EAOg27 [K7364 EAOg26 [EA75 EAOg29 [NIAH Bird 25 EAOg29 [NIAH Bird 25 EAOg30 [ZC44-3 EAOg30 [ZC44-3 EAOg31 [EO6-170 EAOg32 [V11a] EAOg33 [K756 EAOg37 [B156 EAOg37 [B156 EAOg38 [O16-2 a] EAOg38 [O16-2 a]	(weah) galf mlB mlA wzz 2 14 wzy 14 2 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx wzy 2 wzz 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx uzy 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 1 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 1 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 1 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 1 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 1 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlCVbsX wzx 2 2 wzy 1 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 1 2 galf grd (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wfo2 wlA wlB UT wzy 2 1 4 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf maB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 2 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 2 2 2 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf mlB mlD mlAmlC wzx wz 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
LAUGIO [2483 EAOg17 [P6-1 al EAOg18 [HIPH08472 EAOg19 [U36-1 EAOg20 [NIAH, Bird 3 EAOg20 [NIAH, Bird 23 EAOg20 [NIAH, Bird 23 EAOg20 [E475 EAOg20 [NIAH, Bird 23 EAOg20 [NIAH, Bird 23 EAOg20 [E475 EAOg20 [NIAH, Bird 23 EAOg20 [NIAH, Bird 25 EAOg20 [NIAH, Bird 25 EAOg	(weah) galf miB miA wzz 2 1 4 wzy 1 4 2 galf gad ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 2 wzy 2 1 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 2 wzy 2 1 1 1 4 manC manB grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 2 wzy 2 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 1 4 grd UL ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wbgz wzz 1 4 grd UL ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 2 2 grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 2 wzy 1 1 galf grd ugd wzz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wiz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 galf grd (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 1 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 1 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 1 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 1 2 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 2 2 2 2 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 2 wz 2 1 1 1 grd ugd wz hisi (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 1 1 1 4 grd h (weah) galf miB miD miA miC wz wz 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

図 5:全ゲノム配列解析 57株のから同定された *E. albertii*の O 抗原型(EAOg1-40) (Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 1 を改変)



図 6: E. albertii の O 抗原型(EAOg)と Escherichia/Shigella 属の O 抗原型との比較



図7: E. albertii と Escherichia/Shigella 属の wzx 遺伝子の系統解析 (Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 3 を改変)

	F10-1-1	Set and forward	A	Set and reverse	a	Expected amplicon	Reference
	Page 1999	fini ant forward	Seconde (5-3)	det est munero	superior (co)	920 (00)	Steri
	ELOHE	1 um E EAOate	CTATTOCTACTTTTATTOCTOCO	1 war D EAOate	ATCACATCTOCCACTACTTCC	040	CD0746
	ENOgio	E d 1 OF	COTCOTATATOAATOTOACTCA	E al LOE	CONTATORCACOCOCTANTICAT	949	CBS/00
	E40-20	1 um E EAO-10	OCTIATCATTACTICACTIACCO	1 urr D EAD-10	TTAACAAATCACCACCATAACCA	777	NIAL Died 25
	EAD-28	Lum E EAD-18	ACTACOTATATOCAACCOCAC	1 was D EAD-18	ACTITICCCATACAACACC	201	E0076
	ENOg26	1_WZX_F_EWUQ26	AGIAGCIATATOGACOUTTACAAAACA	1_WZX_R_EAUg26	AGTITOCITOCGATACAAGC	101	E2010
1 st	ENOg2/	1_W2C_F_EAUg2/	ATAGGATGGAGCTTTTACAMAGA	1_WZK_R_EAUg21	GGCAGAATAATGGATGACAGC	620	R/394
set	ENOg20	1_wzx_F_EAUg20	ACTAGIATIGATGAWGAWATGCC	1_WZX_R_EAU0020	GTCAGCAGCAGAGTAAATACC	537	NAH_Bird 3
	EAOg2	1_wzx_F_EAV0g2	GCGATTATTTCCGTTGCATTAG	1_wzx_R_EAOg2	CITIGCITIATTIAGIGATACGIG	492	EC05-160
	EAOg18	1_wzx_F_EAOg18	CALICITIAATIATIGCIGATAAG	1_wzx_R_EAOg18	ACACTCAATATTAGCCATGTTAT	434	HIPH08472
	EAOg23	1_wzx F_EA0g23	TACTCTGCAGAGAACCAAGATA	1_wzx_R_EAOg23	ATGATAGTAATAAGCCAAACGC	389	07-3866*
	EAOg36	1_wzx_F_EAOg36	CGTCTTGTGTCTAGGGATTG	1_wzx_R_EAOg36	CACCAATAATGCAAGTATTCTACC	328	K7756
	EAOg7	1_wzx_F_EAOg7	CTTCCTGTGCTGACAAGAAATC	1_wzx_R_EAOg7	TCAATAGGTCAGATAACAATAGAG	241	EC03-195
	EAOg13	1_wzx_F_EAOg13	GACCAGCTGGAATGGCAATG	1_wzx_R_EAOg13	AAGGAATAGTTATCACAGAGAGT	195	NIAH_Bird 16
	EAOg10	1_wzx_F_EAOg10	CACTTGTGACGACATCCCTA	1_wzx_R_EAOg10	GCATGACAATATACTGAACTGA	156	2013C-4143+
r	14	2nd set forward		2nd set reverse			
	EAOg21	2_wzx_F_EAOg21	ATAATTTTCTTTCAATCGTCCTC	2_wzx_R_EAOg21	ACCATATCGAATATACACACATTA	953	EC05-44
	EAOg34	2 wzx F2 EAOg34	ACCTGATGAAGACATGGGAATG	2 wzx R2 EAOg34	GGTGAAATAATACAACTGTTGATACTC	901	4061-6
	EAOg4	2 wzx F EAOp4	ACTCGTATAGACAATATTGAACTG	2 wzx R EAOo4	TAGGAGGCTCAGTTACTCCAG	840	NIAH Bird 24
	EAOq6	2 wzx F EAOa6	TGCTGAAGAGTATGGTCAGTTG	2 wzx R EAOo6	GATGGGATTAACGATATGACAG	774	EC05-81
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	E.al. I.NF	ACACCGTGGCGAAATGGCA	731	common
2nd	EAOg35	2 wzx F EAOp35	GCATGGTTGATAACAATTGGAG	2 wzx R EAOp35	ATGATACTCCACAAAGGATTTCG	656	CB9791
2	EAOa8	2 wzx F EAOg8	GCTCTGCAGATTCTCATAAGC	2 wzx R EAOa8	AGATTTAGAAATTGATTCCTTGCT	579	NIAH Bird 5
set	FA0e37	2 WTX E EAGoAT	ATGAGAAAACTGTTAACGGTTAC	2 wrs R FAOr07	TECTAATCATEATTAAGGTAGCG	502	B156+
	EAO-24	2 way E EAOo24	GTTCTCTCATTAACTAAAGAAAC	2 wrx R EAOo24	TOGATAGAGTAATGTTTTCTCT	458	NIAH Bird 21
	EAOp40	2 way E EAOad0	TAGCCAGAGTTTATTCTACAGG	2 wrs R EAOpt0	ATGAGATTAAGTTTCCCAGTGTC	400	06.3543
	EAOp21	2 wm E EAOolt	CTATTCTTACTCGCCTGTTGG	2 www. P. EAO-01	CAGAAAACACCTCAATAATGGC	300	E016.170
	EAO-1	2 max F EAOs2	TOCOTTICITOCOTOTICITAC	1 um B EAOs1	ATTETTETACATOCCTACC	007	04
	EAOpt	2_w2x_F_EPV0g3	TOADCAADCCCCTTATTTCATC	2_w2k_R_EMOg3	ATTOTTOTA ATTACA	207	MIALL DULLD
	ENUGI	2_wzx_P_E/vugi	IGNOGAWGCCOGTIATTIGATG	2_W2K_R_EMUg1	CONSTICUENCICONCINICS	249	NVAPLBID 2
	EAOg15	2_wzx_F_EAOg15	GATGCTATTGACGGATTCAGT	2_wzx_R_EAOg16	TGACAGCTAAGGGTAGTACTAG	205	2012EL-1823B*
	EAOg28	2_wzx_F_EAOg28	GATGCIGIATICITIATIAGCIG	2_wzx_R_EAOg28	TGATACAGCAGACAATAGAGC	160	2014C-4356*
		3rd set forward		3rd set reverse			100.00
	EAOg32	3_wzx_F_EAOg32	TGATTGCTATGTCAATATGCTCC	3_wzx_R_EAOg32	TACCTATTGATGCAAAAGCTGG	915	V3-1al
	EAOg11	3_wzx_F_EAOg11	GACATTGTCAATAAAGCAATTCC	3_wzx_R_EAOg11	TGTTATGCAGATAATTCCCACAC	851	G-3-3al
	EAOg39	3_wzx_F_EAOg39	GTCTCGATGGTTGGTGTTCTTC	3_wzx_R_EAOg39	AGATCTTGATATATATTGTGCGAC	782	A32-5al
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCGAAATGGCA	731	common
	EAOg6	3_wzx_F_EAOg6	GTGCTGATCATGTTATTTTGCTG	3_wzx_R_EAOg6	AGCAATGATATTATTCCTTCGTG	676	SP140674*
2rd	EAOg17	3_wzx_F_EAOg17	TTTAGCAACAGCAGGCCATGC	3_wzx_R_EAOg17	TGGAAATTATTCACGATCTGAAG	630	P6-1 al
2	EAOg19	3_wzy_F_EAOg19	ATGCTTACAGGCAAGCATTCG	3_wzy_R_EAOg19	GAATTTTCATTTGATTAGATTCTGC	685	U-30-1
set	EAOg38	3_wzx F_EAOg38	TCACATAGATGGTGCTTTGATTG	3_wzx_R_EAOg38	CATAATGAAATCACTTACACGAAG	496	Q16-2 al
10.252351	EAOg22	3_wzx_F_EAOg22	TTGTTACATCATATTTTACTCGAG	3_wzx_R_EAOg22	TGCAACTTGAATATAATGCCATTC	439	HIPH12338
	EAOg33	3_wzx_F_EAOg33	TGCCGTAGGAGTGTCTGCTG	3_wzx_R_EAOg33	ACTGCTAACATGTAAATGCCAG	405	U-112-1
	EAOg9	3_wzx_F_EAOg9	AAGCTACTGACTCCTGAAGAG	3_wzx_R_EAOg9	CATTTAATGCACACTCATATGATG	355	MKR5
	EAOg14	3_wzx_F_EAOg14	TGTAGGCGTTATTGGTAATACG	3_wzx_R_EAOg14	TGCAACAGTGGAGATAAATACTG	307	ZZG 12-3
	EAOg30	3_wzy_F_EAOo30	AGGTACGCAAATACGTGCAGC	3_wzy_R_EAOp30	TGTAAATAATGGATTAATACTCTCC	268	ZAC44-3
	EAOg12	3 wzx F EAOg12	CGATGGCTTGTTATTTCTGCAG	3 wzx R EAOg12	AGGGCTGGCTGTATTACAGC	209	13538
	EAOg25	3_wzx_F_EAOg25	ACGAACGCTTTTACTGTATTGC	3_wzx_R_EA0g25	TGCACAACTGAAAATAACACATTCAAAC	188	FCI-EC468

図8: EAO-genotyping PCR のプライマー情報(3プライマーセット)

E_al_1_OF/OR および E_al_1_NF/NR: E. albertii 検出プライマー2 セット



図 9: EAO-genotyping PCR による各 EAOg 型参照株の PCR・泳動結果 (Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019 . Fig. 4 を改変) △1, △2: *E. albertii* 検出プライマーによるバンド

EAOgタイプ	E.coli/Shigella との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]	EAOgタイプ	E.coli/Shigella との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]
EAOg1	-	4	13	EAOg22	027	1	0
EAOg2	14 A	1	4	EAOg23	0103	2	0
EAOg3	0181	5	5	EAOg24	O58	2	0
EAOg4	-	1	37	EAOg25	084	1	0
EAOg5	-	6	4	EAOg26	049	2	1
EAOg6	4	0	3	EAOg27	0130	1	5
EAOg7	-	6	7	EAOg28	037	0	0
EAOg8	0128/055	1	5	EAOg29	08	4	3
EAOg9	SB13	0	26	EAOg30	O69	17	2
EAOg10	SB7	0	11	EAOg31	_	0	0
EAOg11	0161	1	0	EAOg32	-	0	2
EAOg12	063	3	3	EAOg33	-	1	0
EAOg13	0184	1	1	EAOg34	-	1	0
EAOg14	0141	0	0	EAOg35	-	4	2
EAOg15	0119	0	3	EAOg36	-	1	0
EAOg16	065	2	1	EAOg37	-	0	0
EAOg17	0144	0	0	EAOg38	-	1	2
EAOg18	0115	2	7	EAOg39	-	0	4
EAOg19	069	1	0	EAOg40	-	2	1
EAOg20	0152	1	0	未同定	-	16 (17.4%)	33 (17.7%)
EAOg21	0182	1	1	計		92	186

図 10: EAO-genotyping PCR 系を用いた 278 株の EAO 型の同定結果



図 11:大腸菌および E. albertii のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹



図 12: E. albertii のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹



図 13: E. albertii 進化系統における EAHg1-EAHg4 の分布

а

EAHg typing primers

primer	sequence(5'-3')	product size(bp)
fliC_F		_
fliC_R-1		167
fliC_R-2		309
fliC_R-3		404
fliC_R-4		515

<u>C</u>	ommon primers :	or <i>E. albertii</i>	
	common_F	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	731
	common_R	ACACCGTGGCGAAATGGCA	/31

b



図 14: EAH-genotyping PCR のプライマー情報

(a) および基準株で PCR を実施した際の泳動結果(b)