

EHEC MLVAについて

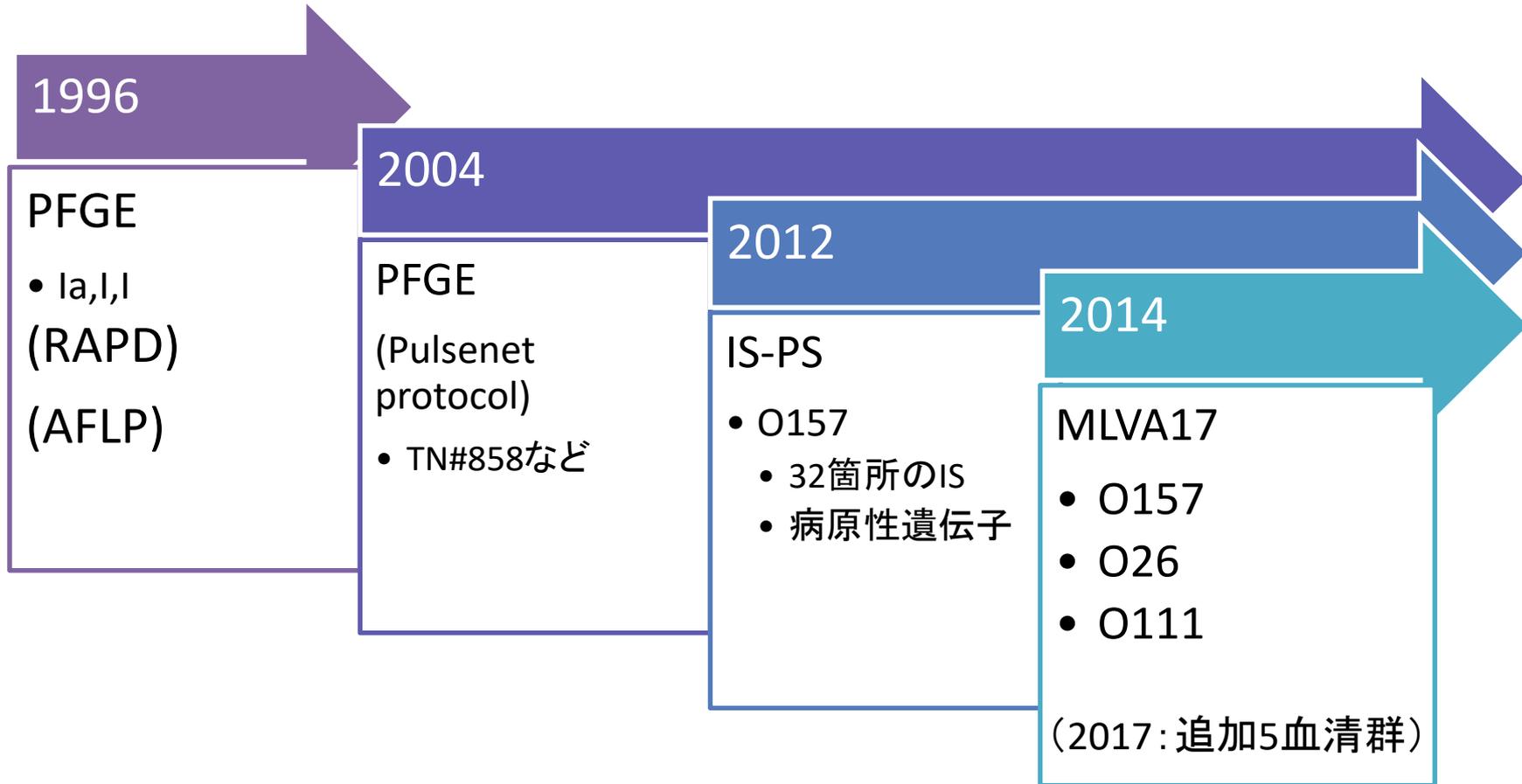
衛生微生物技術協議会第39回研究会

—大腸菌リファレンス会議

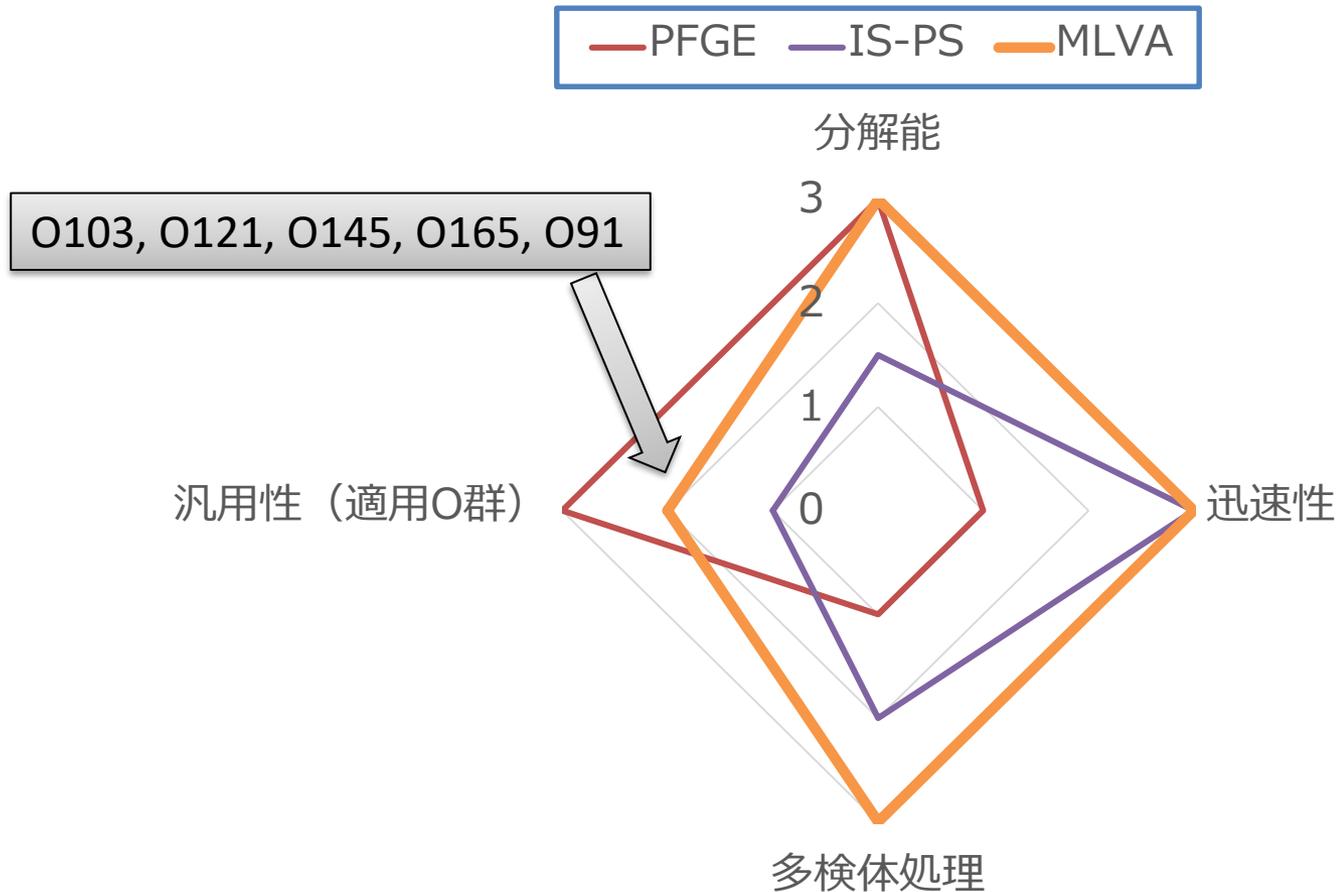
国立感染症研究所細菌第一部

泉谷秀昌、伊豫田 淳

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学解析手法



EHEC分子疫学解析法



(多検体処理能力はラボ環境に依存)

MLVA17 遺伝子座について

Reaction mix 1

<i>O157-34</i>	<i>EHC-1</i> (SVL-3*)	<i>EHC-2</i> (SVL-1*)	<i>O157-9</i> (SVL-2*)	<i>EHC-5</i>	<i>O157-3</i>	<i>O157-25</i>	<i>EH111-8</i>	<i>EH157-12</i>
----------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------	---------------	----------------	----------------	-----------------

9か所

Reaction mix 2

<i>EH111-14</i> (SVL-7*)	<i>EH111-11</i>	<i>O157-17</i>	<i>O157-10</i>	<i>O157-36</i>	<i>O157-19</i>	<i>EHC-6</i> (SVL-12*)	<i>O157-37</i> (SVL-11*)	<i>EH26-7</i>
-----------------------------	-----------------	----------------	---------------------------	----------------	----------------	---------------------------	-----------------------------	---------------

9(8)か所

CDC(O157) : 8か所
PNJ(2014年4月～) : 17か所

(Izumiya, et al., Microbiol Immunol. 54, 569-577, 2010.)

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125, 70-80, 2016.)

MLVA43 追加遺伝子座について

追加5血清群用 (O103, O121, O145, O165, O91)

Reaction mix q1

q1701 q1702 q1705 q1708 q1710 q1712 q1716 q1724 q1725 q1726 q1727 q1730 q1731
(SVL-5*) (SVL-6*)

13か所

Reaction mix q2

q1704 q1707 q1711 q1714 q1715 q1717 q1718 q1720 q1721 q1722 q1723 q1728 q1729
(SVL-23*)

13か所

17か所 + 26か所 ⇒ 43か所

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125: 70-80, 2016)

MLVA型表記

	MLVA型
O157	18m0xxx
O26	18m2xxx
O111	18m3xxx
O103	18m4xxx
O121	18m5xxx
O145	18m6xxx
O165	18m7xxx
O91	18m8xxx

型数及びDiversity Indexの比較 (2017年株)

MLVA17	株数	型数	SID
O157	1668	608	0.973
O26	710	256	0.986
O111	135	55	0.924

MLVA43	株数	型数	SID
O103	146	46	0.910
O121	78	33	0.957
O145	45	20	0.871
O165	8	8	1
O91	42	34	0.988

2017年広域株(5機関以上、株数上位12)

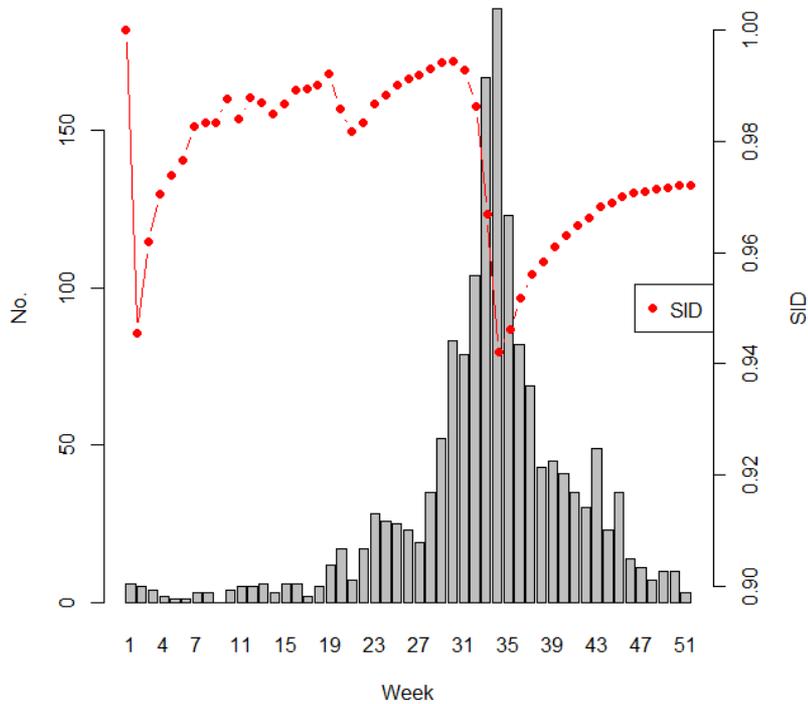
	O群	VT型	株数	機関	コンプレックス	関連事例
17m0121	O157	VT2	258	35	17c013	ポテトサラダ
17m2005	O26	VT1	39	20	17c201	
17m0210	O157	VT1+VT2	33	15	17c027	介護福祉施設
17m0129	O157	VT1+VT2	25	16	17c044	焼肉食中毒
13m2040	O26	VT1	22	6	17c213	保育園
17m0144	O157	VT2	21	8	17c013	
17m0212	O157	VT1+VT2	17	6	17c028	
16m0039	O157	VT1+VT2	17	9	17c050	
17m0351	O157	VT1+VT2	16	9		
17m0104	O157	VT1+VT2	15	7		
16m6009	O145	VT2	15	6		事業所弁当
17m0143	O157	VT1+VT2	15	6	17c027	

MLVA-SIDについて

2017年O157

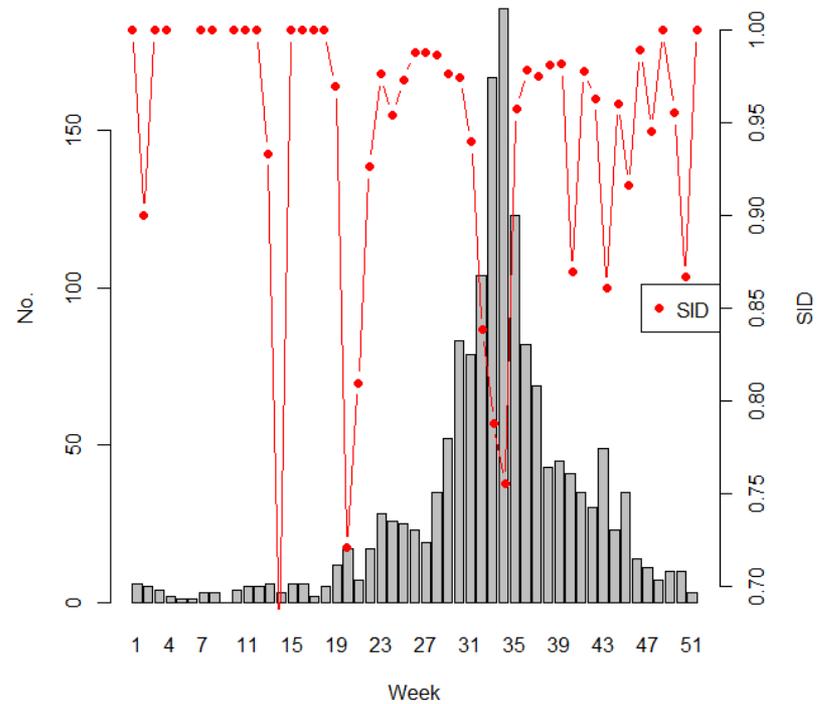
累計

O157 (2017)

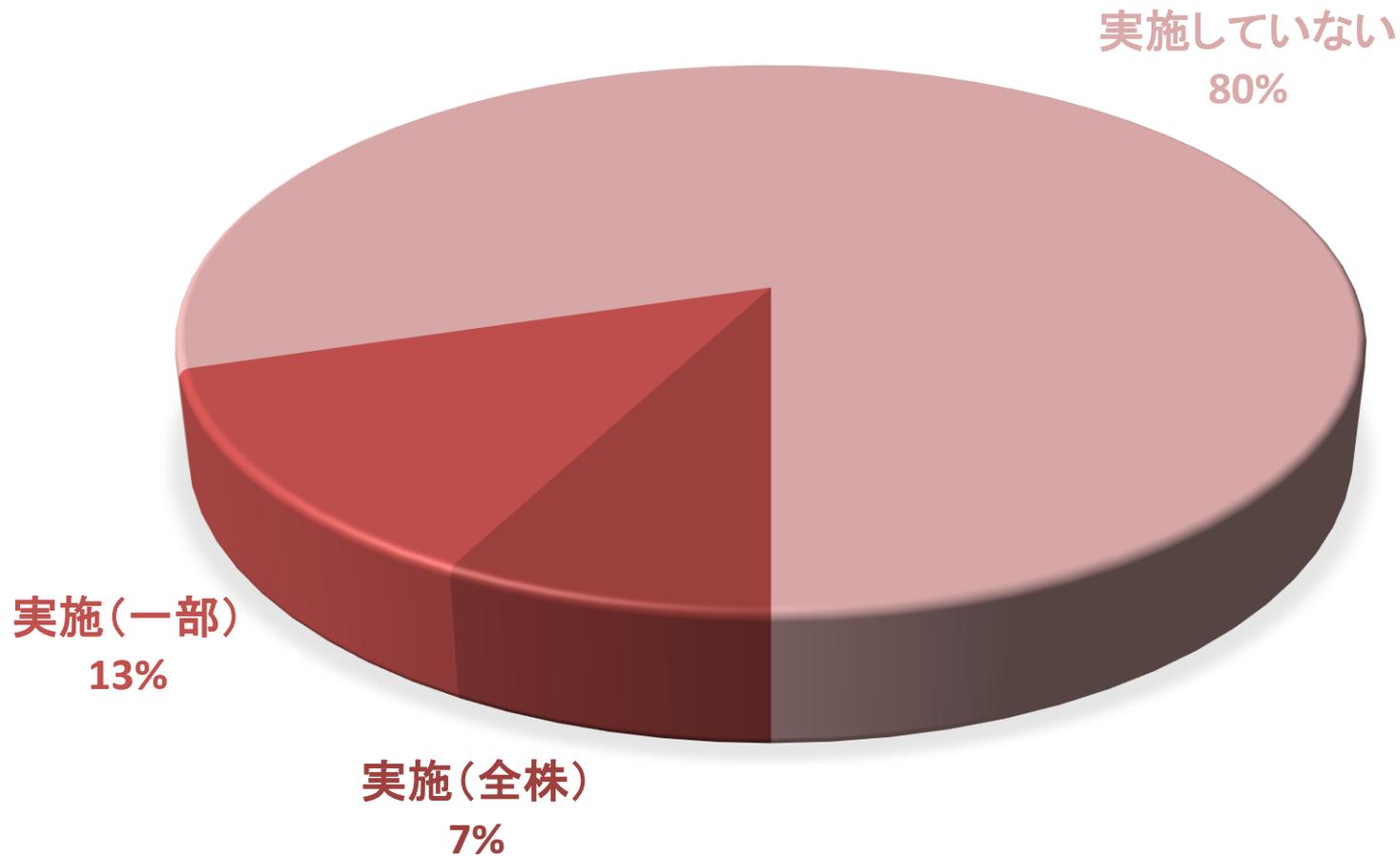


週計

O157 (2017)



MLVA実施状況(2017年)



平成29年11月以後

腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめ

平成 29 年 11 月 17 日

医薬・生活衛生局食品監視安全課
健康局結核感染症課

- 遺伝子型別としてMLVA法に統一へ
 - 健感発0208第1号
(薬生食監発0208第1号)平成30年2月8日
 - MLVA17
- 2018年3月に研修会

18c000(あるいは18m0000) ZZZ県

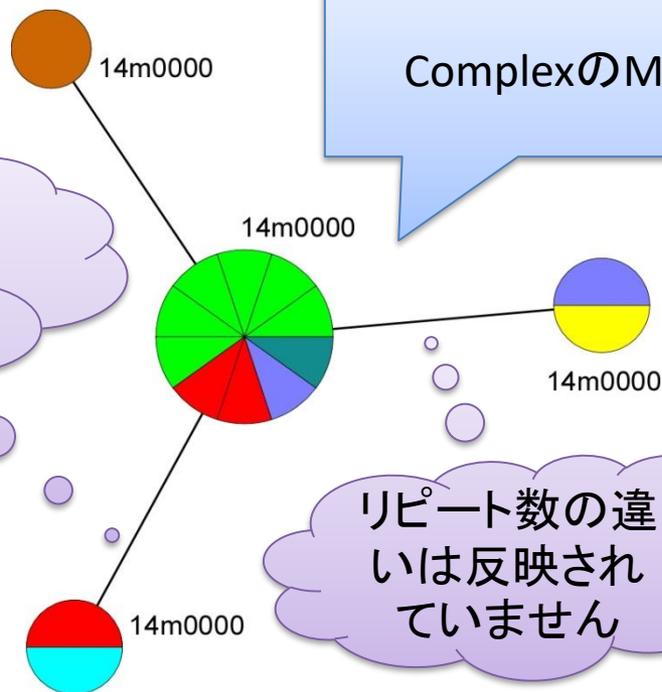
型名もしくはComplex名
都道府県名

Key	date	source	MLVA Type	MLVA Comp
■ co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
■ co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
■ co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
■ co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
■ co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000

該当菌株
菌株番号、分離日、機関、型名、Complex名
【機関で色分け】

線の長さは
異なる遺伝子座の
数を表します

ComplexのMST



リピート数の違
いは反映され
ていません

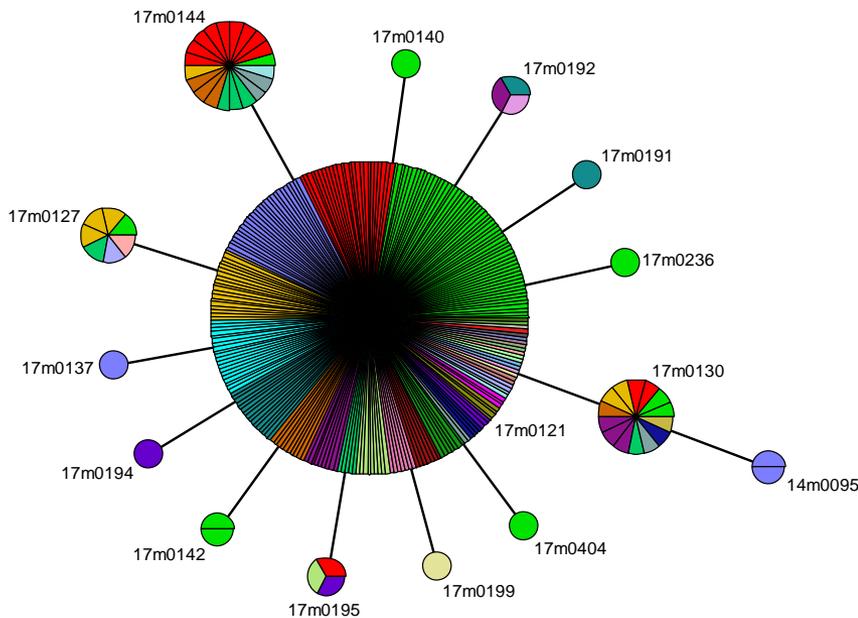
現在(過去1-2か月以内)発生中の集発の一部と考えられます。
追加情報等ございましたらお知らせください。

送付MLVAデータ由来について
は"co"がつきません

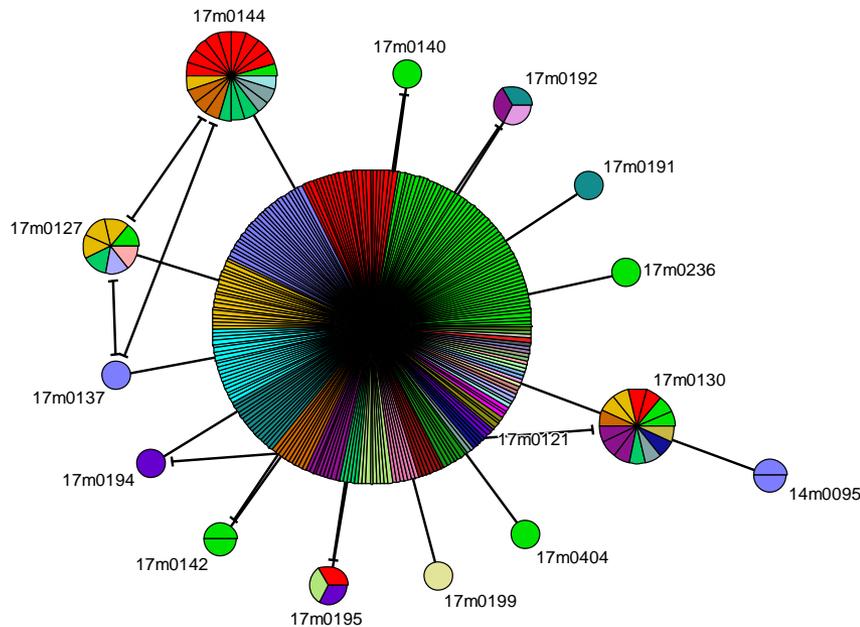
コメント(参考)

回覧している Minimum Spanning Treeについて

- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - 線の角度の意味はない



回覧している Minimum Spanning Treeについて



- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - Single locus variantがわかるように、クロスリンクを付加している
 - 「⊥」で区別

MLVAフローチャート 操作

鋳型DNA

- 菌株培養
- DNA抽出

PCR

- マルチプレックスPCR 2種類(8血清群)+2種類(追加5血清群)
- 産物の希釈(HiDi Formamideで)

電気泳動

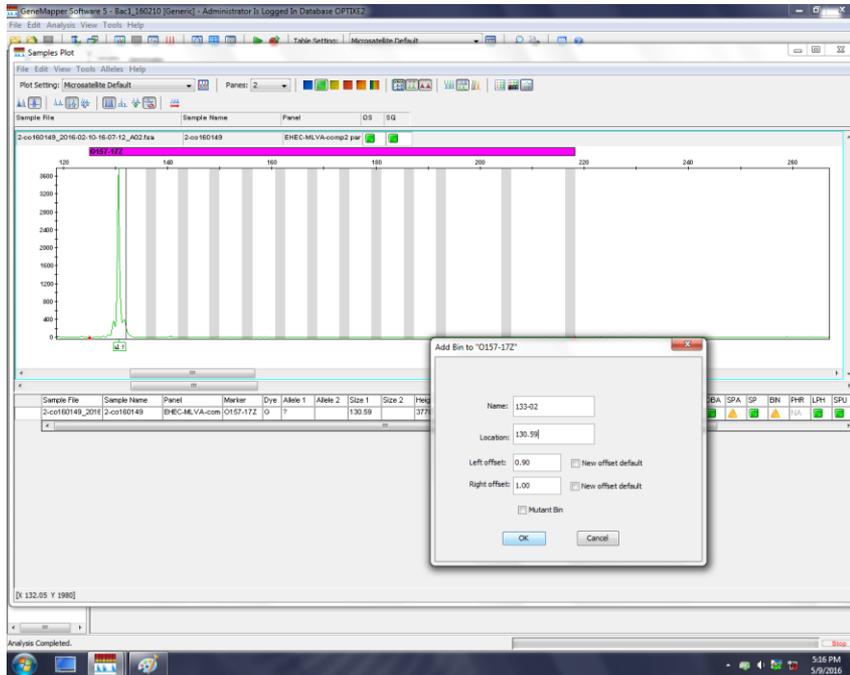
- シークエンサー
- GeneScanサイズマーカー

解析

- ピーク検出
- リポート数への変換

Genemapperのパネル・
bin設定ファイル

Binの修正



- 機器によってBinの位置を修正する必要があります。
- Samples Plot画面等で修正してください。
- 全てのピーク位置をカバーしているわけではありませんので、Binの追加が必要な場合があります。

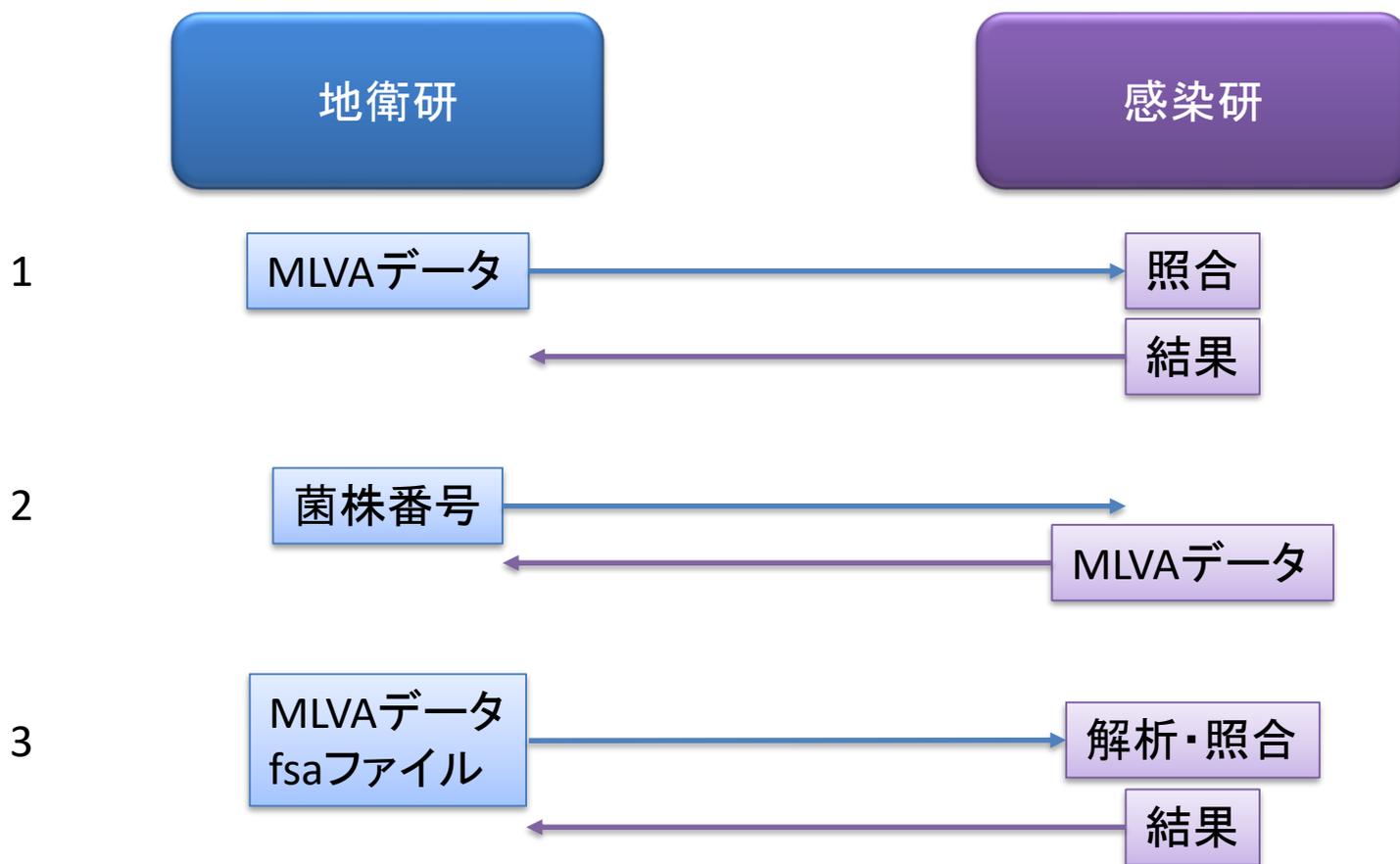
MLVA精度管理

- 菌株もしくはDNAを配布
 - 結果を送付→判定
- 感染研に送付(済み)の菌株について、データを照合

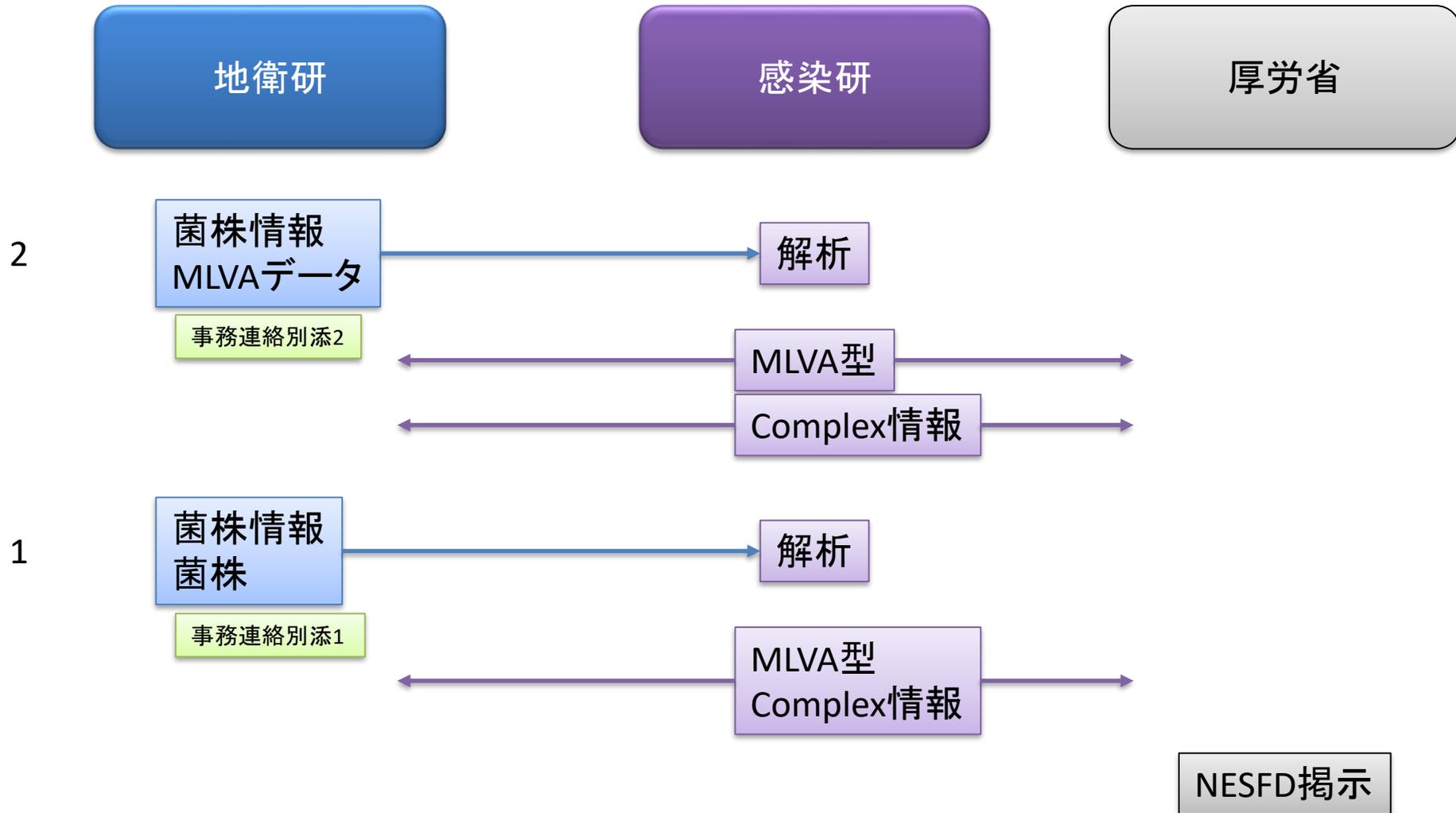
	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

MLVAデータ照合について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6



送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)



厚労省事務連絡後の菌株送付について

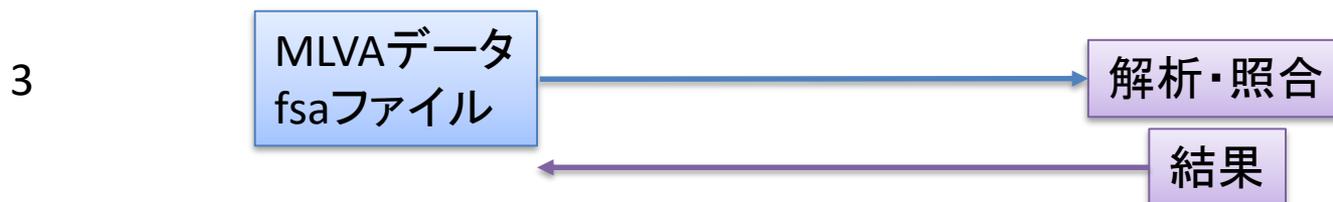
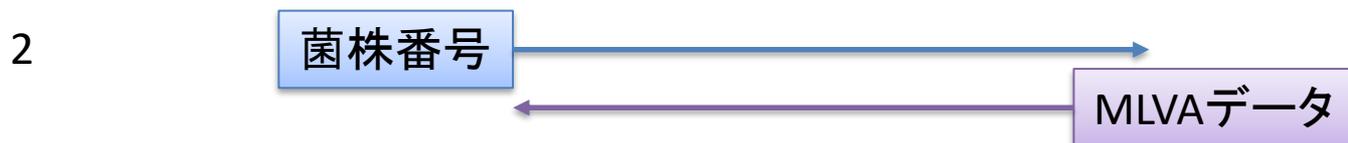
- 地衛研でMLVAを実施した菌株については菌株を送る必要はありませんが、結果の精度確認をする必要があります。最初にMLVAデータを送るにあたり、昨年もしくは今年の株でリピート数の答え合わせをしてください。
- MLVAデータとともに菌株を送付していただければ、毎回答え合わせをすることが可能です。（こちらの方が望ましい。菌株送付は後日で構いません。）

MLVAデータ精度確認について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

地衛研

感染研



お知らせ

- 7月以後は2018年株のみと比較を行います。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。