

< positive control DNA list >

1. class A  $\beta$ -lactamase gene (non-carbapenemase)

gene type (gene)	tube label	primer sequence (5' →3' )	amplicon size
TEM (TEM-26)	TEM	F:CCGTGTCGCCCTTATTCC R:AGGCACCTATCTCAGCGA	824bp
SHV (SHV-12)	SHV	F:ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC R:TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1051bp
CTX-M-1 group (CTX-M-3)	CTX-M-1	F:GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC R:CCATTGCCCGAGGTGAAG	516bp
CTX-M-2 group (CTX-M-2)	CTX-M-2	F:ACGCTACCCCTGCTATTT R:GCTTTCCGCTTCTGCTC	779bp or 780bp
CTX-M-9 group (CTX-M-14)	CTX-M-9	F:GCAGATAATACGCAGGTG R:CGGCGTGGTGGTGTCTCT	393bp

Reference

Tagi T et al, 2000. FEMS Microbiol Lett 184:53-56

Shibata N et al, 2006. Antimicrob Agents Chemother 50(2):791-795

2. carbapenemase gene

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

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

### 3. Plasmid-mediated AmpC $\beta$ -lactamase gene

gene type (gene)	tube label	primer sequence(5' →3' )	amplicon size
MOX (MOX-1)	MOX	F:GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT R:CACATTGACATAGGTGTGGTC	520bp
CIT (CMY-2)	CIT	F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R:TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462bp
DHA (DHA-1)	DHA	F:AACITTCACAGGTGTGCTGGGT R:CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405bp
ACC	ACC	F:AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R:TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346bp
EBC (ACT-1)	EBC	F:TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG R:CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302bp
FOX	FOX	F:AACATGGGGTATCAGGGAGATG R:CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190bp

#### Reference

Perez-Perez FJ 2002. J Clin Microbiol 40 (6) :2153-2162

**Screening for  $\beta$ -lactamase production (Disk diffusion tests)**

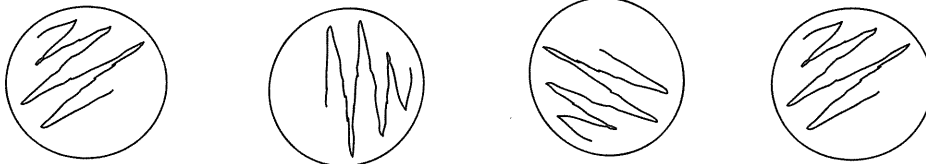
plate culture (incubated overnight at 37°C)



colony suspension in sterile water or saline (ca. McFarland 0.5)



inoculate an Mueller-Hinton agar plate by swab.



place disks containing antimicrobials and/or inhibitor.

\*The distances between antimicrobial disk and inhibitor disk are very important!!!

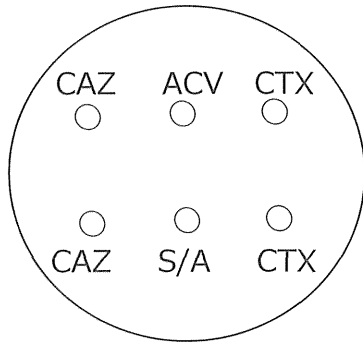


incubation (35±2°C, 16~20hrs)

① Screening for ESBLs (extended spectrum  $\beta$ -lactamase)

[Double disk diffusion synergy test]

ESBLs: TEM, SHV, CTX-M- etc.



CAZ: ceftazidime  
 CTX: cefotaxime  
 ACV: amoxicillin/clavulanic acid  
 S/A: sulbactam/ampicillin

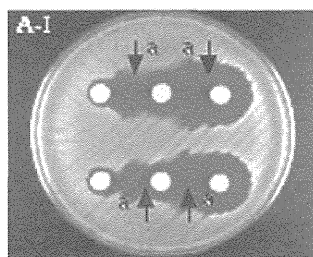
\* \_\_\_ : inhibitor

\*amoxicillin, ampicillin: Penicillin

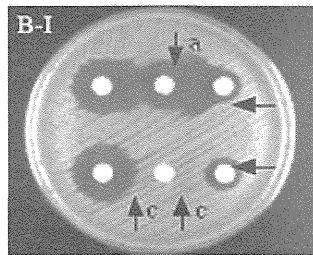
ceftazidime, cefotaxime: 3rd generation cephalosporin

Results

zone diameter	Inhibited by	
	ACV and S/A	only ACV
CTX > CAZ	<b>TEM-, SHV-</b>	pending (check by PCR)
CTX < CAZ	pending (check by PCR)	<b>CTX-M-</b>
CTX = CAZ	pending (check by PCR)	pending (check by PCR)



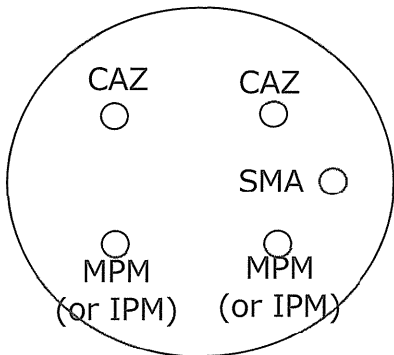
TEM-, SHV-



CTX-M-

## ② Screening for metallo-β-lactamase producers

metallo-β-lactamases: NDM-, IMP-, VIM- etc.



CAZ: ceftazidime

MPM: meropenem

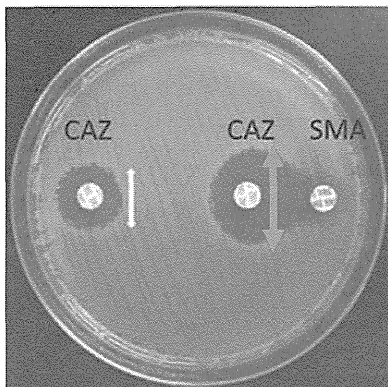
IPM: imipenem

SMA: sodium mercaptoacetic acid

\* \_\_\_ : inhibitor

\*ceftazidime: 3rd generation cephalosporin  
meropenem, imipenem: carbapenem

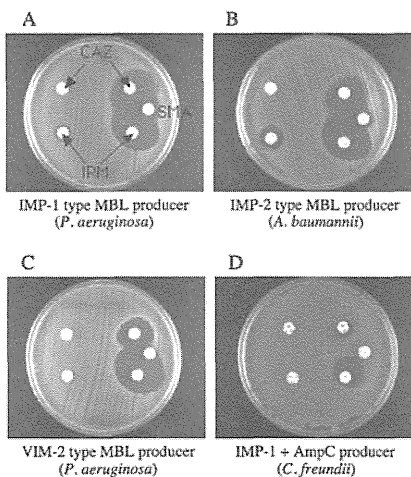
### Results



For metallo-β-lactamase producers, a clear expansion of growth inhibition zone appears between the disks containing CAZ/MPM and SMA. (Right arrow)

Direction of expansion: vertical to CAZ/MPM-SMA → positive

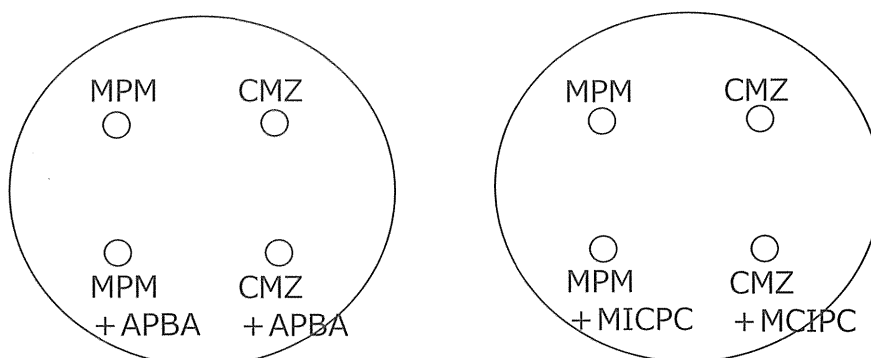
parallel to CAZ/MPM-SMA → negative (basically)



### Reference

J Clin Microbiol 2003, 41:5407-5413

### ③ Screening for KPC and AmpC producers



CMZ: cefmetazole

MPM: meropenem

APBA: 3-aminophenyl boronic acid (+10 $\mu$ l)

MICPC: cloxacillin (+10 $\mu$ l)

\* \_\_\_ : inhibitor

\*cefmetazole: cephamycin

meropenem: carbapenem

ABPA solution  
50mg/ml in DMSO  
store at -20 $^{\circ}$ C

MICPC solution  
20mg/ml in sterile water  
store at -20 $^{\circ}$ C

### Results

Inhibited by			
only APBA	APBA + MICPC	only MICPC	none
<b>KPC</b>	<b>AmpC</b>	pending (check by PCR)	not producing KPC/AmpC

### Reference

Antimicrob Agents Chemother 2009, 53:146-149

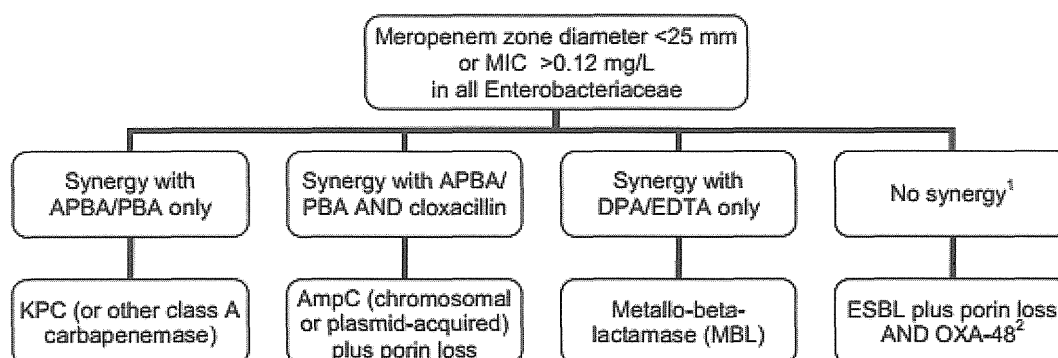
J Clin Microbiol 2005, 43:4163-4167

**Reference**

EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (Version 1.0)

**Recommended methods for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae**

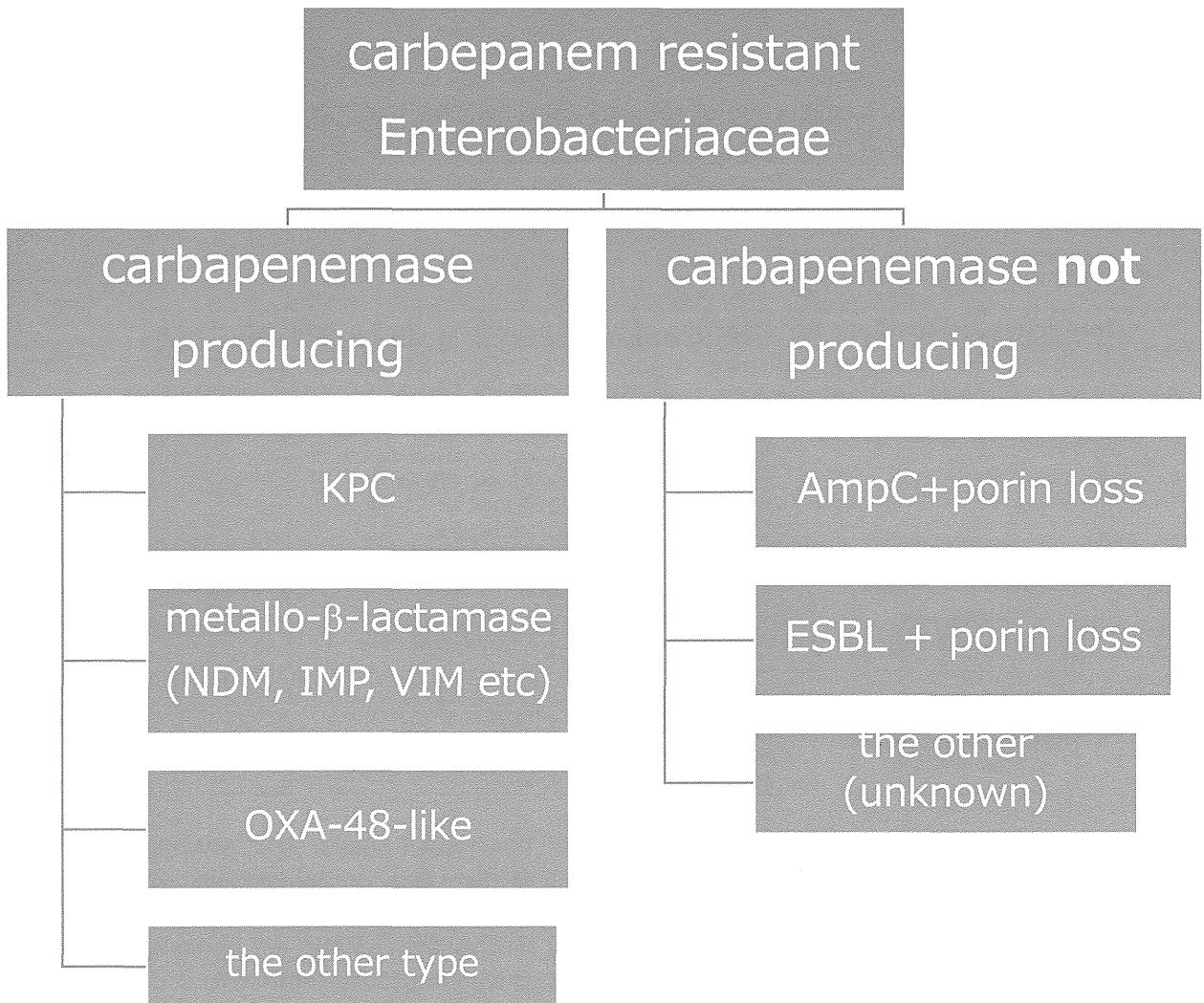
Figure 1. Algorithm for carbapenemase detection.



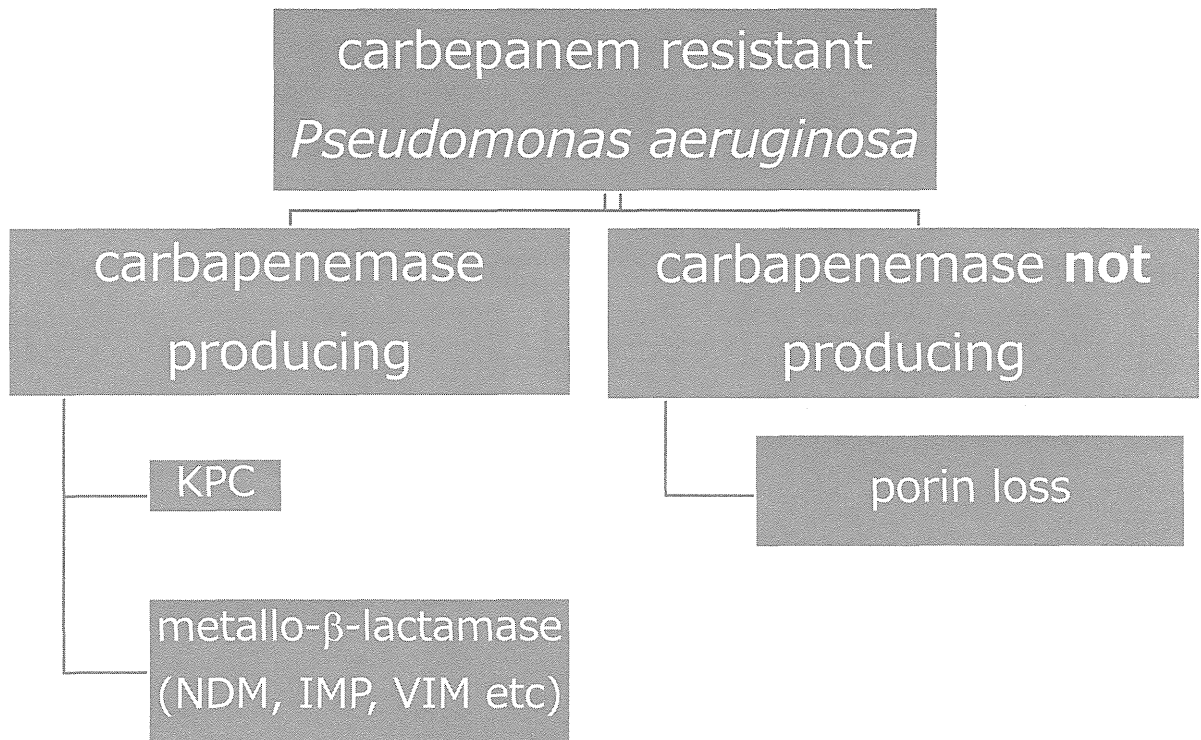
Abbreviations: APBA=aminophenyl boronic acid, PBA=phenyl boronic acid, DPA=dipicolinic acid, EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid (all of them β-lactamase inhibitors added to disks or tablets containing meropenem in combination disk testing assays)

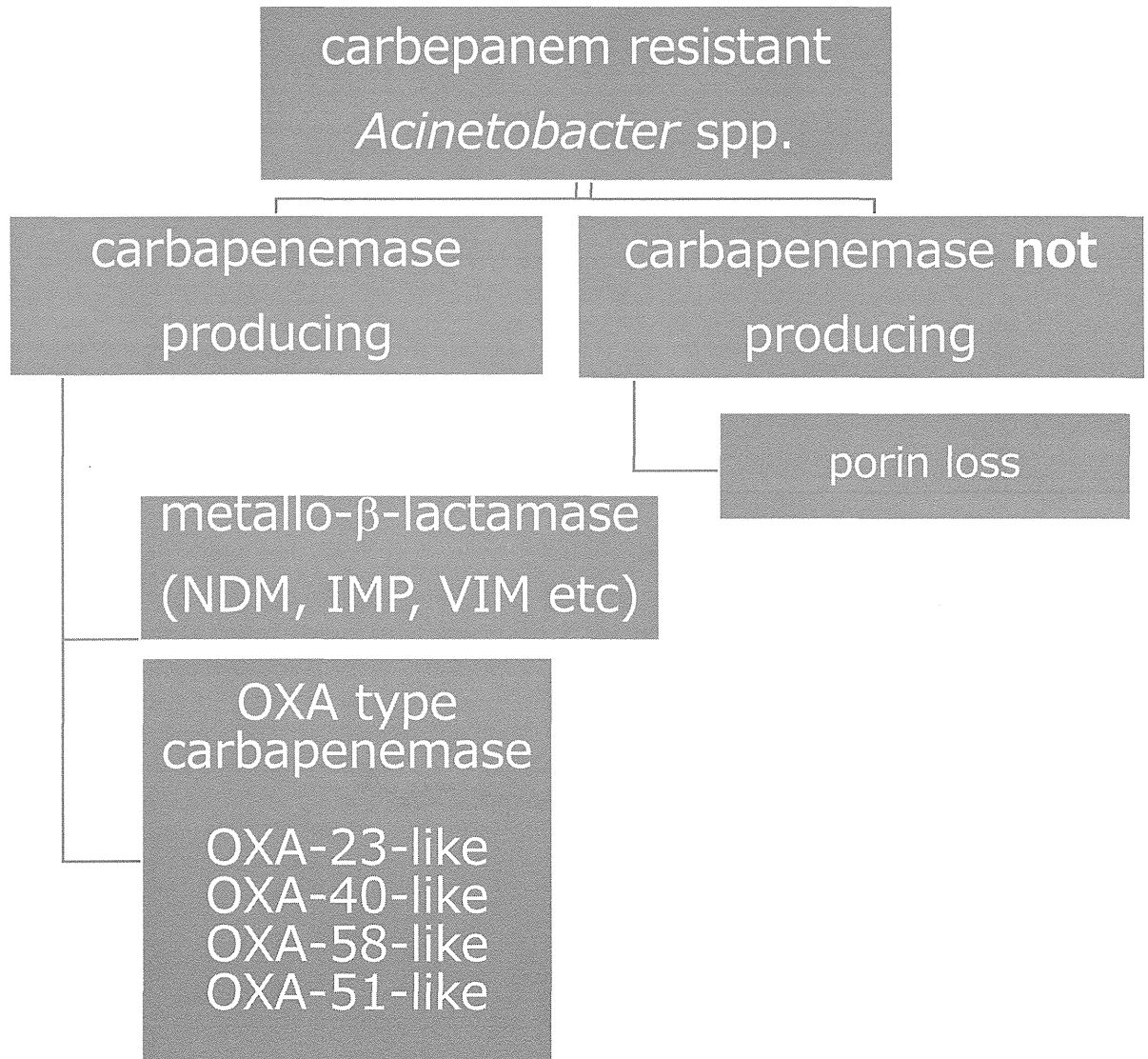
<sup>1</sup> Combination of KPC and MBL may not show synergy but isolates are normally highly resistant to carbapenems. They are easiest to detect with molecular methods.

<sup>2</sup> High-level temocillin resistance [MIC >32 mg/L (12, 18), tentative zone diameter <11 mm with temocillin 30 µg disk (17)] are phenotypic indicators of OXA-48 production, which should be considered in the absence of synergy with inhibitors of class A and B carbapenemases.









1. Please write in which Ambler's class does each  $\beta$ -lactamase belong to.

KPC ( )

NDM ( )

OXA-48 ( )

IMP ( )

SHV ( )

VIM ( )

CTX-M ( )

TEM ( )

2. These are the  $\beta$ -lactamase inhibitor. Which Ambler's class of  $\beta$ -lactamase will they inhibit?

clavulanic acid ( )

EDTA ( )

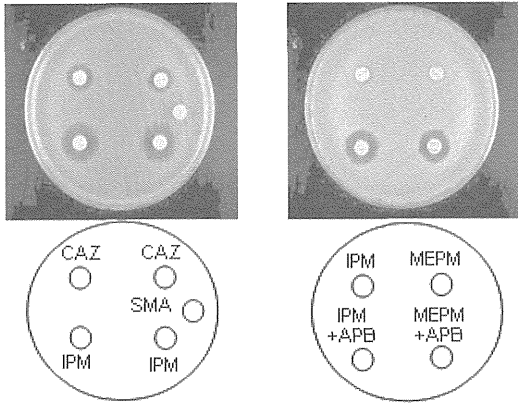
3-aminophenyl boronic acid ( )

sodium mercaptoacetic acid ( )

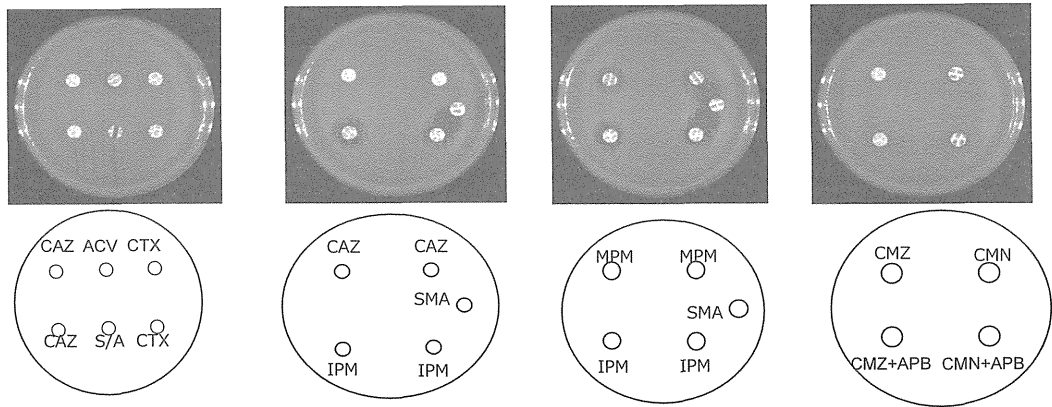
sulbactam ( )

cloxacillin ( )

⑤ NIID No.MRY12-19 *Klebsiella pneumoniae*

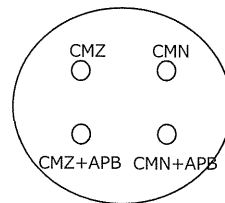
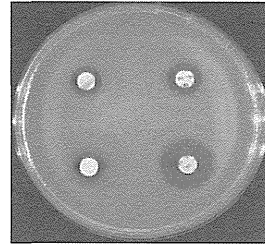
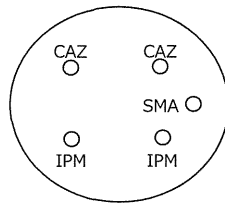
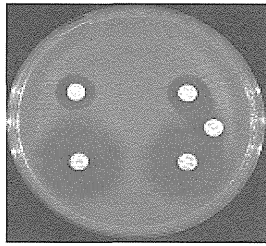
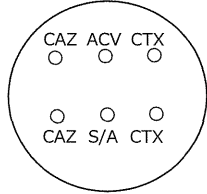
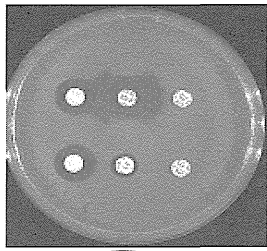


⑥ NIID No.MRY14-134 *Escherichia coli*



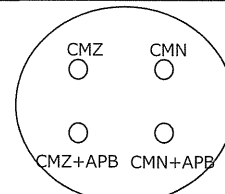
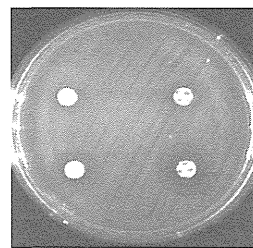
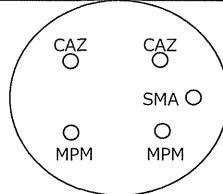
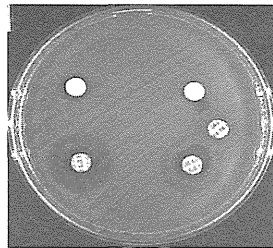
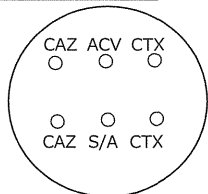
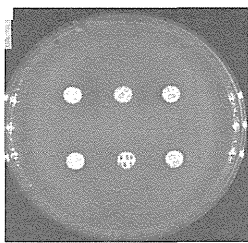
⑦ NIID No.MRY14-348

*Escherichia coli*



⑧ NIID No. MRY13-284

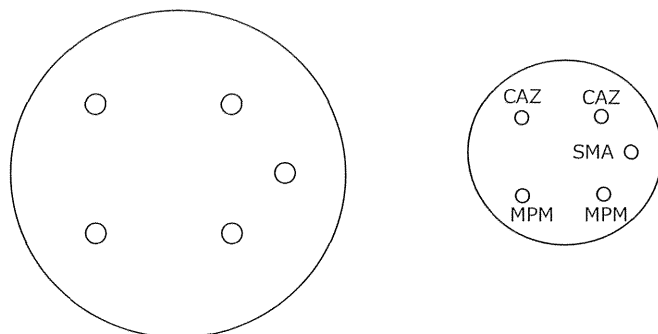
*Escherichia coli*



isolate No. :

Species : *Acinetobacter* spp.

**1. Screening for metallo-β-lactamase producers**



< comments >

**2. PCR**

metallo-β-lactamase genes <sup>1)</sup> (Class B β-lactamase)		OXA-type carbapenemase genes <sup>2), 3)</sup> (Class D β-lactamase)	
IMP-1 type		OXA-51-like	
IMP-2 type		OXA-23-like	
VIM-2 type		OXA-24-like	
		OXA-58-like	
		<i>ISAbal</i> -OXA-51-like	

Reference

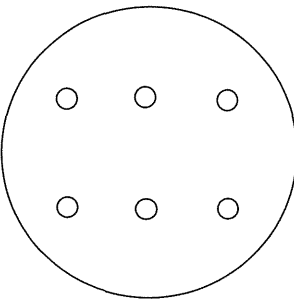
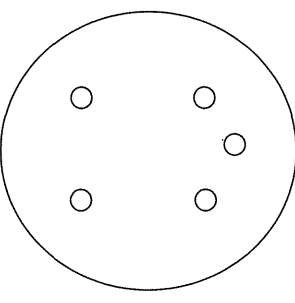
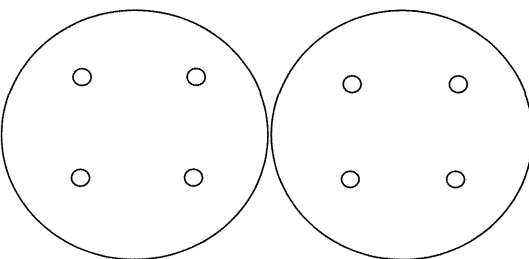
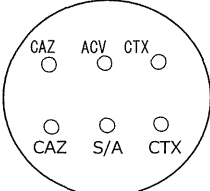
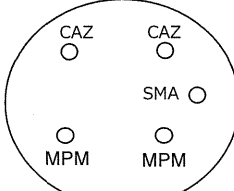
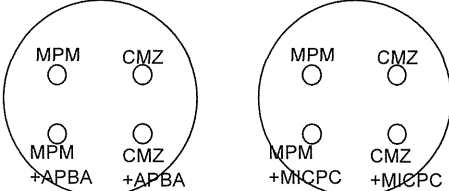
- 1) Shibata N *et al.* 2003. J ClinMicrobiol. 41(12):5407-13
- 2) Woodford N *et al.* 2006. Int J Antimicrob Agents. 27(4):351-353
- 3) Turton JF *et al.* 2006. FEMS MicrobiolLett. 258(1):72-77

Isolate No. :

Species :

**1. Carba NP test**

**2. disk diffusion test**

① Screening for ESBLs	② Screening for metallo-β-lactamase	③ Screening for KPC and AmpC
		
		
comments	comments	comments

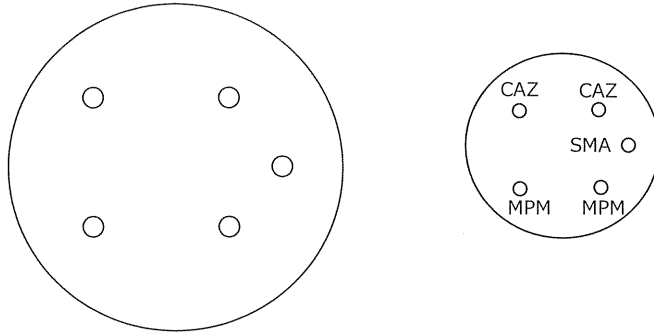
**3. PCR**

Carbapenemase genes		Class A β-lactamase genes (except KPC type)		plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes (class C β-lactamase)	
NDM type		TEM-		MOX	
KPC type		SHV-		CIT	
IMP-1 type		CTX-M-1 group		DHA	
IMP-2 type		CTX-M-2 group		EBC	
VIM-2 type		CTX-M-9 group		FOX	
OXA-48-like				ACC	

isolate No. :

Species : *Pseudomonas aeruginosa*

**1. Screening for metallo- $\beta$ -lactamase producers**



< comments >

**2. PCR**

metallo- $\beta$ -lactamase genes (Class B $\beta$ -lactamase)	
IMP-1 type	
IMP-2 type	
VIM-2 type	

Reference

Shibata N *et al.* 2003. J Clin Microbiol. 41(12):5407-13



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）

病原体ゲノム情報の取得とデータベース運用

担当責任者 黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）  
研究協力者 山下明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

近年特に大きな問題となっているデングウイルスの感染伝播状況を把握するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) database から計 7,933 株分のデングウイルス・ゲノム配列を取得し、serotype, genotype 毎に分類して Google Maps にて分布地図を作成した。世界各国で分離されるデングウイルスの genotype には特徴的な地理的要因が背景にあり、それはデングウイルスの蚊を媒介とする感染伝播ライフサイクルに起因するものと推測された。また、検疫所にて報告される輸入感染症例もマップ上で理解できる web サイトを構築し、海外渡航前に感染リスク因子を予め把握し、渡航中における注意喚起にも役立つ web サイトになるものと期待している。今後、アジア各国と日本を有機的に結び付けるシステムを確立するため、他の病原体ゲノム情報のマップ化を推進していく予定である。

A. 研究目的

多くの新興・再興感染症が発生し、インフルエンザ、デング熱、薬剤耐性菌感染症、下痢性感症は特に近年我が国にとって近年大きな問題となっている感染症である。これら感染症に対して適切な感染症対策の立案と新たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が求められている。これら感染症はアジアにおいての発生が問題となることから、アジアにおいて分布するこれら各種病原体のゲノム情報は有効な情報源となり、ゲノム情報を基盤とした発生分布と疫学への情報提供は効果的な対策となりうる。

本研究においては、近年特に大きな問題となるインフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌およびノロウイルスに関して、アジア各国と日本を有機的に結び付けるシステムを確立し、アジアにおいて流行している病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し、さらにデータベースが継続的に維持されるため基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) デングウイルスの公開配列情報の取得

デングウイルス・ゲノム配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) database

から計 7,933 株分を取得し、表記されている serotype, genotype 毎に分類した。公開データベースの取得と genotype 分類の基本的な解析手法は

Yamashita A, Sasaki T, Kurosu T, Yasunaga Y, Ikuta K. Origin and distribution of divergent dengue virus: novel database construction and phylogenetic analysis. Future Virology. 2013, 8(11): 1061-83. (査読有)

<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.13.99>

にて報告している。

2) Google Maps によるデングウイルスの頻度と分布地図の図示化。

Google Maps の地図情報（フリーライセンス）を元にしてデングウイルスの serotype と genotype を分離国ごとにパイチャートとして表示した。配列データベースは MySQL で管理し、地図上への描画は Java script D3.js にて開発した。

（倫理面への配慮）

特記事項無し。公開配列情報を用いたデングウイルス・データベースの構築であり、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

NCBI 配列データベースに配列登録されている 7,933 株のデングウイルスを serotype ごとに Google Map 上にパイチャートで閲覧可能にし、分離国における各 serotype の頻度（実態数ではなく、配列登録数である）と分布状況が俯瞰的に理解できるようにした（図 1）。デング熱発生国の実情がこのマップ図示化により把握しやすくなった。Serotype 1 (2,855 株), 2 (2,615 株), 3 (1,706 株), 4 (757 株) ごとに genotyping が施されているため、判明している genotype ごとの分類を行った。

Serotype 1 では、Genotype I が東南アジアで優位であり、一方、Genotype V がアメリカ大陸で優位であることが容易に把握できるようになった（図 2）。特にポリネシア諸国における genotype IV が優位であることは特筆すべきことに見える。

Serotype 2 では、Genotype Cosmopolitan が東南アジアで優位であり、一方、Genotype AsianAmerican がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できた。東南アジア諸国の中でも異なる genotype が優位になっており、serotype 1 とはまた違う genotype 分布であることが判明した（図 3）。

Serotype 3 では、Genotype I, II が東南アジアで優位であり、一方、Genotype III がアメリカ大陸で優位であることが理解できた（図 4）。

Serotype 4 では、東南アジア、ポリネシア諸国、アメリカ大陸と明瞭に分布が別れることが判明した（図 5）。

これらマップ図をマウス操作で自在に拡大縮小し、近隣国における検出 genotype の登録状況の閲覧を容易にした。シンガポールでは複数の genotype が検出される一方、ベトナム、カンボジアでは特有の genotype I が優位であり、インドでは Genotype V が主になっていた（図 6）。

日本のデング熱症例は輸入症例が主体であり、検疫所から報告のあったデング熱輸入感染症例（<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1493-iasr-ta>）を Google map へ図示化した。

#### D. 考察 E. 結論

デングウイルスは、主にヤブカとりわけネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) によって媒介され、ウイルスは主にヒトを宿主とするが、ヒト以外の

サル目にも伝染し感染を媒介することが知られている。公開配列データベースの serotype そして genotype として分類してさらにマップ図示化することにより明解な地域依存的な genotype 分布が示唆された。1943 年から 2012 年までの分離株情報が登録されており、年代推移を時系列として分布を表示することも可能にしているため、genotype の変遷も理解することができる。ウイルス情報をゲノム配列として取得し、serotype, genotype として詳細に分類することで、デングウイルスの感染伝播のライフサイクルの理解にも役立つだろう。今後、感染症対策に立案にも役立つような疫学調査システムになるよう発展させたい。

また、検疫所にて報告される輸入感染症例もマップで一目瞭然に理解できるため、海外渡航前に感染リスク因子を予め把握して渡航中における注意喚起を促すことにも役立つことと期待している。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表 1. 論文発表 なし

2. 学会発表  
NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22nd - 23rd January, 2015. Venue; Sunshine City Conference Room No. 14. The fifth floor, World Import Mart Building, 3-1-1 Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo, JAPAN. "Pathogen Genomics for Public Health" Makoto KURODA.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし

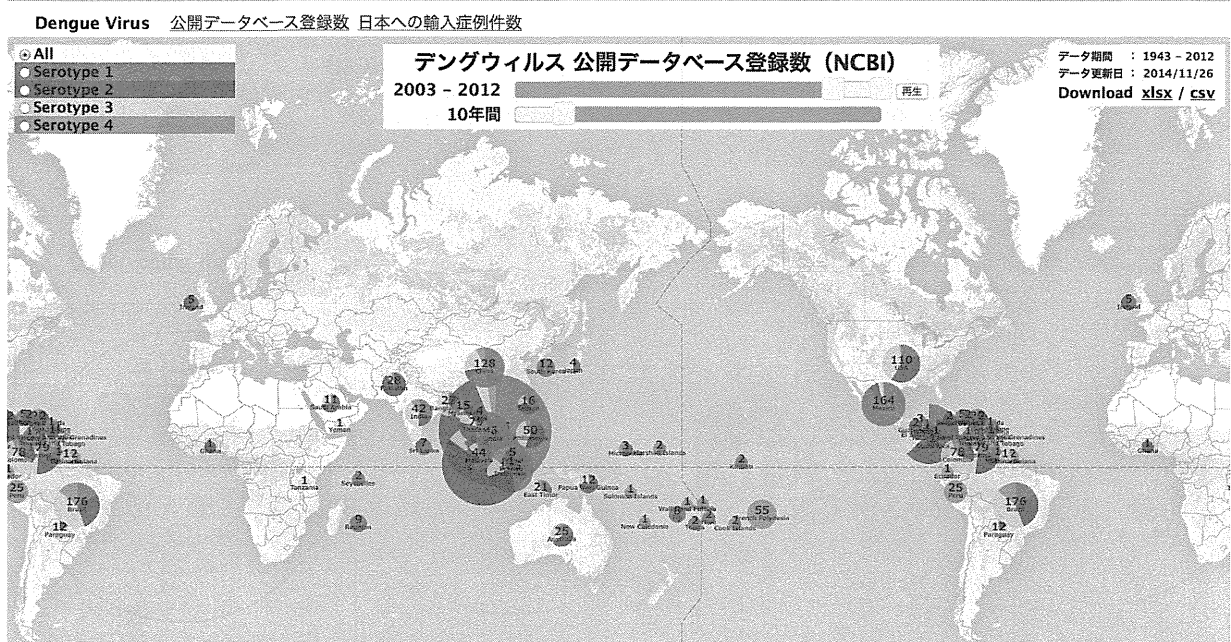


図1 デングウイルス公開データベースと Google Map 上での図示化（血清型別）。NCBI 配列データベースに登録されている 7,933 株のデングウイルスを serotype ごとにパイチャートで閲覧可能にした。Serotype 1 (2,855 株), 2 (2,615 株), 3 (1,706 株), 4 (757 株)。

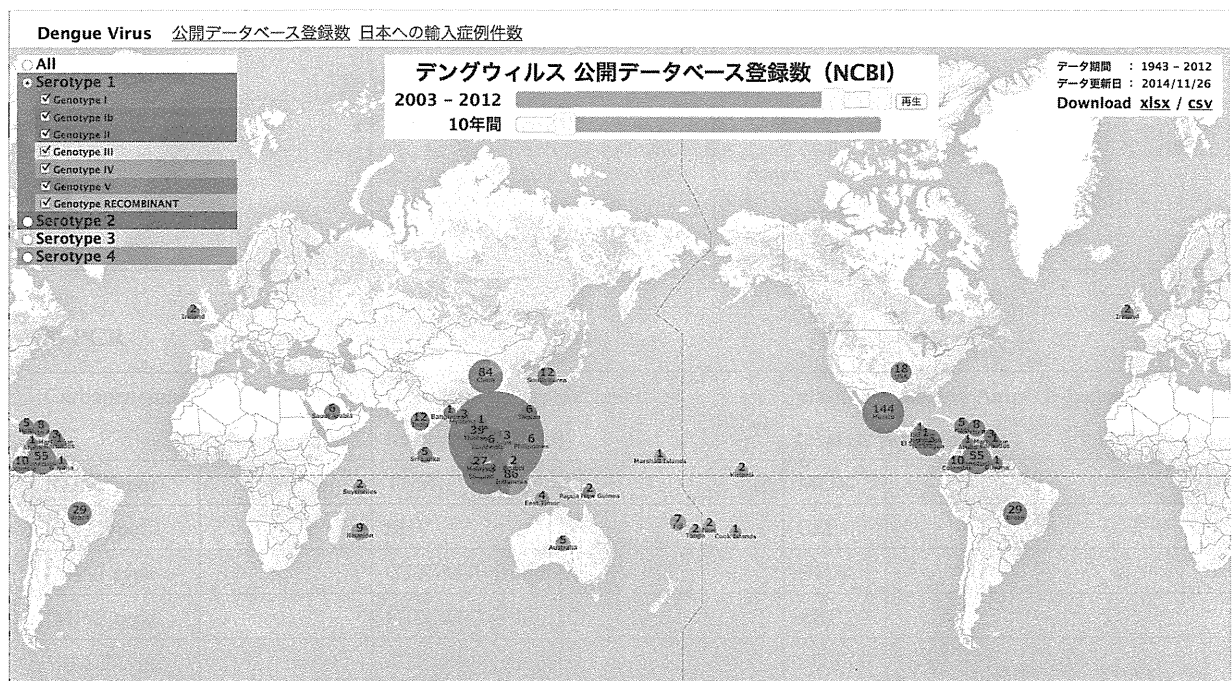


図2 デングウイルス serotype 1 (2,855 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。Genotype I が東南アジアで優位であり、一方、Genotype V がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。

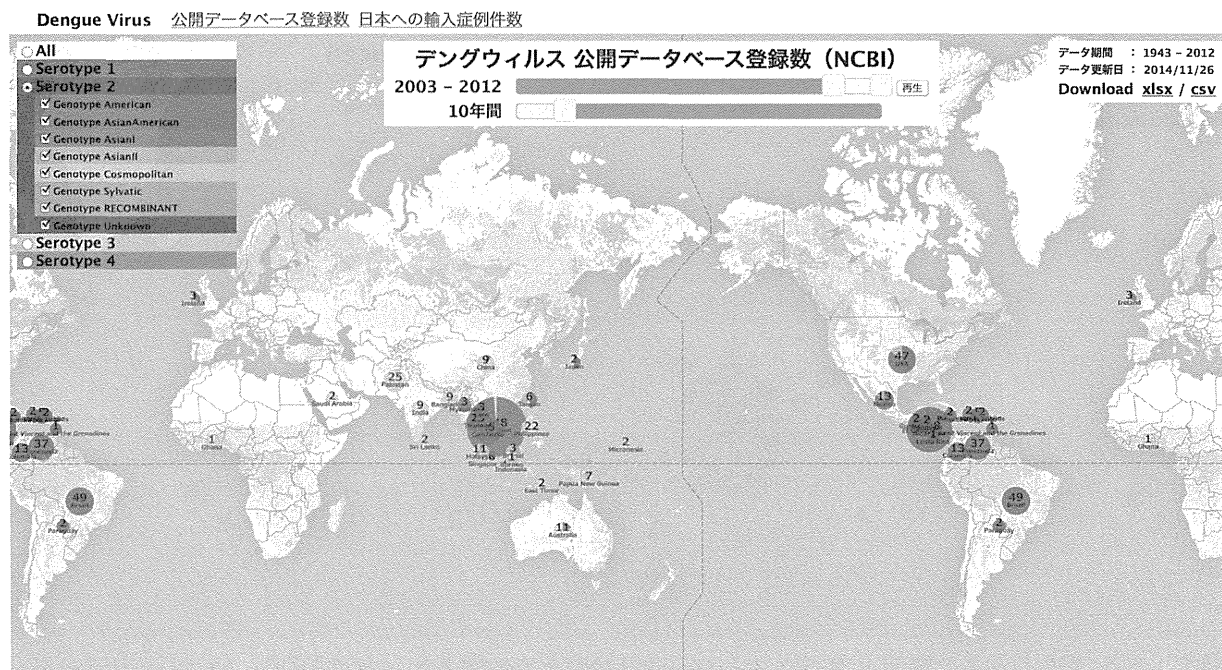


図3 デングウイルス serotype 2 (2,615 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。Genotype Cosmopolitan が東南アジアで優位であり、一方、Genotype AsianAmerican がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。

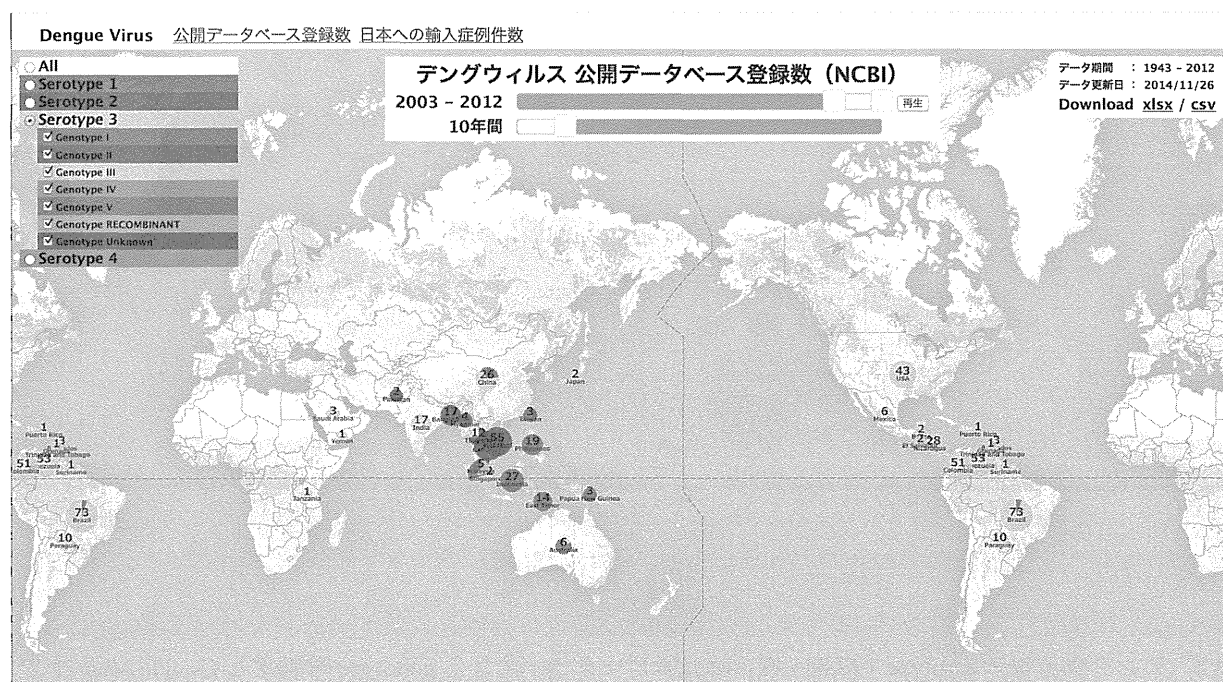


図4 デングウイルス serotype 3 (1,706 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。複数の Genotype が東南アジアで検出され、一方、Genotype III がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。