

[原 著]

腸管出血性大腸菌複数回分離患者株の MLVA におけるリピート数の変化

佐藤孝志・牟田萌枝子・塚本展子・倉園貴至

福島浩一・岸本 剛・本多麻夫

埼玉県衛生研究所

(令和 4 年 5 月 15 日受付, 令和 4 年 8 月 10 日受理)

腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析手法である Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) は, 集団感染事例の範囲の特定や diffuse outbreak の探知に効果を発揮する。今回, 無症状病原体保有者を含む患者便由来の臨床分離株を用いた同一患者生体内での MLVA のリピート配列の変化に焦点を当てて調査を行った。同一患者の初回分離株と 2 回目以降の分離株の MLVA パターンの変化を見るために, 2015~2018 年にかけて同一患者から複数回にわたり分離された 202 株 (61 名分) について MLVA による解析を実施した。その結果, O157 株では 31 名中 7 名 (22.6%), O26 株では 30 名中 8 名 (26.7%) に初回分離株の MLVA パターンからの変化がみられた。また, 分離回数 5 回以上の O157 患者 3 名及び O26 患者 2 名の便由来株を対象に各分離株につき 12 コロニーを鈎菌し, MLVA による解析を実施した。その結果, 初回分離から 5~8 日経過した 2 回目の分離株で最初のパターン変化がみられた。このパターン変化のみられた 3 名の O157 株の初回分離株を用いて継代培養を行ったところ, パターン変化がみられたのはいずれも継代 40 代以降であった。MLVA パターン変化と薬剤服用歴の間の明確な関連性は, 今回は確認できなかった。

Key words: 腸管出血性大腸菌, MLVA, 複数回分離, パターン変化, 継代培養

序 文

腸管出血性大腸菌感染症はわが国で感染症法における三類感染症に指定されており年間約 3000 名以上の届け出がなされる感染症である。腸管出血性大腸菌 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (以下, EHEC) はベロ毒素を産生し感染すると腹痛, 水様性下痢, 血便の症状がみられ, 重症例では溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症し, 時に死に至る場合もある。近年では冷凍メンチカツ, きゅうりのゆかり和え, ポテトサラダなどによる集団感染事例も発生した^{1)~3)}がそのような際の原因究明を行う観点から EHEC の分子疫学的調査が重要となっている。

EHEC の分子疫学的解析手法の中でも Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (以下, MLVA) は, 現在, 国内外において広く利用されている。MLVA は細菌のゲノム上にある特定の複数領域に生じる繰り返し配列の繰り返し回数を調べ, その回数の数字列により遺伝子型別を行う手法である。MLVA は以前から分子疫学調査に用いられてきたパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下, PFGE) と同等以上の系統識別能を有する⁴⁾。さらに検査結果がデジタルデータであるため, 他の検査機関と情報共有しやすい点において優れている。腸管出血性大腸菌における集団発生事例

が疑われる際に行政検査機関において, 感染株同士の遺伝子解析による照合を行うが, 事例が自治体間にまたがる場合には, MLVA による他機関でのデジタルデータを共有することで発生状況を迅速かつ確に把握し対応に役立てることができる。そのことから, 各自治体で MLVA による解析の実施がより一層取り組まれている状況である。

一方, 当所で MLVA による解析を行った際に, 同一事例と推定される集団において, 分離された株のデータに一部変化を認める, いわゆる variant が生じることを経験してきた。variant の発生は MLVA で標的としている複数領域内において複製の際に生じるエラーに起因することが知られている⁵⁾。また, その MLVA パターン変化が起こる頻度や変異率などについて, in vitro における継代実験も複数報告されている⁶⁾⁷⁾。しかし, 臨床検体での複数回分離株における変化に焦点をあてたデータについては未だ報告がない状況である。

今回, 我々は生体内を経由した分離株が MLVA パターンへの影響を受ける可能性を把握する目的として, 当所で分離された血清型 O157 及び O26 株の中で同一患者から複数回分離されたケースを選定し, MLVA 法による検討を実施したので, その概要を報告する。

材料及び方法

1. 対象菌株

2015 年~2018 年に埼玉県衛生研究所で複数回分離・確認された 61 名分の患者便に由来する EHEC202 株 (O157 株: 有症患者 21 名, 無症状病原体保有者 10 名, 計 31 名分 114 株, O26 株: 有症患者 19 名, 無症状病原体保有者 11 名, 計 30 名分 88 株) を対象とした。菌株はそれぞれ 1 つの便検体

著者連絡先: (〒355-0133) 埼玉県比企郡吉見町江和井 410-1
埼玉県衛生研究所
佐藤孝志
TEL: 0493-59-9348
FAX: 0493-59-9635
E-mail: sato.takashi.dp@pref.saitama.lg.jp

Table 1. Changes in the repeat copy number within a locus for initial and reisolated isolates

Serotype	Number of patients who entailed repeat copy number changes in MLVA loci		Total
	Change	No Change	
O157	7	24	31
O26	8	22	30
Total	15	46	61

につき分離された1株で、当所で分離時に、ドルセットの卵培地「ニッスイ」（日水製薬）にて室温保存したものを使用した。また、使用した菌株は、初回分離株について、菌分離時に解析した MLVA 型が変化していないことを確認した上で実施した。

2. 遺伝子抽出法

対象菌株についてミューラーヒントン II 寒天平板（日本ベクトン・ディッキンソン）を用い 37℃、一夜培養し、コロニーを釣菌したものを加熱抽出し、直接 PCR に用いた。

3. MLVA

O157 及び O26 株は特定 17 領域 (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) について Izumiya ら⁸⁾の方法に準じて測定した。PCR により得られた増幅産物を適宜希釈し、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザー（Life Technology Inc.）によるシーケンスを行った。特定領域におけるリピート数の算出は GeneMapper ソフトウェア（Life Technology Inc.）を使用した。なお、リピート数が検出されなかった特定領域には、リピート数「-2」（null allele）と表記した。

4. 対象菌株のスクリーニング

対象とした患者 61 名からの最初の分離株（以下、初回分離株とする）と、その後分離された株（以下、再分離株とする）について菌株ごとにミューラーヒントン II 寒天平板に画線培養し、1 コロニーを釣菌して MLVA を実施した。O157 と O26 のそれぞれについて、初回分離株と再分離株との特定 17 領域における MLVA パターンの変化の有無と変化のめられた領域について調査した。

5. 変化があった患者分離株の詳細な調査

パターンに変化がみられた患者のうち、分離回数 5 回以上の O157 患者 3 名及び O26 患者 2 名からの菌株を選び出し、分離回ごとの菌株をミューラーヒントン II 寒天平板に画線培養し、12 コロニーを釣菌してそれぞれ MLVA を実施し、変化の割合について調査した。結果については、各患者を経過日数ごとにまとめた。

6. 初回分離株の継代培養による MLVA パターンの変化の調査

MLVA パターンに変化がみられた株のうち、分離回数 5 回以上の O157 患者 3 名からの初回分離株を用いた。既報⁹⁾に準じて、Heart Infusion Agar (HIA) 斜面培地（日水製薬）で 37℃、3～4 日間隔で 50 回（25 週間）継代培養し、10 回の継代ごとにミューラーヒントン II 寒天平板に画線培養

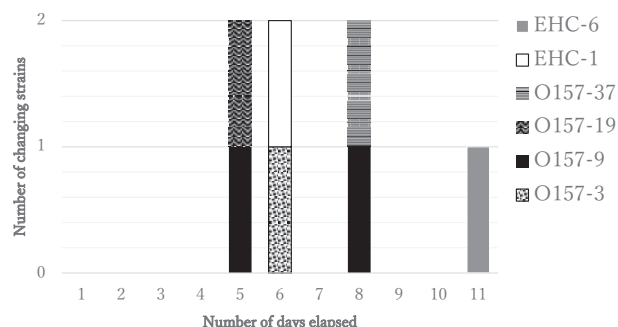


Figure 1. Number of strains and loci of change in MLVA pattern by the number of days elapsed from the date of initial isolation to the date of first change (serotype O157) in strains showing a change in MLVA pattern.

し、12 コロニーを釣菌して MLVA を実施した。得られた結果について、臨床分離された再分離株との変化状況の比較調査を行った。

7. 感染時の薬剤使用歴の調査

対象株が分離された患者 61 名のうち感染時の服薬状況が明らかな 51 名について、感染時の抗菌薬や整腸剤の服薬状況を調査し、整理した。該当者 51 名のうち MLVA 型のパターン変化のあった患者数を調査した。また、分離回数 5 回以上の O157 患者 3 名及び O26 患者 2 名の服薬状況も併記した。

結 果

1. 対象菌株のスクリーニング

対象者 61 名分の MLVA 型の変化の有無を Table 1 に示した。O157 株では 31 名のうち 7 名 (22.6%)、O26 株では 30 名のうち 8 名 (26.7%) について、初回分離株の MLVA パターンの変化が認められた。また、MLVA パターンの変化があった株の採取日と初回分離株の採取日との経過日数は中央値で O157 株が 6 日、O26 株が 5.5 日であった。MLVA 特定 17 領域において、O157 株では、O157-9、O157-3、O157-19、O157-37、EHC-1、EHC-6 でリピート数の変化がみられたが、全て Single locus variant (SLV) であった。一方、O26 株は EHC-6 及び O157-37 の Double locus variant (DLV) の変化がみられた (Fig. 1, 2)。

2. 患者別の臨床分離株の詳細な調査

前項で MLVA パターンに変化のみられた O157 患者 7 名及び O26 患者 8 名の分離株のうち、特に再分離の多かった O157 患者 3 名（患者 A、B 及び C）及び O26 患者（患者 D 及び E）について、1 株につき 12 コロニーについて再度 MLVA 法を実施した結果は Table 2 及び Table 3 のとおりであった。

O157 患者は、患者 A で O157-3 の 1 領域のみに変化があったが、経過 6 日目、10 日目、19 日目にみられたリピート数は全て異なっていた。患者 B は経過 6 日目に O157-37 に 2 コロニー、経過 8 日目には O157-9 に 12 コロニー全てで変化がみられた。患者 C は経過 5 日目のみ変化がみられ O157-36 に 1 コロニー、O157-37 に 1 コロニーみられた。

O26 患者は、患者 D で 5 領域にわたりパターン数の変化

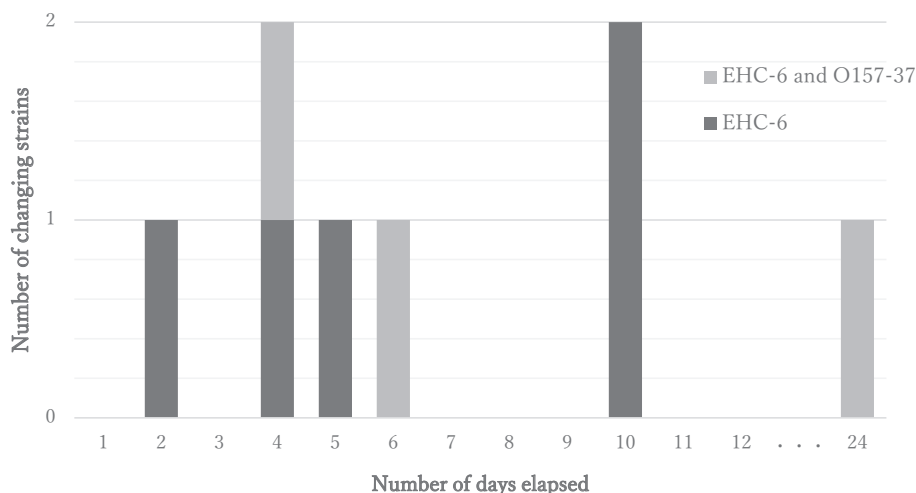


Figure 2. Number of strains and loci of change in MLVA pattern by the number of days elapsed from the date of initial isolation to the date of first change (serotype O26) in strains showing a change in MLVA pattern.

Table 2. Time-series pattern changes in patients isolated multiple times (serotype O157)
Patterns of specific locus not listed have not changed since the initial isolates.

Patient (total number of isolations)	Locus	Isolated times	Number of days elapsed from the first isolation time	Change in repeat copy number	Number of colonies changed repeat copy number out of 12 colonies
A (8 times in total)	O157-3	2nd time	Day 6	14 → 16	1
		4th time	Day 10	14 → 15	4
		7th time	Day 19	14 → 10	1
B (5 times in total)	O157-37	2nd time	Day 6	6 → 3	2
	O157-9	3rd time	Day 8	17 → 18	12
C (8 times in total)	O157-37	2nd time	Day 5	6 → -2	1
	O157-36	2nd time	Day 5	10 → 11	1

がみられ、そのうち EHC-6 及び O157-37 は経過 6 日目までに発生していた。また、患者 D の O157-36 については、初回分離株の時点で 12 コロニー中 11 コロニーが null allele である一方で、1 コロニーにリピート数 10 がみられ、分離 2 回目の経過 5 日目までは同様に検出したが、分離 3 回目以降不検出となった。残る 2 領域は経過 25 日目以降の検出で、EHC-1 が分離 10 回目、EHC-2 が 11 回目であった。患者 E も 4 領域について変化が確認されたが、そのうち O157-36 の 1 領域が経過 8 日目、残る 3 領域が経過 23 日以降の分離株によるものであった。

3. 初回分離株の継代培養による MLVA パターンの変化の調査

O157 患者 3 名の初回分離株を継代培養し、特定領域のリピート数に変化を検討した。その結果を Table 4 に示す。O157 患者 3 名中 1 名 (患者 B) の初回分離株は継代 50 回 (25 週間) を経ても、特定 17 領域でリピート数の変化は確認されなかった。また、患者 A では継代 40 回と 50 回で 1 領域 (O157-36) に、患者 C では継代 50 回で 1 領域 (O157-19) にリピート数の変化が確認されたが、いずれも 1 コロニーのみであった。

4. 感染時の薬剤使用歴の調査

調査該当の患者 61 名のうち、感染中に服薬履歴の記録が

ある 51 名について、抗菌薬又は整腸剤の服用の有無を調べたところ、服薬歴の内訳は Table 5 のとおりであった。

抗菌薬については、服用した患者 16 名のうち 3 名 (18.8%) に初発分離株からのリピート数の変化がみられた。また、整腸剤では、服用した患者 10 名のうち 3 名 (30.0%) にリピート数変化があった。抗菌薬及び整腸剤を服用した患者は 2 名であり、うち 1 名に変化がみられていた。一方で、服薬歴のない患者は 23 名であり、そのうちリピート数変化が確認されたのは 3 名 (13.0%) であった。

また、分離回数 5 回以上の患者については、患者 A は初発分離日から 3 日間、整腸剤の服用、患者 D が初発分離日から整腸剤の服用 (服用終了日不明)、患者 E が初発分離日前日から抗菌薬の服用 (服用終了日不明) の記録があった。なお、患者 B は投与歴がなく、患者 C については服薬歴不明であった。

考 察

腸管出血性大腸菌の遺伝子型別手法の一つである MLVA は、国立感染症研究所を中心に地方衛生研究所等で実施され、全国で発生している腸管出血性大腸菌 O157 等主要血清型の発生動向調査における分子疫学的調査に活用されている。MLVA で解析された MLVA パターンは、既存の調査研究

Table 3. Time-series pattern changes in patients with multiple isolates (serotype O26)
Patterns in the specified locus not shown have not changed since the initial isolates.

Patient (total number of isolations)	Locus	Isolated times	Number of days elapsed from the first isolation time	Change in repeat copy number	Number of colonies changed repeat copy number out of 12 colonies
D (12 times in total)	O157-36	1st time	—	-2 → 10	1
		2nd time	Day 5	-2 → 10	4
	EHC-6	3rd time	Day 6	10 → -2	12
		4th time	Day 10	10 → -2	5
		6th time	Day 18	10 → -2	12
		7th time	Day 21	10 → -2	12
		8th time	Day 22	10 → -2	12
		9th time	Day 24	10 → -2	12
		10th time	Day 25	10 → -2	12
		11th time	Day 28	10 → -2	12
		12th time	Day 29	10 → -2	12
	O157-37	3rd time	Day 6	5 → -2	12
		4th time	Day 10	5 → -2	5
		6th time	Day 18	5 → -2	12
		7th time	Day 21	5 → -2	12
		8th time	Day 22	5 → -2	12
		9th time	Day 24	5 → -2	12
		10th time	Day 25	5 → -2	12
		11th time	Day 28	5 → -2	12
		12th time	Day 29	5 → -2	12
	EHC-1	10th time	Day 25	8 → 7	1
	EHC-2	11th time	Day 28	8 → 9	12
E (7 times in total)	O157-36	2nd time	Day 8	-2 → 10	2
		3rd time	Day 9	-2 → 10	2
		6th time	Day 23	-2 → 10	1
		7th time	Day 24	-2 → 10	3
	EHC-6	7th time	Day 24	-2 → 10	12
	O157-37	7th time	Day 24	-2 → 5	12
	O157-17	7th time	Day 24	-2 → 4	2

Table 4. MLVA pattern changes of first isolates of multiple patients by passaging culture
Patterns in the specified locus not listed have not changed since the initial isolate.

Patient	Locus	Change in repeat copy number with times of passaging culture in 12 colonies (number of colonies changed)		
		10 ~ 30	40	50
A	O157-36	no change	10 → 11 (1)	10 → 11 (1)
B	—	no change	no change	no change
C	O157-19	no change	no change	7 → 6 (1)

によると、PFGE パターンに比べクローナルターンオーバーの影響を受けづらいことが報告されている¹⁰⁾。しかし、当所の経験では患者から分離された菌株を解析した結果からは、一部に短い期間でパターン変化を起こす場合がみられた。Michael B. らの報告¹¹⁾では、温度や日照又は紫外線照射下などの培養条件ではそれほど MLVA パターンの変化に影響はなく、発育培地の栄養状況が最も影響を与えると報告している。そのことを考慮すると、発症者の消化管内の環境変化が影響していることも考えられる。今回、生体内における

MLVA パターン変化への影響を検証するため、同一患者から複数回分離された腸管出血性大腸菌感染症の臨床分離株について解析し、さらに継代培養した場合との比較を試みた。

まず、当所における複数回分離患者 61 名の 202 株について、MLVA を実施したところ O157 患者 22.6%、O26 患者 26.7% で MLVA パターンの変化が確認された。また、変化のみられた領域については、O157 株では特定領域 17 か所中 6 か所 (O157-9, O157-3, O157-19, O157-37, EHC-1, EHC-6) でリピート数の変化がみられたが、O26 株では 17 か所中 2 か所 (O157-37, EHC-6) の変化で、特に EHC-6 領域での変化を認める株が多かったことから、O26 の同一事例においてリピート数の変化が生じる場合には EHC-6 領域を中心に変化する可能性が高いことを考慮すべきと考えられた。

続いて、そのうちの 5 回以上の複数回分離された患者 5 名を対象にして、各分離株から 12 コロニーを再分離し MLVA パターンの変化を調査したところ、O157 患者 3 名分については 1 領域ないし 2 領域における変化にとどまったが、どちらも初回分離後の分離 2 回目 (経過 5~8 日) で最初のパターン変化がみられた。O26 患者 2 名についても初回分離後から早い段階 (経過 5~8 日) で最初のパターン変化がみられた。このことは感染初期の早い段階においてすでに感染株に

Table 5. Patient's medication status

Type of drug	Number of patients who changed repeat copy number in MLVA loci (%)		Total
	Yes	No	
Antibacterial	3 (18.8)	13 (81.2)	16
Intestinal regulators	3 (30.0)	7 (70.0)	10
Antibacterial + Intestinal regulators	1 (50.0)	1 (50.0)	2
None	3 (13.0)	20 (87.0)	23
Total	10 (19.6)	41 (80.4)	51

MLVA パターンの変化が生じていることを示唆している。併せて実施した初回分離株の継代培養実験の結果と比べると臨床分離株の MLVA パターンの変化が生じるタイミングが早いことから、感染時に生体内で起こる MLVA パターン変化の発生頻度は人工培地による継代より高いことが推察された。一方で、分離回数 5 回以上の臨床分離株 1 株につき 12 コロニーずつ解析したが、短期間で生じる MLVA パターン変化は、O157 株の場合に患者 B の経過 8 日目の株を除き 1~4 コロニーであり、全てのコロニーが別パターンに置き換わるにはより経過日数を要していたことから、1 株につき複数コロニーを解析することで、菌株同士が同一クローン由来であるかの異同判定に影響がないようにすることができるとも確認できた。O26 株についても、O157 株に比べて変化する可能性が高いものの、患者 D 株が初回分離日から経過 24 日目の分離 9 回目、患者 E 株が経過 23 日目の分離 6 回目まで double locus variant までの範囲の変化に収まっていた。なお、リピート数の変化パターンについて EHC-6、O157-36、O157-37 の 3 領域は患者 B、C、D、E の複数回分離株及び患者 A 初回分離株の継代培養試験共に変化がみられている。この 3 領域はプラスミド上に由来するため、プラスミドの脱落に伴いリピート数が欠失する場合があるとされている⁵⁾。今回の調査でも当該領域の変化は大多数でリピート数が実数から null allele への変化となっており、既知の報告¹⁰⁾と一致していた。しかし、再分離株の中では初回分離時の null allele から実数へ変化を示す例もみられた。これについては腸管内に残存している菌株のクローンに一定比率で当該領域を有するプラスミドを保持するクローンと脱落しているクローンが存在していた可能性が考えられた。また、患者 A 株の継代培養 40 回目で O157-36 の領域にリピート数が ± 1 ずれる変化がみられ、他の 14 領域と同様のパターン変化も起こることを確認できた。

今回は併せて調査対象の患者について服薬状況も調べた。服薬の条件別にみると、リピート数変化有りの患者の割合は抗菌薬で 16 名中 3 名の 18.8%、整腸剤で 10 名中 3 名の 30.0%、抗菌薬及び整腸剤で 2 名中 1 名の 50.0% であり、服薬歴無し患者 23 名中 3 名の 13.0% をいずれも上回っていた。個々の患者に注目すると 5 回以上の複数回分離患者 5 名中 3 名について初回分離日当日若しくは前日からの整腸剤又は抗菌薬の服用が有り、残る 2 名は 1 名が服薬歴無し、もう一名が不明であり、服薬による影響の有無についてはどちらの可能性も残る結果となった。しかし、感染・発症してまもなく患者へ施される対応が服薬であることは容易に想定されることが

ら、臨床分離株における MLVA パターンの変化が感染早期に起こる場合の一要因として考えられる。なお、服薬歴に抗菌薬が有りながら、その後に複数回菌分離している患者がいることについては、抗菌薬の不十分な作用が大腸菌の MLVA パターンの変化をもたらした可能性も考えられる。服薬状況との因果関係については今後も詳細な調査を積み重ねることが必要であると思われる。

今回の MLVA に関する調査では、臨床分離株における MLVA パターン変化についての知見を得ることができた。MLVA は PFGE よりもクローナルターンオーバーの影響を受けにくい遺伝子型別であるといわれており、今回の臨床分離株を調査した結果においても、そのパターン変化は大多数が一部のコロニーにとどまり、菌株同士の異同判定に影響しないことが確認された。一方で、O157 株についてはパターン変化する領域の種類が O26 株より多かったこと、継代培養株より臨床分離株の変化のタイミングが早かった結果から今後の解析時に考慮すべき知見が得られたと考える。今回の調査データで示されたように MLVA による型別については一部に変化を伴う場合があるので、そのデータの解釈には従来から言われているように疫学情報と照らし合わせて行うことが重要であることを再認識した。また、疫学的に同一クローン由来と推定される Single locus variant についても、本調査から改めてその必要性を確認した。今回の調査でより理解が深まったことを活かして、今後の MLVA による分子疫学的調査に臨みたい。

倫理審査：本研究は、研究計画書を本研究所の倫理審査委員会に提出し、承認を得た。また、本研究の許可を得た後に、本申請書と通知書を本研究所のホームページに情報公開を行った上で実施した。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 久川祐稔. 2017. 冷凍メンチカツを原因とする広域食中毒事例について. 病原微生物検出情報 38: 92-94.
- 2) 平井晋一郎, 横山栄二, 涌井 拓, 他. 2017. きゅうりのゆかり和えによる腸管出血性大腸菌 O157 の集団食中毒事例—千葉県, 東京都. 病原微生物検出情報 38: 92-94.
- 3) 土屋久幸, 桑原由美子, 浅井澄代, 他. 2018. 埼玉県熊谷保健所の腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例への対応. 日本公衛誌 65 (9): 542-552.

- 4) Anna, C.N., M. M. Catharine, G.F.P. Antonio, et al. 2003. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. J. Clin. Microbiol. 12: 5389-5397.
- 5) 泉谷秀昌. 2018. 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について. 獣医公衆衛生研究 20-2: 6-11.
- 6) Anna, C.N., M. M. Catherine, A.S. Kathleen, et al. 2006. Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157: H7. J. Clin. Microbiol. 44: 374-377.
- 7) Amy, J.V., K. Christine, Y. Nemoto, et al. 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Bacteriology. 12: 4253-4263.
- 8) Izumiya, H., Y. Pei, J. Terajima, et al. 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. Microbiol. Immunol. 54: 569-577.
- 9) Iguchi, A., R. Osawa, J. Kawano, et al. 2002. Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 on pulse-field gel electrophoresis profiles. J. Clin. Microbiol. 40: 3079-3081.
- 10) 野田万希子, 門倉由紀子, 亀山芳彦, 他. 2017. 腸管出血性大腸菌集団感染事例の解析と継代培養による PFGE と MLVA パターン変化の比較. 岐阜県保健環境研究所報 25: 1-6.
- 11) Michael, B. C., C. Diana, N. Kimberly, et al. 2010. May. Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157: H7. Applied and Environmental Microbiology. 3398-3400.

Repeat copy number changes in MLVA of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated multiple times from the same patient

Takashi Sato, Moeko Muta, Nobuko Tsukamoto, Takayuki Kurazono, Hirokazu Fukushima,
Tsuyoshi Kishimoto, Asao Honda
Saitama Institute of Public Health

Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), a molecular epidemiological analysis method for enterohemorrhagic *E. coli*, is effective in identifying the extent of outbreak cases and detecting diffuse outbreaks. This study focused on changes in MLVA repeat sequences in the same patient organism using clinical isolates derived from patient stools, including asymptomatic pathogen carriers. We performed MLVA analysis on 202 isolates (61 individuals) isolated multiple times from the same infected person between 2015 and 2018 to see changes in MLVA patterns between first and second and subsequent isolates from the same infected person. The results showed that 7 of 31 (22.6%) of the O157 isolates and 8 of 30 (26.7%) of the O26 isolates showed a change from the MLVA pattern of the initial isolates. In addition, 12 colonies per isolate were caught and analyzed by MLVA for stool-derived strains from 3 patients with O157 and two patients with O26 who had been isolated five or more times. The results showed that the first pattern change was observed in the second isolates after 5 to 8 days from the initial isolation. Artificial passaging was performed using the first isolates of the three O157 strains that showed this pattern change, and the pattern change was observed only after the 40th or later subcultures. No clear relationship between MLVA pattern change and drug use history could be confirmed in this study.