

レファレンスセンター等関連会議「大腸菌」 9:50-10:50

本日の発表内容

1) EHECのMLVAについて

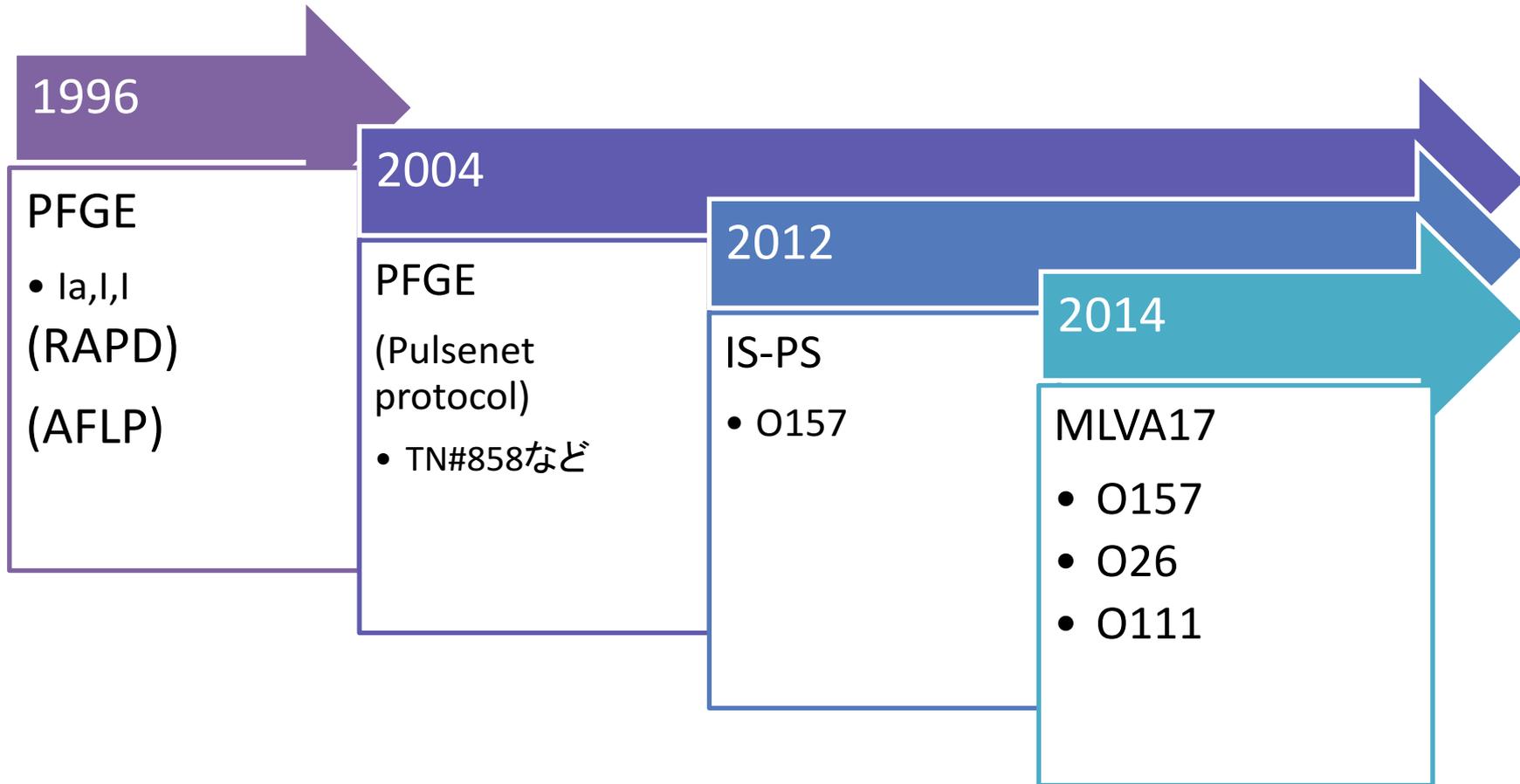
感染研・細菌I部
泉谷 秀昌

- 2) ①大腸菌のO-/H-genotyping PCR について
②精度管理用菌株の配布について

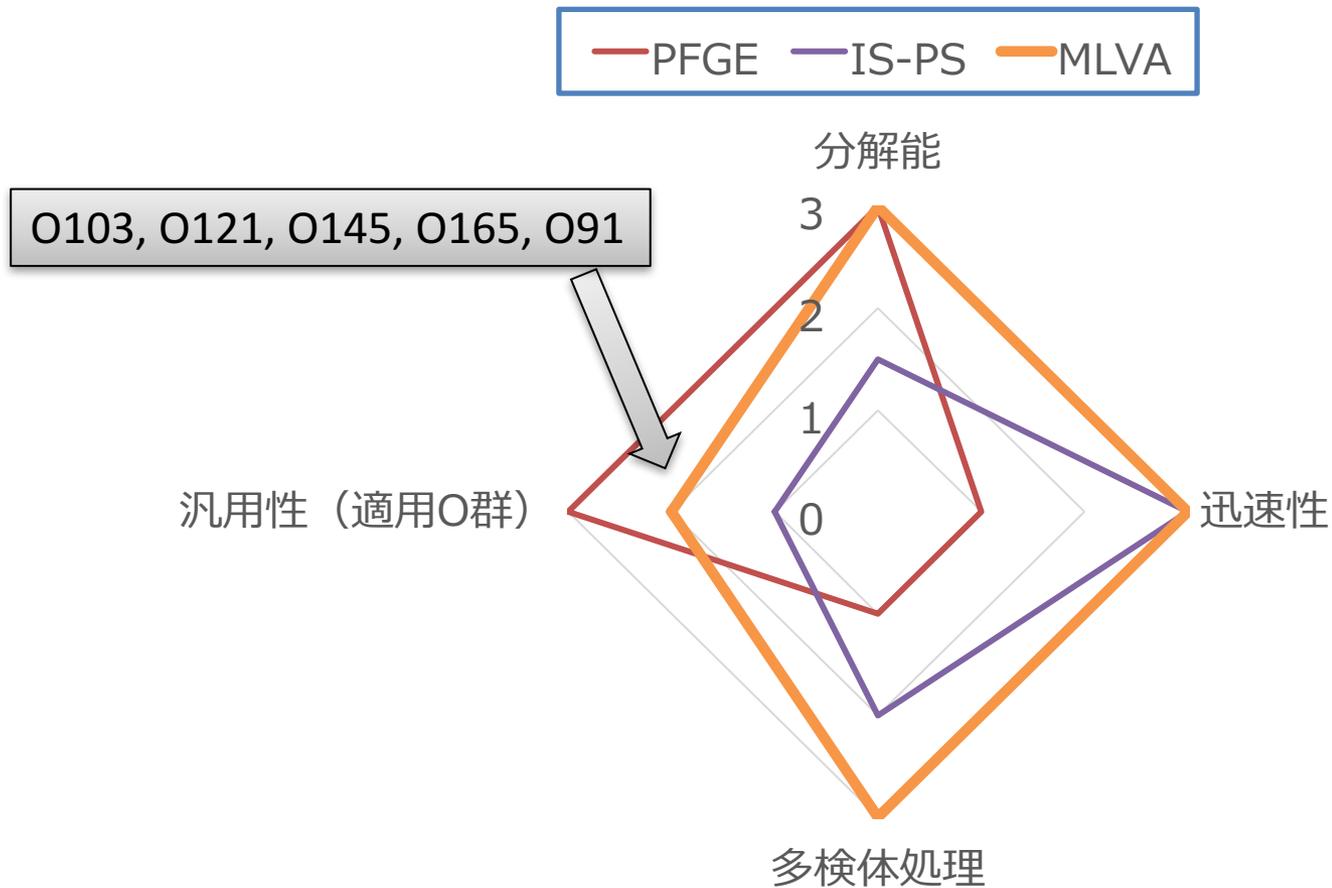
感染研・細菌I部
伊豫田 淳

1) EHECのMLVAについて

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学的解析手法



EHEC分子疫学解析法



(多検体処理能力はラボ環境に依存)

MLVA遺伝子座について

Reaction mix 1

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

9か所

Reaction mix 2

EH111-14 *EH111-11* *O157-17* ~~*O157-10*~~ *O157-36* *O157-19* *EHC-6* *O157-37* *EH26-7*
(SVL-7*) (SVL-12*) (SVL-11*)

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.)

追加遺伝子座について

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)

型数及びDiversity Indexの比較 (主に2016年株)

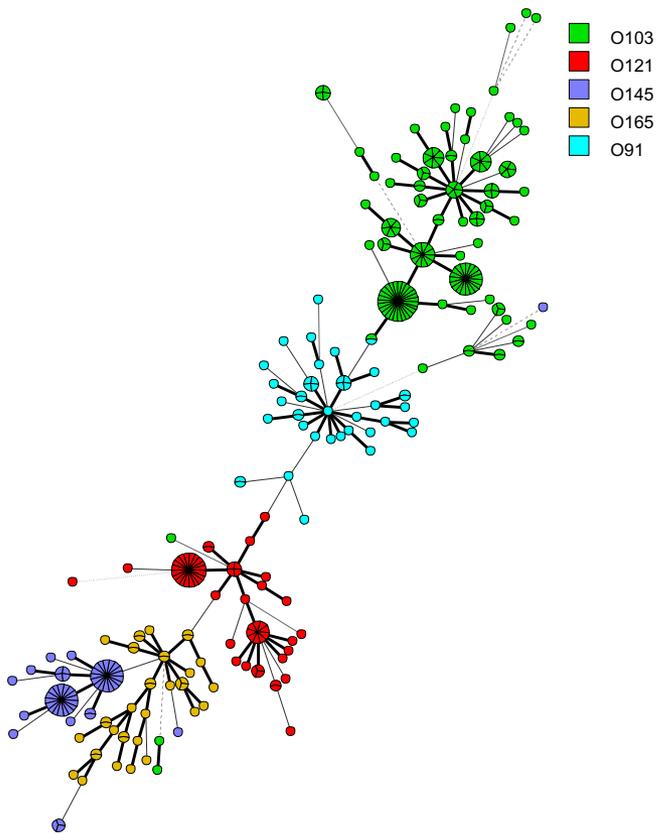
	株数	型数		SID	
		MLVA17	MLVA43	MLVA17	MLVA43
O103	159	55	66	0.945	0.959
O121	58	24	34	0.857	0.912
O145	52	14	23	0.787	0.913
O165	37	27	33	0.983	0.994
O91	43	33	38	0.982	0.993

参考)3大血清群(IASR, 2016年)

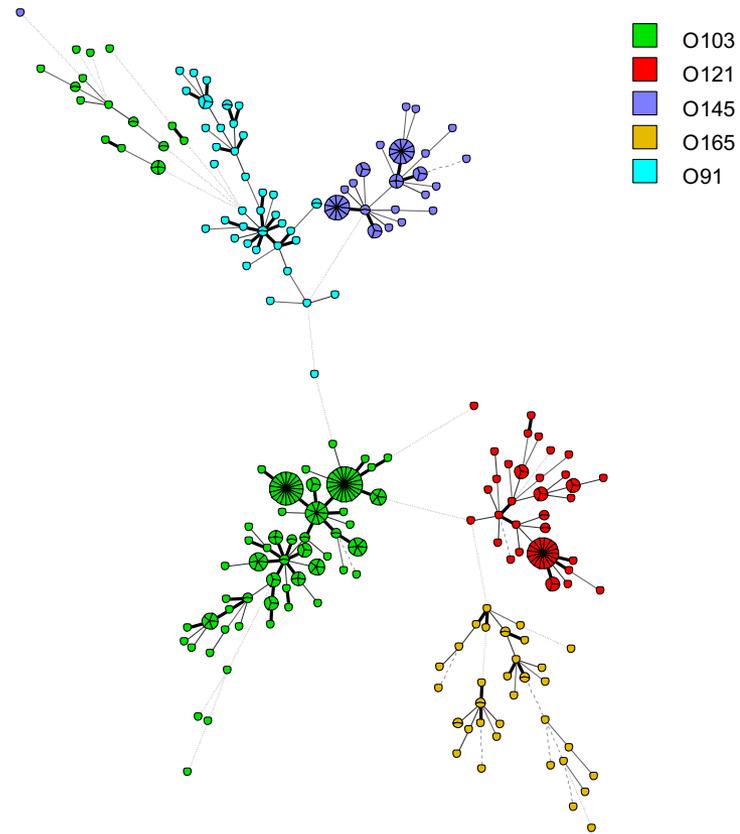
MLVA17	株数	型数	SID
O157	1535	560	0.990
O26	616	201	0.985
O111	70	38	0.969

minimum spanning treeの比較

MLVA17

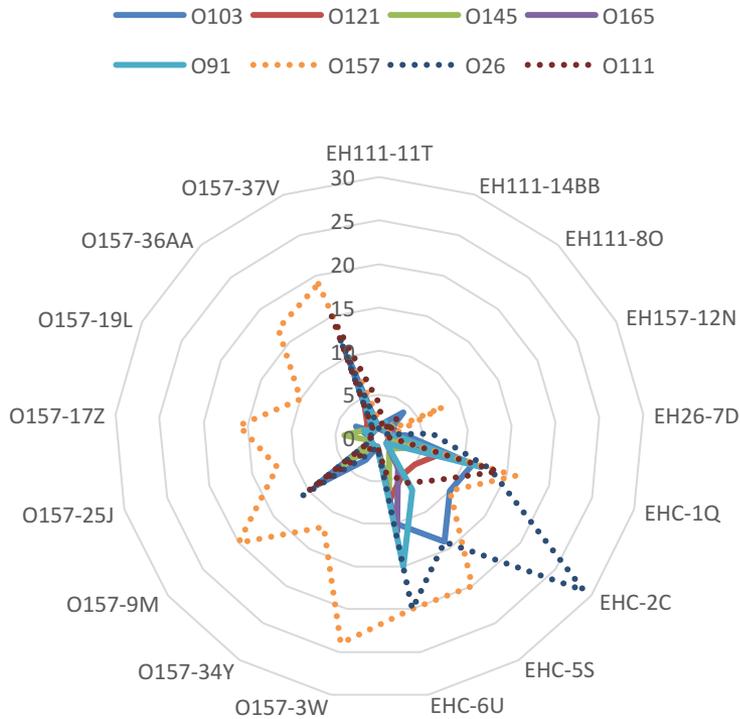


MLVA43

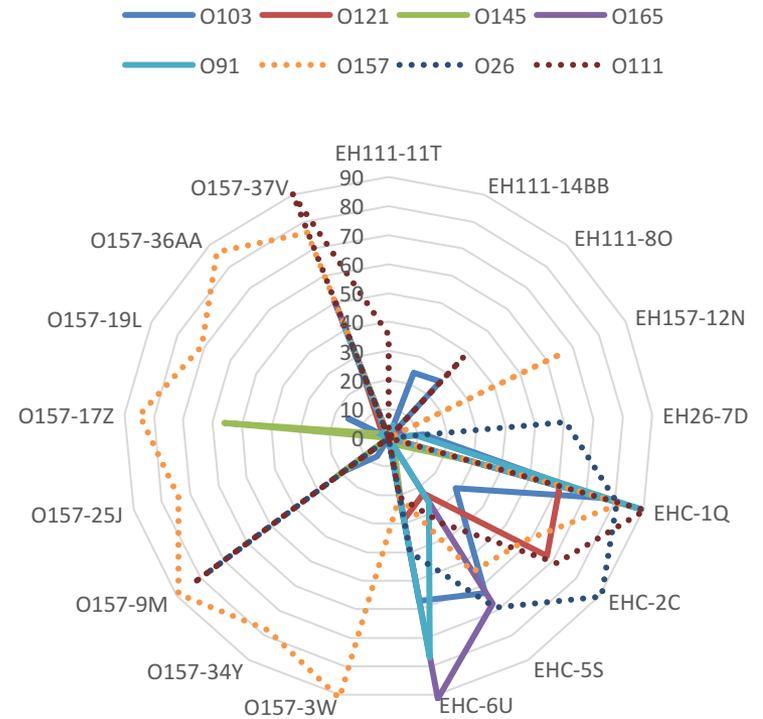


各遺伝子座の分解能 (従来の17遺伝子座)

アリル数

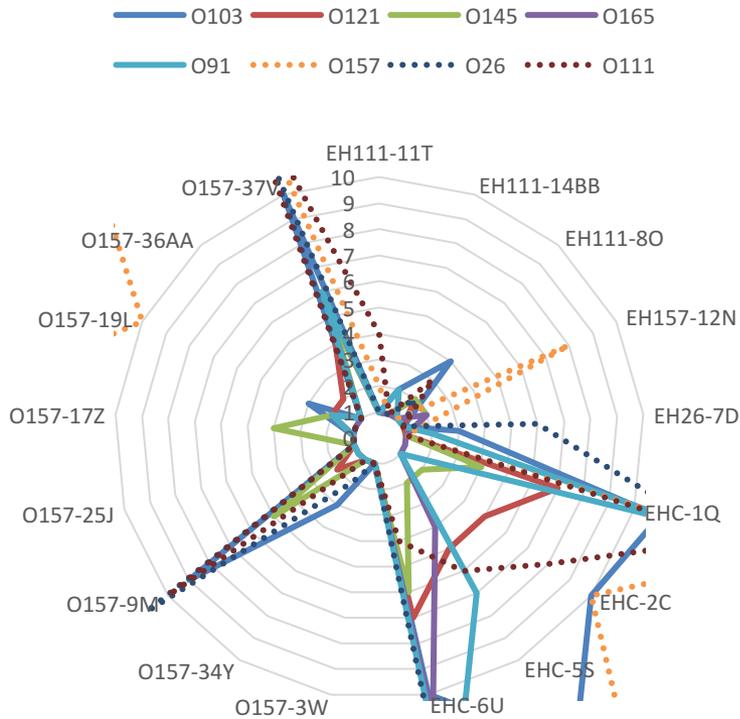


Diversity Index

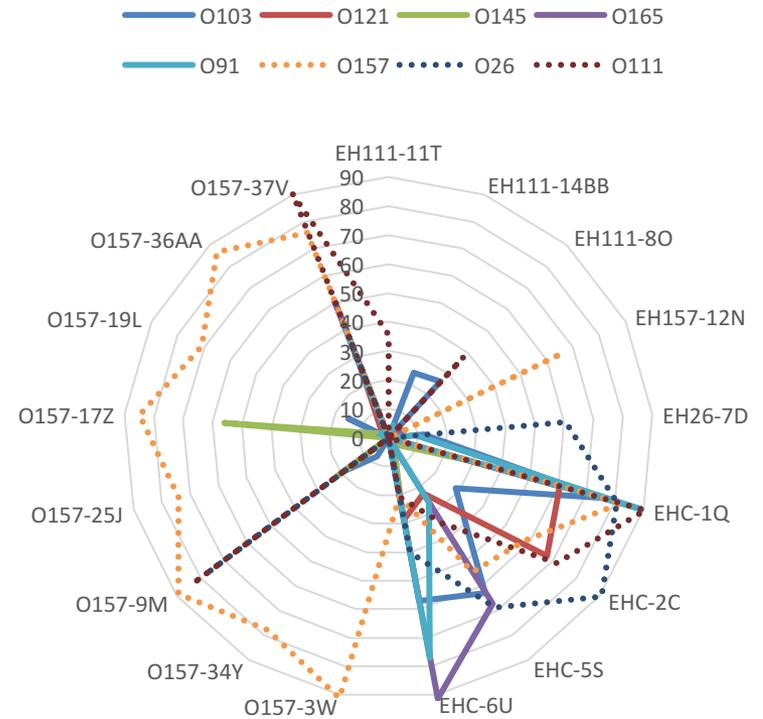


各遺伝子座の分解能 (従来の17遺伝子座)

アリル数

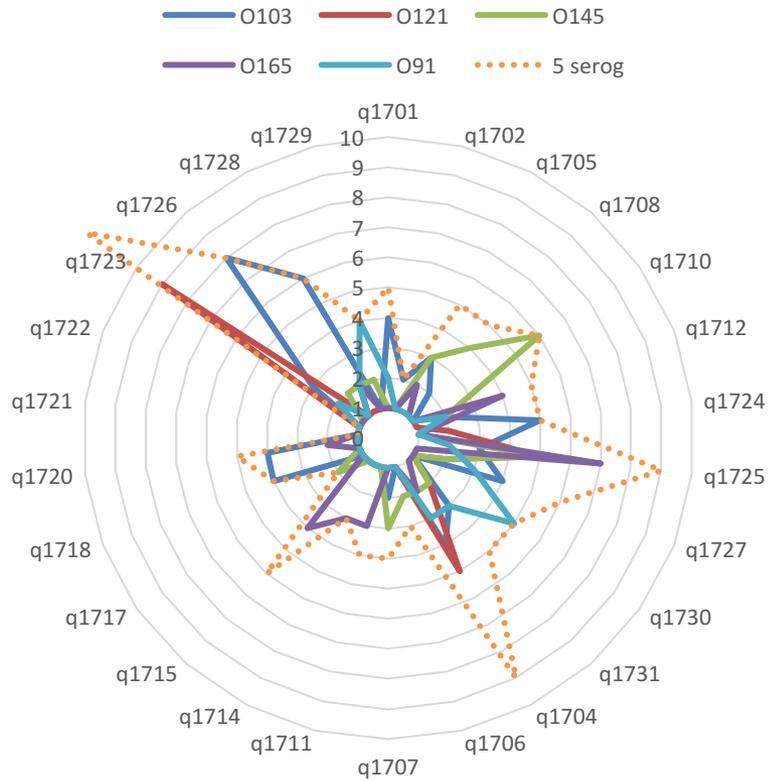


Diversity Index

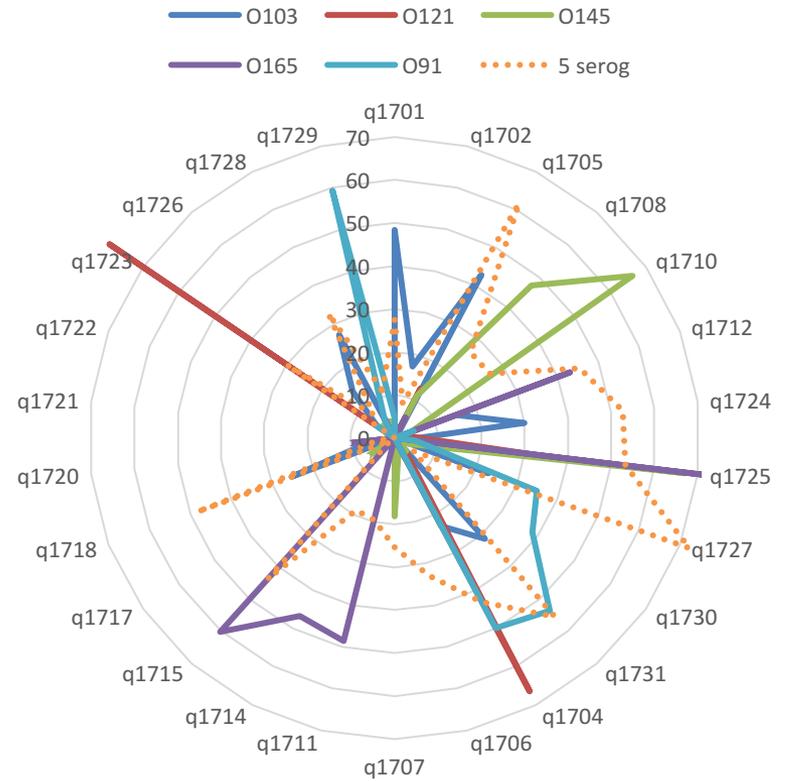


各遺伝子座の分解能 (追加の26遺伝子座)

アレル数

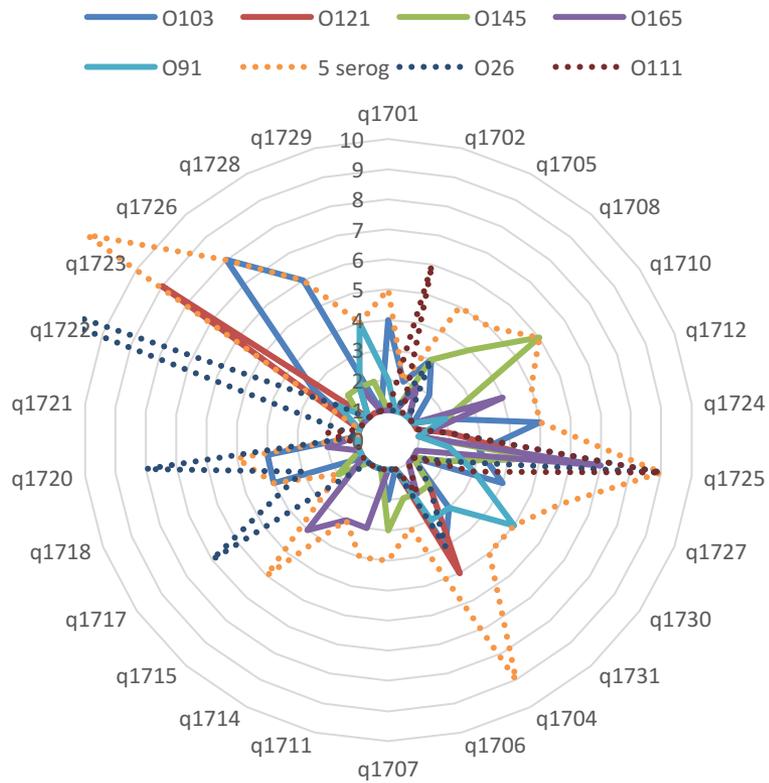


Diversity Index

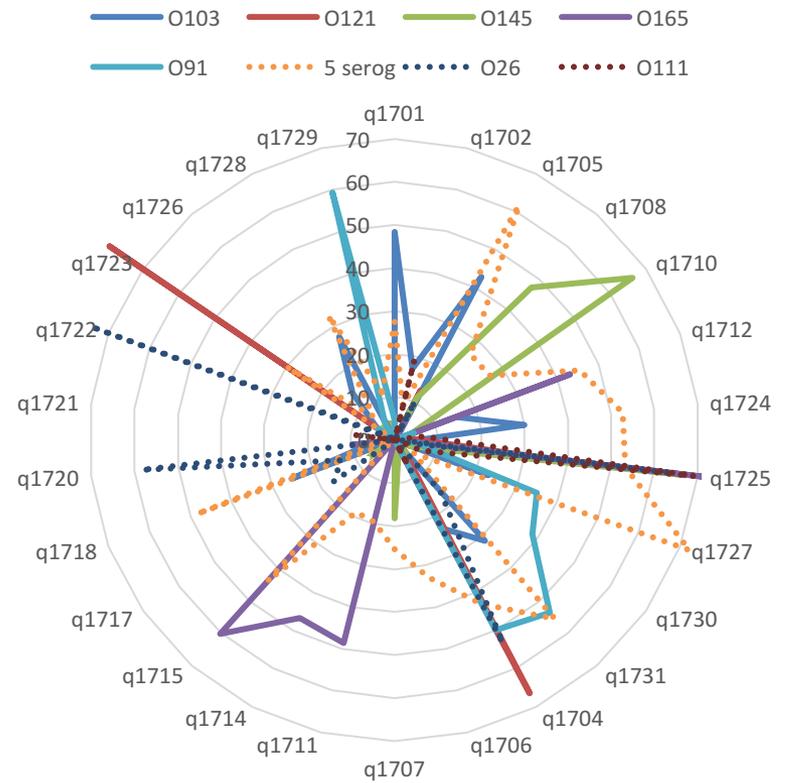


各遺伝子座の分解能 (追加の26遺伝子座)

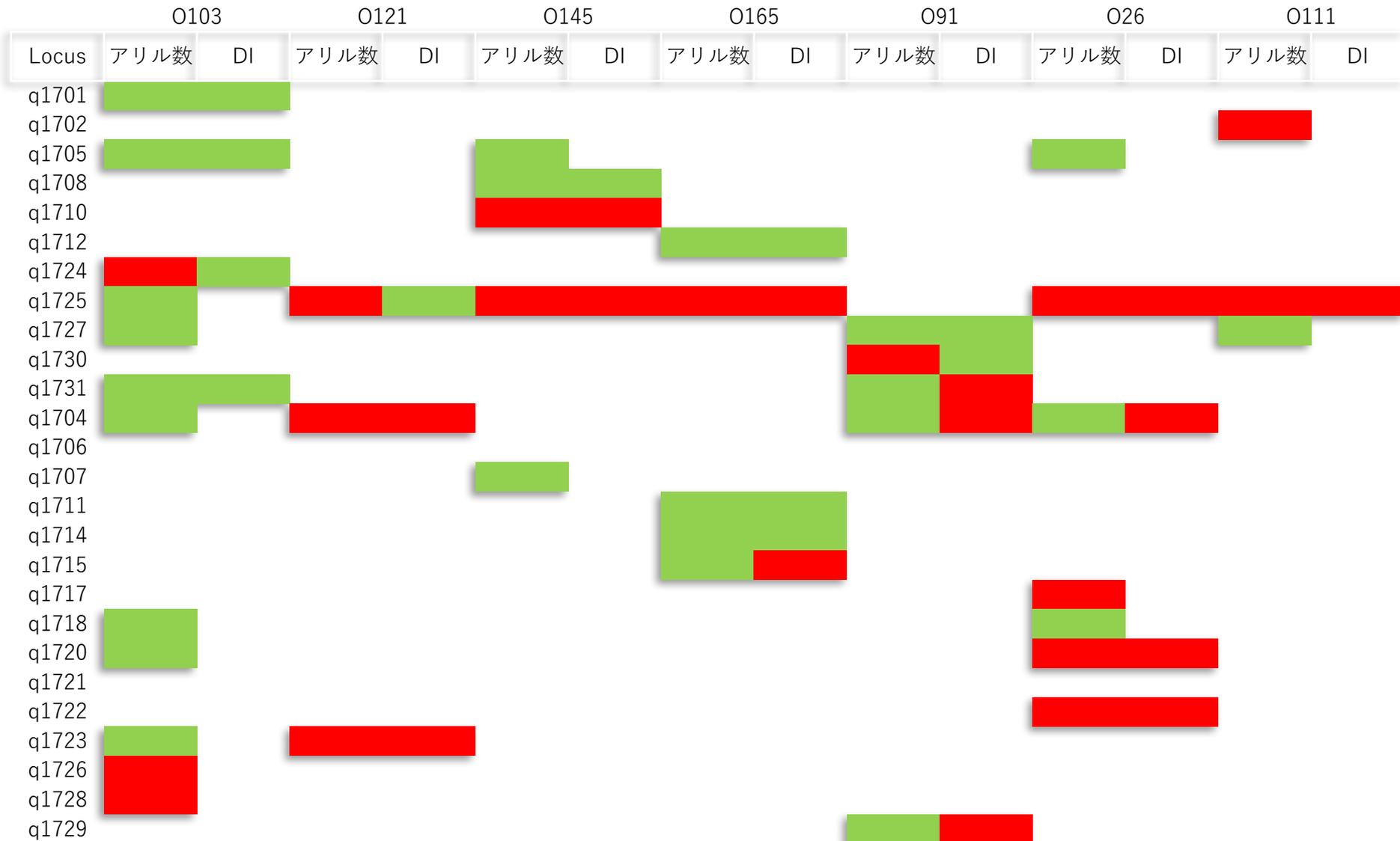
アレル数



Diversity Index

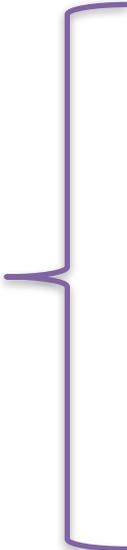


緑：アレル数3以上、SID 30%以上
 赤：アレル数5以上、SID 50%以上

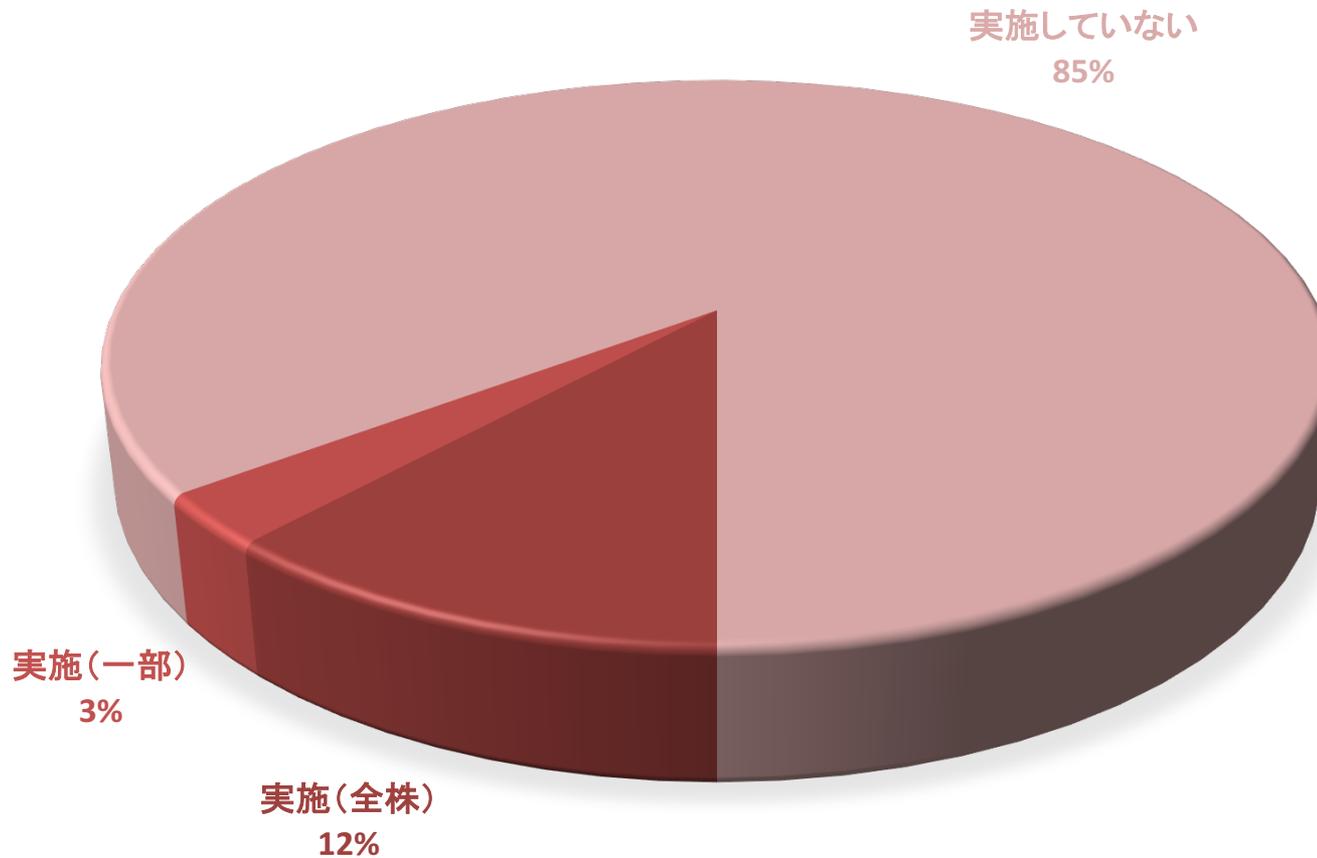


MLVA型表記

	MLVA型
O157	17m0xxx
O26	17m2xxx
O111	17m3xxx
O103	17m4xxx
O121	17m5xxx
O145	17m6xxx
O165	17m7xxx
O91	17m8xxx



MLVA実施状況(2016年)



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

レポート数の照合／照会につきて

- 実施機関で得られた結果を確認するための問い合わせには随時応じております
 - 1. レポート数を送っていただき、こちらの結果と照合する
 - 菌株送付前であれば、こちらのデータベースに一致するものがあるかどうかの検索も行います
 - 2. 当該機関の試験結果を確認するための照会
 - 当該菌株のレポート数をお送りします
- 広域株については必要に応じレポート数を回覧しております

2) ①大腸菌のO-/H-genotyping PCRについて

O genotyping PCR

個別PCR（全184種類の大腸菌O抗原のうち、162種類を検出するプライマーセットをデザイン）



マルチプレックスPCR（MP 1-20: 147種類の単独検出セット+15種類のグループ検出セット）

MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	MP 7	MP 8	MP 9	MP 10	MP 11	MP 12
0165	0112ac	01	063	078	091	OGp1	09	098	0172	0150	040
0103	0148	0146	06	0128	086	OGp9	041	096	088	030	045
0111	0158	0119	0126	015	0152	OGp11	033	059	037	084	OGp10
0157	0114	0142	0143	0166	08	OGp12	0108	069	OGp8	0183	07
026	0144	0167	027	0161	0115	OGp4	0174	082	023	075	0182
0121	0159	074	0168	029	025	OGp3	060	0177	0163	0113	0109
0145	0169	0125	0136	055		OGp13	054	071	0170	0160	079
stx1						OGp2	080	095	099	0138	0181
stx2							092	093	0116	0132	0171
eae											

MP 13	MP 14	MP 15	MP 16	MP 17	MP 18	MP 19	MP 20	MP 21	MP 22	MP 23
058	043	0102	0133	0100	0104	0184	0130			
012	0187	038	OGp7	0176	053	048	049			
0141	0180	064	0149	0175	0155	039	04			
0179	0173	051	05	003	OGp14	010	052			
011	0110	061	022	076	032	O28ab	OGp6			
0140	0147	070	019	085	065	OGp5	083			
081	0120	035	016	066	0154	036	0139			
056	0185	034	0105	O112ab	0131	0156	024			
021	OGp15	097	087							

- 新規Og型
- Shigella Og型

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

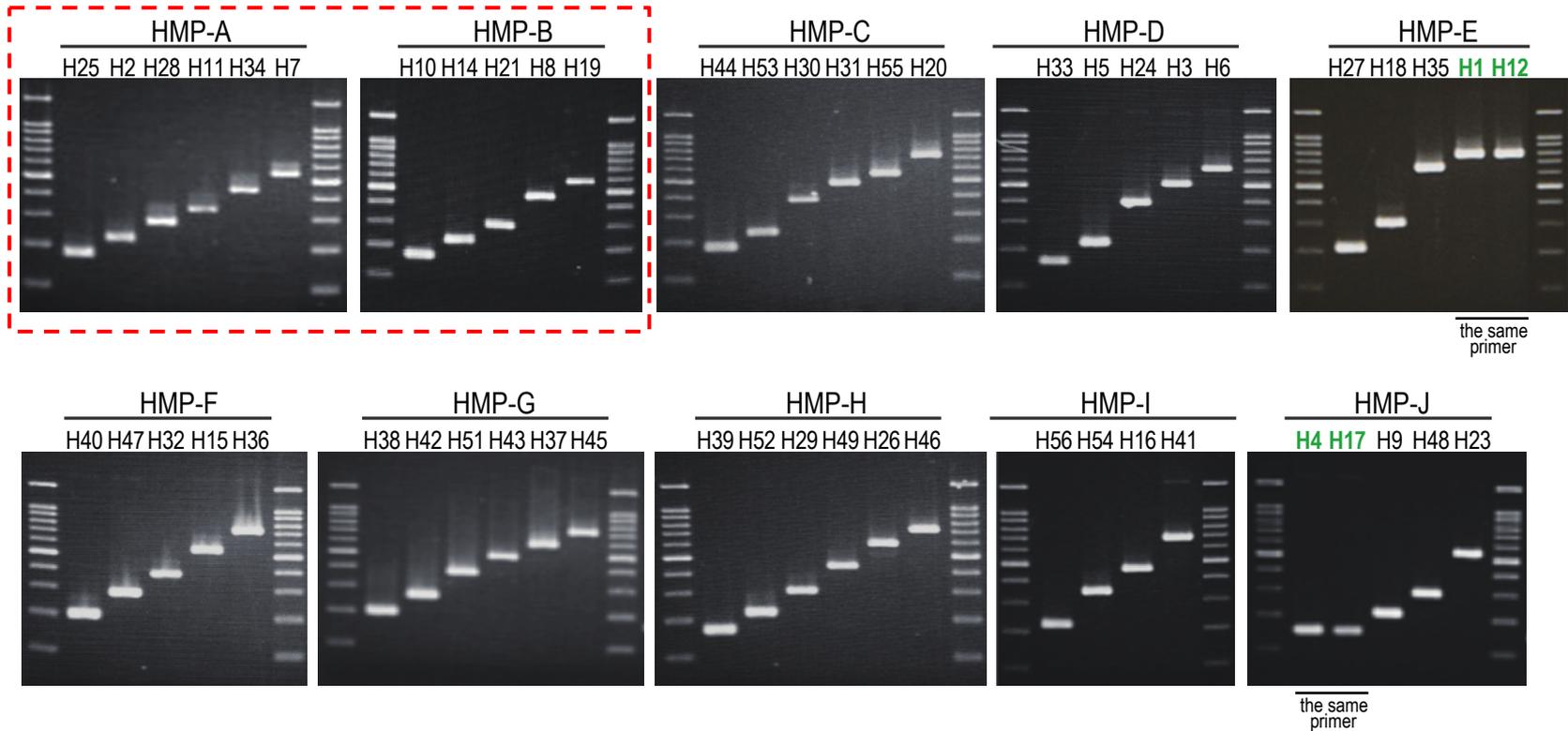
O serogroup Og-type

Iguchi et al., *J Clin Microbiol.* (2015)
 Iguchi et al., *Front Microbiol.* (2016)
 Iguchi et al., unpublished

H genotyping PCR

個別PCR→マルチプレックスPCR

(HMP 1-10: 全53種類の大腸菌H抗原のうち, 51種類の単独検出セット+2種類のグループ検出セット)
主要なEHECのH型11種類を検出可能



EHEC分離株の10-20% (O群によっては100%) を占める
H- (非運動性) 株のH型を決定可能.

② 精度管理用菌株の配布について

配布可能菌株(1): 下痢原性大腸菌PCRコントロール用菌株

菌株番号	保有遺伝子	PCRサイズ(bp)	プライマーセット
1290	<i>elt</i> <i>estA2</i> <i>astA</i>	123 178 109	ExEC
1297	<i>estA1</i> <i>astA</i>	179 109	ExEC
1298	<i>invE</i>	379	ExEC
1303	<i>stx1/2</i> <i>eae</i>	234 310	ExEC
1733	<i>stx2f</i> <i>eae</i> <i>astA</i>	296 310 109	ExEC
1782	<i>afaD</i>	207	EpALL
1923	<i>eae</i>	310	EpALL
1924	neg control	---	ExEC, EpALL
2279	<i>aggR</i> <i>astA</i>	254 109	EpALL

配布可能菌株(2) : *stx* サブタイプコントロール菌株

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

stx1: *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*,

stx2: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル
2017年2月改訂

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20170215.pdf>