

第23回 日本性感染症学会 福岡、2010
12月

セファロスポリン耐性淋菌の出現とその分
子機構：大西 真
京滋性感染症研究会 京都、2010 12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国内の薬剤耐性淋菌の現状

図 1

- ペニシリンG耐性 90%以上
- テトラサイクリン耐性 80%以上
- ニューキノロン耐性 80%以上
- 第3世代経口セファロスポリン耐性 30~50%

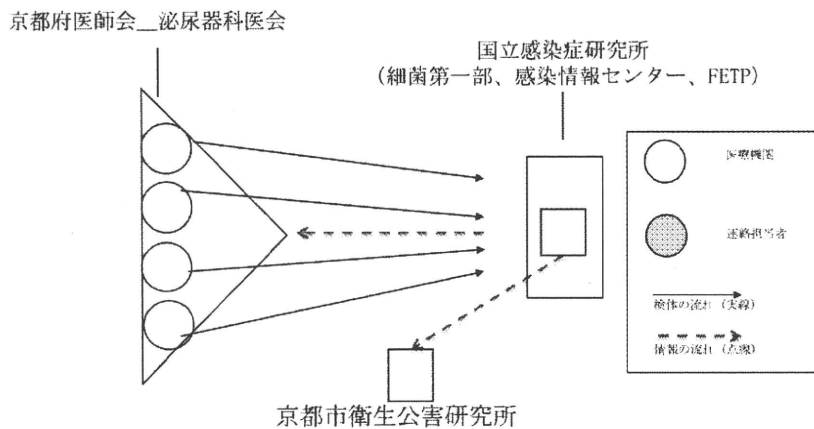
〔淋菌性尿道炎および淋菌性子宮頸管炎〕

セフトリアキソン (CTRX:ロセフィン)
 静注 1.0g 単回投与
 セフォジジム (CDZM:ケニセフ、ノイセフ)
 静注 1.0g 単回投与
 スペクチノマイシン (SPCM:トロピシン)
 筋注 2.0g 単回投与



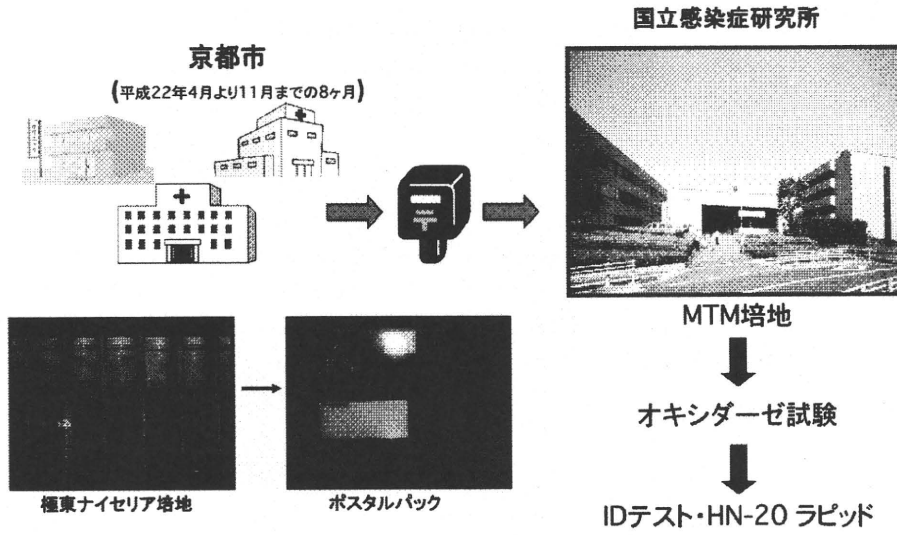
京都市薬剤耐性淋菌 強化サーベイランス

図 2



京都市薬剤耐性淋菌 強化サーベイランス—検体の流れ—

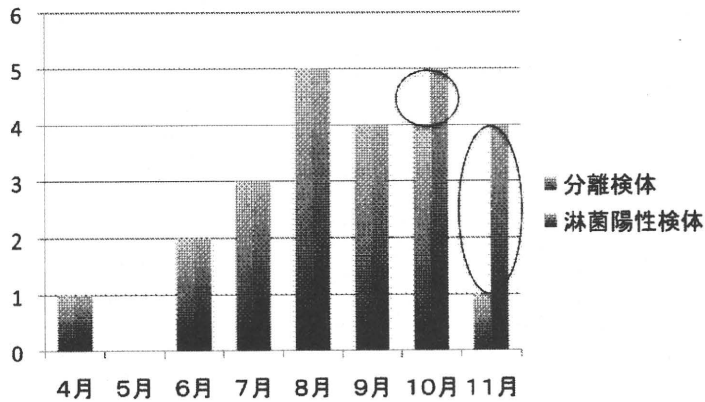
図 3



10月以降の分離率の低下

図 4

- ・淋菌の生育は35～37℃が至適温度とされている。
- ・気温の低下によって郵送中の淋菌の生存にに影響？



in vitroにおける淋菌の保存試験

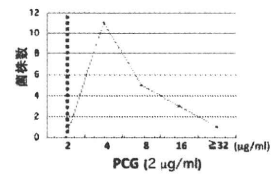
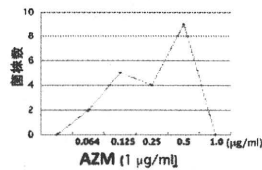
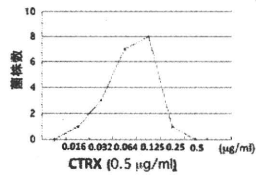
図 5

使用器材	保存温度	保存日数 (days)		
		1	2	3
シードスワブ g2号栄研	4°C	○	○	○
	15°C	○	○	○
	30°C	○	X	X
	37°C	X	X	X
極東ナイセリ ア培地	15°C	X	X	X
	30°C	○	○	○
	37°C	○	○	○

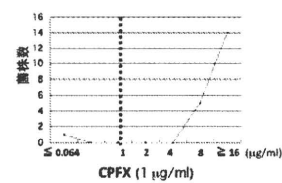
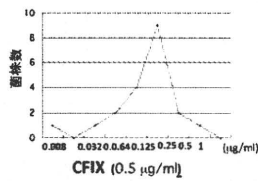
ナイセリア培地は30°C-37°C、シードスワブは4°C-15°Cの保存に適していた。

薬剤感受性試験結果

図 6



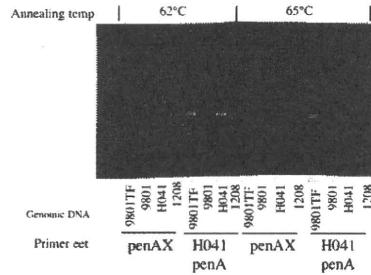
CTRX及びAZMは全株が感受性株であった。
CFIXに対しては、耐性株、低感受性株および感受性株がそれぞれ15%、45%および40%であった。一方、PCGは20株すべてが耐性であった。CPFXは1株を除いてすべて耐性であった。20株中1株は、β-ラクタマーゼ産生株であった (bla type; TEM-1)。



Break point:

セフトリアキソン耐性遺伝子の検出法

図 7



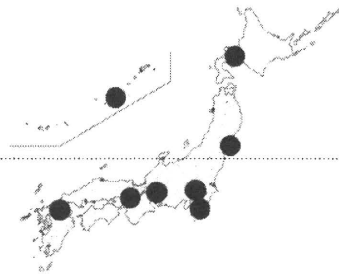
*9801TFは9801をH041 penA PCR productで形質転換して得られた株

GISP PROJECT (JAPAN)

図 8

GONOCOCCAL ISOLATE SURVEILLANCE PROGRAM, JAPAN

- 淋菌分離株サーベイランスシステム (試行) 2010-2011
 - 定点病原体サーベイランス
 - 薬剤感受性試験
 - 分子タイピング
- 薬剤耐性淋菌のモニタリング
- どのような菌株が蔓延しているのかを明らかにする。
 - 国内地域間の相違
 - 年次推移
 - 海外分離株との比較 (輸入・輸出)



基本: 各診療施設のルーティーン検査会社への外注で行われる菌株分離の利用

- 定点の設定(8地域, 毎月24株/1地域(2~4 クリニック), 3ヶ月)。
- 菌株分離および薬剤感受性試験の標準化とセンター設置。
- サーベイランス情報の効果的なフィードバック戦略の構築。

結 論

1. 世界的に淋菌に薬剤耐性は広がっている。これは効果的な治療と疾病制御の効果を低下させている。 ペニシリン、テトラサイクリン、キノロン耐性率が高くなっていることはこれまでも長期に渡り報告されており、これらの薬剤は今や世界の大多数の国では淋菌感染症の治療薬として推奨されていない。スペクチノマイシンやより新しい薬剤のアジスロマイシンへの耐性も出現している。淋菌では、薬剤耐性菌の出現は極めて急速な耐性拡散につながる。抗生物質への無制限なアクセス、不適切な薬剤の選択、抗生物質の乱用、薬剤の低品質などの要因は菌側の変異と並んで、耐性菌出現させる原因となる。
2. セファロスポリンでの治療失敗例、感受性低下の報告が増えている。 セファロスポリンは現状では淋菌感染症治療のラストライン薬剤であり、これによって淋菌感染症が治療不可能になる可能性が危惧される。
3. 薬剤耐性(AMR)サーベイランスは治療指針を最良にするとともに耐性菌出現を検出する上で不可欠である。 大多数の先進国は AMR サーベイランスシステムを確立している (日本は未確立)。しかし、多くの国、特に蔓延率の高い国での AMR データが不足している。しかも、AMR データは国間で比較できない場合もあり、また validity に疑問が有ることも多い。これらは耐性菌出現の早期検出の妨げとなっている。
4. 地域ネットワーク内での参画するラボでの AMR サーベイランスデータの comparability と validity を担保するためのサポート協力体制が必要である。 これには Quality control と Quality assurance を確立すること、AMR モニタリングのためのキャパシティを確保すること、などが上げられる。
5. 核酸検査の普及により、培養による淋菌の生菌検出機会が減り、生菌による AMR モニタリングを行うキャパシティも減少していることから、今後、代表的な淋菌菌株が十分な数は収集できなくなることが危惧される。
6. 診断において、核酸検査は急速に生菌検出法に取って変わりつつある。

AMR サーベイランスにも分子生物学的手法を使う試みもあるが、このためには、遺伝子あるいは遺伝子断片と MIC との関連や、種々の感染部位での治療結果との関係性について情報が今後集積されていくことが前提である。さらに新しい分子生物学的手法は開発されるまでは、現在の生菌を使った AMR サーベイランスは必須である。

7. 現在の AMR サーベイランスは薬剤耐性菌の現状のスナップショットを提供するに過ぎず、セファロスポリン治療失敗例を検知するなどの薬剤耐性菌新規出現の早期警告システムにはなっていない。従って、“治療失敗例” “とされる” ケースのモニタリング、記録、解析が必要である。

8. 現在、in vivo (clinical)と in vivo (MIC)でのセファロスポリン低感受性の報告が信頼に足るものかの判断が困難であることが多い。EQAS など標準法への準拠がなされていないなどの要因で MIC は大きく違ってしまう。このような場合、決定プロセスでのパラメーターが明確でなかったりする。現在は明確な治療失敗例により裏付けられ、MIC breakpoint と対応する形での『セファロスポリン耐性淋菌』は見つかっていない（2010年4月現在）。

9. 現在、AMR サーベイランスデータをより良く対応に結びつけるための組織、メカニズムが十分ではない。

推 奨

1. Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (GASP)を継続強化する。このため地域ネットワークをサポートし、AMR へのラボの参加を拡充する。

2. AMR データの comparability と validity を担保するため、EQAS に準拠した形での感受性試験の方法の標準化、と、感受性/耐性を決定する判定法の標準化を行う。後者に関しては定期的にレビューとアップデートがされている Universal panel of WHO reference panels を基準にする。

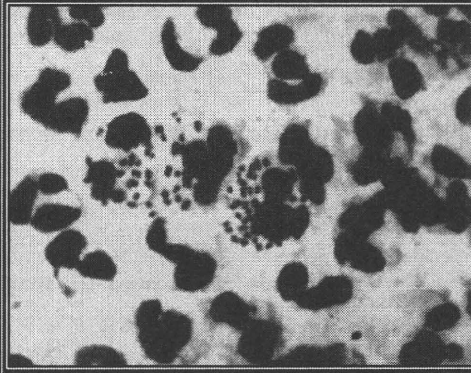
3. セファロスポリン耐性淋菌の出現危機へ対応するため行動プランを作製する。これには

- a. 様々な地域での薬剤耐性状況をレビューする。
- b. Global と regional、両方の薬剤耐性淋菌の分布把握 (Mapping) を確立する。
- c. さしせまっているセファロスポリン耐性及び多剤耐性の出現の早期警告システムの確立。早期警告者の適切な選定、認定。WHO はデータ、菌株、の共有化を促進し、WEB-BASE の治療失敗例報告システムを確立、維持すべきである。
- d. 治療失敗例の体系的モニタリングのため、治療失敗例のケースデフィニッションの基準の作製とモニタリングのプロトコル作製
- e. 治療失敗例の検出のためアウトブレイクレスポンスを確立する。
- f. 薬剤耐性淋菌データとリンクさせた疫学データを収集する。
- g. セファロスポリン耐性淋菌に対する危機感を公的及び民間の医療、ラボ関係者に認識していただく (Increasing Awareness)。
- h. 感受性試験、培養による淋菌検出を行うためのラボ機能の強化。
- i. 効果的な代替治療法の開発

4. 淋菌感染制圧の努力、薬剤の合理的使用

5. 国、地域、及びグローバルレベルでの AMR サーベランスへのサポート。

6. WHO はグローバル GASP のコーディネーションと協力とともに AMR サーベランスのため必要な物品のバルク購入を支援すべき。



GASP

Newsletter

A Newsletter on WHO Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme South-East Asia Region

Report on WHO/CDC Consultation from 7th to 9th April in Manila

A joint WHO/CDC international consultation on "Strategic response to the threat of untreatable *Neisseria gonorrhoeae* and emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*" was organized at the WHO Regional Office for the Western Pacific (WPRO) from 7th to 9th April 2010 in Manila, Philippines with the following objectives:

- To share country and agency experiences of monitoring emergence of antimicrobial resistance (AMR) and elaborate plans for a response to the threat of untreatable gonococcal infections, including an early warning system to detect emergence of cephalosporin resistant *N. gonorrhoeae*.
- To assess the implications of resistance for treatment of gonococcal infections.
- To finalize the programme for the WHO/CDC

symposium at the 16th International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Asia Pacific Conference (Bali, 4-6 May 2010).

The consultation was attended by 28 participants. Microbiologists, international experts in AMR surveillance and STI programme managers from Australia, Bhutan, Brazil, Canada, China, England, Fiji, Hong Kong (China), India, Japan, Morocco, the Philippines, South Africa, Sri Lanka, Sweden and Thailand attended as temporary advisers. Secretariat comprised staff from the United States Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta, Georgia, WHO Headquarters from Geneva and from the Regional Office for Africa, Europe and the Western Pacific.

Contents

Report on WHO/CDC Consultation on "Strategic response to the threat of untreatable <i>Neisseria gonorrhoeae</i> and the emergence of cephalosporin resistance in <i>N. gonorrhoeae</i> " from 7 th to 9 th April, 2010 in Manila, The Philippines	1
- Summary of the report	
- Conclusions	
- Recommendations	
Highlights from 16 th IUSTI Asia-Pacific Conference from 4 th to 6 th May, 2010 in Bali, Indonesia	4
- Contents in brief	
- WHO/CDC symposium on "Strategic response to the threat of untreatable <i>Neisseria gonorrhoeae</i> and the emergence of cephalosporin resistance in <i>N. gonorrhoeae</i> ", including reports of the outcome of the WHO/CDC consultation mentioned above	
WHO GASP SEAR External Quality Assurance Scheme (EQAS) 2009	5
- Analysis of EQAS results	
- Feedback of test results	
Report on Training Workshop in the WHO GASP SEAR from 21 st June to 10 th July 2010 in Delhi, India	5
Interesting Abstracts	6
Recent Research Articles	7
Forthcoming Scientific Events	8

The consultation proceedings included presentations, group work and plenary sessions for open discussions. Technical updates were provided and country and regional experiences were shared. Through group work, regional and country partners generated views on strengthening the AMR monitoring and an action to respond to the threat of multidrug-resistant *N. gonorrhoeae*. Implications of AMR in gonorrhoea were also discussed including programmatic responses, global mapping and early warning systems. Data validity and comparability of AMR monitoring along with molecular methods for monitoring and detecting antimicrobial resistance were discussed.

Conclusions

1. Globally, AMR in *N. gonorrhoeae* is increasing in prevalence, which compromises effective treatment and disease control efforts. High rates of penicillin, tetracycline, and quinolone resistance have long been documented and these antimicrobials are currently not recommended for gonorrhoea treatment in majority of countries in the world. Antimicrobial resistance to spectinomycin and to newer antibiotics such as azithromycin have also emerged. Emergence of different forms of resistance in *N. gonorrhoeae* is often followed by a rapid spread. Unrestricted access to antimicrobials, inappropriate selection and overuse of antibiotics, and suboptimal quality of antibiotics, as well as inherent genetic mutations within the organism contribute to the development of resistance.
2. There are increasing reports of clinical treatment failures and decreased susceptibility to cephalosporins, the last line treatment for gonorrhoea raising concerns that gonorrhoea may become untreatable.
3. AMR surveillance is essential to optimize treatment recommendations and detect emerging antimicrobial resistance. The majority of developed countries have established AMR surveillance systems. However, there is a lack of AMR data in many countries especially those of high burden rates. In addition, AMR data are not comparable across countries and these have questionable validity, which compromise the early detection of emerging resistance.
4. A collaborative mechanism through regional networks of laboratories is essential to provide support to the participating laboratories to ensure comparability and validity of AMR data, to establish quality control and quality assurance and to build capacity for AMR monitoring, including use of gonococcal culture method.
5. There is growing concern about obtaining sufficient numbers of viable and representative gonococcal isolates due to diminishing practice to culture *N. gonorrhoeae* and the capacity to conduct

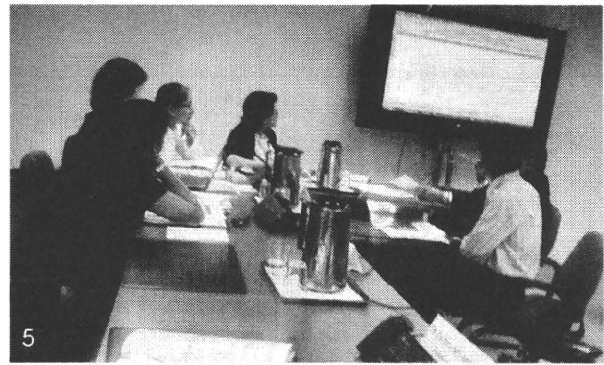
antimicrobial susceptibility monitoring as a result of either the use of syndromic case management approach or shift to non-culture tests including nucleic acid amplification tests (NAATs).

6. NAATs are rapidly replacing culture in the diagnosis of gonorrhoea. Current molecular methods are being explored for use in AMR surveillance. However, more knowledge and correlates between genetic mechanisms, minimum inhibitory concentrations (MICs) and treatment outcomes in different sites are needed. To date, culture and phenotypic antimicrobial susceptibility testing still remain essential until newer molecular methods are developed for monitoring and detecting AMR.
7. Current AMR surveillance provides a snapshot of the AMR situation, but does not provide an early warning system for emergence of AMR and does not tackle the issue of detecting cephalosporin treatment failures. Monitoring, recording and analysing cases of treatment failures are, therefore, necessary.
8. There are currently difficulties with reliable in-vivo (clinical) and in-vitro (MICs) detection and reporting of cephalosporin decreased susceptibility of *N. gonorrhoeae*. There are variations in the interpretative values of MICs due to poor standardization of methods and External Quality Assurance Scheme (EQAS). There is lack of clarity on the parameters for their determination. To date there are no strains "resistant" to cephalosporins that correlate MIC breakpoints with clinical failure to support the definition of cephalosporin resistance.
9. There are insufficient mechanisms to better link AMR surveillance data to action.

Recommendations

1. Continue to strengthen and expand the global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (GASP) by supporting regional networks and expanding participation of laboratories in the AMR surveillance.
2. Ensure comparability and validity of AMR data through standardizing methods for antimicrobial susceptibility testing, and ensure adequate EQAS and quality control, standardizing interpretation for determining susceptibility and resistance to antimicrobials based on the universal panel of WHO reference panels (WHO reference strains; Unemo, *et al. J Antimicrob Chemother.* 2009) which are constantly reviewed and updated.
3. Respond to the threat of emerging cephalosporin resistance by developing a plan to include:
 - a. Review the AMR situation in different regions.
 - b. Establish global and regional mapping of AMR.

- c. Establish an early warning system to contain and mitigate the impending emergence of cephalosporin resistance, including multi-drug resistance. Identify early warning indicators. WHO should facilitate the sharing of data and strains, and establish and maintain a web-based system of posting treatment failure data.
- d. Systematically monitor treatment failures by developing standard case definition of treatment failure and protocols for monitoring.



1. WHO/CDC Consultation on "Strategic response to the threat of untreatable *N. gonorrhoeae* and emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*" in Manila, The Philippines
2. Participants during a scientific session
3. Participants from North American and European regions during group work
4. Participants from Western Pacific region during group work
5. Participants from South East Asia region during group work
6. Participants from African, Eastern Mediterranean and Latin American regions during group work

- e. Establish an outbreak response to detect and investigate treatment failures.
 - f. Collect essential epidemiological data linked with AMR data.
 - g. Increase awareness of clinicians and laboratory staff both in the public and private health sectors about the threat of cephalosporin resistant gonorrhoea.
 - h. Strengthen laboratory capacity to perform antimicrobial susceptibility testing, including culture methods for detecting *N. gonorrhoeae*.
 - i. Identify alternative effective treatment regimen for gonorrhoea.
4. Enhance efforts to sustain gonorrhoea control and integrate efforts for rationale drug use.
 5. Advocate continued support for AMR surveillance at national, regional and global levels.
 6. WHO should support the coordination and collaboration of the global GASP and support the bulk purchase of laboratory supplies for AMR.

Francis J Ndowa, Coordinator, Controlling Sexually Transmitted and Reproductive Tract Infections (STI), Department of Reproductive Health and Research (RHR), World Health Organization Headquarters (HQ), Geneva, Switzerland.

Highlights from 16th IUSTI Asia-Pacific Conference from 4th to 6th May, 2010 in Bali, Indonesia

The 16th International Union Against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Asia-Pacific Conference was held from 4th to 6th May, 2010 in Bali, Indonesia. There were 7 plenary talks, 9 symposia, 4 workshops and 3 free paper sessions and the conference was attended by 700 delegates. The opening plenary lecture was delivered by Francis J Ndowa (WHO HQ, Switzerland) on 'Global strategy in STI prevention: focus on developing countries' and the Closing Lecture by the IUSTI President King Holmes on 'Prevention of STI and HIV Infection: Current Concepts and Results of a Community-Randomized Trial'. A wide range of topics covering all the aspects of STIs were tackled in following different symposia and workshops:

- Reproductive tract infections
- Advances in STI diagnostics
- The impact of periodic presumptive treatment (ppt) interventions
- Subregional perspective on STIs
- Update on bacterial STIs in Asia Pacific

- The potential impact on HPV vaccination
- STIs in HIV
- Management of viral STIs
- STIs in adolescent
- An interactive workshop in the management of STIs
- STI counselling
- An interactive workshop in the management of HIV

Most important, there was also a **WHO/CDC symposium on "Strategic response to the threat of untreatable *Neisseria gonorrhoeae* and the emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*".** Among other lectures, the outcome (global strategic response plan) of the WHO/CDC consultation in Manila (see above) with experts from all over the world was reported in this symposium. It was chaired by Dr. Ronald Ballard (CDC, USA), Dr Francis J Ndowa, and Dr. Jusuf Barakbah (local co-chairperson, Indonesia), and consisted of five talks. Firstly, Dr. Francis J Ndowa gave an overview titled "Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: A global perspective", which was followed by Ms. Athena Limnios (WHO Collaborating Centre in Sydney [WHO CC, Sydney], Australia) presenting "Multi-drug resistant *N. gonorrhoeae* in the Western Pacific and South-East Asia Regions", which included data from the most important regions in regards to emergence of antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*. These talks were followed by a "Points for clarification" session, where the presented data were discussed and the audience could ask questions. The second session of the symposium was initiated by a talk titled "Basic microbiology and mechanisms of resistance in *Neisseria gonorrhoeae*" presented by Dr. Magnus Unemo, WHO Collaborator (National Reference Laboratory, Sweden), followed by "Strategic plan to respond to antimicrobial resistance & emergence of cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*" presented by Dr. Ye Tun (CDC, USA), and finally Manjula Lusti-Narasimhan (WHO HQ, Switzerland) described "Opportunities for funding priority interventions for sexual and reproductive health (SRH), including STIs". The symposium was concluded by a Round Table Discussion (facilitated by Dr. Ronald Ballard, and including all the speakers) regarding epidemiological, clinical & programmatic implications and responses to antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*. The presented public health response and action plan (including sustainable clinical, microbiological as well as epidemiological components), which also soon will be published, will be valuable in order to delay the spread of resistance to extended-spectrum cephalosporins in *N. gonorrhoeae*.

Magnus Unemo, WHO Collaborator, National Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden.

WHO GASP SEAR EQAS 2009

WHO GASP South-East Asia Region (SEAR)-Regional Reference Laboratory (RRL) at Regional STD Teaching, Training & Research Centre, Safdarjang Hospital, New Delhi received eight lyophilized QA strains namely, 09QA1-8 and low concentration antibiotic discs from the WHO CC, Sydney, Australia. The laboratories in Sri Lanka and Bhutan received these strains directly from WHO CC, Sydney. RRL revived all the strains and sent these to five focal point laboratories in India along with the following materials:

1. WHO 2008 *N. gonorrhoeae* reference strains G, K and P, for QA and quality control (QC).
2. Low concentration antibiotic discs for performance of Calibrated Dichotomous Susceptibility (CDS) disc diffusion method: penicillin G (0.5 IU), spectinomycin (100 µg), tetracycline (10 µg), ciprofloxacin (1 µg), ceftriaxone (0.5 µg), nalidixic acid (30 µg), and cefpodoxime (10 µg).
3. Nitrocefin discs.
4. Media and reagents depending on the requirement of laboratories.
5. Result recording sheet for QA and QC strains.

Analysis of EQAS results

All the results were analyzed at RRL, New Delhi after receiving the antimicrobial susceptibility results of the QA strains from the focal point laboratories in India, Bhutan, Sri Lanka and the expected results from WHO CC, Sydney. CDS method for disc diffusion technique was used by all the laboratories for antimicrobial susceptibility testing. Only two laboratories performed MIC testing using Etest method in addition to CDS technique. Therefore, only results using CDS method were considered for analysis. Out of 433 disc testings carried out for the above seven antibiotics, 397 (91.7%) were in agreement with the expected results. Results for spectinomycin were 100% correct. Error rate for the six other antibiotics (penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, nalidixic acid, ceftriaxone, cefpodoxime) varied from 4.8% to 12.9%.

Feedback of test results

Results of all the laboratories tabulated in eight tables, in coded form, were sent to each laboratory so that they could compare their performance with other laboratories. The results were also communicated to the WHO CC, Sydney.

Manju Bala, Coordinator, WHO GASP SEAR Regional Reference Laboratory, VMMC & Safdarjang Hospital, New Delhi, India.



1. Laboratory Technicians from Bhutan during practical & demonstration session

2. Hands-on-Training session for GASP techniques

Report on Training Workshop in the WHO GASP SEAR from 21st June to 10th July 2010 in Delhi, India

A training workshop on standard laboratory methods for isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* for four laboratory technicians from Bhutan was held in the WHO GASP SEAR-RRL at Regional STD Teaching, Training & Research Centre, Safdarjang Hospital, New Delhi from 21st June to 10th July 2010. Dr. Leki Dorji, Head of the focal point laboratory in Bhutan nominated these technicians from four different hospitals. There were lectures followed by demonstration and practical sessions on the laboratory techniques of GASP and Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) by the CDS, Etest and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) techniques, followed by hands-on training on the different procedures. Special emphasis was given to internal quality control; external quality assurance scheme; preservation of reference strains and isolates and their revival. The participants were also trained

in laboratory techniques for diagnosis of other ulcerative and non-ulcerative sexually transmitted infections (STIs). They were also sent to Dr. Seema Sood's laboratory at AIIMS to attend demonstration on molecular methods for diagnosis of *N. gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. Electronic and hard copy of the relevant documents and some technical material was provided to the participants after the workshop.

Manju Bala, Coordinator, WHO GASP SEAR Regional Reference Laboratory, VMMC & Safdarjung Hospital, New Delhi, India.

Interesting Abstracts

Cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*.

Bala M, Sood S. *J Global Infectious Diseases* 2010; 2: 284-90.

One of the recent review articles on antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* that includes discussions regarding several important topics:

- Magnitude of antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*
- Current treatment guidelines for gonorrhoea
- Emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*
- Problem of multi-drug resistant *N. gonorrhoeae*
- Mechanism of resistance to cephalosporins and other antimicrobials
- Future options in treatment of *N. gonorrhoeae* infections

Abstract:

Gonorrhoea, a disease of public health importance, not only leads to high incidence of acute infections and complications but also plays a major role in facilitating human immunodeficiency virus (HIV) acquisition and transmission. One of the major public health needs for gonorrhoea control is appropriate, effective treatment. However, treatment options for gonorrhoea are diminishing as *N. gonorrhoeae* have developed resistance to several antimicrobial drugs such as sulfonamides, penicillin, tetracyclines and quinolones. Antimicrobial resistance (AMR) surveillance of *N. gonorrhoeae* helps establish and maintain the efficacy of standard treatment regimens. AMR surveillance should be continuous to reveal the emergence of new resistant strains, monitor the changing patterns of resistance, and be able to update treatment recommendations so as to assist in disease control. Current treatment guidelines recommend the use of single dose injectable or oral cephalosporins. The emergence and spread of cephalosporin resistant and multi-drug resistant *N. gonorrhoeae* strains,

represents a worrying trend that requires monitoring and investigation. Routine clinical laboratories need to be vigilant for the detection of such strains so that strategies for control and prevention could be reviewed and revised from time to time. It will be important to elucidate the genetic mechanisms responsible for decreased susceptibility and future resistance. There is also an urgent need for research of safe, alternative anti-gonococcal compounds that can be administered orally and have effective potency, allowing high therapeutic efficacy (greater than 95.0% cure rate).

Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations.

Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. *Biochemistry* 2010; 49: 8062-7.

Abstract:

Mutations in penicillin-binding protein 2 (PBP 2) encoded by mosaic *penA* alleles are crucial for intermediate resistance to the expanded-spectrum cephalosporins ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. Three of the ~60 mutations present in mosaic alleles of *penA*, G545S, I312M, and V316T, have been reported to be responsible for increased resistance, especially to cefixime [Takahata, S., *et al.* (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3638-3645]. However, we observed that the minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, ceftriaxone, and cefixime for a wild-type strain (FA19) containing a *penA* gene with these three mutations increased only 1.5-, 1.5-, and 3.5-fold, respectively. In contrast, when these three mutations in a mosaic *penA* allele (*penA35*) were reverted back to the wild type and the gene was transformed into FA19, the MICs of the three antibiotics were reduced to near wild-type levels. Thus, these three mutations display epistasis, in that their capacity to increase resistance to β -lactam antibiotics is dependent on the presence of other mutations in the mosaic alleles. We also identified an additional mutation, N512Y, that contributes to the decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. Finally, we investigated the effects of a mutation (A501V) currently found only in nonmosaic *penA* alleles on decreased susceptibility to ceftriaxone and cefixime, with the expectation that this mutation may arise in mosaic alleles. Transfer of the mosaic *penA35* allele containing an A501V mutation to FA6140, a chromosomally mediated penicillin-resistant isolate, increased the MICs of ceftriaxone (0.4 μ g/mL) and cefixime (1.2 μ g/mL) to levels above their respective break points. The proposed structural mechanisms of these mutations are discussed in light of the recently published structure of PBP 2.

Diagnostic implications of 16S ribosomal assay for gonorrhoea.

Verma R, Sood S, Bala M, Kapil A, Das BK, Sharma VK, Samantaray JC. *Sex Transm Infect* 2010 Jun 11. [Epub ahead of print]

Abstract:

Objectives: In the absence of a single nucleic acid amplification test (NAAT) that is both highly specific and sensitive for gonorrhoea, many have put forward the 16S-based assay as a confirmatory test for *Neisseria gonorrhoeae*. This study was undertaken to evaluate the performance of PCR based on 16S ribosomal gene in comparison with a *porA* pseudogene-based assay.

Methods: The specificity of both the *porA* pseudogene-based PCR and 16S ribosomal gene PCR was checked against a panel of strains comprising of non *N. gonorrhoeae* *Neisseria* sp (NgNS) and other gram-negative and gram-positive bacteria. The sensitivity studies were performed using different dilutions of *N. gonorrhoeae* DNA. PCRs were also done on endocervical and urethral swab samples collected from a total of 100 female and 50 male patients presenting to sexually transmitted disease clinics, Dermatology OPD of AIIMS and Safdarjang Hospital, New Delhi, India, recruited as per inclusion criteria.

Results: PCR assay based on 16S ribosomal gene showed cross-reactivity with three of six strains of *N. sicca*. The *porA* pseudogene-based PCR was highly specific. Analytical sensitivity of 16S-based ribosomal assay was more than that of *porA* pseudogene-based assay. In clinical samples, for female patients, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of 16S ribosomal assay was 100% (95% CI 51.7% to 100%), 91.5% (95% CI 83.4% to 96%), 42.9% (95% CI 18.8% to 70.4%) and 100% (95% CI 94.7% to 100%), respectively, while for the male patients it was 100% (95% CI 85% to 100%), 95.5% (95% CI 75.1% to 99.8%), 96.6% (95% CI 80.4% to 99.8%) and 100% (95% CI 80.8% to 100%), respectively.

Conclusions: The data presented in this report supports use of 16S ribosomal assay as a screening assay only. The *porA* pseudogene target is highly specific for *N. gonorrhoeae* and may be used as a supplemental assay.

Recent Research Articles

1. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial

resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1142-51.

2. Zhao S, Duncan M, Tomberg J, Unemo M, Nicholas R. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3744-51.
3. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 821-34.
4. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhoea: the impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10: 555-77.
5. Tapsall JW. *Neisseria gonorrhoeae* and emerging resistance to extended spectrum cephalosporins. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2009; 22: 87-91.
6. Tapsall JW. Implications of current recommendations for third-generation cephalosporin use in the WHO Western Pacific Region following the emergence of multiresistant gonococci. *Sex Transm Infect* 2009; 85: 256-8.
7. Pong R, Boost MV, O'Donoghue MM, Appelbaum PC. Spiral gradient endpoint susceptibility testing: a fresh look at a neglected technique. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1959-63.
8. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level Azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3812-6.
9. Verma R, Sood S, Bala M, Kapil A, Das BK, Sharma VK, Samantaray JC. Diagnostic implications of 16S ribosomal assay for gonorrhoea. *Sex Transm Infect* 2010 Jun 11. [Epub ahead of print]
10. Tapsall JW, et al. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. *Commun Dis Intell* 2010; 34: 1-7.
11. Kubanova A, Frigo N, Kubanov A, Sidorenko S, Lesnaya I, Polevshikova S, Solomka V, Bukanov N, Domeika M, Unemo M. The Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)--national resistance prevalence in 2007 and 2008, and trends during 2005-2008. *Euro Surveill* 2010; 15(14). pii: 19533.
12. Tapsall JW, Ray S, Limnios A. Characteristics and population dynamics of mosaic *penA* allele-containing *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in Sydney, Australia, in 2007-2008. *Antimicrob*

Agents Chemother 2010; 54: 554-6.

13. Unemo M, Shipitsyna E, Domeika M; on behalf of the Eastern European Sexual and Reproductive Health (EE SRH) Network Antimicrobial Resistance Group. Recommended antimicrobial treatment of uncomplicated gonorrhoea in 2009 in 11 East European countries: implementation of a *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility programme in this region is crucial. *Sex Transm Infect* 2010 May 10. [Epub ahead of print]
14. Lewis DA. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect* 2010 Jul 23. [Epub ahead of print]
15. Singh R, Sumana G, Verma R, Sood S, Sood KN, Gupta RK, Malhotra BD. Fabrication of *Neisseria gonorrhoeae* biosensor based on Chitosan-MWCNT Platform. *Thin solid films* 2010 (Epub ahead of print) doi:10.1016/j.tsf.2010.08.057.
16. Chisholm SA, Mouton JW, Lewis DA, Nichols T, Ison CA, Livermore DM. Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2141-8.
17. Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum

cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. *Biochemistry* 2010; 49: 8062-70.

Forthcoming Scientific Events

IUSTI Latin America / Caribbean Conference

Dates: May 18-21, 2011

Location: Curitiba, Brazil

20th World Congress for Sexual Health

Dates: June 12-16, 2011

Location: Glasgow, United Kingdom

Website: www.kenes.com/was

19th Meeting of ISSTD

Dates: July 10-13, 2011

Location: Quebec City, Canada

26th IUSTI Europe Congress

Dates: September 8-10, 2011

Location: Riga, Latvia

Contact: Prof. Dr. Andris Rubins

Email: arubins@apollo.lv

12th IUSTI World Congress

Dates: November 2-5, 2011

Location: New Delhi, India

Website: www.iusti2011.org

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by WHO in preference to others of a similar nature that are not mentioned. WHO does not warrant that the information contained in this publication is complete and correct and shall not be liable for any damages incurred as a result of its use. This publication contains the collective views of an international group of experts and does not necessarily represent the decisions or the stated policy of WHO.

Comments or suggestions, or material for consideration for publication in future issues, are welcomed.

Address for correspondence: Dr. Manju Bala, Co-ordinator, WHO GASP SEAR Regional Reference Laboratory, Regional STD Teaching, Training & Research Centre,

VMMC & Safdarjang Hospital, New Delhi-110029, India.

Tel: 91-11-26196740, 91-11-26707288; Telefax: 91-11-26196740

Email: manjubala_2@hotmail.com

Editors: Dr. John W. Tapsall, Dr. Magnus Unemo and Dr. Francis J. Ndowa

Editorial Board: Dr. Manju Bala and Dr. Seema Sood

小児におけるウイルス性急性呼吸器感染症の疫学的研究

研究分担者 鈴木 宏 新潟青陵大学看護福祉心理学部看護学科・教授

共同研究者： 齋藤玲子、山口正浩、クライド・ダパット、鈴木康司、イゾルデ・ダパット（新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座公衆衛生分野）；佐野康子（佐野医院）

研究要旨

1. **RS ウイルス(HRSV)の再感染分子疫学**：冬季の乳幼児の急性下気道感染症の主要な起因ウイルスであり、2歳までには殆どの小児が感染し、一生を通して再感染を繰り返す。8シーズンと長期間の多数の小児 HRSV 再感染例を対象とし、HRSV の持つ遺伝的多様性との関連に焦点をあてた分子疫学分析により、再感染の詳細を検討した。HRSV の A 型と B 型の subgroup だけでなく genotype においても A 型は B 型に比較して再感染し易いことが初めて明らかとなった。A 型と B 型に新しい genotype が見つかったが、特に A 型の新しく発生した NA1 と NA2 の再感染が高頻度にみられ RS ウイルスの調査には、分子疫学的要項を含める必要性が強く示唆された。
2. **I 市における季節性と新型インフルエンザの疫学解析**：年齢分布では、H1N1pdm では 18 歳以下が 80% を占め、A 型では 62% と今回のパンデミックの特徴を示し、発症曜日では両者とも日曜日と木曜日であり、潜伏期を考えると学校と流行との関連を強く示唆する結果であった。
3. **新潟市内の小学校における新型インフルエンザによる休業措置と効果の検討**：学級の流行開始は月曜日、閉鎖開始は火曜日、閉鎖期間は 4 日間が最大であった。閉鎖措置と翌週の欠席者数の増減から効果を検討した。10% 未満に減少したのは、閉鎖なし学級が閉鎖した学級より減少者が多かった。減少が多いのは、学級閉鎖より、学年閉鎖、さらには閉鎖なしが多かった。この様に期待を裏切る結果であるが、我々の別の地域における GIS における伝播の空間解析から、流行が地域に繰り返しておこり、伝播がゆっくりであるなどの結果を総合的に考えると、学童全体としてある罹患率に達するまでその地域にウイルスが存在し、閉鎖措置が有効と判定し得なかった可能性が考えられた。

補足研究：

ミャンマーとレバノンにおいてもインフルエンザ疫学調査として流行株、耐性株などの動向を日本の類似性などを検討し、海外での疫学研究の重要性が強く示唆された。

- | | |
|------------------------------------|---|
| I. 8 流行期における小児ヒト RS ウイルスによる再感染分子疫学 | 児の急性下気道感染症の主要な起因ウイルスであり、2歳までには殆どの小児が感染し、一生を通して再感染を繰り返す。 |
| 1. 研究目的 | 重要な感染症でもある HRSV のサーベイ |
| ヒト RS ウイルス(HRSV)は冬季の乳幼 | |

ランスはウイルス分離を基にし、上気道か下気道かに分けての解析が昨年からは開始された。しかし、臨床では迅速診断法が用いられてはいるが、本ウイルスの性状からウイルス分離は難しく、サーベイランス事業による本ウイルスの疫学の実態を反映しているとは言い難い。一方、本ウイルスはウイルス表面蛋白の中和・防御の主標的である G 蛋白に対するモノクローナル抗体による A 型と B 型の subgroup 分類がされ、最近では PCR 法を基本とした遺伝子解析による分子疫学が主流になりつつある。

我々のこれまでの小児患者を対象とした 8 シーズンの分子疫学的研究において、A 型と B 型両者は期間中見られたが、B 型が優位なのは 3 シーズンだけであった。特記すべき事として、A 型の新たな genotype としての NA1 と NS2 型発現と大きな流行が一致し、さらに、特に A 型の新たな genotype、NA1 と NS2 型の発現時に患者の平均年齢が他と比較し高い特徴があり、その原因が不明であった。一方では B 型でも、特に最近 3 シーズンに新たな genotype として BA7-BA10 が発生したが、A 型と異なって大きな流行とはならなかった。

本研究は、これまでの上記の研究の流れから、長期間の多数の小児 HRSV 再感染例を対象とし、HRSV の持つ遺伝的多様性との関連に焦点をあてた分子疫学分析により、再感染の詳細を検討した。さらには、上記の A 型の新たな genotype としての NA1 と NS2 型は、再発例の多発が患者年齢へ影響している可能性も併せて検討した。なお、ここで注目した再感染は、免疫反応が不完全であることや、G 蛋白の抗原的・遺伝的多様性が関与して宿主免疫を逃れるために起こるとされるが、不明な点が多い。

2. 方法

新潟市内の一小児科医院において、

2001 年 11 月から 2009 年 4 月までの 8 流行期に、喘鳴・咳嗽・鼻汁・発熱といった症状から急性下気道感染が疑われた 5 歳以下の小児より鼻腔拭い液を採取した。G 蛋白の第二可変部位に特異的なプライマーを用いて RT-PCR 後、シーケンスにより型(A・B 型)と BioEdit7.0,9.0、MEGA4.0 を用いて Neighbor-joining 法で G 蛋白の系統樹を作成し、ブートストラップ解析により genotype 分類を行なった。本研究は、調査期間中の全感染者の中から HRSV に 2 回以上感染した小児を研究対象とした。患者毎の初回来院時と再感染の年齢、感染時期、得られた型及び genotype 分類による再感染とこれらの時系列推移などにより、再感染の実態を検討した。

3. 結果

8 流行期中に合計 1560 検体中 726 検体 (46.5%) で HRSV が検出された。検査施設と県のサーベイランス定点からの HRSV 検出状況は同様な傾向を示し、2006-2007 シーズンから大きな流行を示した (図 1)。HRSV の亜型分類では、流行季節毎に A 型、B 型の流行に差が見られ、一定の傾向はなかった (図 2)。

A 型の genotype 別分類では、NA1, NA2 型が 2004-2005 シーズンから発生し、特にその翌年から 2 シーズンはこの新型の発生と一致していた (図 3, 4)。

B 型の genotype 別分類では、BA7-10 型が 2005-2006 シーズンから発生したが、これらの新型の発生と流行の変化は見られなかった (図 2, 3)。

8 シーズンを通し、再感染者を取り上げ、再感染の分子疫学的検討を行った。再感染者は 52 名 (のべ 108 検体) であった (図 5)。1 回目、2 回目、3 回目の感染の患者の平均月齢は、 10.6 ± 7.9 ヶ月、 25.8 ± 11.5 ヶ月、 33.6 ± 7.6 ヶ月であった。再感染の

46例(82.1%)は最初の感染の翌シーズンにみられ、次の感染までの平均期間は 14.6 ± 8.8 ヶ月であり、最短は10日であった(表1)。

A型、B型別では、最初の感染は33件(46.5%)、19件(36.5%)、2回目の感染は35件(67.3%)、17件(32.7%)といずれでもA型が多かった(表2)。同じ型内での再感染は28例であり、A型同士は23例(82.1%)、B型同士は5例(17.9%)と、A型同士の再感染の頻度が有意に高かった($P=0.005$)。3回目の感染は、4名だけで、全てA型であった。3回感染者では同じ genotype に繰り返し罹患したものはなかったが、A型のみで3回感染したものが1例あった。異なる型への再感染は28例でみられ、A型からB型に感染したものが12例(42.9%)、B型からA型に感染したものは16例(57.1%)であった。

8流行期中にA型としてGA5、NA1、NA2の3種、B型としてBA4、BA5、BA7~BA10の6種が検出され、NA1、NA2、BA7~BA10が新たに見つかった genotype である。NA1とNA2が流行した2005-2006と2006-2007シーズンに再感染者が増加した(表3)。他方、BA10が主に流行した2007-2008シーズンに再感染の増加はなかった。2回目の感染は、NA1、NA2、BA9、BA10の患者で平均年齢が他の genotype より高い傾向にあった。同じ genotype 同士の5件は全てA型(GA5; 2例、NA2; 3例)であり、B型の同一 genotype での感染はみられなかった。

4. 考察

今回の研究では他と同様にA型の再感染がB型より多く、A型の同じ型の再感染がB型より明らかに多いことが明らかになった。これは、A型はB型に比較して抗原に多様性があるため免疫反応から

逃れ易いためと、特にB型の型特異的免疫反応はA型よりもより完全で長く継続する性質に起因すると思われた。

再感染は8割以上が翌シーズンにみられ、これまで異なる型同士の再感染により頻繁に生じるとされていたが、同じ型同士の感染も同程度みられ、これに対する防御免疫も短い期間しか働かない可能性があり、今回の研究においてはその優位性は否定された。特記すべきこととして、新たに見つかったNA1とNA2の流行時に感染数と再感染者数が増加した。この機序については今後の研究が必要と思われた。

5. 結論

多数の再感染例の分子疫学的解析により、HRSVの subgroup だけでなく genotype においてもA型はB型に比較して再感染し易いことが初めて明らかとなった。特にA型の新しく発生したNA1とNA2の再感染が高頻度にみられ、RSウイルスの調査には、分子疫学的要項を含める必要性が強く示唆された。

II. I市における季節性と新型インフルエンザの疫学解析:

インフルエンザ迅速診断キットをもとに、I市の内科・小児科医がインフルエンザ患者全数登録事業によりA型とB型が主の2008-09の季節性インフルエンザ、2009-10の新型インフルエンザH1N1pdmの情報を収集し、患者年齢分布、発症曜日を解析した。

年齢分布では、H1N1pdmでは18歳以下が80%を占め、A型では62%と今回のパンデミックの特徴を示し、発症曜日では両者とも日曜日と木曜日であり、潜伏期を考えると学校と流行との関連を強く示唆する結果であった。

なお、これらの流行について、患者情報

を基本とし、地図情報システム (GIS) と Geodemographic 手法による解析を現在進行中である。

III. 新潟市内の小学校における新型インフルエンザによる休業措置と効果の検討：

小学校 50 校、912 クラスにおける休業措置とその有効性を検討した。流行ピークの 11 月はクラスの閉鎖実施率 54.7% をピークとし、その後は激減した。学級の流行開始は月曜日、閉鎖開始は火曜日、閉鎖期間は 4 日間が最大であった。閉鎖措置と翌週の欠席者数の増減から効果を検討した。10% 未満に減少したのは、流行全体、ピーク前でも、閉鎖なし学級が閉鎖した学級より減少者が多かった。減少が多いのは、学級閉鎖より、学年閉鎖、さらには閉鎖なしが多かった。

期待を裏切る結果であるが、今回のパンデミックは、我々の別の地域における GIS における伝播の空間解析から、流行が地域に繰り返して起こっていること、伝播がゆっくり起こっているなどの結果を総合的に考えると、学童全体としてある罹患率に達するまでその地域にウイルスが存在し、閉鎖措置が有効と判定し得なかった可能性が考えられた。

補足研究

1. ミャンマーとレバノンのインフルエンザ疫学研究

1) ミャンマー：

インフルエンザは温帯地方では冬に流行し、熱帯・亜熱帯では雨期に流行する。ミャンマーは、東南アジアに位置し、ほぼ鎖国状態であり、インフルエンザの情報は皆無である。我々は、2005 年から迅速診断キットを使ったインフルエンザ・サーベイランスを開始している。

2007-2009 年の 3 年間にヤンゴン市とネピ

ドー市で合計 3924 件の急性上気道炎患者の咽頭ぬぐい液を迅速キットで検査し、ウイルス型別、遺伝子近縁性、薬剤感受性を検討した。

迅速検査において A 型インフルエンザ陽性は 1105 件、B 型陽性は 293 件、ウイルス分離からは A/H1N1(季節性) 187 件、A/H3N2 は 547 件、B 型 214 件、A/H1N1pdm 16 件を検出した。季節的には、5-11 月の雨期に一致して患者がみられた。2009 年にヤンゴン市では 8 月に、ネピドー市では 9 月に A/H1N1pdm が検出されたが、大きな地域流行には至らず、散発のみであった。

2008 年には A/H1N1 の 96.7% アマンタジン耐性株、1.5% がオセルタミビル耐性株であったが、翌年は全てオセルタミビル耐性株であった。なお、3 件はアマンタジンとオセルタミビルの二重耐性株であった。

A/H3N2 は、2007-2009 年に採取された株は全てアマンタジン耐性株であった。特記すべきは、2007 年と 2008 年に 1 株ずつ M2 遺伝子 S31N 変異と NA 遺伝子 Gln136Lys 変異をもつ、アマンタジンとザナミビルの二重耐性株は、世界初の報告となった。

上記の薬剤耐性株は、同国では抗インフルエンザ剤は用いられておらず、薬剤耐性株の国際伝播によると考えられる。

以上から、ミャンマーでのインフルエンザのサーベイランスは、アジアの重要なセンチネルサイトである事を実証した。

2) レバノン；

2009 年 5 月-2010 年 1 月にインフルエンザ様疾患患者から咽頭・鼻腔ぬぐい液を 197 件採取した。うち 50 件が迅速キットで A 型陽性の 30 件を新潟大学にて詳細な解析を行い、全て新型インフルエンザと判明した。10 月に新型による地域流行があり、アマンタジン耐性であり、1 件は内服歴がないにも関わらず、オセルタミビル耐性であ