

腸管出血性大腸菌(EHEC) 検査・診断マニュアル

平成 24 年 6 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 | 8 |
| | (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 | 16 |
| | (3) 抗体価測定法 | 17 |
| | (4) 判定 | 18 |
| 4. | 参考文献 | 19 |
| 5. | 参考資料 1 | 20 |
| | (1) O 抗原合成遺伝子の検出 | 20 |
| | (2) 免疫磁気ビーズの作製方法 | 24 |
| 6. | 検査依頼先 | 25 |
| 7. | 執筆者一覧 | 25 |
| | 参考資料 2・3 | 26 |

1. 概要

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) は、出血性大腸炎を惹起することからこの名称で呼ばれる一方、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 を産生する大腸菌」と定義されている。EHEC 感染症は、3 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、分離株の毒素産生性の確認または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 抗原型や毒素型がわかれば接触者検便の実施に有用である。

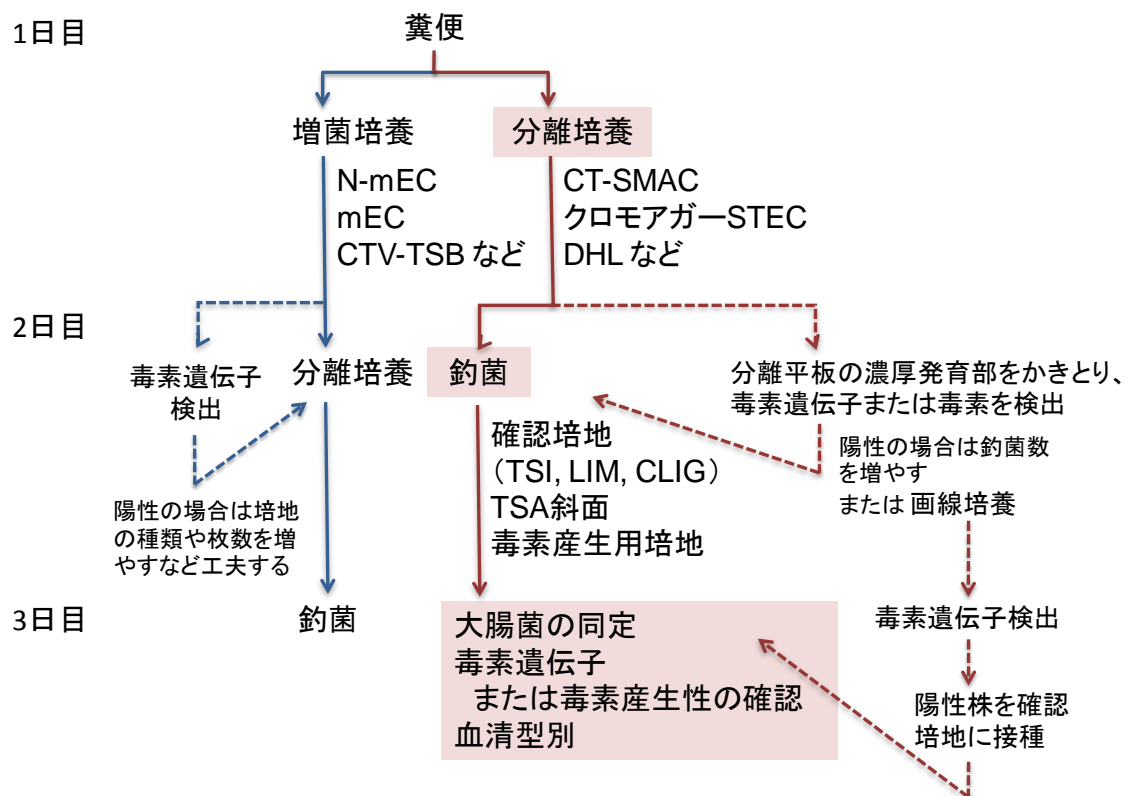


図1 糞便からのEHEC分離の手順

(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いる場合は、下痢便を遠心し沈渣を検査に供する。

(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 抗原型については、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(表 1)。

表1 主なEHEC検出用選択分離培地の種類と特徴

| 培地名 | 種類 | メーカー | 鑑別性状など |
|--------------------------------|---------|--|-----------------------------------|
| 糖分解を利用した培地 | | | |
| CT-SMAC ^{a)} | 粉末, 生培地 | 日水製薬, Merck, 栄研化学, Oxoid, 極東製薬, BD | ソルビトール分解 |
| SIB寒天培地 | 粉末, 生培地 | 極東製薬 | ソルビトール分解, IPA |
| SIB II寒天培地 | 粉末 | 極東製薬 | ソルビトール分解, IPA, H ₂ S産生 |
| DHS寒天培地「ダイゴ」 | 粉末 | 日本製薬 | ソルビトール分解, H ₂ S産生 |
| CT-RMAC | 生培地 | 極東製薬, 栄研化学 | ラムノース分解 |
| CT-RMAC/CT-SBMAC ^{b)} | 生培地 | 日水製薬 | ラムノース分解, ソルボース分解 |
| MAC寒天基礎培地 ^{a)} | 粉末 | BD | 添加した糖の分解 |
| DHL寒天基礎培地「ダイゴ」 | 粉末 | 日本製薬 | 添加した糖の分解, H ₂ S産生 |
| 合成基質培地 | | | |
| クロモアガー O157培地 | 粉末, 生培地 | 関東化学 | 発色基質 |
| クロモアガーSTEC | 粉末, 生培地 | 関東化学 | 発色基質, 発光基質 |
| BCM O157寒天培地 | 粉末, 生培地 | 栄研化学 | 発色基質 |
| Vi RX O26寒天培地 ^{a)} | 粉末 | 栄研化学 | ラムノース分解, 発色基質 |
| Vi EHEC寒天培地 | 生培地 | 栄研化学 | 発色基質 |
| XM-EHEC寒天培地 | 生培地 | 日水製薬 | 発色基質 |
| CIX寒天培地 | 生培地 | 極東製薬 | 発色基質 |
| レインボーアガーO157培地 | 粉末 | カイノス | 発色基質 |

a) 粉末培地はCT選択剤を添加する

b) 分画培地

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、マッコンキー寒天培地(MAC)の鑑別糖を置き換え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)が汎用されており、白色(糖分解陰性)のコロニーを釣菌する。CT選択剤は、SIB寒天培地やDHS寒天培地には使用できない。 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。

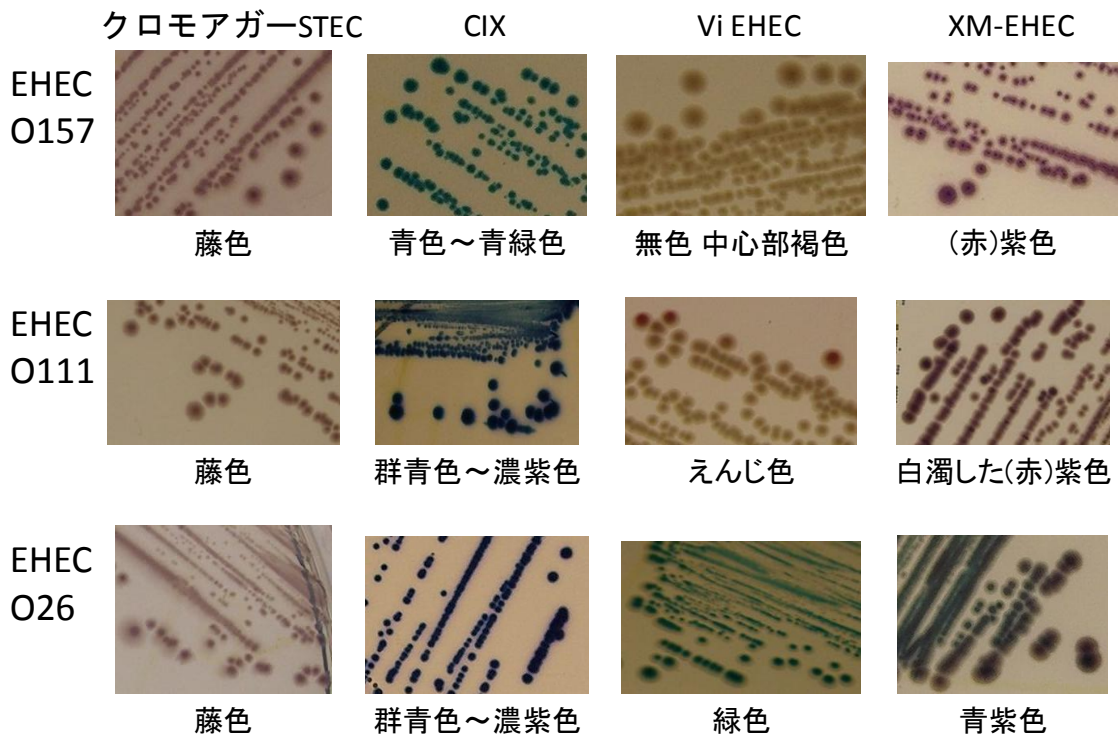


図2 合成基質培地上のEHECコロニー

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 など選択性の高い培地には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 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ジ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、ノボビオシン(最終濃度 20 mg/L)を加えた modified EC 培地や 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。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 抗原型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 の血清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。免疫磁気ビーズは O157、O26、O111 に加えて O103、O145 が市販されており、これ以外の血清群については各種抗体結合用磁気ビーズ(例えば抗ウサギ IgG 抗体結合磁気ビーズ)と目的とする血清群の免疫血清(ウサギ血清)を用いて自家調整できる。

EHEC の耐酸性を利用し、TSB で 6 時間培養した増菌液を等量の 0.125N 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、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。

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 2)。

表2 主なEHECの鑑別性状

| 血清群 | TSI寒天培地 | | | | LIM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 | IND ^{a)} | 運動性 | | SOR | RHAM | | |
| O157 | + ^{e)} | + | - | + | + | + | (+) | - | - | - | + | + |
| O26 | + | + | - | + | + | + | (+) | + | + | - | + | + |
| O111 | + | + | - | + | - | + | (-) | + | + | + | + | + |
| O103 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | d | d | + |
| O121 | (+) ^{f)} | + | - | + | + | + | (+) | + | + | + | + | + |
| O145 | + | + | - | + | + | + | (-) | + | + | + | + | + |
| O165 | + | + | - | - | - | + | (-) | + | (+) | - | - | - |

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) ラクトース陰性株であっても培養中にラクトース陽性株を生じる

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・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。継代培養後はVT遺伝子を運ぶファージが欠落することが頻繁に報告されており、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) デンマークの血清学研究所: Statens Serum Institut (SSI) のPCRプロトコール

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。これらのサブタイプには歴史的な背景から名称が統一されておらず、混乱の原因となっていた。デンマークの血清学研究所: Statens Serum Institut (SSI) では、新しい毒素名としてVtx1 / Vtx2という名称を提案し、それぞれの検出プライマーがデザインされている。本稿ではSSIで行われている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。統一された新しい名称とこれまでの名称との関係については添付の Vtx サブタイプ対応表を参照されたい(参考資料 3)。なお、これらの新しい名称についてはサブタイプを表記する必要がある場合にのみ限定し、単に志賀(ペロ)毒素 1 型および 2 型を表記する場合は、これまで同様 VT1 / VT2(Stx1 / Stx2)としていただきたい。なお、英文のオリジナルプロトコールは参考資料 2, 3 の通りである。

・本手法で分類可能なバリエーション

SSI の PCR 検出系では次のサブタイプの検出が可能である(参考資料 3: Vtx サブタイプ対応表参照のこと): *vtx1a*, *vtx1c*, *vtx1d*, *vtx2a*, *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f*, *vtx2g*.

① Template DNA の作製

- ・イエローチップ等の先端でコロニーを極微量掻き取って滅菌水 50 μ l に懸濁する。
- ・98°C で 5 分以上加熱し, 10,000 \times g で 1 分間遠心した上清を使用する(精製 DNA を用いても可)。
- ・コントロール DNA: *vtx* 陽性株(参考資料 2, Appendix 2 参照)

② Primers

参考資料 2, Appendix 1 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) |
| 10 | μ l | master mix (HotStart, Qiagen) |
| 1.25 | μ l | 5 μ M プライマー(2 種類の場合; 3 種類の場合は水を 1.25 μ l にする) |
| 5 | μ l | 鋳型 DNA |
| <hr/> | | |
| 20 | μ l | total |

ただし、*vtx1* のサブタイプ検出には以下の組成を用いる。

| | | |
|-------|-----|--|
| 12 | μ l | master mix (HotStart, Qiagen) |
| 1 | μ l | 5μ M プライマー (<i>vtx1c</i> および <i>vtx1d</i> の 4 種類) |
| 2 | μ l | 5μ M プライマー (<i>vtx1a</i> の 2 種類) |
| 5 | μ l | 鋳型 DNA |
| <hr/> | | |
| 25 | μ l | total |

④ 反応条件

vtx1 および *vtx2* (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

vtx1 サブタイプおよび *vtx2* サブタイプ検出用反応条件

- Step1: 95°C, 15 min
- Step2: 94°C, 50 sec
- Step3: 62°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

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(参考資料2 Figure 1-3).

⑥ 参考文献

参考資料 2, 3 を参照のこと。なお、サブタイプの陽性コントロールについては、感染研・細菌第一部から分与可能である。

2) その他の PCR プロトコール

SSI のプライマー以外に下記の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 3 (各 PCR プライマーによる *vtx* サブタイプ検出能の比較) を参照のこと。

表3 各PCRプライマー及びLAMP法による *vtx* サブタイプ検出能の比較

| Subtype | LAMP ^{a)} | Linら | Cebulaら | | Takara | |
|---------|--------------------|---------|---------|---------|--------|--------|
| | | up/down | LP30/31 | LP43/44 | EVT1/2 | EVS1/2 |
| 1a | + | + | + | - | + | - |
| 1c | + | + | + | - | + | - |
| 1d | (+) ^{b)} | + | - | - | + | - |
| 2a | + | + | - | + | - | + |
| 2b | + | + | - | + | - | + |
| 2c | + | + | - | + | - | + |
| 2d | + | (+) | - | + | - | + |
| 2e | + | + | - | + | - | + |
| 2f | - | + | - | - | - | - |
| 2g | (+) | (+) | - | + | - | + |

a) Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットを使用

b) (+); 検出感度が低い

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: Loopamp リアルタイム濁度測定装置(LA-320C 及び RT-160C 等: 栄研化学販売)。その他、同等の機能を有する機器が利用できる。

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(タカラバイオ)

対応機種: Thermal Cycler Dice Real Time System(タカラバイオ)、ABI PRISM 7000、7300、7500、7700、7900(アプライド・バイオシステムズ ジャパン)、LightCycler Ver. 1.2、1.5、2.0 その他、同等の機能を有する機器が利用できる。

CycleavePCR O-157(VT gene) Screening Kit Ver. 2.0(タカラバイオ)

CycleavePCR O-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0(タカラバイオ): 前述の2つのキットと異なり VT1 と VT2 を区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 4)。

表4 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100μ 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160μ 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100μ lを滴下 する ラインの有無で判定 | 15分 | |
| RPLA | VTEC-RPLA (デンカ生研) | VT1, VT2 | 階段希釈した被検液 25μ lを試薬と混合す る 凝集価1:4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 度を測定し0.150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) RPLA: 逆受け身ラッセクス凝集反応, IC: イムノクロマト法, 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

VT は志賀毒素と同一の抗原性をもつ VT1 と免疫学的に異なる VT2 があるが、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ない。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 160μ 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。RPLA 法は安価な上、検出感度は約 1 ng/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 など寒天培地発育コロニーをポリミキシン B 溶液や検体希釈液にかき取る方法と、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。IC 法や EIA 法では、菌の濃度が極端に濃いと偽陽性を示す場合がある。

VT2 バリエーションのうち、O157 に多い VT2c は VT2 に比べ RPLA 法の検出感度が低く、IC 法や EIA 法では検出されないことがある。ソルビトール陰性・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 5)。

表5 VT検出法の比較

| Subtype | EIA ^{a)} | | | RPLA ^{b)} | | | Duopath VT ^{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) オートVT1/VT2を使用。TSB発育菌50μ Lを検体希釈液200μ Lに加えて混和後100μ Lを被検液とした。

b) VTEC-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) Duopath Verotoxins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。

d) NHイムノクロマト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-O187まで(このうち、O31, O47, O67, O72, O94, O122は欠番となっているため、合計 181 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 から購入可能である。一方、デンカ生研から販売され

ている抗大腸菌抗血清は、O 抗原が 50 種類、H 抗原は 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 抗原型の場合は、フルセットを用いた確認または定量凝集反応法による血清型参照株との比較が必要である。

a) 菌体抗原(O 抗原)

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 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。

EHEC の代表的な血清群である 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 検出試薬 UNI(OXOID)があり、特異性、感度ともに優れている。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、大腸菌と同定された菌株で実施しなければならない。

b) 鞭毛抗原(H 抗原)

クレイギー管を入れた半流動培地(SIM 培地など)で 3~5 本継代培養し、運動性を増強した菌を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 30~60 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 2-6 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。

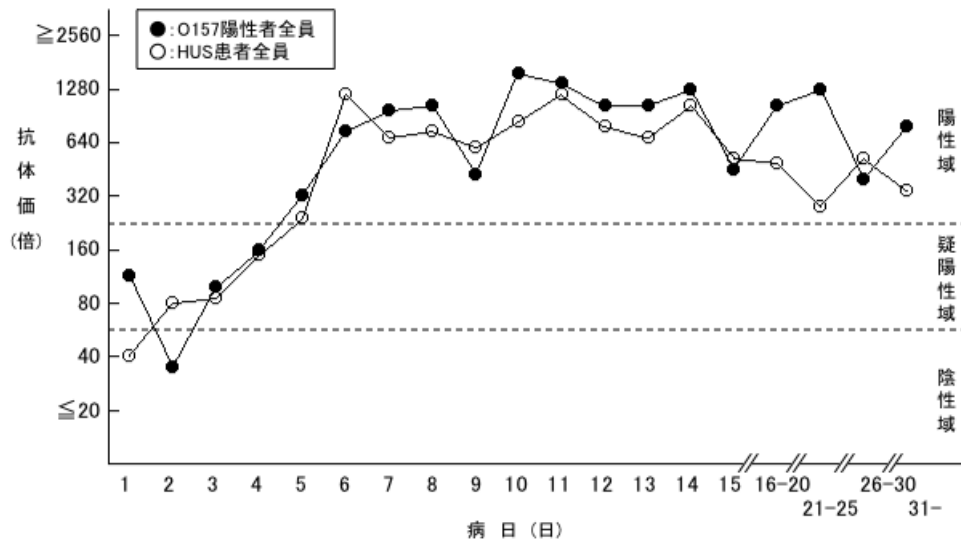


図3. 病日によるO157抗体価の変動(試験管法による判定)

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」(三菱化学メディエンス)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。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 血清群の分離株(O157, O111, O26, O103, O145, O121, 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°C 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 3 平板培地でスムーズ型集落(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) 深型シャーレで 1 cm 以上の厚さにトリプトソイ寒天(TSA)を作製し(または大試験管 [19 mm× 160 mm 程度の大きさのもの] で作製した TSA 斜面培地に)、

菌を全面塗布して 37°C 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°C 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°C で 1 時間静置したものを抗原として使用する。作製した抗原は 4°C で数ヶ月は保存可能である。

抗原液の標準化: 抗原液は、あらかじめデンカ生研の抗血清を用いて、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 とするように調整し、抗原液とする。

(2) 血清の非働化

HUS 患者血清は 56°C 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 μ l を、1 列の 2-8 本目に生食水 600 μ l を分注する。
- 2) 1 列の 1 本目に血清 120 μ l を加えて 10 倍希釈液とし、よく混合した後 600 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l と抗原液 200 μ l 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°C の恒温水槽で一夜静置する。

6) 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。

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ウサギ抗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

1) 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。

2) 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)

3) 陽性コントロール、陰性コントロールの結果を確認する。

4) 特定の O 血清群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)。

5) RPLA 法と同じく「遅滞現象」により、血清濃度の高いところで陰性にみ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 血清群の EHEC が分離されている場合などは、当該 O 血清群と代表的な O 血清群

(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

齊藤剛仁,他, 病原微生物検出情報:IASR Vol. 32 p. 141-143: 2011 年 5 月号;IASR Vol. 31 p. 170-172: 2010 年 6 月号;IASR

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(7): 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(1): 248-250.

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(1):80-8

5. 参考資料 1

(1) O 抗原合成遺伝子の検出

大腸菌の O-antigen gene cluster は染色体上の *galF* と *gnd* 遺伝子間に存在し、血清群特異的な配列を標的とすることにより血清群特異的 PCR 反応系を確立することができる¹⁾。血清群特異的な配列としては O-antigen flippase 遺伝子 (*wzx*) と O-antigen polymerase 遺伝子 (*wzy*) が用いられることが多い。これまでに O15²⁾、O26³⁾、O45⁴⁾、O55⁴⁾、O86⁵⁾、O91⁶⁾、O103⁷⁾、O104⁸⁾、O111⁹⁾、O113³⁾、O114¹⁰⁾、O121¹⁾、O145¹¹⁾、O157¹²⁾、O172¹³⁾、O174¹⁴⁾、O177¹⁴⁾ 抗原検出用 PCR が報告されている。これらのうち、検出頻度が比較的高い EHEC である O26³⁾、O91⁶⁾、O103⁷⁾、O111⁹⁾、O121¹⁾、O145¹¹⁾、O157¹²⁾ 抗原検出用 PCR のプライマーと増幅断片サイズ、原報に記載されているアニーリング温度と文献を表 6 に示す。

一方、大腸菌の H 抗原特異的検出 PCR に関する報告¹⁵⁾もみられ、*fliC* H7 遺伝子を標的とした H7 抗原同定用プライマーと増幅断片を表 6 に示す。運動性を示さない大腸菌でも多くは *fliC* 陽性であり、PCR 法で型別できるが、運動性陽性株と区別する表記 (例えば O157:[H7]) が望ましい。

表6 各種0抗原およびH7抗原同定用PCRのプライマーと増幅断片サイズ

| 抗原 | 標的遺伝子 | プライマー名: | プライマー配列 | 増幅断片サイズ (bp) | アニーリング温度 (°C) | 文献 | |
|------|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|--|-----------------------------------|
| 026 | wzx | F | GCG-CTG-CAA-TTG-CTT-ATG-TA | 152 | 54 | Appl. Environ. Microbiol. 70 1830 (2004) | |
| | | R | TTT-CCC-CGC-AAT-TTA-TTC-AG | | | | |
| wzy | F | TAA-ATT-GCG-GGG-AAA-GAA-TG | 276 | 60 | | | |
| | R | GAC-TTC-ATG-GGT-ACC-GCC-TA | | | | | |
| 091 | wbsD | P47B | GCT-GAC-CTT-CAT-GAT-CTG-TTG-A | 291 | 62 | | J. Appl. Microbiol. 93 759 (2003) |
| | | P47C | TAA-TTT-AAC-CCG-TAG-AAT-CGC-TGC | | | | |
| wzy | P50A | TCT-GGA-ATG-CTT-GAT-GAA-CCT-GGG-T | 177 | 65 | | | |
| | P50B | ACG-CCG-TGT-TTG-AAA-GAT-AAG-CCC-C | | | | | |
| 0103 | wzx | 0103wzxF | TTG-GAG-CGT-TAA-CTG-GAC-CT | 321 | 57 | | Can. J. Microbiol. 51 515 (2005) |
| | | 0103wzxR | GCT-CCC-GAG-CAC-GTA-TAA-G | | | | |
| wzy | 0103wzyF | ATA-CAA-AAT-ATG-GCG-TGG-ATT-GG | 280 | 57 | | | |
| | 0103wzyR | GCC-AGT-AAT-TGA-CGT-AAC-TGC-TC | | | | | |
| 0111 | 0111rfb ORF 3.4 | 0111 F | TAG-AGA-AAT-TAT-CAA-GTT-AGT-TCC | 406 | 60 | J. Clin. Microbiol. 36 598 (1998) | |
| | | 0111 R | ATA-GTT-ATG-AAC-ATC-TTG-TTT-AGC | | | | |
| 0121 | wzx | 0121wzx1F | AGG-CGC-TGT-TTG-GTC-TCT-TA | 310 | 57 | J. Clin. Microbiol. 41 3379 (2003) | |
| | | 0121wzx1R | TCG-CTA-CCG-CTA-ATG-ATT-CC | | | | |
| wzy | 0121wzy1F | AGC-CGG-TAG-TGT-TGA-AAG-GA | 299 | 63 | | | |
| | 0121wzy1R | CTT-CAA-TGA-GTG-CAG-GCA-AA | | | | | |
| 0145 | wzx | wl-2131 | CCA-TCA-ACA-GAT-TTA-GGA-GTG | 610 | 59 | J. Bacteriol. 187 758 (2005) | |
| | | wl-2132 | CTA-TCT-AAG-CGC-CAT-CTT-T | | | | |
| wzy | wl-2135 | TGC-CAC-TGA-TGG-GAT-TAG | 646 | 59 | | | |
| | wl-2136 | ATA-GGC-CCG-AAA-GTT-TAA-GT | | | | | |
| 0157 | rfb0157 | 0157PF8 | CGT-GAT-GAT-GTT-GAG-TTG | 420 | 55 | Appl. Environ. Microbiol. 65 2954 (1999) | |
| | | 0157PR8 | AGA-TTG-GTT-GGC-ATT-ACT-G | | | | |
| H7 | fliCH7 | FLICH7-F | GCG-CTG-TCG-AGT-TCT-ATC-GAG-C | 625 | 65 | J. Clin. Microbiol. 35 656 (1997) | |
| | | FLICH7-R | CAA-CGG-TGA-CTT-TAT-CGC-CAT-TCC | | | | |

(文献)

- 1) Fratamico PM, Briggs CE, Needle D, Chen CY, DebRoy C: Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-Antigen Gene Cluster and Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. J Clin Microbiol 2003;41:3379-83.
- 2) Beutin L, Tao J, Feng L, Krause G, Zimmermann S, Gleier K, *et al.*: Sequence analysis of the *Escherichia coli* O15 antigen gene cluster and development of a PCR assay for rapid detection of intestinal and extraintestinal pathogenic *E. coli* O15 strains. J Clin Microbiol 2005;43:703-10.
- 3) DebRoy C, Roberts E, Kundrat J, Davis MA, Briggs CE, Fratamico PM: Detection of *Escherichia coli* Serogroups O26 and O113 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. Appl Environ Microbiol 2004;70:1830-32.
- 4) DebRoy C, Fratamico PM, Roberts E, Davis MA, Liu Y: Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of *Escherichia coli* O45 and O55 serogroups. Appl Environ Microbiol 2005;71:4919-24.
- 5) Feng L, Han W, Wang Q, Bastin DA, Wang L: Characterization of *Escherichia coli* O86 O-antigen gene cluster and identification of O86-specific genes. Vet Microbiol 2005;10:241-8.
- 6) Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P: Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. J Appl Microbiol 2002;93:758-64.
- 7) Fratamico PM, DebRoy C, Strobaugh TP Jr, Chen CY: DNA sequence of the *Escherichia coli* O103 O antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O103 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. Can J Microbiol 2005;51:515-22.
- 8) Wang L, Briggs CE, Rothemund D, Fratamico P., Luchansky JB, Reeves PR: Sequence of the *E. coli* O104 antigen gene cluster and identification of O104 specific genes. Gene 2001;270:231-6.

- 9) Paton AW, Paton JC: Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol 1998;36: 598–602.
- 10) Feng L, Wang W, Tao J, Guo H, Krause G, Beutin L, *et al.* : Identification of *Escherichia coli* O114 O-antigen gene cluster and development of an O114 serogroup-specific PCR assay. J Clin Microbiol 2004;42: 3799–804.
- 11) Feng L, Senchenkova SN, Tao J, Shashkov AS, Liu B, Shevelev SD, *et al.* : Structural and Genetic Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O Antigen and Development of an O145 Serogroup-Specific PCR Assay. J Bacteriol 2005;187: 758–64.
- 12) Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD : Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl Environ Microbiol 1999;65: 2954–60.
- 13) Guo H, Feng L, Tao J, Zhang C, Wang L: Identification of *Escherichia coli* O172 O-antigen gene cluster and development of a serogroup-specific PCR assay. J Appl Microbiol 2004;97: 181–90.
- 14) Beutin L, Kong Q, Feng L, Wang Q, Krause G, Leomil L, *et al.* : Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O 174 and O 177 O antigens. J Clin Microbiol 2005;43: 5143–9.
- 15) Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, K Rahn K, Read S: Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 1997;35: 656–62.

(2) 免疫磁気ビーズの作製方法

ここでは、大腸菌血清 O 群に対応する免疫磁気ビーズは、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。

準備するもの

Dynabeads^R M-280(Sheep anti-Rabbit IgG,10⁴ /ml/beads,10ml)

洗浄液 PBS/ FCS-NaN₃ (pH7.4)

| | |
|--|------------------------------|
| NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O | 0.16 g |
| NaH ₂ PO ₄ -12H ₂ O | 1.98 g |
| NaCl | 8.10 g |
| H ₂ O | 1,000ml |
| FCS (ウシ胎児血清) | 1.00% (56°C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

ビーズの感作方法

1. 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/10⁷ 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 (10⁸ 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 血清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、VT 遺伝子を保有しない同一の O 群大腸菌を使用する。

6. 検査依頼先

各都道府県の地方衛生研究所を対象とする。

7. 執筆者一覧

地方衛生研究所

八柳 潤（秋田県健康環境センター）

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）

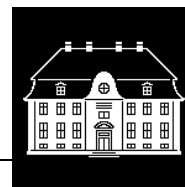
国立感染症研究所 細菌第一部

伊豫田 淳

寺嶋 淳



**Identification of three *vtx1* and seven *vtx2* subtypes of
Verocytotoxin encoding genes of *Escherichia coli*
by conventional PCR amplification**



INDEX

1. Aim and field of application

2. Procedure

2.1 Principle of the method

2.2 Template preparation

2.3 Setting up the PCR reaction

2.4 Agarose gel electrophoresis

2.5 Devices/Instruments

2.6 Reagents and media

2.7 Safety and protection devices

2.8 Reference Strains

2.9 Interpretation of the results

Appendix 1

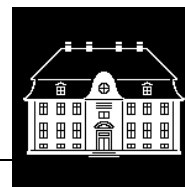
– Primers

Appendix 2

– Reference strains

Appendix 3

– References



1. Aim and field of application

Verocytotoxins (VT), synonymous Shiga toxins, are a toxin family characterized by an elevated degree of diversity. The VT family is divided into two branches, VT1 and VT2, based on their antigenic differences. The terms "VT1" and "VT2" were also used to describe the prototypic toxins first described in each branch. Many toxin variants have been described in either branch and it has been recommended that VT family members be classified based on phenotypic differences, biologic activity and hybridization properties (O'Brien et al. 1994).

Classification of VT variants does not represent only a taxonomic exercise: some of the variants are clinically relevant in that they are produced by strains isolated from cases of haemolytic uremic syndrome (HUS), while some others are primarily associated with milder course of disease or are probably not produced by *E. coli* strains causing human disease (Friedrich et al. 2002; Bielaszewska et al. 2006; Persson et al. 2005). Different systems of nomenclature have been proposed and used for VT variants and their coding genes (*vtx*) (O'Brien et al. 1994). A consensus on a comprehensive proposal of nomenclature has been reached during the 7th International Symposium on VTEC held in 2009. This proposal is going to be published and introduces three levels of designations:

1. Types

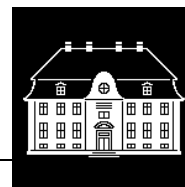
The two major branches VT1 and VT2 that share structure and function but that are not cross neutralized with heterologous antibodies. The terms VT1 and VT2 should only be used when the subtype is unknown.

2. Subtypes

The antigenically related members of the two main types, which are suffixed with small Arabic letters (e.g. VT1a).

3. Variants

Variants include the subtype specific prototypic toxins or related toxins within a subtype (that differ by one or more AAs from the prototype). The variants are designated by toxin subtype, O group of the host *E. coli* strain, followed by the strain name or number from which that toxin was described. (e.g. VT1a-O157-EDL933 or VT2c-O157-E32511). Nucleotide variants within a given VT subtype are italicised e.g. *vtx2c*-O157-E32511 is a nucleotide variant that encodes VT2c-O157-E32511.



The present method concerns the identification of the three *vtx1* subtypes and the seven *vtx2* subtypes of VT encoding (*vtx*) genes of *E. coli* by conventional PCR amplification. It is intended for application on isolated VTEC strains.

The *vtx* gene subtypes that represent the target of this method are:

For *vtx1*:

vtx1a, *vtx1c*, *vtx1d*

For *vtx2*:

vtx2a, *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* and *vtx2g*.

2. Procedure

2.1 Principle of the method

The method is based on PCR amplification of specific DNA regions from a template DNA, with oligonucleotides triggering the start of the PCR reaction.

The procedure includes a first phase of identification of the *vtx* gene types (*vtx1* and/or *vtx2*) possessed by the strain under examination. The primers for this preliminary typing step are included in the table in Appendix 1. The second phase concerns the detection of the *vtx* gene subtypes and is performed by specific PCR reactions, using primers designed on the basis of analyses of existing *vtx* sequences (reported in **Appendix 1**).

The method is composed of the following steps:

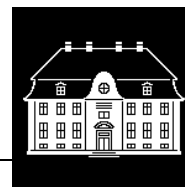
- Template preparation
- Setting up the PCR reaction
- Determination of the PCR results by agarose gel electrophoresis.

2.2 Template preparation

Isolated strains are streaked onto solid media (e.g. TSA) and incubated over night.

A single bacterial colony is inoculated in TSB and incubated over night.

25 µl of the overnight culture are added to 975 µl Milli Q water in Eppendorf tube and boiled for 15 minutes. Centrifuge at 18.000 g 5 minutes. Upon transfer to a clean tube, the supernatant is used directly for PCR and stored at -18°C for further analyses.



5.3 Setting up the PCR reaction

PCR assays are set up in a total volume of 20 µl for standard PCR and 25 µl for triplex PCR as described in Appendix 1 (stock solution of primers is 5 µM) and 5 µl supernatant of boiled lysate (stock template prepared as described above) and Milli Q water up to 20 or 25 µl.

Standard PCR in total volume of 20 µl:

2.5 µl H₂O §

10 µl Mastermix (HotStart, Qiagen),

1.25 µl of each of two primers (STOCK solution of primers is 5 µM) §

5 µl supernatant of boiled lysate (STOCK)

§ If three primers are used (*vtx2a* or *vtx2d* if primer *vtx2d*-O55-R is excluded), H₂O volume is reduced to 1.25 µl; If four primers are used (all *vtx2d* or detection of all *vtx2* variants), H₂O is NOT added!

Triplex-PCR for subtyping of *vtx1*

PCR in total volume of 25 µl:

12 µl Mastermix (HotStart, Qiagen),

1 µl of each of the four primers for *vtx1c* and *vtx1d* (STOCK solution of primers is 5 µM)

2 µl of each of two primers for *vtx1a* (STOCK solution of primers is 5 µM)

5 µl supernatant of boiled lysate (STOCK)

The thermo cycler conditions are:

vtx1 and *vtx2* detection with primers *vtx1*-det-F1/ *vtx1*-det-R1; F4/R1/F4-f/R1-e/f:

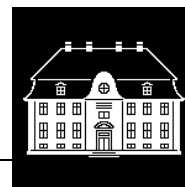
95°C for 15 min (HotStart Taq activation)

35 cycles of 94°C for 50 sec, 56° for 40 sec and 72°C for 60 sec, ending with 72°C for 3 min

vtx1 and *vtx2* subtyping – see appendix 1:

95°C for 15 min (HotStart Taq activation)

35 cycles of 94°C for 50 sec, 62°C for 40 sec and 72°C for 60 sec, ending with 72°C for 3 min. PCR amplicons can be stored at 4°C until loading on agarose gel.



In each PCR assay, a positive and a negative control must be included. The positive controls are DNA templates obtained from *E. coli* strains harbouring the different *vtx* subtypes that are the object of the present method (*vtx1a*, *vtx1c*, *vtx1d*, *vtx2a*, *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* and *vtx2g*), and the negative control is constituted by a sample without template added.

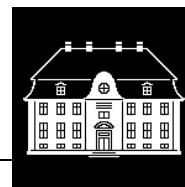
2.4 Agarose gel electrophoresis

Prepare agarose gel in 1X Tris/Borate/EDTA (TBE) or Tris/Acetate/EDTA (TAE). Each well of the gel is loaded with 10 µl of each reaction added with loading dye at 1X final concentration. Run the samples in 1X running buffer (TBE or TAE) in constant voltage (100 V). Use a molecular weight marker suitable for assignment of the correct molecular weights to the amplicons produced (refer to Appendix 1). Consider that a correct band assignment is a crucial point in the assessment of the presence of the target genes. Make sure that the bands produced by the reference strains match exactly the expected molecular weight.

Agarose gels should be added of ethidium bromide to allow the visualisation of DNA. This reagent is a DNA intercalating agent commonly used as a nucleic acid stain in molecular biology laboratories. When exposed to ultraviolet light, it will fluoresce with a red-orange colour. Ethidium bromide should be added to a final concentration of 0.5 µg/ml before pouring the agarose gel in the electrophoresis gel cast. Alternatively the agarose gel can be stained after electrophoresis in a 0.5 µg/ml ethidium bromide aqueous solution.

2.7 Safety and protection devices

Some VTEC strains can infect human beings at a very low infectious dose and can cause severe disease. Laboratory acquired infections have been reported. Therefore, working with VTEC requires good laboratory practices and the use of protection devices. Ethidium bromide is a mutagen and toxic agent; therefore it should be used in compliance with the safety sheet provided and with protection devices (lab-coats and latex gloves). The U.V. light may cause damage to eyes so it is mandatory the use of Plexiglas shields and protective glasses.



2.8 Reference strains

VTEC strains harbouring the different *vtx* subtypes object of the present method are listed in **Appendix 2** and should be used as positive control. A complete set of strains harbouring the genes encoding all *vtx* subtypes (for a total of ten isolates) are provided in the framework of the collaborative inter-laboratory study. Nonetheless, for the application of the present method, only the strains harbouring the *vtx* subtypes object of the method shall be used as positive controls.

The control templates can be prepared in advance as described for the test strains and stored at -20°C for eight months.

**WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
*Escherichia and Klebsiella***



Appendix 1.

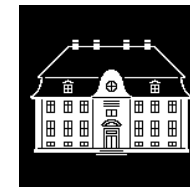
List of primers to be used for *vtx* genes detection and subtyping

| Primer | Sequence (5' – 3') | Position | Amplicon size (bp) | |
|----------------------------------|--|--|--------------------|--|
| <i>Stx/vtx1</i> § | | | | |
| Detection | | | | |
| vtx1-det-F1 vtx1-det-R1 | GTACGGGGATGCAGATAAATCGC AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT | 440-462 622-648 | 209 | |
| Subtyping | | | | |
| vtx1a-F1 vtx1a-R2 | CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG | 362-384 815-839 | 478 | All 6 primers can be used in a triplex PCR for subtyping of <i>vtx1</i> *. |
| vtx1c-F1 vtx1c-R1 | CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA | 362-384 588-613 | 252 | |
| vtx1d-F1 vtx1d-R1 | CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA | 50-78 225-252 | 203 | |
| <i>Vtx2</i> | | | | |
| Detection | | | | |
| F4 R1 F4-f R1-e/f | GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC | 606-629 1209-1232 606-629 1209-1230 | 627 625 | For detection all 4 primers can be used in one reaction. |
| Subtyping | | | | |
| vtx2a-F2 vtx2a-R3 vtx2a-R2 | GCGATACTGRGBACTGTGGCC CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GGCCACCTTCACTGTGAATGTG | 754-774 1079-1102 1079-1100 | 349 347 | |
| vtx2b-F1 vtx2b-R1 | AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG | 968-994 1198-1218 | 251 | |
| vtx2c-F1 | GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA | 926-955 | 177 | |

Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S, Denmark.

Phone +45 3268 3334 Fax +45 3268 8238 e-mail fsc@ssi.dk

**WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
*Escherichia and Klebsiella***



| | | | | |
|--|--|-----------------------------------|------------|---|
| vtx2c-R2 | CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA | 1079-1102 | | |
| vtx2d-F1 vtx2d-R1 vtx2d-R2 ** | AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG GCCTGATGCACAGGTACTGGAC | 927-955 1085-1105 1184-1206 | 179 280 | Some <i>vtx2d</i> strains are positive for the small fragment and some for the larger fragment. The control strain C165-02 should be positive for both bands – see Figure 3 |
| vtx2e-F1 vtx2e-R2 | CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT | 695-713 1080-1105 | 411 | |
| vtx2f-F1 vtx2f-R1 | TGGGCGTCATTCAGTGGTTG TAATGGCCGCCCTGTCTCC | 451-475 856-874 | 424 | |
| vtx2g-F1 vtx2g-R1 | CACCGGGTAGTTATATTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT | 203-231 771-793 | 573 | |

Wobble bases are shown in bold.

§ These primers will also detect Shiga toxin genes from *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella sonnei*.

* Triplex PCR for *vtx1* subtyping: 1 µl of each of the four primers for *vtx1c* and *vtx1d* (stock solution of primers is 5 µM) 2 µl of each of two primers for *vtx1a* (stock solution of primers is 5 µM). See Figure 1 for gel picture of fragment sizes.

** One additional primer has been designed to specifically detect the *vtx2d*-O55-5905 variant:

| | | | | |
|-------------|------------------------|-----------|-----|----------------------|
| vtx2d-O55-R | TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG | 1140-1161 | 235 | Not part if this EQA |
|-------------|------------------------|-----------|-----|----------------------|

All three reverse primers in the same reaction will result in amplicons of 179bp with 9 *vtx2d* variants, 235bp with variant *vtx2d*-O55-5905, 280bp with 5 *vtx2d* variants, and finally two amplicons of 179bp and 280bp with variant *vtx2d*-O73-C165-02.

NOTE on the design of primers: VT2a, VT2c and VT2d are very closely related and the design of primers has been quite difficult! We have identified thirty *vtx2a*, twenty-four *vtx2c* and twenty-six *vtx2d* nucleotide variants. The primers that we have designed should be specific for each of their respective variants. However, as we have not tested all these many variants, our design is based on the fact that the primers match all the desired sequences. Furthermore, we have noted that cross-reactions occur and are seen as ghost bands – especially between *vtx2c* and *vtx2d* positive strains. This

Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S, Denmark.

Phone +45 3268 3334 Fax +45 3268 8238 e-mail fsc@ssi.dk

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
Escherichia and Klebsiella



is illustrated in Figure 3. Thus, only very clearly positive bands should be interpreted as indicative of presence of that specific subtype.

Note on the choice of Taq polymerase: During our test phase, we have noted that the (conventional) PCR's are Taq dependent and therefore, **the protocol should be followed exactly as described using the Qiagen HotStart.** HotStarTaq Master Mix Kit comes in three different "sizes" 250U, 1000U and 2500U. Cat.No.s 203443, 203445 and 203446.

It's a pre-made mastermix. You just add template, primers and water.

We have no commercial interest in Qiagen and you are of course welcome to test other Taq polymerases – but we recommend that you do this after you have validated the control strains using the Qiagen HotStart Master Mix Kit.



Figure 1. Gel picture illustrating five strains each of *vtx1a*, *vtx1c* and *vtx1d* positive strains.

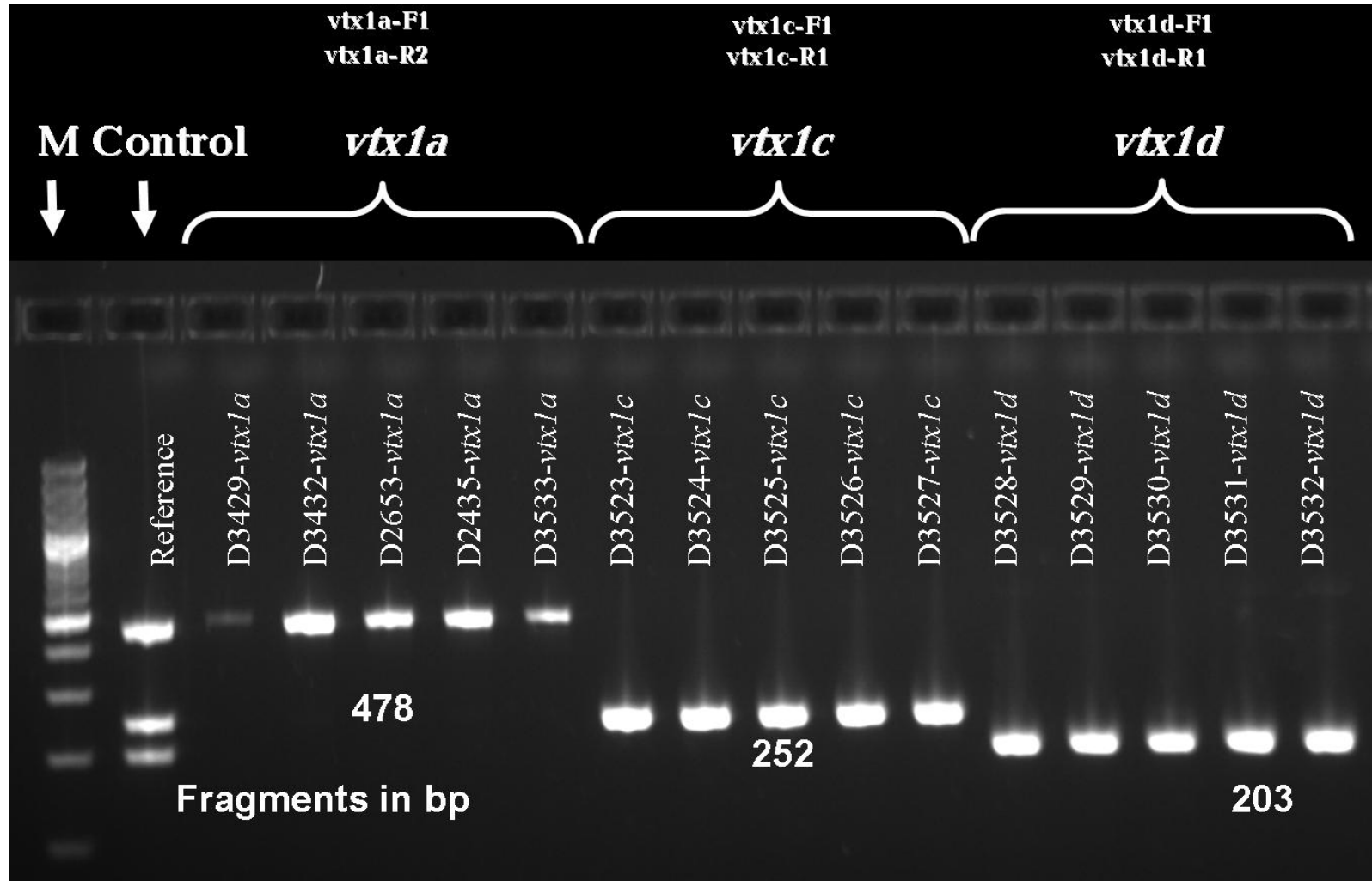
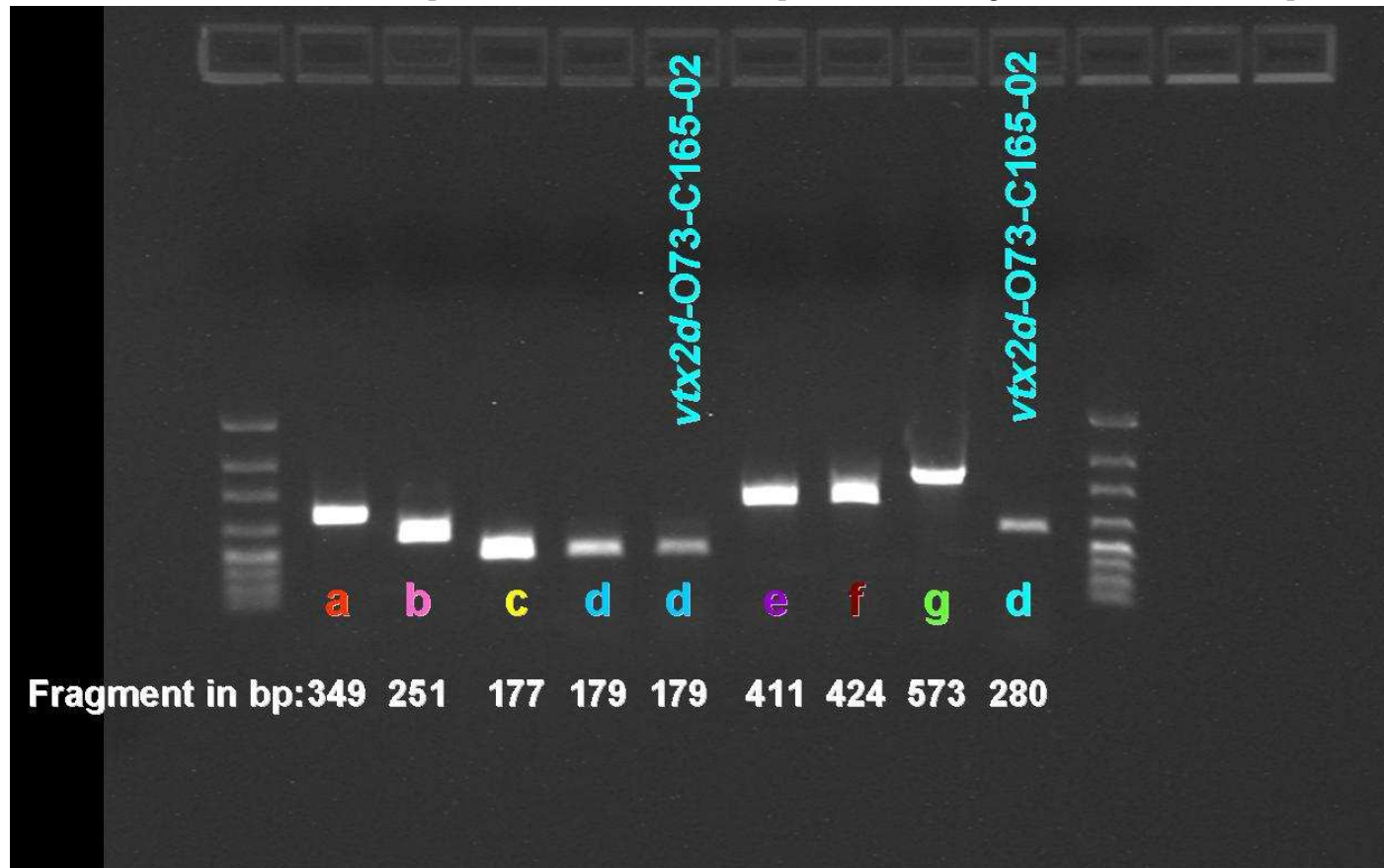




Figure 2. Gel picture illustrating *vtx2a*, *vtx2b*, *vtx2c*, *vtx2d*, *vtx2e*, *vtx2f* and *vtx2g* positive strains.

D3435 (strain C165-02) can be positive with both reverse primers resulting in two bands of 179bp and/or 280bp respectively.



WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
Escherichia and *Klebsiella*

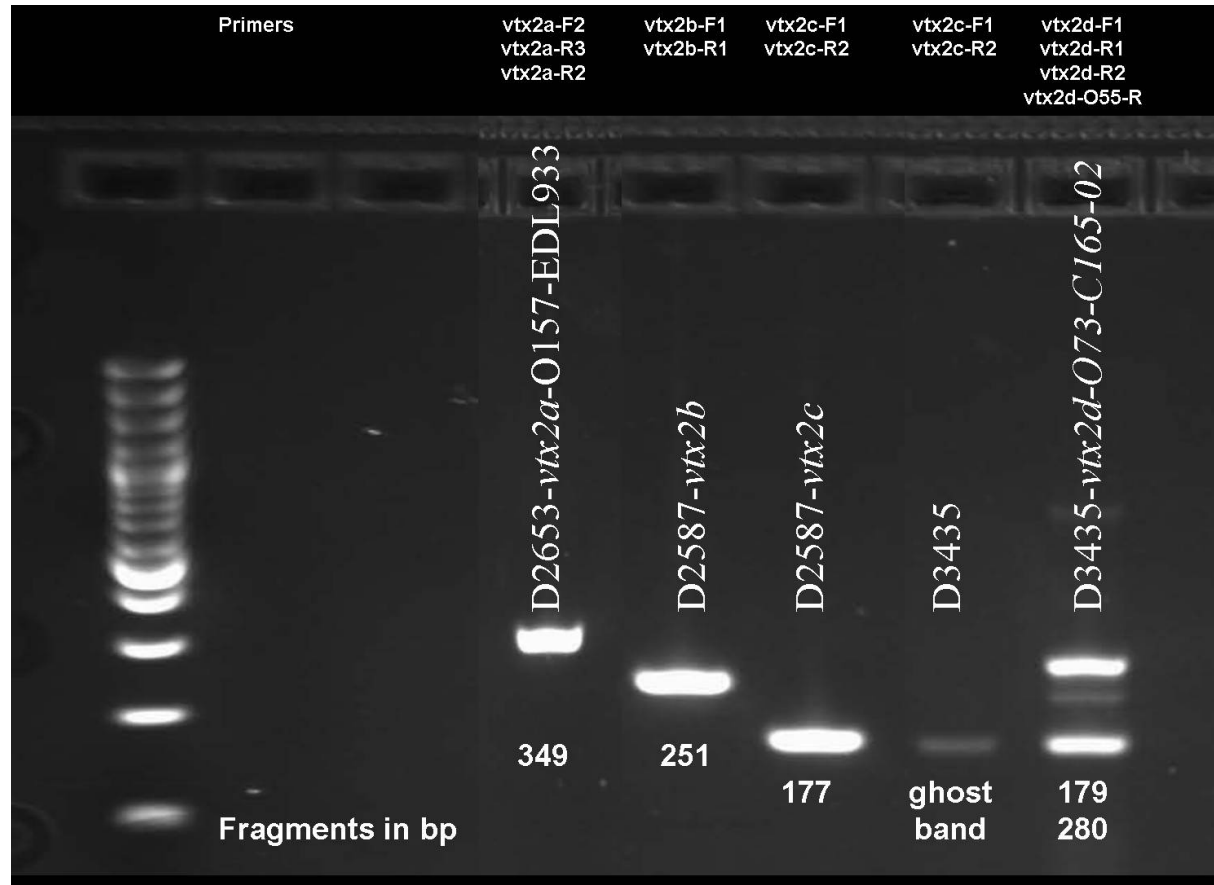


Figure 3. Gel picture illustrating *vtx2a*, *vtx2c* and *vtx2d* positive strains.

D3435 (strain C165-02) is positive with both *vtx2d*-R1 and *vtx2d*-R2 resulting in two bands of 179bp and 280bp, respectively (last lane).

Because of the high degree of similarity between *vtx2c* and *vtx2d* some *vtx2d* positive strains (D3435) also give a weak *vtx2c* ghost band. In order to distinguish between a ghost band and a true *vtx2c* band compare with D2587 (strain 031), which is clearly positive for *vtx2c* (and *vtx2b*).

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
Escherichia and *Klebsiella*



WHO Collaborating Centre for Reference and Research on
Escherichia and *Klebsiella*

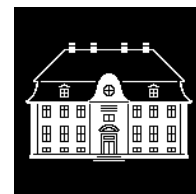


Appendix 2

List of reference strains harbouring the *vtx* gene subtypes

| SSI collection D number | Strain | Control for toxin subtype | Toxin variant designation | GenBank accession No. | Results obtained using the present method |
|-------------------------|---------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|---|
| D2653 | EDL933 | VT1a | VT1a-O157-EDL933 | M19473 | <i>vtx1a</i> + <i>vtx2a</i> |
| D3602 | DG131/3 | VT1c | VT1c-O174-DG131-3 | Z36901 | <i>vtx1c</i> + <i>vtx2b</i> |
| D3522 | MHI813 | VT1d | Stx1d-O8-MHI813 | AY170851 | <i>vtx1d</i> |
| D2435 | 94C | VT2a | VT2a-O48-94C | Z37725 | <i>vtx1a</i> + <i>vtx2a</i> |
| D3428 | EH250 | VT2b | VT2b-O118-EH250 | AF043627 | <i>vtx2b</i> |
| D2587 | 031 | VT2c | VT2c-O174-031 | L11079 | <i>vtx2b</i> + <i>vtx2c</i> |
| D3435 | C165-02 | VT2d | VT2d-O73-C165-02 | DQ059012 | <i>vtx2d</i> |
| D3648 | S1191 | VT2e | VT2e-O139-S1191 | M21534 | <i>vtx2e</i> |
| D3546 | T4/97 | VT2f | VT2f-O128-T4-97 | AJ010730 | <i>vtx2f</i> |
| D3509 | 7v | VT2g | 2g-O2-7v | AY286000 | <i>vtx2g</i> |

* May result in both fragments at 179 bp and 280 bp



Appendix 3

References

O'Brien, A. D., M. A. Karmali, and S. M. Scotland. 1994. A proposal for rationalization of the *Escherichia coli* cytotoxins, p. 147-149. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (eds.), Recent Advances in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infections. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.

Bielaszewska, M., A. W. Friedrich, T. Aldick, R. Schurk-Bulgrin, and H. Karch. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. Clin.Infect.Dis. 43:1160-1167

Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J.Infect.Dis. 185:74-84

Persson, S., K. E. P. Olsen, S. Ethelberg, and F. Scheutz. 2007. Subtyping typing method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. J Clin Microbiol 45:2020-2024

参考資料3

Vtxサブタイプ対応表 Designations of *stx/vtx* genes, their products (Stx/VT)^a, and their previous designations. Table adapted from (31) and (32).

| Toxin subtype ^b <i>stx</i> or <i>vtx</i> | Toxin gene variant designation | Toxin variant designation | Prototype Organisms (reference) | Serotype of prototype organism | GenBank accession No. | Previous designation or synonym for toxin gene | Previous designation or synonym for toxin | |
|--|--|--|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| 1a ^h | <i>stx</i> _{1a-S. dysenteriae-60R} | Stx1a- <i>S. dysenteriae</i> -60R | 60R (16) | <i>S. dysenteriae</i> | X07903 | <i>stx</i> ₁ | Stx1 | |
| | <i>stx</i> _{1a-S. dysenteriae-3818T} | Stx1a- <i>S. dysenteriae</i> -3818T | 3818T (35) | <i>S. dysenteriae</i> | M19437 | | | |
| | <i>stx</i> _{1a-S. sonnei-CB7888} | Stx1a- <i>S. sonnei</i> -CB7888 | CB7888 (3) | <i>S. sonnei</i> | AJ132761 | | | |
| | <i>stx</i> _{1a-O157-EDL933/vtx1b-O157-EDL933} | <i>stx</i> _{1a-O111-PH/vtx1b-O111-PH} <i>stx</i> _{1a-O48-94C/vtx1b-O48-94C} <i>stx</i> _{1a-O111-CB168/vtx1b-O111-CB168} | Stx1b-O157-EDL933/VT1b-O157-EDL933 | EDL933 (23) H-19B (15) H30 (15) | O157:H7 O26:H11 O26:H11 | M19473 M16625 M23980 | <i>slt</i> -I | SLT-I VT1 VT1 |
| | | | Stx1b-O111-PH/VT1b-O111-PH | PH (26) | O111:H- | L04539 | | SLtI/PH |
| | | | Stx1b-O48-94C/VT1b-O48-94C | 94C (24) | O48:H21 | Z36899 | | SLtI/O48 |
| | | | Stx1b-O111-CB168/VT1b-O111-CB168 | CB168 (24) | O111:H- | Z36900 | | SLtI/CB168 |
| | | | | | | | | |
| 1c | <i>stx</i> _{1c-O174-DG131/3/vtx1c-O174-DG131/3} | Stx1c-O174-DG131/3/ VT1c-O174-DG131/3 | DG131/3 (24,40) | O174:H8 | Z36901 | <i>stx</i> _{1c} | | |
| 1d | <i>stx</i> _{1d-ONT-MHI813/vtx1d-ONT-MHI813} | Stx1d-ONT-MHI813/VT1d-ONT-MHI813 | MHI813 (4) | ONT:H19 | AY170851 | <i>stx</i> _{1d} | | |
| 2a | <i>stx</i> _{2a-O157-EDL933/vtx2a-O157-EDL933} <i>stx</i> _{2a-O48-94C/vtx2a-O48-94C} | Stx2a-O157-EDL933/VT2a-O157-EDL933 | EDL933 (23) | O157:H7 | X07865 | <i>stx</i> _{2/vtx2} <i>slt</i> -II | SLT-II | |
| | | Stx2a-O48-94C/VT2a-O48-94C | 94C (25) | O48:H21 | Z37725 | | SLT-II/O48 | |
| 2b | <i>stx</i> _{2b-O174/a-031/vtx2b-O174/a-031} <i>stx</i> _{2b-O111-PH/vtx2b-O111-PH} <i>stx</i> _{2b-O118-EH250/vtx2b-O118-EH250} | Stx2b-O174/a-031/VT2b-O174/a-031 | 031 (27) | O174:H21 | X65949 | <i>stx</i> _{2vOX392} | SLT-II/OX3 / VT2d-OX3a ^d | |
| | | Stx2b-O111-PH/VT2b-O111-PH | PH (25) | O111:H- | L11078 | | <i>stx</i> _{2vO111} | SLT-II/O111 / VT2d-O111 ^d |
| | | Stx2b-O118-EH250/VT2b-O118-EH250 ^c | EH250 (30) | O118:H12 | AF043627 | | Stx2d/VT2d-Ount | |
| 2c | <i>stx</i> _{2c-O157-E32511/vtx2c-O157-E32511} | Stx2c-O157-E32511/VT2c-O157-E32511 | E32511 (34) | O157:H- | M59432 | <i>stx</i> _{2c/vtx2c} | Stx2v/VT2v | |

| Toxin subtype ^b <i>stx</i> or <i>vtx</i> | Toxin gene variant designation | Toxin variant designation | Prototype Organisms (reference) | Serotype of prototype organism | GenBank accession No. | Previous designation or synonym for toxin gene | Previous designation or synonym for toxin |
|--|---|--|---|---|--|--|---|
| | <i>stx</i> _{2c} -O157-FLY16/ <i>vtx</i> _{2c} -O157-FLY16 <i>stx</i> _{2c} -O157-C394-03/ <i>vtx</i> _{2c} -O157-C394-03 <i>stx</i> _{2c} -O157-TK-51/ <i>vtx</i> _{2c} -O157-TK-51 <i>stx</i> _{2c} -O174/b-031/ <i>vtx</i> _{2c} -O174/b-031 <i>stx</i> _{2c} -O22-KY-O19/ <i>vtx</i> _{2c} -O22-KY-O19 | Stx2c-O157-FLY16/VT2c-O157-FLY16 Stx2c-O157-C394-03/VT2c-O157-C394-03 Stx2c-O157-TK-51/VT2c-O157-TK-51 Stx2c-O174/b-031/VT2c-O174/b-031 Stx2c-O22-KY-O19/VT2c-O22-KY-O19 | FLY16 (11) C394-03 (29) TK-51 (19) 031 (28) KY-O19 (19) | O157:H- O157:H- O157:H7 O174:H21 O22:H- | AB015057 DQ235774 SNS ^g L11079 SNS ^g | <i>slt</i> -IIc <i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2vOX393} | SLTIIc VT2v(pKTN1050) =Stx2vhd ? ^g SLT-II/OX3/2 / VT2d-OX3/2 ^d VT2v(pKTN1054) = Stx2vhc ? ^g |
| 2d ^d | <i>stx</i> _{2d} / <i>vtx</i> _{2d} <i>stx</i> _{2d} -O91/a-B2F1/ <i>vtx</i> _{2d} -O91/a-B2F1 <i>stx</i> _{2d} -O91/a-B2F1 / <i>vtx</i> _{2d} -O91/b-B2F1 <i>stx</i> _{2d} -O157-7279 / <i>vtx</i> _{2d} -O157-7279 <i>stx</i> _{2d} -O73-C165-03/ <i>vtx</i> _{2d} -O73-C165-03 <i>stx</i> _{2d} -O8- C466-01B/ <i>vtx</i> _{2d} -O8- C466-01B | Stx2d/VT2d Stx2d-O91/a-B2F1/VT2d-O91/a-B2F1 Stx2d-O91/b-B2F1/VT2d-O91/b-B2F1 Stx2d-O157-7279/VT2d-O157-7279 Stx2d-O73-C165-03/VT2d-O73-C165-03 Stx2d-O8-C466-01B/VT2d-O8-C466-01B | B2F1 (10) B2F1 (10) B2F1 (10) 7279 (21) C165-03 (29) C466-01B (29) | O91:H21 O91:H21 O91:H21 O157:H7 O73:H18 O8:H19 | AF479828 AF479829 X61283 DQ059012 DQ235775 | <i>stx</i> _{2vha} / <i>vtx</i> _{2vha} <i>stx</i> _{2d1} / <i>vtx</i> _{2d1} <i>stx</i> _{2ha} <i>stx</i> _{2vhb} / <i>vtx</i> _{2vhb} <i>stx</i> _{2d2} / <i>vtx</i> _{2d2} <i>stx</i> _{2hb} <i>stx</i> _{2vhc} (<i>vtx</i> _{2d3}) | SLT-IIvh Stx2vha/VT2vha Stx2d1/VT2d1 Stx2vh-a/VT2vh-a VT2v-a SLT-IIvha Stx2vhb/VT2vhb Stx2vh-b/VT2vh-b Stx2d1/VT2d1 VT2v-b SLT-IIvhb Stx2vhc |

| Toxin subtype ^b <i>stx</i> or <i>vtx</i> | Toxin gene variant designation | Toxin variant designation | Prototype Organisms (reference) | Serotype of prototype organism | GenBank accession No. | Previous designation or synonym for toxin gene | Previous designation or synonym for toxin |
|--|--|--|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------|---|---|
| 2e | <i>stx</i> _{2e} -O139-412/ <i>vtx</i> _{2e} -O139-412 | Stx _{2e} -O139-412/VT _{2e} -O139-412 | 412 (9) | O139:K12:H1 | M36727 | <i>slt</i> -IIv | SLT-IIv |
| | <i>stx</i> _{2e} -O139-S1191/ <i>vtx</i> _{2e} -O139-S1191 | Stx _{2e} -O139-S1191/ VT _{2e} -O139-S1191 | S1191 (38) | O139:H1 | M21534 | <i>slt</i> -IIva <i>slt</i> -IIe | SLT-IIva ^e SLTIIe/VTe VT2vp VT2vp1 |
| | <i>stx</i> _{2e} -ONT-26725-97/ <i>vtx</i> _{2e} -ONT-26725-97 | Stx _{2e} -ONT-26725-97/VT _{2e} -ONT-26725-97 | 26725-97 (39) | ONT:H- | AJ567998 | | |
| | <i>stx</i> _{2e} -O101-E-D43/ <i>vtx</i> _{2e} -O101-E-D43 | Stx _{2e} -O101-E-D43/ VT _{2e} -O101-E-D43 | E-D43 (6) | O101:H14 | X81417 | | |
| 2f ^f | <i>stx</i> _{2f} -O128-H.I.8/ <i>vtx</i> _{2f} -O128-H.I.8 | Stx _{2f} -O128-H.I.8/VT _{2f} -O128-H.I.8 | H.I.8 (7) | O128:H2 | M29153 | <i>stx</i> _{2ev} / <i>vtx</i> _{2ev} <i>slt</i> -IIvhc <i>slt</i> -IIId ^d | Stx _{2ev} /VT _{2ev} Stx _{2vp2} /VT _{2vp2} VTev SLTIIvhc SLT-IIId/VT2d ^d SLTIIva |
| | <i>stx</i> _{2f} -O128-T4/97/ <i>vtx</i> _{2f} -O128-T4/97 | Stx _{2f} -O128- T4/97/VT _{2f} -O128- T4/97 | T4/97 (33) | O128:H2 | AJ010730 | | |
| 2g | <i>stx</i> _{2g} -O2-7v/ <i>vtx</i> _{2g} -O2-7v | Stx _{2g} -O2-7v/ VT _{2g} -O2-7v | 7v (17) | O2:H25 | AY286000 | | |
| 2h | <i>stx</i> _{2h} -Out-S-8/ <i>vtx</i> _{2h} -Out-S-8 | Stx _{2h} -Out-S-8/ VT _{2h} -Out-S-8 | S-8 (1) | Out:H25 | AB048227 | | |

^a Data compiled from references (2,4,5,7,10,12-14,18,19,36,37,40)

^b Toxin types are defined according to antigenic variability, differences in toxicity for tissue culture cells and/or animals, their capacity to be activated by mouse elastase and differences in DNA or amino acid sequences.

^c Stx₂-O118/VT₂-O118 - formerly known as VT_{2d}-Ount (30) - is expected to be non-activatable based on analysis of the nucleotide sequence (Denis Piérard and Angela Melton-Celsa; unpublished); The original strain has been retyped as O118:H12 (Lothar Beutin and Flemming Scheutz, unpublished)

- ^d There are several toxins suffixed by “d” in the literature: The Stx2d/VT2d toxins of O91:H21 (20), the VT2d (= *stx*₂-Ogroup/ strain designation and/or year) variants by Paton *et al.*(25-27,30) and the SLT-IIId/VT2d (= Stx2f/VT2f) toxin produced by strain H.I.8 (serotype O128:H2) as proposed by Gyles (8). We support the use of the “d” designation for activatable Stx2/VT2 toxins as proposed by Melton-Celsa *et al.* (20).
- ^e This designation has also been referred to for the Stx2f/VT2f toxin produced by strain H.I.8 (serotype O128:H2).
- ^f The nucleotide sequence of the former *stx*_{2ev}/*vtx*_{2ev} of strain H.I.8 (serotype O128:H2) is nearly identical to the recently published *stx*_{2f}/*vtx*_{2f} found in strain T4/97 (serotype O128:H2) from feral pigeons (33). As its nucleotide sequence is distinctly different from those of the other Stx2/VT2 toxins and variants as well as Stx1/VT1, we support the proposal of renaming *stx*_{2ev}/*vtx*_{2ev} as *stx*_{2f}/*vtx*_{2f}.
- ^g NS: Sequence not submitted to GenBank. Sequence used by Nakao (22) as Stx2vhc(Lin) & Stx2vhd.
- ^h Stx1a/*stx*1a nomenclature is reserved for Shiga toxin from *Shigella* spp.

Reference List

1. **Asakura, H., S. I. Makino, H. Kobori, M. Watarai, T. Shirahata, T. Ikeda, and K. Takeshi.** 2001. Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (Stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals. *Epidemiol Infect* **127**:27-36.
2. **Bastian, S. N., I. Carle, and F. Grimont.** 1998. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res.Microbiol.* **149**:457-472.
3. **Beutin, L., E. Strauch, and I. Fischer.** 1999. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *Lancet* **353**:1498.
4. **Bürk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bülte, and E. Märklbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J.Clin.Microbiol.* **41**:2106-2112.
5. **Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, T. J. Barrett, J. B. Kaper, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth.** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62**:118-119.
6. **Franke, S., D. Harmsen, A. Caprioli, D. Piérard, L. H. Wieler, and H. Karch.** 1995. Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J.Clin.Microbiol.* **33**:3174-3178.
7. **Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri, and C. L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J.Gen.Microbiol.* **136**:1125-1135.
8. **Gyles, C. L.** 1994. *Escherichia coli* Verotoxins and Other Cytotoxins, p. 365-398. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford.
9. **Gyles, C. L., S. A. De Grandis, C. MacKenzie, and J. L. Brunton.** 1988. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microb.Pathogen.* **5**:419-426.
10. **Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with hemolytic uremic syndrome. *Microb.Pathogen.* **8**:47-60.

11. **Iwasa, M., S. Makino, H. Asakura, H. Kobori, and Y. Morimoto.** 1999. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan. *J Med Entomol.* **36**:108-112.
12. **Johnson, W. M., S. D. Tyler, G. Wang, and H. Lior.** 1991. Amplification by the polymerase chain reaction of a specific target sequence in the gene coding for *Escherichia coli* verotoxin (VTe variant). *FEMS Microbiol.Lett.* **68**:227-230.
13. **Karmali, M. A., C. A. Lingwood, M. Petric, J. Brunton, and C. Gyles.** 1996. Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins. *ASM News* **62**:167-169.
14. **Kokai-Kun, J. F., A. R. Melton-Celsa, and A. D. O'Brien.** 2001. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J Biol Chem* **275**:3713-3721.
15. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **18**:775-779.
16. **Kozlov, Y., A. A. Kabishev, E. V. Lukyanov, and A. A. Bayev.** 1988. The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin. *Gene* **67**:213-221.
17. **Leung, P. H. M., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol* **69**:7549-7553.
18. **Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda.** 1993. Detection of Various Variant Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by Polymerase Chain Reaction. *Microbiol.Immunol.* **37**:543-548.
19. **Lin, Z., S. Yamasaki, H. Kurazono, M. Ohmura, T. Karasawa, T. Inoue, S. Sakamoto, T. Suganami, T. Takeoka, Y. Taniguchi, and Y. Takeda.** 1993. Cloning and Sequencing of 2 New Verotoxin-2 Variant Genes of *Escherichia coli* Isolated from Cases of Human and Bovine Diarrhea. *Microbiol.Immunol.* **37**:451-459.
20. **Melton-Celsa, A. R. and A. D. O'Brien.** 1998. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-128. *In* J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains.
21. **Meyer, T., H. Karch, J. Hacker, H. Bocklage, and J. Heesemann.** 1992. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. *Zentralbl.Bakteriol.* **276**:176-188.

22. **Nakao, H., K. Kimura, H. Murakami, T. Maruyama, and T. Takeda.** 2002. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunol.Med Microbiol* **34**:289-297.
23. **O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal.** 1984. Shiga-Like Toxin-Converting Phages from *Escherichia coli* Strains That Cause Hemorrhagic Colitis or Infantile Diarrhea. *Science* **226**:694-696.
24. **Paton, A. W., L. Beutin, and J. C. Paton.** 1995. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* shiga-like toxin type-I operons. *Gene* **153**:71-74.
25. **Paton, A. W., A. J. Bourne, P. A. Manning, and J. C. Paton.** 1995. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric shiga-like toxin type II operons. *Infect.Immun.* **63**:2450-2458.
26. **Paton, A. W., J. C. Paton, P. N. Goldwater, M. W. Heuzenroeder, and P. A. Manning.** 1993. Nucleotide Sequence of a Variant Shiga-Like Toxin Type-I Operon of *Escherichia coli* O111:H-. *Gene* **129**:87-92.
27. **Paton, A. W., J. C. Paton, M. W. Heuzenroeder, P. N. Goldwater, and P. A. Manning.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microb.Pathogen.* **13**:225-236.
28. **Paton, A. W., J. C. Paton, and P. A. Manning.** 1993. Polymerase Chain Reaction Amplification, Cloning and Sequencing of Variant *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Type-II Operons. *Microb.Pathogen.* **15**:77-82.
29. **Persson, S., K. E. P. Olsen, S. Ethelberg, and F. Scheutz.** 2006. Novel typing method for *Escherichia coli* Verocytotoxin 2 variants and correlations to clinical manifestations. In prep .
30. **Piérard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-Subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J.Clin.Microbiol.* **36**:3317-3322.
31. **Scheutz, F., L. Beutin, D. Piérard, and H. R. Smith.** 2001. Nomenclature of Verocytotoxins, p. 447-452. In G. Duffy, P. Garvey, and D. A. McDowell (eds.), Verocytotoxigenic *E. coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, Connecticut, USA.
32. **Scheutz, F. and N. A. Strockbine.** 2005. *Escherichia*, p. 607-624. In G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.

33. **Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**:1205-1208.
34. **Schmitt, C. K., M. L. Mckee, and A. D. O'Brien.** 1991. Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H⁻ strain E32511. *Infect.Immun.* **59**:1065-1073.
35. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J.Bacteriol.* **170**:1116-1122.
36. **Takeda, Y., H. Kurazono, and S. Yamasaki.** 1993. Vero Toxins (Shiga-Like Toxins) Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-Producing *E. coli*). *Microbiol.Immunol.* **37**:591-599.
37. **Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, and K. R. Rozee.** 1991. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J.Clin.Microbiol.* **29**:1339-1343.
38. **Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J.Bacteriol.* **170**:4223-30.
39. **Zhang, W., M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Kuczius, and H. Karch.** 2005. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol* **71**:558-561.
40. **Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J.Clin.Microbiol.* **40**:1441-1446.