

腸管出血性大腸菌（EHEC） 検査・診断マニュアル

2019年9月改訂

目 次

1.	概要	3
2.	EHEC の分離と同定	3
	(1)検体の採取と保存	4
	(2)糞便からの EHEC 分離	4
	(3)EHEC の同定	7
	(4)血清型別	14
3.	血清学的診断法	15
	(1)抗原液の作製と保存	16
	(2)血清の非働化	17
	(3)抗体価測定法	17
	(4)判定	18
4.	参考文献	19
5.	参考資料	20
	(1)免疫磁気ビーズの作製方法	20
	(2) PCR 法による大腸菌血清型判定法	21
6.	検査依頼先	33
7.	執筆者一覧	34
8.	謝辞	35

1. 概要

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は産生する毒素の性状から、ベロ毒素 (VT) 産生性大腸菌 (Vero toxin-producing *E. coli*: VTEC) あるいは志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) とも呼ばれる。我が国の行政上では菌の名称として EHEC が用いられ、EHEC は「VT を産生または VT 遺伝子を保有する大腸菌」と定義されている。EHEC 感染症は三類感染症として菌の分離・同定と VT の確認により全数届出が義務付けられており、溶血性尿毒症症候群 (Hemolytic uremic syndrome: HUS) 発症例に限り、便からの VT 検出あるいは患者血清における O 抗原凝集抗体等の検出によって診断した場合も届出が必要である。EHEC 感染症では HUS や脳症などの重症合併症を併発する危険があることから、早期の高感度な確定診断が求められている。

2. EHEC の分離と同定

EHEC 感染症の診断は症状の有無にかかわらず、糞便から大腸菌を分離し、分離株のベロ毒素産生性の確認またはベロ毒素遺伝子の検出による (図 1)。血清型別や毒素型の判定は求められていないが、O 群や毒素型がわかれば接触者検便の実施に有用である。

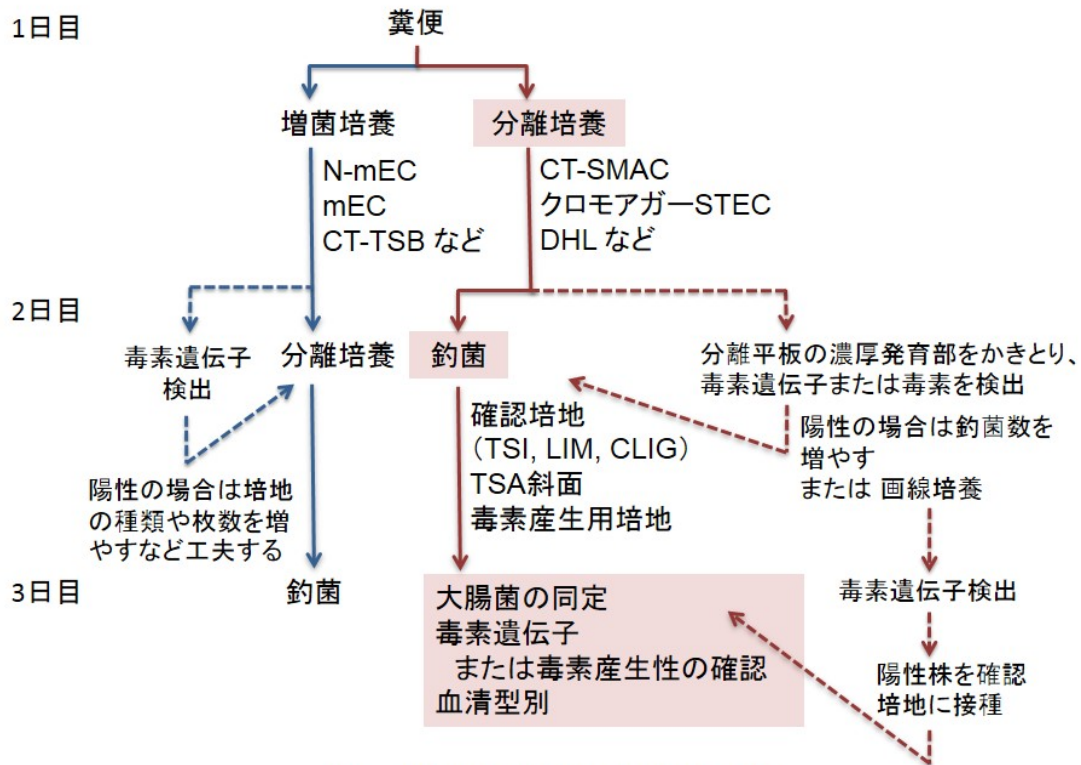


図1 糞便からのEHEC分離の手順

(1) 検体の採取と保存

EHEC 分離のための糞便検体は自然排泄便が望ましいが、採取できない場合は直腸粘液をスワブで採取する。採取後直ちに検査できない場合は、Cary-Blair 培地等に保存して輸送する。

激しい下痢を呈して液体状の検体となっている場合は遠心し（2,500-3,500 ×g で数分間程度）、沈渣（または沈渣と上清）を検査に供する。

(2) 糞便からの EHEC 分離

a) 分離培養

日本で分離されることの多いO群については、その特徴的性状を利用した分離培地が多数市販されている。

すなわち、O157、O26、O111 はそれぞれソルビトール、ラムノース、ソルボース非発酵（または遅発酵）であることから、マッコンキー基礎寒天培地（MAC）に鑑別糖を加えて CT 選択剤（セフィキシム 0.05 mg/L および亜テルル酸カリウム 2.5 mg/L）を加えた CT 加ソルビトール MAC（CT-SMAC）、CT 加ラムノース MAC（CT-RMAC）、CT 加ソルボース

MAC (CT-SBMAC) を使用し、白色 (糖分解陰性) のコロニーを釣菌する。β-グルクロニダーゼや β-ガラクトシダーゼに特異的な発色基質を利用する合成基質培地も便利であるが、コロニーの密集した部分では説明書どおりの色調を示さないことがある (図 2)。また、どの培地においても特徴的な色調のコロニーがすべて EHEC であるとは限らない。

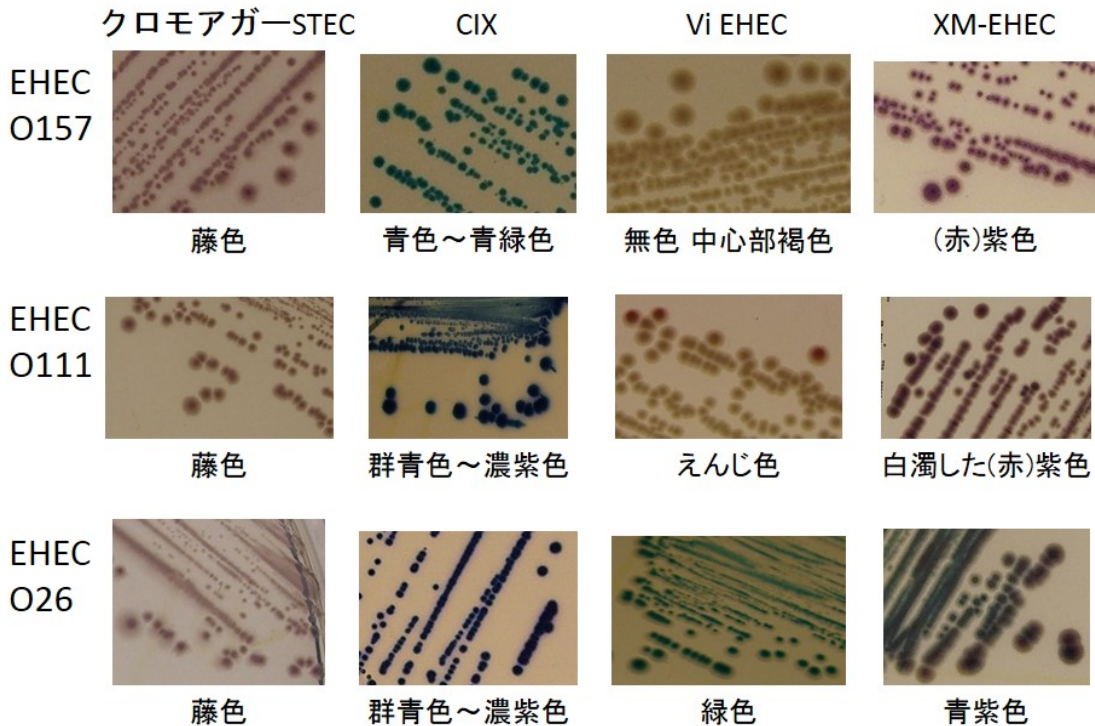


図2 合成基質培地上のEHECコロニー

集団事例などで検出対象となる EHEC が特定されている場合は、その株に適した分離培地を使用するが、日常検査では EHEC 分離用の培地を数種類準備することは困難であり、最も分離頻度の高い O157 検出用培地と一般的な大腸菌分離培地の併用が現実的である。CT 選択剤を加えた培地と合成基質培地は概ね同程度の選択性を示し、O157、O26、O111 のほか O103 や O121、O145 の多くは発育することから、O157 検出用培地の濃厚発育部位をかき取って VT 遺伝子または VT を調べ、陽性の場合には O157 疑いコロニー以外も釣菌する。O91 や O165 などでは、選択性の高い培地に発育しない株もあるため、EHEC 感染が疑われる場合は、DHL 寒天培地などの一般的な大腸菌分離培地から多数のコロニーを釣菌または画線培養して、VT 遺伝子または VT 産生性を調べる。なお、EHEC のスクリーニングに EHEC hemolysin (Ehly) 産生性をみるエンテロヘモリシン培地が使用されるこ

とがあるが、あくまでも Ehly 産生性は指標であり、VT 産生性と一致しない。

b) 増菌培養

急性期の患者便では増菌培養は必要ないが、すでに抗菌剤が使用されている場合や、下痢が激しく糞便が希釈されているときには、増菌培養を実施する。増菌培地には、modified EC 培地 (mEC) や CT 選択剤を添加したトリプトソイブロス (TSB) が使用される。O157 検出にはノボビオシンを最終濃度 20 mg/L に加えた mEC を用いることが多いが、増菌培養における選択剤の適否や最適培養条件 (温度、時間) についての検討の多くは O157 の検出を目的としたもので、その他の O 群についても有用であるかどうかは不明である。

目的とする EHEC の O 群が明らかな場合は、免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液から集菌し、分離培地に塗抹することも可能である。免疫磁気ビーズは O157、O26、O111、O103、O121、O145 が市販されており、これ以外の O 群については各種抗体結合用磁気ビーズ (例えばウサギ IgG 抗体結合用磁気ビーズ) と目的とする O 群の免疫血清 (ウサギ血清) を用いて自家調整できる (参考資料 (1)) 。

EHEC の耐酸性を利用し、TSB 増菌液を塩酸処理 (等量の 0.125 N 塩酸加 0.5% 食塩水と混合) してから分離培地に接種する方法が報告されているが (Fukushima ら, 1999)、分離培地には選択性の低い培地を併用することが望ましく、塩酸加食塩水の混合量も検体によって変更する方が良い。また、pH 3 に調整した TSB に糞便を加えて 30 分間静置した後、TYTP (酵母エキス 12 g/L, TRIS 12.5 g/L, ピルビン酸ナトリウム 1 g/L を加えた TSB, pH 8.7) を等量加えて 42°C で増菌する方法も報告されている (Grant, 2008) 。

c) 確認培養

EHEC が疑われるコロニーを TSI 寒天培地、LIM 培地、CLIG 寒天培地、トリプトソイ寒天斜面培地 (普通寒天斜面培地) などに釣菌する。他の大腸菌と同様に EHEC の多くは乳糖分解性で、リジン脱炭酸酵素陽性、運動性陽性、インドール陽性を示すが、O111 や O165 はリジン脱炭酸酵素陰性、運動性陰性が多い (表 1) 。

表1 主なEHECの鑑別性状

O群	TS 寒天培地				LM 培地			GUD ^{b)}	糖分解 ^{c)}		CT加平板での発育	EHEC hemolysin ^{d)}
	斜面	高層	H ₂ S	ガス	リジン	ND ^{a)}	運動性		SOR	RHAM		
0157	+ ^{e)}	+	-	+	+	+	(+)	-	-	d	+	+
026	+	+	-	+	+	+	(+)	+	+	-	+	+
0111	+	+	-	+	-	+	(-)	+	+	+	+	+
0103	+	+	-	+	+	+	+	+	+	d	d	+
0121	(+) ^{f)}	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
0145	+	+	-	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+
0165	+	+	-	-	-	+	(-)	+	(+)	-	-	d

a) インドール

b) β-グルクロニダーゼ

c) 48時間培養での成績、SOR:ソルビトール、RHAM:ラムノース

d) 10mM 塩化カルシウム加洗浄羊赤血球寒天培地での溶血活性

e) +陽性、(+) 殆どの株は陽性、-陰性、(-) 殆どの株は陰性、d株によって異なる

f) 乳糖非分解性株であっても培養中に乳糖分解性株が出現する

大腸菌の95%はβ-グルクロニダーゼ陽性であるが、EHEC O157はβ-グルクロニダーゼ陰性である。しかし、ドイツなどで分離されるEHEC O157:HNMはソルビトール陽性およびβ-グルクロニダーゼ陽性を示すことが多く、日本でもβ-グルクロニダーゼ陽性のEHEC O157が分離されている。

(3) EHECの同定

下記に示すVT遺伝子検出またはVT産生性によって決定する。継代培養によってVT遺伝子を運ぶファージが欠落する株が存在することが頻りに報告されており、検出は出来るだけ早い段階で行うのが望ましい。

a) VT遺伝子検出法

1) ScheutzらのPCR法

ベロ毒素は免疫学的に異なる2種類の毒素(VT1 [Stx1]とVT2 [Stx2])に大別され、これらをコードする遺伝子にはいくつかの亜型(サブタイプ)がそれぞれ存在する。本稿ではScheutzらのPCR法について述べた後、それ以外のプライマーセットについて概説する。なお、サブタイプを表記する必要のない場合や調べていない場合は、VT1 (Stx1)、VT2

(Stx2) との記載が良い。なお、英文のオリジナルプロトコルは Scheutz ら（参考文献）の通りである。

・本手法で分類可能なサブタイプ

Scheutz らの PCR 法では次のサブタイプの検出が可能である：*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*。

① Template DNA の作製

- ・チップ等の先端でコロニーを極微量掻き取って 25 mM NaOH 溶液 50 μ L に懸濁する。
- ・95°C で 5 分以上加熱し、10,000 \times g で 1 分間遠心した上清に 4 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて使用する（精製 DNA を用いても可能）。
- ・コントロール DNA：*stx* 陽性株（各サブタイプの陽性コントロール株は国立感染症研究所・細菌第一部から分与可能である）

② Primers

Scheutz ら（参考文献）を参照のこと。

③ PCR 反応液の組成

2.5 μ L 滅菌脱イオン水（ミリ Q 水）

（プライマーの組み合わせによって反応液量が 20 μ L となるように変更する）

10 μ L master mix (HotStarTaq Master Mix Kit [Qiagen],

または GoTaq Master Mix [Promega])

2.5 μ L 5 μ M primer mix

5 μ L 鋳型 DNA

20 μ L total

ただし、*stx1* のサブタイプ検出には以下の組成を用いる。

5	μL	滅菌脱イオン水 (ミリQ水)
12	μL	master mix (HotStarTaq Master Mix Kit [Qiagen], または GoTaq Master Mix [Promega])
1	μL	5 μM primer mix (<i>stx1c</i> および <i>stx1d</i> の 4 種類)
2	μL	5 μM primer mix (<i>stx1a</i> の 2 種類)
5	μL	鋳型 DNA
<hr/>		
25	μL	total

④ 反応条件

stx1 および *stx2* (共通プライマー) の検出用反応条件

- Step1 : 95°C, 15 min
- Step2 : 94°C, 50 sec
- Step3 : 56°C, 40 sec
- Step4 : 72°C, 60 sec
- Step5 : go to step 2 (total 35 cycles)
- Step6 : 72°C, 3 min
- Step7 : 4°C保存

ただし、Step 1 は使用キットによって変更可能 (HotStarTaq Plus Master Mix Kit [Qiagen]の場合は 95°C, 5 min に短縮可能)

stx1 サブタイプおよび *stx2* サブタイプ検出用反応条件

- Step1 : 95°C, 15 min
- Step2 : 94°C, 50 sec
- Step3 : 64°C, 40 sec

(使用する機器や試薬等との組み合わせにより, *stx1* サブタイプは 62-64°C, *stx2*

サブタイプは 64-66℃で調整が必要)

Step4 : 72℃, 60 sec

Step5 : go to step 2 (total 35 cycles)

Step6 : 72℃, 3 min

Step7 : 4℃保存

ただし、Step 1 は使用キットによって変更可能 (HotStarTaq Plus Master Mix Kit [Qiagen]の場合は 95℃, 5 min に短縮可能)

⑤ 電気泳動

通常のアガロース (1% TaKaRa LO3 in TAE など) ゲル電気泳動で当該サイズの増幅産物を確認する。

2) その他の PCR プロトコール

Lin ら (参考文献)、Cebula ら (参考文献) のプライマーおよび Takara から販売されているものが使用可能である。それらのプライマーによるサブタイプ検出能については下記の表 2 を参照のこと。重症例由来 EHEC の主要な 7 種類の O 抗原遺伝子と志賀毒素遺伝子を同時検出する方法として、5. 参考資料 (2) に記載のマルチプレックス PCR 法がある。

表2 各種PCR法及びLAMP法によるstxサブタイプ検出能の比較

stx subtyp e	Real-time PCR						Conventional PCR						LAMP c)		
	TaKaRa ^{a)}		Harada ^{a)}				Scheutz ^{b)}		Lin ^{a)}	Karch ^{a)}	Cebu ^{a)}			TaKaRa	
	stx	stx1	stx2	stx2f	stx1	stx2	up/down	MK1/2	LP30/31	LP43/44	EVT1/2	EVS1/2			
1a	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
1c	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+		
1d	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	(+) ^{d)}		
2a	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+		
2b	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+		
2c	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+		
2d	+	-	+	-	-	+	+W	+	-	+	-	+	+		
2e	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+		
2f	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-		
2g	+	-	+	-	-	+	+W	+	-	+	-	+	(+)		

a) Cycleave PCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0

b) stx2は4種類のプライマーセットを使用

c) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット

d) (+); 検出感度が低い

各PCRの詳細は4. 参考文献の項を参照のこと

3) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法

PCR と異なり反応終了後に電気泳動を行う必要がないため簡便な遺伝子検出法である。

以下のキットが利用できる。

- ・Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学）

- ・Loopamp ベロ毒素（VT）タイピングキット（栄研化学）：VT1とVT2を区別できる。

対応機種：リアルタイム濁度測定装置（LoopampEXIA：栄研化学）。その他、同等の機能を有する機器が利用できる。

また、LAMP 法のキットを蛍光・目視検出試薬（栄研化学）と併用すれば、紫外線照射により遺伝子の増幅を確認できるため、Thermal cycler を用いても LAMP 法を行える。

なお、LAMP 法による遺伝子増幅量は極めて大きいため、反応チューブ廃棄時にはキャップが開かないよう十分に注意が必要である。

4) リアルタイム PCR 法

市販の VT 遺伝子検出キットまたは公表されている Primer 及び Probe を各試験検査機関で合成・調製し市販の Master Mix にて反応を行う。これについて下記のものが利用できる。

- ・CycleavePCR O-157(VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ)
対応機種 : Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) 、
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life
Technologies) 、 StepOnePlus Real-Time PCR System (Life
Technologies) 、その他、同等の機能を有する機器が使用できる。
- ・CycleavePCR O-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ) : VT1と
VT2 を型別することが出来る。

b) VT 検出法

免疫学的に VT を検出する方法には、イムノクロマト (IC) 法、逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA) 法、酵素抗体 (EIA) 法があり、それぞれ Duopath Verotoxins (Merck) 、キャピリア VT (タウンズ) 、NHイムノクロマトVT1/VT2 (日本ハム) 、VTEC-RPLA (デンカ生研) 、オーソ VT1/VT2 (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス) が市販されている (表 3) 。

表3 VT検出法の比較

測定原理 ^{a)}	商品名 (メーカー)	検出毒素	主な操作と判定方法	所要時間 ^{b)}	必要な器具
IC	キャピリアVT (タウンズ)	VT ^{c)}	被検液100 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	15分	
	Duopath Verotoxins (Merck)	VT1, VT2	被検液160 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	20分	
	NHイムノクロマト VT1/VT2 ^{d)} (日本ハム)	VT1, VT2	被検液100 μ Lを滴下する ラインの有無で判定	15分	
RPLA	VTEC-RPLA (ゲンカ生研)	VT1, VT2	階段希釈した被検液 25 μ Lを試薬と混合する 凝集価14以上で陽性	16時間 4-5時間で 推定的判定 は可能)	V型96穴プ レートが必要
EIA	オーソVT1/VT2 オーソ・クリニカ ル・ダイアグノス ティックス)	VT ^{c)}	被検液, 一次抗体, 二次抗 体, 基質液を順次反応さ せる (各反応ごとに洗浄操 作が必要) 測定波長450nm, 対照波 長630nmで吸光度を測定 LO.150以上で陽性	3時間	2波長測定可 能なマイクロ プレートリー ダーが必要

a) IC: イムノクロマト法, RPLA: 逆受身ラテックス凝集反応, EIA: 酵素抗体法

b) 被検液調製に必要な時間は含まない

c) VT1とVT2の型別はできない

d) 食品検査用試薬

感染症法ではVTを産生する大腸菌をEHECとしており、毒素型の決定までは求めているが、上記製品のうちVTEC-RPLA、Duopath Verotoxins、NHイムノクロマトVT1/VT2はVT1、VT2の型別が可能である。

IC法は、試料滴下部に100または160 μ Lの被検液を滴下後15-20分後に判定できることから、迅速で簡便な方法として優れているが、検出感度はRPLA法に比べ4倍程度低い。また、IC法はキット間によっても検出感度及び特異性に差があることが報告されている。RPLA法は安価な上、検出感度は約1ng/mLと高いが、被検液と試薬を混合後判定までに16時間以上静置する必要がある。EIA法はRPLA法と同程度かやや高い感度を有し約

3時間で判定できる。測定波長（450 nm）と対照波長（630 nm）で測定可能なマイクロプレートリーダーが必要であるが、多検体処理能力に優れている。

いずれの製品も被検液の調整には、BHI や SMAC などの寒天培地に発育したコロニーをポリミキシン B 溶液や検体希釈液に懸濁する方法と、CAYE 培地などの液体培地を用いる方法があり、製品によって菌量や培養条件が多少異なっている。菌株によっては、調整方法によってベロ毒素の検出感度に差が見られることがある。また、IC 法や EIA 法では、菌の濃度が極端に濃い場合や糞便からの直接毒素検出では偽陽性を示す場合がある。

VT2 サブタイプのうち、O157 に多い VT2c は VT2 に比べ RPLA 法の検出感度がやや低く、IC 法や EIA 法では検出されないことがある。ソルビトール非発酵性およびβ-グルクロニダーゼ陰性の典型的な性状を示す O157 で VT 陰性の場合には VT 遺伝子を確認することが望ましい。このほかのサブタイプについては、ヒト由来株での分離頻度は不明であるが、免疫学的に検出できないことも多い（表 4）。

表4 VT検出法によるstxサブタイプ検出能の比較

Subtype	EIA ^{a)}			RPLA ^{b)}			Duopath Verotoxins ^{c)}			NH-VT ^{d)}		
	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}	被検株数	陽性	陰性 ^{e)}
1a	3	3		8	8		4	4		4	4	
1c	1	1		3	3		3	3		3	3	
1d	5	3	2	3	3		3	3		3	3	
2a	3	3		9	9		4	4		4	4	
2b	2		2	8	6	2	8		8	6		6
2c	10	4	6	13	12	1	12	7	5	10	1	9
2d	6	6		6	6		6	3	3	6	1	5
2e	7		7	10		10	6		6	6		6
2f	12		12	12	11	1	12		12	12	3	9
2g	2		2	2	1	1	2	1	1	1		1
Total	51	20	31	74	59	15	60	25	35	55	19	36

a) オーソVT1/VT2を使用。TSB発育菌50μLを検体希釈液200μLに加えて混和後100μLを被検液とした。

b) VTE-RPLAを使用。CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

c) CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

d) NHイムノクロマVT1/VT2を使用。CAYE培養液をポリミキシンB処理して被検液とした。

e) 実施ごとに判定が異なる場合は陰性とした。

(4) 血清型別

現在、大腸菌のO抗原はO1-O188まで（このうちO31, O47, O67, O72, O94, O122は欠番となっており、O18ab, O18ac, O28ab, O28ac, O112ab, O112acが存在するため合計185種類）定義されており、H抗原はH1-H56まで（このうちH13, H22,

H50 は欠番となっているため合計 53 種類) 定義されている。これらのフルセットの抗血清は SSI Diagnostica (国内代理店: ベリタス) から購入可能である。一方、デンカ生研から販売されている大腸菌免疫血清は O 血清が 50 種類、H 血清は 22 種類のみである。大腸菌の O 抗原は互いに免疫学的に交差する場合があるため、稀な O 群の場合はフルセットを用いた確認または定量凝集反応法による O 群参照株との比較が必要である。

a) 菌体抗原 (O 抗原)

血液や糖を含まない培地で培養した純培養菌を生理食塩水に懸濁して 100℃で 60 分または 121℃で 15-60 分加熱処理を行った死菌液を抗原とし、スライド凝集反応で実施する。ただし、周辺が Rough 様のコロニーを用いて検査を行うと非特異的な凝集反応を起こす場合があるため、周辺が Smooth 様のコロニーを用いて検査するのが望ましい (コロニーの選択については、3. 血清学的診断法, (1) 抗原液の作製と保存の項を参照のこと)。

EHEC の代表的な O 群である O157 については、ラテックスに抗 O157 抗体を感作させた大腸菌 O157 検出キット UNI (OXOID) や E.coli O157-AD 「生研」(デンカ生研) が使用可能である。しかし、O157 抗原は *Salmonella* O30 および一部の *Citrobacter freundii* と血清学的に一致することから、分離培地上のコロニーから実施した場合は、大腸菌の分離・同定が必須である。

b) ベン毛抗原 (H 抗原)

クレイギー管を入れた半流動培地 (SIM 培地なども使える) で 3-5 回継代培養し、運動性を増強した菌を TSB などの液体培地に接種して静置培養後、等量の 1%ホルマリン加生理食塩水を加えて抗原液とする。凝集反応は試験管法で実施し、50℃の恒温水槽で 60 分反応させて凝集を観察する。

3. 血清学的診断法

EHEC が分離されない HUS 発症例においては、血清中の O 抗原凝集抗体の検出によって診断された場合も届出の対象となっている。O 抗原凝集抗体価は下痢発症後 5-6 日目に上昇することがわかっており (図 3)、発症直後と数日後のペア血清で抗体価の上昇を確認することが望ましい。HUS 発症後でも複数の血清について測定した方が良い。HUS と診断される前に採血される症例は少ないので、発症日は重要な情報となる。

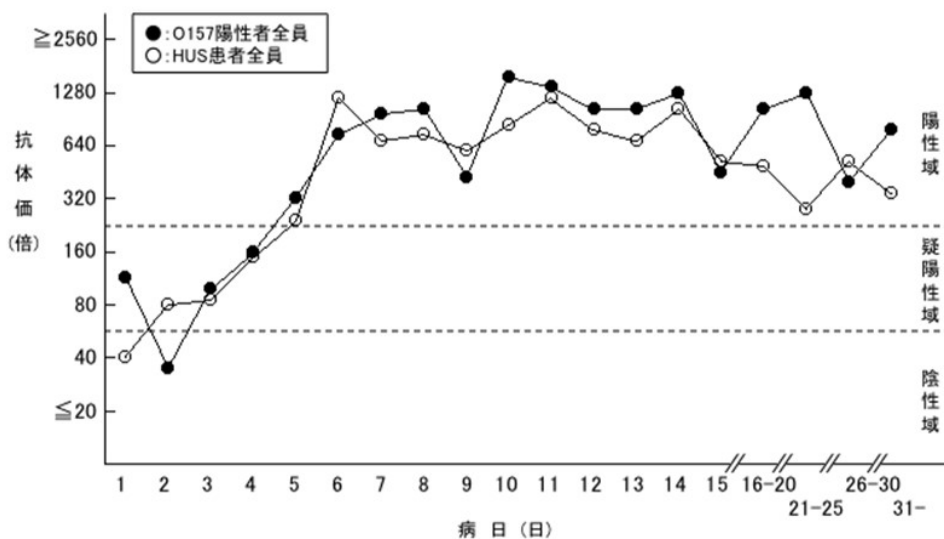


図3. 病日によるO157抗体価の変動(試験管法による判定)

EHEC O157陽性者およびHUS患者で、採血病日がわかっている検体について、病日ごとの抗体価の変動をグラフにしたところ、発症から4病日までは陰性—疑陽性域であるが、5—6病日には陽性域に達し、40—45日程度持続することが確認された小林ら。

O157LPS 抗体については、O157 チェック「LPS 抗体」(LSI メディエンス) が市販されており、ラテックス・スライド凝集反応により簡便に検出できる。本方法は民間の検査機関でも実施しているところがある。自家調整した加熱死菌液を抗原に用いた定量菌体凝集反応による抗体価測定法を以下に示す。

(1) 抗原液の作製と保存

- 1) EHEC 感染が疑われる HUS 患者から分離される EHEC のうち、国内で起因菌として分離頻度が高い 7 種類の大腸菌 O 群の分離株 (O157, O111, O26, O103, O121, O145, O165) を用いる^注。用いる菌株は、0.5% (W/V) アクリフラビンに非凝集性 (もしくは 100℃ 30 分加熱で非沈殿性)、または 1 mg/L の TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride) を含む Antibiotic Medium No. 3 平板培地で Smooth 様集落 (実体顕微鏡観察で表面に凹凸が少なく、TTC の色素でよく染まっているもの) を選択するのが望ましい。
- 2) 深型シャーレに 1 cm 以上の厚さに作製したトリプトソイ寒天 (TSA) 培地 (または中試験管 [φ19 mm× 160 mm 程度の大きさのもの] に 10 mL の TSA を加えて斜面培地にしたもの) に菌を全面塗布して 37℃ 一夜培養する。

- 3) 2-5 mL の生理食塩水（生食水）または PBS に TSA 発育菌を全て掻き取って濃厚に懸濁し、121℃で 1 時間オートクレーブする。
 - 4) 遠心分離（スイングローター等で 1,500-2,000 ×g, 15 分間）後、上清を捨て再度 2-5 mL 程度の生食水または PBS に懸濁する。遠心洗浄をさらに 1-2 回繰り返す、最後に 200 ×g, 5 分間遠心し、上清に 2%ホルマリン加生食水（PBS）を等量加え、37℃で 1 時間静置したものを抗原とする。作製した抗原は 4℃で数ヶ月は保存可能である。
- 抗原液の標準化：抗原液は、あらかじめ市販の大腸菌免疫血清を用いて、凝集価を測定しておく。新しく抗原液を作製した場合は、同一ロットの抗血清で同じ凝集価を示すことを確認してから使用する。
- 5) 使用に際しては生食水または PBS で遠心洗浄し、濁度を McFarland No.3.0 となるように調整し、抗原液とする。

(2) 血清の非働化

HUS 患者血清は 56℃ 30 分で非働化し、10,000 ×g で 1 分間程度遠心した後の上清を使用する。

(3) 抗体価測定法

a) 試験管法

- 1) ガラス試験管（12 mm × 90 mm）を、使用する抗原数（ここでは 3 種類） × 8 列並べ、1 列の 1 本目に生食水 1,080 μL を、1 列の 2-8 本目に生食水 600 μL を分注する。
- 2) 1 列の 1 本目に血清 120 μL を加えて 10 倍希釈液とし、よく混合した後 600 μL を 2 本目へ移し、2-8 本目まで 2 倍階段希釈する。
- 3) 1 列目の希釈液を 200 μL ずつ 2 列目と 3 列目に移す。
- 4) 各列に、濃度を調整した抗原液を各 200 μL 加える（血清の最終希釈濃度は 20 倍から 2,560 倍までとなる）。別の試験管に生食水 200 μL と抗原液 200 μL を加え、抗原液だけの対照とする。
- 5) 試験管立てごと軽く揺すって混合し、50℃の恒温水槽で一夜静置する。
- 6) 凝集の有無を観察し、凝集を示した血清の最終希釈倍数を抗体価とする。

b) 96 穴プレート法

- 1) 血清の希釈は試験管法と同様に 10 倍希釈から 1,280 倍希釈まで行う（容量は血清量または検査する抗原の種類によって適宜変更する）。
- 2) U 底または V 底の 96 穴プレート（ふた付き、コーティングなし）に抗原 25 μ L と希釈血清 25 μ L を加え、プレートミキサー等で十分混和する（血清の最終希釈濃度は 20 倍から 2,560 倍までとなる）。
- 3) 50°C で 1 時間静置する。
- 4) 室温に戻して 1-2 時間後に凝集の有無を観察し、血清の最終希釈倍数を抗体価とする。最終判定は室温で一夜放置後、翌日に行う。陽性コントロールとしてデンカ生研の大腸菌免疫血清に各抗原液を混合したもの、陰性コントロールとして生食水または PBS に各抗原液を混合したものをそれぞれ使用し、凝集の有無を確認する。

(4) 判定

- ・ 判定は以下の通り行う。

試験管法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が 320 倍以上、80-160 倍は疑陽性域、40 倍以下は陰性域と判定する。

96 穴プレート法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が 160 倍以上、40-80 倍は疑陽性域、20 倍以下は陰性域と判定する。

- ・ 疑陽性域の場合は、採血日の異なる血清で再検査をすることが望ましい。（図 3 照）
- ・ 陽性コントロール、陰性コントロールの結果を確認する。
- ・ 特定の O 抗原に凝集が見られることを確認する（ただし、2 種類以上の O 抗原に対して凝集が見られる血清も存在する）。
- ・ RPLA 法と同じく「地帯現象」により、血清濃度の高いところで陰性に見える場合があるので、希釈倍率の高いウエルもよく観察する。

注：状況に応じて使用する抗原の種類を決定する。集団発生等ですでに特定の O 群の EHEC が分離されている場合などは、当該 O 群と代表的な O 群（O157, O26, O111 など）に絞る。国内の HUS 事例のおよそ 80% は O157 の EHEC が原因となっており、O26 と O111 を併せた 3 種類の EHEC で全体のおよそ 85% を占める。使用する分離株には指

定はないが、検査ごとに陽性コントロール（デンカ生研の大腸菌免疫血清による凝集あり）および陰性コントロール（生食水または PBS による凝集なし）の結果を確認する。

4. 参考文献

Fukushima H, Gomyoda M. An effective, rapid and simple method for isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples. Zentralbl. Bacteriol. 1999, 289: 415-428.

Grant MA. Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 enrichment in spiked produce samples. J. Food Prot. 2008, 71: 139-145.

Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol. 2012, 50: 2951-2963.

Lin Z, Kurazono H, Yamasaki S, Takeda Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 1993, 37: 543-548.

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: 248-250.

Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y. Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures. J Food Prot.

2015, 78: 1800-1811.

Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989, 27: 2751-2757.

小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子, 吉矢邦彦, 村上城子.

下痢患者におけるペロ毒素産生性大腸菌血清学的診断法について.

感染症学雑誌 1996, 70: 80-88.

5. 参考資料

(1) 免疫磁気ビーズの作製方法

ここでは、大腸菌 O 群に対応する免疫磁気ビーズをダイナル社の二次抗体結合ビーズ処理マニュアルに従って作製する。

a) 準備するもの

Dynabeads M-280

10 mL 洗浄液

(組成)

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.18 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.98 g
NaCl	8.10 g
H ₂ O	1,000 mL
FCS (ウシ胎児血清)	1.00% (56℃で 30 分間非動化してから使用)
NaN ₃	0.02%

免疫磁気ビーズ保存液

洗浄液と同じ組成であるが、FCS の濃度を 0.1%とする。

大腸菌 O 群免疫血清 (デンカ生研)

分離培地

b) ビーズの感作方法

- ① Dynabeads M-280 500 μL をマイクロチューブに入れ、磁石で集め、浮遊液をマイクロピペットで除去し、洗浄液を 500 μL 入れて再浮遊させる。これを 3 回繰り返す。
- ② このビーズ浮遊液に対象とする大腸菌 O 群の免疫血清 10 μL を加える。加える免疫血清量の目安は 2 μg antibody/ 10^7 ビーズである。(正常家兎全血清中の IgG 量が約 20 mg/mL であることから、ビーズ浮遊原液 1 mL (10^8 ビーズ/mL に対して免疫血清 1 μL で十分と考えられる)
- ③ 4°C 18 時間の条件で穏やかに振とうする。
- ④ 免疫磁気ビーズを磁石で集め、①と同様の操作で、洗浄液で 5-6 回洗浄する。
- ⑤ 最後に磁石で集めたビーズを保存液に浮遊させ、4°C で保管する。
- ⑥ 作製したビーズが対象とした O 群の大腸菌を回収できるか、添加回収試験等で検証する。
- ⑦ 保管期限は明らかではないため、実際に使用する際には、必ず陽性コントロールをたてる。陽性コントロールには、同一の O 群大腸菌株を使用する(VT 遺伝子を保有しない株があればそれを使用する)。

(2) PCR 法による大腸菌血清型判定法

大腸菌の O 血清群と H 型の遺伝子型の判定には PCR 法が利用できる。

血清型の種類

大腸菌の血清型 (serotype) は O 血清群(O 群 (O serogroup))と H 型 (H type) を組み合わせた O : H 型により表される。O 群は菌体表層に発現する糖鎖の構造的な多様性を、H 型は細菌の運動器官であるべん毛の主要構成タンパク質 (フラジエリン) の構造的な多様性を、それぞれ免疫学的に識別したときの分類である。大腸菌の血清型に関する国際的な基準はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut : SSI) が管理しており、SSI では現在のところ 185 種類の O 群と、53 種類の H 型を規定している (表 A) 。EHEC 感染症の調査や研究において、患者や食品などから分離される EHEC の血清型を決定することで、集団感染事例の探知、汚染源や汚染経路の予測、保有する病原性遺伝子の推定などに役立てることができる。また、分離株の MLVA (multilocus variable-number tandem-repeat analysis) や PFGE (pulsed-field gel

electrophoresis) 解析は、血清型（特に O 群）による分類が前提となる。

表A. O群とH型の抗原と種類

分類	抗原 (抗原の構造物)	種類	備考
O群	O抗原：菌体抗原 (LPSを構成する糖鎖ユニット)	O1 - O188	亜型：O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac 欠番：O31、O47、O67、O72、O94、O122
H型	H抗原：べん毛抗原 (フラジエリン)	H1 - H56	欠番：H13、H22、H50

PCR 法により得られた結果の表記に関する注意点

以下に O 群と H 型を判定できる PCR 法について解説するが、PCR 法によって得られる結果（遺伝子型）と、抗血清を用いた凝集試験による結果（表現型）が一致しないケースも稀にある。また、O 抗原が発現しない rough 型の O 群やべん毛を発現していない非運動性株の H 型を凝集反応によって判定することはできないが、それらの抗原コード遺伝子は保存されていることが多く、PCR 法などを用いれば本来の O 群または H 型の遺伝子型を判定できるケースも多い。

菌株の血清型に関する正しい情報を共有するためには、表現型と遺伝子型の結果は区別し、PCR 法によって得られた結果を報告書や論文に記載する場合は、「Og 型（Og-type）または O 群遺伝子型」、「Hg 型（Hg-type）または H 型遺伝子型」として表記することが望ましい。例えば、O1 に対応した Og1 の PCR プライマーで陽性となった場合は「Og1」、H7 に対応した Hg7 の PCR プライマーで陽性となった場合は「Hg7」と表記する。

a) O 群を判定する PCR 法 (*E. coli* Og-typing PCR)

1) 標的遺伝子

LPS はリピド A、コア多糖、O 抗原糖鎖の 3 つの構造からなっており、O 群の違いは O 抗原を構成する糖鎖ユニットの構造の違いに起因する。O 抗原の合成には 10-20 個程度の遺伝子が関与し、その多くは染色体上の決まった位置に O 抗原合成遺伝子群（O-antigen biosynthesis gene cluster, O-AGC）として存在する。O-AGC には糖鎖ユニットの輸送と糖鎖の構築に関わる 2 種類の遺伝子ペア〔wzx/wzy（O-antigen flippase/O-antigen polymerase）または wzm/wzt（ABC transporter）〕のどちら

か一方が必ず含まれる。*wzx/wzy* と *wzm/wzt* の大半は、異なる O 群間では塩基配列が大きく異なっており、最も似ている組み合わせであっても DNA の相同性は 70%を下回る。このような特徴から、*wzx/wzy* と *wzm/wzt* は O 群を判定する PCR 法の標的遺伝子として用いることができる。ただし、表 B に示す 35 種類の O 群は、異なる O 群であっても相同または近似する O-AGC を保有し、15 種類 (Gp1 から Gp15) にグループ化できる。グループ内の *wzx/wzy* または *wzm/wzt* の塩基配列の相同性は非常に高く (97%以上)、グループ内の O 群を O-AGC 上の塩基配列の違いで区別するのは困難な場合が多い (参考文献 1)。

表B. 相同または近似するO-AGCを保有する35種類のO群 (Gp1からGp15)

グループ名	O群	グループ名	O群
Gp1	O20, O137	Gp9	O17, O44, O73, O77, O106
Gp2	O28ac, O42	Gp10	O13, O129, O135
Gp3	O118, O151	Gp11	O153, O178
Gp4	O90, O127	Gp12	O18ab, O18ac
Gp5	O123, O186	Gp13	O124, O164
Gp6	O46, O134	Gp14	O62, O68
Gp7	O2, O50	Gp15	O89, O101, O162
Gp8	O107, O117		

2) PCR プライマー

ほぼ全ての O 群に対応した Og 型を判定できる 162 種類の PCR プライマーペアを別表 1 に示す (参考文献 2)。表 B に示す 35 種類の Og 型は、Gp1 から Gp15 のそれぞれを (グループ内全ての Og 型を) 検出できる PCR プライマーである。O14 と O57 は不完全な O-AGC であるため、PCR 法により検出することはできない。

3) PCR 反応試薬

以下で述べる単独およびマルチプレックスの両 PCR 法では、各社から販売されている一般的な PCR 用 DNA ポリメラーゼが利用できる。Hot-Start 用である必要は無い。

4) 目的別の実施方法

①単独 PCR 法

試験株が特定の Og 型であるか否かを判定したい場合、別表 1 の単独プライマーペア (全

162 種類) のいずれかを用いた PCR 法 (単独 PCR 法) で判定できる。確認のために対象 Og 型の陽性コントロール DNA を用いることが望ましい。

《テンプレート DNA》

市販キットなどにより精製した DNA やアルカリ熱抽出法により準備した DNA を用いることができる。また、生菌を含む培養液 (28 μl の反応液に対して 2 μl 程度) や寒天平板培地上のコロニー (つま楊枝やチップなどの先で釣菌した極少量の菌体) を PCR 反応液に直接加えることでも判定できる。

《反応液組成》

使用する PCR 反応試薬で勧められている組成を基本とし、以下の点に注意する。精製 DNA を使用する場合、テンプレート DNA の最終濃度は 0.1-1.0 ng/ μl (全量 30 μl の PCR 反応液の場合、10 ng/ μl に調整した DNA を 2 μl 加えると、最終濃度は 0.67 ng/ μl となる)、プライマーの最終濃度は 0.2-1.0 μM 程度が推奨される。

《反応条件》

全ての単独 PCR 法は以下の反応条件で実施できる。

Step1 : 94°C 20 秒

Step2 : 58°C 20 秒

Step3 : 72°C 1 分

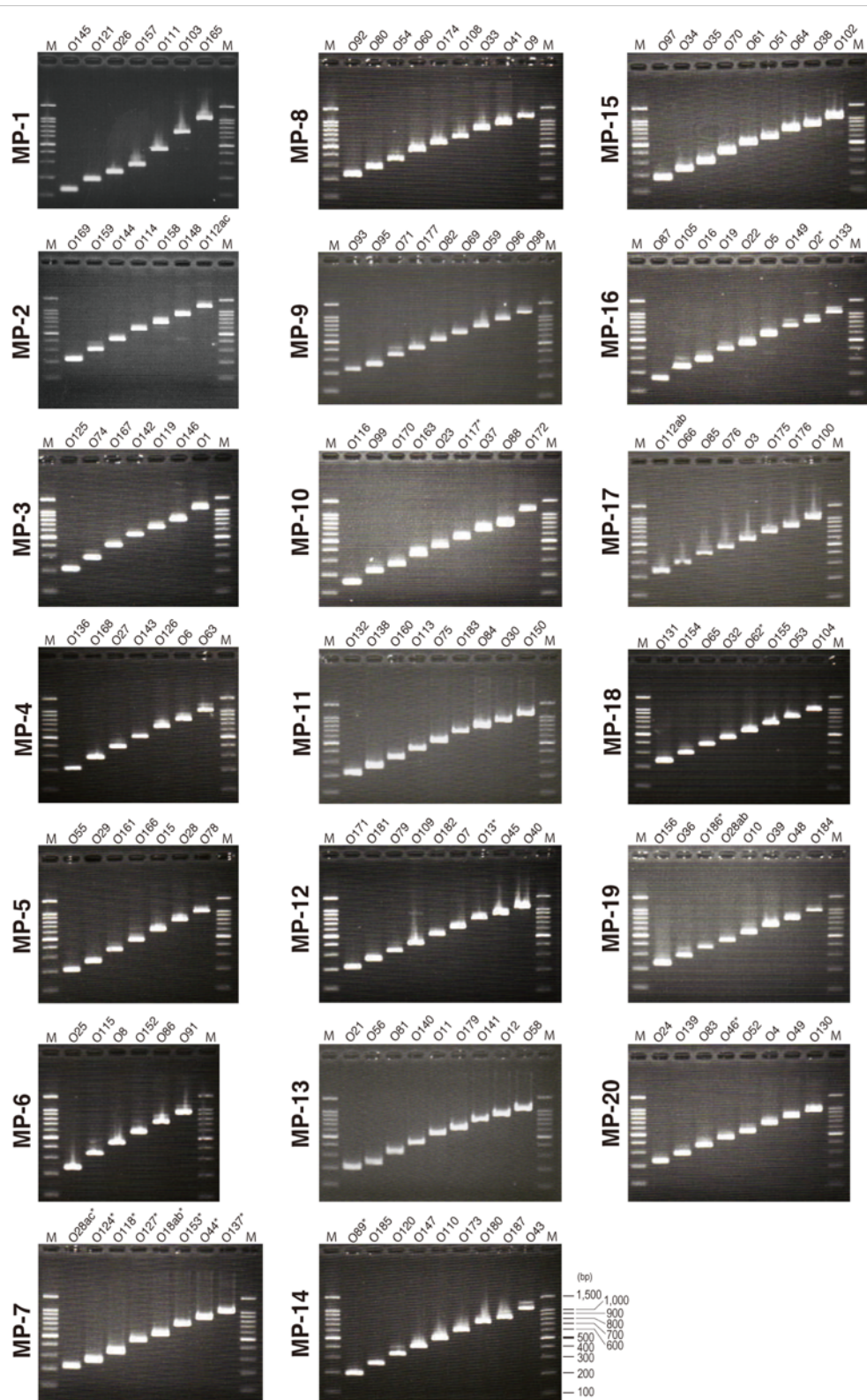
Step4 : go to step 1 (total 25 cycles)

Step5 : 室温保存

②マルチプレックス PCR 法 (フルタイピング)

試験株の Og 型 (または O 群) が不明の場合、全 162 種類の単独プライマーペアを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キット (MP-1 から 20) を用いたフルタイピングが利用できる (図 A)。1 反応系には 6-9 種類のプライマーペアを含む。各キットに含まれるプライマーの組み合わせと産物サイズを別表 2 に示す。ちなみに、EHEC に関連する主要な 7 種類の Og 型 (Og157、Og26、Og111、Og103、Og121、Og145、Og165) の判定プライマーは MP-1 に集約している。

図A. Og-typing用マルチプレックスPCR (MP-1から20) の泳動パターン



《テンプレート DNA》

市販キットなどにより精製した DNA が利用できる。アルカリ熱抽出法により準備した DNA、生

菌を含む培養液、寒天平板培地上のコロニーを釣菌した懸濁液を用いることもできる。ただし、菌量が多い（DNA 濃度が高い）と非特異的な増幅が起こりやすいので注意が必要である。もし複数の MP 反応系で非特異的な増幅が観察される場合は、テンプレート DNA の濃度を 2-10 倍希釈して試すとよい。

《反応液組成》

使用する PCR 反応試薬で勧められている組成を基本とし、以下の点に注意する。精製 DNA を使用する場合、テンプレート DNA の最終濃度は 0.2-1.0 ng/μl が推奨される（全量 30 μl の PCR 反応液の場合、10 ng/μl に調整した DNA を 2 μl 加えると、最終濃度は 0.67 ng/μl となる）。プライマーの最終濃度は、以下に示す 7 種類〔Og165（MP-1）、Og157（MP-1）、Og127（MP-7）、Og98（MP-9）、Og71（MP-9）、Og66（MP-17）、OgGp5（MP-19）〕はそれぞれ 0.4 μM、残る全てのプライマーはそれぞれ 0.2μM が推奨される。

《プライマーミックスの調整方法》

100 μM に調整したプライマー溶液を別表 2 で示す分量で混和し、TE バッファーによって全量 3,520μl に合わせることでプライマーミックスが調整できる。全量 30 μl の PCR 反応液の場合、プライマーミックスを 3.52 μl 加えると、それぞれの最終濃度が 0.2 μM（一部は 0.4 μM）となる。

《反応条件》

全てのマルチプレックス PCR 反応系は以下の反応条件で実施できる。

- Step1 : 94°C 1分
- Step2 : 94°C 30秒
- Step3 : 58°C 30秒
- Step4 : 72°C 1分
- Step5 : go to step 2 (total 25 cycles)
- Step6 : 72°C 2分
- Step7 : 室温保存

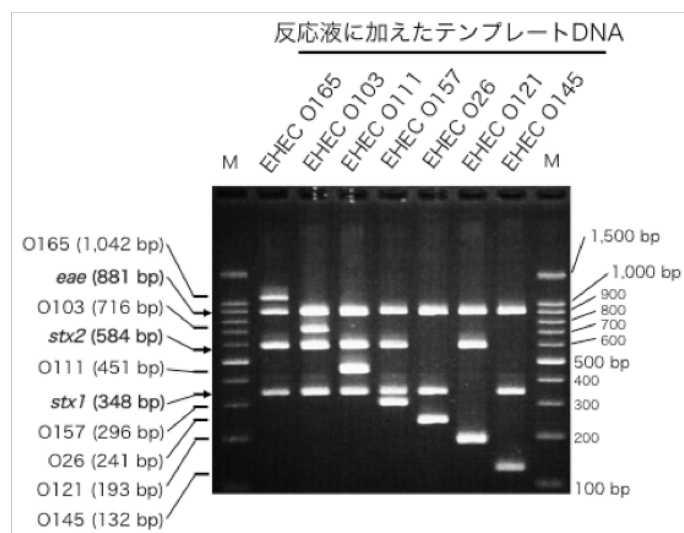
《確認用 *gyrB* プライマー》

フルタイピングを行う際に、テンプレートDNAの濃度や品質に問題がないか、またはPCR反応が良好に行われたかを評価するために、*gyrB* プライマー用の反応チューブを1本追加して同時に調整・反応させることを勧める。別表1に示す *gyrB* プライマーは、DNA ジャイレースをコードした *gyrB* 上の大腸菌に特異的な塩基配列を標的としており、大腸菌の確認（同定）にも利用できる。プライマーの最終濃度は 0.2-1.0 μM 程度が推奨される。マルチプレックスPCR用の反応条件において、大腸菌 (*E. coli*) では十分な増幅が確認されるのに対し、*E. albertii* や *E. harmanii* では少量が増幅し（または増幅しない）、*Escherichia* 以外の属では増幅しない。

③主要な7種類のO血清群と *stx1*、*stx2*、*eae* のマルチプレックスPCR法

EHEC のワンショット検査に、MP-1 に3種類のEHEC病原遺伝子 (*stx1*、*stx2*、*eae*) の検出プライマーを加えたマルチプレックスPCR法 (MP-1 plus) が利用できる（参考文献3）。ただし、電気泳動時に増幅産物をゲル上で十分に展開する必要がある（図B）。

図B MP-1 plusを用いた時の各O血清群に属するEHECの泳動像



0.5 × TBE buffer / 2% Agarose L03 (TaKaRa)
Mupid-2plus (100V) で約45分間泳動

《テンプレートDNA》

上記 ②マルチプレックスPCR法（フルタイピング）と同じ

《反応液組成》

stx1、*stx2*、*eae* の検出プライマーを別表 3 に、反応液組成の例を表 C に示す。*stx1* および *stx2* 検出プライマーのサブタイプ検出範囲については、本編の表 2 (Cebula ら) を参考のこと。

表C. *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ) を使用した場合の組成例

試薬など	組成 (μl)
10 × Ex Taq Buffer	3
dNTP Mixture (2.5mM each)	3
Primer (O157とO165)	(最終濃度 : 0.53μM)
Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度 : 0.13μM)
Primer (その他すべて)	(最終濃度 : 0.27μM)
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)

《反応条件》

上記 ②マルチプレックス PCR 法 (フルタイピング) と同じ

5) その他 (マルチプレックス PCR 法についての注意点など)

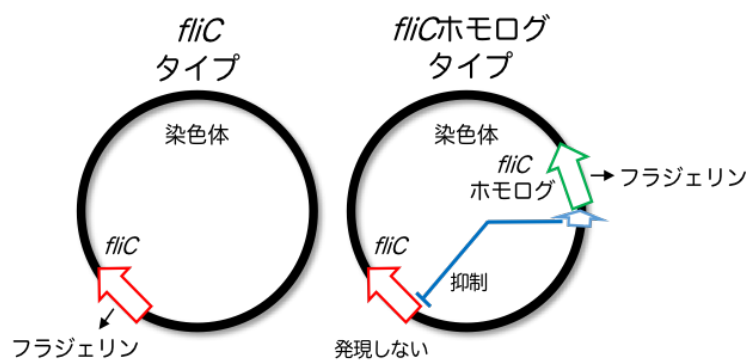
- 100 bp 以下または 1,500 bp 以上に非特異的な増幅が観察されることもあるが、Og 型の判定には影響しないので無視してよい。
- フルタイピング時に、いずれのOg型の増幅産物も確認できない場合がある (確認用 *gyrB* プライマーでの増幅は確認される)。その場合は OgUT (untypable) と判定する。O-AGCの一部が欠失しているか、既定型以外 (新規) のOg型であることが疑われる。
- 2種類のOg型が確認される場合がある。その時の結果は下記の通り「+ (プラス)」で繋いで併記する (例 : Og8+Og156)。これまでのゲノム解析で、染色体上に2種類のO-AGCを保有している菌株が確認されている。このような場合、どちらか一方のOg型と表現型 (O群) が一致するケースが多い。培養液またはテンプレートDNAのコンタミネーションの恐れもあるので、必要に応じて確認すること。
- MP-1 plus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。

b) H 型を判定する PCR 法 (*E. coli* Hg-typing PCR)

1) 標的遺伝子

運動器官であるべん毛は、基部、フック、繊維の 3 つの構造からなる。プロペラの役割を果たす繊維は、*fliC* (またはそのホモログ : 詳細は後述) によってコードされるフラジェリンと呼ばれるタンパク質がらせん状に積み重なった構造をとる。繊維の表面に露出した部分のアミノ酸配列は多様性に富んでおり、この構造的な違いが H 型の多様性を生み出している。多様性領域は *fliC* の中央部分にあり、異なる H 型間では最も似ている組み合わせであっても相同性 90%を下回るものがほとんどである。このような特徴から、*fliC* の中央領域は H 型を判定する PCR 法の標的配列として用いることができる。ただし、H1 と H12 の *fliC* は塩基配列の相同性が 98%以上あり、PCR 法での区別は難しい。

9 種類の H 型では、*fliC* とは異なる遺伝子座に挿入した *fliC* ホモログ (*flkA* など) によってフラジェリンがコードされている (*flkA* : H3、H35、H36、H47、H53、*fliA* : H44、H55、*flnA* : H17、*flmA* : H54)。*fliC* ホモログはプロファージなどの外来性領域に含まれ、*fliC* ホモログを獲得した菌株はその染色体上に *fliC* も保有する (図 C)。*fliC* と *fliC* ホモログが共存する場合、通常は *fliC* の発現は抑えられ、*fliC* ホモログがフラジェリンを発現する。つまり、H 型 (表現型) は *fliC* ホモログの遺伝子型と一致することになる (参考文献 4)。



図C. *fliC*と*fliC*ホモログの関係

2) PCR プライマー

H1 から H56 までの全ての H 型に対応した Hg 型を判定できる PCR プライマーを別表 4 に示す。ただし、Hg1 と Hg12 はこの両方を検出できる共通プライマー (Hg1/12) である (参考文献 4)。

3) PCR 反応試薬

以下で述べる単独およびマルチプレックスの両 PCR 法では、各社から販売されている一般的な PCR 用 DNA ポリメラーゼが利用できる。Hot-Start 用である必要は無い。

4) 目的別の実施方法

①単独 PCR 法

試験株が特定の Hg 型（または H 型）であるか否かを判定したい場合、別表 4 の単独プライマーペア（全 51 種類）のいずれかを用いた PCR 法（単独 PCR 法）で判定できる。確認のために対象 Hg 型（または H 型）の陽性コントロール DNA を用いることが望ましい。

《テンプレート DNA》

市販キットなどにより精製した DNA やアルカリ熱抽出法により準備した DNA を用いることができる。また、生菌を含む培養液（28 μ l の反応液に対して 2 μ l 程度）や寒天平板培地上のコロニー（つま楊枝やチップなどの先で釣菌した極少量の菌体）を PCR 反応液に直接加えることでも判定できる。

《反応液組成》

使用する PCR 反応試薬で勧められている組成を基本とし、以下の点に注意する。精製 DNA を使用する場合、テンプレート DNA の最終濃度は 0.1-1.0 ng/ μ l（全量 30 μ l の PCR 反応液の場合、10 ng/ μ l に調整した DNA を 2 μ l 加えると、最終濃度は 0.67 ng/ μ l となる）、プライマーの最終濃度は 0.2-1.0 μ M 程度が推奨される。

《反応条件》

全ての単独 PCR 法は以下の反応条件で実施できる。

Step1 : 94°C 20 秒

Step2 : 58°C 20 秒

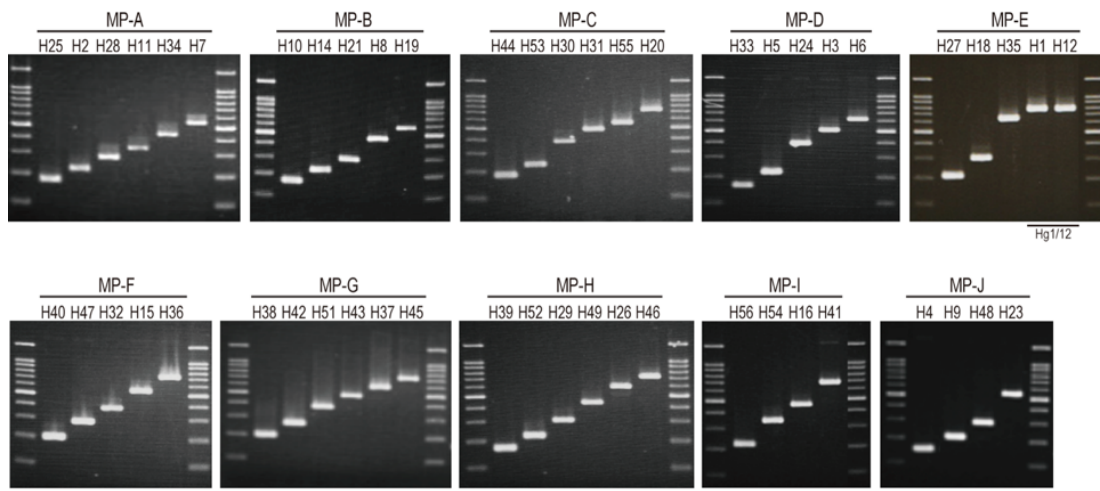
Step3 : 72°C 1 分

Step4 : go to step 1 (total 25 cycles)

Step5 : 室温保存

②マルチプレックス PCR 法（フルタイピング）

試験株の Hg 型（または H 型）が不明の場合、全 51 種類の単独プライマーペアを含む 10 種類のマルチプレックス PCR キット（MP-A から J）を用いたフルタイピングが利用できる（図 D）。1 反応系に 4-6 種類のプライマーペアを含む。各キットに含まれるプライマーの組み合わせと産物サイズを別表 4 に示す。ちなみに、EHEC に関連する主要な 11 種類の Hg 型の判定プライマーは、表 D に示す通り MP-A と B に集約している。



図D. Hg-typing用マルチプレックスPCR（MP-AからJ）の泳動パターン

表D. MP-AとMP-Bで判定可能なHg型と、国内外で患者より分離されるEHECの主なO群の関係

MP-A (6種類)	EHECにみられるO群* (太字は主要な群)	MP-B (5種類)	EHECにみられるO群* (太字は主要な群)
Hg2	O45、 O103	Hg 8	O111
Hg7	O157	Hg10	O6、O91
Hg11	O26 、O103、O111	Hg14	O91
Hg25	O103、O145、 O165	Hg19	O121 、O178
Hg28	O145	Hg21	O91、O111
Hg34	O145		

*O群によっては運動性が無く、表現型がHとなる菌株が大半を占める場合もある

《テンプレート DNA》

市販キットなどにより精製した DNA が利用できる。アルカリ熱抽出法により準備した DNA、生菌を含む培養液、寒天平板培地上のコロニーを釣菌した懸濁液を用いることもできる。ただし、

菌量が多い（DNA 濃度が高い）と非特異的な増幅が起こりやすいので注意が必要である。もし複数の MP 反応系で非特異的な増幅が観察される場合は、テンプレート DNA の濃度を 2-10 倍希釈して試すとよい。

《反応液組成》

使用する PCR 反応試薬で勧められている組成を基本とし、以下の点に注意する。精製 DNA を使用する場合、テンプレート DNA の最終濃度は 0.2-1.0 ng/μl が推奨される（全量 30μl の PCR 反応液の場合、10 ng/μl に調整した DNA を 2 μl 加えると、最終濃度は 0.67 ng/μl となる）。プライマーの最終濃度はそれぞれ 0.4 μM が推奨される。

《プライマーミックスの調整方法》

100 μM に調整したプライマー溶液を別表 5 で示す分量で混和し、TE バッファーによって全量 3,520 μl に合わせることでプライマーミックスが調整できる。全量 30 μl の PCR 反応液の場合、プライマーミックスを 3.52 μl 加えると、それぞれの最終濃度が 0.2 μM となる。

《反応条件》

全てのマルチプレックス PCR 反応系は以下の反応条件で実施できる。

- Step1 : 94°C 1分
- Step2 : 94°C 30秒
- Step3 : 58°C 30秒
- Step4 : 72°C 1分
- Step5 : go to step 2 (total 25 cycles)
- Step6 : 72°C 2分
- Step7 : 室温保存

《確認用 *gyrB* プライマー》

フルタイピングを行う際には、Og-typing と同様に *gyrB* プライマーの利用を勧める。

5) その他（マルチプレックス PCR 法についての注意点など）

- ・ 100 bp 以下または 1,000 bp 以上に非特異的な増幅が観察されることもあるが、Hg 型

の判定には影響しないので無視してよい。

- ・フルタイピング時に、いずれの Hg 型の増幅産物も確認できない場合がある（確認用 *gyrB* プライマーでの増幅は確認）。その場合は HgUT (untypable) と判定する。*fliC* または *fliC* ホモログが欠失しているか、既定型以外（新規）の Hg 型であることが疑われる。
- ・2種類の Hg 型が確認される場合がある。その時の結果は下記の通り「+（プラス）」でつないで併記する（例：Hg8+Hg53）。通常、*fliC* ホモログタイプの菌株は *fliC* も保有するため、2種類の Hg 型が検出される（図 C）。

c) 参考文献

- 1) 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)
- 2) 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 53(8):2427-32 (2015)
- 3) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真、腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価、日本食品微生物学会雑誌 32(4):215-218 (2015)
- 4) Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. J Clin Microbiol. pii: JCM.00190-18 (2018)

6. 検査依頼先

各都道府県の地方衛生研究所等を対象とする。

7. 執筆者一覧

2019年9月改訂版著者（所属）：

勢戸 和子（大阪健康安全基盤研究所）
井口 純（宮崎大学）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2017年2月改訂版著者（一部当時の所属を含む）：

勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所）
井口 純（宮崎大学）
磯部 順子（富山県衛生研究所）
原田 哲也（大阪府立公衆衛生研究所）
平井 晋一郎（千葉県衛生研究所）
横山 栄二（千葉県衛生研究所）
小西 典子（東京都健康安全研究センター）
甲斐 明美（東京医科大学）
緒方 喜久代（大分県薬剤師会検査センター）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）

2012年6月改訂版著者（一部当時の所属を含む）：

八柳 潤（秋田県横手保健所）
横山 栄二（千葉県衛生研究所）
小西 典子（東京都健康安全研究センター）
松本 昌門（愛知県衛生研究所）
磯部 順子（富山県衛生研究所）
勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所）
横田 正春（堺市衛生研究所）
田内 敦子（広島市衛生研究所）
堀川 和美（福岡県保健環境研究所）
伊豫田 淳（国立感染症研究所）
寺嶋 淳（国立医薬品食品衛生研究所）

8. 謝辞

本マニュアルは次の研究資金の支援によって作成されました：厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業；国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業；文部科学研究費助成事業。

別表・腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル〔2019年9月改訂〕

<PCR法による大腸菌血清型判定法>

*本表のワードファイルは、宮崎大学農学部・井口研究室のHP (<https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/iguchi>) からダウンロードすることができます。

別表1. それぞれのOg型を判定できるPCRプライマーペアのリスト

O血清群	Og型	標的 遺伝子	プライマー名	配列 (5'-3')	産物長 (bp)	参考文献
O1	Og1	<i>wzx</i>	Og1-PCR_F	GTGAGCAAAAAGTGAAATAAGGAACG	1098	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og1-PCR_R	CGCTGATACGAATACCATCCTAC		
O3	Og3	<i>wzy</i>	Og3-PCR_F	GAATGAGTGCCACAATGGCTA	571	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og3-PCR_R	GCAGAAAGAATGGACACGCAT		
O4	Og4	<i>wzx</i>	Og4-PCR_F	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	664	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og4-PCR_R	AATAATTTGCTATACCCACACCCTC		
O5	Og5	<i>wzy</i>	Og5-PCR_F	AGGGCAATCTCCGTAATGA	566	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og5-PCR_R	CCTCTTGGGCTATAAACAACC		
O6	Og6	<i>wzy</i>	Og6-PCR_F	GGATGACGATGTGATTTGGCTAAC	783	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og6-PCR_R	TCTGGGTTTGTGTGTATGAGGC		
O7	Og7	<i>wzx</i>	Og7-PCR_F	CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC	610	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og7-PCR_R	TGGCTTCGAGATTAACCTATTCT		
O8	Og8	<i>orf469</i>	Og8-PCR_F	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	448	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og8-PCR_R	GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG		
O9	Og9	<i>wzt</i>	Og9-PCR_F	CGTCGCAAGGCGTATAAATA	1235	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og9-PCR_R	CCCAGAAATCCATGCTC		
O10	Og10	<i>wzy</i>	Og10-PCR_F	GCTGGAGTTGCAGGTGCTATA	546	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og10-PCR_R	AAGGGGCAGGAATGGAAGTA		
O11	Og11	<i>wzy</i>	Og11-PCR_F	ATTAATGGGGCCAGATGGAGT	509	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og11-PCR_R	ATTGCGCTGGGATGAATACA		
O12	Og12	<i>wzy</i>	Og12-PCR_F	CAATGGGGTTGTCGTATCAAA	885	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og12-PCR_R	AAAAATGCCCATAGGACCA		
O15	Og15	<i>wzy</i>	Og15-PCR_F	TGGCAATGGATTGGTATCT	608	Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
			Og15-PCR_R	AGGGAAGAACACCCGCTCTAA		
O16	Og16	<i>wzx</i>	Og16-PCR_F	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	302	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
			Og16-PCR_R	GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG		
O19	Og19	<i>wzy</i>	Og19-PCR_F	ATAAGCGCGAGCTTAGCTCTT	389	Iguchi A. et al.

			Og19-PCR_R	CACAACACGGCGCTAAGTAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O21	Og21	wzx	Og21-PCR_F	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG	209	Li D. et al.
			Og21-PCR_R	TGAAAAAAGGGAACAGAAGAGCC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
O22	Og22	wzx	Og22-PCR_F	TGTCGCCACTACTTCCGCGTTTA	458	Fratamico PM. et al.
			Og22-PCR_R	AGCCCATGACATTACTACGGCACT		Food Analytical Methods. 2009 2:169–179
O23	Og23	wzy	Og23-PCR_F	TCGTGGTAATGGAGGAGATG	427	Iguchi A. et al.
			Og23-PCR_R	TGCCTTCTCGGCTCTGTATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O24	Og24	wzx	Og24-PCR_F	TGGGATTTATGCGGTTGCTT	233	Iguchi A. et al.
			Og24-PCR_R	TGCGAGAAGAGGAGTAGTCGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O25	Og25	wzy	Og25-PCR_F	AGAGATCCGCTTTTTATTGTTTCGC	230	Li D. et al.
			Og25-PCR_R	GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
O26	Og26	wzx	Og26-PCR_F	GGGGGTGGGTACTATATTGG	241	Paddack Z. et al.
			Og26-PCR_R	AGCGCCTATTCAGCAAAGA		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O27	Og27	wzy	Og27-PCR_F	AACCCTATGGGAAGCTCTGGA	382	Iguchi A. et al.
			Og27-PCR_R	ACACACAGGCAACACATCGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O28ab	Og28ab	wzy	Og28ab-PCR_F	AAGCGCAGTGGATCTCGTT	446	Iguchi A. et al.
			Og28ab-PCR_R	ACCACCCATGCGCATAGTAAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O29	Og29	wzy	Og29-PCR_F	TGCTCCCTGCTGGTGGTTATA	260	Iguchi A. et al.
			Og29-PCR_R	TACGTCAAGCCTGGTGCAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O30	Og30	wzy	Og30-PCR_F	GAATGGGAGGGGATATCAGAA	894	Iguchi A. et al.
			Og30-PCR_R	TTGCGCTACCCTGAATAGCAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O32	Og32	wzy	Og32-PCR_F	TCCCAACCCTGTTGCTTTAA	452	Iguchi A. et al.
			Og32-PCR_R	CAGCCAGACCAGTAGAGGAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O33	Og33	wzy	Og33-PCR_F	GGGGCGTGGTGTGTTATTAT	783	Iguchi A. et al.
			Og33-PCR_R	TCACCTACGACCAATGCAGAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O34	Og34	wzy	Og34-PCR_F	TGCTTCTGTGGGGAGTTTA	247	Iguchi A. et al.
			Og34-PCR_R	AATGGCATAATTCGTGCCATC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O35	Og35	wzy	Og35-PCR_F	TGCAGGTGCTCAATTGGTT	303	Iguchi A. et al.
			Og35-PCR_R	CCATCCAATACGGAGCAATT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O36	Og36	wzy	Og36-PCR_F	AATCCAGGGATGGTTATCA	292	Iguchi A. et al.
			Og36-PCR_R	TATAGAGAATGGCACACGCTG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O37	Og37	wzy	Og37-PCR_F	TTCGCCCTTGAAGGAGAATT	683	Iguchi A. et al.
			Og37-PCR_R	TTATGCGCTCCATTCCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O38	Og38	wzy	Og38-PCR_F	TCGCCATTGTTACCCAGT	822	Iguchi A. et al.
			Og38-PCR_R	ATTCGAAAGTCTGGGAAAG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O39	Og39	wzy	Og39-PCR_F	GGATGGAGCGGAATACTGATT	667	Iguchi A. et al.
			Og39-PCR_R	CAAACCAACCGGCATAATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

O40	Og40	<i>wzy</i>	Og40-PCR_F	ACGGGTAATAGCTTAGGGCAA	1082	Iguchi A. et al.
			Og40-PCR_R	CGAGCTACCCAATATGCTGCT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O41	Og41	<i>wzx</i>	Og41-PCR_F	TGGATCGCTCGTTATTTGG	942	Iguchi A. et al.
			Og41-PCR_R	CGCCACCCCTTGGTATATAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O43	Og43	<i>wzy</i>	Og43-PCR_F	TTTTGGGTGCAACTACTGCAT	1041	Iguchi A. et al.
			Og43-PCR_R	GCTTTACCCCAATTGTAGCGAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O45	Og45	<i>wzy</i>	Og45-PCR_F	GTCCCCAGGGTTTGTGTATG	916	Iguchi A. et al.
			Og45-PCR_R	AATAAGGGAGCCCGCGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O48	Og48	<i>wzy</i>	Og48-PCR_F	TATGGTCTGCTTTCTCCAA	793	Iguchi A. et al.
			Og48-PCR_R	AGGAATTGCAGTTGTTCCGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O49	Og49	<i>wzy</i>	Og49-PCR_F	AGTTGCCTTTTCTGGGTGA	789	Iguchi A. et al.
			Og49-PCR_R	TCGTATCCAATTAAGCCAGCC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O51	Og51	<i>wzy</i>	Og51-PCR_F	CCATGAGGGGAAACAATGTTG	583	Iguchi A. et al.
			Og51-PCR_R	TTTTCCCTTGCTCTCGATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O52	Og52	<i>wzm</i>	Og52-PCR_F	TTTGGTCGCAGCGTAGT	543	Feng L. et al.
			Og52-PCR_R	CAACTCGTGGGAAGATGA		J Bacteriol. 2004 186:4510-9.
O53	Og53	<i>wzy</i>	Og53-PCR_F	AAGCTCAAGGGGCATGTTTT	806	Iguchi A. et al.
			Og53-PCR_R	TTCCCTAACCCCTGCACTAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O54	Og54	<i>wzy</i>	Og54-PCR_F	TGGCAATATATGCGTTTGTGA	351	Iguchi A. et al.
			Og54-PCR_R	TGTGGACCACGTCCAAC TTC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O55	Og55	<i>wzy</i>	Og55-PCR_F	TCCTATTGTGTGCGGGG	207	Iguchi A. et al.
			Og55-PCR_R	CCAGGAAAGCTGCCAATTATC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O56	Og56	<i>wzx</i>	Og56-PCR_F	CTTGGGTTTGAAGGTTGGAT	250	Iguchi A. et al.
			Og56-PCR_R	TGCTAATAACAATGCGCCTG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O58	Og58	<i>wzy</i>	Og58-PCR_F	TAGGTGCAAGTCTATGTGGG	1046	Iguchi A. et al.
			Og58-PCR_R	TAGCCTGGCAGCACAGATTT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O59	Og59	<i>wzy</i>	Og59-PCR_F	TGATCCAGCGGTGAATATT	783	Iguchi A. et al.
			Og59-PCR_R	ACACCTGGGTGAACTCTCCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O60	Og60	<i>wzm</i>	Og60-PCR_F	TAGGTGCGGCATGGCTAATAT	443	Iguchi A. et al.
			Og60-PCR_R	GAATTGGCCAACATCACGAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O61	Og61	<i>wzy</i>	Og61-PCR_F	ATCTCAGACCGTCCGATATT	487	Iguchi A. et al.
			Og61-PCR_R	GCATCGAACCGGGCTATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O63	Og63	<i>wzy</i>	Og63-PCR_F	ATTCGGTCTGCTGGAATTA	995	Iguchi A. et al.
			Og63-PCR_R	TGAACATTATGCCACCGATG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O64	Og64	<i>wzy</i>	Og64-PCR_F	TGGCAATACAAGTCTGATGC	727	Iguchi A. et al.
			Og64-PCR_R	AGGGCGTTACCGGATAGAAAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O65	Og65	<i>wzy</i>	Og65-PCR_F	TGTTGGCGCTGTTTATGTT	381	Iguchi A. et al.

			Og65-PCR_R	CCCATAATTGCACCGCATAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
066	Og66	wzy	Og66-PCR_F	CGAGCAAATTAATCCAC	301	Cheng J. et al.
			Og66-PCR_R	TCAACACTAAACGAAACG		J Microbiol. 2007 45:69-74.
069	Og69	wzy	Og69-PCR_F	ACCTGGCTTTGGAGTTGATGA	653	Iguchi A. et al.
			Og69-PCR_R	TAGCCAATGGTAGTCGACCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
070	Og70	wzy	Og70-PCR_F	CTTGCCAAAGGCACAAATCT	393	Iguchi A. et al.
			Og70-PCR_R	CCTTCCGTCTGCCAATAAAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
071	Og71	wzx	Og71-PCR_F	GCATTATTAGCCACTTCAA	344	Hu B. et al.
			Og71-PCR_R	AGCCGTATCATTAGAGCAGA		FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 59:161-9
074	Og74	wzy	Og74-PCR_F	TCCAAAGTGATATGTTGGCA	289	Iguchi A. et al.
			Og74-PCR_R	TATGCGCAGGAAAGTCAATG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
075	Og75	wzy	Og75-PCR_F	GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT	511	Li D. et al.
			Og75-PCR_R	ACCCGATAATCATATTCTTCCAAC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
076	Og76	wzy	Og76-PCR_F	TGGCTTTTATGGCGATATGTG	457	Iguchi A. et al.
			Og76-PCR_R	TTGTGAGTATAAGCCCCCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
078	Og78	wzx	Og78-PCR_F	GGTATGGGTTTGGTGGTA	992	Liu B. et al.
			Og78-PCR_R	AGAATCACAACTCTCGGCA		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
079	Og79	wzy	Og79-PCR_F	AAATGGTCGTGACGCGAAA	333	Iguchi A. et al.
			Og79-PCR_R	TTGTCTGTACGCCCTGAAAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
080	Og80	wzy	Og80-PCR_F	TGGTGTGATCCACTAGCGT	285	Iguchi A. et al.
			Og80-PCR_R	CGAGAGTACCTGGTCCCAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
081	Og81	wzy	Og81-PCR_F	TGGTAGGTTTGGTGGGAAT	329	Iguchi A. et al.
			Og81-PCR_R	GGACGGATGACAAATGCGATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
082	Og82	wzx	Og82-PCR_F	TCCCTATTTAACCAGGGTGCT	538	Iguchi A. et al.
			Og82-PCR_R	TGAATCCCTAAAACCTCGGCTT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
083	Og83	wzx	Og83-PCR_F	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG	362	Li D. et al.
			Og83-PCR_R	TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
084	Og84	wzx	Og84-PCR_F	GTTGGCATATCAATTGGGGTT	775	Iguchi A. et al.
			Og84-PCR_R	CGTTCCAAGAAGCACTCCAGT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
085	Og85	wzy	Og85-PCR_F	TTCGAGGAGATCTCGATGT	388	Iguchi A. et al.
			Og85-PCR_R	TTCCATCATTCCCAGCTTGT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
086	Og86	wzy	Og86-PCR_F	GAGTTATTTTGGTTACCCCTT	731	Liu B. et al.
			Og86-PCR_R	TAGCCCACCTATGAATAGAGC		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
087	Og87	wzy	Og87-PCR_F	GGATGAATGGGAAAAGCAA	167	Iguchi A. et al.
			Og87-PCR_R	TCACGCGTAAATCTTCAATCC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
088	Og88	wzy	Og88-PCR_F	CTGCGCTTGGAGCATTCTAT	781	Iguchi A. et al.

			Og88-PCR_R	GGCGCGAAACTTTCATATGC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O91	Og91	wzy	Og91-PCR_F	GCCTGCGATACCAGTATCCTT	953	Iguchi A. et al.
			Og91-PCR_R	CCCCCATAAATTGGGATCATAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O92	Og92	wzt	Og92-PCR_F	TATTCGCGTGGAATGCTCTT	233	Iguchi A. et al.
			Og92-PCR_R	CAACGGGCTCTTCCATAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O93	Og93	wzy	Og93-PCR_F	AAAGTGCCCGATATGCGAA	229	Iguchi A. et al.
			Og93-PCR_R	CCACATAAGCTTGAGTTGCGT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O95	Og95	wzt	Og95-PCR_F	ATGGTCCATTTCTGTCTGC	272	Iguchi A. et al.
			Og95-PCR_R	AACAGCCAAAGCTTCGTCGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O96	Og96	wzy	Og96-PCR_F	TTAGGAGGTTTCAAAGCGG	938	Iguchi A. et al.
			Og96-PCR_R	TGGTATCGGAATGCATTGCT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O97	Og97	wzt	Og97-PCR_F	AGGCAGATCGTCCACAGTCA	184	Iguchi A. et al.
			Og97-PCR_R	ACAGGATAAATGCCAGCCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O98	Og98	wzy	Og98-PCR_F	TCCAGGCAAATGCAGTGCTT	1139	Iguchi A. et al.
			Og98-PCR_R	TGCTGTTGTGCTTGGAGATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O99	Og99	wzt	Og99-PCR_F	TATCGTCCCGGCATTCTTA	226	Iguchi A. et al.
			Og99-PCR_R	ATAGCGCGCATCTAAAGGGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O100	Og100	wzy	Og100-PCR_F	TATGGGGGCGAATTAGGTAT	1006	Iguchi A. et al.
			Og100-PCR_R	ACCTGCCAGGACGAAAGAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O102	Og102	wzy	Og102-PCR_F	TCCGGTAAGTATCTTACGGCA	1025	Iguchi A. et al.
			Og102-PCR_R	GCACCAAATAGCGAAATACCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O103	Og103	wzx	Og103-PCR_F	TAAGTACGGGGTGCTTTTT	716	Paddack Z. et al.
			Og103-PCR_R	AAGTCCCGAGCACGTATAA		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O104	Og104	wzx	Og104-PCR_F	AAGGCAGTAGCACGTTAGCC	993	Iguchi A. et al.
			Og104-PCR_R	AATAGCTGCGCTAAAGCTGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O105	Og105	wzy	Og105-PCR_F	GCTGTGTTATTGCTTTTTGG	246	Iguchi A. et al.
			Og105-PCR_R	TGCGCTGCCACTTAAATCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O108	Og108	wzy	Og108-PCR_F	AGCTCCCTGTCTACGGTTGA	647	Iguchi A. et al.
			Og108-PCR_R	CCATCCCATCACCAAATTGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O109	Og109	wzy	Og109-PCR_F	GGATAATGGGGTGGTTTTT	409	Iguchi A. et al.
			Og109-PCR_R	GCTTCCCATCCTTGCAATAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O110	Og110	wzy	Og110-PCR_F	CCTTGATAGGAGCGGTTTAT	493	Iguchi A. et al.
			Og110-PCR_R	ACAACCAAAGCCCGTTATCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O111	Og111	wzx	Og111-PCR_F	CAAGAGTGCTCTGGCTTCT	451	Paddack Z. et al.
			Og111-PCR_R	AACGCAAGACAAGGCAAAAC		Vet Microbiol. 2012 156:381-8
O112ab	Og112ab	wzy	Og112ab-PCR_F	CGGGTTAACAGCCATTTTT	241	Iguchi A. et al.
			Og112ab-PCR_R	CAGCCCCCATTTACAGTAAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

O112ac	Og112ac	wzx	Og112ac-PCR_F	CTGTCCTTTTGCGCGAATTA	1180	Iguchi A. et al.
			Og112ac-PCR_R	AAATCCCAGAGCAAGGGTAGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O113	Og113	wzy	Og113-PCR_F	GCATGTATGATGCATAGCTTCGCC	419	DebRoy C. et al.
			Og113-PCR_R	TGATATCGTTTCGCTAACCAACCA		Appl Environ Microbiol. 2004 70:1830-2
O114	Og114	wzy	Og114-PCR_F	TCCCAAGCCATTATATTTGG	553	Iguchi A. et al.
			Og114-PCR_R	TCTGATGCTGGCATCACACTC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O115	Og115	wzy	Og115-PCR_F	CGTCGTGATGTGCATTGTTT	327	Wang Q. et al.
			Og115-PCR_R	GCAACACTAAACGCCTCTTT		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
O116	Og116	wzx	Og116-PCR_F	TCCTGCAATGACACTGACGAA	156	Iguchi A. et al.
			Og116-PCR_R	ATAATCCCAATACCGCCAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O119	Og119	wzx	Og119-PCR_F	GTTAACAATCAGCTCGATAAAC	650	Liu B. et al.
			Og119-PCR_R	TTTGCAAGTAAACACCCTAAAC		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
O120	Og120	wzx	Og120-PCR_F	TATGGGAGTGGGGTTATGCA	329	Iguchi A. et al.
			Og120-PCR_R	ATGGCGTCCAAGAGGATAGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O121	Og121	wzy	Og121-PCR_F	CAAATGGCGTTAATACAGCC	193	Iguchi A. et al.
			Og121-PCR_R	TTCCACCATCCAACCTCTAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O125	Og125	wzy	Og125-PCR_F	TGAATGCTTTGGGCGAAAAGT	210	Iguchi A. et al.
			Og125-PCR_R	CTCGTCTTGAACCTACCAGCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O126	Og126	wzy	Og126-PCR_F	ATGGACCTGATAAAGCATCG	645	Wang Q. et al.
			Og126-PCR_R	AACTTAATACGACCGGAAA		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
O128	Og128	wzy	Og128-PCR_F	ATGATTTCTTACGGAGTGC	782	Li Y. et al.
			Og128-PCR_R	CTCTAACCTAATCCCTCCC		J Clin Microbiol. 2006 44:4376-83.
O130	Og130	wzy	Og130-PCR_F	TAGCCCGGTCAATCCAACCTTA	944	Iguchi A. et al.
			Og130-PCR_R	CGCCAACAATATAGGAACCC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O131	Og131	wzy	Og131-PCR_F	AAATTGGATTGCCTGCCCT	238	Iguchi A. et al.
			Og131-PCR_R	AAAGATGCAACCGCCTGTC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O132	Og132	wzy	Og132-PCR_F	GGCGTGAGAACCACTTCAATA	215	Iguchi A. et al.
			Og132-PCR_R	AAACCAGTTCACCCAACAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O133	Og133	wzy	Og133-PCR_F	TCTGCGTTATGGCAACTGTCA	1017	Iguchi A. et al.
			Og133-PCR_R	CACTCGCAAACGTCTCACATT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O136	Og136	wzy	Og136-PCR_F	TGTTGAAGGTGGCGTAATAGC	210	Iguchi A. et al.
			Og136-PCR_R	AAATACACGCCCATCAATG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O138	Og138	wzy	Og138-PCR_F	CTGCATGGTTCTTTCTGTCA	267	Iguchi A. et al.
			Og138-PCR_R	CGGACAAAATGGCCAATACG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O139	Og139	wzy	Og139-PCR_F	TACGCATTCTGTAACGAGGAT	287	Iguchi A. et al.
			Og139-PCR_R	CATCCCACCATAAAAGAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O140	Og140	wzy	Og140-PCR_F	CTGCGCATGCAATTTCTTTG	409	Iguchi A. et al.

			Og140-PCR_R	AAACCGATCCTAGCCGGAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O141	Og141	wzy	Og141-PCR_F	TTCGGGTGCTTATAGTTGGG	745	Iguchi A. et al.
			Og141-PCR_R	CGAAAATCGGTAAGCTATGGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O142	Og142	wzy	Og142-PCR_F	TGGGCTGCATCATTTTTTC	538	Iguchi A. et al.
			Og142-PCR_R	GGGCACGTTGACGTAATCTAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O143	Og143	wzy	Og143-PCR_F	TGGCCTGCATGCTCTTTTT	500	Iguchi A. et al.
			Og143-PCR_R	ATATACCCCTCCGAGGACAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O144	Og144	wzx	Og144-PCR_F	CGATGCAGATTAATTCAGCCT	406	Iguchi A. et al.
			Og144-PCR_R	AACTGTGGCTCATGCCAATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O145	Og145	wzy	Og145-PCR_F	TTCGCGCACAGCATGGTTAT	132	Iguchi A. et al.
			Og145-PCR_R	TACAATGCACCCGAAACAGT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O146	Og146	wzx	Og146-PCR_F	CGCCACAATTACCATGGGA	801	Iguchi A. et al.
			Og146-PCR_R	CCCCCTCAGGCAAAATTACA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O147	Og147	wzy	Og147-PCR_F	TGGAAATGCTCTCATTCCATTTGCCT	399	DebRoy et al.
			Og147-PCR_R	GATGACATTACCCAAACCAGAACC		Foodborne Pathog Dis. 2010 7:1407-1414
O148	Og148	wzx	Og148-PCR_F	TGGCAACCATTTGTCTTGCA	865	Iguchi A. et al.
			Og148-PCR_R	CCCCAAGCCCCATAATAGTAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O149	Og149	wzy	Og149-PCR_F	TTTGGTGCAGATACTCAGA	709	Han W. et al.
			Og149-PCR_R	GAACAATAGATGCGATACAA		Appl Environ Microbiol. 2007 73:4082-8
O150	Og150	wzx	Og150-PCR_F	ACCACCGGATATGAACATGA	1089	Iguchi A. et al.
			Og150-PCR_R	AGTCCAAAGCAACCAACCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O152	Og152	wzy	Og152-PCR_F	AGGCGCTGATTACTCCGATA	568	Iguchi A. et al.
			Og152-PCR_R	ACCTACCCCACTTCCGATTTT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O154	Og154	wzx	Og154-PCR_F	TCCGACACAGTTAGGTGCGTA	299	Iguchi A. et al.
			Og154-PCR_R	TAATCACCCCGACAATAAGCC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O155	Og155	wzy	Og155-PCR_F	ATGCCATAGGCAATTTGATT	671	Iguchi A. et al.
			Og155-PCR_R	GAGCATCGTGCGACCTGATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O156	Og156	wzy	Og156-PCR_F	GGAAAATGGAACATTTAGCGG	236	Iguchi A. et al.
			Og156-PCR_R	TCGGAGTGCCAACCAAAATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O157	Og157	<i>rfbE (per)</i>	Og157-PCR_F	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	296	Bertrand R. and Roig B.
			Og157-PCR_R	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG		Water Res. 2007 41:1280-6
O158	Og158	wzy	Og158-PCR_F	CTGCGGTATTACCCAGAACAA	693	Iguchi A. et al.
			Og158-PCR_R	ACGCATTCGATGCAATTCCT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O159	Og159	wzy	Og159-PCR_F	TGTGTATGTTAGGCGGGTAA	298	Iguchi A. et al.
			Og159-PCR_R	AGTCGGTCCATTTGTTGCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O160	Og160	wzx	Og160-PCR_F	TGTTTCAGGGGCTTAAAAG	333	Iguchi A. et al.
			Og160-PCR_R	CAACTTGATACGTTGTCCCCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

O161	Og161	wzx	Og161-PCR_F	TATGTTGCCGATATTCGGT	349	Iguchi A. et al.
			Og161-PCR_R	AGGCAACGGATGGAATTGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O163	Og163	wzy	Og163-PCR_F	GCAATCTTGAAGCCAGAACCT	342	Iguchi A. et al.
			Og163-PCR_R	AAGATGTCCACTCCCTGCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O165	Og165	wzx	Og165-PCR_F	GGCGTAAATAAAATATGGGGG	1042	Iguchi A. et al.
			Og165-PCR_R	GCCCTCTAACAAACGAATTGT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O166	Og166	wzy	Og166-PCR_F	TTCATAGCTGGCCTCCTTGTT	462	Iguchi A. et al.
			Og166-PCR_R	TCTATTCCCGAATCCTTTCT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O167	Og167	wzy	Og167-PCR_F	TCAGGGCAATTACAATCCTT	403	Iguchi A. et al.
			Og167-PCR_R	TCGCGCATAGAATAGCATGTC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O168	Og168	wzy	Og168-PCR_F	AGTGAGCCTGCTGCATTATGT	282	Iguchi A. et al.
			Og168-PCR_R	ACGCTGCTGGATACTATCCGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O169	Og169	wzx	Og169-PCR_F	GCCGGTTCAACAATCGTAAT	221	Iguchi A. et al.
			Og169-PCR_R	GCCGCTTAAACAATTGCTTTC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O170	Og170	wzy	Og170-PCR_F	TTGCGTTCGGAATTGTTACTC	271	Iguchi A. et al.
			Og170-PCR_R	AATCCAACACCCGCATTTTG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O171	Og171	wzy	Og171-PCR_F	AGCGGTGTGGTTCTGTCTTTT	212	Iguchi A. et al.
			Og171-PCR_R	TGAATCCGAGGGGTATCAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O172	Og172	wzx	Og172-PCR_F	TGGGGGTGTGGTATGTTTTT	1108	Iguchi A. et al.
			Og172-PCR_R	AATGCTCCCTGAATCCTGTT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O173	Og173	wzy	Og173-PCR_F	TTCAAAGTGCTCTGGAGGGA	606	Wang Q. et al.
			Og173-PCR_R	TGGCTGAGACTTGACTATTTT		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
O174	Og174	wzy	Og174-PCR_F	CGGAAGTCGACTGCTATTTT	541	Iguchi A. et al.
			Og174-PCR_R	TATGTGACCTAGCACACCCAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O175	Og175	wzy	Og175-PCR_F	TTCGCAAGCTACCTGCTTT	690	Iguchi A. et al.
			Og175-PCR_R	TGTATCCCCAAACATCAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O176	Og176	wzy	Og176-PCR_F	TTGGCGTGCCAGGTATATATC	809	Iguchi A. et al.
			Og176-PCR_R	TGACAGAGCTATCCCACTTGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O177	Og177	wzy	Og177-PCR_F	CCGATACACCGGATGGATTAT	427	Iguchi A. et al.
			Og177-PCR_R	AAGCCAGTACCAGAACAGGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O179	Og179	wzy	Og179-PCR_F	ACGGGCTGATTATTTGTCTCT	608	Iguchi A. et al.
			Og179-PCR_R	AAACAAGACCCCTTGCCATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O180	Og180	wzy	Og180-PCR_F	TGGCATCAACGAATGATGCA	744	Iguchi A. et al.
			Og180-PCR_R	TTGCCATGCTTACCAATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O181	Og181	wzy	Og181-PCR_F	AGGACTCCGATTTACTACCGC	261	Iguchi A. et al.
			Og181-PCR_R	ACAGCGAATGCAACAATTGG		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O182	Og182	wzy	Og182-PCR_F	CGGTGATGGTTCTATTCTTGG	510	Iguchi A. et al.

			Og182-PCR_R	TGCTTGACCAACTGTGTTA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O183	Og183	wzx	Og183-PCR_F	CGTGGTAACCAATTCGCAA	666	Iguchi A. et al.
			Og183-PCR_R	GGAATAACGAACGGTTTACA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O184	Og184	wzy	Og184-PCR_F	TTCTGGTACCAGAGCTTGAT	964	Iguchi A. et al.
			Og184-PCR_R	TCCTGCCCTCACAATGGATAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O185	Og185	wzy	Og185-PCR_F	TGGTCGGTTGCCTTGTTTT	254	Iguchi A. et al.
			Og185-PCR_R	CTGACCGATAAAAGCCAACA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O187	Og187	wzy	Og187-PCR_F	CTTCTGTTGGTCTGCTTTGT	828	Iguchi A. et al.
			Og187-PCR_R	AAAATGAACCGGTCTCGCTA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O20, O137	OgGp1	wzy	Og137-PCR_F	GGGATAGGTTTATTGTTGCA	1007	Wang Q. et al.
[Gp1]			Og137-PCR_R	GTTAGCCATCCACCAAGGTA		Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
O28ac, O42	OgGp2	wzx	Og28ac-PCR_F	GGTAATACACTTGTGTGGTGGGT	218	Fratamico PM. et al.
[Gp2]			Og28ac-PCR_R	ATGATTGACCATCCAGGCCGTAT		Can J Microbiol. 2010 56:308-16
O118, O151	OgGp3	wzy	Og118-PCR_F	GTGGGAGTCTGAATCAAGTTGCGA	344	Liu Y et al.
[Gp3]			Og118-PCR_R	AGCAACCTTACCCAATCCTAAGGG		Foodborne Pathog Dis. 2008 5:449-457
O90, O127	OgGp4	wzy	Og127-PCR_F	TTCATCTCCGCTGGGAATACA	451	Iguchi A. et al.
[Gp4]			Og127-PCR_R	AATTGGTGACGCTGGAATGA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O123, O186	OgGp5	wzy	Og186-PCR_F	TTTCAACAGGTTTCAATGCC	362	Iguchi A. et al.
[Gp5]			Og186-PCR_R	CCCACCAATACCACTGGAATA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O46, O134	OgGp6	wzy	Og46-PCR_F	TTAACTGGTTCAAGGACGGG	445	Iguchi A. et al.
[Gp6]			Og46-PCR_R	TGACCGTTATTGCAAGCGAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O2, O50	OgGp7	wzx	Og2-PCR_F	TGGCCTTGTTGATATACTGCGGA	813	Fratamico PM. et al.
[Gp7]			Og2-PCR_R	TCACGAGCTGAGCGAACTGTTC		Can J Microbiol. 2010 56:308-16
O107, O117	OgGp8	wzy	Og117-PCR_F	TGTTCTCCACTGCGATCATAGGT	518	Liu Y et al.
[Gp8]			Og117-PCR_R	ACATAGAGTACCCGACACCATCAC		Mol Cell Probes. 2007 21:295-302.
O17, O44, O73, O77,	OgGp9	wzy	Og44-PCR_F	GAGGGGCGGATACATTTGTA	849	Iguchi A. et al.
O106 [Gp9]			Og44-PCR_R	ATACCACAGCGGGATGAAGTT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O13, O129, O135	OgGp10	wzy	Og13-PCR_F	TGGTGGTGGAAAGATTACTGGA	774	Iguchi A. et al.
[Gp10]			Og13-PCR_R	CCAAACAAGAACGTCGCTAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O153, O178	OgGp11	wzy	Og153-PCR_F	TCGGTAACGGCTTTGCATTA	703	Iguchi A. et al.
[Gp11]			Og153-PCR_R	AACCCAGCCAATAGCAAAA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O18ab, O18ac	OgGp12	wzx	Og18ab-PCR_F	GTTCCGGTGGTTGATTACAGTTAG	551	Li D. et al.
[Gp12]			Og18ab-PCR_R	CTACTATCATCCTCACTGACCACG		J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
O124, O164	OgGp13	wzx	Og124-PCR_F	AGTCACCCGCGATGAATGATT	270	Iguchi A. et al.
[Gp13]			Og124-PCR_R	GCATTAAGTGGCGCTGAATT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
O62, O68	OgGp14	wzy	Og62-PCR_F	TCATGGTGGTCATCAAGCTTT	548	Iguchi A. et al.
[Gp14]			Og62-PCR_R	ACAATGCTGGATGAAATGCC		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

O89, O101, O162	OgGp15	wzt	Og89-PCR_F	TCTGTTGGACATCGCTCTAGG	198	Iguchi A. et al.
			Og89-PCR_R	AATGCTAATCTCACGCGCAT		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432
【Gp15】						
<i>E. coli</i> -specific <i>gyrB</i>		<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> _F	AGTGATCATGACCGTTCTGCA	622	Iguchi A. et al.
			<i>gyrB</i> _R	TTTGCCATGTAGCGTTCA		J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

別表 2. Og-typing 用マルチプレックス PCR (MP-1 から 20) のプライマーの組み合わせと産物サイズなどの一覧

MP	プライマー名	産物サイズ bp)	Og 型	プライマーミックス調整時の 100	
				mM 調整済みプライマー (forward / reverse) の添加量 (μ l)	関連する O 血清群
MP-1	Og165_PCR	1042	Og165	160/160	O165
	Og103-PCR	716	Og103	80/80	O103
	Og111-PCR	451	Og111	80/80	O111
	Og157-PCR	296	Og157	160/160	O157
	Og26-PCR	241	Og26	80/80	O26
	Og121_PCR	193	Og121	80/80	O121
	Og145_PCR	132	Og145	80/80	O145
	(TE)			2080	
(total)			3520		
MP-2	Og112ac_PCR	1180	Og112ac	80/80	O112ac
	Og148_PCR	865	Og148	80/80	O148
	Og158_PCR	693	Og158	80/80	O158
	Og114_PCR	553	Og114	80/80	O114
	Og144_PCR	406	Og144	80/80	O144
	Og159_PCR	298	Og159	80/80	O159
	Og169_PCR	221	Og169	80/80	O169
	(TE)			2400	
(total)			3520		
MP-3	Og1_PCR	1098	Og1	80/80	O1
	Og146_PCR	801	Og146	80/80	O146
	Og119_PCR	650	Og119	80/80	O119
	Og142_PCR	538	Og142	80/80	O142
	Og167_PCR	403	Og167	80/80	O167
	Og74_PCR	289	Og74	80/80	O74
	Og125_PCR	210	Og125	80/80	O125
	(TE)			2400	
(total)			3520		
MP-4	Og63_PCR	995	Og63	80/80	O63
	Og6_PCR	783	Og6	80/80	O6
	Og126_PCR	645	Og126	80/80	O126
	Og143_PCR	500	Og143	80/80	O143

	Og27_PCR	382	Og27	80/80	O27
	Og168_PCR	282	Og168	80/80	O168
	Og136_PCR	210	Og136	80/80	O136
	(TE)			2400	
	(total)			3520	
MP-5	Og78_PCR	992	Og78	80/80	O78
	Og128_PCR	782	Og128	80/80	O128
	Og15_PCR	608	Og15	80/80	O15
	Og166_PCR	462	Og166	80/80	O166
	Og161_PCR	349	Og161	80/80	O161
	Og29_PCR	260	Og29	80/80	O29
	Og55_PCR	207	Og55	80/80	O55
	(TE)			2400	
	(total)			3520	
MP-6	Og91_PCR	953	Og91	80/80	O91
	Og86_PCR	731	Og86	80/80	O86
	Og152_PCR	568	Og152	80/80	O152
	Og8_PCR	448	Og8	80/80	O8
	Og115_PCR	327	Og115	80/80	O115
	Og25_PCR	230	Og25	80/80	O25
	(TE)			2560	
		(total)			3520
MP-7	Og137_PCR	1007	OgGp1	80/80	O20, O137
	Og44_PCR	849	OgGp9	80/80	O17, O44, O73, O77, O106
	Og153_PCR	703	OgGp11	80/80	O153, O178
	Og18ab_PCR	551	OgGp12	80/80	O18ab, O18ac
	Og127_PCR	451	OgGp4	160/160	O90, O127
	Og118_PCR	344	OgGp3	80/80	O118, O151
	Og124_PCR	270	OgGp13	80/80	O124, O164
	Og28ac_PCR	218	OgGp2	80/80	O28ac, O42
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
MP-8	Og9_PCR	1235	Og9	80/80	O9
	Og41_PCR	942	Og41	80/80	O41
	Og33_PCR	783	Og33	80/80	O33

	Og108_PCR	647	Og108	80/80	O108
	Og174_PCR	541	Og174	80/80	O174
	Og60_PCR	443	Og60	80/80	O60
	Og54_PCR	351	Og54	80/80	O54
	Og80_PCR	285	Og80	80/80	O80
	Og92_PCR	233	Og92	80/80	O92
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
	Og98_PCR	1139	Og98	160/160	O98
	Og96_PCR	938	Og96	80/80	O96
	Og59_PCR	783	Og59	80/80	O59
	Og69_PCR	653	Og69	80/80	O69
	Og82_PCR	538	Og82	80/80	O82
MP-9	Og177_PCR	427	Og177	80/80	O177
	Og71_PCR	344	Og71	160/160	O71
	Og95_PCR	272	Og95	80/80	O95
	Og93_PCR	229	Og93	80/80	O93
	(TE)			1760	
	(total)			3520	
	Og172_PCR	1108	Og172	80/80	O172
	Og88_PCR	781	Og88	80/80	O88
	Og37_PCR	683	Og37	80/80	O37
	Og117_PCR	518	OgGp8	80/80	O107, O117
	Og23_PCR	427	Og23	80/80	O23
MP-10	Og163_PCR	342	Og163	80/80	O163
	Og170_PCR	271	Og170	80/80	O170
	Og99_PCR	226	Og99	80/80	O99
	Og116_PCR	156	Og116	80/80	O116
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
	Og150_PCR	1089	Og150	80/80	O150
	Og30_PCR	894	Og30	80/80	O30
	Og84_PCR	775	Og84	80/80	O84
MP-11	Og183_PCR	666	Og183	80/80	O183
	Og75_PCR	511	Og75	80/80	O75
	Og113_PCR	419	Og113	80/80	O113

	Og160_PCR	333	Og160	80/80	O160
	Og138_PCR	267	Og138	80/80	O138
	Og132_PCR	215	Og132	80/80	O132
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
MP-12	Og40_PCR	1082	Og40	80/80	O40
	Og45_PCR	916	Og45	80/80	O45
	Og13_PCR	774	OgGp10	80/80	O13, O129, O135
	Og7_PCR	610	Og7	80/80	O7
	Og182_PCR	510	Og182	80/80	O182
	Og109_PCR	409	Og109	80/80	O109
	Og79_PCR	333	Og79	80/80	O79
	Og181_PCR	261	Og181	80/80	O181
	Og171_PCR	212	Og171	80/80	O171
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
MP-13	Og58_PCR	1046	Og58	80/80	O58
	Og12_PCR	885	Og12	80/80	O12
	Og141_PCR	745	Og141	80/80	O141
	Og179_PCR	608	Og179	80/80	O179
	Og11_PCR	509	Og11	80/80	O11
	Og140_PCR	409	Og140	80/80	O140
	Og81_PCR	329	Og81	80/80	O81
	Og56_PCR	250	Og56	80/80	O56
	Og21_PCR	209	Og21	80/80	O21
	(TE)			2080	
	(total)			3520	
MP-14	Og43_PCR	1041	Og43	80/80	O43
	Og187_PCR	828	Og187	80/80	O187
	Og180_PCR	744	Og180	80/80	O180
	Og173_PCR	606	Og173	80/80	O173
	Og110_PCR	493	Og110	80/80	O110
	Og147_PCR	399	Og147	80/80	O147
	Og120_PCR	329	Og120	80/80	O120
	Og185_PCR	254	Og185	80/80	O185
	Og89_PCR	198	OgGp15	80/80	O89, O101, O162

	(TE)			2080	
	(total)			3520	
MP-15	Og102_PCR	1025	Og102	80/80	O102
	Og38_PCR	822	Og38	80/80	O38
	Og64_PCR	727	Og64	80/80	O64
	Og51_PCR	583	Og51	80/80	O51
	Og61_PCR	487	Og61	80/80	O61
	Og70_PCR	393	Og70	80/80	O70
	Og35_PCR	303	Og35	80/80	O35
	Og34_PCR	247	Og34	80/80	O34
	Og97_PCR	184	Og97	80/80	O97
	(TE)			2080	
(total)			3520		
MP-16	Og133_PCR	1017	Og133	80/80	O133
	Og2_PCR	813	OgGp7	80/80	O2, O50
	Og149_PCR	709	Og149	80/80	O149
	Og5_PCR	566	Og5	80/80	O5
	Og22_PCR	458	Og22	80/80	O22
	Og19_PCR	389	Og19	80/80	O19
	Og16_PCR	302	Og16	80/80	O16
	Og105_PCR	246	Og105	80/80	O105
	Og87_PCR	167	Og87	80/80	O87
	(TE)			2080	
(total)			3520		
MP-17	Og100_PCR	1006	Og100	80/80	O100
	Og176_PCR	809	Og176	80/80	O176
	Og175_PCR	690	Og175	80/80	O175
	Og3_PCR	571	Og3	80/80	O3
	Og76_PCR	457	Og76	80/80	O76
	Og85_PCR	388	Og85	80/80	O85
	Og66_PCR	301	Og66	160/160	O66
	Og112ab_PCR	241	Og112ab	80/80	O112ab
	(TE)			2080	
(total)			3520		
MP-18	Og104_PCR	993	Og104	80/80	O104
	Og53_PCR	806	Og53	80/80	O53

	Og155_PCR	671	Og155	80/80	O155
	Og62_PCR	548	OgGp14	80/80	O62, O68
	Og32_PCR	452	Og32	80/80	O32
	Og65_PCR	381	Og65	80/80	O65
	Og154_PCR	299	Og154	80/80	O154
	Og131_PCR	238	Og131	80/80	O131
	(TE)			2240	
	(total)			3520	
MP-19	Og184_PCR	964	Og184	80/80	O184
	Og48_PCR	793	Og48	80/80	O48
	Og39_PCR	667	Og39	80/80	O39
	Og10_PCR	546	Og10	80/80	O10
	Og28ab_PCR	446	Og28ab	80/80	O28ab
	Og186_PCR	362	OgGp5	160/160	O123, O186
	Og36_PCR	292	Og36	80/80	O36
	Og156_PCR	236	Og156	80/80	O156
	(TE)			2080	
(total)			3520		
MP-20	Og130_PCR	944	Og130	80/80	O130
	Og49_PCR	789	Og49	80/80	O49
	Og4_PCR	664	Og4	80/80	O4
	Og52_PCR	543	Og52	80/80	O52
	Og46_PCR	445	OgGp6	80/80	O46, O134
	Og83_PCR	362	Og83	80/80	O83
	Og139_PCR	287	Og139	80/80	O139
	Og24_PCR	233	Og24	80/80	O24
	(TE)			2240	
(total)			3520		

別表 3. MP-1 plus (EHEC のワンショット検査) に使用する *stx1*, *stx2*, *eae* の検出プライマー

遺伝子	プライマー配列 (forward)	プライマー配列 (reverse)	産物サイズ	参考文献
<i>eae</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881 bp	Oswald E et al. Infect Immun. 2000 68:64-71
<i>stx2</i>	ATCCTATTCCCGGAGTTTACG	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584 bp	Cebula TA et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-50
<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGCGAAGG	CACCAGACAATGTAACCGCTG	348 bp	Cebula TA et al. J Clin Microbiol. 1995 33:248-50

別表 4. それぞれの Hg 型を判定できる PCR プライマーペアのリスト*

H 型	Hg 型	標的 遺伝子	プライマー配列 (forward)	プライマー配列 (reverse)	産物サイズ (bp)
H1/H12	Hg1/12	<i>fliC</i>	ATGCGCTGACTGCATCAAAG	CCTTGCCGTTGTTAGCATCG	774
H2	Hg2	<i>fliC</i>	TGATCCGACATCTCCTGATG	CCGTCATCACCAATCAACGC	228
H3	Hg3	<i>fliA</i>	CTACATCAGGAGCGGTTGCA	CAGCGTCCAGAACCTGCTTA	504
H4	Hg4	<i>fliC</i>	GATTTGAGCGCGGCGAACT	GGTTGCAGAATCAACGACCG	150
H5	Hg5	<i>fliC</i>	CGCGTCGATTAATCATACAG	GTTGCTTTTGCCGCAGTATT	225
H6	Hg6	<i>fliC</i>	TGCTGGCGCAGATGGAATA	GCCGCATCCTCAGTAGTTGT	624
H7	Hg7	<i>fliC</i>	CCCTTCATGCTGATGTGGGT	ATACCCGGCAACAGTCACAG	548
H8	Hg8	<i>fliC</i>	CGGCGCGGTTAAGAATGATG	CCGTTTTACCATCTGCGCTG	467
H9	Hg9	<i>fliC</i>	TCCAAACACCGGTGATTCTGT	ACCGGTAGAAATCGCTGTTGG	208
H10	Hg10	<i>fliC</i>	GCTTCAGGATCGTTAGGTAC	CGTCGCTGCAGTAGGAGTAG	165
H11	Hg11	<i>fliC</i>	AACAACAAGTGCAGCGGATG	TCGGGCTACCACCTTCTGAT	341
H14	Hg14	<i>fliC</i>	TGCAACTGTGGTAGGCAACA	ACGCCCGGGTCAAATATTT	234
H15	Hg15	<i>fliC</i>	AGTGCTCCGACTTCTGCAAT	GTCCCGCCGATAGTCACTTT	554
H16	Hg16	<i>fliC</i>	GTACAGGTGGAAGGGCAGAC	CACGCATAATTGCCTGTGCA	463
H17	Hg17	<i>fliA</i>	CACTCCAGTCGCTGTAACCG	GCGTTGGTGCCGTCATAATC	180
H18	Hg18	<i>fliC</i>	ACGGAGGCAGATGTTGGTTT	TGAGTATCAGTGCCTGCGTT	305
H19	Hg19	<i>fliC</i>	GCTGGCGATACATTTACCGC	CGCCGCTGTCATCAATGTTT	592
H20	Hg20	<i>fliC</i>	CTGTCTAGCCTCGCTGATGG	AGACCGCTTTACCTGAACCG	727
H21	Hg21	<i>fliC</i>	GCAACTAAGCTTGCAAGTGGC	TCTTGGCAGGTTTCAAGTCA	304
H23	Hg23	<i>fliC</i>	ACATGCTGAGCCGGTAAAA	CGCAGCATAATCAGCAACGG	547
H24	Hg24	<i>fliC</i>	CTGTGACTTCGCAACAACC	CATCAACGTTGGCGGCATAC	399
H25	Hg25	<i>fliC</i>	AGCCTGTCGCTGCACAACAT	CTGTTTGCTGGCATCGTCAAC	181
H26	Hg26	<i>fliC</i>	ACAGCGGCTGATGTATTGGG	AGTGCCAGTGGTATCTTT	596
H27	Hg27	<i>fliC</i>	ACAAAAGTCGGTGGTACAGGT	AATGTTGCGTCCTTCCCTGT	212
H28	Hg28	<i>fliC</i>	CTGGCATAACAAGGCACAC	TCAGCTTTGGTGTAAAGCGTC	285
H29	Hg29	<i>fliC</i>	TGCACCAATCGCTGTGAAGA	TCCCCTGCACGGTAACAAAA	305
H30	Hg30	<i>fliC</i>	CTATTAGCGGTTATACCGGT	TTCGCATCAACTGCTGCATT	379
H31	Hg31	<i>fliC</i>	GGCCTGTCGAAATCAACTGC	GCCCCAGCAGTTTTTGTGTTGT	485
H32	Hg32	<i>fliC</i>	CTATTAGCGGTTATGCTGGC	TTCGCATCAACTGCATCATG	379
H33	Hg33	<i>fliC</i>	TCTGCACAACGTACAGACCC	GGAACCGGTAGTAACGCCAT	166
H34	Hg34	<i>fliC</i>	GGGAAAACGACAGCTGCATC	CGGCTTGGCAGTAGTAGGTT	439
H35	Hg35	<i>fliA</i>	ACTACTGAACTAGCTCCGGC	GCCATCAGCAGCAACTTTTG	645
H36	Hg36	<i>fliA</i>	GACCTATACTGGCTCTGCAGG	GCAACCTTACCAGAACCATT	732

H37	Hg37	<i>fliC</i>	CGGATGCAAATCTGACTACC	GGCCTTACCTGTCAACTCAT	605
H38	Hg38	<i>fliC</i>	CTGACCGATGCTTCAGGGTT	CTAACTGGCCTGACTGCGTT	202
H39	Hg39	<i>fliC</i>	GAACACCACTGACGTCACCT	GTTCCGACAGAACGTCAACAC	172
H40	Hg40	<i>fliC</i>	GGTGCAGTCAAGGATAAAGA	CATCAAATGCAGTACCACTC	202
H41	Hg41	<i>fliC</i>	TTAACGGGGGCTGTTTCTC	GGCACTCGTCGTTAATTTACCG	705
H42	Hg42	<i>fliC</i>	CTGCTTTGGGGCAAAGGTT	CTTACCCTGAACGGTAGCGA	269
H43	Hg43	<i>fliC</i>	TGCTGATGCTGCGTTAGGAA	TGGTTTTGCCATCAGAGCCA	497
H44	Hg44	<i>fliA</i>	AACACAATACTCCTGCGGC	CTGTCGTTGTGCCAGTTGTG	187
H45	Hg45	<i>fliC</i>	GCAACGGGAACAGGTCCTTA	CCTGCGCCATTTGAAGCTAC	749
H46	Hg46	<i>fliC</i>	CGTAGACGCAGGGCTTAACA	TGGTTACGCTGCCATCAGTT	728
H47	Hg47	<i>fliA</i>	GCCACCACGCTTAAAGGAGA	GTTTTGGTTGCTGCTGTTGC	281
H48	Hg48	<i>fliC</i>	ACCGGTGGTGATAACGATGG	TCATTACATCCGCAGCGTA	293
H49	Hg49	<i>fliC</i>	CACTATTGGCGGCGAAAAGG	CTTACAGCCCCCGTGCTTTT	432
H51	Hg51	<i>fliC</i>	ACCGGTACTTACAAGGCTGC	CAGTATCACCGTCGGTAGCG	382
H52	Hg52	<i>fliC</i>	CTTCCGTTAATGCTGGTGGC	CATTTGTTGCAGCGTCACCA	225
H53	Hg53	<i>fliA</i>	AAGACGGTGCATATCACGCT	GCCATCAGCGTTTTCAACCA	233
H54	Hg54	<i>fliA</i>	AGTGACGCAATCCAGGTGA	CCGTTGCTATCGGTGTAGGT	347
H55	Hg55	<i>fliA</i>	GCATCTGTTTCTATTGGCGG	GTCGCGGCAGGATCTGTATC	560
H56	Hg56	<i>fliC</i>	CGCGTCCATTGACCATGCAA	GTGGCTGTTGCCGTAGTGTC	225

*参考文献 4

別表 5. Hg-typing 用マルチプレックス PCR (MP-A から J) のプライマーの組み合わせと産物サイズなどの一覧

MP	Hg 型	抗原コード 遺伝子	産物サイズ (bp)	プライマーミックス調整時の 100 mM 調整済みプライマー (forward / reverse) の添加量 (μl)
MP-A	Hg7	<i>flC</i>	548	80/80
	Hg34	<i>flC</i>	439	80/80
	Hg11	<i>flC</i>	341	80/80
	Hg28	<i>flC</i>	285	80/80
	Hg2	<i>flC</i>	228	80/80
	Hg25	<i>flC</i>	181	80/80
	(TE)			2560
	(total)		3520	
MP-B	Hg19	<i>flC</i>	592	80/80
	Hg8	<i>flC</i>	467	80/80
	Hg21	<i>flC</i>	304	80/80
	Hg14	<i>flC</i>	234	80/80
	Hg10	<i>flC</i>	165	80/80
	(TE)			2720
	(total)			3520
MP-C	Hg20	<i>flC</i>	727	80/80
	Hg55	<i>flA</i>	560	80/80
	Hg31	<i>flC</i>	485	80/80
	Hg30	<i>flC</i>	379	80/80
	Hg53	<i>flkA</i>	233	80/80
	Hg44	<i>flA</i>	187	80/80
	(TE)			2560
(total)			3520	
MP-D	Hg6	<i>flC</i>	624	80/80
	Hg3	<i>flkA</i>	504	80/80
	Hg24	<i>flC</i>	399	80/80
	Hg5	<i>flC</i>	225	80/80
	Hg33	<i>flC</i>	166	80/80
	(TE)			2720
	(total)			3520
MP-E	Hg1/12	<i>flC</i>	774	80/80
	Hg35	<i>flkA</i>	645	80/80

	Hg18	<i>flC</i>	305	80/80
	Hg27	<i>flC</i>	212	80/80
	(TE)			2880
	(total)			3520
MP-F	Hg36	<i>flkA</i>	732	80/80
	Hg15	<i>flC</i>	554	80/80
	Hg32	<i>flC</i>	379	80/80
	Hg47	<i>flkA</i>	281	80/80
	Hg40	<i>flC</i>	202	80/80
	(TE)			2720
	(total)			3520
MP-G	Hg45	<i>flC</i>	749	80/80
	Hg37	<i>flC</i>	605	80/80
	Hg43	<i>flC</i>	497	80/80
	Hg51	<i>flC</i>	382	80/80
	Hg42	<i>flC</i>	269	80/80
	Hg38	<i>flC</i>	202	80/80
	(TE)			2560
(total)			3520	
MP-H	Hg46	<i>flC</i>	728	80/80
	Hg26	<i>flC</i>	596	80/80
	Hg49	<i>flC</i>	432	80/80
	Hg29	<i>flC</i>	305	80/80
	Hg52	<i>flC</i>	225	80/80
	Hg39	<i>flC</i>	172	80/80
	(TE)			2560
(total)			3520	
MP-I	Hg41	<i>flC</i>	705	80/80
	Hg16	<i>flC</i>	463	80/80
	Hg54	<i>flmA</i>	347	80/80
	Hg56	<i>flC</i>	225	80/80
	(TE)			2880
	(total)			3520
MP-J	Hg23	<i>flC</i>	547	80/80
	Hg48	<i>flC</i>	293	80/80
	Hg9	<i>flC</i>	208	80/80
	Hg4	<i>flC</i>	150	80/80

(TE)

2880

(total)

3520
