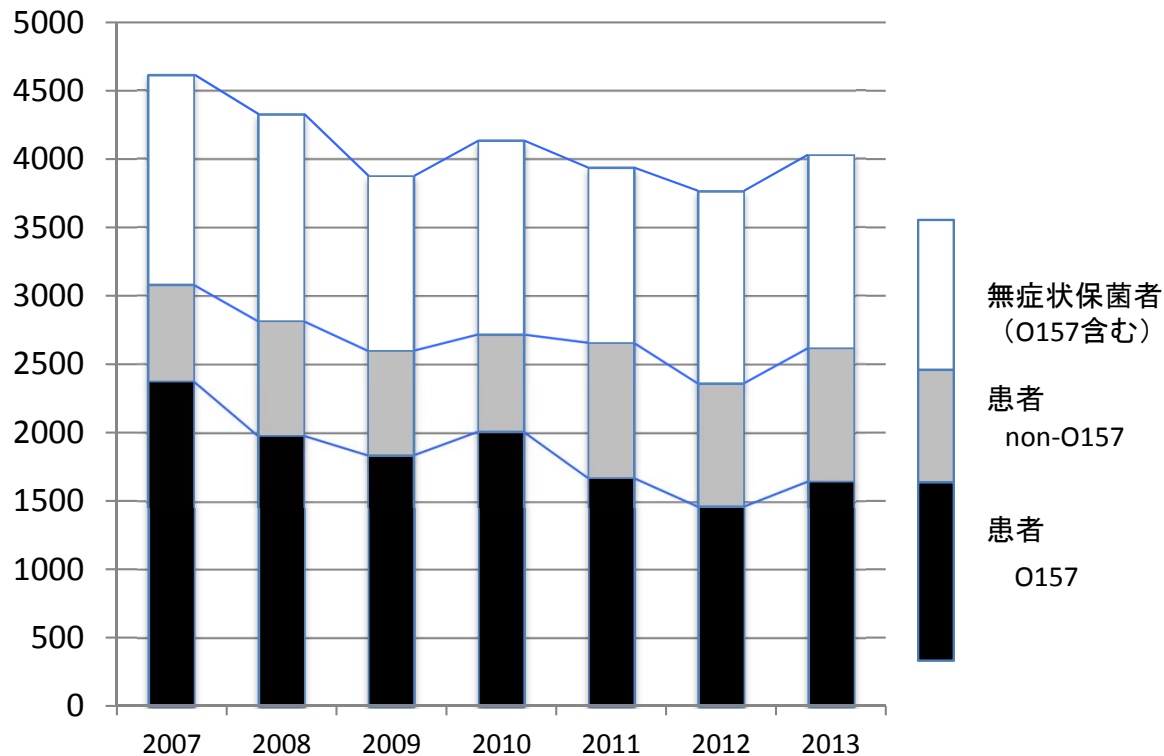


腸管出血性大腸菌感染症 広域散発事例の検出と対応への工夫

～DNA型別の持つ意味とその利用～

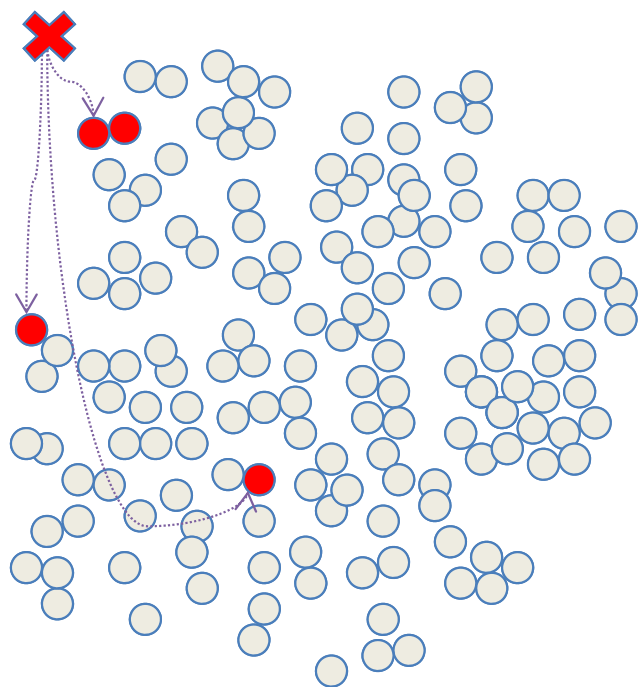


国立感染症研究所
細菌第一部
大西 真

4. 食中毒統計・調査結果

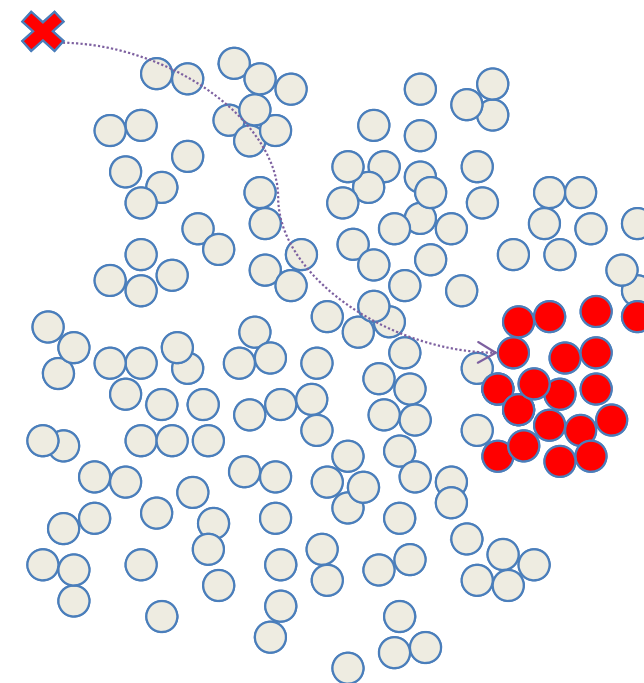
平成25年 病因物質別月別食中毒発生状況

腸管出血性大腸菌(VT産生) 13件 105名



広域に流通する食材が原因となると個々の関連が掴めない

汚染食材のロットサイズ、不適切な調理過程などによって規模が規定される



分子疫学解析

Molecular epidemiological analysis

- 特定の遺伝子領域あるいはゲノム情報を用いて比較解析することで、分離した菌株の異同、もしくは類縁性を調べる
 - 菌株の由来(汚染源)が共通である可能性を探る
- 行政的な関連で使われるのは、食中毒などの集団事例の解析
- 同じ血清型の菌株を比較する際によく使われる
 - 遺伝子型別、分子型別(Molecular typing, DNA型別)
 - (狭義の)分子疫学解析

分離菌株の試験

表現型による試験

生化学的性状試験

属 Genus

種 Species

血清型別試験

O型別

H型別

だいたいここまで

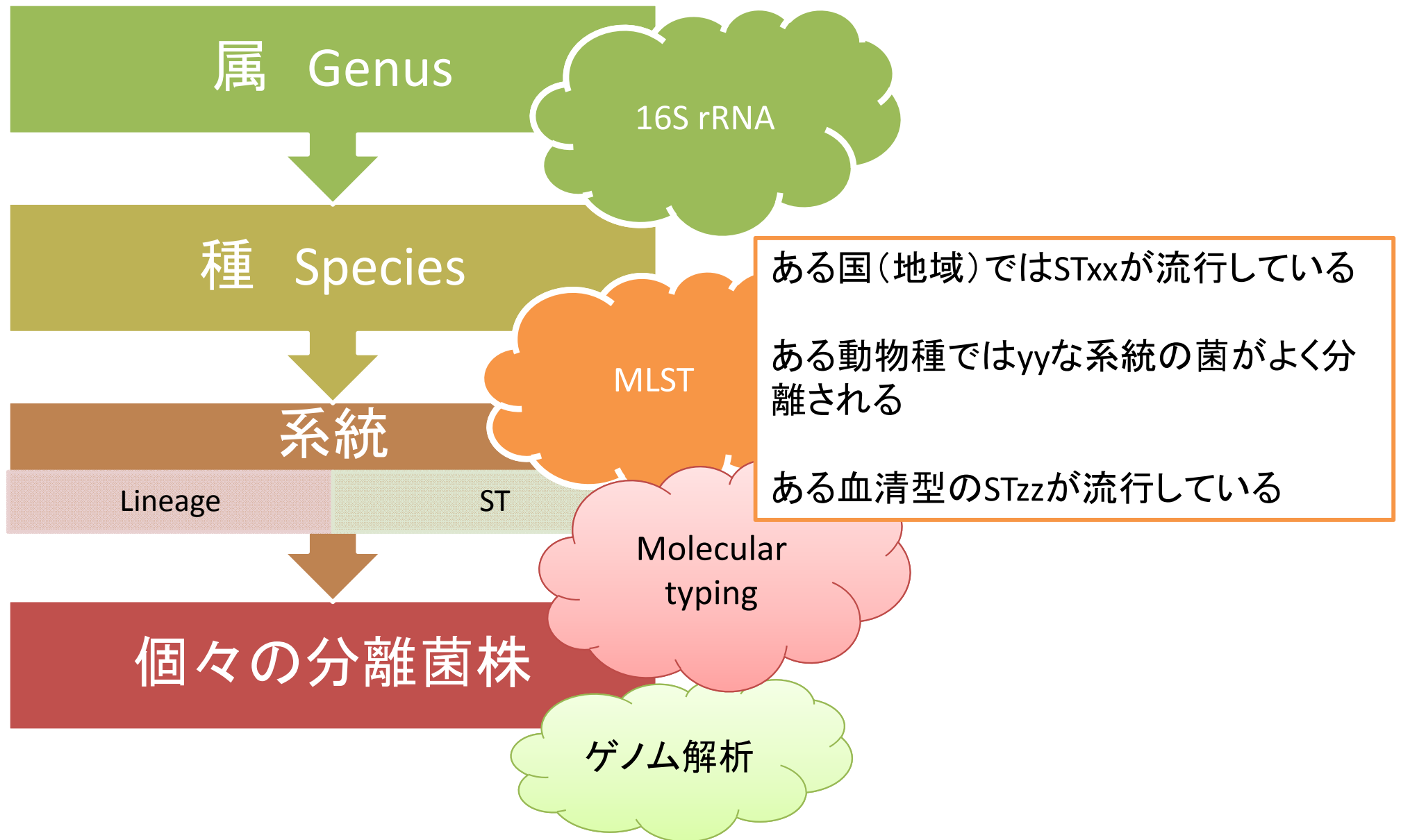
疫学マーカー

生物型

薬剤耐性

ファージ型別

分離菌株の試験 遺伝子解析の識別能



分離菌株の試験

表現型による試験

生化学的性状試験

属 Genus

種 Species

血清型別試験

O型別

H型別

疫学マーカー

生物型

薬剤耐性

ファージ型別

分離菌株の試験 遺伝子型別による解析

生化学的性状試験

属 Genus

種 Species

血清型別試験

O型別

H型別

遺伝子型別

PFGE

IS-printing

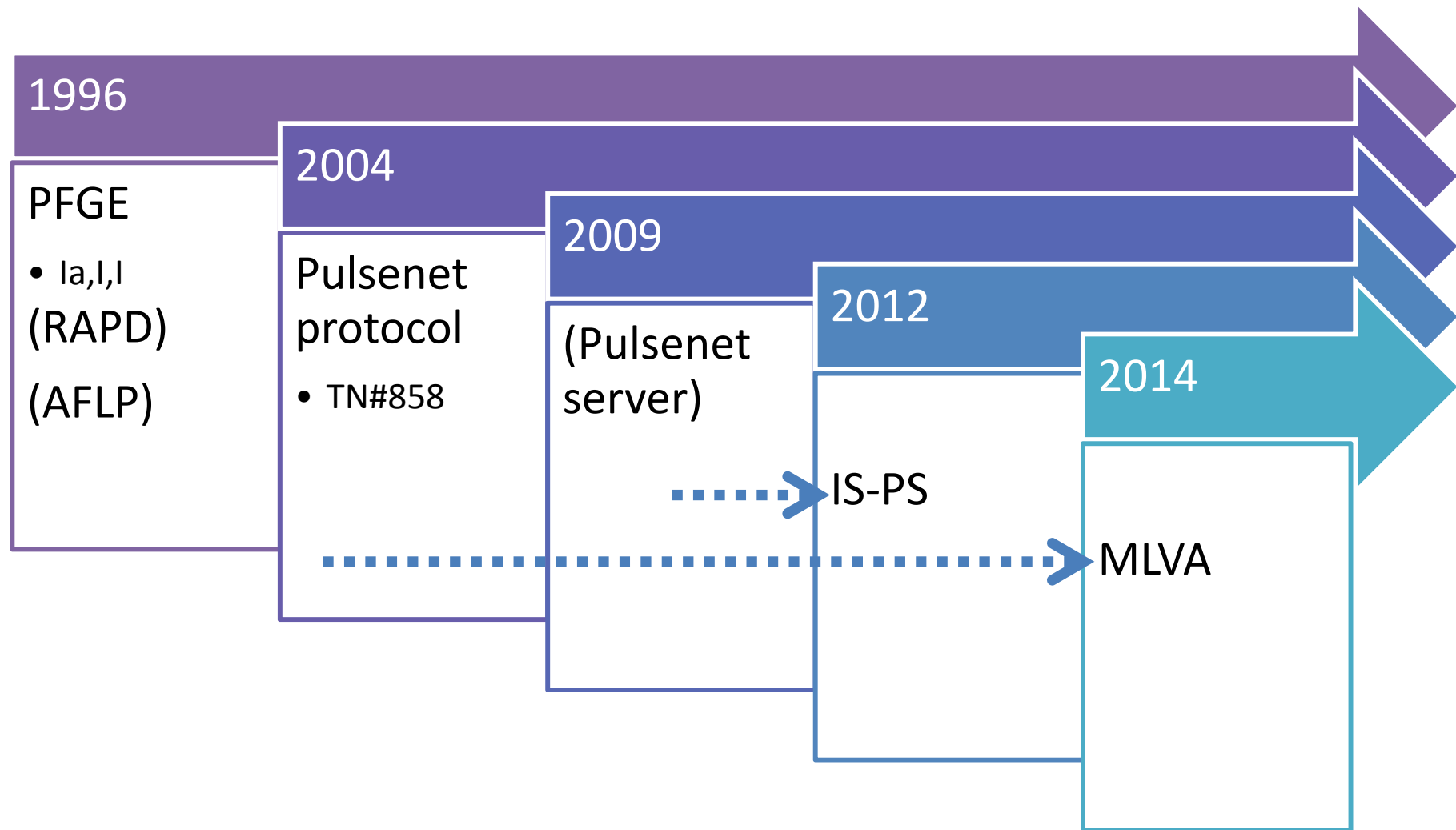
MLVA

同じ血清型の菌株同士を比較するために使われる

腸管出血性大腸菌O157ゲノム

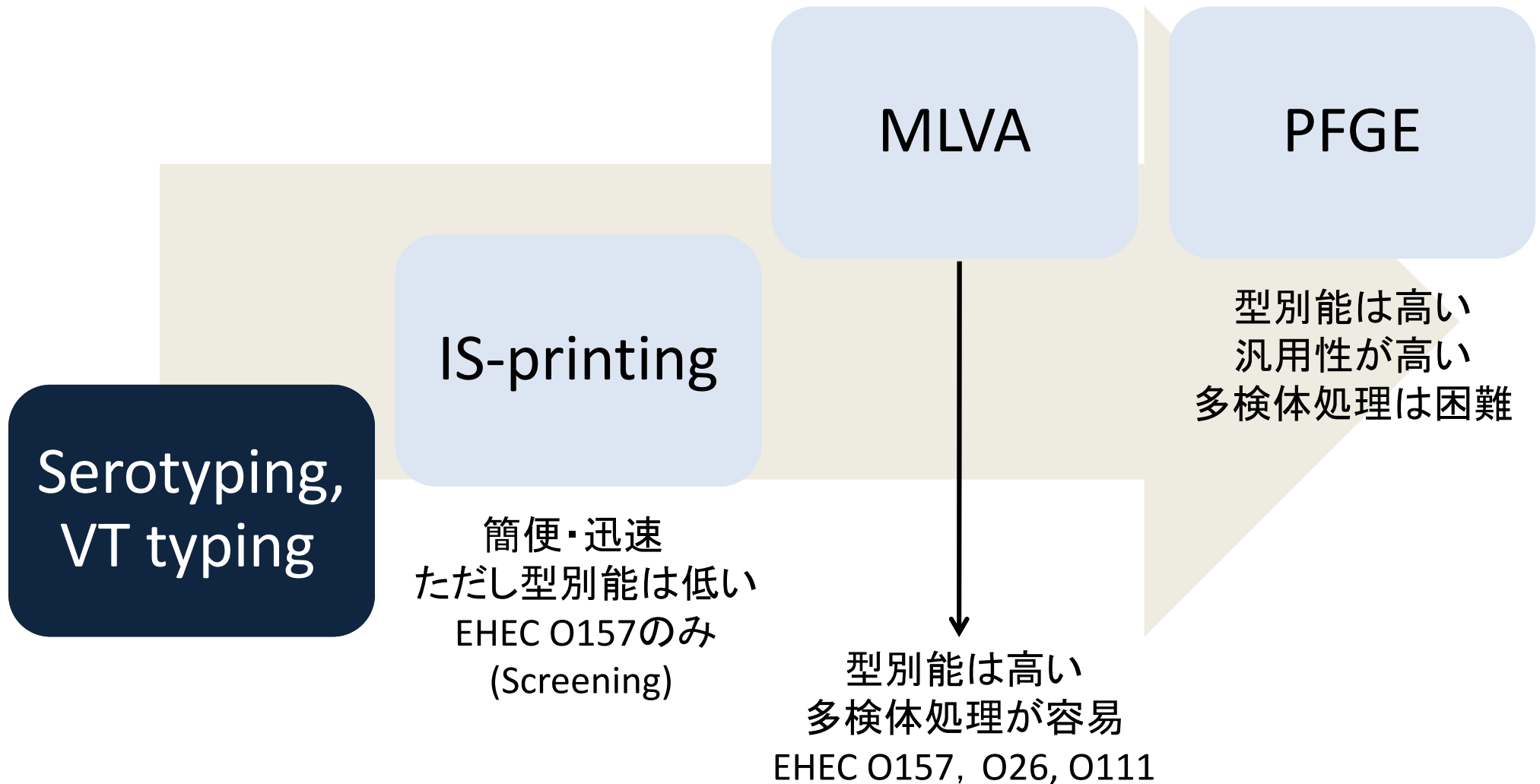
- O157のゲノム
 - 染色体の大きさは5.5Mbp
 - 約90kbのプラスミドを保有している
- PFGEで使われる制限酵素XbaI
 - 染色体上に40か所、プラスミド上に2か所
 - PFGEバンドとして認識されるのは20~25本
- IS-Printing systemで使われるIS629
 - Sakai株で23コピー
 - 使用される箇所は32
- MLVAで使われるリピート配列
 - CDCで8か所
 - PNJで17か所

わが国でEHECに使われてきた分子疫学的解析手法



腸管出血性大腸菌におけるDNA型別 事例解析への活用

腸管出血性大腸菌のタイピング



PFGE

制限酵素（レアカッター）の切断部位数と部位間の距離

Genome DNA



*Xba*I

T C T A G A
A G A T C T

*Bln*I

G C T A G C
C G A T C G

Rare cutter
通常の6塩基認識の制限酵素なら1000カ所以上
→
30カ所程度
(平均 ~175 kb)

巨大DNAを分離する電気泳動



PFGE泳動像が異なる（変化する）

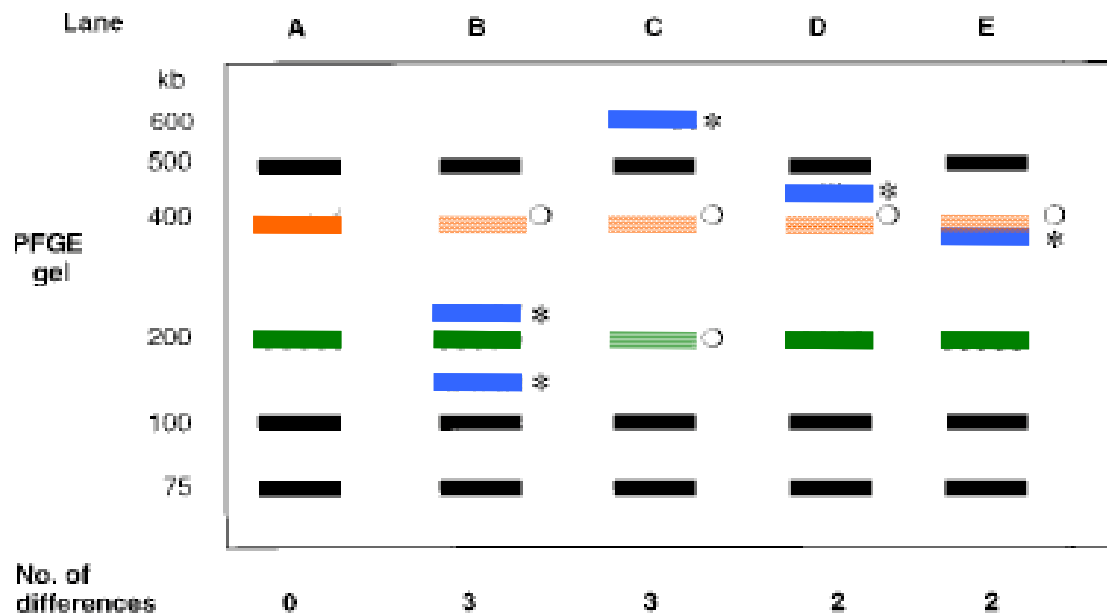
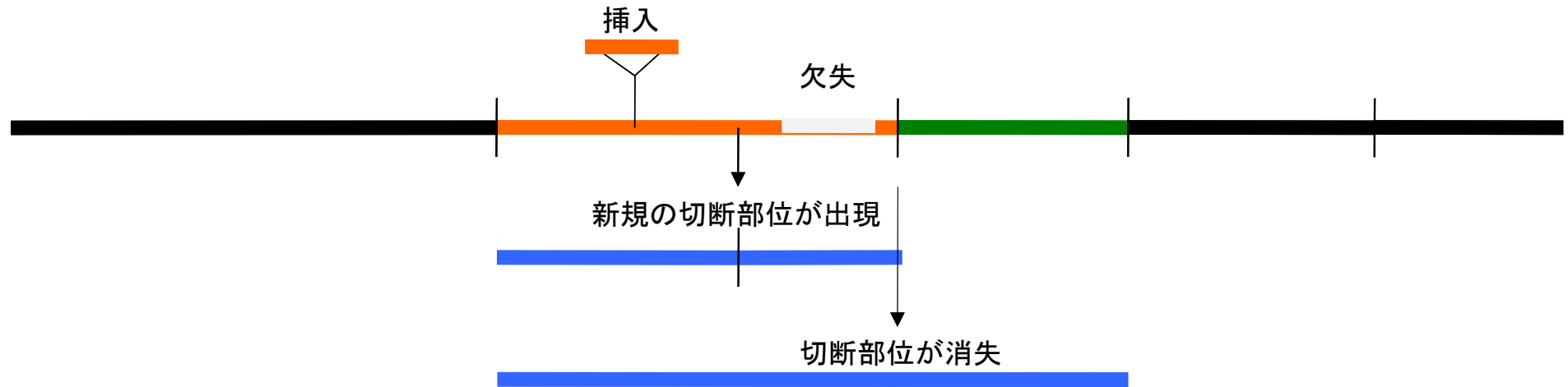


切断部位数と部位間の距離が異なる（変化する）

Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing

FRED C. TENOVER et al.

Ref 1: Tenover et al. JCM Vol. 33. No. 9, 2233-2239, 1995



1回の変異で
PFGE像が大きく（多様に）変わる

Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing

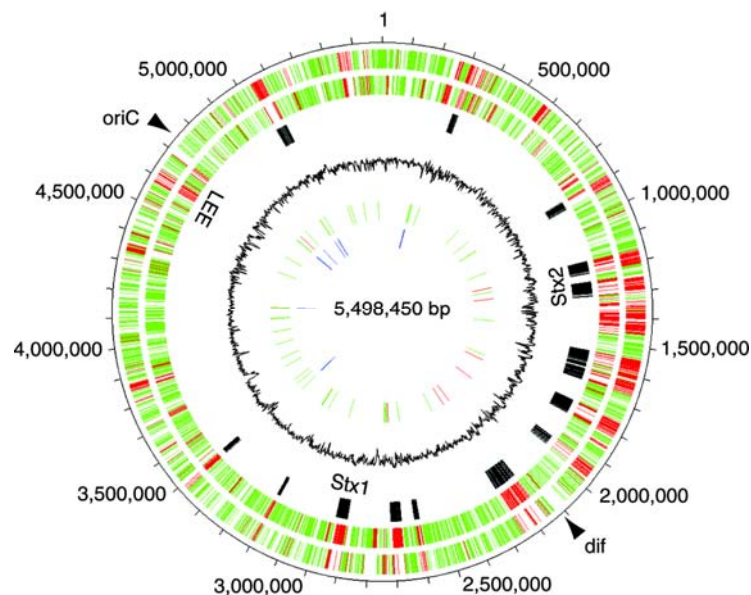
FRED C. TENOVER et al.

集団事例調査における分離菌株の分子タイピング

分類	集団発生の菌株系統と比較しての変異の数	PFGE (ref 1)	疫学的解釈
		集団発生の菌株系統と比較しての断片の相違数	
一致	0	0	分離菌株は集団発生の一部である
密接に関係 (closely related)	1	2 - 3	分離菌株はほぼ確実に集団発生の一部である (probably part of the outbreak)
関係する可能性 (possibly related)	2	4 - 6	分離菌株は集団発生の一部であるかもしれない (possibly part of the outbreak)
不一致	3以上	7以上	分離菌株は集団発生の一部ではない

Ref 1: Tenover et al. JCM Vol. 33. No. 9, 2233-2239, 1995

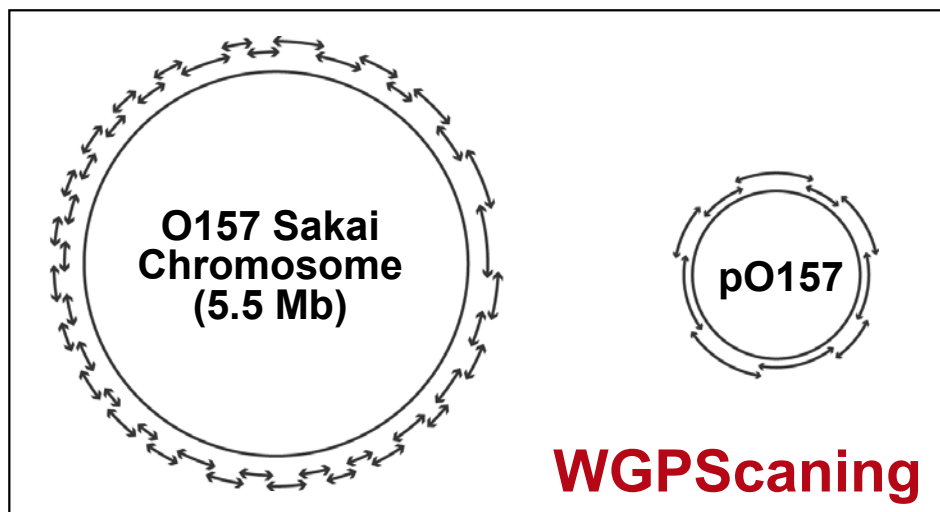
腸管出血性大腸菌のゲノム解析 から学んだこと



EHEC O157:H7のゲノム多様性は

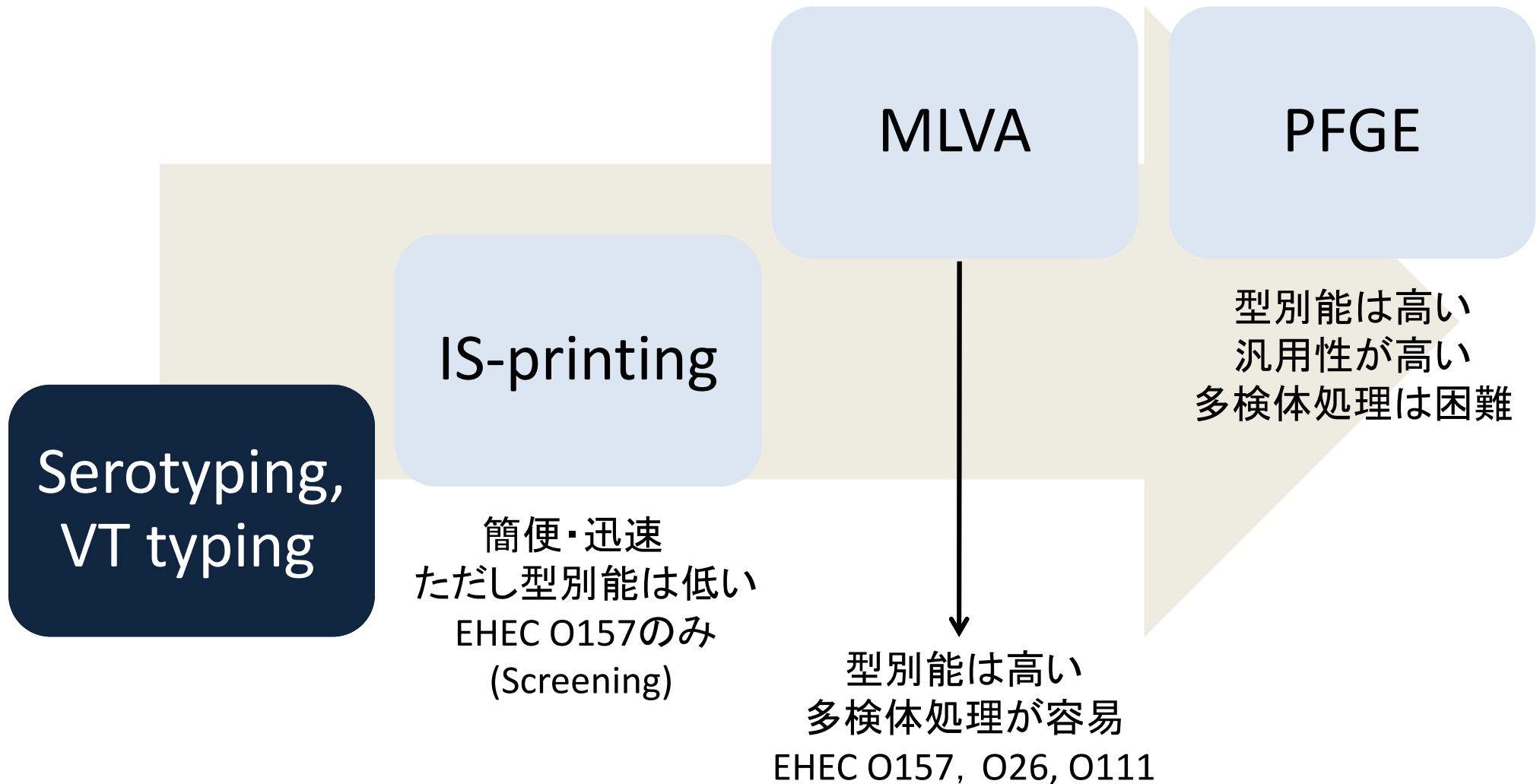
- 1 ファージの種類・数
- 2 IS (挿入配列) の種類・数

が大きく影響している。



*Xba*I切断部位の1 / 3はファージが
運んでいる

腸管出血性大腸菌のタイピング



MLVAについて

Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

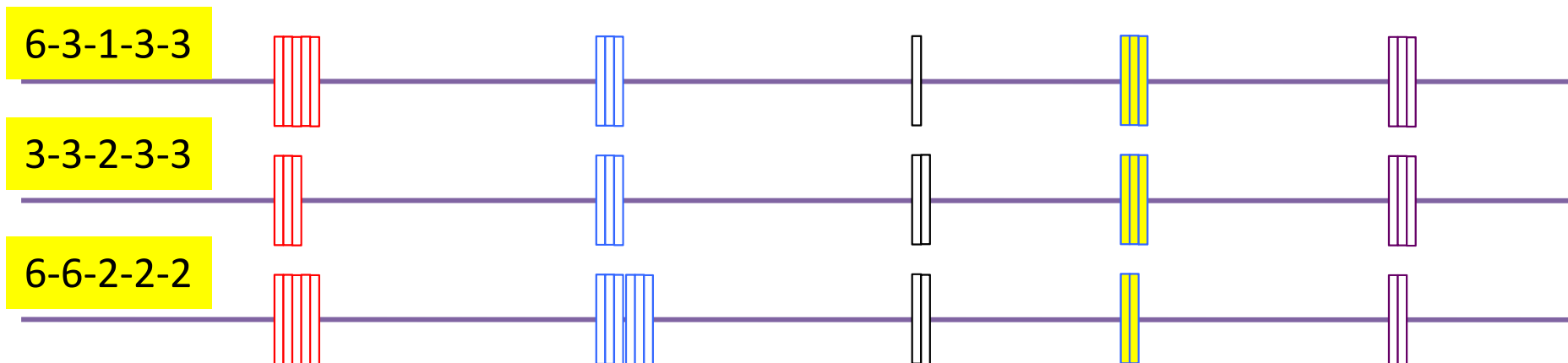
AAAA (Aの4回繰り返し)
ATATATAT (ATの4回繰り返し)
ATGATGATGATG (ATGの4回繰り返し)
ATGCATGCATGCATGC (ATGCの4回繰り返し)
ATGCAATGCAATGCAATGCA (ATGCAの4回繰り返し)

DNAの複製の際にミス
がおり、繰り返し単位
が増減する

$3.4 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-4}$ mutations/generation
(EHEC O157. Vogler AJ et al. J Bacteriol 2006 4253-)

Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

ゲノム上に存在するVNTR領域を複数箇所解析することで菌株間の比較解析を行なう



MLVA リピートユニットの変化

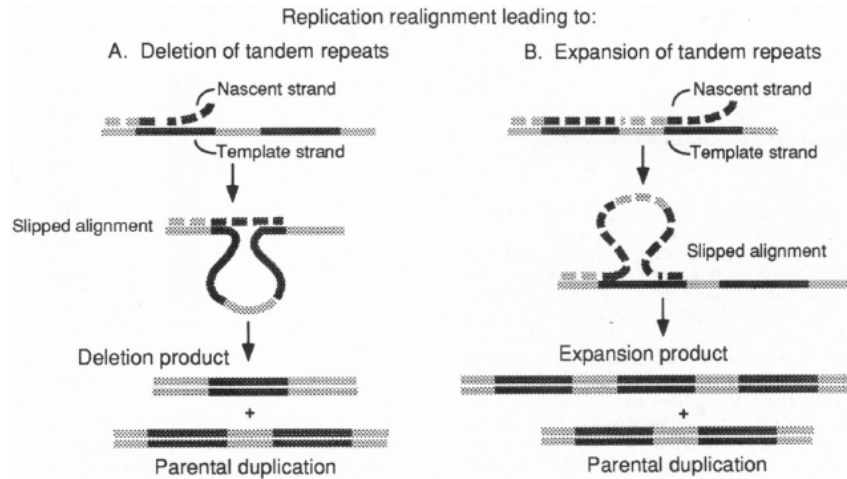


FIG. 1. The replication slippage model showing misalignments that lead to deletion (A) or expansion (B) of tandem repeats. (A) Slipped alignment of the nascent strand with its template, producing a loop between the repeats on the template, will result in a deletion product after completion of replication. (B) Slipped alignment of the nascent strand with its template, producing a loop between repeats in the nascent strand, will result in an expansion product after completion of replication. *Vol. 62, 1998*

PNAS 1996, 93: 7120-7124. Lovett and Feschenko

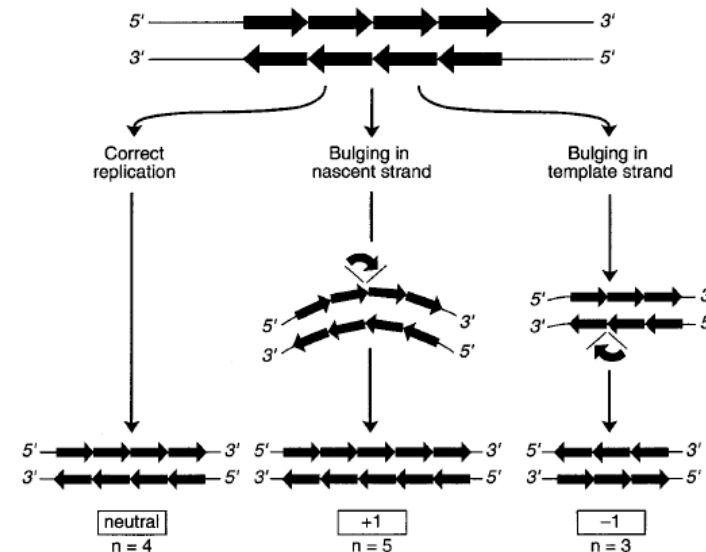
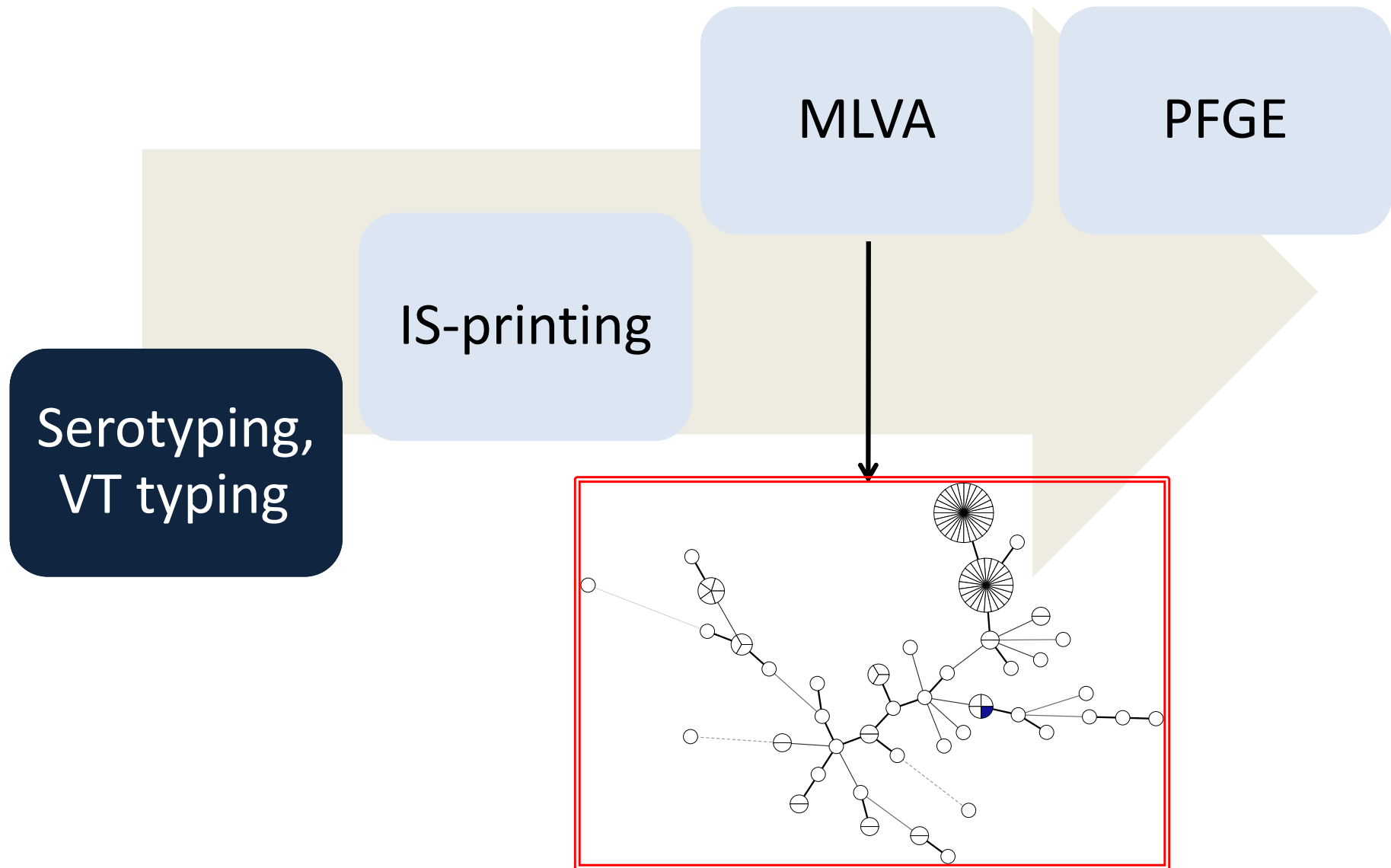


FIG. 2. Schematic representation of the mechanism of SSM during replication, which results in shortening or lengthening of SSRs. Individual repeat units are identified by arrows; bulging is the presence of non-base-pair base residues interrupting a regular 2-strand DNA helix. Bulging in the nascent strand leads to a larger number of repeat units; bulging in the template strand results in a smaller number of units. During replication, bulges can occur in both strands, and the effect of insertion or deletion can be neutralized by occurrence of the adverse event. The number of repeat units can decrease or increase by multiple repeats once multiple bulging in one strand has occurred.

腸管出血性大腸菌のタイピング



集団事例調査における分離菌株の分子タイピング

分類	集団発生の菌株系統と比較しての遺伝子上の相違の数	PFGE (ref 1)	MLVA	疫学的解釈
		集団発生の菌株系統と比較しての断片の相違数	集団発生の菌株系統と比較しての相違する部位数	
一致	0	0	0	分離菌株は集団発生の一部である
密接に関係 (closely related)	1	2 - 3	1 (SLV)	分離菌株はほぼ確実に集団発生の一部である (probably part of the outbreak)
関係する可能性 (possibly related)	2	4 - 6	2 (DLV)	分離菌株は集団発生の一部であるかもしれない (possibly part of the outbreak)
不一致	3以上	7以上	3以上	分離菌株は集団発生の一部ではない

Ref 1: Tenover et al. JCM Vol. 33. No. 9, 2233-2239, 1995

Diffused Outbreaks

各事例は散発例として(疫学的なリンクが見いだされない)認識されるが

分離株の解析から、同一の原因が推測される

PFGE

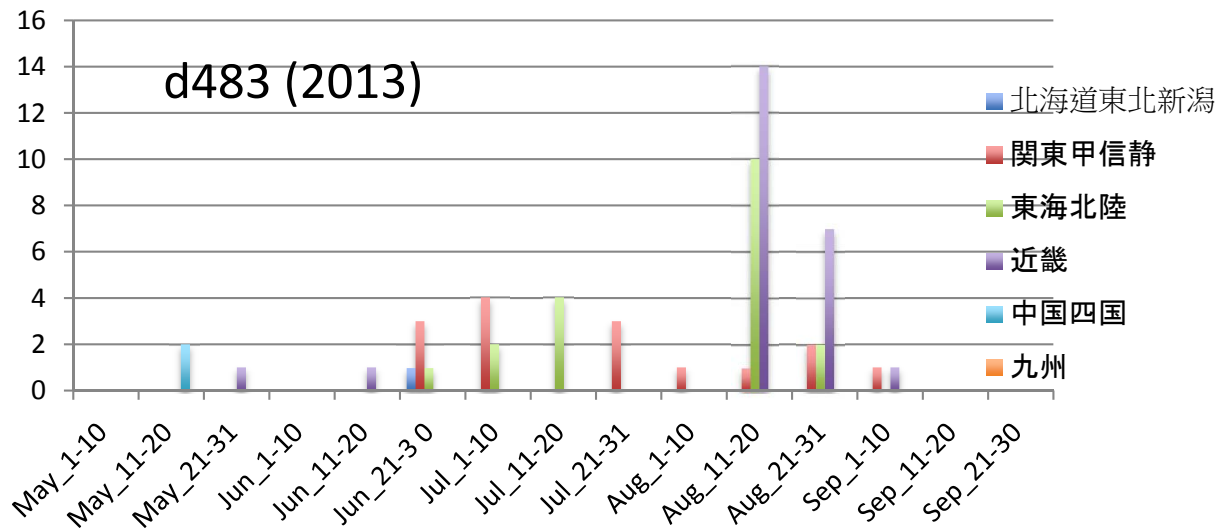
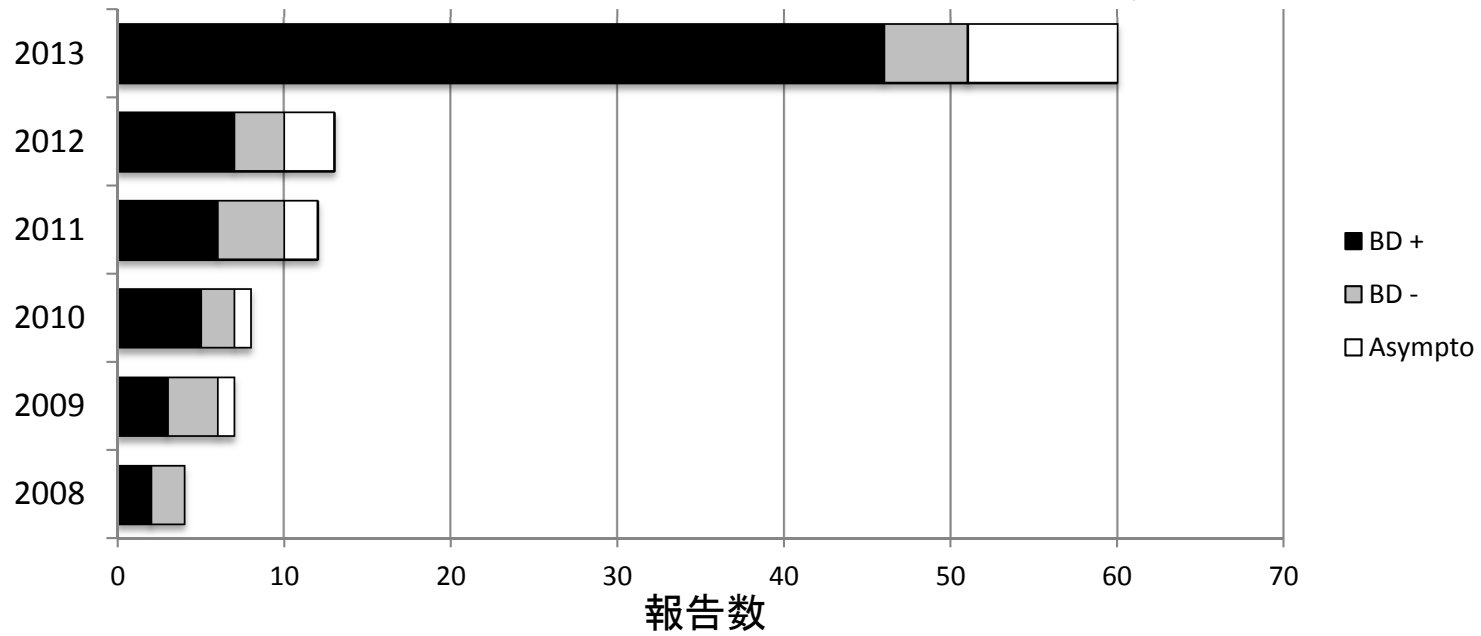
IS-P

追加の疫学調査が可能であれば原因の特定につながる可能性がある

ただし、

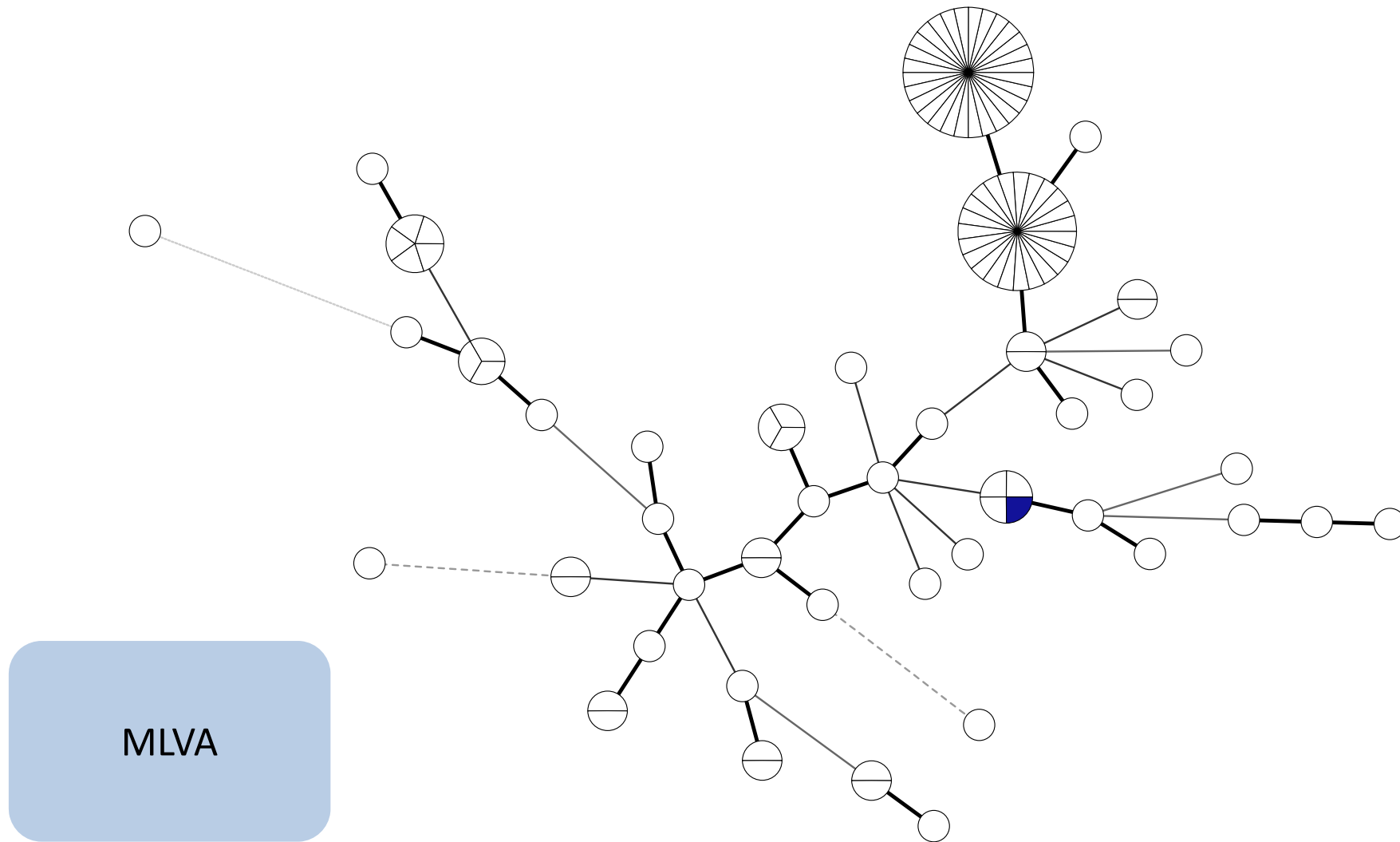
d483

症状の記載がないものが1例. それを合わせると, 今までのところ61例



d483 MLVA-MST (2008-2013; n=109)

2008



PDGE d483 109株は42のMLVA型に細分化される

菌株解析の結果について



菌株どうしが、、

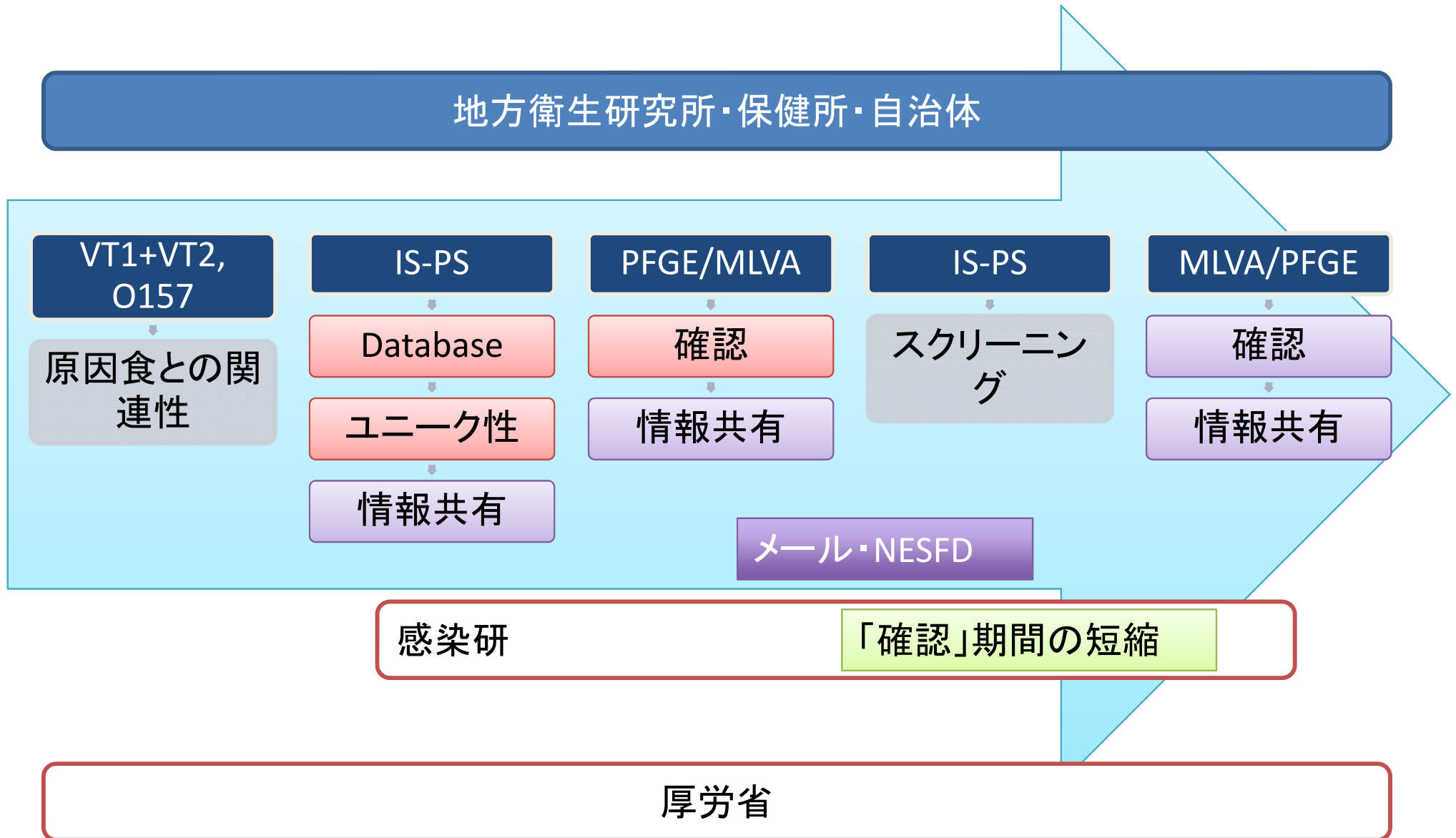
- 異なる場合
 - 異なる由来(汚染源)の可能性が高い
 - 複数汚染の可能性を排除しない
- 一致もしくは類似している場合
 - 共通の汚染源による可能性が高い
 - ただし、共通の汚染源を保証しているわけではない

菌株情報(分子疫学解析の結果)と疫学情報とで相互にフィードバックし、
情報が合致することが重要

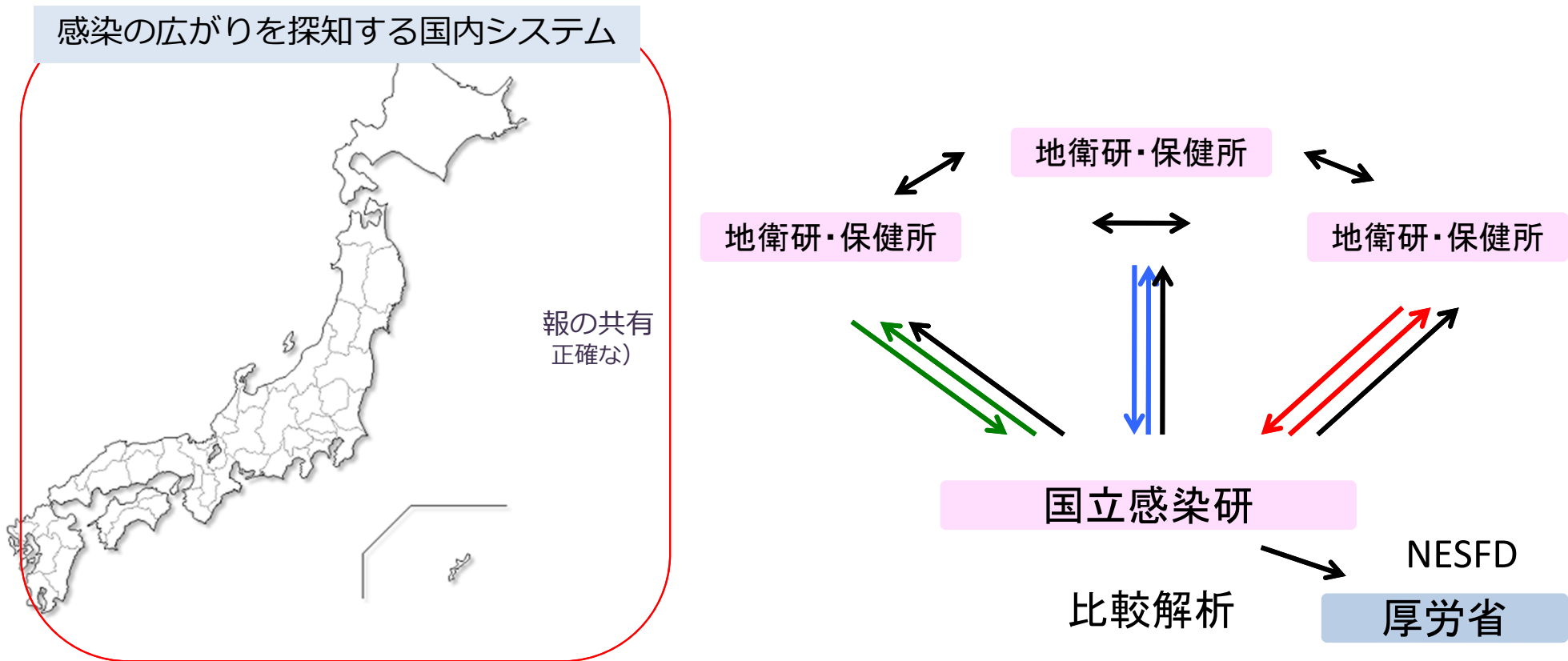
腸管出血性大腸菌における分子疫学 事例解析への活用

- 集団事例の解析
 - 比較的早い段階で疫学情報がついてくる
 - 菌株の解析結果と疫学情報の突合
 - 菌側の確証を提供
- 広域事例の探知
 - 散発例が多い
 - 各症例・事例間を結ぶ情報は提供されない
 - 分子疫学データからリンクを探知
 - リンクが疑われる事例同士の疫学情報を精査

試験・情報の流れ (一例)



EHECのDNA型別解析結果



- EHEC O157, O26, O111に関してはMLVA解析手法を利用して迅速（7-10日以内）に解析結果を報告
- 広域事例が疑われる場合、代表株のPFGEデータを提示
- 2013年分離株のMLVAデータを各自治体に報告
- 他の血清型に関してはPFGE解析結果を報告