

資料 1

EHEC 検査・診断マニュアル 原稿（案）

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	GCCCTCTAACAAACGAATTGT	1042 bp	1)
0103	<i>wzx_0103</i>	TAAGTACGGGGTGCTTTTT	AAGCTCCCAGCAGCTATAA	716 bp	2)
0111	<i>wzx_0111</i>	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	AACGCAAGACAAGGCAAAAC	451 bp	2)
0157	<i>rfbE</i>	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296 bp	3)
026	<i>wzx_026</i>	GGGGTGGGTACTATATTGG	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	241 bp	2)
0121	<i>wzy_0121</i>	CAAATGGGCGTTAATACAGCC	TTCCACCCATCCAACCTCTAA	193 bp	1)
0145	<i>wzy_0145</i>	TTCGCGCACAGCATGGTTAT	TACAATGCACCGCAAACAGT	132 bp	1)
	<i>eae</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881 bp	4)
	<i>stx2</i>	ATCCTATTCCCGGAGTTTACG	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584 bp	5)
	<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	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 μl）

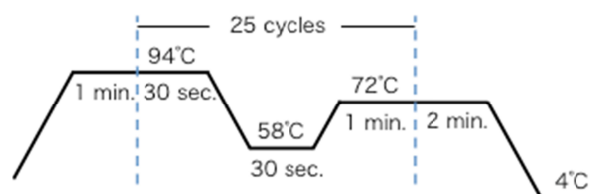
試薬など	組成（μl）
10 × Ex Taq Buffer	3
dNTP Mixture (2.5mM each)	3
Primer (0157 と 0165)	(最終濃度：0.53 μM)
Primer (<i>stx1</i> と <i>stx2</i>)	(最終濃度：0.13 μM)
Primer (その他すべて)	(最終濃度：0.27 μM)
TaKaRa Ex Taq (5units/μl)	0.2
Template DNA（精製 DNA の場合は 10 ng/μl）	2
PCR grade Water	(up to 30 μl)

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

試薬など	組成（μl）
5 × KAPATaq EXtra 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 μM)

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

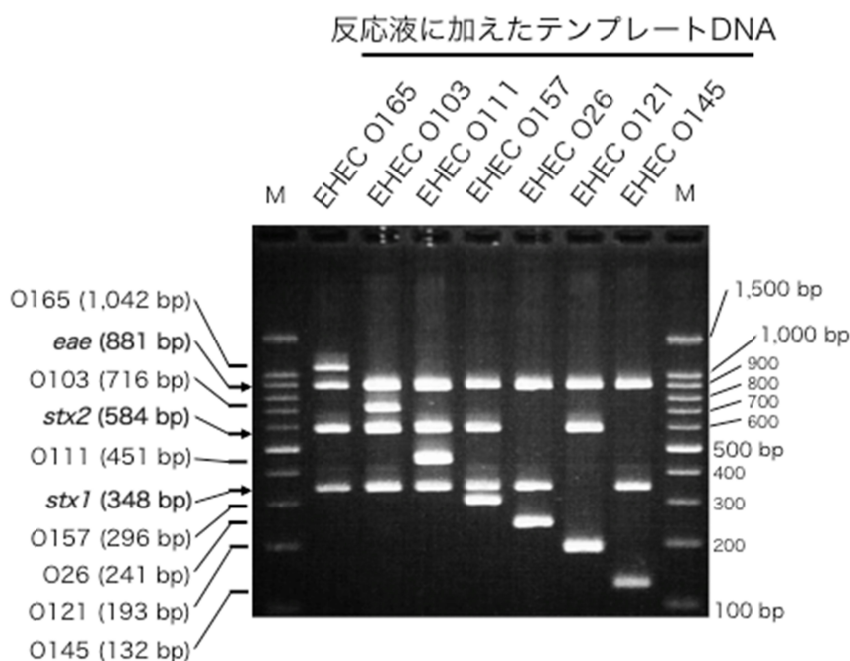


④電気泳動

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)



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、アルカリポイル法、ポイル法 (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 (0 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 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145, and 0157 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* 0157-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 0157: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)、ほぼ全ての大腸菌 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。

O抗原コード領域

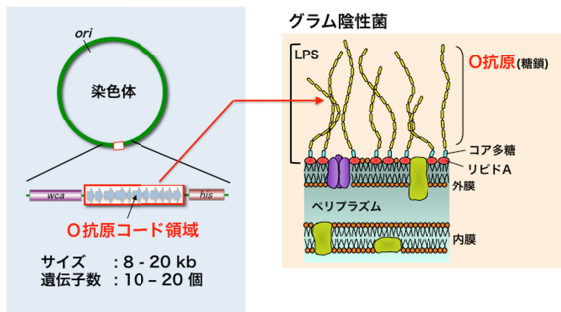


図1

O抗原コード領域のグループ化

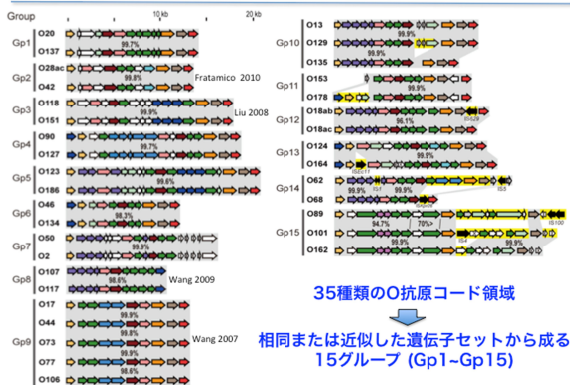


図2

表現型と遺伝子型の関係

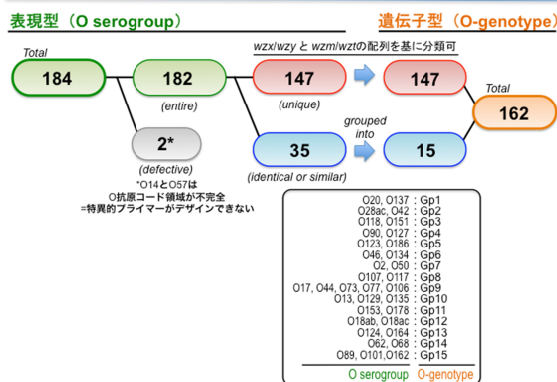


図3

マルチプレックスPCRのデザイン

162種類の O-genotype に特異的なPCRプライマーをデザイン

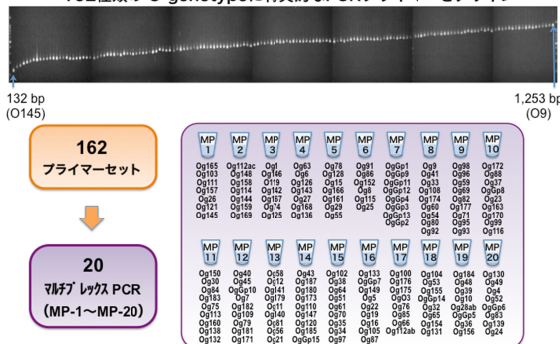


図4

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：KAPA Taq 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/μl 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℃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 ブロス培養液 (o/n) 200 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去

50mM NaOH 170μl を添加

100℃-10min 加熱

1M Tris-HCl (pH7.0) 30μl 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 ブロス培養液 (o/n) 1,000 μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去

TE バッファー250 μl を添加

100℃-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/μl)	0.16	3.52

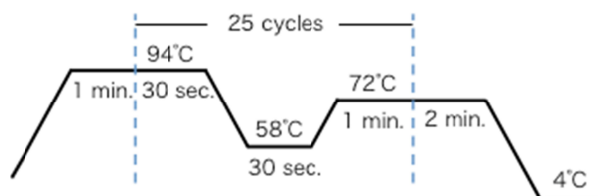
Template DNA	2	44
Total	30 μ l	30 μ l

*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 0g 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 0g タイプ (0gXX) で表記する。
- 0gXX と 0 血清群の対応は 1 対 1。0gGpXX と 0 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

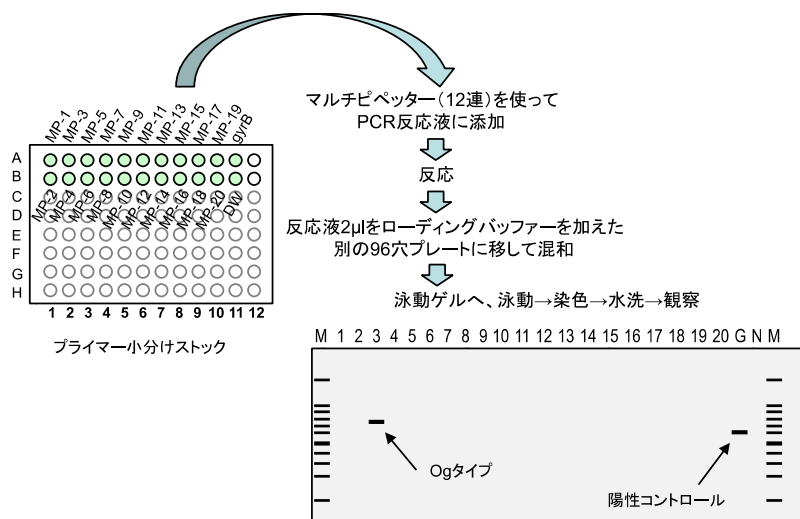
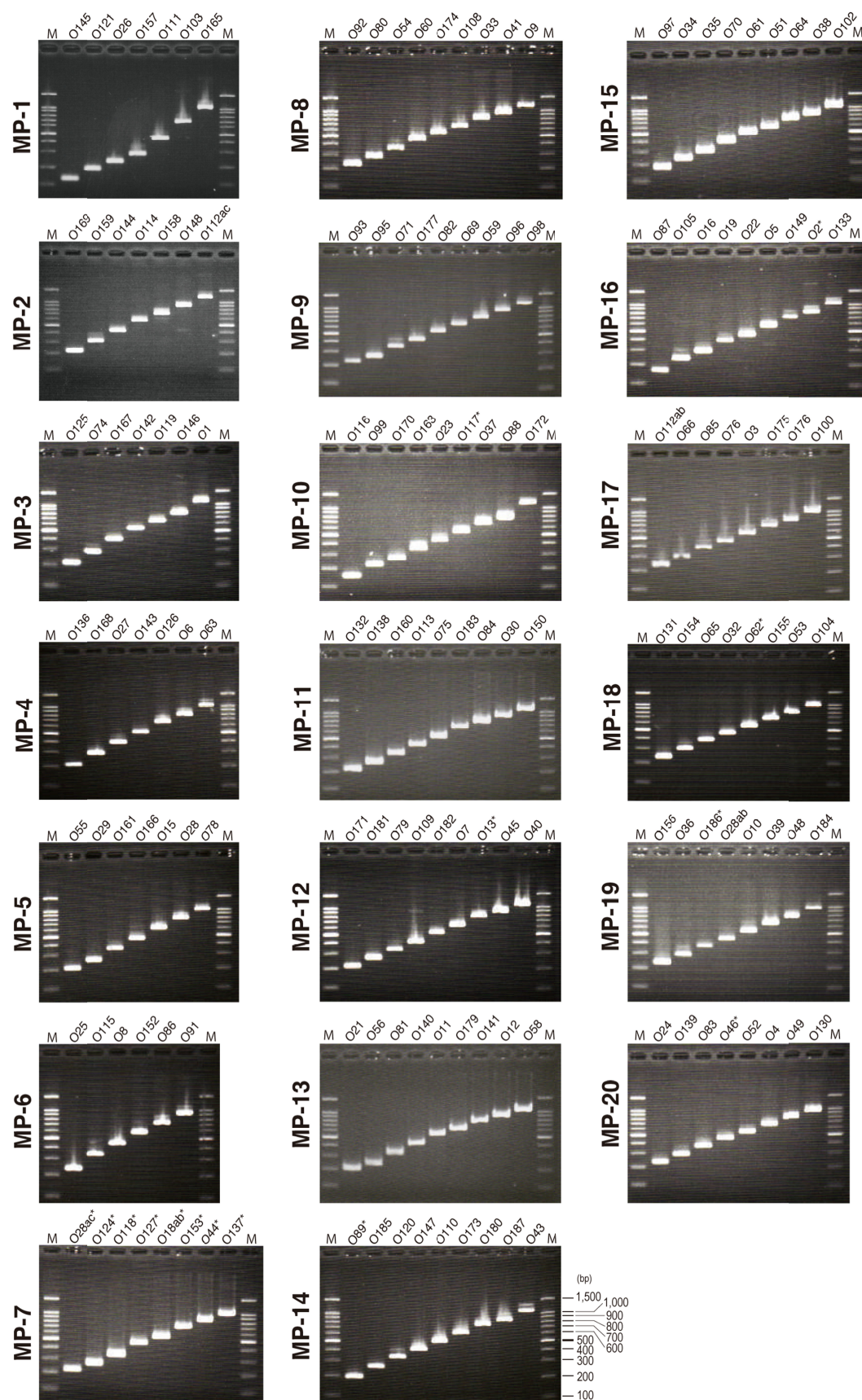


図7、MP-1 から MP-20 の泳動パターン



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)