

## 2) HUS 患者から分離された EHEC O76 : H7 (*stx2/eae* 陽性) 及び EPEC O76 : H7 (*eae* 陽性) の細菌学的検討

小原敦美 近藤ひとみ 松本一俊 大迫英夫 原田誠也

### 要 旨

溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症し、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染が疑われた患者便から、市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) には含まれていない、希な O 血清型の EHEC O76 : H7 を分離した。しかし、患者便を塗抹培養した分離培地上の EHEC 様のコロニーは、ほとんどが志賀毒素遺伝子 (*stx*) 陰性の腸管病原性大腸菌 (EPEC) O76 : H7 であり、感染時に *stx* 陽性であった EHEC O76 : H7 から Stx ファージが脱落したものと結論づけた。

キーワード : EHEC, O76 : H7, Stx ファージ, 脱落

#### はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC) 感染症の主要症状は、腹痛や血便を主徴とする出血性大腸炎であるが、乳幼児や免疫機能の低下した高齢者では溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) や脳症などの重篤な合併症を継発し、死に至ることもある。

EHEC の最も重要な病原因子とされる志賀毒素 (Shiga toxin : Stx) は、Stx1 と Stx2 に大別され、菌によりどちらか一方、もしくは両方を産生する。Stx1 と Stx2 の遺伝子はそれぞれ染色体上にプロファージとして溶原化した Stx1 ファージと Stx2 ファージにコードされ、疫学的調査研究から、Stx2 の方が重症化しやすいと考えられている。

2017年6月、EHEC感染が疑われたが便培養でEHECが確認できず、原因不明となっていたHUS患者便の依頼検査において、PCR法を活用することで市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)には含まれていない、希なO血清型のEHEC O76 : H7 (*stx2/eae* 陽性)を分離することができた。しかし、分離培地上に純培養状に生育したEHEC様コロニーのほとんどが*stx2*陰性であり、*eae*のみ陽性の大腸菌 O76 : H7 であったことから、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia*

*coli* : EPEC) と同定された。

そこで、同一血清型を示すこれら2種類の下痢原性大腸菌 O76 : H7 が、もともと異なっていたのか、あるいは Stx2 ファージの脱落によるものかを判断するため、細菌学的検討を行った。

#### 材料及び方法

##### 1 患者情報

患者は3歳男子の保育園児で、平成29年6月25日、朝から保育園に行ったが、胃腸炎症状(粘液・血便10回、嘔吐、食欲不振)を呈したため早退した。翌26日に近隣の病院を外来受診し入院となった。頻回の血性下痢、腹痛、及び嘔吐があり、症状の改善がみられないため、28日に小児ICUを備えた基幹病院へ転院となった。患者は腎機能が徐々に低下し、HUSと判断された。

近隣の病院で行われた便培養検査では、ロタウイルス、腸管アデノウイルス、及びカンピロバクターは陰性であった。大腸菌は多数分離されたが、市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)に凝集する血清型の大腸菌は認められなかった。一方、基幹病院ではEHEC O157は陰性と判定された。しかし、培養検査でその他の検査結果が判明するまでには1週間ほど必要であっ

たため、基幹病院から患者の管轄保健所経由で本研究所に行政試験検査が依頼された。

## 2 検査材料

患者が最初に受診した病院に保存されていた患者便と患者便の直接分離培地（ドリガルスキー改良培地及びS-MAC寒天培地各1枚）、及び基幹病院で採取された患者血清（第12病日）を検査材料とした。

また、細菌学的検討には、患者便から分離された *stx2* 陽性の EHEC O76 : H7 と *stx2* 陰性の EPEC O76 : H7 を使用した。

## 3 検査方法

### 1) PCR法によるEHECのスクリーニング

搬入された直接分離培地のコロニー密集部をスワイプし、アルカリ熱抽出法で調整したテンプレートDNAを用いて、Ceblaらの *stx1* 及び *stx2* プライマー<sup>1)</sup> に Schmidtらの *stx2f* プライマー<sup>2)</sup> を加えて構築した *stx*-PCRを行った。さらに、複数のEHEC様コロニーから、*stx*-PCR及び伊藤らが構築したEpAll-PCR(*eae*, *aggR*, *astA*, *afaD*, 及び *bfpA* の各遺伝子を検出)<sup>3)</sup>を行った。

同時に搬入された患者便は、クロモアガーSTEC寒天培地（関東化学）及びDHL寒天培地（日水）に画線培養後、生育した多数のEHEC様のコロニーについて、上記のPCR法でEHECのスクリーニングを行った。

### 2) 鑑別培養及び血清型別

分離培地上のEHEC様コロニーを釣菌し、常法によりTSI, LIM, CLIG, 及びTSAの各培地で、鑑別培養を行った。また、病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いてO及びH血清型の同定を試みた。さらに、Iguchiらが開発した *E. coli* O-genotyping PCR法<sup>4)</sup>を用い、O抗原遺伝子により血清型(Og型)を決定した。

### 3) シークエンス解析による***bfpA***様PCRバンドの確認

EpAll-PCRで***bfpA***の位置にバンドが検出されたが、*bfpA*陽性のEHECはこれまで経験がなかったため、*bfpA*の単独プライマーで再度PCRを行ったところ、バンドは見られなくなった。そこで、EpAll-PCRに用いる10種類のプライマーを2種類ずつ組合せてPCRを行い、*bfpA*の位置にバンドが検出される組合せを調べた。また、バンドが検出されたPCR反応液をExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific)で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitによるダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定(ABI3500 Genetic Analyzer)し、BLAST検索を行った。

### 4) 生化学的性状検査

*stx2*陽性と陰性の大腸菌O76 : H7について、糖分解試験等を追加し、生化学的性状を比較した。

### 5) 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI) 標準ディスク拡散法<sup>5)</sup>に従い、市販のセンシ・ディスク (日本BD) を用いて Kirby-Bauer法で実施した。使用薬剤はアンピシリン (ABPC ; 10 $\mu$ g), セフトジジム (CAZ ; 30 $\mu$ g), セフメタゾール (CMZ ; 30 $\mu$ g), セフミノクス (CMNX ; 30 $\mu$ g), ストレプトマイシン (SM ; 10 $\mu$ g), エリスロマイシン (EM ; 15 $\mu$ g), テトラサイクリン (TC ; 30 $\mu$ g), クロラムフェニコール (CP ; 30 $\mu$ g), ナリジクス酸 (NA ; 30 $\mu$ g), シプロフロキサシン (CPFX ; 5 $\mu$ g), ホスホマイシン (FOM ; 50 $\mu$ g), ST合剤 (ST ; 23.75 $\mu$ g/1.25 $\mu$ g) の12剤である。判定は、ディスク添付の判定表に基づき、阻止円の直径により、感受性 (S), 中間 (I), 及び耐性 (R) とした。

### 6) パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis : PFGE) 解析

米国疾病予防管理センター (CDC) のパルスネットのEHEC O157標準プロトコール<sup>6)</sup>に準じ、CHEF-DR IIIシステム (Bio Rad社) で実施した。使用した制限酵素は *XbaI* (Takara) である。

### 7) 次世代シーケンサー (Next generation sequencer : NGS) によるフルゲノム解析

国立感染症研究所細菌第一部に依頼し、MiSeqシステム (イルミナ社) により全ゲノムデータを取得し、*Stx2* ファージの挿入部位の検索、病原遺伝子検索、及び一塩基多形 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 解析等を行った。

### 8) EHEC O76に対する患者血清の抗体価測定

国立感染症研究所編集の腸管出血性大腸菌検査・診断マニュアル<sup>7)</sup>に従い、マイクロプレート法でO76抗原に対する患者血清中の凝集抗体価を測定した。

### 9) *Stx2* ファージの安定性評価試験

分離された *stx2* 陽性のEHEC O76:H7について、*Stx2* ファージの安定性を確認するため、本菌をTSAに培養し、約3ヶ月間室温で保存した。この培地から1ヶ月後、2ヶ月後、及び3か月後にクロモアガーSTEC寒天培地で再分離し、それぞれ約25コロニーについて *stx2* の有無を検査した。

## 結果

### 1) PCR法によるEHEC等のスクリーニング

搬入された2枚の直接分離培地のうち、ドリガルスキー改良培地のコロニー密集部のスワイプ試料から、*stx*-PCRで *stx2* の位置にバンドが検出された。そこで、ドリガルスキー改良培地を中心に、各直接分離培地から複数のコロニーを釣菌し、*stx*-PCR及びEpAll-PCRを

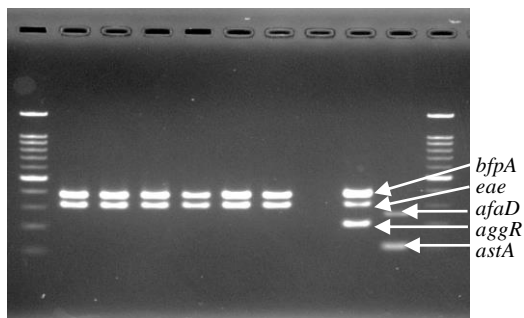


図1 EpAII-PCR法による検出例

ほとんどのコロニーから *eae* と *bfpA* の位置にバンドが検出された。



図2 便を培養したクロモアガー-STE C寒天培地

クロモアガー-STE C寒天培地上には藤色のEHEC様コロニーが純培養状に発育した。

表1 分離された大腸菌 076:H7 の生化学的性状

生化学的性状試験	Stx2陽性株	stx2陰性株	生化学的性状試験	Stx2陽性株	Stx2陰性株
Indole	+	+	Acid from Dulcitol	+	+
Motility	+	+	Inositol	-	-
ONPG	+	+	Lactose	+	+
$\beta$ -Glucuronidase	+	+	Maltose	+	+
Citrate (Simmon's)	-	-	Mannitol	+	+
Citrate (Christensen's)	-	-	Melibiose	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	-
Voges-Proskauer	-	-	L-rhamnose	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	D-raffinose	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	Salicin	(+)	(+)
Arginine dihydrolase	+	+	Amygdalin	(+)	(+)
D-glucose, acid	+	+	D-sorbitol	+	+
D-glucose, gas	+	+	L-sorbose	-	-
Acid from Adonitol	-	-	Sucrose	+	+
L-arabinose	+	+	Trehalose	+	+
Cellobiose	-	-	D-xylose	+	+

表2 分離された大腸菌 076:H7 の薬剤感受性

感受性ディスク	Stx2陽性株	Stx2陰性株	感受性ディスク	Stx2陽性株	Stx2陰性株
ABPC	S	S	TC	S	S
CAZ	S	S	CP	S	S
CMZ	S	S	NA	S	S
CMNX	S	S	CPFX	S	S
SM	I	I	FOM	S	S
EM	R	R	ST	S	S

行ったところ、*stx*はすべて陰性であったが、ほとんどのコロニーから *eae* 及び *bfpA* の位置にバンドが検出された。検査結果の一部を図1に示した。

また、患者便を培養したクロモアガー-STE C寒天培地上には、図2のように藤色のEHEC様コロニーが純培養状に生育したが、これらのコロニーからも *stx2* のバンドはなかなか検出できなかった。最終的に約250コロニーを検査し、そのうちわずかに2コロニーが *stx2*, *eae*, 及び *bfp* 陽性と判定された。

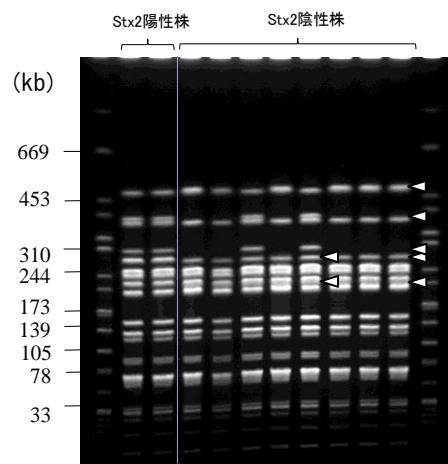


図3 分離された大腸菌 076:H7 の PFGE 像

◁ : Stx2 陽性株のパターンから変化した部位  
Stx2 陰性株には陽性株と異なる2つのパターンがみられた。

すなわち、この時点では患者便から2株のEHEC (*stx2/eae/bfpA* 陽性) と多数のEPEC (*eae/bfpA* 陽性) が分離されたと判断した。

## 2) 鑑別培養及び血清型別

分離された *stx2* 陽性株と陰性株 (ともに *eae* 及び *bfpA* 陽性) は、鑑別培養とともに典型的な大腸菌の性状を示したが、病原大腸菌免疫血清のO血清に凝集しなかった。そこで、*E. coli* O-genotyping PCRを行ったところ、ともにOg76と同定された。なお、H抗原はH血清で型別可能であり、ともにH7と同定された。

## 3) シークエンス解析による *bfpA* 様バンドの確認

EpAII-PCRで *bfpA* の位置に検出されたバンドは、*bfpA* と *astA* のリバースプライマー同士で増幅された非特異バンドであった。PCR産物の塩基配列を決定し、BLAST検索を行ったところ、IS256 familyのtransposaseの一部であることが判明した。

## 4) 生化学的性状検査

*stx2* 陽性と陰性の大腸菌076は、表1のとおり同一の生化学的性状で、ソルボース非発酵性であった以外は

通常の大腸菌の性状であった。

#### 5) 薬剤感受性試験

*stx2*陽性と陰性の大腸菌O76は、EMを除くほとんどの薬剤に感受性であり、表2のとおり同一の感受性パターンを示した。

#### 6) PFGE解析

*stx2*陽性と陰性の大腸菌O76:H7のPFGE像を図3に示した。両株の泳動パターンは類似していたが、200kb以上の領域で数バンドの違いがあり、*stx2*陰性株には*stx2*陽性株と異なる2種類のパターンが認められた。

#### 7) NGSによる全ゲノム解析

PFGEパターンの異なった3株の大腸菌O76:H7(*stx2*陽性株:1株、*stx2*陰性株:2株)を用いてNGS解析を行ったところ、*stx2*陽性株のStx2ファージ組込み部位はゲノム上の*wrbA*のローカスであり、*stx2*の亜型は*stx2a*であった。また、*stx2*陰性の2株はStx2ファージを含んでいなかった。なお、塩基配列を得ることができたStx2ファージの前半部分約45kbpは、2011年にドイツを中心に集団発生を起こしたO104のStx2ファージと高い相同性を示した。

病原因子解析では、*stx2*陽性株は多数の病原遺伝子(*stx2*, *astA*, *cif*, *eae*, *ehxA*, *espA*, *espF*, *espI*, *espJ*, *lpfA*, *nleA*, *nleB*, *nleC*, *tir*, *toxB*)を保有していたが、*stx2*陰性の2株も*stx2*以外はすべて保有していた。

さらに、全ゲノムデータからファージや繰返し配列等を除いたコアゲノムデータを用いてSNP系統解析を行ったところ、供試した3株間にSNPは全く認められず、系統樹は同一クラスターに分類された。

以上のことから、*stx2*陰性2株のPFGEパターンの違いは解明できなかったものの、*stx2*陰性株は*stx2*陽性株からStx2ファージが脱落した株と推定された。

#### 8) EHEC O76Iに対する患者血清の抗体価

発症時の血清が得られなかったため、基幹病院で採取された第12病日の血清を用い、分離された大腸菌O76抗原に対する凝集抗体価を測定したところ、1:640と高い値であった。

#### 9) Stx2ファージの安定性評価試験

*stx2*陽性EHEC O76:H7のStx2ファージは予想外に安定であり、室温で約3ヶ月間保存しても、*stx2*陰性EPEC O76:H7株を得ることはできなかった。

### 考 察

今回の事例は、患者が受診した最初の病院で起因菌が分離されていたにもかかわらず、市販の病原大腸菌免疫血清に含まれていない血清型であり、さらに培地上に生育したEHEC様コロニーのほとんどが、*stx*陰性

であったため、原因不明となっていた。しかしながら、病院、保健所及び本研究所の連携より、希な血清型であるEHEC O76を迅速に検出し、さらに患者血清中の抗大腸菌O76凝集抗体価が高値であったことと併せて、EHEC O76:H7(*stx2/eae*陽性)が起因菌であると断定することができた。

本事例では、EHECのスクリーニングに用いた*stx*-PCRとEpAll-PCR、及び*E. coli* O-genotyping PCRが非常に有効であった。まず、*stx*-PCRでコロニー密集部のスリーブ試料から*stx2*が検出されたことで、本事例がEHEC感染症であることを確信した。しかし、分離培地上に生育したEHEC様のコロニーから*stx2*は検出されず、EpAll-PCRで*eae*と*bfpA*のバンドが検出されたことから、当初はEPECとの重複感染を疑った。その後、数多くのコロニーを検査し、*stx*陽性のコロニーを検出したが、このコロニーは*eae*と*bfpA*も陽性であった。*bfpA*陽性のEHECは、これまでに分離した経験のないものであったが、検査を進めるうちに、分離されたEHECとEPECは同じ血清型O76:H7であり、両者にみられた*bfpA*様のバンドはともに非特異バンドであることが判明した。これらのことから、分離培地上に多数生育した*stx2*陰性のEPEC O76:H7は、もともと*stx2*陽性のEHEC O76:H7からStx2ファージが脱落して生じたものではないかと推測された。さらに、本事例の起因菌は、市販の病原大腸菌免疫血清に含まれていないO血清型であったが、*E. coli* O-genotyping PCR法で迅速にO血清型を同定することができた。なお、この方法を開発した宮崎大学農学部・畜産草地学科の井口研究室では現在、*E. coli* H-genotyping PCR法<sup>8)</sup>も開発しており、1週間程度かかる大腸菌のH抗原の同定が数時間で可能である。

EHEC O76:H7(*stx2/eae*陽性)によるHUS事例として、伊豫田ら<sup>9)</sup>が本事例と同様、分離の難しかった散発事例を報告している。また、病原微生物検出情報<sup>10, 11)</sup>によると、2013年と2015年に散発事例が各1事例及び2015年8月に山形県の保育所で発生した患者数7名(菌陽性者22名)の集団事例が記載されている。このうち、本事例を含め3事例でHUSを併発していることから、EHEC O76:H7(*stx2/eae*陽性)は検出頻度は低いものの、HUSを起こす可能性のある血清型として注意すべきであろう。

今回分離培地として、多くの血清型のEHECが藤色のコロニーを形成し、EHECの分離培地として評価の高いクロモアガーSTEC寒天培地<sup>12)</sup>を使用したところ、藤色のコロニーが純培養状に生育した。この中には*stx2*陽性のEHEC O76のコロニーも含まれており分離

培地として有効であったが、残念ながらそのほとんどは、*stx2* 陰性の EPEC O76 であり、*stx2* 陽性の EHEC O76 との鑑別は困難であった。なお、さまざまな O 血清型の EHEC 152 株について、市販 EHEC 選択分離培地における生育特性を調べた秋吉ら<sup>13)</sup>は 3 株の EHEC O76 を調べ、クロモアガー STEC 寒天培地には生育しない血清型として報告した。しかし、彼女らが用いた EHEC O76 は 3 株とも *stx1* 陽性及び *eae* 陰性の株であり、本事例の分離株とは病原因子が異なっている。EHEC O76 には H 抗原の異なる 2 つの血清型 (H7 及び H19) が報告されていることから、H 抗原が異なっている可能性もある。また、今回分離された EHEC O76:H7 (*stx2/eae* 陽性) 株はソルボースの発酵性が陰性であり、EHEC O111 の分離に用いられているソルボース・マッコンキー (SBMAC) 寒天も有効と思われるが、この培地でも *stx2* の有無の鑑別は困難である。

EHEC から Stx フェージが脱落する現象は、菌株の継代培養や感染後期の分離培養に伴い発生することが報告<sup>14-21)</sup>されている。感染初期から患者の腸管内で Stx フェージの脱落が起こったと考えられる事例として、Watahiki ら<sup>22)</sup>は 2011 年 4 月から 5 月にかけて富山県の焼肉チェーン店を中心に発生した O111 を主因とする食中毒事例を報告している。この事例では、*stx2* 陽性の EHEC O111 以外に、多くの患者から *stx2* 陰性の O111 が分離され、両者の PFGE パターンの類似性やゲノム解析結果から、*stx2* 陰性の O111 は、*stx2* 陽性の O111 の染色体上に不安定な状態の Stx2 プロフェージが存在し、容易に脱落したものと推察している。また、村田ら<sup>23)</sup>は山形市内で発生した EHEC O157 による食中毒事例で *stx1/stx2* 陽性株と *stx1* 陽性株を分離したが、両者の PFGE パターンが類似し、*stx1/stx2* 陽性株を室温保存することで *stx1* 陽性株が得られ、PFGE パターンが当初分離された *stx1* 陽性株と一致したことから、*stx1* 陽性株は *stx1/stx2* 陽性株から *stx2* が脱落した株であると考えられたと報告している。今回の事例も、感染初期の便を塗抹した分離培地上には EHEC 様のコロニーが純培養状に生育していたにも関わらず、ほとんどが *stx2* 陰性の EPEC O76 であった。そのため 2 株分離された *stx2* 陽性 EHEC O76 の Stx2 フェージは不安定であることが予想されたが、予想外に安定で 3 ヶ月間室温培養しても脱落しなかった。また、PFGE 解析において、*stx2* 陰性株に認められた *stx2* 陽性株と異なる 2 種類のパターンが、どのようなメカニズムで生じたのかを NGS 解析で解明しようと試みたが、明らかにすることはできなかった。今回の事象の解明は今後の検討課題である。

本事例で検出された *stx2* 陽性と陰性の大腸菌 O76 は、EpAll-PCR でともに *bfpA* の位置に非特異バンドが見られたこと、血清型、生化学的性状、及び薬剤感受性パターンが同一であったこと、さらに PFGE パターンが類似し、NGS 解析で *stx2* 以外の病原遺伝子が同一であったこと、及びコアゲノムデータによる SNP 系統解析で全く SNP が認められなかったことから、*stx2* 陰性の EPEC O76:H7 は *stx2* 陽性の EHEC O76:H7 から Stx2 フェージが脱落した株であると結論づけた。

このように、ヒト腸管における Stx フェージの脱落や獲得は、ある程度の頻度で起こっている可能性がある。EHEC 感染が疑われ起原因菌が検出できなかった際には、*stx* や *eae* 等を検出する PCR 法と分離された EHEC の O 抗原に対する患者血清中の凝集抗体価測定検査の併用が有効である。しかしながら、病院の PCR 装置の整備は遅れており、積極的な PCR 装置の導入が望まれる。

## ま と め

1. PCR 法を用いることで、原因不明であった HUS 患者便から、病原大腸菌免疫血清には含まれていない、希な O 血清型の EHEC O76 (*stx2/eae* 陽性) を検出・分離し、患者血清の O76 抗体価上昇と併せて HUS の起原因菌と断定した。
2. 患者便を画線培養した分離培地上の EHEC 様コロニーは、ほとんどが *stx2* 陰性の大腸菌 O76 (*eae* 陽性) であった。
3. *stx2* 陽性と陰性の大腸菌 O76 は、同一の生化学的性状及び薬剤感受性パターンを示した。
4. PFGE 解析では、*stx2* 陽性と陰性の大腸菌 O76 は非常に類似した泳動パターンであったが、*stx2* 陰性の大腸菌 O76 には *stx2* 陽性株とは異なる 2 種類の泳動パターンが認められた。
5. NGS 解析では、*stx2* 陰性の大腸菌 O76 は *stx2* フェージを含んでいないことが確認され、さらに、*stx2* フェージの有無、PFGE パターンの違いにかかわらず、コアゲノムの SNP 系統解析で SNP は全く認められなかったことから、*stx2* 遺伝子陰性の EPEC O76 は、*stx2* 陽性の EHEC O76 から Stx2 フェージが脱落したものと結論づけた。
6. EHEC O76:H7 は希な血清型ではあるが、国内では本事例を含め散発事例が 3 事例、集団事例が 1 事例報告されており、このうち 3 事例で HUS を併発していることから、注意すべき血清型であろう。

## 謝 辞

患者情報を提供していただいた公立多良木病院検査室の江崎有里技師，次世代シーケンサー（NGS）により，患者から分離された *stx2* 陽性及び陰性の大腸菌 O76 の全ゲノム解析を行っていただいた国立感染症研究所 細菌第一部の李 謙一先生，伊豫田 淳先生，及び大西 真先生，Stx フェージの解析にご協力・ご助言をいただいた富山県衛生研究所の綿引正則先生，並びに大腸菌の O 抗原及び H 抗原の遺伝子型別セットを分与していただいた宮崎大学農学部の井口 純先生に深謝します。

## 文 献

- 1) Cebula TA, Payne WL, Feng P : J Clin Microbiol. **33**, 248-50, (1995). Erratum in: J Clin Microbiol, **33**, 1048, (1995).
- 2) Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. : Appl Environ Microbiol., **66**, 1205-8. (2000).
- 3) 伊藤健一郎：平成 20 年度 厚生労働省新興再興感染症研究班「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」に関する九州地区研修の新規遺伝子検出法に関する研修会テキスト,(2008).
- 4) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan : J Clin. Microbiol. **53**, 2427-2432, (2015).
- 5) CLSI:VET01 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition
- 6) Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. : J Clin. Microbiol. **43**, 1045-1050, (2005).
- 7) 国立感染症研究所編：腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル（2017 年 2 月改訂）.
- 8) Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan ; J Clin. Microbiol. **56**, e00190-18, (2018).
- 9) 伊豫田ら：第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会プログラム抄録集, p20, 2014.
- 10) 病原微生物検出情報： **35(5)**, 15, (2014).
- 11) 病原微生物検出情報： **37(5)**, 2 及び 13, (2016).
- 12) 角屋勇気, 梅沢政功, 山崎恒, 岡元満, 林田瑞穂, 金子孝昌：日臨微誌, **22**, 231-238, (2012).
- 13) 秋吉 充子, 中村 寛海, 伊豫田 淳, 石原 朋子, 加藤 結子, 井口 純：日食微誌 **32**, 192-198, (2015)
- 14) Karch H, Meyer T, Rüssmann H, Heesemann J. : Infect. Immun., **60**, 3464-3467, (1992) .
- 15) Feng P, Dey M, Abe A, Taked T : Clin. Diagn. Lab. Immunol., **8**, 711-717, (2001).
- 16) Mellmann A, Bielaszewska M., Zimmerhackl LB, Rita Prager, Harmsen D, Tschape H, and Karch H : Clinical Infectious Diseases, **41**, 785-92, (2005).
- 17) Bielaszewska M, Prager R, Kock R, Mellmann A, Zhang W, Tschape H, Tarr P I, Karch H : Appl. Environ. Microbiol., **73**, 3144-3150, (2007).
- 18) Bielaszewska M, Kock R., Friedrich AW , Eiff C, Zimmerhack LB, Karch H, Mellmann A : PLoS ONE, 2(10): e1024, (2007).
- 19) Friedrich AW, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Köck R, Fruth A, Tschape H, Karch H. : Clin. Infect. Dis., **45**, 39-45, (2007).
- 20) Yoshii N, Ogura Y, Hayashi T, Ajiro T, Sameshima Toshiya, Nakazawa M, Kusumoto M, Iwata T, Akiba M : Applied and Environmental Microbiol., Sept., 5719-5726, (2009).
- 21) Ferdous M, Zhou K, Mellmann A, Morabito S, Croughs PD., Boer RF, e. Kooistra-Smid AMD, Rossen JWA, Friedrich AW : J Clin. Microbiol. **53**, 3530-3538, (2015).
- 22) Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Terajima J, Ohnishi M, Sata T : J Clin Microbiol., **52**, :2757-63, (2014).
- 23) 村田敏夫, 柳生裕子, 三瓶美香, 青木敏也：第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会プログラム抄録集, 20, (2013).