

RNase 処理について添付プロトコールと異なる方法を用いた。

ILLUMINA MiSeq 解析は、Nexta XT DNA 調整キット、Nextera インデックスキットを用いてゲノム DNA のインデックス化と調整を行った。MiSeq における塩基配列決定は、ILLUMINA 社のインストラクトに従って実施した。

C. 研究結果

1 コレラ菌ゲノム解析研修

期間：平成27年2月2日～13日

研修参加者：

- 1 今村大輔（岡山大学インド感染症共同研究センター）
- 2 岡田和久（大阪大学 日本・タイ感染症共同研究センター）
- 3 竹村太地郎（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点）
- 4 NGO Tuan Cuong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点 National Institute of Hygine and Epidemiology, NIHE）
- 5 TRAN Thi Luong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 6 NGUYEN Hai Tuan（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 7 PHAM Duc Tho（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）

コレラ菌16株についてゲノム DNA を取得し、ILLUMINA MiSeq による配列決定を行った。それぞれの国で分離株をそれぞれが調

整し、解析を実施した。また、得られた配列の品質評価法について研修した。品質評価をクリアした配列生データを利用して、系統解析を実施した。

D. 考察

ゲノム DNA を取得し ILLUMINA MiSeq 解析を実施し、期間内に解析の流れの一連を各人が研修することができた。次世代シーケンサーは高価な機器であり、現状では各研究施設に配備することは困難な面もある。また、その保守については、特に発展途上国においては、万全な体制が整っているとはいえない。

海外研究機関において分離された株のゲノム配列情報を所得するためには、3つの方策が考えられる。

- 1) 海外研究機関から国立感染症研究所に菌株を輸送し、国立感染症研究所においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定・解析の全てを実施する。
- 2) 海外研究機関においてゲノム DNA を取得し、ゲノム DNA を国立感染症研究所に輸送し、国立感染症研究所において、解析 DNA 調整、配列決定・解析を実施する。
- 3) 海外研究機関においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定を実施する。他地域との比較解析のためには、決定された配列情報を国立感染症研究所に設置するデータベースに格納して解析する。

1)においては、病原体輸送にコストがかかることが問題であり、迅速な解析が難しい。次世代シーケンサーが設置可能な研究機関では、3)の方策が可能である。また、設置不能であるか、あるいは保守が困難な場合には、2)ゲノム DNA を輸送することで（菌株の輸送に比較して簡易である）ゲノム配列の取

得が可能となる。

本研修において、2)および 3)が実施できる体制が整いつつあることが認識された。また、今村博士、岡田博士、竹村博士に関しては国立感染症研究所の協力研究員として登録することで、自らの研究を進展させるためにも、国立感染症研究所の機器を利用することが可能である。

赤痢菌性状解析に関する研修（開催予定時期
3月2日～6日）

Mark Philip Bugayong（Research Institute
for Tropical Medicine, 東北大）

既に研修にもちいらフィリピン分離赤痢菌
25株の輸送の準備が整っている。本研修に
おいては赤痢菌の分子型別ならびに薬剤感
受性試験に関する研修の依頼があり、その準
備を整えている段階である。

E. 結論

今後の、海外研究機関等と国立感染症研究
所との感染症に関する共同研究および連携
強化の流れのなかで、様々な手段において迅

速にゲノム配列情報を集積することを可能
とする道筋が、本研究によって明らかにされ
たと考える。研究者の交互の交流と、技術の
共有化を押し進めて行くことで、共同研究の
進展の原動力となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

担当責任者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 岡 智一郎 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

カウンターパート：
Thailand NIH, Vietnam NIHE

研究要旨：本年度は、下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス）の全ゲノム配列解析技術の研修と、配列解析の共同研究をJ-GRID拠点を通じて実施するための職員研修を中心に行った。

A. 研究目的

ヒトに感染するノロウイルス（HuNoV）、サポウイルス、ロタウイルス等の下痢症ウイルスは、毎年、我が国のみならず全世界的な流行を引き起こすため社会問題となっている。上記ウイルス感染症は、交通機関の発達によるヒトの移動がウイルスを運び、流行を引き起こすと考えられている。本研究は、我が国の近隣諸国における上記ウイルスの流行動向を調べ、アジア地域の分子疫学を推進することで、アジア地域における上記ウイルスの流行動向を把握して、予測プログラム構築に役立てる。さらに、ワクチンや、抗ウイルス薬の開発を通じて下痢症ウイルスの感染制御に貢献する。

今年度は、下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス）の全ゲノム配列解析技術の研修と、配列解析の共同研究をJ-GRID拠点を通じて実施するための職員研修を中心に行った。今後、現地に流行株の全塩基配列を利用した時系列解析ゲノム解析を導入し、流行状況を互いに把握し、下痢症ウイルスの感染制御に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

1. タイNIH職員の研修

大阪大学タイJ-GRID拠点を通じ、タイNIH職員2名を受け入れた。同時にタイNIHからは下痢症ウイルス感染者の便検体48サンプルが持ち込まれた。

研修は、コンベンショナルなRT-PCRによるノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスの検出、次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列解析を実施した。

2. ベトナムでの感染研若手職員の研修

国立感染症研究所より、岡智一郎主任研究官を、長崎大学J-GRID拠点を通じてNIHEの下痢症ウイルスセクションと地元の大学との共同研究体制の調査、協力関係樹立のために現地に約1週間派遣した。

C. 研究結果・考察

1. タイNIH職員の研修

研修は、順調に進み、48サンプルの解析が終了する予定。大阪大学J-GRID対拠点には、ライフテクノロジー社のイオンプロトン次世代シーケンサーが導入され、稼働している。感染研では、イルミナ社のMiSeqが稼働している。両マシンは作動原理、シーケンス原理が異なるが、データ処理手法、解析手法については共通点が多く、双方でのデータ共有が可能である。そこで、本研修では、RNA抽出からcDNAライブラリー作製、

次世代シーケンスランをMiSeqに対応した方法で行い、データを持ち帰ることにより、タイNIHに隣接した大阪大学タイ拠点のスタッフと共に配列解析ができるようにトレーニングを行うこととした。

2. ベトナムでの感染研若手職員の研修

長崎大学J-GRID拠点を通じてNIHEの下痢症ウイルスセクションと地元の大学との共同研究体制の調査、協力関係樹立のために現地約1週間派遣した岡智一郎主任研究官により、NIHEとの共同研究がスタートすることとなった。NIHEのカウンターパートとして、J-GRIDベトナム拠点の長崎大学山城教授を通じて紹介を受けたDr. Nguyen Van Trangが対応することとなった。3者間の協議により、2000年以降にベトナムで流行したノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスを中心とした下痢症ウイルスの全ゲノム塩基配列解析を実施し、ベトナム国内での下痢症ウイルスの流行の変遷をレトロスペクティブに解析することとした。すでに検体の選択が始まっており、今年度中にNIHEからJ-GRID拠点を通じて感染研に検体の輸送搬入が行われる予定である。また、来年度は、カウンターパートであるDr. Nguyen Van Trangが来日し、感染研にて次世代シーケンサー（イルミナ社MiSeq）に関する研修、分子系統解析手法にかかる研修を実施する予定である。

D. 結論

従来より交流が有り、共同研究が稼働している台湾に加え、本年度は、別プロジェクトではあるが、インド王立研究所NICEDとの協力体制がスタートした。さらに、本プロジェクトで、タイNIH, ベトナムNIHEとの共同研究がJ-GRID拠点を通じて稼働し始めた。さらに、来年度は神戸大学インドネシアJ-GRID拠点が、本プロジェクトへの合流を目指している。全ての拠点が本プロジェクトに合流すると、アジア領域における下痢症ウイルスの流行とその変遷について、時系列データが収集、共有化できるようになる。また、感染研による次世代シーケンスで、ゲノム全長に渡る配列データが供給される事と成る。今後、これらのプロジェクトが、順調に推移することで、下痢症ウイルスの流行の把握、より確率の高い流行予測システムの構築に効果を発揮すると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

海外研究機関研究員の研修に関する研究

担当責任者 大石和徳（国立感染症研究所感染症疫学センター長）
研究協力者 木村博一（国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）

研究要旨: 国立感染症研究所において、急性胃腸炎患者の起因ウイルス検査診断および食品中に含まれるウイルスの検出に関する国際研修プログラムの構築ならびに研修を実施するための先進的な病原体検出系の構築を行った。その結果、水系感染を引き起こす主要ウイルスの国際研修プログラムが完成した。また、次世代シーケンサー(NGS)を導入し、経口感染症の原因となる病原体の網羅解析に関する検出系の一部構築を行った。また、NGS を用いた英語による研修プログラムの作成・構築も一部完成した。

A. 研究目的

国立感染症研究所においては、病原体検査診断に関する国際研修および国内研修を行っている。特に、国際研修においては、WHO 西太平洋事務局地域の病原体検査診断に従事する専門官の人材育成を重要視し、公衆衛生学上、対策が必要な疾患に関する病原体検査診断研修を行っている。このなかで、東南アジア地域各国、例えば、インドネシア、タイ、フィリピンおよびベトナムにおいては、水系感染を引き起こすウイルスによる国内で発生した急性胃腸炎患者の検査診断ならびに生鮮食品（魚介類）や乳肉製品の輸出品の微生物学的安全確保のための研修のニーズが高い。そこで、本研究においては、急性胃腸炎患者の起因ウイルス検査診断および食品中に含まれるウイルスの検出に関する国際研修プログラムの構築ならびに研修を実施するための先進的な病原体検出系の構築を行った。また、これらの研修を行うため次世代シーケンサーなどの先駆的な病原体遺伝子解析機器も導入した。

B. 研究方法

国際研修プログラムの構築

水系感染を引き起こす主要ウイルスを A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびロタウイルスとした。研修プログラムの座学による研修は、当該ウイルスのウイルス学、疫学および各検査診断法を主体とした。また、実験室内研修は、当該ウイルスの検出法として、コンベンショナル(RT-)PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、シーケンシング解析法および分子系統樹解析(近隣結合法)を主体とした英語によるプログラムを作成した。

先進的病原体検出系の構築と次世代シーケンサーを用いた病原体網羅解析研修プログラムの構築

上記ウイルス以外にも経口感染症を引き起こす病原体は多種類存在することは言う

までもない。そこで、次世代シーケンサー(NGS)を導入し、経口感染症の原因となる病原体の網羅解析に関する検出系の構築を行った。また、NGS を用いた英語による研修プログラムの作成・構築も行った。

(倫理面への配慮)
特に該当事項は無い

C. 研究結果

国際研修プログラムの構築

研修プログラム期間は、派遣元の諸事情を考慮し、1 週間（実質 5 日間）の英語による研修プログラムを構築した。具体的には、第 1 日目に、研修内容のオリエンテーションと下痢症ウイルス総論、第 2 日目は、各種ウイルスのウイルス学・疫学検査診断法の概要に関する座学、第 3 日目から 5 日目までは、当該ウイルスの遺伝子検出、病原体遺伝子定量、シーケンス・系統樹解析を実験室内診断研修とした。

先進的病原体検出系の構築と次世代シーケンサーを用いた病原体網羅解析研修プログラムの構築

NGS は、ウイルス細菌を含む病原体のフルゲノムおよびディープシーケンシングを遂行することが可能な機種 (Illumina MiseqII) を導入した。また、NGS を用いた病原体網羅解析の英語によるマニュアルも一部完成した。

D. 考察

今回、本研究において、水系感染を引き起こすウイルスによる国内で発生した急性胃腸炎患者の検査診断ならびに生鮮食品（魚介類）や乳肉製品の輸出品の微生物学的安全確保のため、病原体検査診断に従事する国外の専門官のための研修プログラムの構築およびプログラムを遂行するための機器整備を行った。本プログラムにより、WPRO 西太平洋地域に属する国の専門官であれば、

約1週間のプログラムで、水系ウイルスの主な原因であるA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびロタウイルスの疫学やウイルス学のみならず、これらの病原体の検査診断法が習得可能になると思われる。

国内外において、食品が原因と思われる食中毒の一定数は、起因病原体が原因不明になっている。その一方で、NGSによる原因究明が進み、クドアなどの新規病原体も同定されるようになってきている。したがって、今後、NGSを応用した水系感染あるいは食品由来する感染症の病原体検索が進むと思われる。来年度以降、研修プログラムのさらなる充実と導入したNGSやリアルタイムPCRを応用し、国内外の研修充実化を図りたい。

E. 結論

急性胃腸炎患者の起因ウイルス検査診断および食品中に含まれるウイルスの検出に関する国際研修プログラムの構築ならびに研修を実施するための先進的な病原体検出系の構築を行った。その結果、水系感染を引き起こす主要ウイルスの国際研修プログラムが完成した。また、次世代シーケンサー(NGS)を導入し、経口感染症の原因となる病原体の網羅解析に関する検出系の一部構築を行った。また、NGSを用いた英語による研修プログラムの作成・構築も一部完成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda

M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.

2. Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep* 2015 Feb 2;5:8185. doi: 10.1038/srep08185.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

アジア地域の研究者向け薬剤耐性菌の検出、分子疫学、ゲノム解析の研修

担当責任者	柴山 恵吾	（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者	鈴木 里和	（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
研究協力者	松井 真理	（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）
研究協力者	筒井 敦子	（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
研究協力者	鈴木 仁人	（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）

アジア各国では NDM 型カルバペネム耐性腸内細菌科細菌など、多剤耐性菌が蔓延しており临床上、公衆衛生上大きな問題となっている。薬剤耐性菌は、国境を超えて拡散するため、対策には各国の連携が重要である。WHO は各国の専門家が協力してグローバルな視点で耐性菌対策を進めることを求めている。この研究では、アジア各国の研究者を招聘し、薬剤耐性菌の検出やサーベイランスに関する技術研修を行い、各国での薬剤耐性菌対策のレベルの向上を図り、また今後の共同研究体制を構築することを目的とした。国立感染症研究所細菌第二部第一室にて、アジア各国の研究者向け研修プログラムを作成した。プログラム内容は主に、現場ですぐに活用できることを目指して作成した。アジア各国で拡散しており、かつ特に注意を要する耐性菌について、検出法や着目すべき点などについて講義と実習を行った。研修は単なる実験技術の習得だけでなく、実験結果と菌株の疫学情報とを合わせて総合的に解釈し、実際に感染対策に資するようを目指すことを目指した。また、今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる作業や、感染研で行なう解析についても研修を行った。中国、フィリピン、韓国、ベトナム、台湾から1名ずつ、ミャンマーから3名の研究者が来所し研修を受けた。また研修中に各研修生から各国の薬剤耐性菌の状況を発表してもらい、お互いの理解を深めた。この研修により各国参加者の研究機関との連携が強化され、今後の薬剤耐性菌に関する共同研究が促進されることとなった。

A. 研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、国境を越えて拡散している。特に途上国では、新型のカルバペネム耐性菌が急速に拡散している。これらの耐性菌は日本にも輸入例がある。米国でも、CDC がカルバペネム耐性腸内細菌科細菌がこの10年で急速に増加したと報告した。国内でも類似の薬剤耐性菌による院内感染が散発しており、今後諸外国のように薬剤耐性菌が拡散していくことが危惧される。これらの耐性菌は有効な薬剤が無いと極めて限られるため、公衆衛生上深刻な問題である。WHO は2013年に薬剤耐性菌対策に関する Advisory Group を組織し、各国にサーベイランスの強化を求めている (Global Report on Surveillance, 2014)。薬剤耐性菌対策のためには、まず状況を的確に把握し、そして特に注意を要する耐性菌を明らかにして積極的に社会に情報発信する必要がある。同時に、簡便な検査法や型別法を開発して医療現場が容易に検査をできるようにして、感染拡大防止策が適切に実施されるよ

うにすることが重要である。国立感染症研究所細菌第二部は、これまで全国の医療機関と協力関係を構築して菌株を収集し、実態を解明して注意すべき耐性菌を同定し、検査法の開発などを行ってきた。同時に J-GRID などと連携し、アジア各国の研究機関、病院と協力関係を構築してきた。アジアの多くの国では、薬剤耐性菌が蔓延しているものの、専門家がないなどの理由で臨床現場で薬剤耐性菌の検出が十分に実施されていない。この研究では、アジア各国との共同研究および連携を強化し、グローバルな薬剤耐性菌対策の向上に資することを目標にて、各国の研究者に薬剤耐性菌に関する研修を行った。

B. 研究方法

J-GRID の海外拠点や、感染研細菌第二部が共同研究を行っているアジアの研究機関を対象に、薬剤耐性菌の研修希望者を募り、応募者に感染研細菌第二部において研修を実施した。

倫理面への配慮

該当なし。

C. 研究結果

中国、フィリピン、韓国、ベトナムから1名ずつ、ミャンマーから3名の若手研究者が研修を受けた。別の時期に、台湾の研修生1名が耐性菌のゲノム解析に関する研修を受けた。国立感染症研究所細菌第二部第一室にて、アジア各国の若手研究者を想定した研修プログラムを作成した。プログラム内容は主に、現場ですぐに活用できることを目指して作成した。プログラム及び配布資料を末尾に示す。アジア各国で拡散しており、かつ特に注意を要する耐性菌について、検出法や着目すべき点などについて講義と実習を行った。菌の培養、同定など基本操作を習得後、まず薬剤感受性試験を実施した。対象は、臨床的、公衆衛生的に最も問題が大きいカルバペネム耐性腸内細菌科細菌とした。日本及びアジア各国で比較的良好に分離されるカルバペネマーゼ遺伝子を持つ菌株を研修に供した。微量液体希釈法に加え、途上国でも実施することができるディスク法の研修を行った。特に注意を要するカルバペネマーゼ産生菌について、ディスク法での判別法を実演により習得させた。また、近年開発され今後普及が見込まれる CarbaNP テストも含めた。ディスク法での判別後に、パルスフィールド電気泳動による型別の研修を行った。またこれらの技術を習得するだけでなく、分離された菌株の疫学情報から、どのような菌株を解析対象とするべきか、結果をどのように解釈するのかなど、その技術を実際の感染対策に活用するために必要な知識についても講義を行った。一部の希望者には、ゲノム解析の研修も実施した。研修プログラムの最後に、試験用菌株を用いて理解度テストを行った。また研修中には、各研修生から各国の薬剤耐性菌の状況を発表してもらい、お互いの理解を深めた。

この研修により、参加者は薬剤耐性菌の検出に関する基本的な技術を習得した。今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる実験技術を習得し、また感染研で行なう解析についても理解した。

D. 考察

薬剤耐性菌は感染症を起こすと有効な薬剤が極めて限られるため、临床上深刻な問題である。また対策が不十分だと病院内や市中で拡散するため、公衆衛生上も大きな問題である。アジアの多くの途上国では日本と比べると薬剤耐性菌が多い。この原因としては、多くの途上国では国民は抗菌薬を処方箋なしで購入可能なので、抗菌薬

がコントロールなしで使用されており、また病院での感染対策も不十分なので、薬剤耐性菌が極めて出現、拡散しやすい状況にあることが挙げられる。しかしアジア地域の国々、特に途上国では、薬剤耐性菌の解析のための設備や専門家が十分ではないことが多い。途上国においては、これまでマラリア、結核、インフルエンザなど、症状が明らかな市中感染症と比較して、新興感染症としての薬剤耐性菌感染症はあまり大きく認識されていなかったと思われる。しかし、2014年にWHOが薬剤耐性菌を世界的な問題として取り上げて、**Global Report**で各国に対応を求めたことや、治療薬がない薬剤耐性菌が国境を超えて拡散している実態が理解され始めてから、先進国だけでなく途上国も最近関心を高めてきた。

日本は世界でも最も薬剤耐性菌が少ない国の一つである。薬剤耐性菌が少ない背景には、医療機関において積極的に耐性菌の検出が行われていることが挙げられる。この研修で、アジアの研究者に特に注意を要する薬剤耐性菌の検出法を習得してもらい、帰国後に各国でその技術を普及してもらえれば、各国の薬剤耐性菌対策の一助となると考えられる。同時に、分離された耐性菌株を用いて、感染研と共同でグローバルな体制で耐性菌対策のための研究が進められると期待できる。

E. 結論

アジア各国の専門家に、临床上、公衆衛生上特に注意を要する薬剤耐性菌の検出法、型別法、その他解析法について研修を実施した。研修は単なる実験技術の習得だけでなく、実験結果と菌株の疫学情報とを合わせて総合的に解釈して、実際に感染対策に資することを目指した。また、今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる作業や、感染研で行なう解析についても研修を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Training course on genotyping and molecular analyses of antimicrobial resistant bacteria
Time Table

2015/02/02 Mon.		02/03 Tue.		02/04 Wed.		02/05 Thu.		02/06 Fri.	
Gram-negative bacteria	<i>C. difficile</i>	Gram-negative bacteria	<i>C. difficile</i>	Gram-negative bacteria	<i>C. difficile</i>	Gram-negative bacteria	<i>C. difficile</i>	Gram-negative bacteria	<i>C. difficile</i>
9		9	presentaion & discussion of participants	9	presentaion & discussion of participants	9	presentaion & discussion of participants	9	Lab
10		10	Lecture Antimicrobial sysceptibility testing & defection method for CRE	10	Lab results of disk diffusion test	10	Lab Electrophoresis	10	Lecture plasmid sequence GPAT
11		11	Lab Antimicrobial susceptibility testing	11	Lab DNA extraction	11	Lab Electrophoresis	11	Culture of <i>Clostridium difficile</i> from stool specimens
12		12	Lunch	12	Lunch	12	Lunch	12	Lunch
13	Overview Epidemiology and Surveillance of Antimicrobial resistant bacteria in Japan (Dr. S Suzuki)	13	Lunch	13	Lecture phenotype&genotype, typing method	13	Lab	13	Discussion
14	Lecture Biosafety (Dr. Tanabayashi) room 204	14	Lab disk diffusion test CarbaNP test	14	Lab PCR results of disk diffusion test	14	Lab comparison of pgenotype & genotype. PFGE, sequence (Demo)	14	Free
15		15		15		15		15	
16	Lab Labo Tour & Automatic system for bacteria identification (MALDI- TOF MS) (Dr. M Suzuki & Matsui)	16	PCR	16	Making gel for PCR ribotyping	16		16	
17		17		17		17		17	

Antimicrobial Susceptibility Testing & Detection Methods for Gram-Negative Rods

Objectives of AMR test at NIID

- 1 To reveal mechanisms of resistance
- 2 To confirm nosocomial outbreak

Before starting the tests...

1. Confirm the isolate information
 1. Number of isolates
 2. Species
 3. Resistance

2. Confirm Epidemiological information for each isolate

1. Date of isolation (sampling), at least "Year"
 2. Place (hospital, ward)
 3. Type of specimen (Blood, Urine etc.)
 4. Patient ID
3. Inoculation of the isolate
- One isolate per one agar plate
 - Use antimicrobial drug containing disk
 - Check the single colony, antimicrobial resistance
 - Confirm species identification and antimicrobial resistance
4. Preserve the isolates and record the data into your database.

Let's Start!

Antimicrobial Susceptibility Testing and Detection at reference lab

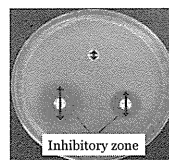
At clinical lab
Predict/speculate resistance mechanism from antimicrobial susceptibility pattern

At reference lab
Confirm the resistance mechanisms by molecular method (usually detection of resistance gene by PCR)
Check the whether the phenotype (antimicrobial susceptibility pattern, disk diffusion test, Carba NP test etc.) of isolates are consistent with the results of genotype.

- > Molecular typing
- ✓ Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)
 - ✓ Multilocus Sequence Typing (MLST)
 - ✓ Plasmid analysis

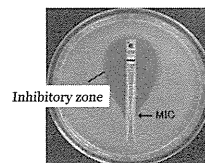
Antimicrobial susceptibility Test (AST)

- In Japan...
 - AST is usually conducted at clinical level
 - Middle to large hospitals, large commercial labs
⇒ microdilution method with automated system
 - Small hospitals and small commercial labs
⇒ disk diffusion test



Disk diffusion test

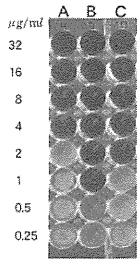
Relatively cheap
Continuous data available
Accurate MIC is not available
Difficulty in automation



Etest

Expensive
MIC is available

Microdilution Broth method



Use 96 well plate
Add 100µl of bacterial suspension
↓
Incubation
Read the plate for bacterial growth

Automation system is available.
Dry plate and frozen plate are commercially available.

96 well antimicrobial locating design

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CFPM	IPM	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.064
B	IPM	MEPM	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
C	IPM	LVFX	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.064
D	IPM	IPM	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
E	IPM	IPM	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.064
F	IPM	IPM	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
G	IPM	IPM	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.064
H	IPM	IPM	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125

Break point panel

- When the S/I/R category is defined as
Susceptible $\leq 1\mu\text{g/ml}$
Intermediate $= 2\mu\text{g/ml}$
Resistant $\geq 4\mu\text{g/ml}$

Meropenem	54	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125

EUCAST screening cut-off for detecting
carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
MIC $>0.12 \mu\text{g/ml}$ (meropenem)
Disk diffusion $<25\text{mm}$

Detection of
acquired β -lactam resistance among GNR

- Disk diffusion test with β -lactamase inhibitor
- Carba NP test
- Detection of β -lactamase genes by PCR

Check the consistency

This is the main objectives of this training course

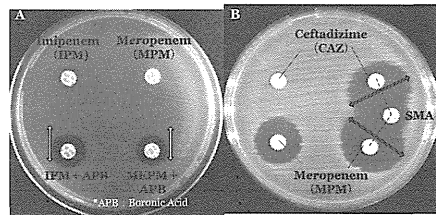
Additional analysis

- Plasmid analysis, Whole genome analysis

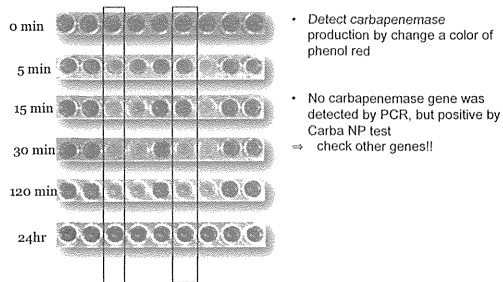
Classification of β -lactamase

Ambler class	genotype	resistance phenotypes					Inhibition by				
		2 nd generation carbapenemase (KPC, CTX)	4 th generation carbapenemase	carbapenemase (KPC, CTX)	carbapenemase (KPC, CTX)	carbapenemase (KPC, CTX)	clavulanic acid	EDTA	DPA	PBA	clavulanic acid
A	TEM SHV (ESBL)	R (S CTX)	R	R	S	S	+	-	-	-	
	CTXM (ESBL)	R (CAZ)	R	R	S	S	+	-	-	-	
	KPC	R	R	R	R	R	-	-	+	-	
B	Bla _{TEM} SHV	R	R	S	R	R	-	+	-	-	
C	CMY etc...	R	I/R	R	I/R	S	-	-	+	+	
	OXA-48	S	S	S	S	R	-	-	-	-	

SMA: sodium mercaptoacetate acid, DPA: dipicolinic acid
ACV: amoxicillin/clavulanate, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CMZ: cefmetazole, CMN: cefminox, IPM: imipenem, MEPM: n



Carba NP test



Why it is important to know the genotype of resistance?

- Knowing the molecular epidemiology enables
 - Easy understanding of resistant mechanisms at clinical lab
 - Easy selection of resistant gene to do the PCR detection
 - Easy understanding of nosocomial outbreak of resistant bacteria

Nationwide survey in 2010

Between September and December in 2010
Enterobacteriaceae isolates resistant to carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones were collected from hospitals across Japan.

	IMP-1 type	Genotype of Carbapenemase			
		KPC	NDM-1	OXA-48 like	SMB-1*
<i>Escherichia coli</i>	23				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	2	2	1	
<i>Enterobacter cloacae</i>	22				
**Other	8				1
Total	72	2	2	1	1

*Newly identified metallo-β-lactamase (Vlachino et al. AAC 2011)
** *Providencia* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*

•IMP-1 type metallo-β-lactamase producing Enterobacteriaceae is already endemic in Japan.
•Most of KPC, NDM and OXA-48 producers are imported cases.

IMP-type carbapenemase domestic thread of Japan

- Metallo-β-lactamase, belong to Class B of the structural classification of β-lactamase
- First detected in clinical *Serratia marcescens* isolate from Japan in the late 1980s. The first acquired metallo-β-lactamase
- More than 30 different allotypes have been described. (IMP-1, IMP-2 . . .)
- The different IMP variants often have a defined geographical distribution.
- In Japan, IMP-1 metallo-β-lactamase have become endemic among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* since late 1990s.
- Most of the hospital microbiologist are aware of detecting metallo-β-lactamase by disk containing sodium mercaptoacetic acid (SMA)

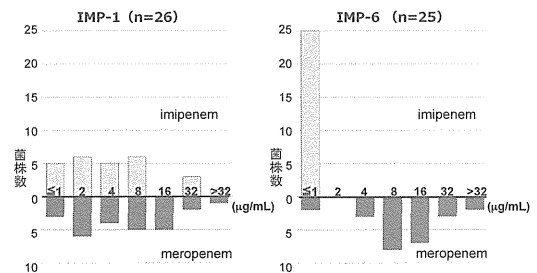
CPE is not always CRE

MIC distribution of IMP-1-type metallo-β-lactamase producing Enterobacteriaceae



In Japan, MICs are more frequently measured for imipenem

MIC distribution of IMP-1/IMP-6 metallo-β-lactamase producers.



Classification of β -lactamase genes

Ambler class	gene	resistance phenotypes						Inhibition by			
		penicillin + β -lactamase inhibitor (e.g. ACV)	3 rd generation cephalosporin (e.g. CAZ, CTX)	4 th generation cephalosporin	monobactam (e.g. aztreonam)	cephamycin (e.g. CMZ, CMN)	carbapenem (e.g. IPM, MEPM)	clavulanate	EDTA /SMA /DPA	PBA	cloxacillin
A	TEM SHV (ESBL)	S	R (S: CTX)	R	R	S	S	+	-	-	-
	CTX-M (ESBL)	S	R (S: CAZ)	R	R	S	S	+	-	-	-
	KPC	R	R	R	R	R	R	-	-	+	-
B (metallo- β -lactamase)	NDM IMP VIM TMB	R	R	R	S	R	R	-	+	-	-
C (AmpC β -lactamase)	CMY etc..	R	R	S	R	I/R	S	-	-	+	+
D	OXA-48	R	S	S	S	S	R	-	-	-	-

SMA: sodium mercaptoacetic acid, DPA: dipicolinic acid

ACV: amoxicillin/clavulanate, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CMZ: cefmetazole, CMN: cefminox, IPM: imipenem, MEPM: meropenem

microbroth dilution

colony suspension in 3ml Mueller-Hinton broth (ca. McFarland=1 / OD₆₀₀= 0.257)

↓

dilution (add 25 μ l to 12ml Mueller-Hinton broth)

↓

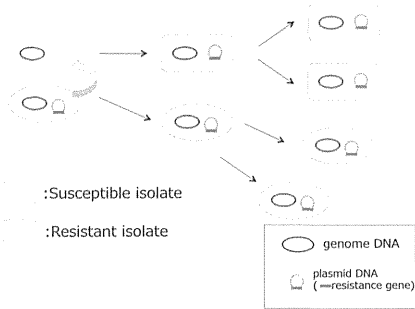
to plate (100 μ l/well)

↓

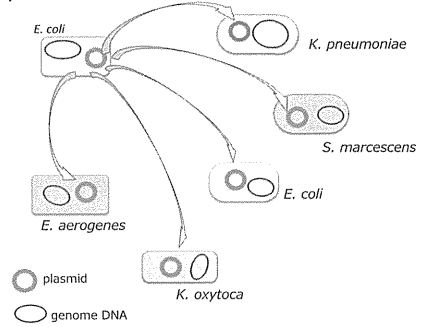
incubate at 37°C overnight

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CPFX 32	IPM 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	S/A 32/64
B	16	MEPM 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	16/32
C	8	LVFX 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	CAZ 32	CFPM 32	8/16
D	4	AMK 128	64	32	16	8	4	2	PL 4	16	16	4/8
E	2	CL 4	MINO 32	16	8	4	2	1	2	8	8	2/4
F	1	2	PIP/TAZ 256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	1	4	4	1/2
G	0.5	1	S/C 32/64	16/32	8/16	4/8	2/4	1/2	0.5	2	2	0.5/1
H	0.25	0.5	GM 64	32	16	8	4	2	1	1	1	GC

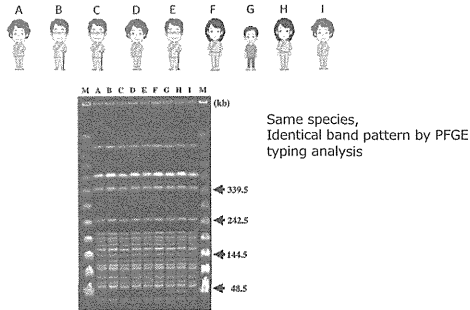
Plasmid
The drive force of resistance gene dissemination



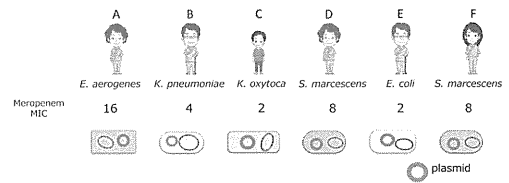
Inter-species transmission of resistant plasmid



“Typical” nosocomial transmission of resistant bacteria

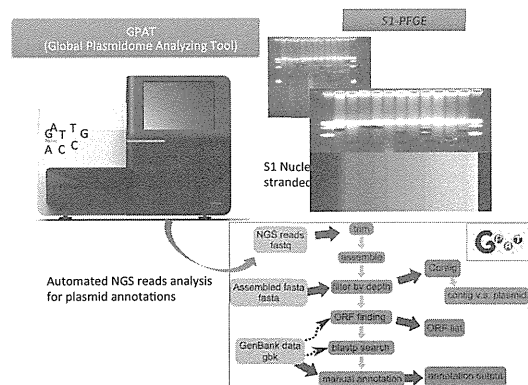
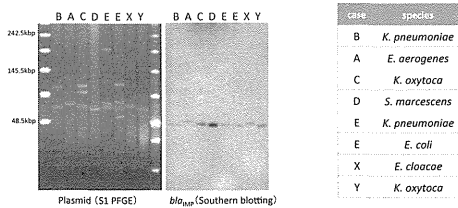


Nosocomial outbreak of CRE ?



Is this a nosocomial transmission??

S1 PFGE Southern blotting



Carba NP test

Aim

To detect a carbapenemase by change a color of phenol red

Materials

- bacteria on a plate (overnight culture)
- Lysis buffer (B-PERII, Bacterial Protein Extraction Reagent; Thermo)
- Imipenem-phenol red solution
- 96-well plate or 1.5 ml tube

Preparation of imipenem-phenol red solution

1. Dissolve 50 mg phenol red in 1 ml pure water after adding 1 drop 1N NaOH.
2. Add 9 ml pure water (0.5% phenol red solution).
3. Mix 2 ml 0.5% phenol red solution and 16.6 ml pure water, and adjust the pH 7.8 with 1N NaOH (drop each 3 μ L)
4. Dissolve 288 mg ZnSO₄ in 10 ml pure water.
5. Mix 2ml phenol red solution prepared in step 3 and 2 μ L ZnSO₄ solution prepared in step 4.
6. Dissolve 3 mg imipenem in 1 ml solution prepared in step 5.

Methods

1. Dispense 100 μ L lysis buffer in 1.5 ml tube or 96-well plate.
2. Scrape off with a 10- μ L loop and suspend in lysis buffer (two times).
3. Vortex for 5 min.
4. Incubate for 30 min, RT
5. Dispense 100 μ L imipenem-phenol red solution in 1.5 ml tube or 96-well plate.
6. A 30 μ L-volume of this lysate is mixed with imipenem-phenol red solution.
7. Incubate for 60-120 min, at 37 degree.
8. The color check with visual observation.

Reference

1. Patrice Nordmann *et al.* 2012. *Emerg Infect Dis.* 18:1503-7
2. Laurent Dortet *et al.* 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:6437-6440
3. Monica O' sterblad *et al.* 2014. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:7553-7556

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CPFX 32	IPM 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	S/A 32/64
B	16	MEPM 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	16/32
C	8	LVFX 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	CAZ 32	CFPM 32	8/16
D	4	AMK 128	64	32	16	8	4	2	PL 4	16	16	4/8
E	2	CL 4	MINO 32	16	8	4	2	1	2	8	8	2/4
F	1	2	PIPC/TAZ 256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	1	4	4	1/2
G	0.5	1	S/C 32/64	16/32	8/16	4/8	2/4	1/2	0.5	2	2	0.5/1
H	0.25	0.5	GM 64	32	16	8	4	2	1	1	1	GC

isolate No. _____

		MIC(μ g/ml)
IPM	imipenem	
MEPM	meropenem	
LVFX	levofloxacin	
CPFX	ciprofloxacin	
AMK	amikacin	
CL	colistin	
MINO	minocycline	
PIPC /TAZ	piperacillin/tazobactam	
S/C	sulbactam/cefoperazone	
GM	gentamicin	
PL	polymyxin B	
CAZ	ceftazidime	
CFPM	cefepime	
S/A	sulbactam/ampicillin	

isolates (AMR course at NIID)

	isolates No.	species	Memo (resistance genes etc...)
MDRP	10-654	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	10-655	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	10-747	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
MDRA	12-277	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	09-775	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
CRE	13-273	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	10-810	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	10-811	<i>Escherichia coli</i>	
	10-822	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	11-327	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	12-143	<i>Escherichia coli</i>	
	13-367	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	06-358	<i>Escherichia coli</i>	
	06-359	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	06-355	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	08-1508	<i>Escherichia coli</i>	

PCR

1. DNA extraction

plate culture (incubated overnight at 37°C)

↓

colony suspension in 500µl sterile water (ca. McFarland 0.5)

↓

boil 100°C, 10min

↓

centrifugation 13000rpm, 4°C, 5min

↓

collect the supernatant (100µl) to other tube

2. reaction mix

PCR sheet

Date _____

		×	(number of samples+3)	Total volume
PCR beads*	1			
sterile water	22µl			
Forward primer (20µM)	1µl			
Reverse primer (20µM)	1µl			
template DNA	1µl			
Total	25µl			

*illustra Hot Start Mix RTG Bead, which includes: dNTPs, PCR buffer, Mg⁺⁺, Taq(enzyme)

primer type (gene type) _____

#1	13-273 <i>K. pneumoniae</i>
2	10-810 <i>K. pneumoniae</i>
3	10-822 <i>K. pneumoniae</i>
4	11-327 <i>K. pneumoniae</i>
5	10-654 <i>P. aeruginosa</i>
6	positive control
7	negative control

primer list (carbapenemase genes)

gene type	primer sequence (5' →3')	amplicon size
NDM type	F: TTGCCAATATTATGCACCC R: ATTGGCATAAGTCGCAATCC	420bp
KPC type	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCC	893bp
IMP-1 type	F: ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC R: ACAACCAGTTTTGCCTTACC	587bp
IMP-2 type	F: GTTTTATGTGTATGCTTCC R: AGCCTGTTCCCATGTAC	678bp
VIM-2 type	F: ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG R: CTAACAACGACTGAGCG	801bp
OXA-48-like	F: TTGGTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTGTGATGGC	744bp

PCR program

94°C	2min	} 30 cycle
94°C	1min	
55°C	1min	
72°C	1min30sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

Reference

- Shibata N *et al.* 2003. J Clin Microbiol. 41(12):5407-13
- Poirel L *et al.* 2004. Antimicrob Agents Chemother. 48(1): 15-22