

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

令和元年度 分担研究報告書

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

研究分担者	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	森本 洋	北海道立衛生研究所
	小川 恵子	北海道立衛生研究所
	三津橋 和也	北海道立衛生研究所
	石黒 真琴	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	青森県環境保健センター
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	樫尾 拓子	秋田県健康環境センター
	山下 裕紀	岩手県環境保健研究センター
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山谷 聡子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	大下 美穂	仙台市衛生研究所
	菊地 理慧	福島県衛生研究所
	木村 有紀	新潟県保健環境科学研究所
	山本 一成	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

平成 30 年 6 月 29 日付事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により遺伝子検査手法は MLVA 法に統一化するように通知されていることから、北海道・東北・新潟ブロック内の地方衛生研究所における腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法の構築のため、MLVA に特化した精度管理の実施及び技術研修会を開催した。また研修会において、MLVA トラブルシューティング集が必要との参加者の一致した見解により、ブロック内の「EHEC MLVA フラグメント解析判定事例集」案を作成した。

精度管理は、血清型 VT 型の異なる 4 株について MLVA の結果を求め、国立感染症

研究所における解析結果と比較することで行った。ほとんどが一致する結果となったが、ピークと判定すべき遺伝子座において、ピーク検出閾値以下であったため「-2（ピークなし）」とした施設があった。また、研修会では、MLVA 技術研修のほか、「2019年度の全国の MLVA の検査状況及び広域発生事例等の講演」、「精度管理の結果報告」及び「事例発表」を行い、情報共有を図った。その中で、MLVA 導入後の解析データに対する細かな疑問に対するトラブルシューティング集作成の要望があった。また、解析データから検出された Complex 等の解釈は、疫学情報を鑑みて総合的な判断が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

ブロック内の地方衛生研究所（以降、地衛研）で、腸管出血性大腸菌（以降、EHEC）の MLVA を実施しているのは 11 施設中 6 施設で、3 施設が来年度導入予定である。MLVA 導入直後は、解析データを閲覧することに慣れていないことから細かな疑問が生じ、結果に影響することも考えられる。

そこで、MLVA の精度確保の取組を促し信頼性を確保することを目的に、精度管理を実施した。

また、MLVA 実施に伴う疑問を解決し、MLVA を実施しない地衛研においては、国立感染症研究所（以降、感染研）から送付される結果の解釈の理解を目的に、総合的な MLVA 技術研修会を開催した。

## B 研究方法

1. 「令和元年度北海道・東北・新潟ブロックの腸管出血性大腸菌 MLVA の精度管理」の実施

1) 参加は任意とし、7 施設が参加した。

MLVA を実施している 6 施設と来年度から実施予定の 1 施設であった。

2) 試料は、岩手県内で 2018 年～2019 年に分離した EHEC4 菌株の DNA 抽

出液を、参加希望の施設に送付した。

① O157VT1VT2

② O157VT2

③ O26VT1

④ O111VT1

3) 検査方法は、各施設で実施している方法で行い、各 17 遺伝子座の繰り返し配列数を報告することとした。

4) MLVA に使用する試薬や機器、検査で苦慮していることについてアンケートを実施した。

5) 各施設の結果を感染研の結果と比較することで解析した。

2. 「令和元年度北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会」の開催

1) 日時：

令和 2 年 1 月 16 日 13:30～17:15

令和 2 年 1 月 17 日 9:00～12:00

2) 場所：岩手県環境保健研究センター

3) 参加者：10 地衛研 11 名

岩手県環境保健研究センター 3 名

4) 内容

① 「フラグメント解析用ソフトウェア GeneMapper を用いた腸管出血性大腸菌の MLVA データ解析」

講師 ライフテクノロジーズジャパン  
草野 順子

②「腸管出血性大腸菌の MLVA 法について」

講師 国立感染症研究所  
細菌第一部室長 泉谷 秀昌

---資料 1---

③ 精度管理の結果報告

④ 事例発表

MLVA を実施しての疑問点、MLVA の結果が有益だった事例、腸管出血性大腸菌による集団感染事例などについて演題を募集し下記の3演題申込があった。

今年度、全国で広域発生した食中毒疑い事例において、原因食品と推定されたシマチョウの検査を実施した2つの地衛研からそれぞれ事例発表があった。

---資料 2---

「O157VT2 による広域事例における食品検査について」

新潟市衛生環境研究所 山本一成

仙台市衛生研究所 山田香織

また、今年度から MLVA を実施し、判定に苦慮する6事例を経験した北海道立衛生研究所から報告があった。

---資料 3---

「当所における MLVA 状況とその結果の共有」

北海道立衛生研究所 三津橋和也

⑤泉谷先生から講評

C. 研究結果

1. MLVA の精度管理

①O157VT1VT2 については、7 地衛研

が一致した。②O157VT2 については、遺伝子座 O157-34 が、③O26VT1 と④O111VT1 については、遺伝子座 O157-34 と遺伝子座 O157-9 が1施設だけ報告がと異なっていた。(表1)

アンケートの結果は、全ての施設でポリマーやバッファーなどの消耗品は、施設内で共有しており、シークエンサーも共有していることから、使用の日程調整などに苦慮していた。また、解析データの閲覧でも Bin からずれる、低いピークをピークととるか等苦慮していた。

2.腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会

1) 基本的な GeneMapper の操作について

PC を使用しての操作実習はできなかったが、配布資料に沿って操作の説明があった。概要は下記のとおり。

① Bin の設定について

GeneMapper に解析の条件を設定する必要がある。感染研が専用の解析ファイルを配布している。すでに解析してあるので詳細なところまで設定してある。ただし、装置に多少個体差があり、微調整が必要な場合もある。また、古いバージョンである場合コピーできないこともある。Panel ファイルとは、各遺伝子座（マーカー、ローカスとも）の名前、プライマーについている蛍光色素、リピートサイズから予想されているサイズの領域の情報である。Bin Set ファイルとは、アレルピークの判定範囲のことでマーカー内にいくつか設定してあるので Bin Set と呼ばれる。Analysis Method に Bin Set をあてて解析条件を設定する。

3500 と SeqStudio の bin セットは装置によって泳動が違うので、別の bin セットとなる。

## ② 小さなピークについて

ピーク検出閾値は、デフォルトで 50 に設定されている。設定値を大きくしてノイズを読むことを避けることができる。

増幅効率の高い PCR 試薬

(Platinum MultiplexMaster Mix : ThermoFisher) に変えることで、小さなピークが改善された。

## ③ Bin から外れる場合

サイズから小さく (左に) 外れるのは、ポリマーやキャピラリーなどの消耗品が劣化し分離能が悪くなって、泳動が早まることから、サイズが小さくなることもある。消耗品を確認し、それでも bin からずれている場合は既知のサンプルを流して bin を補正し再設計する必要がある。

<参考>セプタを使いまわす場合は、よく洗浄して使用し、定期的に新しいものと交換することをお勧めする。キャピラリーの液だれを切る役目をするので、キャピラリーの先に汚れが付きデータに影響を与える。

## 2) 「腸管出血性大腸菌の MLVA 法について」

感染研で解析している全国の EHEC の MLVA について、広域散発事例など最新情報について講演があった。主検査方法については安定した条件をみつけることが重要とのことである。また、菌株解析の結果、解析データから検出された Complex 等の広域事例について

は時期や地域などの疫学情報が合致することが重要であるということである。

なお、東北地方で赤痢の広域散発事例が発生したことから、その事例についても情報提供していただいた。2018 年の集団事例と、2019 年の東北地方の散発の MLVA 型は同じか 1 ローカス違いで、原因が不明であるので今後も発生の可能性が危惧されるとのことである。

## 3) 精度管理の結果報告

結果について、研修参加者全員で原因や対策を話し合える場ができた。

## 4) 事例発表

新潟市では、シマチョウ 500 g 検体が届き、解凍するのを待って 25 g ずつ採取し 20 検体検査を行った。食安監発 1120 第 1 号 (平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」により増菌培養を、衛生検査指針により直接塗抹培養検査を実施した。直接塗抹培養は陰性、増菌培養では 8 件 PCR 陽性、そのうち免疫磁気ビーズ法で 3 検体 EHEC が分離されたが、O157 は 1 検体で、VT1,2 だった。感染研では O157vt2、19m0488 と型別された。

仙台市では、2 事例の検体が搬入された。1 事例目は陰性、増菌培地はノボビオシン添加と添加しない培地を使って 36°C で培養 (損傷菌) し、遺伝子も菌も陰性であった。検査は終わったがさらに国立医薬品食品衛生研究所からアドバイスをもらい蘇生培養を実施 (37°C 2 時間 → 42°C 培養) した。遺伝

子は検出されたが、菌は陰性であった。2事例からは同様に検査し O157vt2 が分離された。シマチョウの免疫磁気ビーズ法は脂が多くて苦勞した。自然に沈んだビーズで検査実施している。

北海道立衛生研究所からは、これまで経験した MLVA の 6 事例（ダブルピーク、トリプルピーク、Bin からのずれ、新しい Bin の作成、低いピーク等）に感染研と相談して解決した事例について発表があった。

情報交換する中、MLVA トラブルシューティング集が必要との参加者の一致した見解により、ブロック内で

「EHEC MLVA フラグメント解析判定事例集」案を作成することとなった。様式は追加できるようパワーポイントのスライド 1 枚に事例をまとめることとした。様式作成は北海道が担当した。

---資料 4---

#### D. 考察

今回初めて、ブロック内で MLVA の精度管理を行った。感染研における解析結果と比較し、ほとんどが一致する結果となったが、ピークと判定すべき遺伝子座において、ピーク検出閾値以下（100 と設定）であったため「-2（ピークなし）」とした施設があった。そのピークと判定すべき遺伝子座は、O157-9 と O157-34 で、O157-34 は出現頻度が 99%以上の遺伝子座であることから、「-2」とはならない。解析するうえで、各遺伝子座の特徴を知っておくことも重要であると考えられた。

また、ピークが低い場合、増幅効率の高い PCR 試薬で実施することで改善

するとの感染研から情報提供があったので、Platinum MultiplexMaster Mix : ThamoFisher を配布し効果を確認する予定である。

また、今年 2 回目となる技術研修会は、MLVA 導入のための研修のほか、MLVA 導入後苦慮していることに対応する総合的な研修会を目指した。参加者の協力のもと、トラブルシューティング集案を作成した。また、今年度発生した EHEC の広域散発食中毒疑い事例と東北地方において発生した赤痢の広域散発事例について概要を訊くことができ、有意義な研修会となった。

#### E. 結論

今回、MLVA に特化した精度管理の実施及び技術研修会を開催した。しかし EHEC の分子疫学解析法は PFGE 及び IS-Printing System も利用されている。特に PFGE は薬剤耐性菌、サルモネラ属菌やレジオネラ属菌において利用されている。これらの検査法についても、精度管理が必要であると考えられた。

また、MLVA について信頼性の確保された結果を出すことだけでなく、解析データから導き出された Complex などの解釈についても知っておくべきと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 精度管理結果

	報告施設数	EH111 -11	EH111 -14	EH111 -8	EH157 -12	EH26 -7	EHC -1	EHC -2	EHC -5	EHC -6	O157 -3	O157 -34	O157 -9	O157 -25	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	MLVA備考
※1必ずピーク		○		○	○		○	○				○		○		○			
※2プラスミド										プラスミド							プラスミド	プラスミド	
複数ピーク										複数ピーク			複数ピーク					複数ピーク	
ピーク低め				ピーク低め								ピーク低め	ピーク低め						
binからずれやすい		binずれ			binずれ														
① O157VT1,2	7	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	11	11	15	7	9	6	3	6	
② O157VT2	6	2	-2	1	1	-2	7	4	7	-2	-2	9	11	4	3	5	5	8	
	1	2	-2	1	1	-2	7	4	7	-2	-2	-2	11	4	3	5	5	8	
③ O26VT1	6	2	1	1	2	3	12	9	-2	-2	-2	1	10	2	-2	1	-2	-2	
	1	2	1	1	2	3	12	9	-2	-2	-2	-2	-2	2	-2	1	-2	-2	
④ O111VT1	6	4	1	5	2	-2	12	9	2	3	-2	3	12	2	-2	1	-2	6	EHC-6:3と10のピーク有
	1	4	1	5	2	-2	12	9	2	3	-2	-2	-2	2	-2	1	-2	6	EHC-6:3と10のピーク有

※1 O157、O26、O111においてピークの出現頻度が99%以上（2017～2018年）の遺伝子座

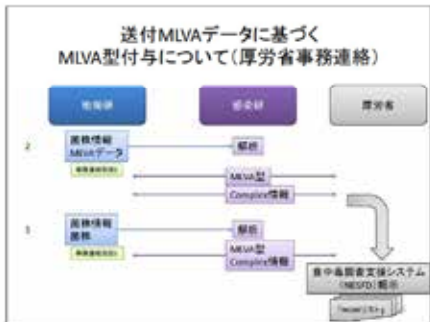
※2 プラスミドがあると考えられている遺伝子座

表2 アンケート結果

PCR反応		施設数	シーケンサー		施設数
試薬	QIAGEN Multiplex PCR kit	6	機種	3500	6
	Platinam Multiplex PCR Master Mix	1		SeqStudio	1
反応液量	25μL	5	ポリマー等	ウイルスと共有	7
	20μL	1		EHEC専用	0
	15μL	2			
希釈倍率	100倍	2	苦慮していること		
	80倍	1	シーケンサー	使用の日程調整	
	50倍	2		ウイルス担当から借りて実施していること	
	50倍と100倍	2	MLVA結果解析	リピート数の算出方法	
		Binから外れる、追加方法			
			業務	ダブルピーク	
				食中毒事例と重なる時期の、MLVA検査時間の確保	



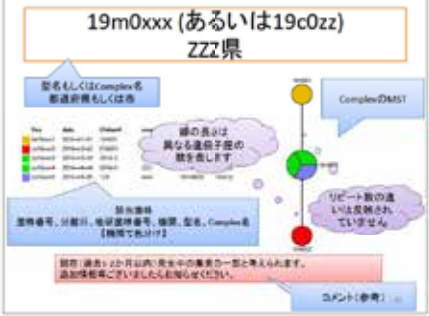




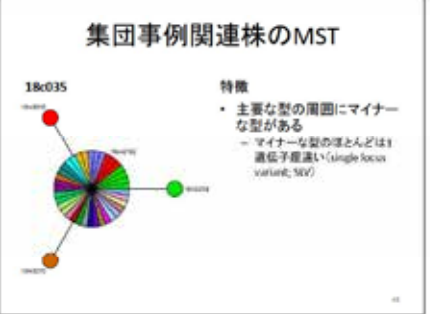
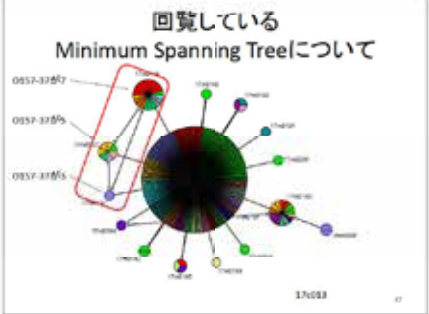
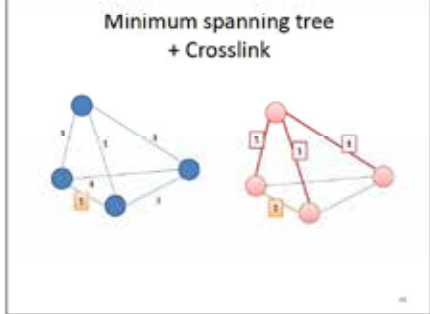
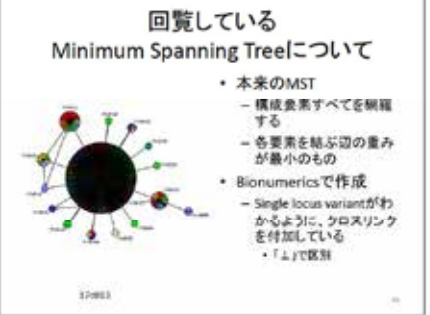
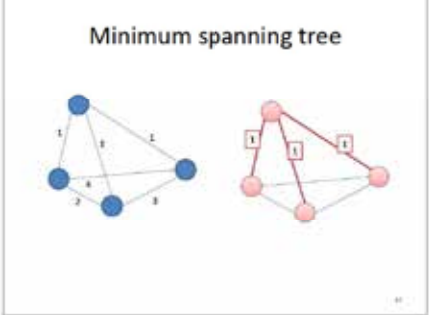
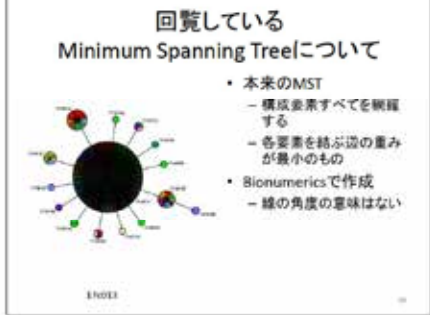
### NESFD

- ### 別添の菌株情報
- 別添1**
    - 発症日
    - 分枝目
    - 都道府県・市町村
    - 施設番号
    - 年齢・性別
    - 疫学情報
    - 症状
    - 毒素型
    - 入手先(発症名)
    - 自治体名
  - 別添2**
    - 別添1の情報
    - MLVA17カ所のリピート数

- ### MLVA結果お知らせにあたって
- 集団事例・広域事例について
  - 同タイプ、もしくは同Complexに該当する菌株の一覧
  - 3タイプ以上からなるComplexの場合には Minimum Spanning Tree (MST) の添付
  - コメント



- ### 昨年度から変わっている点
- Chicken#**
    - 地方衛生研究所からの菌株番号
    - 日本語フォントは対応していないので「@#%」などに置換される
  - 番号**
    - 平成30年度事務連絡に基づくMLVA型番号
    - 地衛研から送付されるMLVAデータ(別添2ファイル)につけられる感染研番号



- ### (広域)集団事例の例
- 2019年
    - 養老チキン店(0157)
    - ホテル(0157)
    - 群衆施設(0157)
    - バーガー店(0121)
  - 2017年
    - ホテル(0157)
  - 2016年
    - ホテル(0157)
    - ホテル(0157)
    - ホテル(0157)
  - 2014年
    - ホテル(0157)
    - ホテル(0157)
    - ホテル(0157)
  - 2013年
    - ホテル(0157)
  - 2012年
    - ホテル(0157)
  - 2011年
    - ホテル(0157)
  - 2010年
    - ホテル(0157)
  - 2009年
    - ホテル(0157)
  - 2008年
    - ホテル(0157)
  - 2007年
    - ホテル(0157)

### 2019年2月に同一系列の焼き肉店で発生した腸管出血性大腸菌O157食中毒事例について(事例の概要)

同一系列の焼き肉店を2月9日から2月12日にかけて利用し、下痢、嘔吐等の症状を呈する者の14名の便から、腸管出血性大腸菌O157(VTL2)が8名検出されたことが判明しました。このうち、3月11日までに判明した13名の便より分離された菌株の遺伝子型が全て一致しています。国立感染症学研究所等において、系列店で保管されていたハラス及びその関係材料を検査したところ腸管出血性大腸菌O157を検出し、患者便と遺伝子型が一致しました。このハラスは、有症者の多くが喫食しており、当該系列店のみに提供されてきました。当該系列店の焼き肉店は2月25日より全店舗の営業を自粛しています。現在までに公表された調査結果は以下の通りです。なお、現時点で事犯な患者は認められておりません。

### 2019年2月に同一系列の焼き肉店で発生した腸管出血性大腸菌O157食中毒事例について(事例の概要)

日付	内容	備考
2019年2月25日	神戸市内の店舗の食中毒について	神戸市衛
2019年2月26日	八王子市内の店舗の食中毒について	八王子市衛
2019年3月1日	奈良県内の店舗の食中毒について	奈良県衛 リンク切れのため参照していません
2019年3月2日	徳島県内の店舗の食中毒について	徳島県衛 リンク切れのため参照していません
2019年3月4日	茨城県内の店舗の食中毒について	茨城県衛 リンク切れのため参照していません
2019年3月25日	腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例について(事例の概要)について	厚生労働省(2019年3月25日)



### 2019年検出数上位MLVA型

MLVA型	菌株数	検出	検出	検出	検出	クロスリンク
0157	1592	673	0.995	0.97-0.99		
026	456	209	0.979	0.984-0.99		
0111	126	70	0.957	0.92-0.98		

### 菌株解析の結果について

★

疫学情報 菌株情報

菌株同士が、...

- ある程度以上異なる場合
  - 異なる由来(汚染源)の可能性が高い
  - 複数汚染の可能性を排除しない
- 一致もしくは類似している場合
  - 共通の汚染源による可能性が高い
  - ただし、共通の汚染源を保証しているわけではない

菌株情報(分子疫学解析の結果)と疫学情報とで相互にフォローアップし、情報が合致することが重要

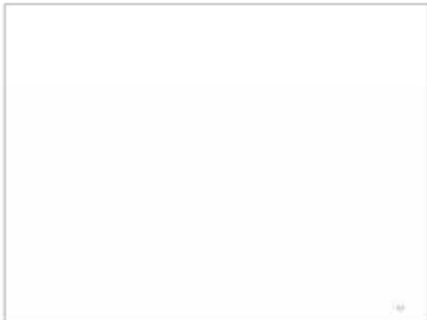
### 広域事例解析

分子疫学的に一致のもの

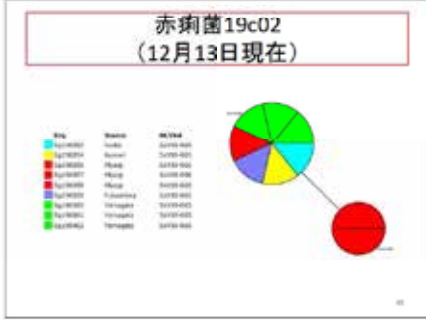
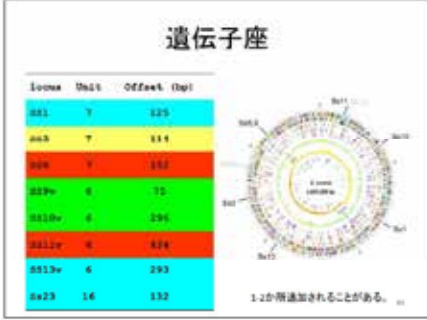
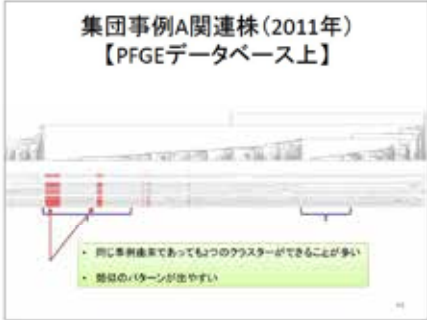
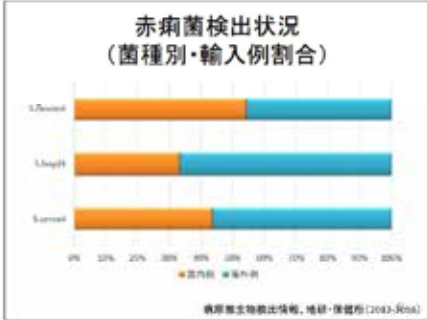
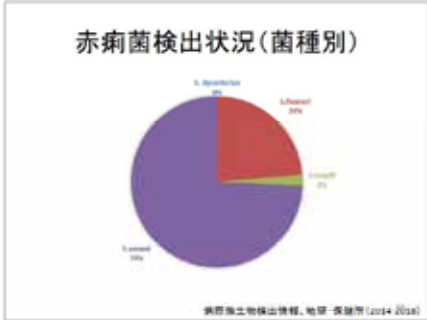
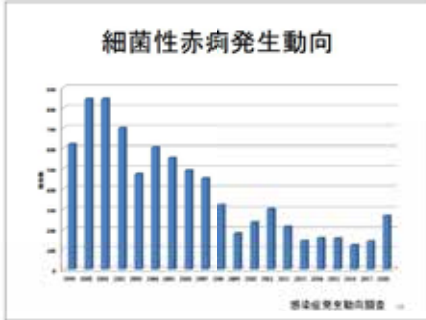
時間的に一致のもの

地域的に一致のもの

一致のもの



### 赤痢菌流行について



# 0157vt2による広域疑い事例における食品検査について

新潟市衛生環境研究所  
山本 一成

## 本日の内容

- 背景
- 検査法
- 結果
- まとめ

## 背景

•患者  
職場の保健検査にて0152vt2 (MLVA 19m0487)  
焼肉チェーンKの新潟K店利用

•園からのメール  
新潟K店に患者が喫食したシマ鍋と同一Lotの  
保管品あり

取返し、MLVAまで検査を実施

## 検査法

- 直接塗抹培養  
衛生検査指針に準拠
- 増菌培養  
食安監業 1120 第 1号 (平成26年11月20日)  
『腸管出血性大腸菌O26, O103, O111, O121,  
O145及びO157の検査法について』に準拠

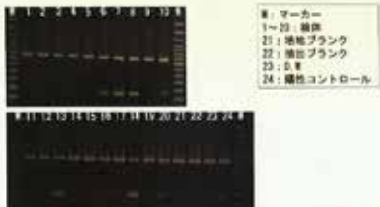
## 検査法 (直接塗抹培養)



## 検査法 (増菌培養)



## 結果 (VT遺伝子)



## 結果 (VT遺伝子)



## 結果 (増菌培養)

No. 8 O168 H8 VT1, 2  
No. 17 O26 H11 VT1 (MLVA 19m2157)  
No. 18 O157 H7 VT1, 2 (MLVA 19m0488)



## まとめ

- 20検体中8検体よりVT遺伝子が認められた
- 遺伝子検出8検体中3検体よりEHECが分離された

ご清聴ありがとうございました

## 腸管出血性大腸菌 O157 VT2による 広域発生疑い事例における食品検査 について

2020年1月17日(金)  
仙台市衛生研究所 山田

### 広域発生疑い事例に係るEHEC O157 VT2感染症の 発生状況 (仙台市)

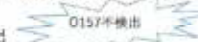
飲食店A利用者：2名 (1グループ)  
MLVA type 19m0488

飲食店B利用者：3名 (2グループ)  
MLVA type 19m0487, 19m0488  
(各グループで異なるMLVA Type)

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

- 検体情報  
冷凍牛シマチョウ2検体(1店舗)  
ロット：賞味期限2020.09.24  
重量：524 g/1袋、523 g/1袋
- 依頼項目：EHEC O157

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

**検査法Ⅰ**：食安監発1120第1号（平成26年）に準拠  
【サンプリング】  
25g、各1 Sample  
【増菌法】  
検体25g+mEC / ノボピオシン加mEC (NmEC) 225g (10倍希釈)  
→36°C、22時間培養  
【遺伝子検査】  
カラム精製 (NucleoSpin Tissue:TaKaRa)  
↓  
Realtime PCR法によるVT遺伝子およびO157/O26遺伝子検査  
↓  
VT/O26遺伝子検出 

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

**【培養検査】**  
① mECおよびNmEC増菌培養液(直接法)  
② O157免疫磁気ビーズによる濃縮(濃縮法)  
↓  
分離平板5種 (DHL,CTS,Smac,CHS,CH O157) に塗抹・培養  
↓  
ひたすらコロニー釣菌 (300以上) するが分離できず  
↓  
**EHEC O157陰性**

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

**検査法Ⅱ**  
原因究明のための検査法検討を追加実施  
  
・国立医薬品食品衛生研究所へアドバイスを求めた  
・結果の如何にかかわらず、依頼課へ追加検査の結果についても報告することとした

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

**【増菌法】**  
サンプリング量25g+mEC / NmEC 100g (5倍希釈)  
→20~25°Cで2~3時間の蘇生培養後、42°C、22時間培養  
各条件2 Samples、計8 Samples  
**【遺伝子検査】**  
食安監発1120第1号（平成26年）に準拠  
↓  
VT遺伝子/O157遺伝子、VT遺伝子/O26遺伝子検出

コロニー分離へ 

#### 食品検査状況① ー飲食店A事例ー

**【O157 分離培養】**  
分離平板5種に塗抹・培養したが、EHEC O157分離できず・・・  
非定型コロニーもターゲットとしたところ、non-EHEC O157分離  
↓  
MLVA解析実施したが、発症者と異なるtypeの株であった  
**【O26 分離培養】**  
O26ビーズ濃縮法により、CTR培地よりO26、VT1を分離した

食品検査状況② ー飲食店B事例ー

- 検体情報  
冷凍牛シマチョウ1検体(1店舗)  
ロット：賞味期限2020.10.05  
重量：519 g/1袋
- 依頼項目：EHEC

食品検査状況② ー飲食店B事例ー

- 【サンプリング】  
検体25 g/Sample
- 【増菌法】  
増菌液：mECまたはNmEC 100 g (5倍希釈)  
培養時間：36°Cまたは42°C(2時間の蘇生培養)
- 【サンプル数】  
増菌培地2種×培養条件2種×2 Samples  
→計8 Samples (供試検体量25 g×8)

食品検査状況② ー飲食店B事例ー

- 【遺伝子検査】 Realtime PCR  
ターゲット遺伝子  
：VT/O157/O26/O103/O111/O121/O145
- ↓
- 全8 SamplesからVT/O157遺伝子検出  
(他、O26 (1sample)、O103 (8samples)、O121 (2samples) 遺伝子も同時検出)

O157優先して分離へ

食品検査状況② ー飲食店B事例ー

- 【O157 分離培養】  
① mECおよびNmEC増菌培養液(直接法)  
② O157免疫磁気ビーズによる濃縮(濃縮法)
- ↓
- 分離平板3種 (DHL,CTS,CHS) に塗抹・培養
- ↓
- ビーズ濃縮法のCTSから11株のEHEC O157,VT2 分離した
- 【MLVA解析】  
全11株について実施したところ、  
19m0487 10株、19m0488 1株 であった。

食品検査状況② ー飲食店B事例ー

- 【O26、O103、O121分離へ】  
各ターゲット遺伝子の検出されたmECおよびNmEC増菌培養液
- ↓
- 各O抗原免疫磁気ビーズによる濃縮
- ↓
- 分離平板 (DHL,CTS,CTR) に塗抹・培養
- ↓
- 継続中・・・

食品検査の振り返り

- ・食品の特性により、免疫磁気ビーズがマグネットスタンドにくっつかないこともある
- くっつかないビーズも集菌していることを想定し、自然沈殿したビーズも集め、培養検査に供した
- ・ Realtime PCR用PrimerはVT1/2の区別できないものしか持っていなかった  
→多様なEHECが混在するような検体の検査に備え、VT タイピング用Primer準備が必要か
- ・ Realtime PCRの壁  
①装置が他部署所有のため日程調整必要→Conventional PCRの選択肢も  
②カラム精製は時間がかかる (2時間ほど) →濃縮法を並行して実施した
- ・培養条件よりもサンプリング量が結果に結びついたか・・・
- ・コロニー分離はやはり根気！そして発想の転換
- ・常にヒューマンエラーの想定を・・・

# EHEC MLVA法 フラグメント解析 判定事例集

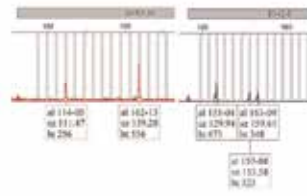
## 1領域に複数のピークがある

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 北海道保健  
報告者 三津雄 和也  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢1マーカ領域に2本以上のピークがある

<例>



### 対応

➢原則, 最も高いピークを採用  
左例: リピート数13, 右例: リピート数4  
➢複数ピークがある旨を備考欄に記載

左例: ピーク2本あり (5/13), 13の方が高い

\*同一株を試験しても, 施設によってピークの高さが変わることがある (高さの比率はあまり変わらない)  
\*ピークの高さが同程度であった場合は, 試験ごとにピークの高さが変化し, 採用するピークが変わることがあるため, 奇数回試験して採用回数が多い方を選択する  
\*複数のピークが出ることはあるが, 概ね O157-9, EHC-5, EHC-6, O157-37である  
\*PCRにおける増幅ターゲットが2カ所以上あることによるものと考えられる

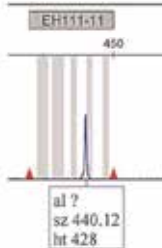
## ピークがBinからずれている

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 北海道保健  
報告者 三津雄 和也  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢ピークがBinからずれて, アレル(al)が『?』になる

<例>



### 対応

➢一番近いBinを採用する  
例: リピート数『4』と採用する  
➢BinとBinのちょうど中間にピークが存在する場合は, 必要に応じてsingle PCRを実施する  
\*ポリマーやバッファー等の消耗品の変化によって, 泳動速度が変化し得る可能性があるため, 必要に応じて消耗品を交換すること  
\*リピート数が既知の株を試験して, 同様なずれがあるかチェックする  
\*毎回同程度のずれが生じる際は, 必要に応じてBinを調整すること  
\*EH157-12, EH111-11のピークは, ずれやすい傾向がある  
\*通常, Binを用いてリピート数を算出している施設が理論上の計算式で算出する場合には, 既知の株で正しい値が出ることを確認すること

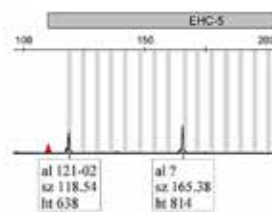
## 1領域に複数のピーク+Binからずれている

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 北海道保健  
報告者 三津雄 和也  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢1領域に複数のピークがあり, 一部あるいはすべてのピークがBinからピークがずれてアレル(al)が『?』になる

<例>



### 対応

➢原則一番高いピークを採用  
➢採用するピークがBinからずれている場合は, Binからずれたケースと同様に対応  
例: リピート数10,  
備考として『2本のピークあり(2/10), 10の方が高い, 10はBinからずれていた』  
※内部用としての記載,  
感染研に送付する際は『2, 10の2本のピークあり』でよいとのこと

## 他に比べて極端に低いピークがある

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 北海道保健  
報告者 三津雄 和也  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢他に比べてピークが著しく低い

<例>



### 対応

➢ピークが必ず出る領域か確認  
99%以上の確率でピークが出る領域↓  
EH111-11, EH111-8, EH157-12, EHC-1, EHC-2, O157-34, O157-25, O157-19  
➢必ず出る領域であればPCR増幅が上手くいっていないか, PCR産物を希釈しすぎている  
➢この場合, 高さが100以下であっても採用可  
\*初級検計の段階で, 一番高いピークが10000~20000程度に収まるような希釈倍率を検討すること  
\*EH111-8, O157-34, O157-9はピークが低い傾向  
\*ピークの高さは, ThermoのPlatinum Multiplex PCR kitで概ね改善する傾向がある (特にEH111-8)

## マーカ外と思われるピークがある

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 北海道保健  
報告者 三津雄 和也  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢必ず出る領域にピークがなく, 次の領域に2本ピークがある

<例>



### 対応

➢必ずピークが出る領域, 複数ピークが出る領域を把握しておく  
例:  
EHC-2には, ピークが複数出ないため, 2本のうちの1本はEHC-1のピークである  
↓  
2本のうち, EHC-2のBinからずれていて, かつそのサイズがEHC-1の最終Binのサイズにリピートサイズを足していったもの (Binの範囲を考慮した上で) になるのか確認する  
↓  
208 bp (EHC-1の最終Bin, リピート数23のサイズ) + 6 bp (リピートサイズ) × 5回 = 238(232+238.9)  
⇒ リピート数28 (23+5)

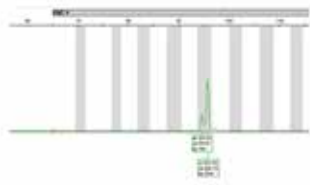
## 二つに割れたピークの対処法

事例報告日 2020/11/24  
報告機関 道庁  
報告者 岩淵善博  
使用機器 ABI 3500XL

### 現象

➢二つに割れたピークがでる

<例>



### 対応

➢-A/+Aピークであるため, どちらも本物のピーク  
\*多くのDNAポリメラーゼの性質により, 3'末端にアデニン(A)を付加する性質があるが, 5'末端の配列に依存して, Aの付加効率が変化するため, -A/+Aピークが検出される。  
【対処法】  
\*リバースプライマーの5'末端側に, Tail配列 (7塩基: 配列非公開) を付加したプライマーを使用→Aの付加を誘導し, +Aの断片を増幅  
\*蛍光プライマー購入時にTail配列プライマーを購入しなければならない  
\*その場合, 感染研のBinとPanelは修正しなければならない