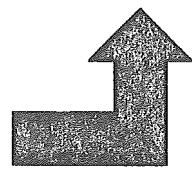


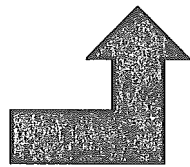
## 行政政策への貢献の可能性

1. multiplex-PCRによる迅速O157菌株識別システムの実用化
2. 汎用性のあるO157菌株識別用のDNAチップの開発



O157 EHEC対策への応用  
・新しい疫学ツールとしての利用  
(現行のサーベイランスシステムへの組み込み)

3. O26, O111, O103 EHECの全ゲノム配列の解析



non-O157 EHEC対策への応用  
・病原性の解明  
・疫学マーカーや選択培地の開発

## 業績

### 発表論文:

- Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, Tashiro K, Tobe T, Ohnishi M, Nakayama K, Morimoto T, Terajima J, Watanabe H, Kuhara S, and Hayashi T: Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. DNA Research. (in press).
- Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, Ohnishi M, Ohtsubo E, Hattori M, and Oguma K: The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102: 17472-17477, 2005.
- Tobe T, Ando H, Ishikawa H, Abe H, Tashiro K, Hayashi T, Kuhara S, and Sugimoto N: Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. Molecular Microbiology. 58: 320-333, 2005.
- 林哲也: 細菌の病原性遺伝子システムの獲得と進化. 蛋白質 核酸 酵素 50: 2204-2209, 2005.
- 大岡唯祐, 小椋義俊, 林哲也: 大腸菌O157のゲノム研究とその応用. 臨床微生物迅速診断研究会誌 (JARMAM) 16: 179-181, 2005.

林哲也: ゲノムが語る細菌の病原性. 細胞工学 24: 1302-1306, 2005.

ガイドライン・マニュアル等の作成: なし



研究課題名:「アジアを中心に世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定法に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者	西淵光昭	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	西岡輔	京都大学大学院 医学研究科, 総合研究大学院大学 先導科学研究科
協力研究者	松本(真下)千穂	大阪歯科大学 細菌学講座
協力研究者	Ashrafuzzaman Chowdhury	バングラデッシュ国際下痢症研究センター
協力研究者	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	中口義次	京都大学 東南アジア研究所

研究要旨 本研究では、アジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定に最も適した遺伝学的方法を明らかにするために、まず多数の遺伝子中の塩基置換を総合的に解析して新型クローンの系統発生を明らかにし、その結果に基づいて同定法を評価した。系統発生学的解析にはアジア各地で 1980 年から 2001 年までに分離された 61 菌株(新型クローンおよび関連菌株)を対象に、大小 2 つの染色体中に分布する合計 11 遺伝子の塩基配列を決定し、それらを連結して Neighbor-Joining 法によって系統樹を作成した。我々のグループはかつて *toxRS* オペロンの塩基置換に着目した新型クローンの同定法(GS-PCR 法)を確立した。11 遺伝子の配列すべてを統合して解析した結果、GS-PCR 陽性株と陰性株はそれぞれ異なるクラスターを形成した。GS-PCR 陽性株クラスターには O3:K6 以外の血清型も含まれていた。大染色体と小染色体に属する遺伝子を別々に解析した結果、GS-PCR 陽性ながら *tdh* 遺伝子陰性である例外的な菌株を除いては、系統関係には大きな変化はなかった。その他の情報も総合して解析すると、新型クローンは系統発生の過程で大染色体中に環境変化への適応に必要な挿入配列(23 kb および 16 kb 配列)、小染色体中に病原性関連遺伝子群(*tdh* 遺伝子を含む)を獲得したと考えられる。系統解析に使用した菌株における新型クローン同定用の各種遺伝マーカーの分布を調べた結果、GS-PCR 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適していると判断された。これより多少特異性は劣るが、23 kb および 16 kb 挿入配列もある程度有用であり、Mn<sup>2+</sup> /Fe<sup>2+</sup> トランスポーター遺伝子中の塩基置換や線上ファージの ORF8 は特異性が低いと判定された。

## A. 研究目的

分担研究者らは、1995年頃に腸炎ビブリオ新型クローンが出現し、このクローンに属すると思われる菌株による感染症の大流行が、アジアを中心に世界の他の地域に広がっていることを報告した<sup>1,2)</sup>。我々は新型クローンが O3:K6 血清型、*tdh* 遺伝子陽性、*trh* 遺伝子陰性という特徴も持つことを明らかにした後、クローナリティーを arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法による DNA フィンガープリント解析によって確認した<sup>1,2)</sup>。しかし後に O3:K6 以外の様々な血清型に属する派生型が存在する可能性を示唆する結果を得た<sup>3,4)</sup>。この世界的大流行は現在でも継続し、最近では規模が拡大して、アジア・北米にとどまらず南米、ヨーロッパ、アフリカにも広がったことが報告されている<sup>5-8)</sup>。新型クローンによる感染症の国際的伝播をモニターし、我が国に侵入することを監視するためには、このクローンに属する菌株を確実に同定する手法を確立する必要がある。このクローンを遺伝学的に同定するために、我々は *toxRS* オペロン中の特異的塩基置換を標的とする GS-PCR (group-specific PCR) 法を開発した<sup>2)</sup>。その後、複数の遺伝子マーカーが提案されているが、菌株によっては検査方法の違いによって、結果が異なることが報告されている。

本研究では、新型クローンの同定に最も適した遺伝学的方法を明らかにするために、系統発生的解析によって新型クローン菌株とそれ以外の菌株を明確に区別し、それらの菌株を用いて同定方法を比較して、最も適した同定方法を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

腸炎ビブリオ被検菌株は分担研究者が現在までにアジアを中心として、世界各地における共同

研究において分離あるいは入手し保存していたものである。全 DNA を抽出し、PCR 法によって標的遺伝子の部分配列を増幅し、塩基配列を決定した(表 1)。増幅のための PCR プライマーは、全ゲノム配列が報告されている新型クローン O3:K6 菌株の塩基配列<sup>9)</sup>を参考にして設計した。選択した遺伝子の塩基配列を連結して、Neighbor-joining 法によって解析し、系統樹を作成し、被検菌株間の系統発生的関係を調べた。

新型クローンに特有な遺伝子マーカーを検出するための PCR は既報に従って実施した(表 2)。*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を検出する PCR は過去に報告した方法に従って行った<sup>1)</sup>。

## C. 研究結果と考察

### 1. 新型クローンの系統発生的解析

1980 年から 2001 年までにアジア 11 カ国で分離された腸炎ビブリオ 61 菌株(新型クローンおよび関連菌株)について、染色体中の 11 遺伝子中の塩基置換に基づく系統関係を明らかにした。被検菌株すべてについて、大染色体中の 7 遺伝子につき合計 5,065 bp の塩基配列、小染色体中の 4 遺伝子につき合計 2,990 bp の塩基配列を決定した。標的遺伝子はビブリオ属細菌種によく保存されていると思われるハウスキーピング遺伝子または調節遺伝子を選んだ。その結果いずれの遺伝子でも、十分な数の多型が検出され、これらの遺伝子は系統解析に使用できると判断された(表 1)。

11 遺伝子すべての塩基配列を連結して解析した場合、被検菌株は 12 の菌株グループに分かれた(図 1)。GS-PCR 陽性(+)株と GS-PCR 陰性(-)株は異なるクラスターを形成していた。GS-PCR(+ )クラスター内には 6 グループが含まれ、

その中で最も大きなグループを形成していたのは O3:K6 の他に O1:KUT、O1:K25 を含む 8 種類の O:K 血清型に属する 30 菌株で、様々な国で分離されていた菌株であることを確認した。これらの菌株の塩基配列は、検査した範囲内では 100%の相同性を示した。次に GS-PCR(+)クラスター内で特徴のあるグループは、O4:K68 血清型に属する 6 菌株(2グループ)で 98 年から 99 年にかけて 4 カ国で分離されたものである。そのうち、1 菌株(1グループ)を除く 5 菌株(1グループ)の塩基配列は 100%一致していた。これらの菌株は O3:K6 菌株を含むグループとは多少離れた位置にあり、後に派生したという説を支持する結果が得られた。ただし、GS-PCR(+)ながら *tdh* 遺伝子が検出できなかった O3:K6 菌株は、GS-PCR(+), *tdh* 遺伝子陽性菌株とは異なる 2 グループを形成していた。GS-PCR(-)クラスター内には多様な系統関係を示す 6 グループの菌株が存在し、この中には 1980 年から 1993 年にかけて分離され、O3:K6 血清型に属し、*trh* 遺伝子を保有する菌株を含むグループ、および 1980 年から 1981 年にかけて分離され、O3:K6 血清型に属し、*tdh* 遺伝子を保有する菌株を含むグループが含まれているが、前者のグループのほうが新型クローン O3:K6 菌株に系統発生的に近似していた。

次に、大染色体中に存在する 7 遺伝子の塩基配列(合計 5,065 bp)における塩基置換のみに基づく系統解析を実施した。その結果、11 遺伝子すべての塩基配列を用いて解析した結果と類似する系統樹が得られた。しかし、GS-PCR(+)ながら *tdh* 遺伝子陰性の O3:K6 菌株グループは、他の GS-PCR(+), *tdh* 遺伝子陽性菌株と区別できなかった。一方小染色体中に分布する 4 遺伝子の塩基配列(合計 2,990 bp)における塩基置換のみ

に基づく系統解析の結果では、GS-PCR(+)ながら *tdh* 遺伝子陰性の O3:K6 菌株グループは、GS-PCR(-)クラスターの系統樹の中心に位置していた。

このように、GS-PCR(+)ながら *tdh* 遺伝子陰性の例外的な O3:K6 菌株グループが、別の染色体中の遺伝子を標的として解析した結果、異なる系統解析結果を示したのは、小染色体中の VPA1232 遺伝子の塩基配列が、この菌株グループとそれ以外で異なっているためであった。VPA1232 遺伝子は、pathogenicity island と命名された領域 (*tdh* 遺伝子や type III secretion system をコードする遺伝子群を含む) の近傍に位置している。おそらくこの領域は腸炎ビブリオが系統発生の過程において外部から獲得したもので、病原性菌株の重要なマーカーになりうる部分であると考えられる。しかし、この領域は、*tdh* 遺伝子陰性の例外的な菌株を除いては、新型クローン菌株にも、それ以前に分離された古典的な病原性菌株(神奈川現象陽性株)にも存在しており、これらの菌株間では、*tdh* 遺伝子の構造および TDH の産生量に差が認められない。従って、この領域は新型クローンが病原性を示すには必須であるが、新型クローンに特有の領域ではないと言える。

一方、新型クローンが獲得したと考えられる特有の挿入配列が subtractive hybridization 法を用いて同定・解析されている。われわれは 23 kb の挿入配列が新型クローンに特異的であり (Chowdhury 他)、この部分には新型クローン菌株が、温度変化などに適応するために必要な能力をコードする遺伝子が含まれている (Kamruzzaman 他)ことを明らかにした。また Williamsら<sup>12,14)</sup>が報告した 16 kb の挿入配列<sup>12,14)</sup>には、

ヒストン様蛋白をコードする遺伝子が含まれており、この部分も新型クローン菌株が環境の変化に適応する能力に関与している可能性がある。これらの挿入配列のヒトに対する病原性への関与については明らかではないが、新型クローン菌株が自然環境中の変化に適応しながら生存・増殖するために有利に作用すると考えられる。特に、この特質は、菌が冷蔵・冷凍輸出入魚介類中などでも生存し、生菌が国境を越えて移動することに関与する可能性がある。これらの挿入配列は大染色体中に存在しており、GS-PCR で検出する *toxRS* オペロン(大染色体中に存在)の塩基置換と関連している。

新型クローンがどのように発生したかについて、現在2つの仮説を提唱できる。1つは、祖先菌株が、先ず大染色体に 23 kb および 16 kb の挿入配列を獲得し、後に小染色体中に pathogenicity island を含む領域を獲得した可能性である。他の仮説は、従来から存在していた病原性菌株(神奈川現象陽性株)が大染色体に 23 kb および 16 kb などの挿入配列を獲得した可能性である。この大染色体中の系統変化と連動し、それを間接的に反映しているのが、GS-PCR で検出する *toxRS* オペロン(大染色体中に存在)の塩基置換であると言える。新型クローン菌株の *tdh* 遺伝子構造(*tdh1* および *tdh2* 遺伝子を含む領域)が典型的な神奈川現象陽性株と一致することは、この説を支持する。ただし例外的に *tdh* 遺伝子が欠損している GS-PCR(+ )株(23 kb 挿入配列も保有する)が存在することを説明するには、後に *tdh* 遺伝子が脱落し、その過程で周辺の pathogenicity island を含む領域にも変化が生じたという仮定が必要である。しかし、そのような菌株が 1996 年以前に分離されていることが、この仮説を反証する。11 遺伝

子の塩基置換頻度をもとに2つの仮説のどちらが統計学的な確率が高いかを調べたが、有意な差は認められなかった。今後、後者の可能性を検証するために、新型クローン菌株および例外的に *tdh* 遺伝子が欠損している GS-PCR(+ )株について、pathogenicity island を含む領域を比較して、*tdh* 遺伝子脱落の可能性について検討する必要があると考えられる。

## 2. 新型クローン同定法の比較

現在までに報告されている新型クローンの遺伝子マーカーを標的にした PCR 法を表 2 にまとめた。これらの PCR 法を用いて系統解析に用いた 61 菌株を検査した。GS-PCR(+ )株が新型クローン菌株すべてを含む系統クラスターを形成するが、医学的見地からは、この中の *tdh* 遺伝子が欠損している例外的な菌株グループは除くほうが妥当であると考えられる(図 1)。ORF8 を検出する PCR 法は、これらの菌株のうち 4 菌株を検出できなかった。おそらく ORF8 を保有するファージの不安定性が原因であると思われる。過去に GS-PCR(+ )ながら ORF8 陰性を呈する相当数の菌株が報告されている<sup>3)</sup>。PGS-PCR 法では、新型クローン菌株を検出できたが、新型クローン以外の 3 菌株(*tdh* 遺伝子欠損 GS-PCR(+ )菌株を含めると 4 菌株)が陽性を示したので、この PCR 法では擬陽性結果が得られることが示唆された。16-kb 挿入配列を検出する PCR 法では、*tdh* 遺伝子欠損株を除く GS-PCR(+ )菌株が検出できたが、1 菌株で PCR 増幅産物のサイズが異なっており(図 1には未記入)、特異性が高いが完全ではなかった。23-kb 挿入配列を検出する PCR 法では、*tdh* 遺伝子欠損株を除く GS-PCR(+ )菌株が検出でき、*tdh* 遺伝子を欠損する 3 株中 2 株は陰性を呈した。やはり、

この PCR 法も特異性が高いが完全ではなかった。これらの例外的な非特異性は、挿入配列の可動性と関連した塩基配列の変化に起因しているのではないかと考えられる。

#### D. 結論

2 つの染色体に分散して分布する 11 の遺伝子の塩基置換に着目し、多数の菌株を解析することにより、新型クローンに属する菌株の系統関係の詳細を明らかにすることができ、新型クローン菌株を明確に定義できるようになった。その結果、新型クローンに属する菌株の一部は O:K 血清型が変化したバリエーションに変化しているという仮説を支持することができた。また新型クローン菌株のうち病原性菌株を検出するためには、GS-PCR(+)かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適していると判断された。23 kb および 16 kb 挿入配列を標的とする PCR 法もかなり有用であるが完全に特異的とは言えない。 $Mn^{2+}/Fe^{2+}$  トランスポーター遺伝子中の塩基置換や線上ファージの ORF8 はかなり特異性が低いと言える。

#### 引用文献

- 1) Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.*

35:3150-3155.

- 2) Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. DePaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585.
- 3) Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130:395-406.
- 4) Ansaruzzaman, M. M. Lucas, J. L. Deen, N. A. Bhuiyan, X. Y. Wang, A. Safa, M. Sultana, A. Chowdhury, G. B. Nair, D. A. Sack, L. von Seidlein, M. K. Puri, M. Ali, C. L. Chaignat, J. D. Clemens, and A. Barreto. 2005. Pandemic Serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African



- continent. *J. Clin. Microbiol.* 43:2559-2562.
- 5) Ansaruzzaman, M. M. Lucas, J. L. Deen, N. A. Bhuiyan, X. Y. Wang, A. Safa, M. Sultana, A. Chowdhury, G. B. Nair, D. A. Sack, L. von Seidlein, M. K. Puri, M. Ali, C. L. Chaignat, J. D. Clemens, and A. Barreto. 2005. Pandemic Serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J. Clin. Microbiol.* 43:2559-2562.
  - 6) Gonzalez-Escalona, N., V. Cachicas, C. Acevedo, M. L. Rioseco, J. A. Vergara, F. Cabello, J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11:129-131.
  - 7) Martinez-Urtaza J, L. Simental, D. Velasco, A. Depaola, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, D. Carrera-Flores, C. Rey-Alvarez, and A. Pousa. 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1319-1320.
  - 8) Quilici, M. L., A. Robert-Pillot, J. Picart, and J. M. Fournier. 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Spread, France. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1148-1149.
  - 9) Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-749.
  - 10) Iida, T., A. Hattori, K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim, and T. Honda. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis.* 7:477-478.
  - 11) Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156-2161.
  - 12) Okura, M., R. Osawa, E. Arakawa, J. Terajima, and H. Watanabe. 2005. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *J. Clin.*

- Microbiol. 43:3533-3536.
- 13) Okura M, R. Osawa, A. Iguchi, M. Takagi, E. Arakawa, J. Terajima, and H. Watanabe. 2004. PCR-based identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* with a novel group-specific primer pair. *Microbiol. Immunol.* 48:787-790.
  - 14) Williams, T. L., S. M. Musser, J. L. Nordstrom, A. DePaola, and S. R. Monday. 2004. Identification of a protein biomarker unique to the pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 42:1657-1665.
- 発表論文 (2005年)
- 1) Wong, H. C., Chen, C. H., Chung, Y. J., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Nishibuchi, M., and Lee, B. K.: Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *J. Appl. Microbiol.* 98:572-80, 2005.
  - 2) Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., Depaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., and Pousa, A.: Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1319-1320, 2005.
  - 3) Tanil, G. B., Radu, S., Nishibuchi, M., Rahim, R. A., Napis, S., Maurice, L., and Gunsalam, J. W.: Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med.* 36:940-945, 2005.
  - 4) Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I.: The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102:151-159, 2005.
  - 5) Benjamin P. G., Gunsalam, J. W., Radu, S., Napis, S., Bakar, F. A., Beon, M., Benjamin, A., Dumba, C. W., Sengol, S., Mansur, F., Jeffrey, R., Nakaguchi, Y., and Nishibuchi, M.: Factors associated with emergence and spread of cholera epidemics and its control in Sarawak, Malaysia between 1994 and 2003. *Southeast Asian Studies.* 43:109-140, 2005.

表1 系統解析に使用した腸炎ビブリオの遺伝子および検出した多型サイトの数

所在	推定遺伝子産物	決定した配列の長さ(bp)	多型サイトの数
染色体1 (=大染色体)	DnaJ-related protein	728	34
	ToxS	441	12
	ToxR	801	19
	Putative DNA pol III, epsilon subunit	647	24
	FlaL	903	23
	Integrase/recombinase XerC	802	20
	Shikimate 5-dehydrogenase	743	15
染色体2 (=小染色体)	D-lactate dehydrogenase	874	19
	D-alanine-D-alanine ligase	848	11
	Conserved hypothetical protein	571	18
	Iron(III) ABC transporter, ATP-binding protein	697	26

表2 新型クローンの遺伝子マーカーを検出するためのPCR法

検出法名 (または仮称)	標的遺伝子	所在	文献
GS-PCR	<i>toxRS</i> *	染色体1	2
ORF8	ファージ f237 ゲノムの ORF8	染色体1	3, 10, 11
PGS-PCR	Mn <sup>2+</sup> Fe <sup>2+</sup> トランスポーター様遺伝子*	染色体2	13
16-kb 挿入配列	ヒストン様蛋白(HU- $\alpha$ )遺伝子	染色体1	12, 14
23-kb 挿入配列	内膜蛋白様遺伝子	染色体1	Kamruzzaman 他

\* 置換した塩基を標的

Symbol	Country
J	Japan
B	Bangladesh
V	Vietnam
S	Singapore
L	Laos
T	Thailand
M	Malaysia
D	Maldives
I	India
A	Indonesia
H	Hong Kong

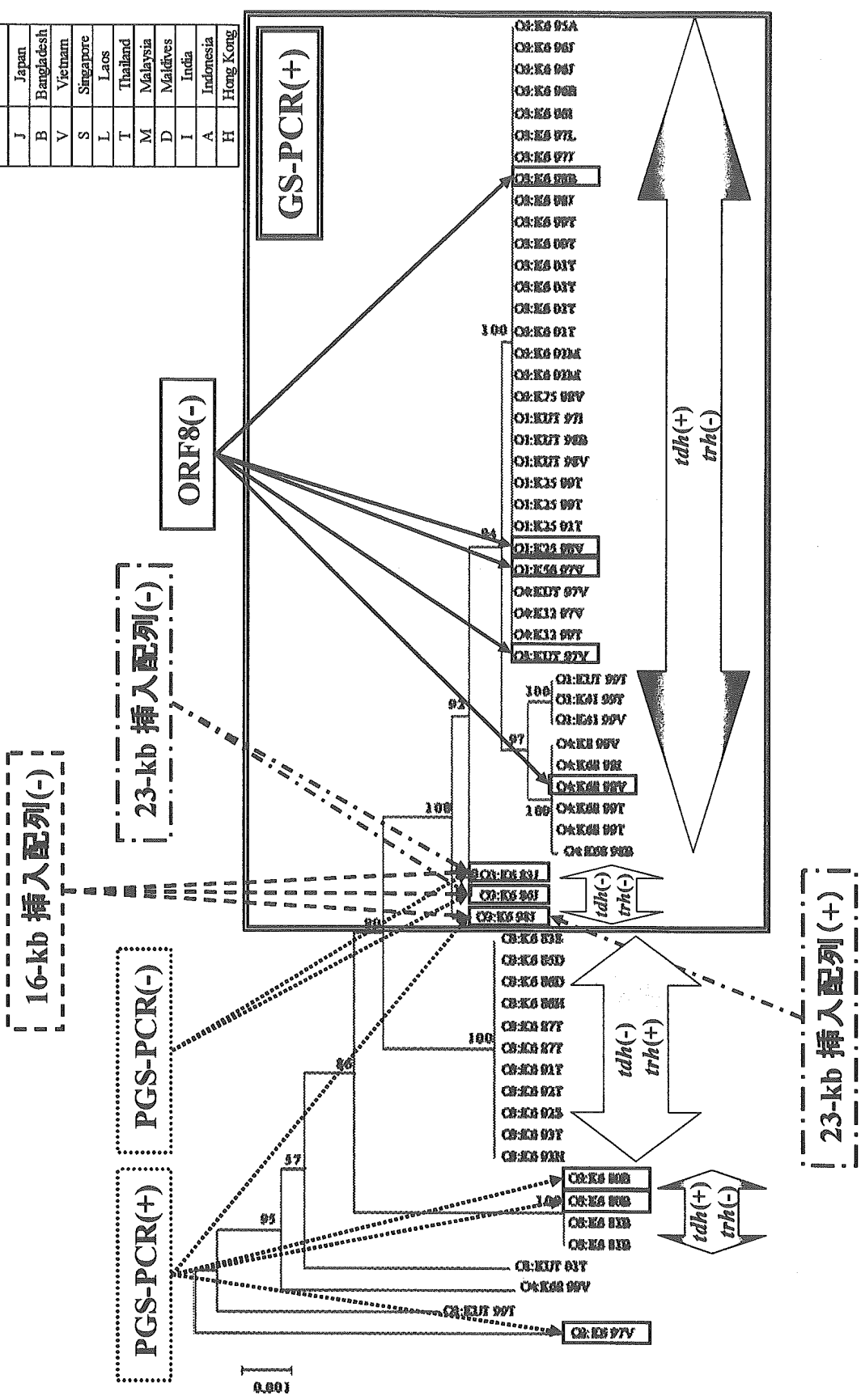


図1. 新型コロナウイルスおよび関連菌株の系統発生の関係(11遺伝子の解析結果を連結)  
および新型コロナウイルスワンゲノム検査方法を比較した結果のまとめ

**Surveillance and construction of PFGE data bases *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A, *Shigella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in China**

Xu, Jianguo

State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control

National Institute of Communicable Diseases Control and Prevention and Control,  
Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**1 ) OBJECTIVE:**

The major problem in current laboratory-based surveillance for bacterial infectious diseases in China is that each laboratory uses its own protocols for molecular typing and designations of patterns. Therefore, the results obtained by one laboratory cannot be compared with those of another laboratory, even if both laboratories have used essentially the same methods, or even if two persons in same laboratory have analyzed different isolates. . This lack of comparability has greatly diminished the power of molecular subtyping methods. It has been recognized recently that use of standardized subtyping methods would allow isolates to be compared from different parts of the country or the world, enabling recognition of nationwide or international outbreaks or biological attack, attributable to a common source of infection. Transfer of standardized molecular subtyping methodology to public health laboratories at various levels should enable timely subtyping of outbreak-causing and bio-terrorism –related isolates, when electro-transfer and on-line analysis of the data are practiced.

China is making good progress in establishing a nationwide laboratory-based surveillance system for bacterial infectious diseases. The State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control(China CDC) and National Institute of Communicable Disease Control and Prevention(China CDC), responsible for the network, is actively engaged in PFGE subtyping of following pathogens: *Vibrio*

*cholerae*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Yersinia enterocolitica*, Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*, *Leptospira* species and some other pathogens. Initially, fingerprint databases of these selected microbes will be constructed and the PulseNet standardized protocol will be adopted where applicable. In collaboration with provincial laboratories, PulseNet China hosted their first national meeting in September of 2004. Sharing of the databases is expected once the Network is established. Chinese scientists are gearing up to contribute to the tracking of not only Foodborne but also other bacterial pathogens that are important to China.

Purpose of this research is to carry out surveillance and establish national database of PFGE patterns for *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*; as well as to develop of PFGE protocol and standardization for *Leptospira species*. Three workshops will be organized to transfer these techniques to provincial CDC.

## 2 ) STUDY DESIGN:

1. **Surveillance of bacterial enteric pathogens (isolation frequency and other epidemiological information) in selected provinces of China in 2005.** In selected provinces, diarrheal patients who visited selected hospital will be sampled and attempted to isolate various enteric pathogens, including *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A, *Shigella* spp. *Yersinia enterocolitica* and other bacteria pathogens. In same time, clinical, epidemiological information associated with patients will be collected and analyzed. Therefore, the isolation frequencies of various enteric pathogens in rural areas will be obtained.
2. **Construction of PFGE Data Base for *Vibrio cholerae*, *Shigella species*, *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A, and *Yersinia enterocolitica*.** Strains isolated from various year, various geographic origins and various sources will be included in this study. At end of this project, at least 1000,

500, 500 and 300 isolates of *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* and *paratyphi A*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* will be analyzed, which include our strains collection isolated in various time and various geographic locations in China.

3. **Development of PFGE protocol and standardization for *Leptospira species*.** In collaboration with DR.Watanabe, we have analyzed PFGE patterns of 117 isolates of Leptospires, including reference strains and field strains isolated in China. In this project, we will continue collaboration with DR.Watanabe to develop and standardize the PFGE protocol for *Leptospira*.
4. **Workshop for PFGE protocol training of *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae*.** Scientists from provincial CDC of China will be trained for standardized PFGE protocols. The proposed provinces include Jiangsu, Henan, Shandong, Anhui, Guandong. Required equipment systems for PFGE analysis has been established in those provincial CDC.
5. **Quality control and assessment among the labs in the network.** A standard assessment system will be established for evaluation of the work in the selected provincial labs. The definite indexes used for the assessment will be fixed to develop standard procedure and protocols, to evaluate team structure and skill of the lab staff, quality of the PFGE images, and data process capacity of the labs.

### 3 ) Progress:

#### 1. Vibrio cholerae

- ◇ The different protocols of electrophoresis parameters for *V. cholerae* PFGE were compared, and found that the protocol obtained from CDC Atlanta is the best in discriminatory power. This protocol was used in the *V. cholerae* isolates analysis. Up to now 380 strains of Serogroup O1 (312 strains) and O139 (68 strains) were analyzed.

The database has been constructed, including the epidemiological information, toxin gene *ctxAB* detection and PFGE patterns.

This protocol was used in the investigation of El Tor cholera epidemic in Fujian Province in August, 2005. Forty-two strains were analyzed, including 31 patient strains and 11 water isolates from the river. Four different patterns were obtained, while 37 strains were identical (including 10 water isolates), 3 strains (including 1 isolate from river) belongs to the second pattern. For the other 2 patterns there's one strain in each pattern. The similarity of these 4 strains is more than 97%. The positive rate of isolation in water samples was 19.4% (in 36 water samples), while in seafood samples it's zero, only some non-toxigenic strains of *V. cholerae* were obtained. Because the water samples were collected after the epidemic appeared, so the role of contaminated water in epidemic appearance cannot be affirmed, but it may be used to assess the risk of environment. More strains analysis and database construction are continued.

2. *Salmonella typhi* and *paratyphi* A We started the database construction in *S. typhi* and *paratyphi* A. Two hundred and thirty-nine strains in total from 1998 were run with PFGE, including 113 strains of *S. typhi* and 126 strains of *S. paratyphi* A from 5 provinces with higher typhoid fever incidence. With the obtained PFGE bands we found that the patterns of *S. typhi* were much multiple, while for *S. paratyphi* A, three dominant patterns exist with the similarity coefficient of 96.3%. The database is under construction.
3. *Shigella* species Surveillance was conducted in diarrhea patients in ten provinces. In total of 5684 stool specimens collected, 1092 strains isolated, of which 792 were identified as *S. flexneri*. PFGE analysis of the isolates are in progress.
4. *Development of PFGE protocol and standardization for Leptospira*



*species* Detailed PFGE protocol for *Leptospira* species has been tested, and established. The construction of database will be accomplished in 2006. Over 40 strains of *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae were isolated from Apodemus agrarius. Other strains are in progress of identification.

5. *Yersinia enterocolitica* Surveillance was conducted in diarrhea patients and food samples in three provinces. Data showed that, in general, only around 1% samples from diarrhea patients tested positive for *Y. enterocolitica*. Most of the strains were isolated from Henan Provinces. Strains from other sources are still in progress of identification.

Table. Strain of *Y. enterocolitica* isolated from Diarrheal patients and food samples

Sources	Henan		Anhui		Jianhgsu	
	<u>Specimens</u> s tested	Strains isolated	<u>Specimens</u> tested	Strains isolated	<u>Specimens</u> s tested	Strains isolated
Diarrhea patient	261	4	431	2	400	0
Food	124	2	218	0	396	2

6. *E. coli* O157:H7 Surveillance was conducted in diarrhea patients in four provinces, where outbreak and diarrhea patients have been diagnosed. However, In total of 1763 stool specimens collected from diarrhea patients, no strain was identified. However, strains with virulence genes were isolated from few food samples and some animals.
7. Workshop. Technicians from 5 provincial were trained in the operation of PFGE for *V. cholerae*, *S. typhi* and paratyphi A in National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, China CDC.

**STUDY TITLE:** Organization of PFGE Workshop for Training and  
Technology transfer for Asia Pacific  
countries/ areas in February 2006

**STUDY FACILITY:**

(Name and  
address of  
institute)

Public Health Laboratory Centre, 7/F,  
382 Nam Cheong Street, Shek Kip Mei,  
Kowloon, Hong Kong.

**STUDY DIRECTOR:**

(name of the  
research director)

Dr. Kai Man KAM, M.D.

**Project leader:**

Haruo Watanabe, M.D. Ph.D.  
Deputy Director-General  
National Institute of Infectious Diseases  
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku  
Tokyo 162-8640, Japan

:

Date: February 20, 2006.

**Summary** : A Training and technology transfer Workshop was organized to enhance the laboratory capacity of countries/ areas in Asia Pacific in performing Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) in February 2006. Ten key laboratory personnel from 5 countries in Asia Pacific region were trained in PFGE technology using standardized protocol. After training, they were able to build up their capacities in their own country/ area. In addition, a network of trainer and trainees was established through the Workshop so that participants shared experiences in PFGE laboratory work, and then can work together in partnership during outbreak investigations.

2 ) **STUDY DESIGN:**

- (1) Organization of Workshop in the Public Health Laboratory Centre in Hong Kong for training of laboratory personnel in the Asia Pacific Region in February 7- 10, 2006.
- (2) Co-organizers were: NIID, Japan; CDC, USA.
- (3) The Public Health Laboratory Centre in Hong Kong was responsible for the use of fund monies of 2,000,000 yen in the overall organization of the Workshop.
- (4) The Workshop took place in the Public Health Laboratory Centre in Hong Kong.
- (5) The Workshop lasted 4 days and covered the basics of setting up of PFGE laboratory, requisite laboratory technique, common problems, and quality control issues.

3 ) **RESULTS :**

- (1) Participants of the Workshop had hands-on wet lab experience of performing PFGE's. (listed Appendix I)
- (2) PFGE Data input and analysis were also covered in the Workshop. (Schedule in Appendix II)
- (3) Key trainers from advanced institutions (including NIID and CDC, USA) were invited to participate in the Workshop.
- (4) Evaluation of the Laboratory Workshop by participants were done to gather experience for future work in the Asia Pacific Region. (Appendix III)
- (5) A report was generated after the Workshop.