

分子疫学解析 薬剤耐性菌

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター
松井 真理

本日の内容

- 薬剤耐性菌の分子疫学解析、対象と方法

薬剤耐性遺伝子

染色体 (PFGE, MLST)

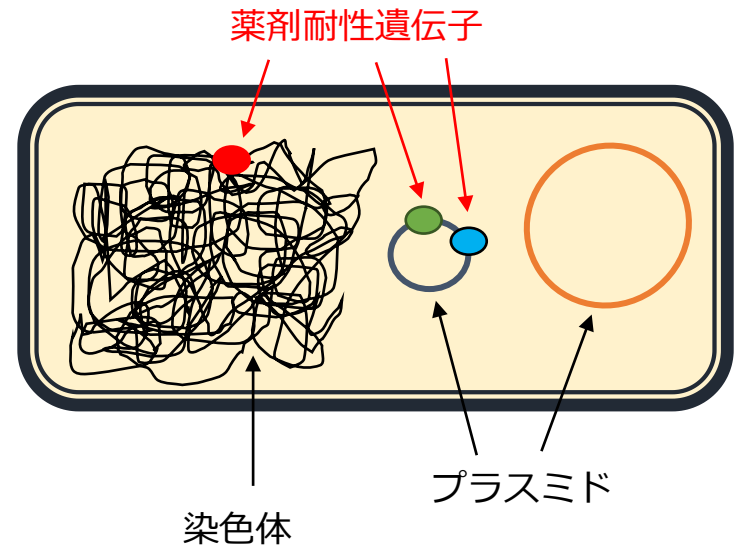
プラスミド

- 解析事例紹介

プラスミド水平伝達を介したIMP-6カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌のアウトブレイク

薬剤耐性菌の分子疫学解析、対象と方法

- 菌種、薬剤感受性パターン
- 薬剤耐性遺伝子
PCR
シーケンス
- プラスミド
Inc typing
pMLST (plasmid MLST)
whole plasmid genome sequencing
- 染色体
パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法
Multilocus Sequence Typing (MLST)
core genome MLST (cgMLST)
whole genome sequencing

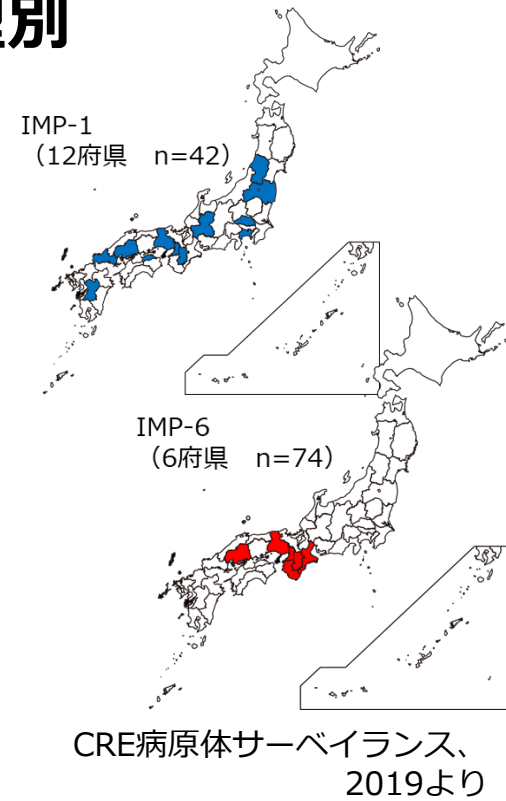
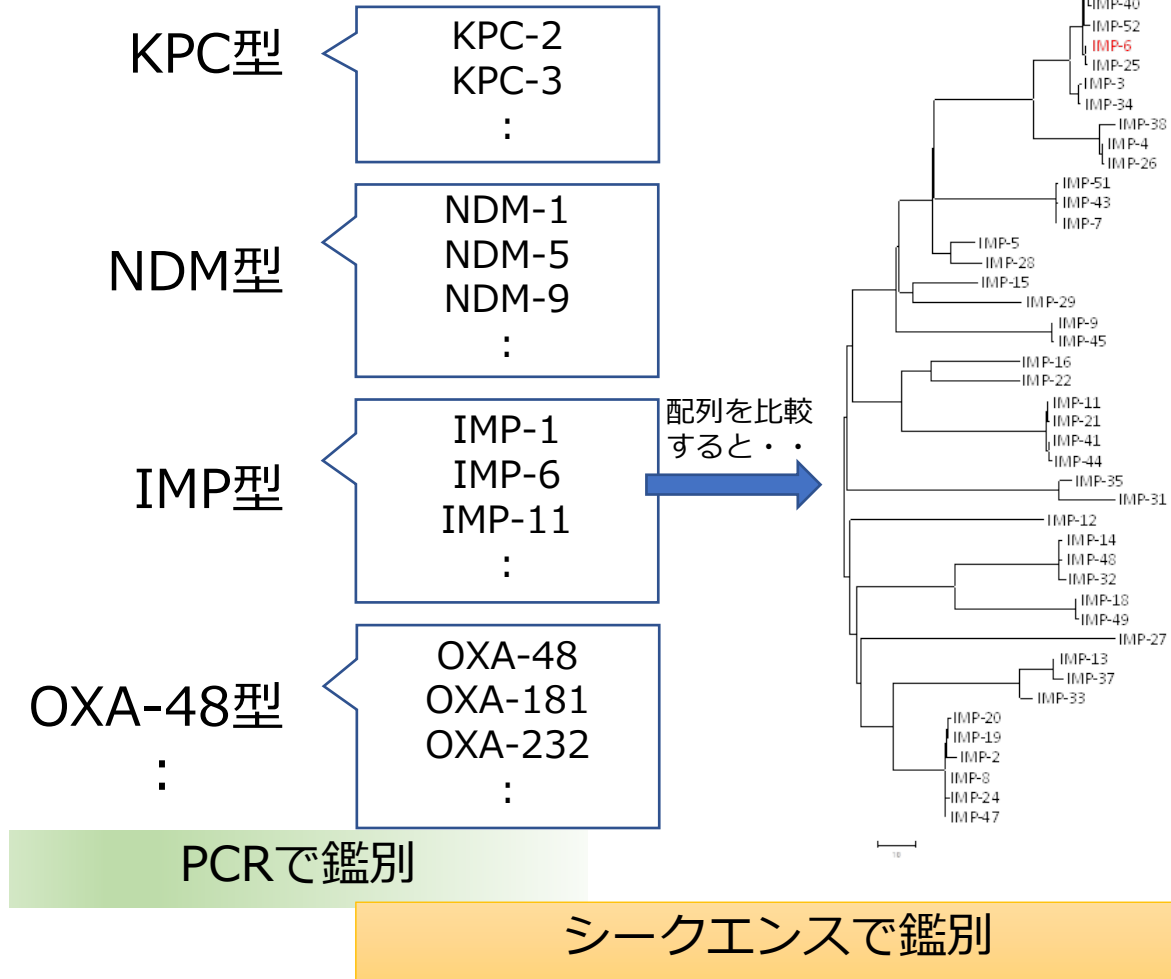


何を対象にどこまで解析するのか
目的に応じた検討が必要

保有する薬剤耐性遺伝子による型別

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)

例) カルバペネマーゼ遺伝子による型別

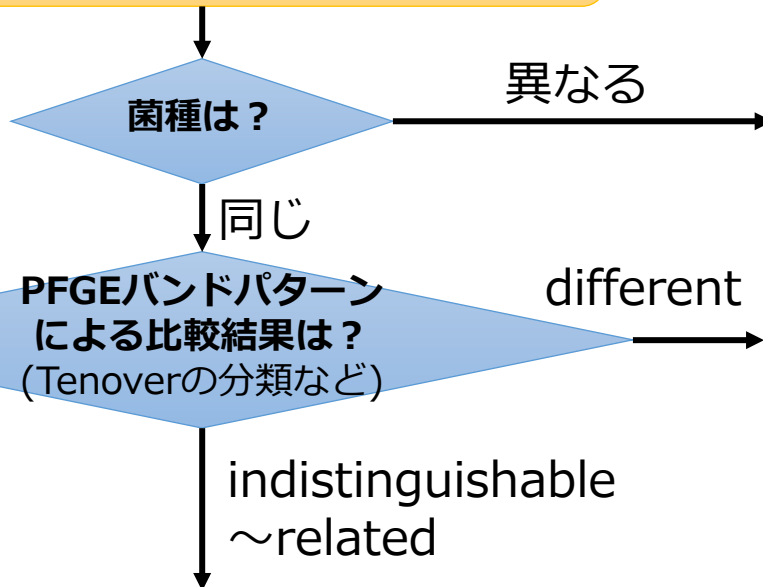


アウトブレイク中に異なる耐性遺伝子に変化することは稀
→ 耐性遺伝子が異なれば異なる由来と考えられる、遺伝子によって疫学分布も異なる

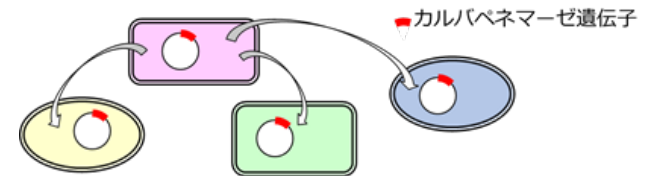
カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）のタイピング解析

同一のカルバペネマーゼ遺伝子保有株の集積
(IMP-1, NDM-5など、遺伝子配列も一致)

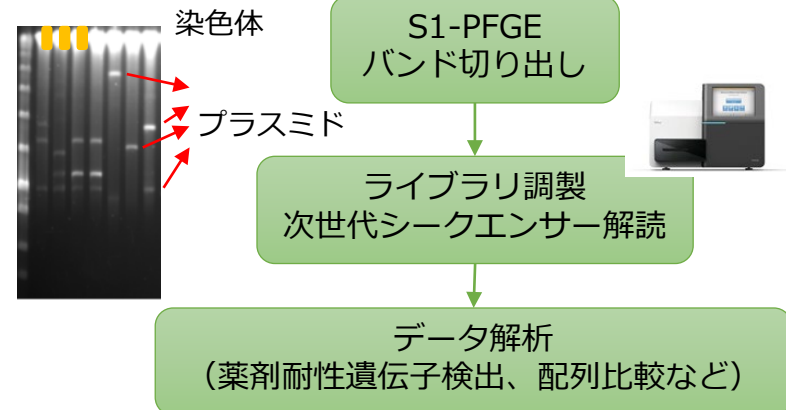
*保有するカルバペネマーゼ遺伝子が異なる場合は、
菌株間の関連は否定的



カルバペネマーゼ遺伝子を含む共通のプラスミド
を保有する可能性は否定できない
(検査結果だけでなく疫学情報もふまえて解釈する
必要あり)

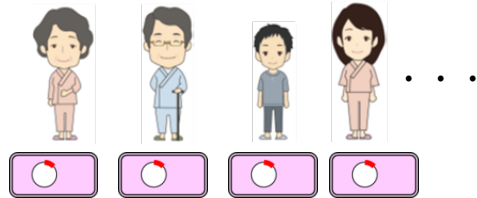
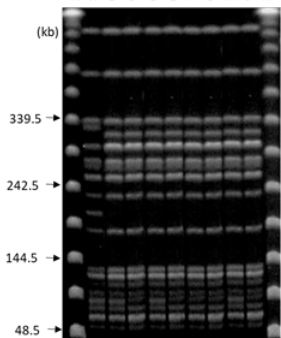


プラスミドの比較解析の実施例
統一的な解析手法、明確な解釈基準はまだ確立
されていない (AMED研究班 共同研究プロジェ
クトにて検討中)

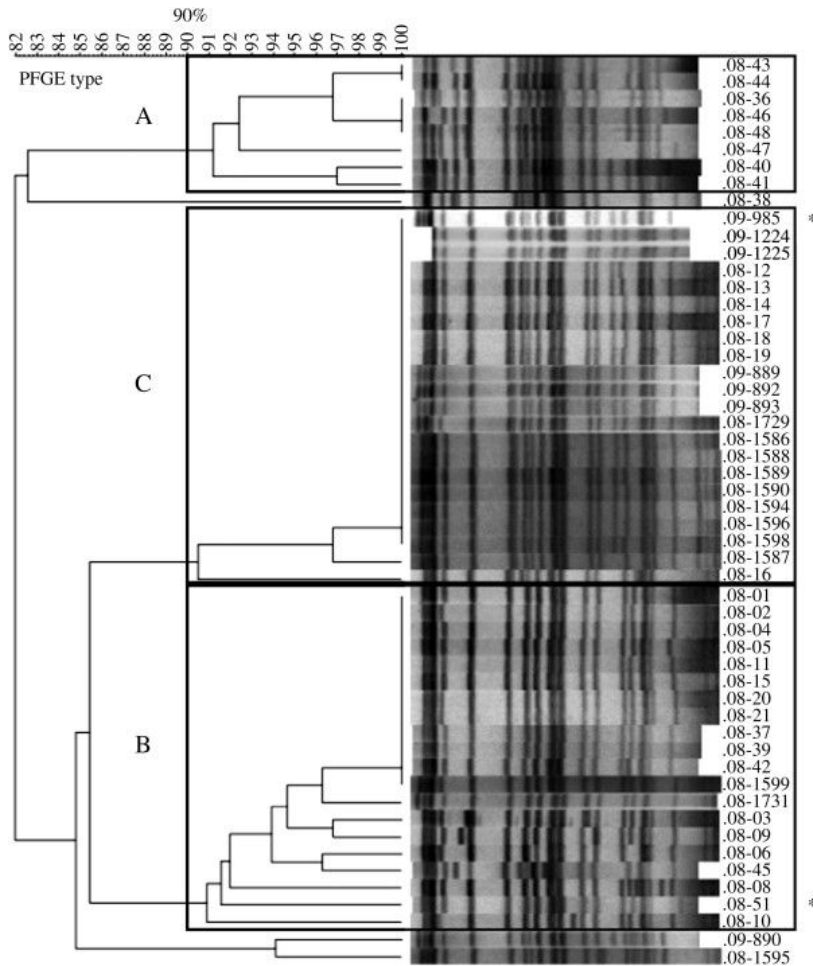


同一株由来の可能性

(検査結果だけでなく、疫学情報もふまえて解釈
する必要あり)



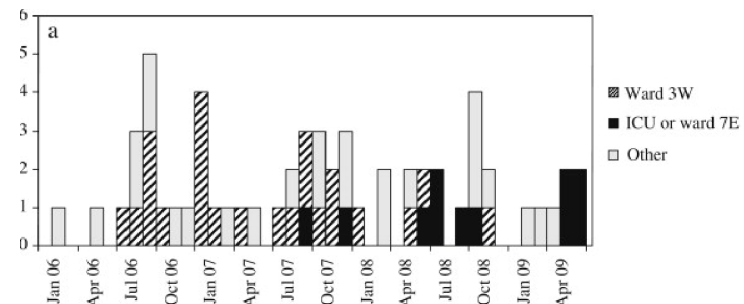
PFGEによる薬剤耐性菌のタイピング解析



多剤耐性緑膿菌の解析例

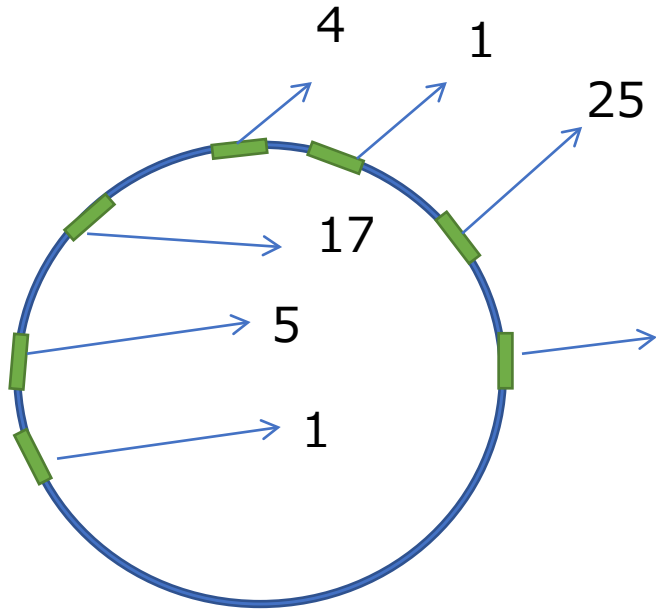
Tsusui A, et al. Journal of Hospital Infection
2011, Volume 78, Issue 4, Pages 317-322

- 症例の多くが保菌者
 - 数か月～数年経過した後に調査がはじまる
 - 多くの症例が、連続したヒト-ヒト感染・ヒト-環境-ヒト感染によって病原体を獲得
- ↓
- 同一アウトブレイク関連株であっても、変異の蓄積によるバンドパターン多様性を許容する必要性
 - 長期化した事例の場合、どこまでをアウトブレイク関連株とするかの明確な基準はない
(Tenoverの基準は3か月以内の分離が条件)
 - 疫学情報もふまえて解釈する必要性



Multilocus Sequence Typing (MLST)

Sequence analysis of housekeeping genes Allele Number



```
CCTAAAAAAGTATTTGATCAATGTGAAGTTCTTTGCTTTATCCGATGTTTGTCAAA
CCGGCGAATATGGGTTCTAGTGTCGGCATTACAAAAGCAGAAAACCGAGAAGAG
CTGCAAAATGCTTTAGCAACAGCCTATCAGTATGATTCTCGAGCAATCGTTGAACA
AGGAATTGAAGCGGGCGAAATCGAAGTTGCTGTATTAGGAAATGAAGACGTTTCG → 6
GACGACTTTGCCTGGTGAAGTCGTAAAAGACGTAGCATTCTATGATTATGAAGCA
AAATATATCAATAATAAAAATCGAAAATGCAGATTCCAGCCGAAGTGCCAGAAGAAGT
TTATCAAAAAGCGCAAGAGTAC
```

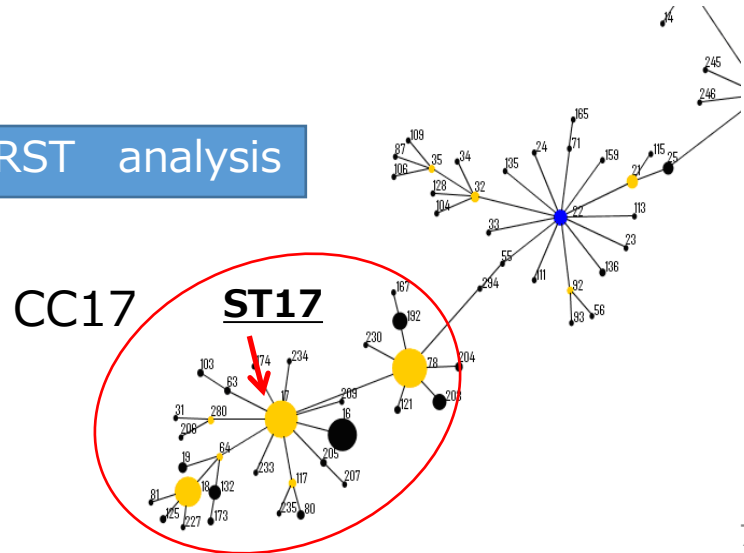
```
CCTAAAAAAGTATTTGATCAATGTGAAGTTCTTTGCTTTATCCGATGTTTGTCAAA
CCGGCGAATATGGGTTCTAGTGTCGGCATTACAAAAGCAGAAAACCGAGAAGAG
CTGCAAAATGCTTTAGCAACAGCCTATCAGTATGATTCTCGAGCAATCGTTGAACA
AGGAATTGAAGCGCGCGAAATCGAAGTTGCTGTATTAGGAAATGAAGACGTTTCG → 8
GACGACTTTGCCTGGTGAAGTCGTAAAAGACGTAGCATTCTATGATTATGAAGCA
AAATATATCAATAATAAAAATCGAAAATGCAGATTCCAGCCGAAGTGCCAGAAGAAGT
TTATCAAAAAGCGCAAGAGTAC
```

e.g. *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*,
gyd, *pstS*, and *adk*

Allelic profile sequence type (ST)

1-1-1-1-1-1-1	ST17	} CC17
15-1-1-1-1-1-1	ST78	
15-1-1-1-1-20-1	ST203	
7-5-1-18-11-3	ST426	

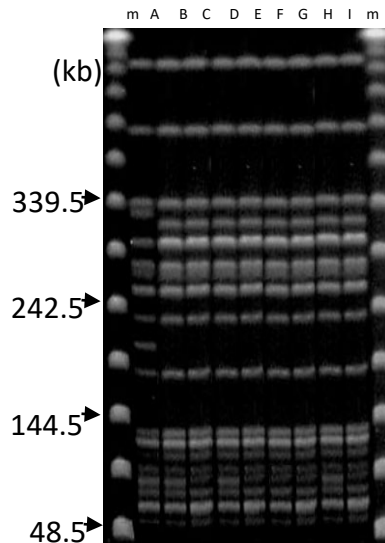
eBURST analysis



PFGE vs MLST

PFGE

- 分解能高い
- 異なるラボ間での比較は困難
- 院内感染など、アウトブレイク株（比較的短期間のアウトブレイク、アウトブレイク初期）のタイピング解析向き



m: 分子量マーカー

MLST

- 分解能低い
- 異なるラボ間での比較が容易
- 異なる地域や国際間の比較に向く
- 流行株の判別に有用

E. coli ST131

K. pneumoniae ST258

E. faecium CC17

A. baumannii ST2

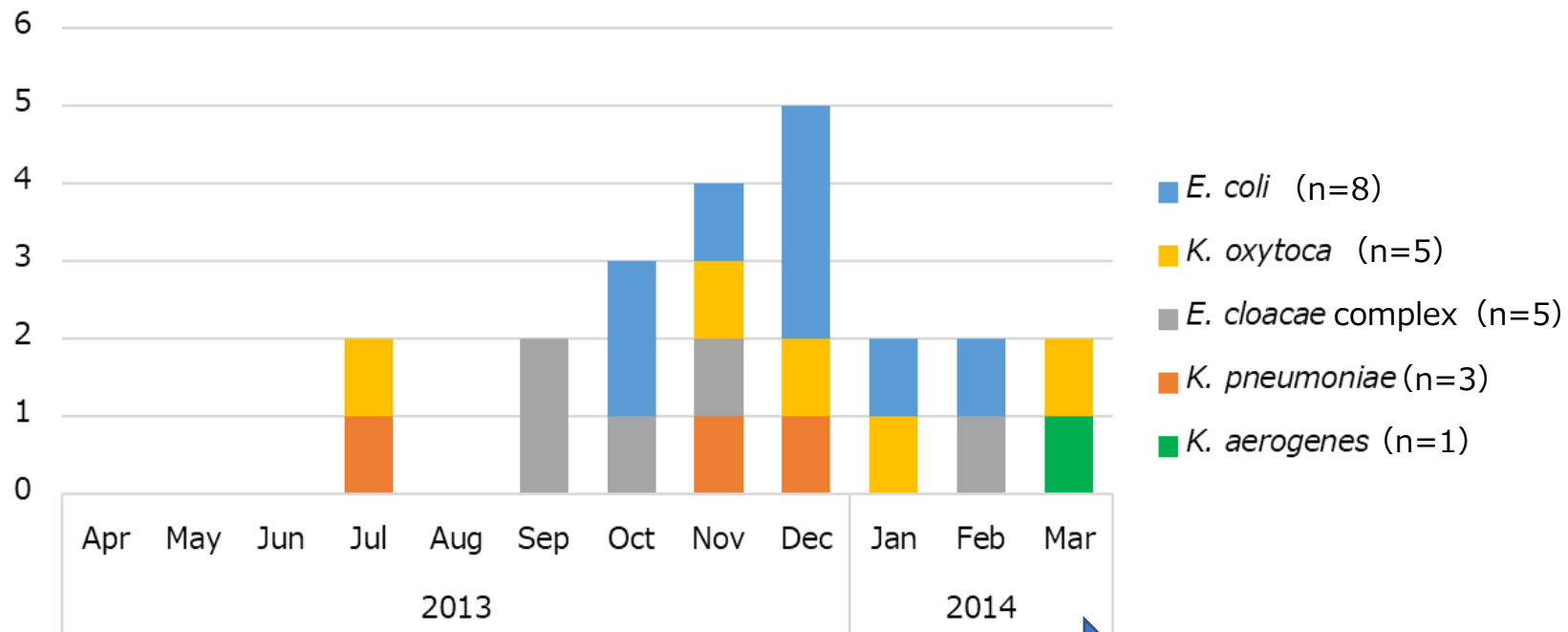
PubMLST <https://pubmlst.org/>

解析事例紹介

(プラスミド水平伝達を介したIMP-6カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌のアウトブレイク)

ある医療機関でIMP-6 カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出が相次ぐ
(2013年4月～2014年3月、n=22)

耐性遺伝子は共通でも菌種は多様、これらの関連性は？ ⇒ 分子疫学解析実施



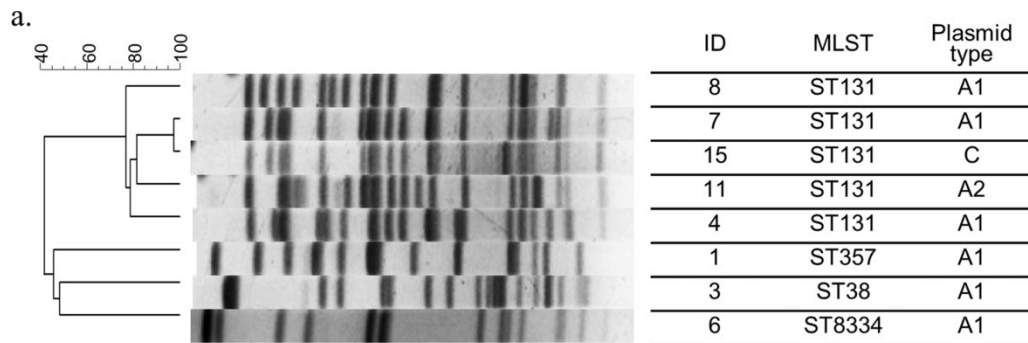
さかのぼると2010年～2014年に、100名以上よりCRE検出

Yamagishi et al., Scientific Reports (2020)10:4139
A prolonged multispecies outbreak of IMP-6 carbapenemase-producing Enterobacteriales due to horizontal transmission of the IncN plasmid

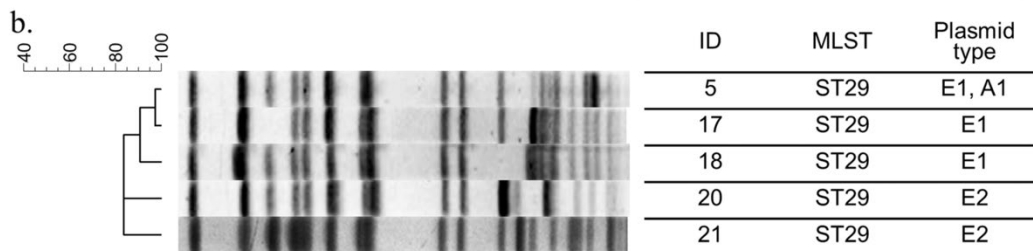
解析事例紹介

(プラスミド水平伝達を介したIMP-6カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌のアウトブレイク)

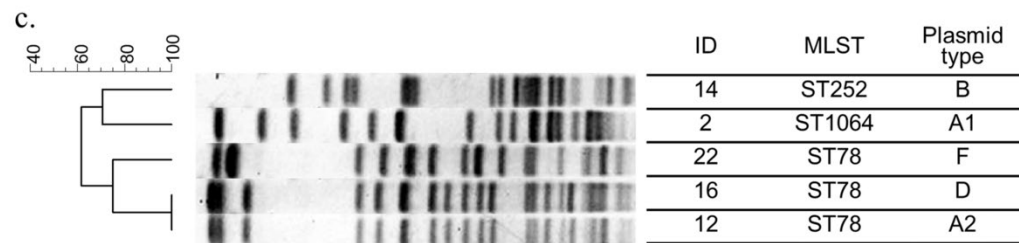
菌種別にPFGEバンドパターンによって型別



E. coli (n=8)
バンドパターンは多様



K. oxytoca (n=5)
類似のバンドパターン
→ 同一株由来の可能性が示唆



E. cloacae complex (n=5)
一部は異なる

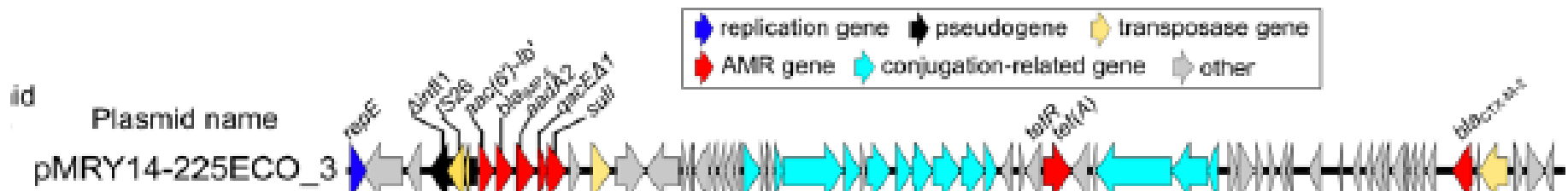
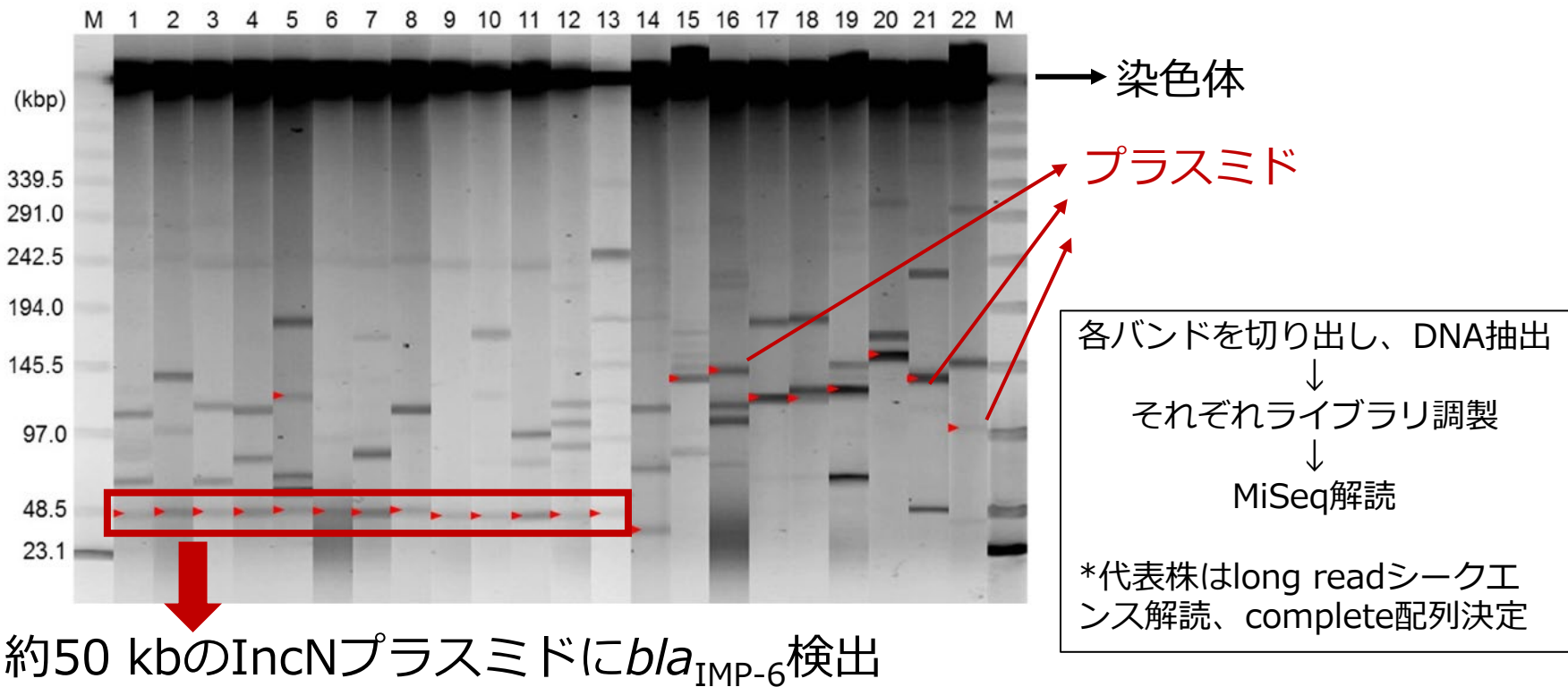


Klebsiella pneumoniae (n=3)
異なるバンドパターン

解析事例紹介

(プラスミド水平伝達を介したIMP-6カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌のアウトブレイク)

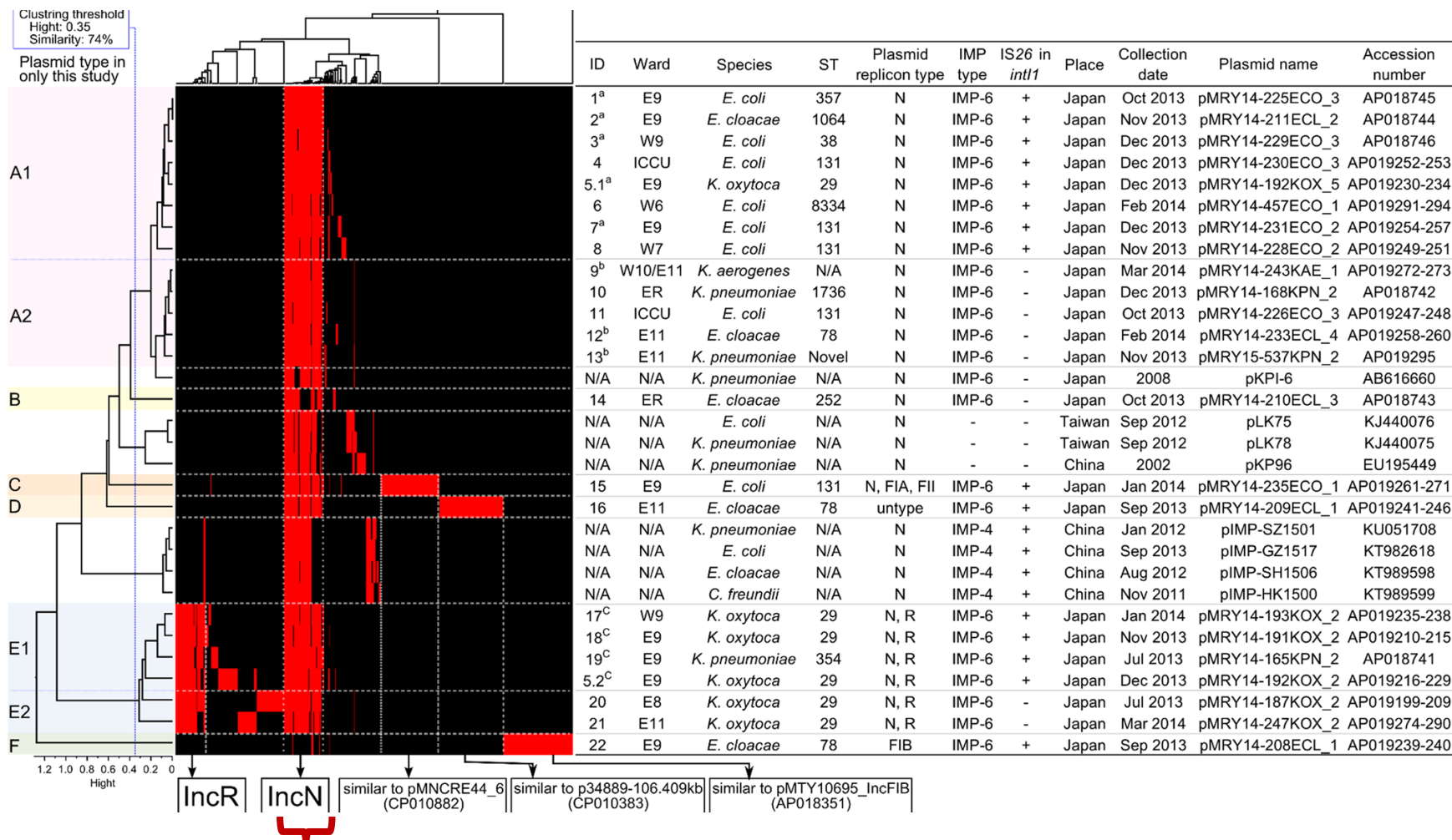
DNAプラグをS1-ヌクレアーゼ処理後電気泳動 (S1-PFGE)



解析事例紹介

(プラスミド水平伝達を介したIMP-6カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌のアウトブレイク)

*bla*_{IMP-6} 検出プラスミドの比較

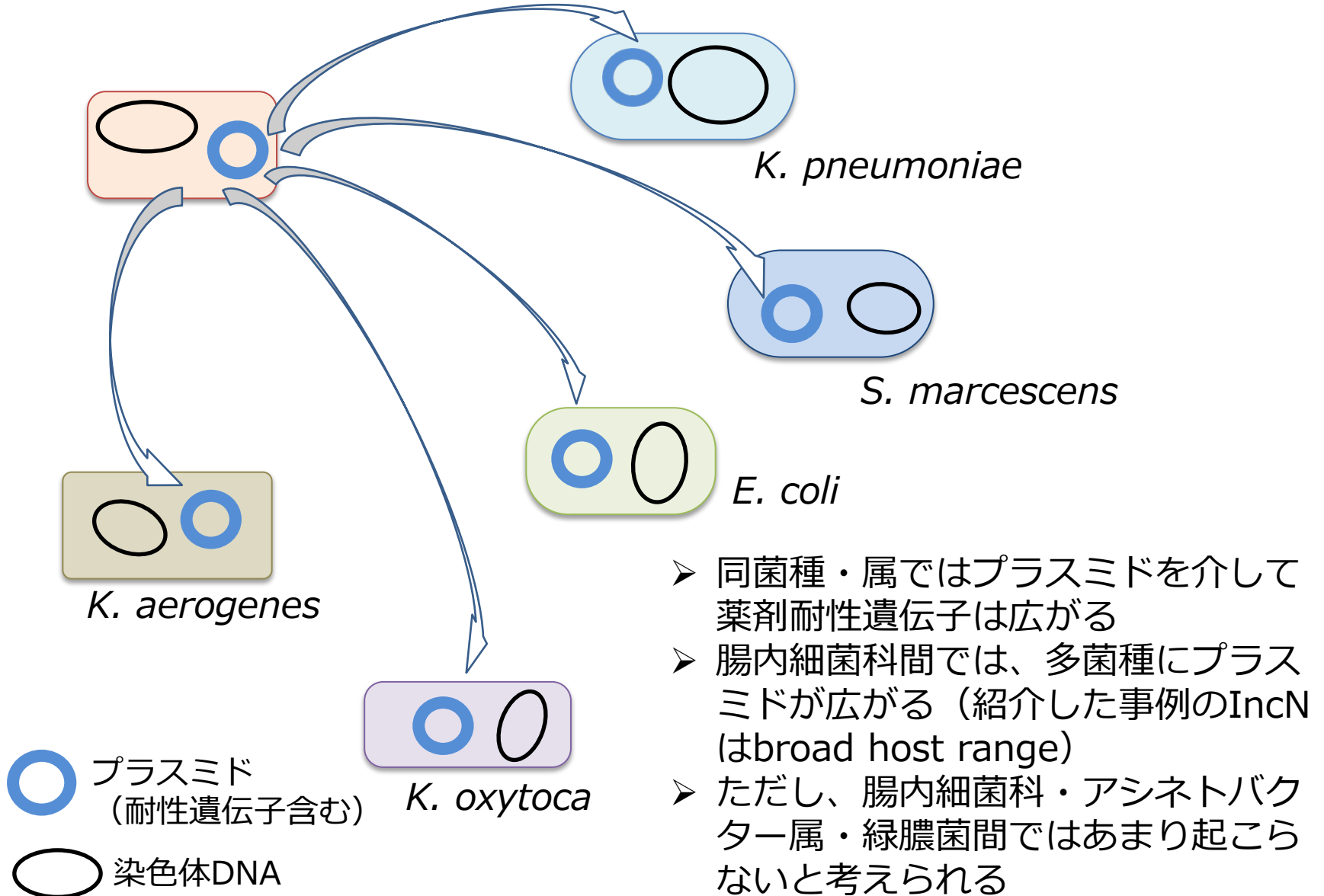


約50 kbのIncNプラスミドの配列を共通に保有

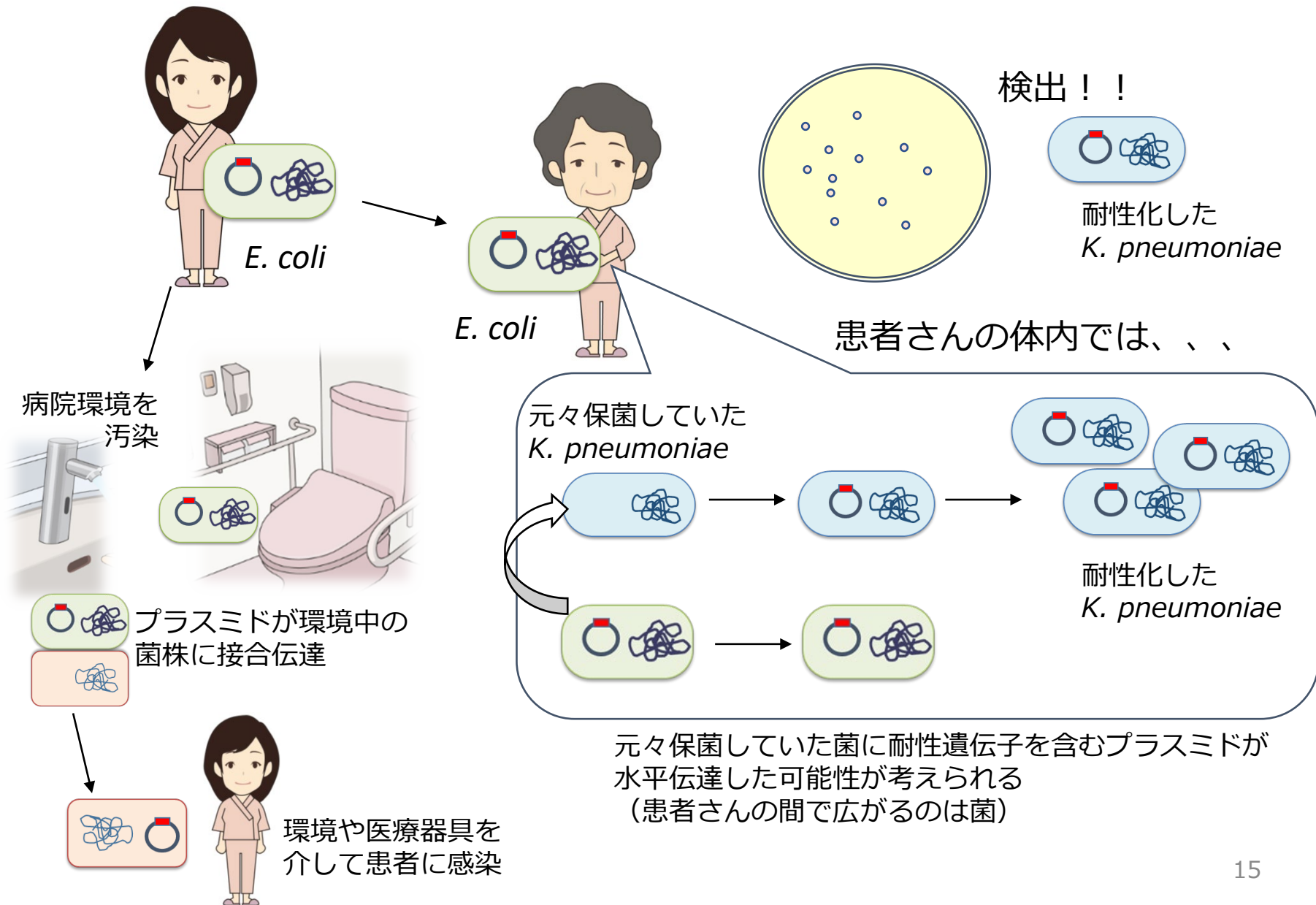
プラスミドの融合・配列組み換えを伴いながら拡散したと考えられた

(同一Inc typeであれば似た骨格を持つ、同一耐性遺伝子や疫学関連性をふまえて解釈)

プラスミドによる薬剤耐性遺伝子の水平伝達



何が起こっていたのか???



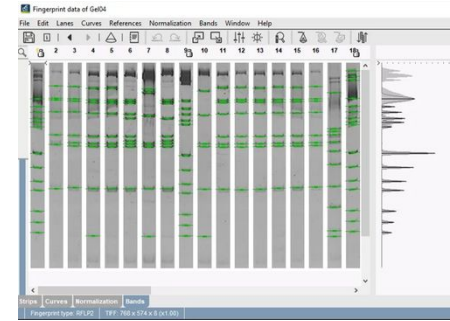
PFGEによるタイピング解析は終了へ

- バイオ・ラッド CHEF Mapper XAシステム
製造販売終了 2022年12月末（在庫限り、早まる可能性高）
修理サポート終了 2027年12月予定



BIO-RADホームページより

- bioMérieux社（旧 Applied Math社） BIONUMERICS
新規購入終了 2022年3月31日まで
サービス終了 2024年12月末
*ネットワーク型ライセンス
2025年1月からは使用不可
*ドングル型ライセンス
使用可能であるがサポート終了



infocomホームページより

- 今後はwhole genome sequence (WGS) による解析が主流に
- 耐性遺伝子の検出やMLSTには、従来法に比べはるかに強力なツール
 - 染色体やプラスミド配列比較に基づく薬剤耐性菌のタイピングには、
統一的な解析手法や解釈基準の検討が必要と思われる