

表 5. *E. coli* O-genotyping PCR における各マルチプレックス PCR キットのプライマー組み合わせ

マルチ プレッ クス PCR	プライマー名	関連する O 血清群	O-genotype	サイズ (bp)	混和するプライマー (100 μM) の組成 forward/reverse (μl)
MP-1	Og165_PCR	O165	Og165	1042	160/160
	Og103_PCR	O103	Og103	716	80/80
	Og111_PCR	O111	Og111	451	80/80
	Og157_PCR	O157	Og157	296	160/160
	Og26_PCR	O26	Og26	241	80/80
	Og121_PCR	O121	Og121	193	80/80
	Og145_PCR	O145	Og145	132	80/80
				TE	2080
			Total	3520	
MP-2	Og112ac_PCR	O112ac	Og112ac	1180	80/80
	Og148_PCR	O148	Og148	865	80/80
	Og158_PCR	O158	Og158	693	80/80
	Og114_PCR	O114	Og114	553	80/80
	Og144_PCR	O144	Og144	406	80/80
	Og159_PCR	O159	Og159	298	80/80
	Og169_PCR	O169	Og169	221	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-3	Og1_PCR	O1	Og1	1098	80/80
	Og146_PCR	O146	Og146	801	80/80
	Og119_PCR	O119	Og119	650	80/80
	Og142_PCR	O142	Og142	538	80/80
	Og167_PCR	O167	Og167	403	80/80
	Og74_PCR	O74	Og74	289	80/80
	Og125_PCR	O125	Og125	210	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-4	Og63_PCR	O63	Og63	995	80/80
	Og6_PCR	O6	Og6	783	80/80
	Og126_PCR	O126	Og126	645	80/80
	Og143_PCR	O143	Og143	500	80/80
	Og27_PCR	O27	Og27	382	80/80
	Og168_PCR	O168	Og168	282	80/80
	Og136_PCR	O136	Og136	210	80/80
				TE	2400
			Total	3520	

			TE	2400	
			Total	3520	
MP-5	Og78_PCR	O78	Og78	992	80/80
	Og128_PCR	O128	Og128	782	80/80
	Og15_PCR	O15	Og15	608	80/80
	Og166_PCR	O166	Og166	462	80/80
	Og161_PCR	O161	Og161	349	80/80
	Og29_PCR	O29	Og29	260	80/80
	Og55_PCR	O55	Og55	207	80/80
			TE	2400	
			Total	3520	
MP-6	Og91_PCR	O91	Og91	953	80/80
	Og86_PCR	O86	Og86	731	80/80
	Og152_PCR	O152	Og152	568	80/80
	Og8_PPCR	O8	Og8	448	80/80
	Og115_PCR	O115	Og115	327	80/80
	Og25_PCR	O25	Og25	230	80/80
			TE	2560	
			Total	3520	
MP-7	Og137_PCR	O20, O137	OgGp1	1007	80/80
	Og44_PCR	O17, O44, O73, O77, O106	OgGp9	849	80/80
	Og153_PCR	O153, O178	OgGp11	703	80/80
	Og18ab_PCR	O18ab, O18ac	OgGp12	551	80/80
	Og127_PCR	O90, O127	OgGp4	451	160/160
	Og118_PCR	O118, O151	OgGp3	344	80/80
	Og124_PCR	O124, O164	OgGp13	270	80/80
	Og28ac_PCR	O28ac, O42	OgGp2	218	80/80
			TE	2080	
			Total	3520	
MP-8	Og9_PPCR	O9	Og9	1235	80/80
	Og41_PCR	O41	Og41	942	80/80
	Og33_PCR	O33	Og33	783	80/80
	Og108_PCR	O108	Og108	647	80/80
	Og174_PCR	O174	Og174	541	80/80
	Og60_PCR	O60	Og60	443	80/80
	Og54_PCR	O54	Og54	351	80/80
	Og80_PCR	O80	Og80	285	80/80
	Og92_PCR	O92	Og92	233	80/80
			TE	2080	

			Total	3520
	Og98_PCR	O98	Og98	1139
	Og96_PCR	O96	Og96	938
	Og59_PCR	O59	Og59	783
	Og69_PCR	O69	Og69	653
	Og82_PCR	O82	Og82	538
MP-9	Og177_PCR	O177	Og177	427
	Og71_PCR	O71	Og71	344
	Og95_PCR	O95	Og95	272
	Og93_PCR	O93	Og93	229
			TE	1760
			Total	3520
	Og172_PCR	O172	Og172	1108
	Og88_PCR	O88	Og88	781
	Og37_PCR	O37	Og37	683
	Og117_PCR	O107, O117	OgGp8	518
	Og23_PCR	O23	Og23	427
MP-10	Og163_PCR	O163	Og163	342
	Og170_PCR	O170	Og170	271
	Og99_PCR	O99	Og99	226
	Og116_PCR	O116	Og116	156
			TE	2080
			Total	3520
	Og150_PCR	O150	Og150	1089
	Og30_PCR	O30	Og30	894
	Og84_PCR	O84	Og84	775
	Og183_PCR	O183	Og183	666
	Og75_PCR	O75	Og75	511
MP-11	Og113_PCR	O113	Og113	419
	Og160_PCR	O160	Og160	333
	Og138_PCR	O138	Og138	267
	Og132_PCR	O132	Og132	215
			TE	2080
			Total	3520
	Og40_PCR	O40	Og40	1082
	Og45_PCR	O45	Og45	916
MP-12	Og13_PCR	O13, O129, O135	OgGp10	774
	Og7_PCR	O7	Og7	610
	Og182_PCR	O182	Og182	510

	Og109_PCR	O109	Og109	409	80/80
	Og79_PCR	O79	Og79	333	80/80
	Og181_PCR	O181	Og181	261	80/80
	Og171_PCR	O171	Og171	212	80/80
			TE		2080
			Total		3520
<hr/>					
	Og58_PCR	O58	Og58	1046	80/80
	Og12_PCR	O12	Og12	885	80/80
	Og141_PCR	O141	Og141	745	80/80
	Og179_PCR	O179	Og179	608	80/80
	Og11_PCR	O11	Og11	509	80/80
MP-13	Og140_PCR	O140	Og140	409	80/80
	Og81_PCR	O81	Og81	329	80/80
	Og56_PCR	O56	Og56	250	80/80
	Og21_PCR	O21	Og21	209	80/80
			TE		2080
			Total		3520
<hr/>					
	Og43_PCR	O43	Og43	1041	80/80
	Og187_PCR	O187	Og187	828	80/80
	Og180_PCR	O180	Og180	744	80/80
	Og173_PCR	O173	Og173	606	80/80
	Og110_PCR	O110	Og110	493	80/80
MP-14	Og147_PCR	O147	Og147	399	80/80
	Og120_PCR	O120	Og120	329	80/80
	Og185_PCR	O185	Og185	254	80/80
	Og89_PCR	O89, O101, O162	OgGp15	198	80/80
			TE		2080
			Total		3520
<hr/>					
	Og102_PCR	O102	Og102	1025	80/80
	Og38_PCR	O38	Og38	822	80/80
	Og64_PCR	O64	Og64	727	80/80
	Og51_PCR	O51	Og51	583	80/80
	Og61_PCR	O61	Og61	487	80/80
MP-15	Og70_PCR	O70	Og70	393	80/80
	Og35_PCR	O35	Og35	303	80/80
	Og34_PCR	O34	Og34	247	80/80
	Og97_PCR	O97	Og97	184	80/80
			TE		2080
			Total		3520

	Og133_PCR	O133	Og133	1017	80/80
	Og2_PCR	O2, O50	OgGp7	813	80/80
	Og149_PCR	O149	Og149	709	80/80
	Og5_PCR	O5	Og5	566	80/80
	Og22_PCR	O22	Og22	458	80/80
MP-16	Og19_PCR	O19	Og19	389	80/80
	Og16_PCR	O16	Og16	302	80/80
	Og105_PCR	O105	Og105	246	80/80
	Og87_PCR	O87	Og87	167	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og100_PCR	O100	Og100	1006	80/80
	Og176_PCR	O176	Og176	809	80/80
	Og175_PCR	O175	Og175	690	80/80
	Og3_PCR	O3	Og3	571	80/80
MP-17	Og76_PCR	O76	Og76	457	80/80
	Og85_PCR	O85	Og85	388	80/80
	Og66_PCR	O66	Og66	301	160/160
	Og112ab_PCR	O112ab	Og112ab	241	80/80
				TE	2080
				Total	3520
	Og104_PCR	O104	Og104	993	80/80
	Og53_PCR	O53	Og53	806	80/80
	Og155_PCR	O155	Og155	671	80/80
	Og62_PCR	O62, O68	OgGp14	548	80/80
MP-18	Og32_PCR	O32	Og32	452	80/80
	Og65_PCR	O65	Og65	381	80/80
	Og154_PCR	O154	Og154	299	80/80
	Og131_PCR	O131	Og131	238	80/80
				TE	2240
				Total	3520
	Og184_PCR	O184	Og184	964	80/80
	Og48_PCR	O48	Og48	793	80/80
	Og39_PCR	O39	Og39	667	80/80
MP-19	Og10_PCR	O10	Og10	546	80/80
	Og28ab_PCR	O28ab	Og28ab	446	80/80
	Og186_PCR	O123, O186	OgGp5	362	160/160
	Og36_PCR	O36	Og36	292	80/80
	Og156_PCR	O156	Og156	236	80/80

			TE	2080	
			Total	3520	
MP-20	Og130_PCR	O130	Og130	944	80/80
	Og49_PCR	O49	Og49	789	80/80
	Og4_PCR	O4	Og4	664	80/80
	Og52_PCR	O52	Og52	543	80/80
	Og46_PCR	O46, O134	OgGp6	445	80/80
	Og83_PCR	O83	Og83	362	80/80
	Og139_PCR	O139	Og139	287	80/80
	Og24_PCR	O24	Og24	233	80/80
			TE	2240	
			Total	3520	

表 6. マルチプレックス PCR の反応液組成

PCR grade water	14.42
5x KAPA Extra Buffer (without Mg2+)	6
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP mix (10 mM each dNTP)	0.9
multiplex primer mix (表 5 参照)	3.52
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.16
Template DNA	2
total	30 μl

表 7. マルチプレックス PCR の反応条件

1. Initial Denaturation	94°C	1 min	25 cycles
2. Denaturation	94°C	30 sec	
3. Annealing	58°C	30 sec	
4. Extension	72°C	1 min	
5. Final Extension	72°C	2 min	

表 8. 非典型的 EHEC の *stx1*・*stx2*・*eae* 保有パターン

分離源	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1+stx2</i>	<i>stx1</i> + <i>eae</i>	<i>stx2</i> + <i>eae</i>	<i>stx1+stx2</i> + <i>eae</i>	total
ヒト	114	106	31	86	37	6	380
ウシ	8	208	47	28	16	0	307
ウシ以外の動物	2	15	0	1	0	0	18
食品	0	11	1	0	1	0	13
不明	3	2	1	0	2	0	8

表 9. 有症者由来 EHEC 株に見られた O-genotype とその分布

	ヒト-重症	ヒト-有症者	無症状保菌者	ウシ	その他動物
O103	13	10	1	4	0
O165	9	2	0	0	0
O121	5	3	1	0	0
O28ac/O42	3	0	3	2	0
O177	2	0	1	4	1
O107/O117	2	0	1	1	0
O115	2	1	3	1	0
O5	2	3	0	2	1
O118/151	2	3	1	0	0
O145	2	8	0	0	0
O163	1	0	3	12	0
O84	1	0	11	3	0
O88	1	0	0	2	0
O45	1	0	2	1	0
O141	1	0	0	0	1
O119	1	0	3	0	0
O15	1	0	2	0	0
O109	1	1	4	16	0
O174	1	1	3	16	0
O172	1	1	0	1	0
O123/186	1	1	5	0	0
O55	1	1	3	0	0
O113	1	2	6	55	0
O182	1	2	2	6	0
O183	1	2	9	0	0
O91	1	4	16	1	0
O128	0	3	5	0	0
O8	0	2	5	17	1
O156	0	2	7	11	0
O63	0	2	0	0	0
O2/50	0	1	1	3	0
O100	0	1	0	2	0
O146	0	1	4	1	3
O98	0	1	2	1	0
O108	0	1	1	0	0
O126	0	1	0	0	0
O112ab	0	1	1	0	0
O24	0	1	0	0	0

O66	0	1	0	0	0
O69	0	1	3	0	0
O76	0	1	3	0	0
O89/O101/O162	0	1	3	0	0

表 10. 重症者由来 EHEC 株と同じ遺伝学的特徴を持つウシまたはシカ由来株

strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	sea	ihfA	fimA	Origin	Symptom
EHO-11	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-22	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-4	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-35	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-33	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-16	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-17	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
EH23-26	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
A140318	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0022	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0103	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0121	O103	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	sea	ihfA	fimA	Origin	Symptom
OT-310	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ヒト	重症
A140250	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140259	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140269	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140273	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140277	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140290	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140292	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140293	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140296	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140302	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140311	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140316	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140323	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140338	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140340	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0013	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-

A0017	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0061	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0062	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0064	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0128	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0133	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A0134	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
OT-291	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
OT-292	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140166	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140181	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140190	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140191	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140192	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140193	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140223	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
A140245	O113	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stc2c</i>	<i>efx</i>	<i>cdtV</i>	<i>subAB</i>	<i>saa</i>	<i>ifnA</i>	<i>fimA</i>	Origin	Symptom
EHO-28	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ヒト	重症
A140253	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A140260	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A0025	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A0036	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A0041	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A0066	O163	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stc2c</i>	<i>efx</i>	<i>cdtV</i>	<i>subAB</i>	<i>saa</i>	<i>ifnA</i>	<i>fimA</i>	Origin	Symptom
EHO-13	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ヒト	重症
EHOUT19	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ヒト	重症
A0110	O177	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ウシ	-
strain ID	O-genotype	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stc2c</i>	<i>efx</i>	<i>cdtV</i>	<i>subAB</i>	<i>saa</i>	<i>ifnA</i>	<i>fimA</i>	Origin	Symptom
EHO-34	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症
OC-32	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
OC-35	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
A0111	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
OT-295	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
A140227	O182	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-

strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
EHOUT41	O45	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症
A140312	O45	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
EHO-74	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症
EHOUT01	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ヒト	重症
A0120	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
A140237	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ウシ	-
EOG34-7	O5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	シカ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
EHOUT46	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ヒト	重症
A140297	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
EHOUT31	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
A0002	O84	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
OT-116	O88	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	ヒト	重症
A140288	O88	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	ウシ	-
strain ID	O-genotype	stx1	stx2	eee	stc2c	ehx	cdtV	subAB	saa	iha	fimA	Origin	Symptom
OT-4	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ヒト	重症
A140230	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ウシ	-
A140231	O28ac/O42	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	ウシ	-

表 11. EHEC における新規 O-genotype の分布

	ヒト-重症	ヒト-有症者	無症状保菌者	ウシ	その他動物	食品
ON3	1	1	2	7	0	0
ON6	1	1	1	4	1	0
ON8	1	0	8	19	0	1
ON10	1	1	2	2	0	0
ON31	1	1	2	0	0	0

7 大 0 血清群+*stx1/stx2/ eae* のマルチプレックス PCR 検査法【MP-1+ (プラス)】

EHEC の主要 7 種類 0 血清群 (0157、026、0111、0103、0121、0145、0165) の判定にはマルチプレックス PCR 法が利用できる。本法は 3 種類の EHEC 病原遺伝子 (*stx1*、*stx2*、*eae*) の保有も同時に判定できる。

①プライマー配列

0 血清群	標的遺伝子	プライマー配列 (F)	プライマー配列 (R)	PCR 産物の サイズ	参考 文献
0165	<i>wzx_0165</i>	GGCGTAAATAAAATATGGGGG	GCCCTCTAACAACGAATTGT	1042 bp	1)
0103	<i>wzx_0103</i>	TAAGTACGGGGTGCTTTTT	AAGCTCCCAGACGTATAA	716 bp	2)
0111	<i>wzx_0111</i>	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	AACGCAAGACAAGGCAAAAC	451 bp	2)
0157	<i>rfbE</i>	CAGGTGAAGGTGAATGTTGTC	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296 bp	3)
026	<i>wzx_026</i>	GGGGTGGGTACTATATTGG	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241 bp	2)
0121	<i>wzy_0121</i>	CAAATGGGGCTTAATACAGCC	TTCCACCCATCCAACCTCTAA	193 bp	1)
0145	<i>wzy_0145</i>	TTCGCGCACAGCATGTTAT	TACAATGCACCGCAAACAGT	132 bp	1)
	<i>eae</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881 bp	4)
	<i>stx2</i>	ATCCTATTCGGGAGTTTACG	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584 bp	5)
	<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCAAGG	CACCAGACAATGTAACCGCTG	348 bp	5)

②反応液組成

1) *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ) を使用した場合 (Total 30 μ l)

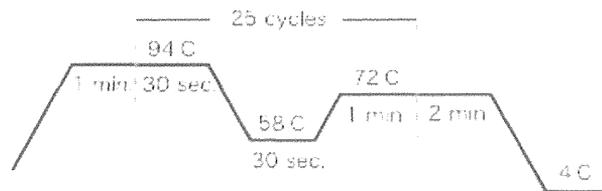
試薬など	組成 (μ l)
10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	3
dNTP Mixture (2.5mM each)	3
Primer (0157 と 0165)	(最終濃度 : 0.53 μ M)
Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度 : 0.13 μ M)
Primer (その他すべて)	(最終濃度 : 0.27 μ M)
<i>TaKaRa Ex Taq</i> (5units/ μ l)	0.2
Template DNA (精製 DNA の場合は 10 ng/ μ l)	2
PCR grade Water	(up to 30 μ l)

2) *KAPATaq EXtra* (日本ジェネティクス) を使用した場合 (Total 30 μ l)

試薬など	組成 (μ l)
5 \times <i>KAPATaq EXtra</i> Buffer (Mg ²⁺ free)	6
25mM MgCl ₂	3
dNTP Mix (10mM each)	0.9
Primer (0157 と 0165)	(最終濃度 : 0.53 μ M)

Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度 : 0.13 μ M)
Primer (その他すべて)	(最終濃度 : 0.27 μ M)
KAPATaq Extra DNA ポリメラーゼ (5U/ μ l)	0.16
Template DNA (精製 DNA の場合は 10 ng/ μ l)	2
PCR grade Water	(up to 30 μ l)

③反応条件



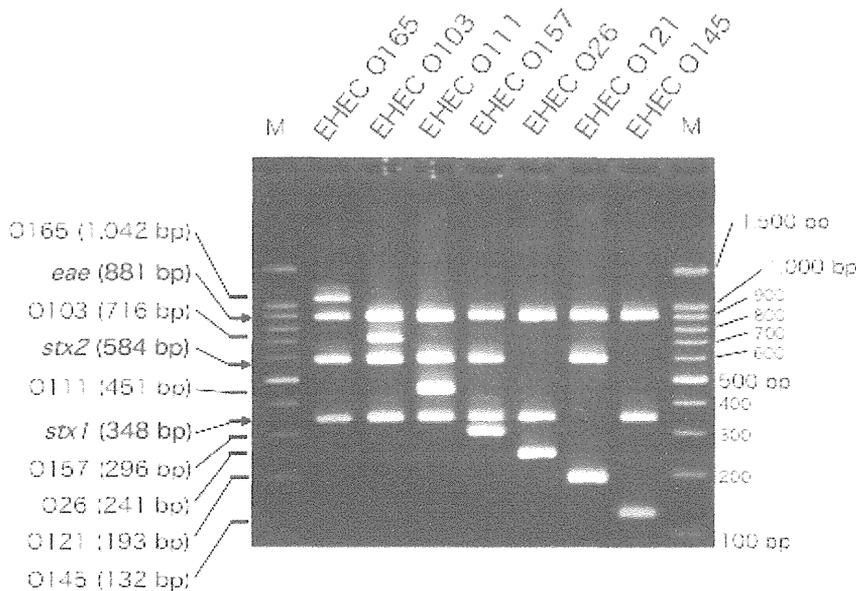
④電気泳動

増幅産物をゲル上で十分に展開して確認する。一例として、0.5×TBE buffer / 2% Agarose L03 (TaKaRa) / Mupid-2plus (100V) であれば、35～45 分間泳動する。

⑤泳動像

(PCR 反応液 2 μ l をローディングバッファーと混和して泳動)

反応液に加えたテンプレートDNA



⑥その他

- 1) 単離菌株のテンプレート DNA についてはキット等により精製した DNA に加え、アルカリボイル法、ボイル法 (10 分間)、菌体の直接添加 (コロニーPCR) でも判定できる。
- 2) 糞便や食品検体に含まれる EHEC も高濃度であれば本法で検出できるが、検体によっては非特異的バンドが出現するので注意が必要である。
- 3) *stx* サブタイプの検出能については、本編の表 3 (Cebula ら) を参考のこと。

- 4) 本手法の特異性や検出感度を改良したキット「EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (RR133A)」がタカラバイオから販売されている。

[文献]

- 1) 井口純、秋吉充子、吉崎美和. EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価. 第 35 回日本食品微生物学会学術総会要旨 p.65
- 2) Paddock Z, Shi X, Bai J, Nagaraja TG. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol.* 2012 156:381-8
- 3) Bertrand R, Roig B. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-application to municipal wastewater. *Water Res.* 2007 41:1280-6
- 4) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* 2000 68:64-71
- 5) 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 33:248-50

E. coli O-genotyping PCR

大腸菌 O 血清群 PCR 検査法-フルスクリーニング用

宮崎大学 農学部 畜産草地科学科 衛生微生物学分野 准教授 井口純

(2015. 2. 26 版)

はじめに

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は、原因細菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となり、重要な検査項目の一つとなっている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) (兼 WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*) により現在のところ O1 から O188 までが定められており、3 種類の垂型 (O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac) と 6 種類の欠番 (O31、O47、O67、O72、O94、O122) が認められている。ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌 (EHEC) の O 血清群は O157、O26、O111、O103、O145、O121、O165 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。国立感染症研究所の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なくとも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O 血清群が分離される事例も複数報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、過去に事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、検査現場では稀な O 血清群にも対応した検査法を備え、事例発生時に早期対応できる態勢を整えておくことが望まれる。しかし、SSI から販売されている O 血清群完全判定用抗血清試薬のセットは高価であるために地方衛生研究所などの検査現場で揃えることは経済的に難しい。国内メーカーからも抗血清試薬は販売されているが主要な 50 種類に限られている。また血清学的な凝集反応試験は、菌株によって交差反応や非特異的凝集、不凝集などが起こることも知られており、その不鮮明さや煩雑性の解消が課題となっている。

O 抗原の合成に関わる遺伝子 (10 から 20 個程度) は染色体上の特定遺伝子座にクラスター (O 抗原合成遺伝子領域) を形成している (図 1)。この領域における比較解析から、O 血清群の違いにより糖転移や糖鎖輸送に関わる遺伝子の相同性がオーソログ間で大きく異なることが知られている。近年ではこれら塩基配列の多様性を利用した、それぞれの O 血清群を特異的に判定できる遺伝学的手法 (PCR 法、リアルタイム PCR 法、ハイブリダイゼーション法など) が開発されている。しかしそれら手法の多くは病原大腸菌に関連性の高い一部の O 血清群のみを標的としたものであり、稀な O 血清群をカバーした網羅的な判定手法は存在しなかった。

宮崎大学・農学部・井口研究室のグループは、大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の網羅的な比較解析結果を基に (図 2、図 3)、ほぼ全ての O 血清群を遺伝学的に判定出来る PCR 検査法 (*E. coli* O-genotyping PCR) を開発した。本法は 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR キットで構成されており (図 4)、O 血清群全参考株を用いた評価によってその特異性と妥当性が確認された。本法は分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられる。

材料と方法

①試薬など（井口研で使用しているもの）

- ・ プライマー：北海道システムサイエンス、簡易カラム精製（TE バッファーで希釈）
- ・ PCR 反応試薬：KAPATaq Extra PCR Kit（KK3009、日本ジェネティクス）
- ・ DNA 精製キット：Wizard Genomic DNA purification kit（プロメガ）
- ・ サーマルサイクラー：GeneAmp PCR システム 9700（アプライドバイオシステムズ）または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch*（タカラバイオ）
- ・ 電気泳動槽：Mupid-exu
- ・ 泳動用ゲル：agarose L03（5003、タカラバイオ）
- ・ ローディングバッファー：10× Loading Buffer（9157、タカラバイオ）
- ・ サイズマーカー：GeneDirex 100bp DNA Ladder RTU（GeneDirex 社）

②テンプレート DNA の準備

- ・ キットによる精製 DNA の場合、10ng/ μ l に調整したものを使用（長期保存する場合には精製した DNA が望ましい。-20°C で保存）
- ・ アルカリ熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる。

アルカリ熱抽出

LB プロス培養液（o/n）200 μ l を 10,000g -10min 遠心、上清除去

50mM NaOH 170 μ l を添加

100°C-10min 加熱

1M Tris-HCl（pH7.0）30 μ l を加え、3-4 回タッピング

10,000g-10min 遠心

上清をテンプレート DNA として使用

- ・ 熱抽出で準備した DNA でも良好な結果が得られる（長期保存には適していない）

熱抽出

LB プロス培養液（o/n）1,000 μ l を 10,000g -10min 遠心、上清除去

TE バッファー250 μ l を添加

100°C-10min 加熱

10,000g-10min 遠心

上清をテンプレート DNA として使用

③プライマー

表 1 および表 2 参照

④反応液組成

	X1	X22
PCR grade water	14.42	317.24
5x KAPA Extra Buffer (without Mg2+)	6	132
MgCl ₂ (25 mM)	3	66
dNTP mix (10 mM each dNTP)	0.9	19.8
multiplex primer mix (表 2 参照)	3.52	(各 3.52)
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/ml)	0.16	3.52

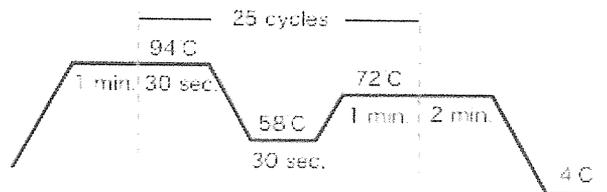
Template DNA	2	44
Total	30 μ l	30 μ l

*フルスクリーニング (MP-1~MP-20 + gyrB + ネガコン、計 22 反応チューブを使用) を行う場合は、プライマーを除く反応液 (X22) を調整し、PCR 反応チューブに 26.48 μ l ずつ分注後、プライマーミックス 3.52 μ l を加える。

*gyrB プライマーも 3.53 μ l/反応チューブに調整済み

⑤反応条件

図 5、全反応に対して統一した反応条件



⑥電気泳動

- 0.5×TBE buffer / 2% アガロースで、35~45 分間泳動する。
(増幅産物がゲル上で十分に展開できれば、他の方法でも問題無い)
- PCR 反応液 2 μ l をローディングバッファーと混和して泳動する。

⑦増副産物の確認

エチジウムブロマイド (1 μ g/ml) 200ml で染色 (10 分間)、水洗 (10 分間) 後、UV トランスイルミネーター上で確認する。PCR 産物サイズと Og タイプの対応は表 2 参照。

⑧その他

- 十分に単離された菌株を使用する。
- 判定結果は Og タイプ (OgXX) で表記する。
- OgXX と O 血清群の対応は 1 対 1。OgGpXX と O 血清群の対応は表 1 参照。
- プライマーは 96 穴プレートに 100 μ l 程度小分けしたものを準備しておくで効率よく反応液の調整が行える。乾燥やコンタミには注意。井口研での操作手順は下図の通り。

図 6

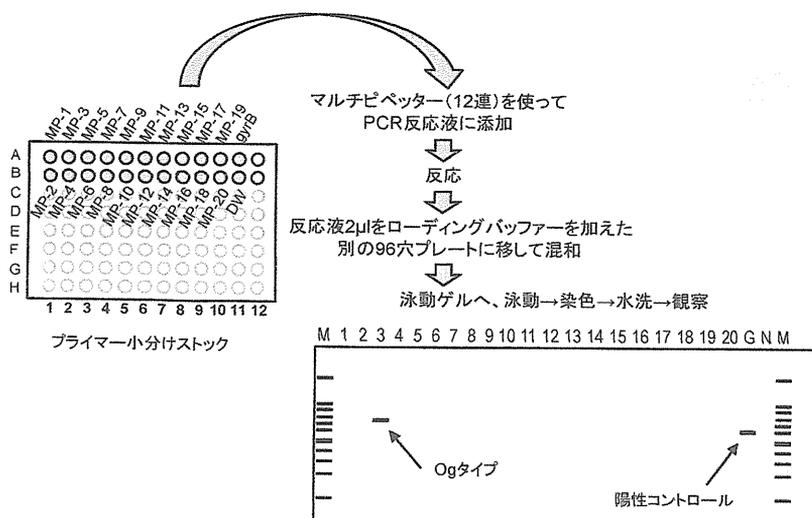
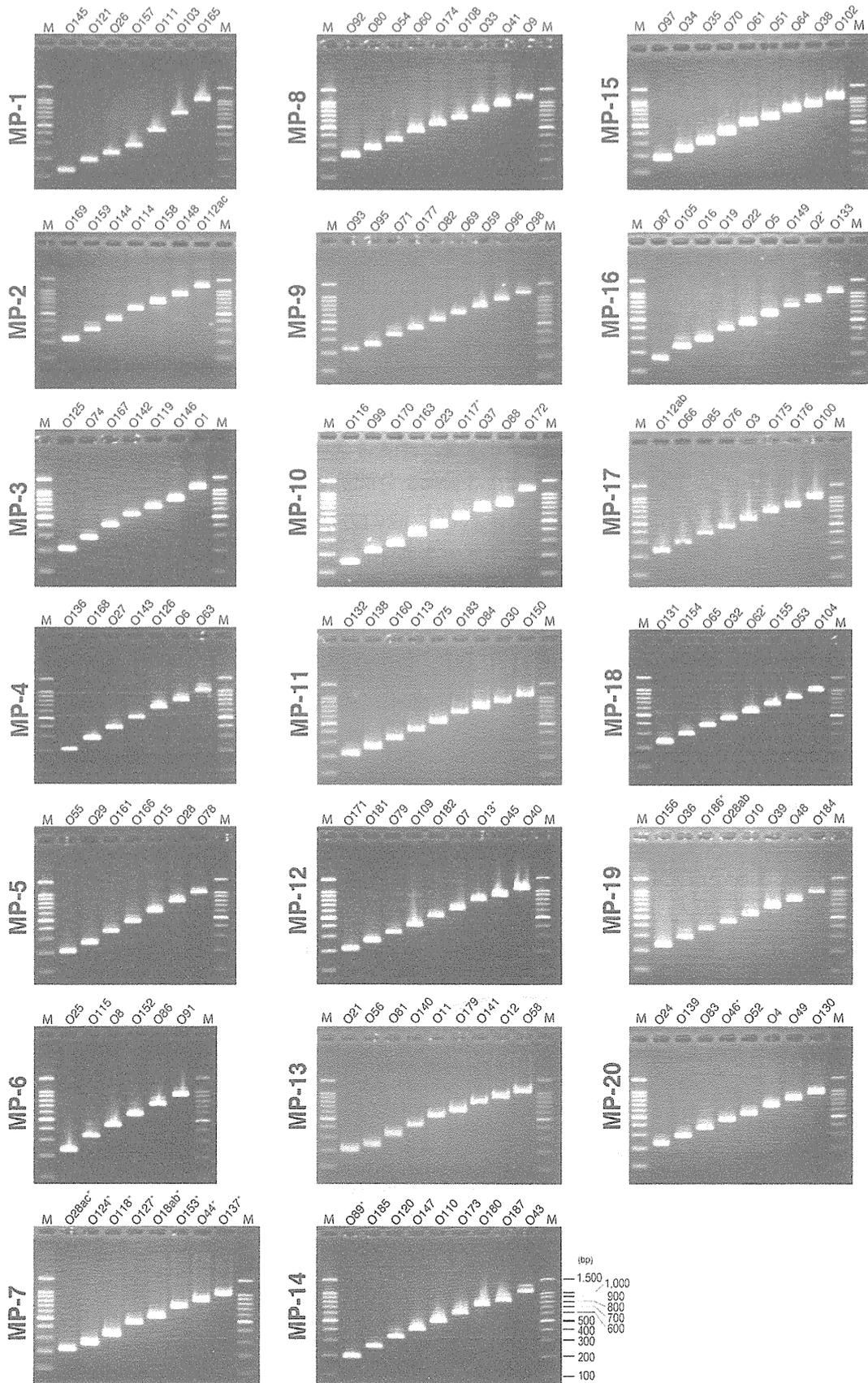


図 7、MP-1 から MP-20 の泳動パターン



⑨参考文献

Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. DNA Research 22(1):101-7 (2015)

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. Journal of Clinical Microbiology (Accepted)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic <i>E. coli</i> Working Group in Japan	<i>Escherichia coli</i> O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping	Journal of Clinical Microbiology	In press		
Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR	A complete view of the genetic diversity of the <i>Escherichia coli</i> O-antigen biosynthesis gene cluster	DNA Research	22	101-107	2015
Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N	Identification of O-serotypes, -genotypes and virulotypes of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> isolates including non-O157 from beef cattle in Japan	Journal of Food Protection	8	1269-1274	2014
von Mentzer A, Connor T, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A, Sjöling A, Dougan G	Identification of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC) clades with significant long-term global distribution	Nature Genetics	46	1321-1326	2014