

厚生労働省外部精度管理事業 「腸管出血性大腸菌」

国立感染症研究所
細菌第一部・第一室
伊豫田 淳



厚生労働省外部精度管理事業 対象病原体

- H28年度 インフルエンザウイルス
- ↓
- H29年度
 - 課題1 インフルエンザウイルス
 - 課題2 腸管出血性大腸菌
- ↓
- H30年度
 - 課題1 麻疹・風疹
 - 課題2 腸管出血性大腸菌
- ↓
- 今年度
 - 課題1 カルバペナム耐性腸内細菌科細菌
 - 課題2 麻疹・風疹
 - 課題3 腸管出血性大腸菌

腸管出血性大腸菌

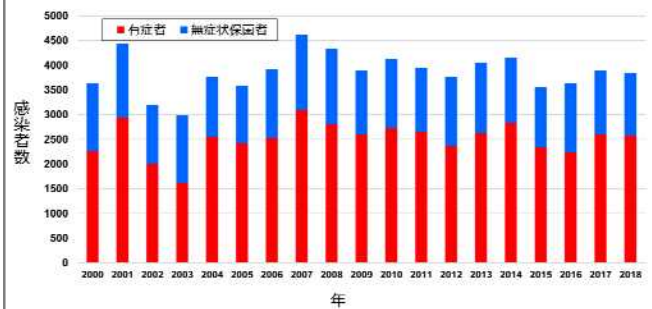
H30年度参加希望施設 113施設 ⇒ 実施は 80施設
(H29年度は103施設)

H30年度のスケジュール：

1. 対象菌株の準備 (5月～)
2. 参加希望施設を募集：10月1日～10月12日
(BSL2実験室確認書収集)
3. 検体送付：11月5日
4. 結果入力：11月30日締切
5. 検体内容の公開：12月5日
6. 結果集計：12月上旬
7. 各施設成績書を作成、解説書とともに送付

EHEC感染症の年別発生状況

(NESIDの集計による)

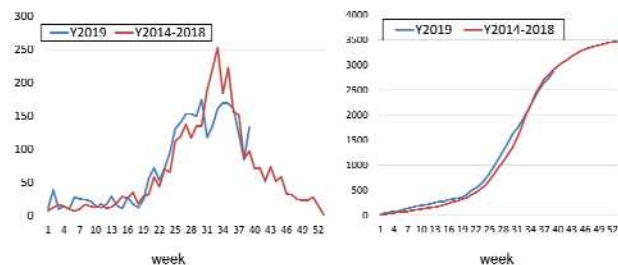


2019年第39週まで: 2,900例 (有症者 1,990例; HUS 53例; 死亡 3例)

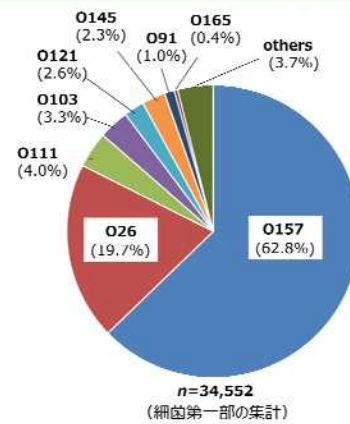


EHEC感染症の発生状況 (2019年 vs 2014-2018年)

(NESIDの集計による)

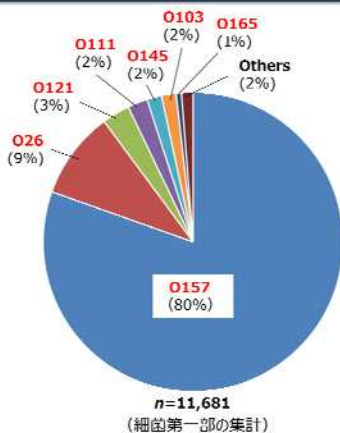


ヒト由来EHECのO血清群 (2007-2018)



重症例分離株におけるO血清群の割合 (2007-2018)

重症例の定義:
血便, HUS,
脳症, 死亡例



重症例由来のEHEC (2007-2017)

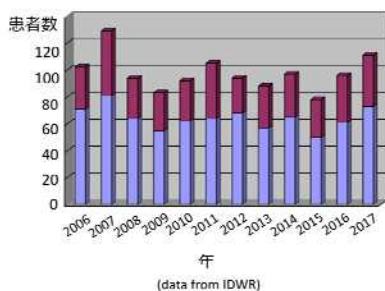
	O group	総菌株数	重症例	% (重症例)
cac 陽性	O157	20,015	8,554	42.7
	O26	6,243	986	15.8
	O121	731	285	39
	O111	1,218	221	18.1
	O145	730	169	23.2
	O103	1,018	166	16.3
	O165	120	65	54.2
cac 陰性	O5	53	16	30.2
	O76	52	10	19.2
	O55	49	8	16.3
	O177	21	8	38.1
	O91	349	6	1.7
	others	942	79	8.39
	total	31,541	10,573	33.5

重症例由来の
主要7血清群

(細菌第一部の集計) NIID

HUS症例発生数とEHECの分離率

■ EHEC不分離のHUS症例
■ EHEC分離のHUS症例

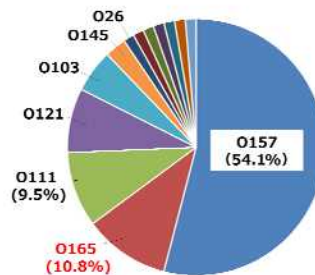


菌不分離のHUS症例: 約34%
便中の Stx または患者血清中の
抗大腸菌 (主要7血清群) 抗体価
等の測定。
↓
陽性であれば EHEC 感染症の確
定診断とすることが可能。



HUS患者の血清診断 (2009-2017)

陽性数 / 解析件数 = 69 / 85 (陽性率81.2%)



- 160倍 (血清の最終希釈濃度) 以上の抗体価で陽性判定 (96wプレート).
- 一部の例外を除いて特定のO群抗体価上昇.
- 血清診断に伴って菌分離が可能となった事例: 15事例 (2012-2017).



送付検体

- 送付検体内容
H30年度: EHEC O111, O121, O165の3株とした (H29年度: O157, O26, O165) .
- 検体ラベル
送付した3検体には、アルファベット3文字からなる菌名を付した
(3検体 x 80施設 = 240種類: 統計ソフトを用いて自動生成) .

送付検体内容

	O抗原型	H抗原型	βH 毒素型	βH毒素 遺伝子型
検体1	O111	H-/Hg8	VT1, VT2	vt1, vt2
検体2	O121	H19	VT2	vt2
検体3	O165	H-/Hg25	VT2	vt2

検体ラベル例

施設番号	検体1	検体2	検体3
1	KFF	ZAZ	PGW
2	YAY	FXY	BZS
3	EFY	AHW	MHX
4	HYB	PMP	HZW
...			



検体の発送

基本三重包装



webシステム



検査項目

1. 必須検査項目
 - 菌種同定
 - O抗原型別
 - ペロ毒素検出
 - ペロ毒素遺伝子検出
2. 任意検査項目
 - H抗原型別
 - ペロ毒素型別
 - ペロ毒素遺伝子型別

必須検査項目					任意検査項目				
	菌種同定	O抗原型	ペロ毒素	ペロ毒素遺伝子	H抗原型	ペロ毒素型		ペロ毒素遺伝子型	
						VT1	VT2	vI1	vI2
検体1	人糞菌	O111	陽性	陽性	H-/HgR	陽性	陽性	陽性	陽性
検体2	大腸菌	O121	陽性	陽性	H19	陽性	陽性	陽性	陽性
検体3	大腸菌	O165	陽性	陽性	H-/Hg25	陽性	陽性	陽性	陽性



結果1：必須検査項目

	菌種同定	O抗原型	ペロ毒素	ペロ毒素遺伝子
正答	検体1	人糞菌	O111	陽性
	検体2	大腸菌	O121	陽性
	検体3	大腸菌	O165	陽性
正答割合数* / 実施施設数 (未実施施設数)	検体1	79/80 (0)	77/80 (0)	50**/52 (28)
	検体2	79/80 (0)	77/80 (0)	50/51 (29)
	検体3	79/80 (0)	78/80 (0)	50/51 (29***)

* 実施施設のうち、3つ全ての検体番号 | 記号 | に記載のある施設が1ヶ所あった。
 ** 入力のない施設が1ヶ所あった。
 *** ペロ毒素・ペロ毒素遺伝子ともに未実施と記入した施設が1ヶ所あった (ペロ毒素遺伝子型別の結果は止し入力されてい)。

Og-typing PCRによる遺伝子型別 (*J Clin Microbiol.* 2015, 53 (8): 2427-2432; *J Clin Microbiol.* 2018, 56 (6): pii: e00190-18) が有効である。
 今回の参加施設の中には、Og-typing PCRを使用した結果を記入した施設が10施設あった。



結果2：任意検査項目

- 検体(A)O111:H-/HgRで「運動性あり」と回答した施設が13ヶ所あった (うち1施設は検体(B)の結果を記入したものと推定された)
- 検体(B)O121:H19で「運動性なし」と回答した施設が2ヶ所あった (うち1施設は検体(C)の結果を記入したものと推定された)
- 検体(C)O165:H-/Hg25で「運動性あり」と回答した施設が6ヶ所あった (うち1施設は検体(B)の結果を記入したものと推定された)

	H抗原型	ペロ毒素型		ペロ毒素遺伝子型	
		VT1	VT2	vI1	vI2
正答	検体1	H-/HgR	陽性	陽性	陽性
	検体2	H19	陽性	陽性	陽性
	検体3	H-/Hg25	陽性	陽性	陽性
正答割合数 / 実施施設数	検体1	53/66	48/49	45/49	73/73
	検体2	64/66	48/49	48/49	72/72
	検体3	60/66	49/49	49/49	72/72

今回の参加施設の中には、Hg-typing PCRを使用した結果を記入した施設が3施設あった。



参考資料2：運動性 (H抗原) の判定

コメント
 運動性 (H抗原) の判定について 今回の実施した検体の運動性の判定についてクレイギー管を使用した検査を行ったのですが、中々動かさず (完全に動かないわけではない)、当施設では運動性なしと回答しました。今回の判定に片感したのでどのように判定するのがよいのか、今後のためにご教授くださいとお願いいたします。

回答

感染症・細菌学一部では人糞菌の運動性について、30℃で最長72時間培養して運動性がないものはH (非運動性) としています。

I. H抗原の調製

Bacto Heart Infusion Broth (Difco)

ゼラチン (Difco) 0.8% (W/V)

卵黄 (Difco) 0.3% (W/V)

にクレイギー管を挿した培養管を用いて30度で培養する

(37度で培養を行った場合に3度く型別出来ない可能性があるため、すべて30度培養で統一しています)。

一般にクレイギー管の上部より上がってくるまで培養を続けた後 (運動性がない場合も2回の検体より)、

2 mlのBacto Heart Infusion Broth (卵黄無し) を接種し、30度で 数時間培養する。

1 mlの2% (V/V) ホルマリン抽出液を加え、37度で1-2時間培養したものを用いてH抗原として使用する。

II. H型別

H型別は、12.1で調製したH抗原がSS1 (デンマク血清学研究所) 製の抗血清ノットセット (デンマークのH抗原ノットに番号があるH型はデンマークのものを使用) を25 μlずつ96ウェットに入れてよく混合し、52度で1-2時間培養して凝集反応を判定する。

なお、SS1の抗血清ノットはH抗原ノット (多価) 血清ノットにあり、実際の型別は多価血清との凝集反応に基づいて血清血清で凝集反応を行っています。また、デンマークのH抗原ノットに対して凝集反応を至し引いているものなので、SS1の抗血清ノットを用いた場合と結果が異なる場合があります。

上記の通り、OもHも現在Cは遺伝子型別が可能となっており、感染症・細菌学一部でも細菌学・感染症等で型別されたEHEC/O:H型はPCRで検出を行っていますようにしています。



参考資料2：運動性 (H抗原) の判定



37°C 3 days



参考資料1：vt遺伝子およびVT産生の安定性

【目的】

vt遺伝子はEHECの染色体上にプロファージとして存在することから、保存や継代培養等によってvtファージ(vt遺伝子)の脱落が起きる可能性がある。そこで、送付菌株のvt遺伝子およびVT産生性の安定性を事前に確認した。

【方法】

以下の1), 2) を2週間ごと1.8-11回行った。

1) vt遺伝子保有確認

カジトン培地に接種(室温で培養・保存)

↓ LB寒天平板に塗布(37°C, o/n)

↓ 各株8コロニーからアルカリ熱抽出法で
抽出DNA調製

↓ PCR
(井口ら, 日本食品微生物学会雑誌, 2015)

↓ O抗原型および保有vt遺伝子型を確認

2) VT産生性確認

1) vt遺伝子保有を確認したコロニーのうち

各株1コロニーをCAYE培地(デンカ生研)に接種

↓ 37°C, 振盪培養, o/n

↓ 培養上清

↓ VTEC-RPLA(デンカ生研)でVT産生性を確認

↓

↓ O抗原型および保有vt遺伝子型を確認



参考資料1：vt遺伝子およびVT産生性の安定性

【結果】

検体として送付した株はvt遺伝子保有、VT産生性のいずれも安定していることが確認された。

一方、今回検体として用いた菌株以外の同一血清型のEHEC株の中には、同様の確認を行った場合、早期にvt遺伝子が非検出となる菌株も存在した。

	血清型	ベロ毒素型	VTEC-RPLA凝集価	
			VT1	VT2
検体1	O111:H-/Hg8	VT1, VT2	64	8
検体2	O121:H19	VT2	<2	256
検体3	O165:H-/Hg25	VT2	<2	256



アンケート回答

【検査以外について】

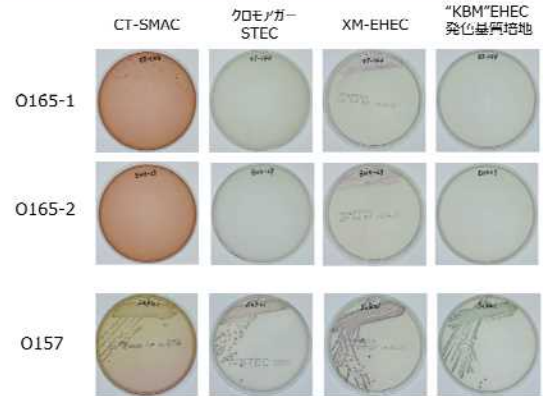
- 結果入力の際、選択紙がマウスのホイール操作と変わってしまった。陽性と陰性の文字が似ていて区別しにくかったりしたので、入力ミスが起きないように工夫していただけると思いませう。(陽性のみ大文字にする、「陽性」のようにスペースを入れるなど)

【検査について】

- 検体PFX(O111V1,2)について、デュムパス・ベロトキシンによるVT2の検出が非常に弱く、検出限界付近であった。
- O型別試験の判定方法には1分以内におこなう必要があるとすることとなります。今回の検体は2~3分経過しないと気味は分らず、判定は困難でした。
- 運動性(H抗原)の判定について、クレイジー管を使用した検査を行ったのですが、中々動かし(完全に動かないわけではない)、当施設では運動性なしと判定した。
- CT感受性のある株を初めて検査したので、参考になった。
- 検体2について、NHイムノクロマトVT1/VT2ではVT2(-)であったため、VTEC-RPLAによりVT1(+)/VT2(+))と判定した。
- 検体1は、加熱死菌によるO111抗原層への凝集反応が5コロニーあったものの2コロニーしか確認できなかった。
- 検体2のH型については、デンカ生研の抗血清を用いて検査したところ、H21およびH28の2つに凝集が見られた。
- LIM培地を使用せず、SIM培地とリジン脱炭酸試験用培地を併用している。



市販選択培地上での生育



出典: file:///E:/PDF/20since/20May/2018/EHEC選択培地カラーチャート_210.pdf



各試験の実施設数集計項目

- 生化学的性状確認培地
- β-グルクロニダーゼ活性試験法
- ソルビトール発酵性試験法
- ベロ毒素検出法
- O抗原型別法
- H抗原型別法
- ベロ毒素遺伝子検出法
- ベロ毒素遺伝子型別法
- ベロ毒素・ベロ毒素遺伝子検出の実施状況
- ベロ毒素・ベロ毒素遺伝子型別の実施状況
- Taqポリメラーゼ
- サーマルサイクラー



生化学的性状確認に使用した培地

TSI培地

	検体1	検体2	検体3
実施	79	79	79
未実施	0	0	0
合計	79	79	79

LIM培地

	検体1	検体2	検体3
実施	76	76	76
未実施	3	3	3
合計	79	79	79

CLIG培地

	検体1	検体2	検体3
実施	62	62	63
未実施	17	17	16
合計	79	79	79

SIM培地

	検体1	検体2	検体3
実施	34	34	35
未実施	45	45	44
合計	79	79	79



β-グルクロニダーゼ活性試験法

方法	検体1	検体2	検体3
CLIG増地	62	62	63
クロモアガー-STECC増地	39	39	30
XM-G増地	2	2	2
トリコロル増地	2	2	2
ESコリマーク	1	1	1
IPTG添加ONPG-MUG増地	1	1	1
クロモカルトコリフォーム	1	1	1
クロモアガー E. coli	1	1	1
クロモアガー O-157	1	1	1
ID32Eアビ	1	1	1
MUG反応	1	1	1
未実施	5	5	5

複数の方法を併用している施設あり。



ソルビトール発酵性試験法

方法	検体1	検体2	検体3
CT-SMAC	61	61	54
SMAC	21	21	24
IDテストEB20	16	16	16
API20E	12	11	12
ソルビトール加アンドレドヘプトン水	3	3	3
Rapid ID 32E アビ	2	2	2
SIB寒大増地	1	1	1
ソルビトール加糖分解用半流動増地	1	1	1
ソルビトール加DHL基礎増地	1	1	1
パーゴウ増地	1	1	1
BBLクリスタルE/NF	1	1	1
バイテック2 GN 同定カード	1	1	1
糖分解試験 (詳細不明)	1	1	1
未実施	5	5	6

複数の方法を併用している施設あり。



ベロ毒素検出法

方法	検体1	検体2	検体3
VTEC-RPLA	39	38	39
Duopath Verotoxins	14	14	14
NHイムノクロマトVT1/VT2	2	2	2
オーソ VT1/VT2*	1	1	1
未実施	29	29	29

複数の方法を併用している施設あり。

* VT1とVT2の型別は不可。



O抗原型別法 / H抗原型別法

O抗原型別法	検体1	検体2	検体3
マンガン研抗血清	79	79	79
Og typing PCR	10	10	9
TaKaRa EHEC (O antigen) PCR Typing Kit	1	1	1
PCRカスタムプライマー	1	0	0
欧州食品安全機構のリアルタイムPCR (Probe法)	1	0	0
未実施	0	0	0

複数の方法を併用している施設あり。

H抗原型別法	検体1	検体2	検体3
デンカ生研抗血清	14	46	10
Hg Typing PCR	3	2	3
未実施	62	32	66

複数の方法を併用している施設あり。



ベロ毒素遺伝子検出法

方法	検体1	検体2	検体3
TaKaRa 遺伝子抽出キット大腸菌用 Primer Set [EVT,EVS,EVC-1&2]	23	23	23
Scheufler 1	9	9	9
TaKaRa O-157(ベロ毒素1型、2型遺伝子)One Shot Typing Kit Ver.2	7	7	7
Cebula 5+2	6	6	6
Loopamp ベロ毒素遺伝子検出キット	6	6	6
TaKaRa O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit	5	5	5
Nikolov 5+3	4	4	4
TaKaRa H94-C (O antigens) HCK Typing Kit	4	4	4
Karch 5+4	3	4	4
国立保健医療科学研究センター (EHEC multiplex PCR)	3	2	2
Genie PCR O-157(VT gene) Screening Kit Ver. 2.0	2	2	2
Hatton 5+4	2	2	2
Iiarada 5+6	1	1	1
Ejima 5+7	1	1	1
Karch 5+6	1	0	0
QuickPrimer ShigaII遺伝子、QuickPrimer ShigaII遺伝子	1	1	1
TaKaRa O-157(Verocytotoxin Genes) HCK Typing Set	1	1	1
TaKaRa Probe qPCR Mix	1	1	1
TaKaRa O-157 (ベロ毒素1型、2型遺伝子) PCR Typing Set Plus	1	1	1
TaKaRa O-157(ベロ毒素1型、2型遺伝子) PCR Typing Set Plus	1	1	1
VERITAS DEC Primer Mix	1	1	1
カスタムプライマー 及びアンプ	1	1	1
遺伝子抽出1200号 (平成26年11月20日)	1	1	1
未実施	5	6	6



ベロ毒素遺伝子型別法

方法	検体1	検体2	検体3
TaKaRa 遺伝子抽出キット大腸菌用 Primer Set [EVT,EVS,EVC-1&2]	22	22	22
Scheufler / Systems Serum Instivia *1	9	9	9
Cebula 5+2	6	6	6
Loopamp ベロ毒素遺伝子検出キット	6	6	6
TaKaRa O-157(ベロ毒素1型、2型遺伝子) One Shot Typing Kit Mix-2	6	7	7
TaKaRa LILIC (O antigens) HCK Typing Kit	5	5	5
TaKaRa O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit	5	5	5
Nikolov 5+3	4	4	4
Palov 5+1	2	2	2
TaKaRa O-157(ベロ毒素遺伝子) 検出キット	2	2	2
国立保健医療科学研究センター (EHEC multiplex PCR)	2	2	2
Hatton 5+4	1	1	1
Igarashi 5+6	1	1	1
Ejima 5+7	1	1	1
Karch 5+6	1	1	1
Karch 5+6	1	1	1
Holland 5+9	1	1	1
QuickPrimer ShigaII遺伝子、QuickPrimer ShigaII遺伝子	1	1	1
TaKaRa O-157 (ベロ毒素1型、2型遺伝子) PCR Typing Set Plus	1	1	1
TaKaRa O-157(Verocytotoxin Genes) PCR Typing Set	1	1	1
TaKaRa Probe qPCR Mix	1	1	1
VERITAS DEC Primer Mix	1	1	1
カスタムプライマー 及びアンプ	1	1	1
遺伝子抽出1200号 (平成26年11月20日)	1	1	1
大腸菌 10	1	1	1
未実施	2	2	2



ペロ毒素およびペロ毒素遺伝子の検出・型別実施状況

	検体1	検体2	検体3
ペロ毒素および ペロ毒素遺伝子検出実施	45	44	44
ペロ毒素検出のみ実施	5	6	6
ペロ毒素遺伝子検出のみ実施	29	29	29

	検体1	検体2	検体3
ペロ毒素型別および ペロ毒素遺伝子型別実施	43	42	42
ペロ毒素型別のみ実施	6	7	7
ペロ毒素遺伝子型別のみ実施	30	30	30



Taqポリメラーゼ

商品名	メーカー	検体数
FX Taq HS Version	Invitrogen	21
LX Taq	Takara	12
O-157 (EHEC O157) One Shot PCR Typing Kit, Ver.2	Takara	7
O-157 (EHEC O157) One Shot PCR Screening Kit	Takara	4
PHFC (O157:H7) PCR Typing kit	Takara	3
Taq iXtra 110Start Ready Mix	KAPA	3
Taq Man Environmental Master Mix 2.0	Applied Biosystems	2
Multiplex PCR plus kit	QIAGEN	2
RealTime PCR iE Taq (Perfect real)	Takara	2
Quark Taq HS DyeMix	TOYOBO	2
Ultimate III Ultra-ast QPCR Master Mix	Agilent	1
Soofast Livegreen Supermix With Low Rox	Uio-Kad	1
Illustra Hot Start Mix RTG	GE Healthcare	1
puBuTaq Ready To Go PCR Beads	CF Healthcare	1
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen	1
Till i PCR kit	KAPA	1
GoTaq DNA polymerase	Promega	1
GoTaq Green Master Mix	Promega	1
GoTaq High Start Green Master Mix	Promega	1
GoTaqq 110 Start Green Master Mix	Promega	1
110Start110 Master Mix	QIAGEN	1
Multiplex PCR Plus Kit	QIAGEN	1
SYBR Green I Probes Master	Roche	1
Cytosolver PCR O-157(VT green) Screening Kit Ver. 2.0	Takara	1
Premix LX Taq	Takara	1
Probe qPCR Mix	Takara	1
Sapphire/rip Fast PCR Master Mix	Takara	1
TR Green Premix Fx Taq (Tti RNaseH Plus)	Takara	1



サーマルサイクラー

商品名	メーカー	検体数
CineAmp PCR System 9700	Applied Biosystems	12
PCR Thermal Cycler Dice	Takara	11
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems	7
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems	4
ProFlex PCR System	Applied Biosystems	4
1100 Thermal Cycler	Hio-Rad	4
QuantStudio 5	Applied Biosystems	2
SimpliAmp Thermal Cycler	Applied Biosystems	2
MyCycler	Bio-Rad	2
CineAmp iC11 System 2400	Applied Biosystems	1
MiniAmp Thermal Cycler	Applied Biosystems	1
GeneAmp G92	ASTEC	1
PC 8165 Q2	ASiFC	1
CFX96 Real-Time System	Bio-Rad	1
DNA Engine Tetrad2	Bio-Rad	1
S1000 Thermal Cycler	Hio-Rad	1
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad	1
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad	1
Light Cycler 96	Roche	1
Light Cycler 11	Roche	1
PCR Cycler Dice Real Time System	Takara	1
PCR Thermal Cycler MP	Takara	1
HCX Thermal Cycler touch	Takara	1
SmartCycler	Takara	1



大腸菌のO:H型 (血清型) について

O1-O188 (欠番: O31, O47, O67, O72, O94, O122)

因子血清群O18ab, O18ac, O28ab, O28ac, O112ab, O112ac
が存在するため、全185種類。

H1-H56 (欠番: H13, H22, H50) : 全53種類。

・ デンマーク血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI)
からの輸入品 (フルセット, 国内代理店: ヘリタス)。

・ 感染研自家血清 (O: O182-O188を除く, H: フルセット)。

・ デンカ生研 (O: 52種類, H: 22種類のみ)。



重症例由来のEHEC (2007-2017)

O group	総菌株数	重症例	% (重症例)
O157	20,015	8,554	42.7
O26	6,243	986	15.8
O121	731	285	39
O111	1,218	221	18.1
O145	730	169	23.2
O103	1,018	166	16.3
O165	120	65	54.2
O5	53	16	30.2
O76	52	10	19.2
O55	49	8	16.3
O177	21	8	38.1
O91	349	6	1.7
others	942	79	8.39
total	31,541	10,573	33.5

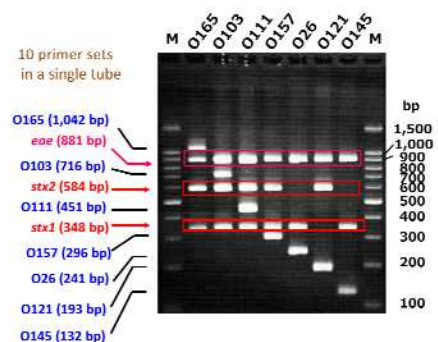
重症例由来の
主要7血清群

重症例の定義:
血便, HUS,
脳症, 死亡例

(細菌第一部の集計)



One-shot multiplex PCR for major 7 O-groups



detects 7-major O antigens, stx1(a, c), stx2 (a-c, g) and cac.

EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (Takara) と同じプライマーセット



