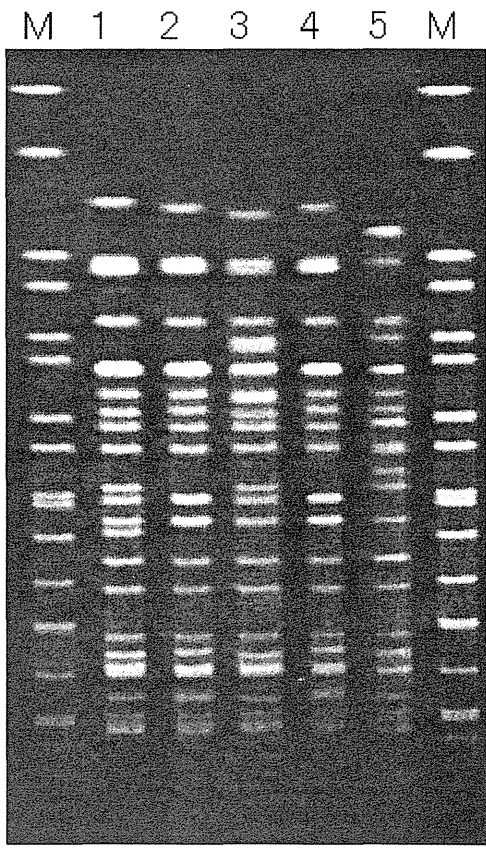
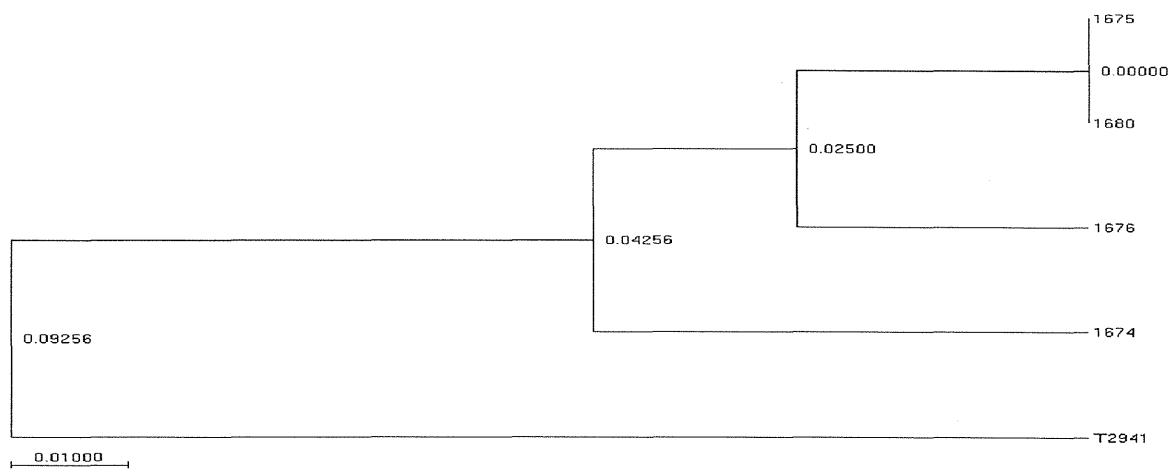


(G)

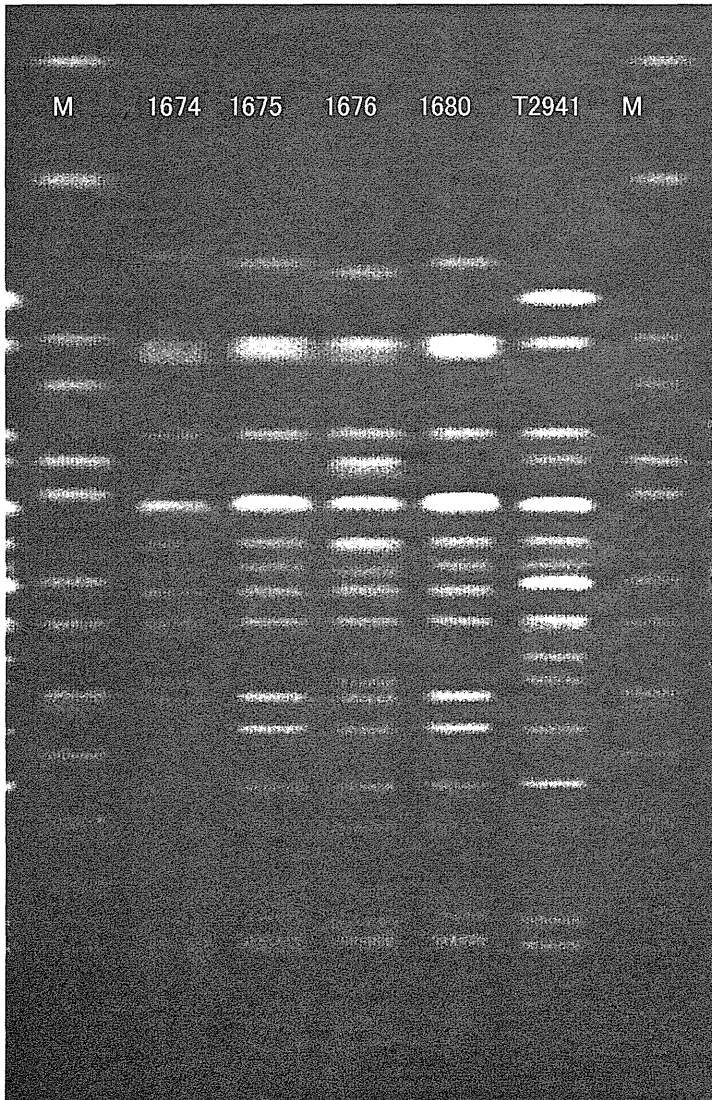
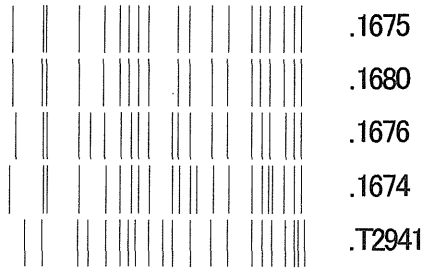
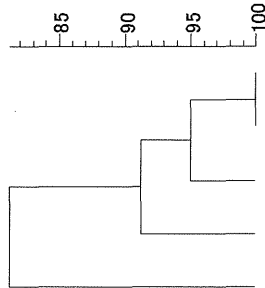


レーン 1: 1674
2: 1675
3: 1676
4: 1680
5: T2941
M: マーカー (Salmonella Braenderup H9812株)

菌株は実施前日まで室温保管

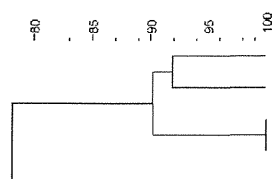
(H)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
EHEC EHEC



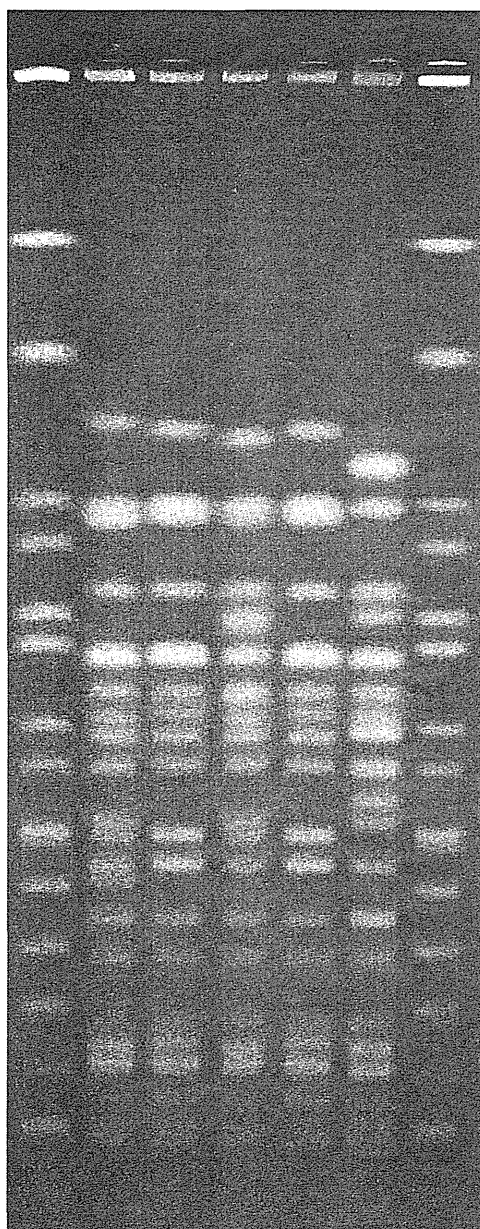
室温 5 日間保存

(I)



H24_1674
H24_1676
H24_1675
H24_1680
H24_T2941

M 1 2 3 4 5 M



M : Marker (S.Braenderup H9812)

1 : No.1674

2 : No.1675

3 : No.1676

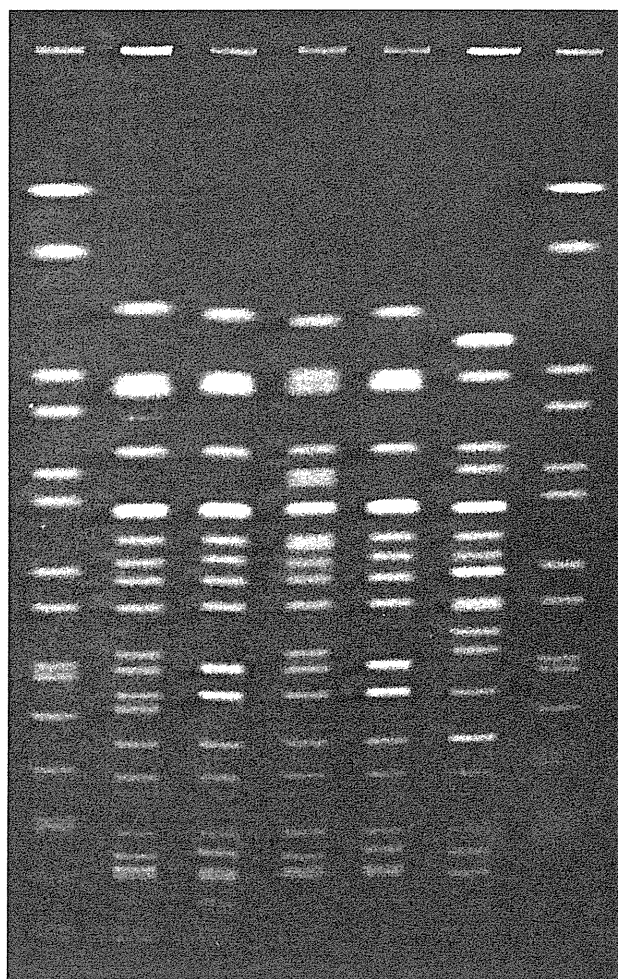
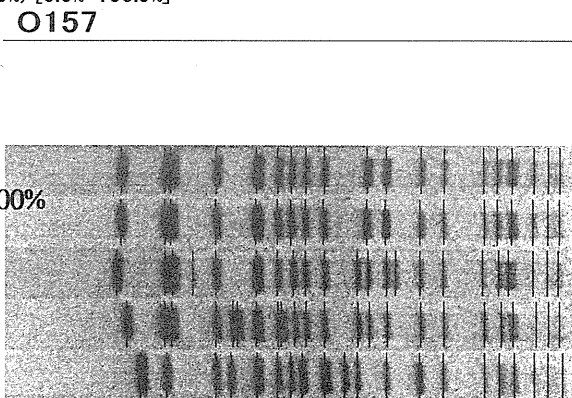
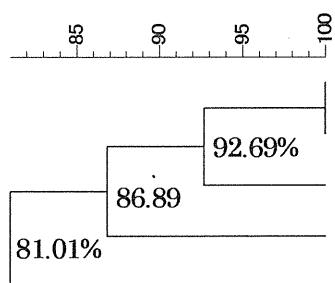
4 : No.1680

5 : No.T2941

菌株は検査まで室温で15日間保存、プラグの状態でも10日間保存してからPFGEを実施

(J)

Dice (Tol 1.0%~1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]
O157



M : Gold Standard

検査は、検体到着当日に開始

表1 平成24年度 PFGE 精度管理結果

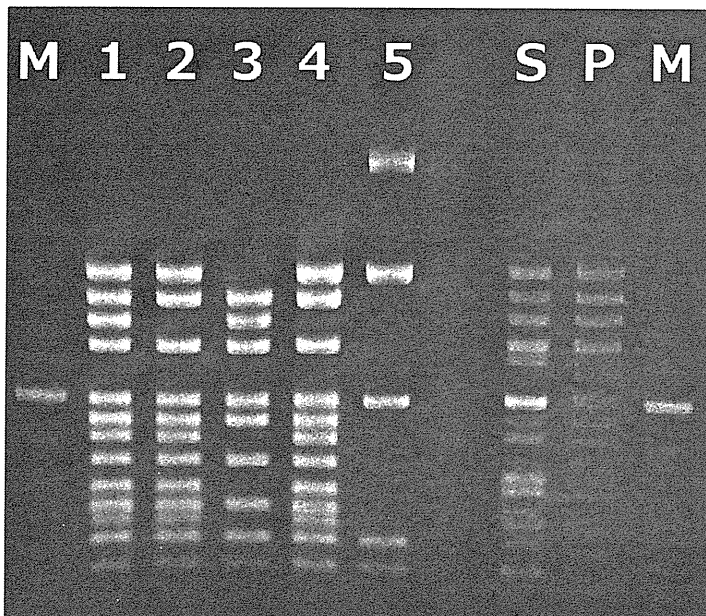
施設	菌株No				
	1675	1680	1676	1674	T2941
A	解析なし				
B	PFGE精度管理不参加				
C	100		95	91	83
D	100		87	80	65
E	100		90	92	81
F	100		87	90	75
G	100		98	93	84
H	100		95	91	81
I	100		90 (1675,1680と92%)		78
J	100		87	93	81
PFGE型	h63	g107	g332	h64	h41

数字はデンドログラム解析結果 (%)

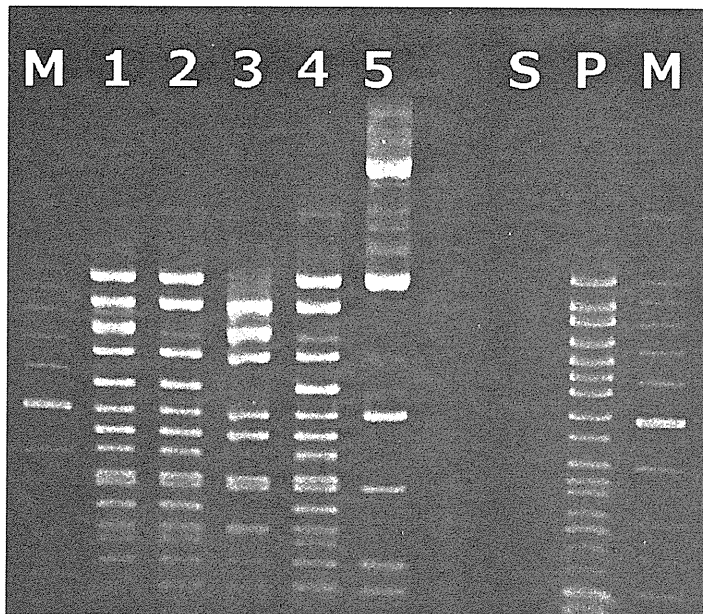
図2 EHEC O157株の IS-printing System による精度管理結果

(A)

1st primer set



2ns primer set



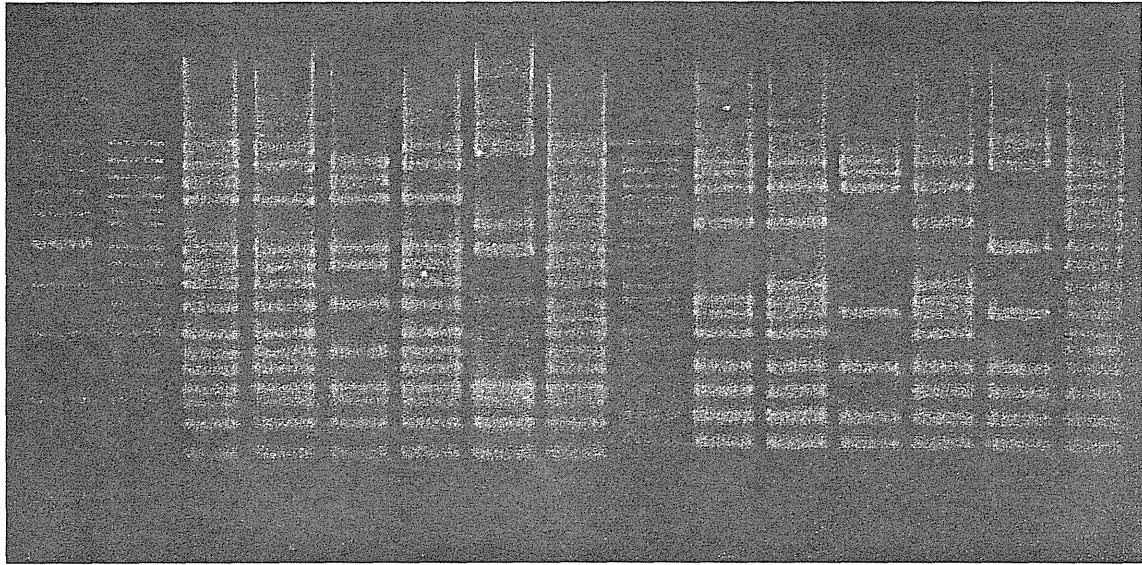
- 1 : 菌株No1674
- 2 : 菌株No1675
- 3 : 菌株No1676
- 4 : 菌株No1680
- 5 : 菌株NoT2941

M : 100 b p マーカー

S : スタンダードDNA P : テンプレートMIX

(B)

M P ① ② ③ ④ ⑤ P P ① ② ③ ④ ⑤ P



1st set

2nd set

① 1674 ②1675 ③1676 ④1680 ⑤T2941

4℃、10日間保存後に実施

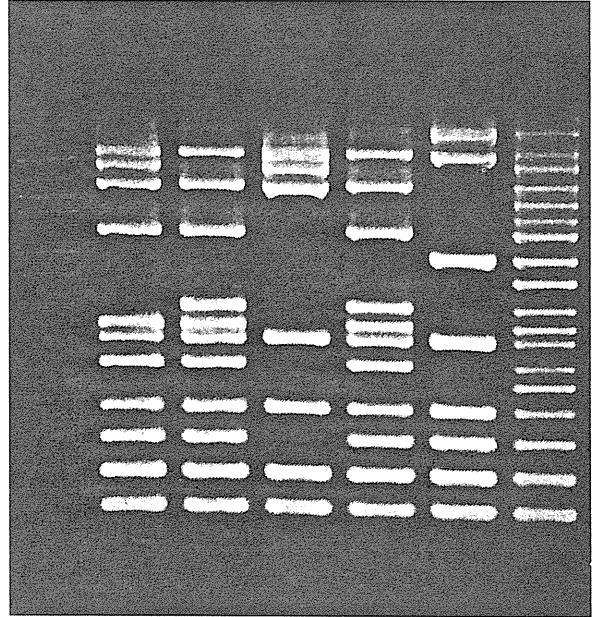
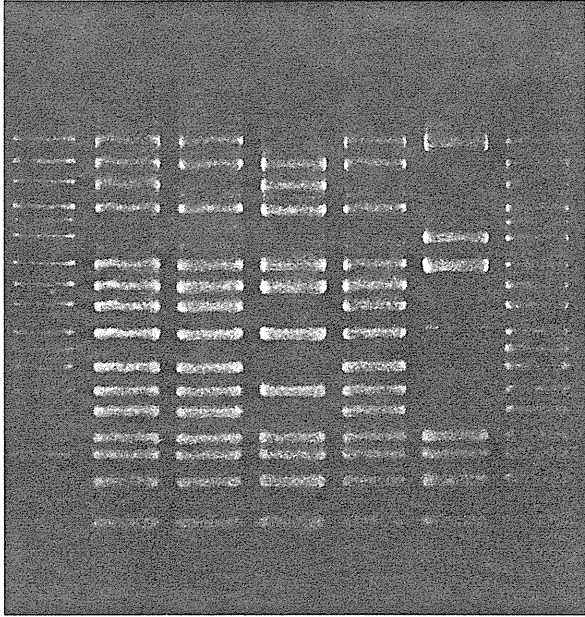
(D)

【1st primer】

【2nd primer】

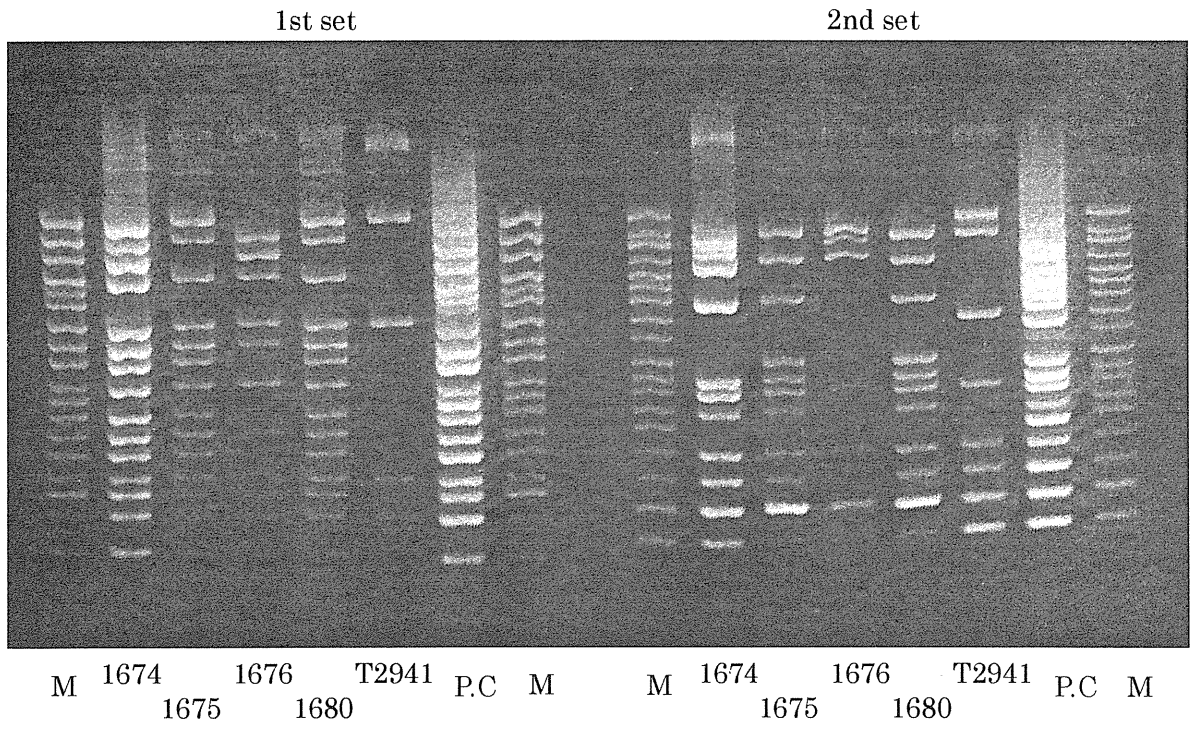
S 1674 1675 1676 1680 T2941 P

S 1674 1675 1676 1680 T2941 P



S: Standard DNA
P: Template Mix

(E)



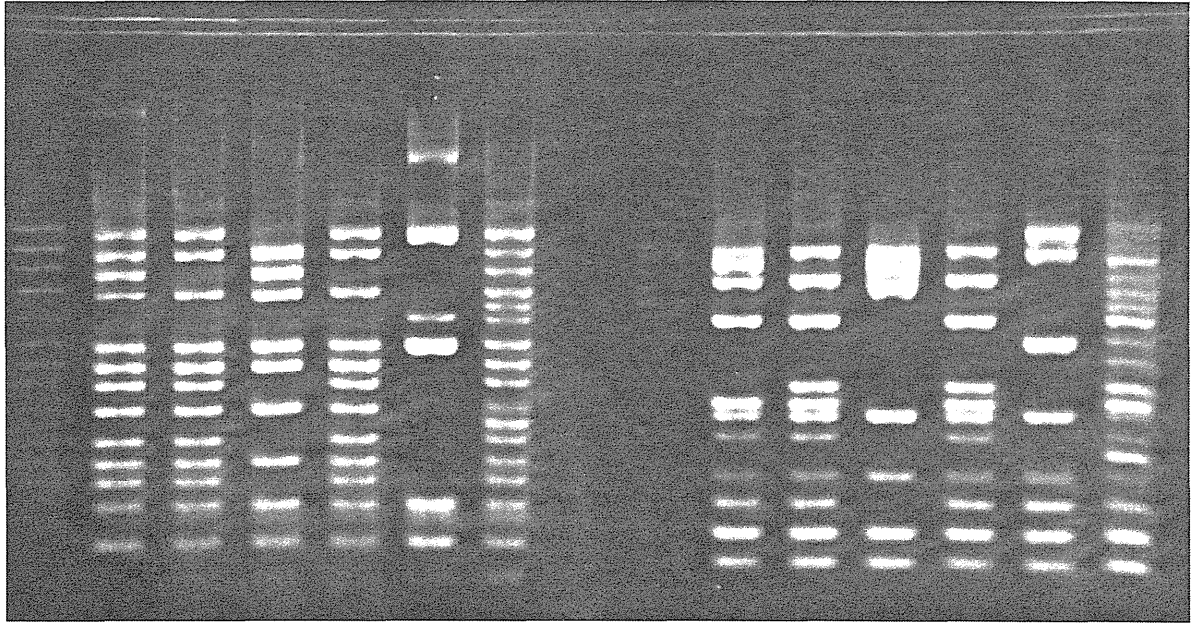
(F)

1st primer set

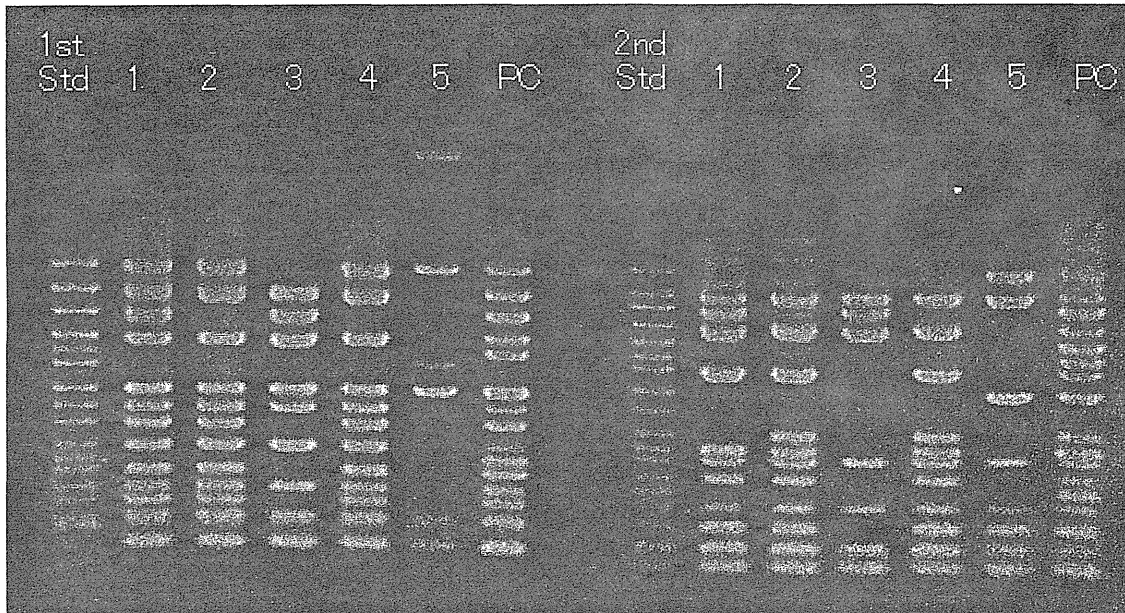
2nd primer set

std 1674 1675 1676 1680 T2941 PC

std 1674 1675 1676 1680 T2941 PC



(G)



Lane 1:No1674

Lane 2:No1675

Lane 3:No1676

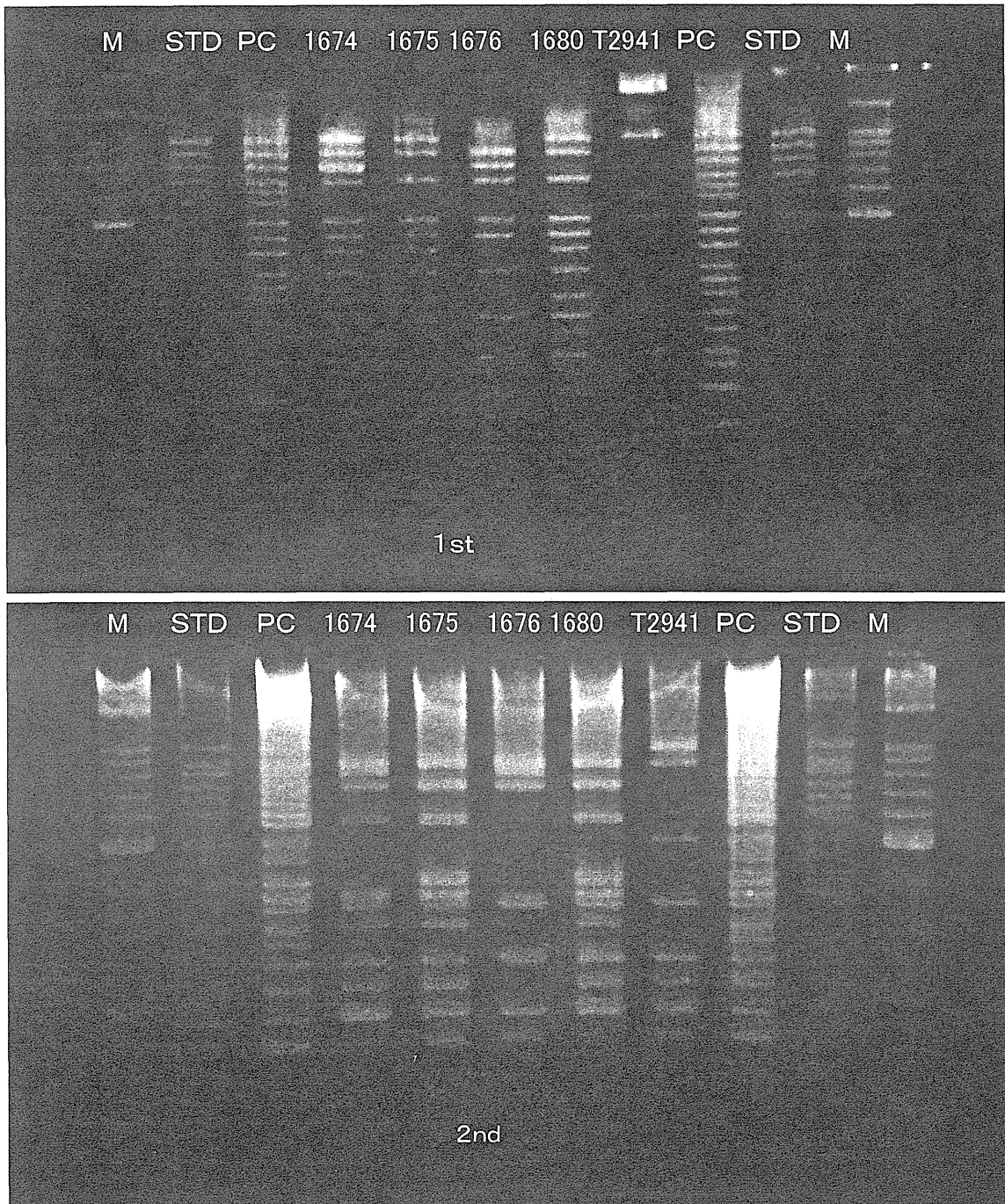
Lane 4:No1680

Lane 5:NoT2941

STD: standard DNA

PC : positive control

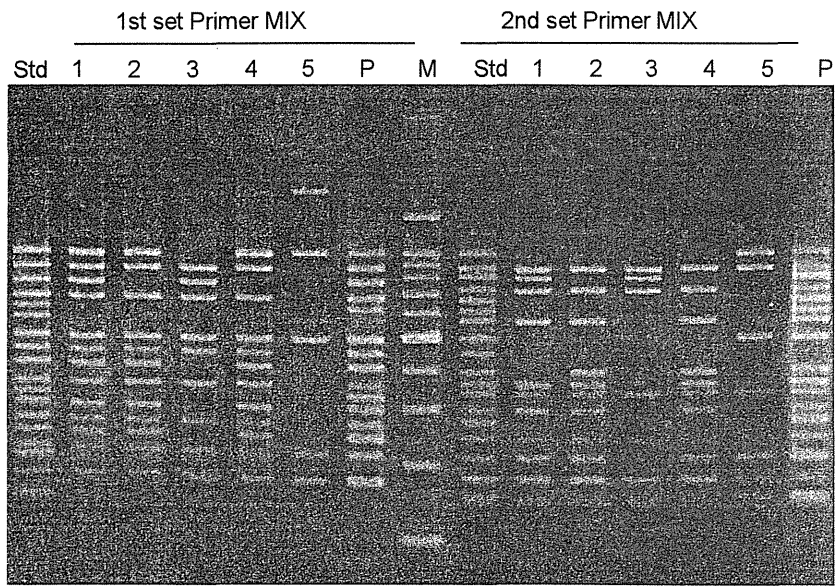
(H)



室温 5 日間保存

M : 100bp ladder Marker
STD : Standard DNA
PC : ポジティブコントロール

(I)



Std : Standard DNA

1 : No.1674

2 : No.1675

3 : No.1676

4 : No.1680

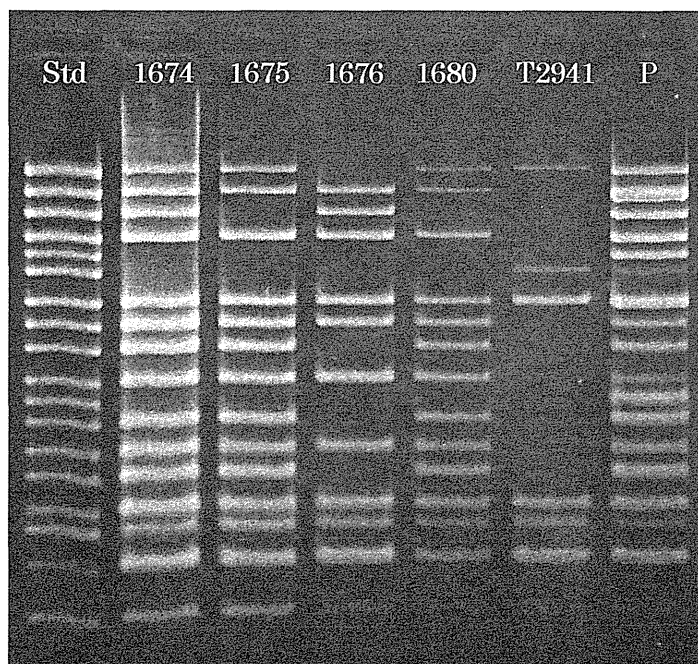
5 : No.T2941

P : Template Mix

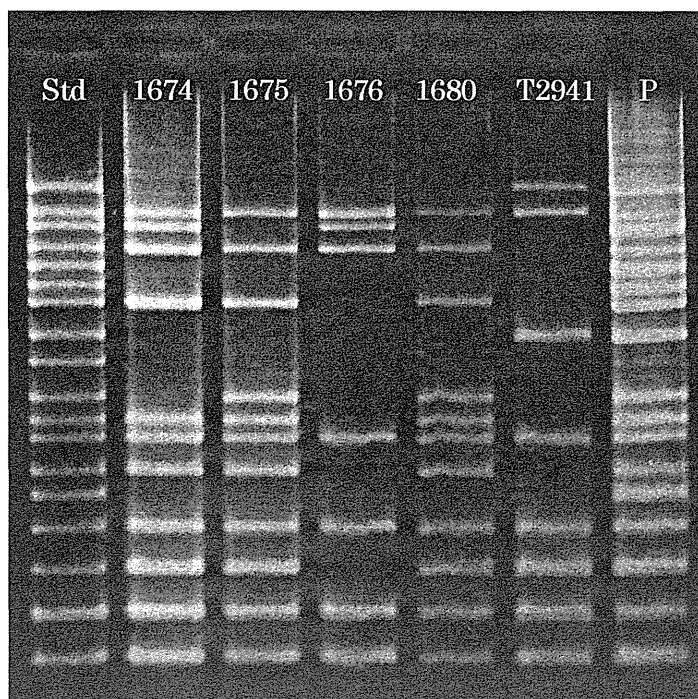
M : 100bp Ladder

(J)

IS Printing 1st



IS Printing 2nd



Std : スタンダード DNA P : Template Mix

表2 平成24年度 IS-printing system 精度管理結果

施設	菌株No				
	1675	1680	1676	1674	T2941
		317577	317577	613157	717577
	211757	211757	610446	611657	302447
A	317571	317571	613151	717571	101041
	337777	337777	636627	737777	323767
B	○	○	○	○	141147 ○
C	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○
F	○	○	○ 620446	○	○ 502447
G	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○
I	○	○	○	○	○
J	○	○	○	○	○

上段：1st primer code、下段：2nd primer code、○印は菌株 No 下欄の IS コードと結果が一致したもの。

表3 中四国地域の県別患者等由来 EHEC O157 株数

県名	分離株数
鳥取	7
島根	17
岡山	31
広島県	23
広島市	10
山口	43
徳島	7
香川	9
愛媛	3
高知	5
計	155

表4 中四国地域の患者等由来 EHEC O157 の IS コード一覧

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	株数
010057	214443	1
012057	210443	1
012057	214443	1
013057	214443	2
055047	303043	4
106557	201557	1
114057	203443	3
115045	343447	1
115047	343447	2
115057	303443	1
145047	103443	2
145047	301443	3
145147	303443	1
151147	361447	4
155047	303442	3
155047	343443	1
205057	311456	1
211057	310047	1
215457	301656	2
245457	511242	2
245457	611242	4
305455	611642	2
305457	211642	4
305577	211757	14
307577	211757	5
310457	110416	1
317477	611756	8
317555	411757	1
317555	611657	1
317575	211756	2
317575	211757	1
317577	211756	4
317577	211757	2
317577	611756	3
345457	311652	2
613057	610446	1
613157	610446	18
615455	311656	1
713555	610657	1
713557	610457	3
717555	611657	1
717557	611657	10
717557	757637	3
717575	611453	4
717575	611657	1
717575	611667	1
717577	211657	4
717577	411657	1
717577	611657	13
717577	611757	1
717577	631557	1
計		155

表5 中四国地域で患者等から多数分離された EHEC O157 の IS コード

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	H型	VT型	株数	発生月	発生県
305577	211757	7	1,2	14	11~1	岡山、広島、香川
307577	211757	7	1,2	5	10,1	広島、山口
317477	611756	7	1,2	7	7~9	山口
613157	610446	7	1,2	18	6~7	山口、広島、岡山
717557	611657	7	1,2	10	4~8,11,12	山口、広島、香川、愛媛
717577	611657	7	1,2	13	5~10	広島、島根、岡山、香川

鳥取県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における

IS-Printing 法の検討

研究協力者 鳥取県衛生環境研究所

花原悠太郎、上田豊

研究要旨

マルチプレックス PCR を用いた IS-printing 法の遺伝子型別能について検証を行った。対象菌株は当所で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の 7 菌株を用いた。これらの菌株について当所で行った IS-printing 法の結果とパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法との結果について比較検討したところ、双方ほぼ一致した。

しかしバンドの位置判定は目視によるものであり、正確な判定のための工夫が必要と考えられた。

A. 目的

細菌の遺伝子型別法としてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による方法が一般的に知られている。しかしこれは結果が出るまでに 3 日以上かかるなど、迅速性に欠ける部分がある。これを解消する方法としてマルチプレックス PCR を用いた IS-printing 法(IS 法)が開発されている。

今回この IS 法が、当所でも遺伝子型別試験として十分に機能するものか検証することを目的として県内分離菌株を用いて解析を行った。

B. 方法

1. 供試菌株

平成 24 年度当所で分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌 VT1,2 産生株 7 菌株を用いた。これら 7 菌株のうち 4 菌株(No1~No4)は事例 A で分離され、3 菌株(No5~No7)は事例 B で分離されたものであった(表 1)。

2. 方法

(1) IS 法

IS-printing system(TOYOBO)の取扱説明書のプロトコールに準じて菌株を処理し、1st,2nd の 2 種のプライマーセットによる PCR 後、電気泳動を行った(図 1)。いずれ

のプライマーセットにおいてもすべてのターゲットが増幅されると 18 本のバンドが現れるため、合計 36 本のバンドの有無を判定した。各検体について規定分子量サイズの増幅(バンド)有りを「1」、無しを「0」とし、各セットとも分子量サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st,2nd それぞれ 6 桁の IS コードとした。(表 2)

(2) PFGE 法

制限酵素 *Xba*I を用い、国立感染症研究所(感染研)で示された方法に従って実施した。

C. 結果及び考察

IS 法では、同一事例内において分離された菌株の IS コードは、一致していた。また、PFGE 法では事例 A のバンドパターンは同一であった。事例 B では菌株 No5 のバンドはスメア状となり判別できなかったが、他の 2 菌株は 1 バンド違いでほぼ同一パターンを示した(図 2)。

以上のことから同一事例内の分離菌株は同一由来菌株と考えられたが、事例間は別々の由来菌株と考えられた。

今回の研究で IS 法は PFGE 法に比べ操作が簡便で迅速に結果が出ることから、同

一由来菌株の探索には有用だと考えられた。

しかしながら、IS法、PFGE法ともに判定の際に複数のバンドをゲル上で確認しなければならず、バンドが薄い場合や近似した分子量のバンドは見分けが難しいというデメリットがある。このことを解消するためにIS法とPFGE法を両方組み合わせ、疫学情報を交えて総合的に判断する必要があると考えられる。

E 結論

IS法は集団発生事例の解析において、操作の簡便性・迅速性の観点から感染症発生早期に有効な活用が期待できる。

今後さらに信頼性確保のための精度管理や誤判定しないための電気泳動手技や反応条件の検討を行う必要があると思われた。