

島根県内で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析におけるIS printing法の有用性の検討

黒崎守人

1. はじめに

腸管出血性大腸菌の分子疫学解析には一般的にパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE法) が用いられているが、検査に3日以上かかるため迅速性に欠けることに加え操作が煩雑である。近年開発されたIS printing法は、細菌の挿入配列 (IS) の多型性をmultiplex PCR法により検出するため、数時間で結果の判定ができ、手技も比較的簡便である。この方法が腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析に有用であるか検討した。

2. 材料および方法

2.1 材料

使用した菌株は、平成19年度および20年度に当所で分離された腸管出血性大腸菌O157株のうち、患者の家族である等の疫学的な関連およびPFGEタイプ (国立感染症研究所実施) から3つのグループに分けられる11株を用いた (表2)。

グループA (菌株No.1~5) はPFGEタイプa259が4株およびこれらと1本バンドが異なる1株の計5株で、内3株は同一家族からの分離株、他の2株はそれぞ

れ疫学的関連の認められない患者からの分離株である。

グループB (菌株No.6~8) は、保育園児とその祖母および園児の先生からの分離株だが、PFGEタイプは3株とも異なる。

グループC (菌株No.9~11) は、同一家族からの分離株で、3株ともPFGEタイプはc57である。

2.2 方法

IS printing System (東洋紡) の説明書に記載された方法に準じ、滅菌蒸留水 9 μ l、1stまたは2nd set Primer Mix 2.5 μ l、2 \times IS printing Master Mix 12.5 μ l、Template DNA 1 μ lの計25 μ lで行った。

電気泳動は、3% NuSieve 3 : 1 アガロース、0.5 \times TBEバッファーでサブマリン型電気泳動装置を用いた。「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書」では、電気泳動の際サイズの大きい増幅バンドが密集して判定が困難な場合があると報告されていたため、電圧、泳動時間は、115V、120分で行った。

また、IS printingの結果は、勢戸ら¹⁾の方法に準じ表1のようにコード変換して解析した。

表1 IS printingの増幅バンドサイズと判定のコード変換

1st set primer		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
primer No.	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例 (菌株No.1)	係数	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
加算		6			1			3			5			7			7		
2nd set primer		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
primer No.	size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定例 (菌株No.1)	係数	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
加算		6			1			0			6			4			6		

コード変換の方法

各プライマーごとに図1のスタンダードDNAと比較増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定増幅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セット1、セット2の順に12桁にコード化

表2 供試菌株とIS printingの結果

グループ	No	PFGEタイプ (感染研)	分離年	備考	VT	IS printingコード											
						1st set					2nd set						
A	1	a259	H19	H市	1&2	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6
	2	c904 (a259と1本異なる)	H19	1の母	1&2	2	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	4
	3	a259	H19	1の弟	1&2	6	1	3	5	7	5	6	1	0	6	4	6
	4	a259	H19	O町	1&2	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6
	5	a259	H19	U町	1&2	2	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	4
B	6	d246	H20	U町	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
	7	d247 (d246と2本異なる)	H20	6の祖母	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
	8	d248	H20	6の先生	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
C	9	c57	H20	U町	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2
	10	c57	H20	9の父	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2
	11	c57	H20	9の母	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2

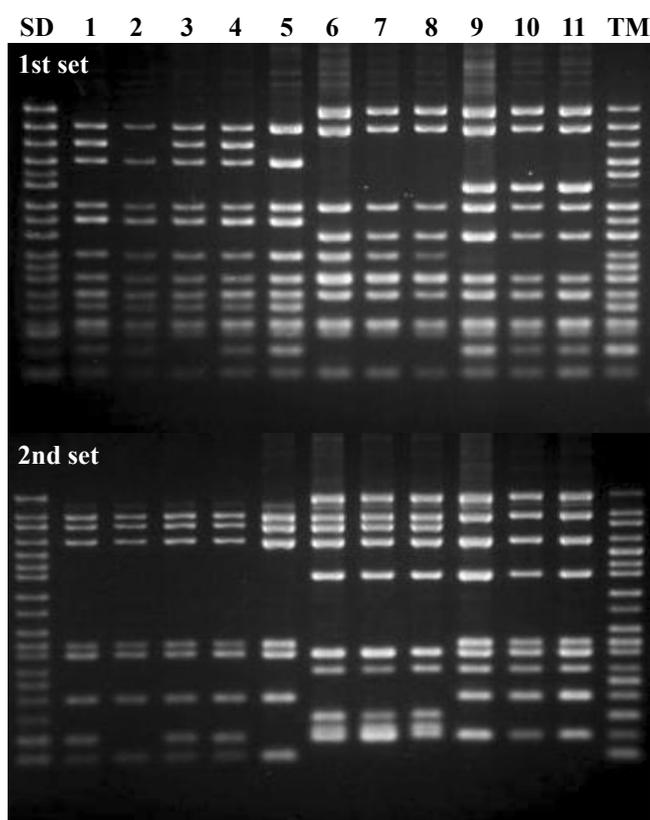


図1 IS printingの電気泳動像,
 レーン: SD:スタンダードDNA (泳動コントロール)
 1: 菌株No.1、2: 菌株No.2、3: 菌株No.3、
 4: 菌株No.4、5: 菌株No.5、6: 菌株No.6、
 7: 菌株No.7、8: 菌株No.8、9: 菌株No.9、
 10: 菌株No.10、11: 菌株No.11、
 TM: テンプレートミックス (PCRコントロール)

3. 結果

電気泳動を120分行ったところバンドの密集はなく、判定は容易であった。

グループAでは、異なるPFGEタイプのNo.2と5が同じIS printingパターンを示した。いっぽう同じPFGEタイプのNo.1、3、4と5の4株がIS

printingでは3パターンに分けられた。疫学的関連の見られるNo.1、2と3は全て異なるIS printingパターンを示し、疫学的関連の見られないNo.1と4、No.2と5がそれぞれ同じIS printingパターンになった。バンドの違いは1~3本であり、これらを同じグループとするのか、違うグループとするのか結果の解釈が困難であった。

No.2と5は*stx2*のバンドが欠けており、培養中あるいは保存中に*stx2*が欠落したものと思われる。

グループBでは、3株ともPFGEタイプは異なるが疫学的な関連が見られ、IS printingパターンは全て同じであった。グループCでは、3株ともPFGEタイプが同じで疫学的な関連も見られており、IS printingパターンも同じであった。

グループA、BとCの間では、IS printingパターンも明確に異なっていた。

以上より、IS printing法の識別能力はPFGEと同等あるいは若干劣るものの、疫学的関連のある菌株は概ね同じパターンを示しており、バンドの若干の違いについて相同性の評価ができれば、IS printing法は迅速、簡便に実施できるため、有用なサブタイピング法であることが示唆された(表2、図1)。

4. 文献

- 1) 勢戸和子ほか: 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書, 101 (2007)