＝原 著＝

食品検体の腸管出血性大腸菌 O157・O26 汚染 一次スクリーニング用 Multiplex PCR 法の開発

徳永 暁彦^{*1}・大澤 朗^{*1, 2, †}・伊豫田 淳^{*3}・
寺嶋 淳^{*3}・渡辺 治雄^{*3}

(神戸大学・^{*1} 大学院農学研究科, ^{*2} 食の安全・安心科学センター, ^{*3} 国立感染症研究所・細菌部)

(受付 平成 20 年 9 月 12 日)

(受理 平成 20 年 12 月 23 日)

Development of Multiplex PCR Method for a Primary Screening of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and O26 in Food Samples

Akihiko TOKUNAGA^{*1}, Ro OSAWA^{*1, 2, †}, Sunao IYODA^{*3},
Jun TERAJIMA^{*3} and Haruo WATANABE^{*3}

(^{*1} Department of Bioscience, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University,
Rokko-dai 1-1, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan; † Corresponding author)

(^{*2} Research Center for Food Safety and Security, Graduate School of Agricultural Science,
Kobe University, Rokko-dai 1-1, Nada-ku, Kobe 657-8501)

(^{*3} Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640)

A PCR-based primary screening method for foods contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 or O26 was developed. The method employs a multiplex PCR targeting EHEC O157 and O26 specific *tox*B sequences. The multiplex PCR assay was found to detect EHEC O157 and O26 but no other strains tested (except for several EHEC O121 strains). Experimental inoculation of a range of concentrations of EHEC O157 and O26 cells to overnight cultures of minced beef, beef liver or radish sprout in buffered peptone water (BPW), indicated that detection limit of the multiplex PCR assay was *ca.* 10⁵ CFU/ml for EHEC O157 and O26. Subsequent quasi-field test, in which combinations of EHEC O157 or O26 strains were experimentally contaminated at an initial density of *ca.* 0.3 to 0.5 viable cells per gram of minced beef, beef liver or radish sprout, demonstrated that the multiplex PCR successfully detected EHEC O157 and O26 in the overnight cultures of the food samples in BPW. Based on the results, the multiplex PCR technique can be used as a primary screening tool for possible EHEC O157 and O26 contamination in food samples.

Key words: EHEC O157, EHEC O26, Primary screening, Multiplex PCR, *tox*B

緒 言

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) は、軽度の下痢から溶血便・溶血性尿毒症

症候群 (HUS) を伴う重篤な症状に至るまで、広範囲な疾患を引き起こす^{2, 16)}。わが国では、1996 年まで本菌による事例報告数は年間 100～200 件に過ぎなかったが、1996 年に生じた集団食中毒事件以降、毎年数千件にも及ぶ感染症を引き起こしている²²⁾。EHEC による食中毒事例は血清型 O157:H7 によるものが最も多く、2006 年までは平成 9 年に厚生労働省より発行された通達「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法の解説について」(衛食

† 連絡先

^{*1, *2} ☎657-8501 神戸市灘区六甲台 1-1

^{*3} ☎162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

第 207 号および衛乳第 199 号) を基に, EHEC O157 のみを対象とした検査が実施されてきた^{10, 11)}。しかし, 近年では EHEC O26 による事例が増加してきており, 国立感染症研究所のまとめでは, 2005 年度は O157 が 68%, O26 が 22% であり, 2006 年度は O157 が 68%, O26 は 24% と, EHEC O157 と O26 による事例が 9 割近くを占めている⁸⁾。この現状を踏まえ, 厚生労働省は平成 18 年に新たな通達「腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法について」(食安監発第 1102004 号) を発行し, EHEC O157 に加え, EHEC O26 を検査対象とした¹²⁾。

現在のわが国における食品等の EHEC O157 および O26 の汚染を対象とした検査は, 本菌の主な病原因子とされる志賀毒素遺伝子 (*stx*) を標的とした遺伝的検査法 (LAMP 法⁴⁾や PCR 法¹⁾) を用いて一次スクリーニングを行い, 陽性であった食品検体について EHEC O157 および O26 の分離培養を行う。最終的に, EHEC O157 あるいは O26 が分離された場合に陽性と判定しているが, この検査法は志賀毒素を標的とした一次スクリーニング法であり, EHEC O157 や O26 以外の血清型を有する志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) が検出される。国内外における腸管出血性大腸菌 EHEC O157 および O26 の主な原因食品は牛に関連した食品であるが, それらの食品からは EHEC 事例で分離されたことのない血清型の STEC 株も多数検出されることが報告されている⁶⁾。Kobayashi ら⁹⁾ は, わが国において 358 頭の牛より糞便を採取し, *stx* を標的とした PCR, ならびに分離された STEC 株の血清型別を行った。その結果, 約 60% の糞便サンプルが *stx* 陽性を示したのに対し, 分離された 92 株の STEC のうち血清型 O157 もしくは O26 を呈した株はそれぞれ 1 株, 9 株とごく少数であったと報告している。このように, *stx* を標的とした一次スクリーニング法では, 非常に多くの検体が陽性と判定されてしまい, 検査効率が著しく低下してしまうことが考えられる。

近年筆者らは, DNA フィンガープリンティング法として有用性が報告されている AFLP の改変型を用い, EHEC O157 が安定して保有しているとされているプラスミド, pO157 上にコードされている *tox*B という遺伝子内に EHEC O157 に特異的な DNA 断片を同定した²³⁾。本遺伝子は, 過去に EHEC O157 以外にも EHEC O26 など他の血清型にも分布していることが報告されている²⁴⁾。そこで, 筆者らはさまざまな血清型を有する STEC における *tox*B の分布を調べ, 本遺伝子の塩基配列を利用し, EHEC O157 と O26 の食品汚染を一括, かつ両者を識別して検出することが可能な multiplex PCR 法の開発を試みた。また, 開発した PCR 法が増菌培養液からの一次スクリーニングに使用できるか否かを検証すべく, EHEC O157, O26 を人為的に接種した食品検体培養液からの検出の可否を, *stx* を標的とした

LAMP 法⁴⁾ との比較も含めて検討を行った。

材料および方法

1. 供試菌株

EHEC 株 60 株 (O157 39 株, O26 7 株, O103 4 株, O111 6 株, O121 4 株), STEC 株のその他の血清型 4 株, ならびに EHEC O157 と系統的に近い血清型とされる EPEC O55 株 6 の計 70 株 (Table 1) を使用した。なお, Table 1 に記載されている供試菌株の *stx*, *eae* 遺伝子プロファイルは Wang ら²⁵⁾ によって報告された multiplex PCR 法により確認した。

2. PCR による *tox*B 遺伝子の異同解析

GenBank に登録されている *Escherichia coli* O157: H7 str. Sakai の塩基配列データ (accession no. AB011549) を参考に, 全長約 9.5 kb の *tox*B を 9 つの領域 (*tox*B1~*tox*B9, Fig. 1) に分割し, その各領域を増幅するプライマーセット (Table 2) を作製し, PCR を行い供試菌株における *tox*B の異同を網羅的に調べた。

3. シークエンス解析

Escherichia coli O26: H11 str. HW1 より抽出した DNA をテンプレートとし, *tox*B のシークエンス解析を行った。方法 2 において PCR 産物が確認された領域に関しては, PCR 産物より塩基配列を決定した。5' 末端側の配列は, *Hind*III を用いた inverse PCR¹⁷⁾ により決定した。

3' 末端側の配列は, *tox*B の外側領域におけるプライマー *tox*B-outer 65493-65510 (5'-CCGCATACAGGA-AATCAG-3') および方法 2 で使用した *tox*B7F (5'-TTGGATTTATCAGATGGGAGG-3') を用いた PCR により増幅された産物を PCR ウォーキングすることにより決定した。

4. Multiplex PCR 法の考案

4.1 特異性

GenBank に登録されている *Escherichia coli* O157: H7 str. Sakai, および今回が筆者らが決定した *Escherichia coli* O26: H11 str. HW1 (961244) の *tox*B の塩基配列データ (Accession no.: AB456530) をもとに, O157, O26 をそれぞれ増幅できるプライマー (O157/26 multi-F: 5'-GGCGTTATCTTAGCAATGTGG-3', O157 multi-R: 5'-AAATCGATTATGCCTGTGGC-3', O26 multi-R: 5'-GCTAATTGAGATTCAGACAG-3') を設計し (Fig. 2), GenBank に登録されているゲノムデータとの相同性解析を行った。さらに, 供試菌株 70 株を用いて特異性を検証した。PCR 反応液は鋳型 DNA を 20 ng, 10×PCR reaction buffer (終濃度 2 mM Mg²⁺; Takara) を 2 μ l, dNTP mixture (TaKaRa) を 1.6 μ l (終濃度各 dNTP 0.2 mM), プライマー各 8.0

Table 1. Distribution of virulence-associated genes in *Escherichia coli* strains used and results of the EHEC O157/O26-specific multiplex PCR assay

Strain No.	Serotype ^a		Sources/Locality	Year of isolation	PCR results targeting			EHEC O157/O26 multiplex-PCR
	O	H			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	
KE59	157	NM	Cattle/Japan	1996	—	+	+	+
KE62	157	NM	Cattle/Japan	1996	—	+	+	+
KE214	157	7	Cattle/Japan	1996	—	+	+	+
KE241	157	7	Cattle/Japan	1996	—	+	+	+
KE243	157	7	Cattle/Japan	1996	+	—	+	+
CDC10	157	7	Cattle/USA	1993	—	+	+	+
KE31	157	7	Cattle feces/Japan	1996	+	+	+	+
KE149	157	7	Cattle feces/Japan	1996	+	+	+	+
KE181	157	7	Cattle feces/Japan	1996	—	+	+	+
KE188	157	NM	Cattle feces/Japan	1996	—	+	+	+
KE302	157	7	Cattle feces/Japan	1996	+	+	+	+
KE373	157	7	Cattle feces/Japan	1996	+	+	+	+
NIID1496	157	7	Fly/Japan	1996	—	+	+	+
KE114	157	7	Food/Japan	1996	+	+	+	+
KE424	157	7	Food (ikura)/Japan	1998	+	+	+	+
CDC8	157	7	Hamburger/USA	1993	+	+	+	+
CDC9	157	7	Hamburger/USA	1993	+	+	+	+
NIID457	157	7	Implicated food/Japan	1996	+	+	+	+
NIID1856	157	7	Implicated food/Japan	1996	+	+	+	+
NIID1646	157	7	Implicated food/Japan	1996	—	+	+	+
KE1	157	7	Implicated food/Japan	1996	—	+	+	+
EDL933	157	7	Patient/USA	1982	+	+	+	+
CDC1	157	7	Patient/USA	1993	+	+	+	+
CDC2	157	7	Patient/USA	1993	+	+	+	+
DC3	157	7	Patient/USA	1993	+	+	+	+
NIID2	157	7	Patient/Hiroshima, Japan	1996	+	+	+	+
NIID23	157	7	Patient/Okayama (Oku, Japan	1996	+	+	+	+
NIID42	157	7	Patient/Aichi (Kasugai), Japan	1996	+	+	+	+
NIID220	157	7	Patient/Osaka (Sakai), Japan	1996	+	+	+	+
NIID437	157	7	Patient/Japan	1996	+	+	+	+
NIID1124	157	7	Patient/Japan	1996	+	+	+	+
CDC4	157	7	Patient/USA	1993	+	+	+	+
CDC5	157	7	Patient/USA	1993	+	+	+	+
CDC6	157	7	HUS patient/USA	1993	+	+	+	+
CDC7	157	7	HUS patient/USA	1993	+	+	+	+
NIID212	157	7	Patient/Japan	1996	+	+	+	+
NIID225	157	7	Patient/Japan	1996	+	+	+	+
KE87	157	NM	Swab from sink/Japan	1996	—	+	+	+
KE24	157	7	Sewage water/Japan	1996	+	+	+	+
HW1(961244)	26	11	Patient/Japan	1996	+	—	+	+
HW2(961418)	26	11	Patientt/Japan	1996	+	—	+	+
30794	26	11	Patient/Miyagi, Japan	2003	+	—	+	+
31020	26	11	Patient/Ishikawa, Japan	2003	+	—	+	+
31068	26	11	Patient/Hyogo, Japan	2003	+	—	+	+
31123	26	11	Patient/Kagawa, Japan	2003	+	—	+	+
31606	26	n.d.	Patient/Hiroshima, Japan	2003	+	—	+	+
HW10(960647)	103	2	Patientt/Japan	1996	+	—	+	—
30400	103	2	Patient/Yamanashi, Japan	2003	+	—	+	—
30609	103	2	Patient/Hukushima, Japan	2003	+	—	+	—
30902	103	2	Patient/Shizuoka, Japan	2003	+	—	+	—
HW3(961876)	111	n.d.	Patientt/Japan	1996	+	+	+	—
HW4(961882)	111	n.d.	Patientt/Japan	1996	+	+	+	—
30947	111	n.d.	Patient/Okayama, Japan	2003	+	—	+	—
31274	111	n.d.	Patient/Kagoshima, Japan	2003	+	—	+	—
31594	111	n.d.	Patient/Aichi, Japan	2003	+	+	+	—
31735	111	n.d.	Patient/Ibaragi, Japan	2003	+	—	+	—
HW5(960832)	121	19	Patientt/Japan	1996	—	+	+	—
HW6(961427)	121	19	Patientt/Japan	1996	—	+	+	+
30536	121	19	Patient/Kanagawa, Japan	2003	—	+	+	+
30789	121	19	Patient/Miyagi, Japan	2003	—	+	+	+
HW7(961337)	160	21	Patientt/Japan	1996	—	+	—	—

Table 1. Continued

Strain No.	Serotype ^a		Sources/Locality	Year of isolation	PCR results targeting			EHEC O157/O26 multiplex-PCR
	O	H			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	
HW9(960476)	161	n.d.	Patientt/Japan	1996	+	—	+	—
HW8(970463)	167	32	Patientt/Japan	1997	+	—	—	—
KIHC359	UT	UT	Food (alfalfa)/Japan	1997	—	+	—	—
992-87	55	n.d.	Patientt/Japan	1987	—	—	+	—
80	55	n.d.	Patientt/Japan	1983	—	—	+	—
179-83	55	n.d.	Patientt/Japan	1983	—	—	+	—
146-83	55	n.d.	Patientt/Japan	1983	—	—	+	—
663-84	55	7	Patientt/Japan	1984	—	—	+	—
KB10	55	7	Patientt/Japan		—	—	+	—

^aNM, non motile; n.d., not determined; UT, untypeable

Regions amplified by PCR primer pairs designated as:

No. of PCR positive strains:

		toxB1	toxB2	toxB3	toxB4	toxB5	toxB6	toxB7	toxB8	toxB9
EHEC	O157 (n=39)	39	39	39	39	39	39	39	39	39
	O26 (n=7)	0	7	7	7	7	7	0	0	7
	O103 (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O111 (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O121 (n=4)	0	2	3	3	2	3	0	0	0
STEC	others (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPEC	O55 (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 1. Schematic locations of 9 divided regions of the *toxB* gene targeted for PCR assays and the PCR results for EHEC, STEC, and EPEC strains used.

Nucleotide positions to be amplified by PCRs were as follow: toxB1, 55,982nd to 56,995th; toxB2, 56,870th to 57,930th; toxB3, 57,910th to 59,393rd; toxB4, 59,382nd to 60,536th; toxB5, 60,509th to 61,711st; toxB6, 61,691st to 62,778th; toxB7, 62,758th to 63,676th; toxB8, 63,667th to 64,787th; toxB9, 64,694th to 65,347th; (based on the DNA sequence obtained from the GenBank database for *E. coli* O157:H7 str. Sakai [accession no. AB011549]).

Table 2. PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	location on the pO157 of Str. sakai ^a	Size of PCR amplicon (bp)
toxB1-F	TGATTCATCCTGGCTCTTCTT	55982–56002	1,014
toxB1-R	CTTCCGCTAAATGTGGATTCTG	56995–56675	
toxB2-F	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	56870–56891	1,061
toxB2-R	ATCTCTGATGCGTTGGAGTT	57930–57911	
toxB3-F	GAACCTCCAACGCATCAGAGA	57910–57929	1,484
toxB3-R	ACGCCGTGAGAATAATGTCC	59393–59374	
toxB4-F	TTCTCACGGCGTGGTATATC	59382–56401	1,182
toxB4-R	CGACGCTGGTATAATATGCC	60563–60544	
toxB5-F	AGGTTCTGGAATTGAAAGACCC	60509–60530	1,203
toxB5-R	CCACATTGCTAAGATAACGCCC	61711–61690	
toxB6-F	GGCGTTATCTTAGCAATGTGG	61691–61721	1,088
toxB6-R	CCTCCCATCTGATAAATCCAA	62778–62757	
toxB7-F	TTGGATTATCAGATGGGAGG	62758–62778	919
toxB7-R	CCGCTTCACTCGTAGCATTAT	63676–63656	
toxB8-F	AGTGAAGCGGCGAACATTAA	63667–63686	1,121
toxB8-R	CCACCACCATGAGTTTTTGA	64787–64768	
toxB9-F	TATTGTCCGGAGTAATGACCG	64694–64714	654
toxB9-R	CCGAATTACTCGAAGAAGCA	65347–65328	

^a Accession no. AB011549

O157:H7(str. Sakai)	61659	GGTGTGCTGCTTCAAGAATGGTGGACCGCAGGCGTTATCTTAGCAATGTGGCAAAAGT	61718
O26:H11(HW1)	5679	A*****C**G*****A*****T*****C*****G*****C*****	5738
O157/26 multi-F →			
O157:H7(str. Sakai)	61719	AATTAATTAACCTTGTGCTAGATATAGGCATAAATTTGGTCATTATGATGTTCTTCA	61778
O26:H11(HW1)	5739	***A*****C*****G*****C*****G*****C*****G*****C*****	5798
O157:H7(str. Sakai)	61779	AAATCATGCTAAAGCACCACACAAATTAATATATATCAACAGCAATAGATGTTCTTT	61838
O26:H11(HW1)	5799	*****C**G*****A*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	5858
O157:H7(str. Sakai)	61839	TTTCATCTATAAATACAGCTTTTGTCAATAGGCGCAATCGCATATCTCTTTGGCAATAGC	61898
O26:H11(HW1)	5859	*****C**G*****A*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	5918
O157:H7(str. Sakai)	61899	TATAGTTCGATAACTATTTTTCATGAAGTAAAAAAGTATGCTGTTTATGTGAATCA	61958
O26:H11(HW1)	5919	*****C**G*****A*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	5978
O157:H7(str. Sakai)	61959	AATTAATGAGCGCATAGTTATGGCTGGAAGCTGAAAGTATCTGGCAATGGAAGTGC	62018
O26:H11(HW1)	5979	*****A*****G*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	6038
← O157 multi-R			
O157:H7(str. Sakai)	62019	AAAGGTCTCAAGCATTAAACAAAGCAGCAGCAATATCGATTTATCAAAATACAGGTGTT	62078
O26:H11(HW1)	6039	*****A*****G*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	6098
O157:H7(str. Sakai)	62079	AGGTAATATTATTAGATATGAGAGAAATCTCCAAATATTACACGGTGAGAAATCATA	62138
O26:H11(HW1)	6099	*****G**C*****G*****C*****G*****C*****G*****C*****G*****C*****	6158
O157:H7(str. Sakai)	62139	TAATAGCGGAAGAATATTGATGATCTCTGATATGACTGACAGAGAGATTATGAGTCT	62198
O26:H11(HW1)	6159	*****G**C*****G*****A*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	6218
O157:H7(str. Sakai)	62199	TAGACATACAAATTTTGCATGCACAAACTCTCAGATGACGTTGAACCGATATTTTGG	62258
O26:H11(HW1)	6219	*G*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****G*****C*****	6278
O157:H7(str. Sakai)	62259	TTGGGAGATAAGGAAATATGTAATTCAATGGAATTATCAGAAATCACAATTAGCTAATG	62318
O26:H11(HW1)	6279	*****TG*****C**G*****A*****T*****C*****G*****C*****G*****C*****	6338
← O26 multi-R			

Fig. 2. Alignments of the *tox*B gene DNA sequences used for designing the EHEC O157/O26-specific multiplex primers.

The sequences for EHEC O157 and O26 were retrieved from the GenBank database (*E. coli* O157:H7 str. Sakai, accession no. AB011549) and the present study (*E. coli* O26:H11 HW1, accession no. AB 456530), respectively. Underlined letters and arrows indicate positions of the primers and directions of PCRs, respectively. The asterisks show identical nucleotides.

pmol, Ex Taq (TaKaRa) を 0.5 U 用い、蒸留水 (DW) を加えて計 20 μ l とした。PCR は GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems) を用いて行い、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 25 回繰り返した。

4.2 感度試験

食品検体 (牛ミンチ、牛レバー、貝割れ大根) 20 g を滅菌スクリューカップに採取し、これに緩衝ペプトン水 180 ml を加え、37°C で 15~17 時間培養した。EHEC O157(NIID220), O26(HW1) を吸光度 (OD 660 nm) が 0.4~0.6 となるまで 37°C で振とう培養した。この菌液を生理食塩水ならびに上述の食品検体培養液で 10^{-7} となるまで 10 倍段階希釈し、各菌液 1 ml を 13,000 rpm で 1 分間遠心し、100 μ l の生理食塩水に再懸濁した。得られた菌液を 100°C で 10 分間熱処理した後、遠心 (同上) し、上清を鋳型 DNA として PCR に用いた。各菌液に含まれる EHEC の菌濃度は、生理食塩水で希釈した 10^{-5} ~ 10^{-7} 希釈液 100 μ l をそれぞれ 3 枚の LB agar に塗抹し、37°C で一晩培養した後にコロニー数を測定することで算定した。

4.3 人為的に菌を接種した食品検体からの EHEC O157/O26 の検出

EHEC O157 2 株 (NIID220, NIID2), O26 2 株 (HW1, 30794) を吸光度 (OD 660 nm) が 0.4~0.6 となるまで 37°C で振とう培養した。これらの菌液を生理食塩水にて 10^{-7} となるまで 10 倍段階希釈し、 10^{-5} ~ 10^{-7} 希釈液 100 μ l をそれぞれ 3 枚の LB agar に塗抹、37°C で一晩培養した後、コロニー数を測定することで各菌液中の菌濃度を算定した。

食品検体 20 g を滅菌スクリューカップに採取し、緩衝ペプトン水 180 ml を加えた。そこへ上記で作製した 10^{-7} 菌液 200 μ l (上記の菌濃度測定より平均して EHEC O157, O26 を 6~10 CFU 含む) をさまざまな組み合わせ (Table 3) で接種し、37°C で 15~17 時間培養した。翌日、培養液 1 ml を遠心 (13,000 rpm, 1 分間) し、菌を回収し、100 μ l の生理食塩水に再懸濁した。これらの菌液を 100°C で 10 分間熱処理した後、遠心 (同上) し、上清を鋳型 DNA とした。

5. *stx* を標的とした LAMP 法と細菌共通の 16S rDNA を標的とした PCR

方法 4.3 で作製した食品検体については、*stx* を標的とした Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を用いた EHEC O157, O26 の有無の確認を行った。また multiplex PCR および LAMP に供試された鋳型 DNA の「健全性」を確認するために、細菌に共通して存在する 16S rDNA を標的とした PCR¹⁵⁾ も行った。

結 果

1. 菌株群間 *tox*B 遺伝子の異同

9 つの領域に分けた *tox*B の各々の領域において設計したプライマーを用いて本遺伝子の分布解析を行ったところ (Fig. 1), O157 では全領域において、O26, O121 においては *tox*B2~*tox*B6 および *tox*B9 の領域で増幅が見られた。

2. O26 が保有する *tox*B のシーケンス解析

結果 1 より、EHEC O26 の *tox*B にも O157 の EHEC *tox*B と相同な領域が存在していたため、上記の解析で得られた PCR 産物をもとに EHEC O26 の *tox*B のシーケンスを決定した (Accession no.: AB456530)。その結果、O26 が保有する *tox*B は EHEC O157 のものと相同性が高い (塩基配列相同性: 91%, アミノ酸相同性: 89%) ことが明らかとなった。しかし、両者には塩基置換レベルの差異が多数認められた。

3. Multiplex PCR 法の特異性

結果 2 より、*tox*B6 領域 (Fig. 1) における EHEC O157 と O26 塩基置換部分を利用したプライマーを設計し (Fig. 2), GenBank に登録されているゲノムデータとの比較解析を行った。その結果、O157/26 multi-F および O157 multi-R と完全に一致する配列を有する塩基配列は EHEC O157 を除いて存在せず、O26 multi-R と完全に一致する配列は存在しなかった。また、供試菌株 70 株における特異性を調べた。結果を Table 1 に示した。今回筆者らが設計したプライマーを用いることにより、EHEC O121 において 4 株中 3 株で増幅が見られたものの、すべての EHEC O157, O26 株が検出可能で

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments amplified by the EHEC O157/O26 multiplex PCR.

Lane 1: Lane M: molecular size marker (1 kb-DNA ladder [Invitrogen]); Lane 1, NIID220 (O157)+HW1 (O26); Lane 2: NIID220 (O157); and Lane 3: HW1 (O26). Amplicons were separated on a 1.0% agarose gel (TaKaRa) in $0.5 \times$ Tris-Borate-EDTA buffer for 15 min.

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments amplified by the EHEC O157/O26 multiplex PCR on overnight BPW cultures of food sample (minced beef, beef liver and radish sprout) containing 10-fold serial dilutions of EHEC O157 NIID220 or EHEC O26 HW1.

あった。また、EHEC O157 より得られた産物と EHEC O26 および O121 より得られた産物は、その大きさが異なる (O157: 369 bp, O26/O121: 621 bp) ことにより、区別することが可能であった (Fig. 3)。

4. Multiplex PCR 法の感度

特異性の解析より、本手法が EHEC O157/O26 の一次スクリーニング法として有用であることが示唆されたため、次に食品培養液中の本 PCR 法の感度を調べた。3 種の食品検体 (牛ミンチ、牛レバー、貝割れ大根) を用いて本 multiplex PCR 法の感度を調べた結果を Fig. 4 に示した。プレートカウント法による菌濃度測定の結果、希釈前の EHEC 菌液には $3 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/ml の菌が含まれていると算定された。この結果より、本 PCR 法では、O157 もしくは O26 を少なくとも 10^5 CFU/ml 以上を含む培養液であれば、標的の PCR 産物

を確実に目視できることが示された。なお、EHEC 菌液を希釈する際に用いた食品検体培養液からは O157, O26 は検出されなかった。

5. 人為的に菌を接種した食品検体からの EHEC O157/O26 の検出

本 multiplex PCR 法を用いて、人為的に EHEC 株を接種した食品検体からの菌の検出を行った結果を Table 3 に示した。菌を接種していない検体からは産物が全く検出されなかったのに対し、EHEC O157 を接種した検体では 369 bp の産物、EHEC O26 を接種した際には 621 bp の産物、EHEC O157 と O26 を共に接種した検体では両方の産物が検出された。LAMP 法では、EHEC O157 や EHEC O26 を接種したすべての検体において陽性反応を呈した。

考 察

わが国における腸管出血性大腸菌による被害は、血清型 O157 と O26 によって引き起こされている事例が約 9 割を占めており^{8, 22)}、現在わが国ではこれらの血清型を標的とした検査法が施行されている^{12, 13)}。しかしながら、食品検体を対象とした現行の検査法では *stx* 遺伝子を標的とした一次スクリーニングが行われていることから、O157, O26 以外の血清型を有する STEC も検出されてしまい、検査効率が著しく低下していることが考えられる。

今回筆者らは、さまざまな血清型を有する EHEC, STEC, ならびに EPEC O55 における *toxB* の分布を解析し、本遺伝子が EHEC O157, O26 の両者に特徴的な遺伝子であることを明らかにした。また、O26 の *toxB* の塩基配列を決定し、O26 の *toxB* は O157 の *toxB* とかなり高い相同性があるものの、塩基置換レベルの差異が存在していることも見いだした。

そこで、*toxB* における塩基配列の差異を利用し、EHEC O157 および O26 を区別して検出できる手法の確立を試みた。今回筆者らが考案した multiplex PCR 法を検証したところ、本手法は一部 O121 も検出してしまうものの、EHEC O157, O26 を区別して検出することが可能であった。今回が標的とした *toxB* は、EHEC のヒト腸管への接着に関与していることが報告されており、病原因子のひとつとして考えられている²¹⁾。本研究では EHEC O157 と EHEC O26 の *toxB* の塩基配列が近似していることが示されたが、このことは翻って、「志賀毒素産生かつインチミンを保有する EHEC の血清型が多々ある中で、なぜヒト感染事例の大多数が O157 と O26 に占められるのか？」の答えが両者 *toxB* にコードされる特異な病原因子にあることを示唆している。

食品検査における遺伝子検出法は、その迅速性と信頼性が高く評価されており、腸管出血性大腸菌やサルモネラ¹⁸⁾、腸炎ビブリオ¹⁹⁾ などにおいても PCR 法や Real-

Table 3. Results of the multiplex PCR and the LAMP assays on minced beef, beef liver, radish sprout artificially inoculated with or without viable EHEC O26 and O157 at an initial concentration of 0.3 to 0.5 viable cells per gram of samples

Sample categories	Sample Ac. No.	Origins or Sources	EHEC O26 and O157 strains artificially inoculated to the sample (serotype: <i>stx</i> profile)	Results of the PCR & Lamp assays on culture after 20 h enrichment			
				Multiplex PCR		Lamp assay	PCR targeting 16S rDNA sequence common to all bacteria
				O26	O157		
Minced beef	MB1	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB2	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB3	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB4	Retail store A in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB5	Retail store B in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB6	Retail store C in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	MB7	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	MB8	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	MB9	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	MB10	Retail store A in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	MB11	Retail store B in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	MB12	Retail store C in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	MB13	Retail store A in Kobe	none	-	-	-	+
	MB14	Retail store B in Kobe	none	-	-	-	+
	MB15	Retail store C in Kobe	none	-	-	-	+
Beef Liver	BL1	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL2	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL3	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL4	Retail store A in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL5	Retail store B in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL6	Retail store C in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	BL7	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	BL8	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	BL9	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	BL10	Retail store A in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	BL11	Retail store B in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	BL12	Retail store C in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	BL13	Retail store A in Kobe	none	-	-	-	+
	BL14	Retail store B in Kobe	none	-	-	-	+
	BL15	Retail store C in Kobe	none	-	-	-	+
Radish sprout	RS1	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS2	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS3	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS4	Retail store A in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS5	Retail store B in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS6	Retail store C in Kobe	30794 (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-) & NIID2 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	+	+	+	+
	RS7	Retail store A in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	RS8	Retail store B in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	RS9	Retail store C in Kobe	HW1(961244) (O26: H11 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2-)	+	-	+	+
	RS10	Retail store A in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	RS11	Retail store B in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	RS12	Retail store C in Kobe	NIID220 (O157: H7 <i>stx</i> 1 +/ <i>stx</i> 2+)	-	+	+	+
	RS13	Retail store A in Kobe	none	-	-	-	+
	RS14	Retail store B in Kobe	none	-	-	-	+
	RS15	Retail store C in Kobe	none	-	-	-	+

time PCR 法, LAMP 法などさまざまな遺伝子検出法が取り入れられている. その一方で, 反応液中に含まれる PCR 阻害物質の影響により, 検出率が低下するという問題点も指摘されている^{3, 20)}. 筆者らは, このような問題が本 PCR 法に存在するか否かを検証すべく, EHEC による食中毒の主要な汚染食品^{6, 7)}である牛ミンチ, 牛レバー, 貝割れ大根を用い, 食品培養液中の本 PCR 法の感度, ならびに人為的に EHEC O157 あるいは EHEC O26, もしくはその両方を接種したサンプルからの菌の検出を試みた. その結果, 本 PCR 法は増菌培養液中に O157 もしくは O26 が 10^5 CFU/ml 以上含まれていれば菌を検出することが可能であった. また, 増菌前の食品 1 g 当たりの EHEC 汚染数が 1 コピーに満たない (0.3~0.5 コピー/1 g 検体) 場合でも EHEC O157, O26 を検出することが可能であった. これらの結果から, 本手法は食品検体から EHEC O157/O26 を検出するための一次スクリーニング法として有用であると考えられる.

最終的に EHEC O157/O26 による食品汚染の判定や, その後の疫学的な解析を行うには, 食品検体の培養液より当該菌が分離されることが必要となる. EHEC O157 については有用な選択分離培地 (例えばソルビット加マッコンキー寒天培地¹³⁾) が報告され, 多くの検査室において実用されている. また, EHEC O26 については, この菌株に共通に認められるラムノース分解能とセフェキシムおよび亜テルル酸耐性を利用した選択分離培地が開発されている⁵⁾. したがって, 本一次スクリーニング法を行い「陽性」と判断された食品検体について, 上記の選択分離培地を用いて菌分離作業を行うことで, より効率的な検査が期待できるものとする.

要 約

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 および O26 による食品汚染を検査するための一次スクリーニング法を開発した. 筆者らはまず, さまざまな血清型の EHEC 株, 志賀毒素産生性大腸菌株, および腸管病原性大腸菌 O55 株について, *tox*B (EHEC O157:H7 の巨大プラスミド上にエンコードされている遺伝子) の分布解析を行い, 本遺伝子が EHEC O157 および O26 に特徴的な遺伝子であることを見いだした. EHEC O26 が保有している *tox*B の塩基配列を決定したところ, EHEC O157 と高い相同性 (塩基配列相同性: 91%, アミノ酸相同性: 89%) を有しているものの, 塩基置換レベルの差異が存在していることが明らかとなった. そこで筆者らは, 本遺伝子における塩基配列の違いを利用し, 食品検体における EHEC O157 と O26 汚染を一括, かつ両者を識別して検出することが可能な multiplex PCR 法の確立を試みた. 今回筆者らが考案した multiplex PCR 法は, 一部 EHEC O121 も検出されてしまうが, 供試したすべての EHEC O157 および O26 を検出することが可能であっ

た. また, EHEC O157 と O26 (および一部の O121) は, 増幅される産物の大きさの違いにより, 区別することが可能であった. 食品培養液中の PCR 阻害物質の影響を考慮し, EHEC による食中毒の主要な汚染食品である牛ミンチ, 牛レバー, 貝割れ大根を用いて本 PCR 法の感度, ならびに人為的に EHEC O157 あるいは EHEC O26, もしくはその両方を接種したサンプルからの菌の検出を試みたところ, 本 PCR 法は増菌培養液中に EHEC O157 もしくは O26 が 10^5 CFU/ml 以上含まれていれば菌を検出でき, 増菌前の食品 1 g 当たりの EHEC 汚染数が 1 コピーに満たない (0.3~0.5 コピー/1 g 検体) 場合でも検出することが可能であった. 以上の結果から, が確立した multiplex PCR 法が, 食品検体から EHEC O157/O26 を検出するための一次スクリーニング法として重要なツールとなることが示唆された.

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金 (新興再興感染症・研究事業・研究課題名: 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 [H18-新興-一般-016]) によって行われたものである.

文 献

- 1) Cebula, T. A., Payne, W. L. and 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.*, **33**, 248-250 (1995).
- 2) Coia, J. E.: Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**, 1-9 (1998).
- 3) Fluit, A. C., Widjoatmodjo, M. N., Box, A. T., Torensma, R. and Verhoef, J.: Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1342-1346 (1993).
- 4) Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T. and Ikeda, M.: Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Med. Microbiol.*, **56**, 398-406 (2007).
- 5) Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., and Miyazaki, Y.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 922-925 (2002).
- 6) Hussein, H. S.: Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.*, **85**, E63-E72 (2007).
- 7) Jensen, C., Ethelberg, S., Gervelmeyer, A., Nielsen, E. M., Olsen, K. E. and Molbak, K.: Outbreak investigation team: First general outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Eur. Surveill.*, **11**, 558 (2006).

- 8) 感染症情報センター, 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報, **28**, 133-133 (2007).
- 9) Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. and Yamamoto, K.: Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 484-489 (2001).
- 10) 厚生省生活衛生局食品保健・乳肉衛生課事務連絡: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法の解説について (1997).
- 11) 厚生省生活衛生局食品保健・乳肉衛生課長連名: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について. 平成 9 年 7 月 4 日, 衛食第 207 号および衛乳第 199 号 (1997).
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法について. 平成 18 年 11 月 2 日, 食安監発第 1102004 号 (2006).
- 13) 工藤由起子, 高鳥浩介: 食品における腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法に関する通知法に向けての取り組みについて. *日食微誌*, **24**, 80-85 (2007).
- 14) March, S.B. and Ratnam, S.: Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 869-872 (1986).
- 15) Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, D. Dymock and W. G. Wade: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 795-799 (1998).
- 16) Nataro, J. P. and Kaper, J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 142-201 (1998).
- 17) Ochman, H., Gerber, A. S. and Hartl, D. L.: Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, **120**, 621-623 (1988).
- 18) Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y.: Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6730-6735 (2005).
- 19) Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J. and Watanabe, H.: Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4676-4682 (2003).
- 20) Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. and Rasmussen, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 37-45 (1992).
- 21) Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T. and Sasakawa, C.: *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect. Immun.*, **69**, 6660-6669 (2001).
- 22) 寺嶋 淳: 堺以後の日本における O157 の発生動向. *日食微誌*, **24**, 74-79 (2007).
- 23) Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M., Iyoda, S., Watanabe, H. and Osawa, R.: Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157-specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 883-888 (2007).
- 24) Tozzoli, R., Caprioli, A. and Morabito, S.: Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4052-4056 (2005).
- 25) Wang, G., Clark, C. G. and Rodgers, F. G.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3613-3619 (2002).