

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6166365号
(P6166365)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 13 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2015-516741 (P2015-516741)	(73) 特許権者	514318253
(86) (22) 出願日	平成25年6月14日 (2013.6.14)		アジャンス ナショナル ド セキュリテ
(65) 公表番号	特表2015-519075 (P2015-519075A)		サニテア ド ラリマンタシオン, ド
(43) 公表日	平成27年7月9日 (2015.7.9)		レンヴィロンヌマン エ デュ トラヴァ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/054888		イユ
(87) 国際公開番号	W02013/186754		AGENCE NATIONALE DE
(87) 国際公開日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		SECURITE SANITAIRE
審査請求日	平成28年5月20日 (2016.5.20)		DE L' ALIMENTATION,
(31) 優先権主張番号	12171941.3		DE L' ENVIRONNEMENT
(32) 優先日	平成24年6月14日 (2012.6.14)		ET DU TRAVAIL
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス、エフ-94701、メゾン-ア
			ルフォール セデックス、リュ ピエール
			エ マリー キュリー 14
			14 rue Pierre et Ma
			rie Curie, F-94701
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸出血性大腸菌を検出及び同定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルに存在すると疑われる腸出血性大腸菌(EHEC)の血清型を同定する方法であって、前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAにおいて、以下の大腸菌CRISPR配列：

a) - 配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 のCRISPR配列であり、その 1 以上の存在がEHEC 0157:[H7]の存在を示す配列；及び/又は

- 配列番号 4 のCRISPR配列であり、その存在がEHEC 0157:[H7]の存在を示す配列から選択される、EHEC 0157:[H7]同定用CRISPR配列；

b) 配列番号 5 の配列であり、その存在がEHEC 0145:[H28]の存在を示すEHEC 0145:[H28]同定用CRISPR配列；及び

c) 配列番号 6 の配列であり、その存在がEHEC 0111:[H8]の存在を示すEHEC 0111:[H8]同定用CRISPR配列；及び

d) 配列番号 7 の配列であり、その存在がEHEC 0121:[H19]の存在を示すEHEC 0121:[H19]同定用CRISPR配列；及び

e) 配列番号 8 の配列であり、その存在がEHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]の存在を示すEHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]同定用CRISPR配列；及び

f) 配列番号 9 の配列であり、その存在がEHEC 0104:[H4]の存在を示すEHEC 0104:[H4]同定用CRISPR配列；及び

g) 配列番号10の配列であり、その存在がEHEC 026:[H11]の存在を示すEHEC 026:[H11]同定用CRISPR配列

10

20

の存否を検出することを含んでなる方法。

【請求項 2】

前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAについて、前記CRISPR配列を標的するプライマーの組合せを用いてPCRアッセイを行うことを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記プライマーの組合せが

a) - 以下の配列：

GGGAACACAAACCGAAACACA(配列番号11)

CTTAGTGTGTTCCCCGCGC(配列番号12)

で規定される、配列番号 1 及び配列番号 2 の両方のCRISPR配列を標的するプライマーセット、及び

- 以下の配列：

GAACACTTTGGTGACAGTTTTTGT(配列番号13)

CTTAGTGTGTTCCCCGCGC(配列番号14)

で規定される、配列番号 3 のCRISPR配列を標的するプライマーセット；及び/又は

- 以下の配列：

GAACACAAACCGAAACACACG(配列番号15)

ATAAACCGTCACCAAAACAGTG(配列番号16)

で規定される、配列番号 4 のCRISPR配列を標的するプライマーセット

からなり、前二者のプライマーセットの少なくとも一方の増幅産物の存在及び/又は後者のプライマーセットの増幅産物の存在がEHEC 0157:[H7]の存在を示す、EHEC 0157:[H7]検出用プライマー；及び

b) 以下の配列：

GAACCTTGAGCCCTGCCAGAA(配列番号17)

ACCGCGATCTTTTCCTACCTG(配列番号18)

で規定される、配列番号 5 のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0145:[H28]の存在を示す、EHEC 0145:[H28]検出用プライマー；及び

c) 以下の配列：

GTGACCGCCTGTACACGC(配列番号19)

CGGATATTTGGGCGTAATACC(配列番号20)

CTGCCGCGAGTGGTTTCAC(配列番号21)

で規定される、配列番号 6 のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、配列番号 19及び配列番号20又は配列番号19及び配列番号21の少なくとも一方のプライマー対の増幅産物の存在がEHEC 0111:[H8]の存在を示す、EHEC 0111:[H8]検出用プライマー；

d) 以下の配列：

CGGGGAACACTACAGGAAAGAA(配列番号22)

GGCGGAATACAGGACGGGTGG(配列番号23)

で規定される、配列番号 7 のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0121:[H19]の存在を示す、EHEC 0121:[H19]検出用プライマー；

e) 以下の配列：

GAGTCTATCAGCGACACTACC(配列番号24)

AACCGCAGCTCGCAGCGC(配列番号25)

で規定される、配列番号 8 のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]の存在を示す、EHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]検出用プライマー；及び

f) 以下の配列：

GGAACCTACCGAGCGCCG(配列番号26)

GCCTTTGCAGCGTCTTTCCGATC(配列番号27)

で規定される、配列番号 9 のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0104:[H4]の存在を示す、EHEC 0104:[H4]検出用プライマー；及び

g) 以下の配列：

ACAATCGTGTGTAAATTCGCGG(配列番号28)

GATAAACCGTGGTACGGAACA(配列番号29)

で規定される第1のプライマーセットと、以下の配列：

TGAAACCACTCGCGGCAGAT(配列番号30)

ATAAACCGATCTCCTCATCCTC(配列番号31)

で規定される第2のプライマーセットとの、配列番号10のCRISPR配列を標的する2つのプライマーセットからなり、それらの少なくとも一方の増幅産物の存在がEHEC 026:[H11]の存在を示す、EHEC 026:[H11]検出用プライマーを含んでなる請求項2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記サンプルがEHEC 0157:[H7]、0145:[H28]、0103:[H2]、0111:[H8]、0121:[H19]、026:[H11]、045:[H2]及び0104:[H4]の少なくとも1つの血清型の腸出血性大腸菌(EHEC)を含有するかどうかを予測する前工程を含んでなり、該前工程がespK遺伝子の検出と、以下の標的遺伝子：espV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の1以上の検出とを含んでなる請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記前工程がespK遺伝子の検出と、espV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156から選択される少なくとも1つの遺伝子の検出と、Z6065遺伝子の検出とを含んでなる請求項4に記載の方法。

20

【請求項6】

前記前工程が前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAについて、espKに由来するプライマーセットとespV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の少なくとも1つに由来するプライマーセットとを含んでなるプライマーの組合せを用いてPCRアッセイを行い、各プライマーセットの増幅産物の存否を検出することを含んでなる請求項4又は5に記載の方法。

【請求項7】

前記前工程が前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAについて、stx1に由来するプライマーセット及びstx2に由来するプライマーセットを含んでなるプライマーの組合せを用いてPCRアッセイを行い、各プライマーセットの増幅産物の存否を検出することを更に含んでなる請求項4～6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項8】

請求項3に規定するプライマーセットを含んでなる、腸出血性大腸菌(EHEC)の血清型の同定キット。

【請求項9】

請求項3に規定するプライマーセットの各々の増幅産物を検出するプローブを更に含んでなる請求項8に記載のキット。

【請求項10】

espKに由来するプライマーセットと、以下：espVに由来するプライマーセット、ureDに由来するプライマーセット、Z2098に由来するプライマーセット、Z1151に由来するプライマーセット、Z1153に由来するプライマーセット、Z1154に由来するプライマーセット、Z1155に由来するプライマーセット、Z1156に由来するプライマーセット、Z6065に由来するプライマーセットから選択される少なくとも1つのプライマーセットとを更に含んでなる請求項8又は9に記載のキット。

40

【請求項11】

請求項10に規定するプライマーセットの各々の増幅産物を検出するプローブを更に含む請求項10に記載のキット。

【請求項12】

stx1及びstx2を標的するプライマーセットを更に含んでなる請求項8～11のいずれか1項に記載のキット。

50

【請求項 13】

stx1の増幅産物を検出するプローブとstx2の増幅産物を検出するプローブを含んでなる請求項 12 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトの健康にとって重大なリスクとなるシガトキシン産生大腸菌(STEC)の同定に関する。

【背景技術】

【0002】

シガトキシン産生大腸菌(*Escherichia coli*)(STEC)は、400を超える大腸菌O:H血清型に属する多様な一群の大腸菌であり、いくつかは下痢から出血性結腸炎(HC)及び溶血性尿毒症症候群(HUS)にわたる食物媒介疾患の大発生及び散発例を引き起こす。ヒトに対する病原性に従い、後者の株は腸管出血性大腸菌(EHEC)とも呼ばれる(Levine 1987, Nataro and Kaper 1998)。HC及びHUSの多くの症例でEHEC血清型O157:H7株が原因とされてきたが、今日では、他の血清型のSTECがEHEC群に属すると認識されている。

【0003】

よって、多くの国で蓄積された証拠は、30~60%までのヒトSTEC感染が非-O157 STECにより引き起こされることや、5~7程度の少数の「優先」血清型のSTECがHC及びHUSの大発生及び散発例に関与していることを示している。これらには、血清型O26:[H11]、O45:[H2]、O103:[H2]、O111:[H8]、O121:[H19]、O145:[H28]、O157:[H7]及びそれらの非運動性派生株が含まれる。加えて、O104:[H4]の非通常株は、2011年の最大規模の世界的なHC及びHUS大発生に関係付けられている(Scheutら, 2011; Frankら, 2011; Struelensら, 2011; Gaultら, 2011)。

【0004】

その結果として、多くの所管当局がヒトに対して強毒性であるこれらSTEC株から公衆を保護する食品検査プログラムの実施を検討中である。(リスクベースの食品検査プログラムの一部として)これら腸管出血性大腸菌(EHEC)株を検出する合理的アプローチには、優先STECに特有の顕著な特徴(例えば、血清群、血清型、毒性及び他のマーカー)の明確な規定及び食品においてこれら病原性STECを検出する効果的アプローチが必要である。非O157 EHECの検出は特に困難である。なぜなら、非O157 EHECは、同じ生態学的地位を共有する多数の無害の共生大腸菌と区別できる特性を有しないからである。食物媒介大発生に關する最も重要なO-血清群を、疾患の重篤度、発生との関係及び頻度に基づいて同定するフレームワークとして、血清病原型分類がKarmaliら(2003)により提案されているが、種々のSTEC株間で毒性が異なる理由は未解明のままである。この差異は、STEC株が保有する毒性遺伝子のパターンの差に起因するのであろう。このことを実証し、適切な分子マーカーを同定する研究が必要とされている。

【0005】

例えばstx1/stx2遺伝子及び(腸病原性大腸菌(EPEC)において最初に同定された遺伝子座であるLEE(locus of enterocyte effacement; 腸細胞消失の座)に位置する)eae遺伝子の存在を検出することによって、サンプル中のSTEC汚染の存在を決定する技術が存在する。しかし、STEC病原性の遺伝子基礎は、これら遺伝子的一方又は両方の存否より更に複雑である。株の混合物(例えば、STEC株とEPEC株の混合物)を含み得る複雑なサンプル(例えば、食物、便、環境サンプル)におけるstx1/2及びeae遺伝子の存在は、当該サンプルにおけるEHECの存在を示すものではない。

【0006】

しかし、ヒトにおいて非常に重大な健康問題を引き起こすことがあるSTEC株もあることを考えれば、食品におけるSTEC株の検出は、このSTECがヒトの健康を脅かしそうにないとしても、当該食品の廃棄に繋がる。これは、非病原性STEC株とEHEC株との弁別の欠如に起因する大量の浪費を生じる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

EHEC株を選択的に検出し、非病原性STEC株と弁別するために、stx1/stx2及びeaeマーカ－に加えて、他の遺伝子マーカ－を使用することが提案されている。例えば、PCT WO 2011/018762には、遺伝子stx1、stx2、eae、nleB及びespKの組合せ検出を含む、サンプル中のEHECの存在を予測する方法が記載されている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

しかし、EHEC(非O157 EHECを含む)の存在についての鑑別スクリーニング及び(特に「上位7つ」の血清型O26:[H11]、O45:[H2]、O103:[H2]、O111:[H8]、O121:[H19]、O145:[H28]、O157:[H7]の場合に)含まれるEHEC血清型の特異的検出を可能にする信頼できる検査の必要性が依然として存在する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、ヒトの健康にとって重大なリスクとなる幾つかのSTEC株に関する弁別遺伝子マーカ－を同定した。具体的には、本発明者らは、ヒトに対して高毒性を有するEHEC株のCRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)配列内に位置する遺伝子マーカ－を同定した。

【 0 0 1 0 】

CRISPRは、大腸菌を含む多くの細菌種のゲノムに存在する。CRISPRは、21～47bp長の直接反復を含み、類似サイズのスペーサーで隔てられたタンデム配列からなる。スペーサーは、外来核酸(例えば、ファージ又はファージミド)に由来し、それにより、相同なファージ及びファージミドによる感染から細菌が保護され得るという仮説が立てられている。

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、世界的に最も頻繁な臨床例と関係する種々のEHEC株のCRISPR遺伝子座を配列決定し、ヒトでのEHEC感染の大部分を担うEHEC血清型O157:[H7]、O145:[H28]、O103:[H2]、O111:[H8]、O121:[H19]、O45:[H2]、O26:[H11]、O104:[H4]及びそれらの非運動性派生株の特異的同定に使用できる異なるスペーサーを同定した。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の1つの目的は、サンプルに存在すると疑われるEHECの血清型を同定する方法であって、前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAにおいて、以下の大腸菌CRISPR配列：

a) - 配列番号1、配列番号2及び配列番号3のCRISPR配列であり、その1以上の存在がEHEC O157:[H7]の存在を示す配列；及び/又は

- 配列番号4のCRISPR配列であり、その存在がEHEC O157:[H7]の存在を示す配列から選択される、EHEC O157:[H7]同定用CRISPR配列；

b) 配列番号5の配列であり、その存在がEHEC O145:[H28]の存在を示すEHEC O145:[H28]同定用CRISPR配列；及び

c) 配列番号6の配列であり、その存在がEHEC O111:[H8]の存在を示すEHEC O111:[H8]同定用CRISPR配列；及び

d) 配列番号7の配列であり、その存在がEHEC O121:[H19]の存在を示すEHEC O121:[H19]同定用CRISPR配列；及び

e) 配列番号8の配列であり、その存在がEHEC O103:[H2]及び/又はEHEC O45:[H2]の存在を示すEHEC O103:[H2]及び/又はEHEC O45:[H2]同定用CRISPR配列；及び

f) 配列番号9の配列であり、その存在がEHEC O104:[H4]の存在を示すEHEC O104:[H4]同定用CRISPR配列；及び

g) 配列番号10の配列であり、その存在がEHEC O26:[H11]の存在を示すEHEC O26:[H11]同定用CRISPR配列

の存否を検出することを含んでなる、方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明の1つの好適な実施形態によれば、この方法は、前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAについて、前記CRISPR配列の増幅用に設計されたプライマーを用いてPCRアッセイを行い、対応する増幅産物の存在を調べることを含んでなる。

【 0 0 1 4 】

好ましくは、前記PCRアッセイは、

a) - 以下の配列：

GGGAACACAAACCGAAACACA(配列番号11)

CTTAGTGTGTTCCCCGCGC(配列番号12)

で規定される、配列番号1及び配列番号2の両方のCRISPR配列を標的するプライマーセット、及び

- 以下の配列：

GAACACTTTTGGTGACAGTTTTTGT(配列番号13)

CTTAGTGTGTTCCCCGCGC(配列番号14)

で規定される、配列番号3のCRISPR配列を標的するプライマーセット；及び/又は

- 以下の配列：

GAACACAAACCGAAACACACG(配列番号15)

ATAAACCGTCACCAAAACAGTG(配列番号16)

で規定される、配列番号4のCRISPR配列を標的するプライマーセット

からなり、前二者のプライマーセットの少なくとも一方の増幅産物の存在及び/又は後者のプライマーセットの増幅産物の存在がEHEC 0157:[H7]の存在を示す、EHEC 0157:[H7]検出用プライマー；及び

b) 以下の配列：

GAACCTTGAGCCCTGCCAGAA(配列番号17)

ACCGCGATCTTTTCCTACCTG(配列番号18)

で規定される、配列番号5のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0145:[H28]の存在を示す、EHEC 0145:[H28]検出用プライマー；及び

c) 以下の配列：

GTGACCGCCTGTACACGC(配列番号19)

CGGATATTTGGGCGTAATACC(配列番号20)

CTGCCGCGAGTGGTTTCAC(配列番号21)

で規定される、配列番号6のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、配列番号19及び配列番号20又は配列番号19及び配列番号21の少なくとも一方のプライマー対の増幅産物の存在がEHEC 0111:[H8]の存在を示す、EHEC 0111:[H8]検出用プライマー；

d) 以下の配列：

CGGGGAACACTACAGGAAAGAA(配列番号22)

GGCGGAATACAGGACGGGTGG(配列番号23)

で規定される、配列番号7のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0121:[H19]の存在を示す、EHEC 0121:[H19]検出用プライマー；

e) 以下の配列：

GAGTCTATCAGCGACACTACC(配列番号24)

AACCGCAGCTCGCAGCGC(配列番号25)

で規定される、配列番号8のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]の存在を示す、EHEC 0103:[H2]及び/又はEHEC 045:[H2]検出用プライマー；及び

f) 以下の配列：

GGAACCTACCGAGCGCCG(配列番号26)

GCCTTTGCAGCGTCTTTCCGATC(配列番号27)

で規定される、配列番号9のCRISPR配列を標的するプライマーセットからなり、その増幅産物の存在がEHEC 0104:[H4]の存在を示す、EHEC 0104:[H4]検出用プライマー；及び

10

20

30

40

50

g) 以下の配列：

ACAATCGTGTGTAAATTCGCGG(配列番号28)

GATAAACCGTGGTACGGAACA(配列番号29)

で規定される第1のプライマーセットと、以下の配列：

TGAAACCACTCGCGGCAGAT(配列番号30)

ATAAACCGATCTCCTCATCCTC(配列番号31)

で規定される第2のプライマーセットとの、配列番号10のCRISPR配列を標的する2つのプライマーセットからなり、それらの少なくとも一方の増幅産物の存在がEHEC 026:[H11]の存在を示す、EHEC 026:[H11]検出用プライマーを含んでなるプライマーの組合せを用いて行う。

10

【0015】

増幅産物は、PCR産物を検出する任意の適切な方法により検出することができる。例えば、PCR産物は、それぞれの標的配列に由来するプローブにより検出することができる。

【0016】

好適なプローブの例を下記に示す：

- 以下の配列：CGATCAATCCGAATATGAGCGGT(配列番号32)で規定され、配列番号1及び配列番号2に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、及び以下の配列：CACTGTTTTGTGACGGTTTATCC(配列番号33)で規定され、配列番号3に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、及び/又は以下の配列：ACAAAACTGTCACCAAAGTGTTTC(配列番号34)で規定され、配列番号4に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

20

- 以下の配列：TGGGGCCTCTTTTGTACCCGG(配列番号35)で規定され、配列番号5に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：TGTAATGGCTCACCGGTTTATCCCC(配列番号36)で規定され、配列番号6に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：TCGCCAACGGCGACAGGGG(配列番号37)で規定され、配列番号7に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：TCGGAACGTGGCGCTATAGGTG(配列番号38)で規定され、配列番号8に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：CTGGGAGCGTATCTCACGTTCCGT(配列番号39)で規定され、配列番号9に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

30

- 以下の配列：TGCTGTCTATATTTGACCAAGTGTTC(配列番号40)で規定され、配列番号10に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列10：CCAGCTACCGACAGTAGTGTGTTC(配列番号41)で規定され、配列番号10に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ。

【0017】

本発明の別の1つの観点によれば、サンプルが定型腸出血性大腸菌(EHEC)(本明細書でstx及びeaeの両方について陽性である大腸菌株と定義される)及び/又は非定型EHEC 0104:H4(stxについて陽性結果を示し、eaeについて陰性結果を示す)を含有するかどうかを予測する方法が提供される。定型EHEC株には、特に、EHEC 0157:H7、0145:H28、0103:H2、0111:H8、0121:H19、026:H11及び045:H2血清型並びにそれらの非運動性派生株が含まれる。

40

この方法は、espK遺伝子の検出と、以下の標的遺伝子：espV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の1以上の検出とを含んでなる。

これら大腸菌遺伝子標的は、種々のゲノムO-アイランド：O1-43、O1-44、O1-50、O1-57及びO1-71に由来する非LEEコード化タイプIIIエフェクターに相当する。

espKとespV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155及びZ1156の1以上との組合せは、推定毒性マーカーの幾つかの組合せから、定型EHEC(stx及びeae陽性大腸菌株)、特に血清型EHEC 0157:[H7]、0145:[H28]、0103:[H2]、0111:[H8]、0121:[H19]、026:[H11]又は045:[H2]のEHEC株の存在をより良好に予測できるものとして本発明者らが同定した。espKとZ6065との組合せは、非定型EHEC 0104:H4の存在を予測できる。

特に好適な組合せは以下である：

50

- espKとespV、ureD、Z2098の1以上の組合せ；
- espKとZ6065との組合せ；
- espKとespV、ureD、Z2098の1以上とZ6065との組合せ。

【0018】

1つの特定の実施形態によれば、本方法は、前記サンプル又は該サンプルから単離したDNAについて、espKに由来するプライマーセットとespV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の少なくとも1つに由来するプライマーセットとを含んでなるプライマーの組合せを用いてPCRアッセイを行い、各プライマーセットの増幅産物の存在を検出することを含んでなる。

この方法の1つの好適な実施形態によれば、プライマーの組合せは、stx1に由来するプライマーセットとstx2に由来するプライマーセットとを更に含んでなる。これにより、STECのマーカーストとしてのstx遺伝子と、HC及びHUSの大発生及び散发例に関係する優先STEC血清型に関連付けられた上記の追加の遺伝子マーカーストとの両方についてサンプルをスクリーニングすることが可能になる。

従来技術の方法とは対照的に、本発明の方法は、eae遺伝子の検出を必要としない。

espK、espV、ureD、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156、Z6065、stx1又はstx2に由来し、本発明のPCRアッセイでの使用に適切なプライマー及びこれらプライマーで得られた増幅産物の検出を可能にするプローブは、データベースで入手可能なこれら遺伝子の配列に基づいて(例えばGenBankにおいてアクセッション番号AE005174.2で入手可能な大腸菌O157:H7(EDL933株)の注釈付き配列内で)、当業者が容易に設計することができる。

【0019】

このPCRアッセイでの使用に好適なプライマーセットの非限定例を以下に示す：

- 以下の配列：

GCAGRCATCAAAAGCGAAATCACACC(配列番号42)

TCGTTTGGTAACTGTGGCAGATACTC(配列番号43)

で規定される、espKを標的するプライマーセット

- 以下の配列：

TCAGGTTCTCTCGTCTGATGCCGC(配列番号44)

CTGGTTCAGGCCTGGAGCAGTCC(配列番号45)

で規定される、espVを標的するプライマーセット

- 以下の配列：

GCAATAATTGACTCTGATTGCC(配列番号46)

GCTGCTGCGGTAAATTTACT(配列番号47)

で規定される、ureDを標的するプライマーセット

- 以下の配列：

CTGAAAAGAGCCAGAACGTGC(配列番号48)

TGCCTAAGATCATTACCCGGAC(配列番号49)

で規定される、Z2098を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

CGATCATTGTGGGCATGTTATGCC(配列番号50)

CCTGAATTCACACGGTGATGCG(配列番号51)

で規定される、Z1153を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

GCCTTTTATGTTTATTATTGCGGTTG(配列番号52)

GTATAGTTTTAGCAATACCTTCCTGC(配列番号53)

で規定される、Z1154を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

GATTGTGGCGATTAATGGGGG(配列番号54)

ACACCGATCTGGTCATTGGCG(配列番号55)

で規定される、Z1155を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

AAACGCCTTTAAATCTGCGTCT(配列番号56)

TGCCGTGCGCACAGTCATAAG(配列番号57)

で規定される、Z1156を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

GCCCATGGCTCCACATCCTG(配列番号58)

CCAAAAAAGTTATGATGATTGCACTG(配列番号59)

で規定される、Z1151を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

GCACTGGCCCTTGTGCTCAGGC(配列番号60)

GCTCTCCAGTGAGAATGTCTTTCCGG(配列番号61)

で規定される、Z6065を標的するプライマーセット

- 以下の配列：

TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG(配列番号62)

CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC(配列番号63)

で規定される、stx1及びstx2を標的するプライマーセット。

【 0 0 2 0 】

増幅産物の検出用プローブの非限定例を以下に示す：

- 以下の配列：

ATTGAGATAGAAGAAGCGCGGGCCAG(配列番号64)；

で規定される、espKに由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ

- 以下の配列：

CTTGCAACACGTTACGCTGCCGAGTATT(配列番号65)；

で規定される、espVに由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ

- 以下の配列：

TACGCTGATCACCATGCCTGGTGC(配列番号66)；

で規定される、UreDに由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ

- 以下の配列：

TAAGTCTATACCTCCGCGCCG(配列番号67)；

で規定される、Z2098に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ

- 以下の配列：

TGTAACACCCAGACGGTCAGCAACATG(配列番号68)；

で規定される、Z1153に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ

- 以下の配列：

TCACTTCCAGTTTCTGGTGATGTTTTGAT(配列番号69)

で規定される、Z1154に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

TGGGTGAGGTTAAATATAAAGAACGATTGC(配列番号70)

で規定される、Z1155に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

TAAGATATTTTCTGACTTTCCGCATGCGCTT(配列番号71)

で規定される、Z1156に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

AAAGAGCCAGCGCAGAGCTGACCAG(配列番号72)

で規定される、Z1151に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

TTCGCTGGAAGCAGAGCCCGTGC(配列番号73)

で規定される、Z6065に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA(配列番号74)

10

20

30

40

50

で規定される、stx1に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 以下の配列：

TCGTCAGGCACTGTCTGAACTGCTCC(配列番号75)

で規定される、stx2に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ。

【0021】

有利には、本発明は、サンプルがEHEC 0157:[H7]、0145:[H28]、0103:[H2]、0111:[H8]、0121:[H19]、026:[H11]及び045:[H2]の少なくとも1つの血清型の定型腸出血性大腸菌(EHEC)を含有するかどうかを予測し、更に該EHECの血清型を同定する方法であって、以下

- 前記サンプルが0157:[H7]、0145:[H28]、0103:[H2]、0111:[H8]、0121:[H19]、026:[H11]、045:[H2]及び0104:H4の少なくとも1つの血清型のEHECを含むか否かを評価するためにPCRアッセイを上記のとおり行い、該PCRアッセイの結果が陽性であれば、

- 前記EHECの血清型を同定するためにPCRアッセイを上記のとおり行うことを含んでなる方法を提供する。

【0022】

本発明のPCRアッセイは、EHECを含有する可能性がある物質の任意のサンプル、例えば食物サンプル、水サンプル、土壌サンプルなどを検査するために使用することができる。

本発明のPCRアッセイは、この目的に利用可能な種々の天然の又は遺伝子操作した酵素の任意のものをを用い、標的配列のPCR増幅に適切な任意の方法で行うことができる。核酸配列ベース増幅(NASBA)、分岐DNA、鎖置換増幅又はループ媒介等温増幅(LAMP)法(Compton 1991, Chang 1991, Walkerら 1992, Notomiら 2000)のような代替法も使用可能である。

【0023】

特に好適な方法は、「Real-time PCR in Microbiology: from diagnosis to characterization」(2007) Caister Academic Press, Norfolk, UKにIan M. Mackayが記載したような、リアルタイムPCR増幅を含むものである。

リアルタイムPCR(定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)又は動力学的ポリメラーゼ連鎖反応とも呼ばれる)は、標的のDNA分子を増幅し、同時に定量するために使用される。これは、DNAサンプル中の特定配列の検出及び定量(絶対コピー数、又はDNA投入量若しくは追加の規格化用遺伝子に対して規格化したときの相対量として)を両方とも可能にする。この手順は、ポリメラーゼ連鎖反応の一般原理に従う；その鍵となる特徴は、増幅DNAが反応中に蓄積するにつれ各増幅サイクル後にリアルタイムで定量されることである(Mackay 2007)。2つの一般的な定量法は、二本鎖DNAとインターカレートする蛍光色素の使用、及び相補DNAとハイブリダイズしたときに蛍光発光する修飾DNAオリゴヌクレオチドプローブの使用である(Mackay 2007)。本発明では、発明者らは、これら2つの方法のうち第2の方法(蛍光色素のインターカレーションに基づいてPCR産物を定量する他方の方法ではなく)が本発明の範囲内であることを示した。

【0024】

適切な蛍光標識の非限定例としては、6カルボキシル-フルオレセイン(FAM)、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(TET)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)が挙げられる。二重標識プローブの標識に適切なクエンチャーの非限定例としては、6カルボキシ-テトラメチル-ローダミン(TAMRA)、DABCYL、ブラックホールクエンチャーファミリー(BHQ)のクエンチャーのような非蛍光クエンチャーが挙げられ、マイナーグループ結合基(minor groove binder group; MGB)も挙げられる。

本発明のPCRアッセイの各々は、検出すべき各標的配列について別々のPCR反応(単式PCR)を行うことで実行することができる。しかし、多くの場合で、単一反応で幾つかの標的配列の増幅が可能であるマルチプレックスPCRを行うことが好適である。有利には、マクロアレイ(すなわち、所望のDNAプライマーがスポット状に堆積されている基体のような予め形成された構造体)を使用することができる。このようなマクロアレイは、本明細書に記載のマルチプレックスPCRアッセイのルーチン的な実行を可能にする。例として、求める標的を検出・定量するに必要な反応試薬を予め搭載した反応マイクロチャンバにおいて

複数標的の同時検出を可能にする、例えばBeutinら(Beutinら, 2009)が記載したGeneDisc(登録商標)マクロアレイ(Pall-GeneDisc Technology, Bruz, France)を使用することができる。

【0025】

アッセイの結果がサンプルの真の含有物を確実に代表するように、いずれの検出産物も真の陽性結果であることを確実にする陰性増幅コントロールを含んでいてもよく、またサンプルのDNAを増幅することができ、よって偽陰性が生じていないことを確実にする阻害コントロールを含んでいてもよい。

本発明はまた、本発明のPCRアッセイの実施を可能にする上記のプライマーセット及びプローブ並びにこれらプライマーセット及びこれらプローブを組み合わせた(更にはPCR反応を行うための試薬を組み合わせてもよい)キットを包含する。これらキットは、増幅反応を行うための指示書を含んでいてもよい。本発明のプライマーを用いる増幅産物も本発明の一部である。

【0026】

第1の実施形態によれば、本発明のキットは、以下：

- 配列番号11及び配列番号12の配列で規定されるプライマーセット、及び配列番号13及び配列番号14の配列で規定されるプライマーセット、及び/又は配列番号15及び配列番号16の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号17及び配列番号18の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号19、配列番号20及び配列番号21の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号22及び配列番号23の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号24及び配列番号25の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号26及び配列番号27の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号28及び配列番号29の配列で規定されるプライマーセット；

- 配列番号30及び配列番号31の配列で規定されるプライマーセット

を含むプライマーの組合せを含んでなる。

【0027】

好ましくは、前記キットはまた、

- 上記のような配列番号1及び配列番号2に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、及び上記のような配列番号3に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、及び/又は上記のような配列番号4に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号5に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号6に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号7に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号8に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号9に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ；

- 上記のような配列番号10に由来する増幅産物の検出を可能にする2つのプローブ

を含んでなる。

【0028】

第2の実施形態によれば、本発明のキットは、

- espKに由来するプライマーセット、及び

- espVに由来するプライマーセット、ureDに由来するプライマーセット、Z2098に由来するプライマーセット、Z1151に由来するプライマーセット、Z1153に由来するプライマーセット、Z1154に由来するプライマーセット、Z1155に由来するプライマーセット、Z1156に由来するプライマーセット、Z6065に由来するプライマーセットから選択される1以上のプライマーセット

を含んでなる。

【0029】

好ましくは、前記キットはまた、espKに由来する増幅産物の検出を可能にするプローブと、以下：espVに由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、ureDに由来する増幅産

物の検出を可能にするプローブ、又はZ2098に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z1151に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z1153に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z1154に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z1155に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z1156に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ、Z6065に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブから選択される1以上のプローブとを含んでなる。

【0030】

上記の第2の実施形態に従うキットは、stx1を標的するプライマーセット及びstx2を標的するプライマーセットを更に含んでもよく、好ましくはstx1に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブ及びstx2に由来する増幅産物の検出を可能にするプローブも含んでもよい。

10

本発明のより良好な理解のため、及び本発明が如何に実施され得るかを示すために、ここで、例示の目的のみで、本発明に従う具体的な実施形態、方法及び過程を示す。

【実施例】

【0031】

実施例1：腸管出血性大腸菌(EHEC)の特異的同定のための大腸菌CRISPR遺伝子座に由来するDNA配列の同定

材料及び方法

細菌株

CRISPR遺伝子座について高スループットリアルタイムPCRで調べた大腸菌株(n = 955)を下記の表Iに示す。

20

【0032】

【表 1】

表 I : 大腸菌株

EHEC* (n = 331)	
O103:[H25] (n=6), O103:H2 (n=38), O111:H8 (n=49), O118:[H16] (n=3), O119:[H25] (n=4), O121:H19 (n=12), O123:H11, O127:H8s, O145, O145:[H28] (n=29), O156:H21, O156:H25 (n=10), O157:[H7] (n=75), O165:H25, O172:[H25], O172:H25, O172:NM, O177 (n=2), O177:[H25], O182:[H25], O26:[H11] (n=76), O3, O45:H2, O49:H16, O5 (n=8), O55, O76:H51, O84:H2, Ont:[H2], Or:H16, OX186:[H2]	
EPEC (n = 344)	
O100:[H25] (n=2), O102:H19, O103:H21, O103:H8, O108:H9 (n=6), O109:H25, O111, O111:B4, O111:H11, O111:H19 (n=3), O111:H2 (n=13), O111:H25 (n=2), O111:H47, O111:H9 (n=3), O113:H6 (n=2), O114:H2 (n=6), O114:H49 (n=5), O115:H38 (n=3), O117:H25, O117:H40b (n=3), O118:H5, O118:H8a (n=3), O119:[H25], O119:H2 (n=3), O119:H6 (n=4), O119:H8 (n=2), O119:H9, O119s:H2, O123/O4:H45 (n=2), O123:H25, O125:H6, O125ac:H6 (n=3), O126:H27, O126:H6, O127, O127:H19, O127:H40 (n=4), O127:H40b (n=2), O127:H6 (n=2), O128:[H2] (n=12), O128:H8, O128ac:H2, O142:H34, O142:H6 (n=3), O145:H34 (n=5), O15:H11, O15:H2 (n=3), O153:H14, O156, O156:[H8] (n=7), O156:H1 (n=2), O156:H25 (n=3), O157, O157:[H45] (n=2), O157:H16 (n=5), O157:H2, O157:H26 (n=2), O157:H39, O157:H45 (n=3), O177:H26, O186:[H45], O2:[H40] (n=2), O2:H40b, O2:H8, O21:H25, O22:H7, O26:[H11] (n=38), O26:H31, O26:H34, O28:H28 (n=4), O3:H40b, O3:H5, O3:H8a (n=3), O37:H10, O4:H16, O45, O45:H7, O45:H9, O49:[H10] (n=2), O49:H-, O5:H11, O51:H49 (n=3), O55:[H51], O55:[H7] (n=26), O55:H6 (n=5), O62:H9, O63:H6 (n=2), O66:H8/8a, O69:[H2], O69:H16 (n=2), O70/O86:H2, O70:H11 (n=5), O71:H40b, O76:H41, O76:H7 (n=5), O80:[H2] (n=3), O84:[H2], O86:[H34] (n=4), O86:H11 (n=2), O86:H40, O86:H8 (n=4), O86:H8a, O88:H8a, O89:[H2], O9:H10, OX8:H10, Ont:[H10], Ont:[H6], Ont:H11, Ont:H14, Ont:H2 (n=2), Ont:H21, Or:H40b, Or:H8a, Or:H9, OX177:H11 (n=2), OX177:H6	
STEC** (n = 160)	
O100:NM (n=2), O101:H- (n=3), O104:H7, O105:H18, O109:H-, O110:H28, O111, O111:H10, O113:H4, O115:H18 (n=2), O116:H28, O117 (n=2), O117:H7 (n=2), O118:H12 (n=3), O125, O126, O126:H8, O128ab:H2, O130:H11, O136 (n=2), O138, O139, O139:H1, O141:[H4], O141ac, O146:H21, O146:H28 (n=2), O146:H8, O147, O149:H19, O15:H16, O153:H25 (n=3), O165:H11, O168:H8, O1777:H41, O171:H-, O171:H2, O172:H21, O174:[H21] (n=11), O174:H2, O174:H8 (n=4), O176:H-, O178:H19, O179:H8, O181:H49, O2:H25, O2:H27, O21:H21 (n=3), O22/O83, O22:H16 (n=2), O22:H8 (n=3), O23:H15, O3, O39:H48, O40:21, O40:H8, O46:H38 (n=2), O48:H21, O5, O5:[H19], O53, O6 (n=7), O6:H10 (n=2), O6:H34 (n=2), O68:H12, O73:H18, O74:H42, O75:H8, O76, O76:H19 (n=3), O77 (n=2), O79, O79:H48, O8:H10, O8:H19 (n=6), O8:H8, O85:H11, O86, O88:H25, O91 (n=6), O91:[H21] (n=5), O91:H10 (n=3), O91:H14 (n=2), O92, O107:H-, O92, O107:H48, O96:H19, Ont:H-, Ont:H7, Or:[H16], Or:H12, Or:H29, Or:H33, Or:H4, Or:H48, OX178:H19, OX185:H28, OX187:Hbev, OX3:H-, OX3:H2, OX3:H21, OX7:H16	
無病原性大腸菌 (n = 120)	
O103 (n=2), O103:H8, O104:H7, O110, O111:H12, O111:H21, O121:[H45], O126 (n=33), O126:H11, O126:H27 (n=3), O127 (n=8), O127:H10, O127:H21, O142 (n=8), O145:H2 (n=2), O150:H8, O153:H12, O156:H33, O156:H47, O156:H56, O157 (n=5), O157:H27, O180:H-, O26:H? (n=4), O26:H21/32, O26:H32 (n=6), O26:NM, O4:H5, O41:H7, O45:H7, O55 (n=8), O55:H19, O55:H21, O6:H4, O62:H30 (n=2), O8/O104:H10, O8/O104:H45, O86 (n=6), O86/O125ac, O86:H2, O86:H27, O88, O9:K9:H12, OX183:H18	

特段の記載がない場合、各血清型につき、n = 1

* Bugarelら 2010Iに記載されるEHEC派生株を含む ** 非定型EHECを含む

【 0 0 3 3 】

大腸菌株を、シガトキシン産生大腸菌又はSTEC (n = 160)、腸病原性大腸菌又はEPEC (n = 344)、腸管出血性大腸菌又はEHEC (n = 331)及び非病原性大腸菌 (n = 120)に分けた。STEC/EHECタイプは、stx遺伝子及びeae遺伝子の存在に基づいて定義した。EHEC株は、stx遺伝子(stx1及び/又はstx2)及びeae遺伝子を両方とも有するものと定義した。一方、STEC株はstx遺伝子のみを有するものと定義した。STECは、血清型O91:[H21]、O113:[H21]、O104:[H21]のstx陽性、eae陰性大腸菌株(非定型EHECとも呼ばれ、これらは、出血性疾患に關与する頻度が他のEHECより低い、下痢を頻繁に引き起こす)を含んでいた。EHEC株のStx陰性派生株はEHEC様と名付け、遺伝子espKの存在及びarcA遺伝子の対立遺伝子型2に基づいて同定した血清型O26:H11のEHEC様株(Bugarelら, 2011)を除き、Bugarelら(2010; 2011)が記載したように、nle遺伝子プロフィール、eaeサブタイプ及び血清型に基づいて定義した。EPEC株は、Bugarelら(2011)により記載されたとおりに定義した。非病原性大腸菌はstx及びeae陰性株と定義した。

【 0 0 3 4 】

本研究で調べた全ての株は、大腸菌のO (LPS)及びH (鞭毛)抗原について特定し、以前(Bugarelら, 2010)に報告されたようにstx遺伝子及びeae遺伝子について特徴付けた。検査のため、細菌をLuria-ブロスプレート上で培養して単一コロニーとし、37 にて一晚増殖させた。1つのコロニーを採取し、InstaGeneマトリクス(Bio-Rad Laboratories, Marnes

10

20

30

40

50

La Coquette , France)を用いてDNAを抽出した後、高スループットリアルタイムPCR検査を行った。

【 0 0 3 5 】

DNA配列決定

大腸菌株のCRISPR遺伝子座を、表IIに列挙したプライマーを用いてPCR増幅した。CRISPRアンプリコンの二本鎖DNA配列決定を、表IIに列挙した配列決定プライマーを用いるEurofins MWG Operon(Courtaboeuf , France)で行った。

【 0 0 3 6 】

【表 2】

表 II

プライマー名	フォワードプライマー及びリバースプライマー配列 (5' - 3')	配列番号	アクセッション番号	配列内での位置
CRISPR-I-F	GGTGAAGGAGYTGGCGAAGGCGTC	76	AE005174	3665412-3665435
CRISPR-I-R	CCGGTGGATTGGATGGGTTACG	77	AE005174	3665885-3665863
CRISPR-II-F	TGTGAACCTCTCTGGCATGGAG	78	AP010953	3786919-3786940
CRISPR-II-R	TAAAGTTGGTAGATTGTGACTGGC	79	AP010953	3787672-3787649

【 0 0 3 7 】

高スループットリアルタイムPCR

LightCycler(登録商標) 1536(Roche , Meylan , France)を使用して高スループットリアルタイムPCR増幅を行った。LightCycler(登録商標) 1536マルチウェルプレートのPCRセットアップに、冷却装置及びPlateLoc熱マイクロプレートシーラー(Agilent Technologies)を備えたBravo液体ディスペンサー自動装置(Agilent Technologies , Massy , France)を使用した。PCR反応には、0.5 μ lのサンプルと1 \times RealTime ready DNA Probesマスター(Roche)(最終0.7 \times に相当)、300nMの各プライマー及び300nMの各プローブ(各々最終200nMに相当)を含む1 μ lのマスターミックスとを含ませた。増幅は、FAM-又はHEX-標識TaqMan(登録商標)プローブを用いて行った。PCR増幅に使用したプライマー及びプローブを表IIIに列挙する。LightCycler(登録商標) 1536リアルタイムPCRシステムを以下の熱プロファイルで使用した：95 で1分間、続いて95 で0秒間(ランプ：4.8 /s)及び60 で30秒間(ランプ：2.5 /s)の35サイクル、及び40 で30秒間の最終冷却工程。ソフトウェアセッティングは、Dual color hydrolysis probes/UPL probes及びMaster Controlであった。

【 0 0 3 8 】

10

20

30

【表 3】

表Ⅲ			
	フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブ配列 (5' - 3')	配列番号	標的配列
SP_O157_A	GAACACAAACCGAAACACACG	15	(配列番号4)
	ATAAACCGTCACCAAAACAGTG	16	
	[FAM]-ACAAAACTGTCACCAAAGTGTC-[BHQ1]	34	
SP_O157_B	GGGAACACAAACCGAAACACA	11	(配列番号1及び2)
	CTTAGTGTGTTCCCCGCGC	12	
	[HEX]-CGATCAATCCGAATATGAGCGGT-[BHQ1]	32	
SP_O157_C	GAACACTTTGGTGACAGTTTTTGT	13	(配列番号3)
	CTTAGTGTGTTCCCCGCGC	14	
	[HEX]-CACTGTTTTGGTGACGGTTTATCC-[BHQ1]	33	
SP_O121	CGGGGAACACTACAGGAAAGAA	22	(配列番号7)
	GGCGGAATACAGGACGGGTGG	23	
	[HEX]-TCCGCCAACGGCGACAGGGG-[BHQ1]	37	
SP_O45	GAGTCTATCAGCGACACTACC	24	(配列番号8)
	AACCGCAGCTCGCAGCGC	25	
	[HEX]-TCGGAACGTGGCGCTATAGGTG-[BHQ1]	38	
SP_O145	GAACCTGAGCCCTGCCAGAA	17	(配列番号5)
	ACCGCGATCTTTTCTACCTG	18	
	[HEX]-TGGGGCCTCTTTTGTACCCGG-[BHQ1]	35	
SP_O104	GGAACCTACCGAGCGCCG	26	(配列番号9)
	GCCTTTGCAGCGTCTTTCCGATC	27	
	[HEX]-CTGGGAGGCGTATCTCAGTTCGGT-[BHQ1]	39	
SP_O26_C	ACAATCGTGTGTAATTTCGCGG	28	(配列番号10)
	GATAAACCGTGGTACGGAACA	29	
	[HEX]-TGCTGTCTATATTCGACCAAGTTCC-[BHQ1]	40	
SP_O26_D	TGAAACCACTCGCGGCAGAT	30	(配列番号10)
	ATAAACCGATCTCCTCATCCTC	31	
	[HEX]-CCAGCTACCGACAGTAGTGTGTTCC-[BHQ1]	41	
SP_O111	GTGACCGCCTGTACACGC	19	(配列番号6)
	CGGATATTTGGGCGTAATACC	20	
	CTGCCGCGAGTGGTTTCAC	21	
	[HEX]-TGTAATGGCTCACCGGTTTATCCCC-[BHQ1]	36	

【 0 0 3 9 】

結果

EHEC 0157:H7のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

種々のEHEC 0157:[H7]株のCRISPR遺伝子座の配列決定により、この血清型についてのこの遺伝子座の多形性が示された。EHEC 0157:[H7]株のCRISPR遺伝子座に特徴的な配列を、配列番号1、2、3及び4に示す。これら配列及びEDL933株のCRISPR遺伝子座(アクセッション番号AE005174)に基づいて、種々のリアルタイムPCRアッセイをEHEC 0157:[H7]の検出について設計した(SP_O157_A、SP_O157_B及びSP_O157_C)。アッセイの特異性及び感度を、955株の大腸菌(75株のEHEC 0157:[H7]を含む)からなるパネルに対して試験した(表Ⅰ)。このPCR検査は、EHEC 0157:[H7]について、高感度で高度に特異的であることが証明された。アッセイの感度は92.0%~97.3%の範囲であり、数株の0157:[H7]が各アッセイで検出できないに過ぎなかった。PCR検査の特異性は高く、99.6~100%の範囲であった。PCRアッセイSP_O157_Bは、血清群055の極僅かな株としか交差反応しない独特な検査であった。PCRアッセイSP_O157_B及びSP_O157_Cを組み合わせることで、75株のEHEC 0157:[H7]の全てが正確に検出され(感度100%)、3株の血清群055の単離株のみが交差反応した(特異性99.6%)。

【 0 0 4 0 】

EHEC 0145:H28のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

EHEC 0145:[H28]のCRISPR遺伝子座を、大腸菌で同定された2つのCRISPR遺伝子座の一方を配列決定して特徴付けた(配列番号5)。このCRISPR配列から、EHEC 0145:[H28]を標的するPCRアッセイ(SP_O145)を設計した。このPCR検査で調べた955株の大腸菌のうち29株のEHEC 0145:[H28]及び4株のEPEC 028:H28のみが陽性結果を示した。PCRアッセイSP_O145の感度及び特異性は、それぞれ100%及び99.5%であった。

EHEC 0111:H8のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

EHEC 0111:H8のCRISPR遺伝子座の配列(配列番号6)に基づいて、EHEC 0111:[H8]を検出するリアルタイムPCRアッセイを設計した(SP_0111)。PCRアッセイSP_0111で980株の大腸菌を調べた結果、試験した49株の0111:[H8]のうち47株が陽性を示した。1株の血清型045:H7のEPECのみが陽性結果を示した。このPCRアッセイの感度及び特異性は高く、それぞれ95.9%及び99.9%であった。

【0041】

EHEC 0121:H19のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

本研究ではEHEC 0121:[H19]のCRISPR遺伝子座を配列決定した(配列番号7)。この配列から、EHEC 0121:[H19]を標的するPCRアッセイ(SP_0121)を設計した。PCRアッセイSP_0121で試験した955株の大腸菌のうち、僅か1株の0104:H7及び12株のEHEC 0121:[H19]が陽性であり、このPCR検査は高感度で(100%)、高度に特異的である(99.9%)ことが示された。

10

EHEC 0103:H2及び045:H2のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

EHEC 045:[H2]のCRISPR遺伝子座の配列(配列番号8)及び株12009について公表されているEHEC 0103:H2のCRISPR遺伝子座の配列(アクセッション番号AP010958)に基づいて、PCRアッセイ(SP_045)を設計した。このPCRアッセイは、本研究で調べた1株のEHEC 045:H2及び38株全てのEHEC 0103:H2について陽性結果を示した。よって、PCRアッセイSP_045は、EHEC 0103:[H2]及び045:[H2]について高感度(100%)を示した。この検査は、大腸菌の大きなパネルについて試験したとき、98.6%の特異性を有し、数株の以下の血清型:0118:H8、0128:[H2]、0128:H8、0128:H2、089:[H2]、046:H38、08:H8、0142、0145:H2のもの及び(鞭毛H2について陰性結果を示した)1つの0103株と僅かな交差反応を示したに過ぎない。

20

【0042】

EHEC 0104:H4のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

本研究ではEHEC 0104:[H4]のCRISPR遺伝子座を配列決定した(配列番号9)。この配列から、EHEC 0104:[H4]を標的するPCRアッセイ(SP_0104)を設計した。大腸菌0104:H4のCRISPR遺伝子座を標的するPCRアッセイを、(既知のO-血清群の186株及びH型の56株を含む)1303株の大腸菌からなるパネルで評価した。このPCRアッセイは、2011年5月に起きた大発生に関連付けられた48株の0104:H4単離株(1株のOr:H4単離株を含む)及び2001年に報告された1株の0104:H4臨床単離株について陽性結果を示した。H4以外のH型を有する大腸菌0104の39株は陰性結果を示した。抗0104血清と凝集で交差反応するK9莢膜抗原を有する大腸菌株(08:K9:H10、08:K9:H45、09:K9:H1、09:K9:H12及び09:K9:H51)は、全て陰性結果を示した。最終的に、既知のO血清群の186株及びH型の56株を含む他の大腸菌株のうち、血清型Ont:H2、043:H2、0141:H2及び0174:H2に属する僅か5つの単離株のみが、EHEC 0104:H4のCRISPR遺伝子座用に設計したプライマー及びプローブと交差反応したに過ぎない。よって、更に、0174:H2、0141:H2及び043:H2株をCRISPR-0104について検査した。3/12の0174:H2、3/4の043:H2及び1/8の0141:H2が陽性結果を示した。まとめると、これらデータは、このPCR検査が高感度であり(100%)、高度に特異的である(99.6%)ことを示した。

30

【0043】

EHEC 026:H11のCRISPR遺伝子座を標的する特異DNA配列の同定

種々のEHEC 026:[H11]株のCRISPR遺伝子座の配列決定により、この血清型についてのこの遺伝子座の多形性が示された。EHEC 026:[H11]のCRISPR遺伝子座に特徴的な配列を、配列番号10に示す。これら配列及びEHEC 026:H11株11368のCRISPR遺伝子座(アクセッション番号AP010953, NC_013361)に基づいて、2つのリアルタイムPCRアッセイをEHEC 026:[H11]の検出について設計した(SP_026_C及びSP_026_D)。アッセイの特異性及び感度を、980株の大腸菌(77株のEHEC 026:[H11]及びEHEC様026:[H11]を含む)からなるパネルに対して試験した。この2つのPCR検査は、EHEC 026:[H11]について、高感度で特異的であることが証明された。PCRアッセイSP_026_Cの感度は87.0%であった一方、PCRアッセイSP_026_Dの感度は90.9%であった。数株の026:[H11]株のみが各アッセイで検出できなかったに過ぎ

40

50

ない。PCR検査SP_026_Cの特異性は98.7% (12株が交差反応)であった一方、PCR検査SP_026_Dの特異性は98.1% (17株が交差反応)であった。PCRアッセイSP_026_C及びSP_026_Dを組み合わせることで、77株のEHEC様及びEHEC 026:[H11]株のうち僅か4株のEHEC様026:H11株が検出できなかったに過ぎず(94.8%感度)、僅かに26株の大腸菌が交差反応したに過ぎなかった(97.1%特異性)。

【0044】

結論：

本研究の結果を下記の表IVにまとめる。

【表4】

表IV：感度及び特異性

血清型	番号	PCR	感度	特異性	交差反応
O157:[H7] ^a	75	SP_O157_A	92.0%	100%	-
		SP_O157_B	97.3%	99.6%	O55:[H7] ^a , O55:[H7] (n=2) ^b
		SP_O157_C	94.7%	100%	-
		SP_O157_B+C	100%	99.6%	O55:[H7] ^a , O55:[H7] (n=2) ^b
O103:H2 ^a , O45:H2 ^a	38 1	SP_O45	100%	98.6%	O118:H8a (n=3) ^b , O128:[H2] ^b , O128:H8 ^b , O128ac:H2 ^b , O89:[H2] ^b , O46:H38 ^c , O8:H8 ^c , O103 ^d , O142 ^d , O145:H2 ^d
O111:H8 ^a	49	SP_O111	95.9%	99.9%	O45:H7 (n=1) ^b
O121:H19 ^a	12	SP_O121	100%	99.9%	O104:H7 ^d
O145:[H28] ^a	29	SP_O145	100%	99.5%	O28:H28 (n=4) ^b
O104:[H4] ^a	49	SP_O104	100%	99.6%	Ont :H2, O43:H2 (n=4), O141:H2 (n=2), and O174:H2 (n=4)
O26:[H11] ^a	77	SP_O26_C	87%	98.7%	O111:H11 ^b , O111:H47 ^b , O118:H16 (n=2) ^a , O118:H8a (n=3) ^b , O128:H8 ^b , O26:H11 ^b , O118:H2 ^a , O103:H11 ^a , O111 ^b
		SP_O26_D	90.9%	98.1%	O118:H16 (n=3) ^a , O123:H11 ^a , O26:H11 (n=9) ^b , O118:H2 (n=2) ^a , O86:H11 (n=2) ^b , O103:H11 ^a
		SP_O26_C+D	94.8%	97.1%	O111:H11 ^b , O111:H47 ^b , O118:H16 (n=4) ^a , O118:H8a (n=3) ^b , O123:H11 ^a , O128:H8 ^b , O26:H11 (n=10) ^b , O86:H11 (n=2) ^b , O118:H2 (n=2) ^a , O103:H11 ^a , O111 ^b

特段の言及がなければ、各血清型について、n=1

^{a)} EHEC及びEHEC様; ^{b)} EPEC; ^{c)} STEC及び非定型EHEC; ^{d)} 非病原性大腸菌

【0045】

種々のEHEC株のCRISPR遺伝子座の配列決定により、世界的に最も頻繁な臨床例と関係付けられるEHECのCRISPR配列の遺伝的多様性が示された。CRISPR遺伝子座の短いパンドローム反復配列間に位置するスペーサー配列の分析により、高感度及び高特異性でEHEC株を検出する有用な遺伝子マーカーの同定が可能となった。高スループットリアルタイムPCRアプローチに基づいて、EHEC、EPEC、STEC及び非病原性大腸菌を含む大腸菌株の非常に大きなパネルをCRISPR遺伝子座含有について調べた。最終的に、EHEC O145:H28 (n = 29)、O103:H2 (n = 38)、O121:H19 (n = 12)、O104:H4 (n = 49)及びO45:H2 (n = 1)は、これらEHEC血清型に由来する種々のCRISPR配列を標的する各PCRアッセイを用いて、100%の感度で検出された。EHEC O157:[H7] (n = 75)は、EHEC O157 CRISPR遺伝子座の異なる2つの配列を標的するPCRアッセイSP_O157_B及びSP_O157_Cを組み合わせたとき、100%の感度で検出された。EHEC O111:[H8] (n = 49)は95.9%感度で検出された(47/49のO111:[H8]が検出され、僅かに2株が検出されなかったに過ぎない)。O26 CRISPR遺伝子座の異なる2つの配列を標的するPCRアッセイSP_O26_C及びSP_O26_Dを組み合わせたとき、EHEC O26:[H11] (n =

77)は94.8%の感度で検出された(73/77のO26:[H11]が検出された；検出されなかった僅か4株はEHEC様O26:H11株であった)。

世界的に最も頻繁な臨床例と関係付けられるEHECのCRISPR遺伝子座を標的する、本研究で開発したPCRアッセイもまた、高度に特異的であった。これらアッセイは、大腸菌株の非常に大きなパネルで検査したとき、97.1%～100%の特異性を有した。極僅かが交差反応したに過ぎなかった(表IV)。

【0046】

実施例2：ヒトに対する高毒性と関係付けられるシガトキシン産生大腸菌(STEC)を同定する遺伝子マーカーの特定

非LEEコード化タイプIIIエフェクター(Tobeら, 2006; Creuzburgら, 2011)及び付着因子(Spearsら, 2006; Cergole-Novellaら, 2007)の拡大レパートリーは、STEC毒性決定基の最も可能性のある供給源である。しかし、分子リスク評価アプローチを良好に支持する遺伝子標的は、依然として未確定である。食物中のEHECのモニタリングには、特に、EHEC株をEPEC株と明確に弁別できる遺伝子マーカーの選択が必要である。

このような因子を特定しようと、本発明者らは、ヒトの健康にとって重大なリスクとなるSTEC株を重篤な疾患や流行性疾患とは無関係なEPEC株及びSTEC株と弁別する候補因子としての、ゲノムO-アイランドOI-43、OI-44、OI-50、OI-57及びOI-71に由来する或る種のnle遺伝子の適合性を調べた。リアルタイムPCR増幅に使用した大腸菌遺伝子標的を下記の表Vに示す。

【0047】

【表5】

表V		
遺伝子(染色体遺伝子の場合ORF名) ^a	コードされるタンパク質又はファミリーエフェクター	遺伝子サポート(可動性因子) ^a
<i>ureD</i> (Z1142, Z1581)	ウレアーゼ関連タンパク質 <i>UreD</i>	OI-43及びOI-48
Z1151	仮想タンパク質	OI-43
Z1153	仮想タンパク質	OI-43
Z1154	コリシン免疫タンパク質	OI-43
Z1155	推定膜タンパク質	OI-43
Z1156	仮想タンパク質	OI-43
<i>espV</i> (Z1387)	<i>AvrA</i> ファミリーエフェクター	OI-44
<i>espK</i> (Z1829)	ロイシンリッチ反復	OI-50
Z2098	仮想タンパク質	OI-57
Z6065	仮想タンパク質	OI-71

a) ORF及び可動性因子の命名法は、大腸菌O157:H7 EDL933の配列 (GenBank AE005174)を参照

【0048】

1) 遺伝子マーカー-*espK*、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065

OI-43(Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156)、OI-50(*espK*)及びOI-71(Z6065)に由来する遺伝子マーカーの分布を種々の大腸菌病原群の間で調べ、ヒトに対して高毒性を有するSTECとの関係を評価した。

材料及び方法

本研究で調べた1252株の大腸菌を、*stx*遺伝子及び*eae*遺伝子の存在に基づいて、腸管出血性大腸菌又はEHEC (n = 466)、腸病原性大腸菌又はEPEC (n = 468)、シガトキシン産生大腸菌又はSTEC (n = 179)及び非病原性大腸菌 (n = 139)に分けた。STEC株は*stx*のみを有した。EPEC株は*eae*のみを有した。非病原性大腸菌 (n = 139)は*stx*及び*eae*陰性株と定義した。

高スループットリアルタイムPCR検査を、上記の実施例1に記載したように行った。

遺伝子マーカー-*espK*、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065のPCR増幅に使用したプライマー及びプローブを表VIに列挙する。*stx1*、*stx2*及び*eae*検出用プライマー及

びプローブは以前(Bugarelら, 2010)に記載されたものであった。遺伝子stx1、stx2及びeaeの増幅を内部コントロールとして及び群割当目的に使用した。

【 0 0 4 9 】

【表 6】

表Ⅵ		
フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブ配列 (5' - 3')		配列番号
espK (1829)	GCAGRCATCAAAAGCGAAATCACACC	42
	TCGTTTGGTAACTGTGGCAGATACTC	43
	[6FAM]-ATTGAGATAGAAGAAGCGCGGGCCAG-[BHQ1]	64
Z1153	CGATCATTGTGGGCATGTTATGCC	50
	CCTGAATTCACACGGTGATGCG	51
	[6FAM]-TGTAACACCCAGACGGTCAGCAACATG-[BHQ1]	68
Z1154	GCCTTTTTATGTTTATTGCGGTTG	52
	GTATAGTTTTAGCAATACCTTCCTGC	53
	[6FAM]-TCACTTCCAGTTTCTGGTGATGTTTTGAT-[BHQ1]	69
Z1155	GATTGTGGCGATTAATGGGGG	54
	ACACCGATCTGGTCATTGGCG	55
	[6FAM]-TGGGTGAGGTTAAATATAAAGAACGATTGC-[BHQ1]	70
Z1156	AAACGCCTTTAAATCTGCGTCT	56
	TGCCGTGCGCACAGTCATAAG	57
	[6FAM]-TAAGATATTTTCTGACTTCCGCATGCGCTT-[BHQ1]	71
Z1151	GCCCATGGCTCCACATCCTG	58
	CCAAAAAGTTATGATGATTGCACTG	59
	[6FAM]- AAAGAGCCAGCGCAGAGCTGACCAG-[BHQ1]	72
Z6065	GCACTGGCCCTTGTTGCTCAGGC	60
	GCTCTTCCAGTGAGAATGTCTTCCGG	61
	[6FAM]-TTCGCTGGAAGCAGAGCCCGTGC-[BHQ1]	73

【 0 0 5 0 】

結果：

大腸菌病原群におけるespK、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065並びにそれらの組合せの分布

異なる大腸菌病原群間での異なる遺伝子マーカー-espK、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の分布を下記表VIIに示す。概して、調べた遺伝子マーカーは、ほとんどがEHEC株で検出され、頻度は51.9% (Z6065) ~ 90.8% (espK) の範囲であった。これらマーカーはEPEC株とは関係性が低く、頻度は17.7% (Z1154) ~ 53.8% (Z1155) の範囲であり、STEC(3.4 ~ 20.7%) 及び非病原性大腸菌(3.6 ~ 9.4%) では稀にしか検出されなかった。

遺伝子マーカー-espK、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065のいずれも、単独では、全てのEHEC株を確実に同定することができない。しかし、espKを01-43(Z1151、Z1153、Z1154、Z1155及びZ1156)又は01-71(Z6065)のいずれかの遺伝子マーカーと組み合わせたときには、EHEC株のほとんどが検出され、頻度は95.5% (espK/Z6065) ~ 98.3% (espK/Z1155) の範囲であった。同じ組合せが、31.2% (espK/Z1156) ~ 61.8% (espK/Z1155) の範囲の頻度でEPEC株を、6.7% ~ 23.5% の頻度でSTEC株を、7.9% ~ 13.7% の頻度で非病原性大腸菌株を検出した。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

【表 7】

表Ⅶ

遺伝子マーカー	EHEC (n=466)	EPEC (n=468)	STEC (n=179)	EC (n=139)
Z1151	79,8%	20,3%	20,7%	7,9%
Z1153	89,3%	23,9%	12,3%	9,4%
Z1154	83,3%	17,7%	3,4%	3,6%
Z1155	79,4%	53,8%	16,8%	8,6%
Z1156	88,8%	18,8%	12,8%	6,5%
Z6065	51,9%	20,1%	5,0%	8,6%
espK	90,8%	28,0%	3,4%	5,0%
espK/Z1151	97,2%	34,0%	23,5%	12,2%
espK/Z1153	97,4%	35,7%	15,1%	13,7%
espK/Z1154	97,0%	31,8%	6,7%	7,9%
espK/Z1155	98,3%	61,8%	19,6%	12,9%
espK/Z1156	97,4%	31,2%	15,6%	10,1%
espK/Z6065	95,5%	36,8%	8,4%	13,7%

espK/Z1151はespK及び/又はZ1151について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1153はespK及び/又はZ1153について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1154はespK及び/又はZ1154について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1155はespK及び/又はZ1155について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1156はespK及び/又はZ1156について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z6065はespK及び/又はZ6065について陽性結果を示す株を表わす

【 0 0 5 2 】

腸管出血性大腸菌における遺伝子マーカーの分布

各遺伝子マーカーespK、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065の分布は、EHEC血清型により顕著に異なっていた(表VIII)。興味深いことに、遺伝子マーカーZ6065は、2011年のドイツでの大発生に關与したEHEC O104:H4(stx陽性、eae陰性、aggR陽性)を検出できる独特な遺伝子マーカーである。

いずれのEHEC O45:[H2]でも検出されなかったZ1151及び検査した19株のうち18株のO121:[H19]で存在しなかった(5.3%)Z6065を除き、調べた他の全ての遺伝子マーカーが、上位7つの血清型のEHEC株で見出され、頻度は15.4%(O26:[H11]ではZ6065が優勢)～100%の範囲であった。

【 0 0 5 3 】

espKをO1-43の以下の遺伝子マーカー：Z1151、Z1153、Z1154、Z1155及びZ1156の1つと組み合わせることで、上位7つのEHEC血清型のEHEC株のほとんどが検出された。よって、使用した遺伝子マーカーの組合せがどんなものであっても、上位7つの血清型の全てのEHEC株が検査で陽性結果を示した。ただし、それぞれespK/Z1154及びespK/Z6065で陰性結果を示したEHEC O121:[H19]の1～2株；espK/Z1154で検出できなかったO103:[H2]の1株、及び試験した全ての遺伝子マーカーの組合せで陰性であったEHEC O26:[H11]の7～8株を除く。よって、僅かなEHEC株のみが本研究で検査した遺伝子マーカーと反応しなかったに過ぎない。これらは異常株であり得、古典的なEHECタイプを代表するものではない可能性がある。これら事例的株において他の遺伝子を見るか又はゲノムを配列決定すると、この状況をより明確にする更なる相違点が明らかになるかもしれない。本発明者らは、原理的に、特定の血清型の全メンバーがEHECであるとは限らないと仮定した。

【 0 0 5 4 】

興味深いことに、上位7つの血清型以外の血清型である他のEHEC株が、87.5%～95.5%の範囲の頻度で高度に検出された。この知見は、検査した遺伝子マーカーの組合せが定型EHEC(stx及びeaeが共に陽性の腸菌株)を高感度で検出できることを示した。加えて、遺伝子マーカーZ6065の導入により、2011年のドイツでの大発生に關与したEHEC O104:H4(stx陽性、eae陰性、aggR陽性)の検出が可能になる。

【 0 0 5 5 】

【 表 8 】

表Ⅷ

遺伝子 マーカー	O26:H11 (n=117)	O45:H2 (n=19)	O103:H2 (n=61)	O111:H8 (n=33)	O121:H1 9 (n=19)	O145:H2 8 (n=31)	O157:H7 (n=98)	その他の EHEC (n=88)
Z1151	105/117 (89.7%)	0/19 (0%)	44/61 (72.1%)	33/33 (100%)	5/19 (26.3%)	30/31 (96.8%)	91/98 (92.9%)	64/88 (72.7%)
Z1153	107/117 (91.5%)	19/19 (100%)	48/61 (78.7%)	33/33 (100%)	18/19 (94.7%)	31/31 (100%)	91/98 (92.9%)	69/88 (78.4%)
Z1154	87/117 (74.4%)	19/19 (100%)	48/61 (78.7%)	31/33 (93.9%)	15/19 (78.9%)	29/31 (93.5%)	91/98 (92.9%)	68/88 (77.3%)
Z1155	75/117 64.1%	16/19 (84.2%)	41/61 (67.2%)	33/33 (100%)	14/19 (73.7%)	25/31 (80.6%)	97/98 (99.0%)	69/88 (78.4%)
Z1156	106/117 (90.6%)	19/19 (100%)	48/61 (78.7%)	33/33 (100%)	18/19 (94.7%)	31/31 (100%)	91/98 (92.9%)	68/88 (77.3%)
Z6065	18/117 (15.4%)	19/19 (100%)	59/61 (96.7%)	7/33 (21.2%)	1/19 (5.3%)	6/31 (19.4%)	85/98 (86.7%)	47/88 (53.4%)
espK	108/117 (92.3%)	19/19 (100%)	60/61 (98.4%)	33/33 (100%)	17/19 (89.5%)	31/31 (100%)	92/98 (93.9%)	63/88 (71.6%)
espK/Z1151	110/117 (94.0%)	19/19 (100%)	61/61 (100%)	33/33 (100%)	19/19 (100%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	82/88 (93.2%)
espK/Z1153	110/117 (94.0%)	19/19 (100%)	61/61 (100%)	33/33 (100%)	19/19 (100%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	83/88 (94.3%)
espK/Z1154	110/117 (94.0%)	19/19 (100%)	60/61 (98.4%)	33/33 (100%)	18/19 (94.7%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	83/88 (94.3%)
espK/Z1155	113/117 (96.6%)	19/19 (100%)	61/61 (100%)	33/33 (100%)	19/19 (100%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	84/88 (95.5%)
espK/Z1156	110/117 (94.0%)	19/19 (100%)	61/61 (100%)	33/33 (100%)	19/19 (100%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	83/88 (94.3%)
espK/Z6065	109/117 (93.2%)	19/19 (100%)	61/61 (100%)	33/33 (100%)	17/19 (89.5%)	31/31 (100%)	98/98 (100%)	77/88 (87.5%)

espK/Z1151はespK及び/又はZ1151について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1153はespK及び/又はZ1153について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1154はespK及び/又はZ1154について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1155はespK及び/又はZ1155について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z1156はespK及び/又はZ1156について陽性結果を示す株を表わす
 espK/Z6065はespK及び/又はZ6065について陽性結果を示す株を表わす

【 0 0 5 6 】

2) 遺伝子マーカー-espK、espV、Z2098及びUreD

腸管出血性大腸菌(EHEC)によるシガトキシン(Stx)の産生は、出血性結腸炎(HC)及び溶血性尿毒症症候群(HUS)の原因である主要な毒性形質であるが、Stxを産生する多くの大腸菌(STEC)株はHC及びHUSを引き起こさない。ヒト感染に関係付けられるSTEC株は、1以上のタイプのシガトキシンを産生する能力に加え、他の因子を有し、これが、ヒトの健康にとって重大なリスクとなるSTEC株を重篤な疾患や流行性疾患とは無関係なSTEC株と弁別するために使用できる可能性がある。このような因子を同定しようとして、本発明者らは、ヒト健康にとって重大なリスクとなるSTEC株を重篤な疾患や流行性疾患とは無関係なEPEC株及びSTEC株と弁別する候補因子としての、ゲノムO-アイランドOI-43、OI-44、OI-50及びOI-57に由来する或る種のnle遺伝子の適合性を調べた。本発明者らは、OI-43及び/又はOI-48がコードするureD(ウレアーゼ活性)、経口感染した子ウシの腸でのEHEC O157:H7の残留性に関与する遺伝子座(Vlisidouら, 2006)であるOI-50が有するespK(EspK)に着目した。また、本発明者らは、ヒトに対するSTEC株の増大した毒性と関係付け得るゲノムアイランド(Coombesら, 2008; Imamovicら, 2010; Bugarelら, 2011)であるOI-57に由来する配列であるZ2098にも着目した。また、EHEC株(EHEC O157:H7、O111、O103及びO26)のゲノム配列決定により、他の遺伝子マーカー、例えば疾患におけるその役割が調べられていないespVが指摘された。この遺伝子はEHEC O157:H7のOI-44に位置するが、他の大腸菌病原群での保有率は未だ報告されていない。本研究で、本発明者らは、種々の大腸菌病原群におけるureD、espV、espK及びZ2098の分布を調べ、ヒトに対して高毒性を有するSTEC株と

の関係を評価し、EHECと他の大腸菌病原群との明確な弁別に対する適合性を調べた。

【 0 0 5 7 】

材料及び方法

本研究で使用した大腸菌株 (n = 1100) は、主に、上記の研究で記載したものであった。EHECタイプ株 (n = 340) はstx遺伝子及びeae遺伝子の存在に基づいて定義した。STEC株 (n = 193) はstxのみを有した。EPEC株 (n = 392) はeaeのみを有した。非病原性大腸菌 (n = 175) はstx及びeae陰性株と定義した。細菌の培養及びDNAの調製は以前に記載したとおりであった。

高スループットリアルタイムPCR増幅も上記のとおりに行なった。

stx1、stx2及びeaeのPCR増幅に使用したプライマー及びFAM-標識TaqMan(登録商標)プローブは以前(Bugarelら, 2010)に記載されたものであった。ureD、espK、Z2098及びespVを標的するために使用したプライマー及びプローブを下記表IXに列挙する。

【 0 0 5 8 】

【表 9】

表IX

標的 遺伝子 ^a	フォワードプライマー, リバースプライマー及びプライマー配列(5' - 3')	配列 番号	配列AE005174内 での位置
espK (Z1829)	GCAGRCATCAAAAGCGAAATCACACC	42	1673422 - 1673397
	TCGTTTGGTAACTGTGGCAGATACTC	43	1673312 - 1673338
	[6FAM]-ATTTCAGATAGAAGAAGCGCGGGCCAG-[BHQ]	64	1673395 - 16673370
espV (Z1387)	TCAGGTTCTCTCGTCTGATGCCGC	44	1295446 - 1295424
	CTGGTTCAGGCCTGGAGCAGTCC	45	1295360 - 1295382
	[6FAM]-CTTGCAACACGTTACGCTGCCGAGTATT-[BHQ]	65	1295422 - 1295395
ureD (Z1142)	GCAATAATTGACTCTGATTGCC	46	1078824 - 1078845
	GCTGCTGCGGTAATAATTTACT	47	1078892 - 1078872
	[6FAM]-TACGCTGATCACCATGCCTGGTGC-[BHQ]	66	1078847 - 1078870
Z2098	CTGAAAAGAGCCAGAACGTGC	48	1888173-1888193
	TGCCTAAGATCATTACCCGGAC	49	1888308-1888287
	[HEX]TAAGTCTATACCTCCGCGCCG[BHQ]	67	1888286-1888265

a) EDL933と同様に番号付け

【 0 0 5 9 】

結果

大腸菌病原群間でのureD、espV、espK及びZ2098並びにそれらの組合せの分布

異なる大腸菌病原群での遺伝子マーカーureD、espV、espK及びZ2098の分布を表Xに示す。概して、調べた遺伝子マーカーは、ほとんどがEHEC株で検出され、頻度は84.4% (espV) ~ 92.4% (espK) の範囲であった。これらマーカーはEPEC株とは関係性が低く、頻度は18.1% (ureD) ~ 45.2% (espV) の範囲であり、STEC(0.5 ~ 3.6%) 及び非病原性大腸菌(0.6 ~ 2.9%) では稀にしか検出されなかった。全体的には、本発明者らは、調べた遺伝子マーカーの少なくとも1つについて陽性結果を示したEPEC株の26.5% が上位7つのEHEC血清型に属することを観察した。espKについて陽性である57/113のEPEC株が上位7つのEHEC血清型に属していたことは特筆すべきである。同様に、espVについて陽性である59/177のEPEC株は上位7つのEHEC血清型に属していた。また、Z2098について陽性である68/91のEPEC株及びureDについて陽性である58/71のEPEC株も同様に上位7つのEHEC血清型に属していたことも驚くべきことである。興味深いことに、既知のEHEC血清型(例えば、O55:H7、O103:H25及びO156:H25)を有する他のEPEC株もまた、これら遺伝子マーカーの少なくとも1つについて陽性であることが判明した(データは示さず)。この知見は、このような単離株が、EHEC様株とも名付けられている(Bugarelら, 2011)、EHECのStx陰性派生株である可能性を示している。本発明者らは、これら単離株が血清型及びnle遺伝子含有によればEHEC派生株であると想定したが、これら単離株はEHEC派生株とは未だ区別できないEPEC株である可能性もある。将来、全ゲノム配列決定を用いる更なる研究によって、これら株の正確な呼称が明らかにされよう。

遺伝子マーカーureD、espV、espK及びZ2098のいずれも、単独では、全てのEHEC株を確実に同定することができない。EHECを最良の特異性で検出するものを特定するために、遺

伝子マーカーの組合せを調べた。結果を表Xに示す。組合せで、これら遺伝子マーカーはEHECと高度に関係付けられ、頻度は97.9% (espK/Z2098) ~ 98.8% (espK/ureD)の範囲であった。同じ組合せが、33.4% (espK/ureD) ~ 54.1% (espK/espV)の範囲の頻度でEPEC株を、1.6% ~ 3.6%の頻度でSTEC株を、1.1% ~ 3.4%の頻度で非病原性大腸菌株を検出した。

【 0 0 6 0 】

【表 1 0】

表X

遺伝子マーカー	EHEC (n=340)	EPEC (n=392)	STEC (n=193)	EC (n=175)
<i>espK</i>	92.4%	28.8%	0.5%	1.1%
<i>ureD</i>	89.4%	18.1%	3.1%	2.9%
<i>Z2098</i>	87.4%	23.2%	3.6%	1.1%
<i>espV</i>	84.4%	45.2%	1.6%	0.6%
<i>espK/espV</i>	98.5%	54.1%	1.6%	1.1%
<i>espK/ureD</i>	98.8%	33.4%	3.6%	3.4%
<i>espK/Z2098</i>	97.9%	36.7%	3.6%	2.3%

espK/espV は *espK* 及び/又は *espV* について陽性結果を示す株を表わす。

espK/ureD は *espK* 及び/又は *ureD* について陽性結果を示す株を表わす。

espK/Z2098 は *Z2098* 及び/又は *espK* について陽性結果を示す株を表わす。

【 0 0 6 1 】

EHEC血清型間での*ureD*、*espV*、*espK*、*espN*、*Z2098*及び*espM1*並びにそれらの組合せの分布
各遺伝子マーカー*ureD*、*espV*、*espK*及び*Z2098*の分布は、EHEC血清型により顕著に異なっていた。種々のEHEC血清群における各遺伝子マーカーの分布を表XIに示す。いずれのEHEC O45:[H2]でも検出されなかった*espV*を除き、調べた他の全ての遺伝子マーカーが、上位7つの血清型のEHEC株で高度に優勢に見出され、頻度は71.4% (O103:[H2]では*ureD*が優勢) ~ 100%の範囲であった。

【 0 0 6 2 】

【表 1 1】

表XI

遺伝子マーカー	上位7つのEHEC血清型	O103:H2	O111:H8	O121:H19	O145:H28	O157:H7	O26:H11	O45:H2	その他のEHEC (新出現EHEC) ^a	総EHEC
<i>Z2098</i>	250/277 (90.3%)	49/49 (100%)	47/51 (92.2%)	17/20 (85.0%)	30/30 (100%)	49/66 (74.2%)	44/44 (100%)	14/17 (82.4%)	47/63 (74.6%)	297/340 (87.4%)
<i>espK</i>	269/277 (97.1%)	48/49 (98.0%)	51/51 (100%)	19/20 (95.0%)	29/30 (96.7%)	61/66 (92.4%)	43/44 (97.7%)	17/17 (100%)	45/63 (71.4%)	314/340 (92.4%)
<i>espV</i>	248/277 (89.5%)	48/49 (98.0%)	51/51 (100%)	20/20 (100%)	30/30 (100%)	65/66 (98.5%)	34/44 (77.3%)	0/17 (0%)	39/63 (61.9%)	287/340 (84.4%)
<i>ureD</i>	257/277 (92.8%)	35/49 (71.4%)	51/51 (100%)	16/20 (80.0%)	30/30 (100%)	64/66 (97.0%)	44/44 (100%)	17/17 (100%)	47/63 (74.6%)	304/340 (89.4%)

a) O103:[H25] (n=2), O118:[H16] (n=4), O118:H2, O119:[H25] (n=5), O123:H11, O127:H8s, O145, O145:[H25] (n=5), O156:H21, O156:H25 (n=11), O165:H25 (n=2), O172:[H25] (n=2), O172:NM, O177 (n=2), O177:[H25], O182:[H25], O3, O49:H16, O5 (n=11), O55:[H7] (n=2), O76:H51, O84:H2, Ont:[H2], Ont:H25 (n=2), Or:H16, OX186:[H2].

【 0 0 6 3 】

これら遺伝子マーカーの異なる組合せに基づく上位7つのEHEC血清型の検出を表XIIに示す。*espK*及び/又は*Z2098*の検出により、ヒト感染に係るEHEC血清型のほとんどの検出が可能になった。よって、EHEC O111:[H8]、O26:[H11]、O45:[H2]、O103:[H2]及びO145:[H28]株の全ての株が、*espK*及び/又は*Z2098*について陽性結果を示した一方、O157:[H7]の97.0%及びO121:[H19]の95%が陽性結果を示した。*espK*と*espV*又は*ureD*のいずれかとの

組合せも、同様に、上位7つのEHEC血清型の株のほとんどの検出を可能にした。よって、血清型O157:[H7]、O145:[H28]、O111:[H8]、O103:[H2]、O45:[H2]及びO121:[H19]の全ての株がespK及び/又はespVについて陽性結果を示し、O26:[H11]の97.7%がespK及び/又はespVについて陽性結果を示した。espKをureDとの組合せで検査したときのデータは非常に類似していた。この場合で、上位7つのEHEC血清型の全ての株がespK及び/又はureDについて陽性結果を示した。

【0064】

【表12】

表XII

遺伝子組合せ	上位7つのEHEC血清型	O103:H2	O111:H8	O121:H19	O145:H28	O157:H7	O26:H11	O45:H2	その他のEHEC (新出現EHEC) ^a	総EHEC
espK/espV	276/277 (99.6%)	49/49 (100%)	51/51 (100%)	20/20 (100%)	30/30 (100%)	66/66 (100%)	43/44 (97.7%)	17/17 (100%)	59/63 (93.7%)	335/340 (98.5%)
espK/ureD	277/277 (100%)	49/49 (100%)	51/51 (100%)	20/20 (100%)	30/30 (100%)	66/66 (100%)	44/44 (100%)	17/17 (100%)	59/63 (93.7%)	336/340 (98.8%)
espK/Z2098	275/277 (99.3%)	49/49 (100%)	51/51 (100%)	19/20 (95.0%)	30/30 (100%)	65/66 (98.5%)	44/44 (100%)	17/17 (100%)	59/63 (93.7%)	334/340 (98.2%)

a) O103:[H25] (n=2), O118:[H16] (n=4), O118:H2, O119:[H25] (n=5), O123:H11, O127:H8s, O145, O145:[H25] (n=5), O156:H21, O156:H25 (n=11), O165:H25 (n=2), O172:[H25] (n=2), O172:NM, O177 (n=2), O177:[H25], O182:[H25], O3, O49:H16, O5 (n=11), O55:[H7] (n=2), O76:H51, O84:H2, Ont:[H2], Ont:H25 (n=2), Or:H16, OX186:[H2].

espK/espV は espK 及び/又は espV について陽性結果を表わす

espK/ureD は espK 及び/又は ureD について陽性結果を表わす

espK/Z2098 は Z2098 及び/又は espK について陽性結果を表わす

【0065】

3)まとめ：

上記研究により、定型EHEC株の検出、特にヒト感染で世界的に報告されているEHECの主要な7つの血清型に属するものの検出に有用である遺伝子マーカーZ1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156、Z6065、ureD、espV、espK及びZ2098を選択することができた。異なる大腸菌病原群間でのこれら種々の遺伝子マーカーの分布を調べた。これにより、これらマーカーの最適な組合せを設計することができた。これら研究の結果を下記でまとめる。

遺伝子マーカーureD、espV、espK、Z2098、Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156及びZ6065は、EHEC血清型間で異なる頻度で検出された。本発明者らは、これら遺伝子マーカーの種々の組合せを調べて、EHECの検出についてより高い特異性及び感度を示す最良のマーカーの組合せを検索した。遺伝子マーカーespKと他の9つの遺伝子マーカーの1つとの組合せにより、定型EHEC株のほとんどの検出、特に上位7つのEHEC血清型のものの検出が可能になる。遺伝子マーカーespV、ureD及びZ2098は、EHECの検出のためにespKと組み合わせるべき最良の候補であることが示された。これら遺伝子マーカーは、個々には、上位7つのEHEC血清型の全ての株を検出できなかったが、組合せでは、上位7つのEHEC株の99.3%~100%を検出した。espKとespV、ureD又はZ2098のいずれかとの組合せは、EHEC株のより特異的で高感度な検出に最良の組合せであることが証明された。よって、espK及び/又はespVについての陽性の結果が、ヒト感染で世界的に報告されているEHECの主要な7つの血清型に属するEHEC株の99.6%で観察された(僅かに1つのEHEC O26:H11単離株が陰性の検査結果であった)。また、上位7つの血清型以外の血清型を有するEHEC株の93.7%が、espK及び/又はespVについて陽性の検査結果であった。最終的に、EPEC株の一部(54.1%)のみがespK及び/又はespVについて陽性の検査結果であった。ほとんどのSTEC及び無毒性大腸菌株は、espK及びespVの両方で陰性であることが判明した。別の興味深いアプローチはespKとZ2098とを組み合わせることであった。この遺伝子マーカーの組合せにより、主要な7つのEHEC血清型に属するEHEC株の99.3%及び上位7つの血清型以外の血清型を有するEHEC株の93.7%が検出された。espK及び/又はZ2098の検出は、EPECの36.7%、STECの3.6%、非病原性大腸菌株の2.3%についてのみ報告された。最高の特異性及び感度でEHECを

10

20

30

40

50

検出する最良のアプローチは、espKをureDと組み合わせることであった。この組合せにより、上位7つの血清型のEHECの100%及び他の血清型を有するEHEC株の93.7%の検出が可能になった。espK及び/又はureDの検出は、EPECの33.4%、STECの3.6%、非病原性大腸菌株の3.4%についてのみ報告された。

【0066】

これら知見は、espKとespV、ureD又はZ2098のいずれかとの組合せ検出が、世界的に最も頻繁な高い臨床例と関連付けられるEHEC血清型を99%の信頼性で同定する高感度で高度に特異的なアプローチであることを示した。複雑なサンプル(食物又は便検体)におけるstxとの組合せでのこれら遺伝子マーカーの検出は、stx及びeaeのみの組合せに比して、よりEHECに標的付けられた診断を提供する。興味深いことに、検出スキームへのZ6065の導入により、欧州で発生した深刻で最大のSTEC大発生に関与した非定型EHEC O104:H4の検出を可能にする。これらPCRアッセイの迅速性を考えれば、このアプローチは、上位7つのEHECの監視及び発生調査に大きな影響を与えるはずであり、公衆衛生に有益である可能性が高い。更に、上位7つのEHEC血清型以外の血清型を有するEHEC株の93.7%でのこれら遺伝子マーカーセットの検出は、新たに生じるEHEC株の同定の助けになり得る。

【0067】

結論

本発明者らは、高スループットPCRアプローチを使用して、種々の大腸菌病原群のビルローム(virulome)を調べ、病原性STEC株を特徴付ける遺伝形質の特定を試みた。10の遺伝子マーカー(Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156、Z6065、ureD、espV、espK及びZ2098)の分布を、EHEC、EPEC、STEC及び非病原性大腸菌株を含む大腸菌の大きなパネルで調べた。これら遺伝子マーカーの分布は、大腸菌病原群間で、血清型に応じて変化した。

概して、espKと他の9つの遺伝子(Z1151、Z1153、Z1154、Z1155、Z1156、Z6065、ureD、espV及びZ2098)との組合せは、ヒト感染で世界的に報告されているEHECの主要な7つの血清型に属するEHEC株の検出に最良の組合せであることが示された。これら知見は、この該当する遺伝子組合せを用いて、EHEC株のほとんどが陽性の検査結果であった一方、EPEC株の一部のみが交差反応したに過ぎない。また、このアプローチを用いたとき、極少数のSTEC及び無毒性大腸菌株のみが交差反応したに過ぎない。組合せespK/Z6065により、定型EHEC株の検出に加え、2011年に欧州で発生したHC及びHUSの大流行に関与した非定型EHEC O104:H4(stx陽性、eae陰性、aggR陽性)の検出が可能になる。

【0068】

参考文献

Beutin, L., S. Jahn, and P. Fach. 2009. Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *J. Appl. Microbiol.* 106(4): 1122-1132.

Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol.* Jun 21;11:142.

Bugarel M, Beutin L, Scheutz F, Loukiadis E, Fach P. 2011. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl Environ Microbiol.* Apr;77(7): 2275-81.

Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol.* Sep 1;142(3):318-29.

Bugarel M, Beutin L, Fach P. 2010. Low-density macroarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Sh

10

20

30

40

50

iga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): a new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Appl Environ Microbiol.* Jan;76(1):203-11.

【 0 0 6 9 】

Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Dos Santos LF, Irino K, Vaz TM, Bergamini AM, Guth BE. 2007. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* Sep;274(2):329-34. Epub 2007 Jul 25.

Chang, C. 1991 "Branched DNA Amplification Multimers for the Sensitive, Direct Detection of Human Hepatitis Viruses," *Nucleic Acids Symposium Series*, no. 24: 197-200.

Compton, J. 1991 "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification," *Nature* 350, no. 6313: 91-92.

Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA. 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* Apr;74(7):2153-60.

Creuzburg K, Middendorf B, Mellmann A, Martaler T, Holz C, Fruth A, Karch H, Schmidt H. 2011. Evolutionary analysis and distribution of type III effector genes in pathogenic *Escherichia coli* from human, animal and food sources. *Environ Microbiol.* Feb;13(2):439-52.

【 0 0 7 0 】

Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G; HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011 Nov 10;365(19):1771-80.

Gault G, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Mace M, Bingen E, Noel H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigne E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Euro Surveill.* 2011 Jun 30;16(26).

Imamovic L, Tozzoli R, Michelacci V, Minelli F, Marziano ML, Caprioli A, Morabito S. 2010. O1-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease. *Infect Immun.* Nov;78(11):4697-704.

Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin. Microbiol.* 41: 4930-4940.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* That Cause Diarrhea - Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389.

【 0 0 7 1 】

Mackay, I. 2007. Real-time PCR in Microbiology, from diagnosis to characterization. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiol. Rev.* 11: 142-201.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N.,

10

20

30

40

50

and Hase, T. 2000 Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, no. 12: E63.

Scheutz F, Nielsen EM, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* 2011 Jun 16;16(24).

Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. 2006. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett.* Feb;255(2):187-202.

【 0 0 7 2 】

10

Struelens MJ, Palm D, Takkinen J. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: new microbiological findings boost coordinated investigations by European public health laboratories. *Euro Surveill.* 2011 Jun 16;16(24).

Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 3;103(40):14941-6.

Vlissidou I, Marches O, Dziva F, Mundy R, Frankel G, Stevens MP. 2006. Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett.* Oct;263(1):32-40.

20

Walker, G., Fraiser, M., Schram, J., Little, M., Nadeau, J., and Douglas P. Malinowski, D. 1992 Strand Displacement Amplification-An Isothermal, In Vitro DNA Amplification Technique, *Nucleic Acids Research* 20, no. 7: 1691-1696.

【配列表】

0006166365000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 514318253

アジャンス ナショナル ド セキュリテ サニテア ド ラリマンタシオン, ド レンヴィロン
ヌマン エ デュ トラヴァイユ

AGENCE NATIONALE DE SECURITE SANITAIRE DE L'
ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVA
IL

フランス、エフ - 9 4 7 0 1、メゾン - アルフォーール セデックス、リュ ピエール エ マリー
キュリー 14

14 rue Pierre et Marie Curie, F - 9 4 7 0 1 Maiso
n - Alfort Cedex, France

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 ファッシュ, パトリック

フランス、エフ - 9 4 2 0 0 シャラントン ル ボン、リュ デ オルム 8

(72)発明者 ドラノイ, サビヌ

フランス、エフ - 9 4 2 3 0 カシャン、リュ ヴィクトール ショルシェール 1

(72)発明者 ボイティン, ロタール

ドイツ、1 4 1 2 9 ベルリン、アム シュラハテンゼー 1 1 2

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第 0 3 / 0 6 2 4 6 4 (WO , A 1)

特開 2 0 0 2 - 3 5 5 0 7 4 (JP , A)

BUGAREL M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 77(7)(2011), pp.2275-2281

ORTH D. et al., Int. J. Hyg. Environ.-Health, 209(2006), p.513-520

Villasenor C.D. et al, Microbiology, 156(2010), pp.1351-1361

DELANNOY S. et al, Journal of Clinical Microbiology, 50(12)(Epub 2012 Oct), pp.4035-4040

DELANNOY S. et al, Journal of Clinical Microbiology, 50(11)(Epub 2012 Aug), pp.3485-3492

TOUCHON M. et al, J. Bacteriol., 193(10), pp.2460-2467

BARRANGOU R. et al, Annu. Rev. Food Sci. Technol., 3(2012, First published online 2011 Dec), pp.143-162

RHO M. et al, PLoS Genetics, 8(6)(2012 June 13), e1002441, pp.1-12

PIAZZA R.M.F. et al., Distribution of Genetic Markers Useful for the Identification of Shiga Toxin-Negative O26 Escherichia coli Strains Isolated in Brazil., Zoonoses and Public Health, 59(Suppl.1)(2012 Jul), p.33 P-041

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq