

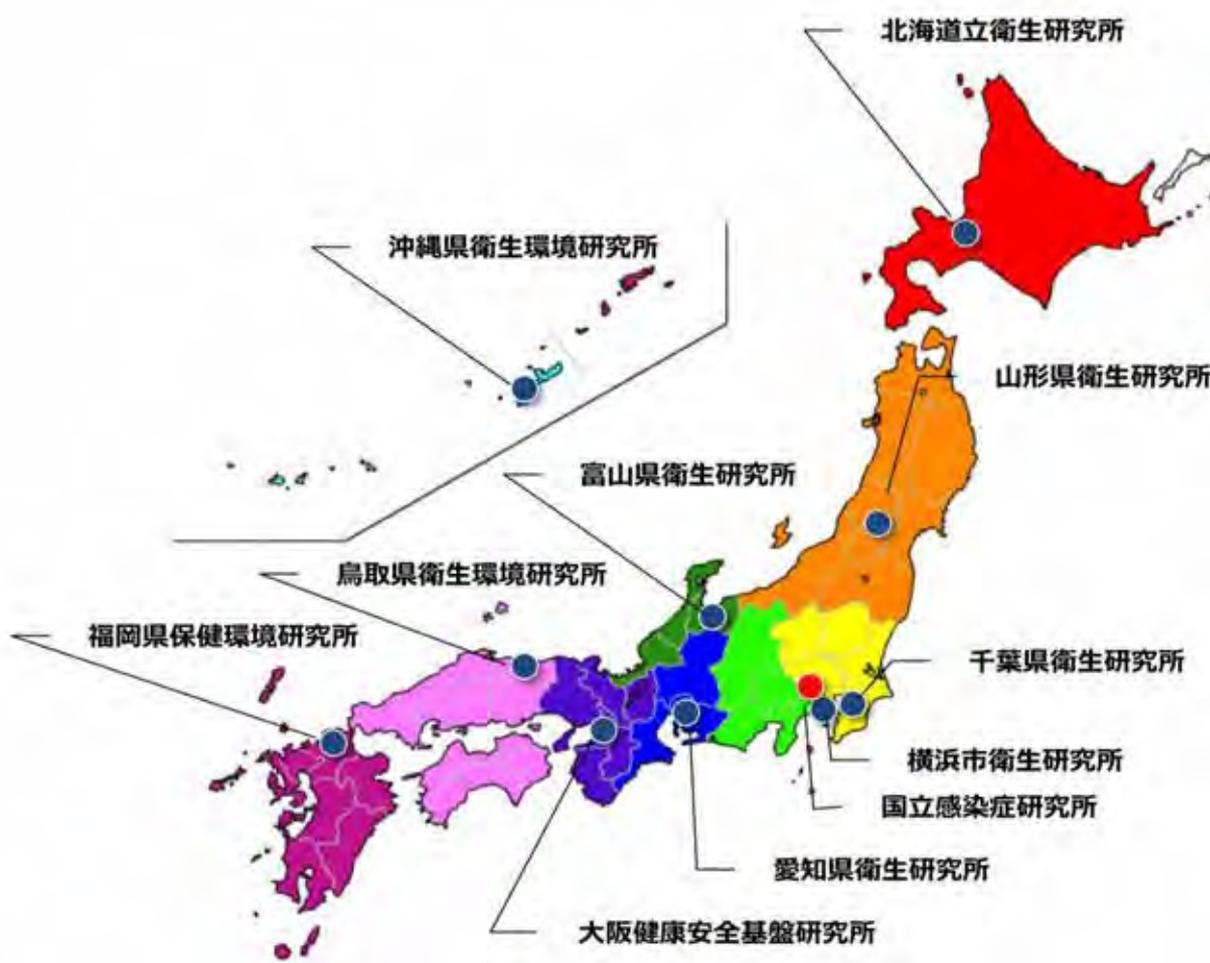
衛生微生物技術協議会第39回研究会（滋賀） レファレンスセンター等報告

日時：平成30年7月5-6日

場所：滋賀県大津市におの浜 ピアザ淡海：滋賀県立県民交流センター

1. [麻疹・風疹](#)
2. [薬剤耐性菌](#)
3. [HIV関連](#)
4. [百日咳・ボツリヌス](#)
5. [動物由来感染症](#)
6. [インフルエンザ](#)
7. [大腸菌](#)
8. [エンテロウイルス](#)
9. [寄生虫](#)
10. [レンサ球菌](#)
11. [アルボウイルス](#)
12. [ノロウイルス](#)
13. [カンピロバクター](#)
14. [アデノウイルス](#)
15. [レジオネラ](#)
16. [結核](#)
17. [リケッチア](#)

1. 麻疹・風疹

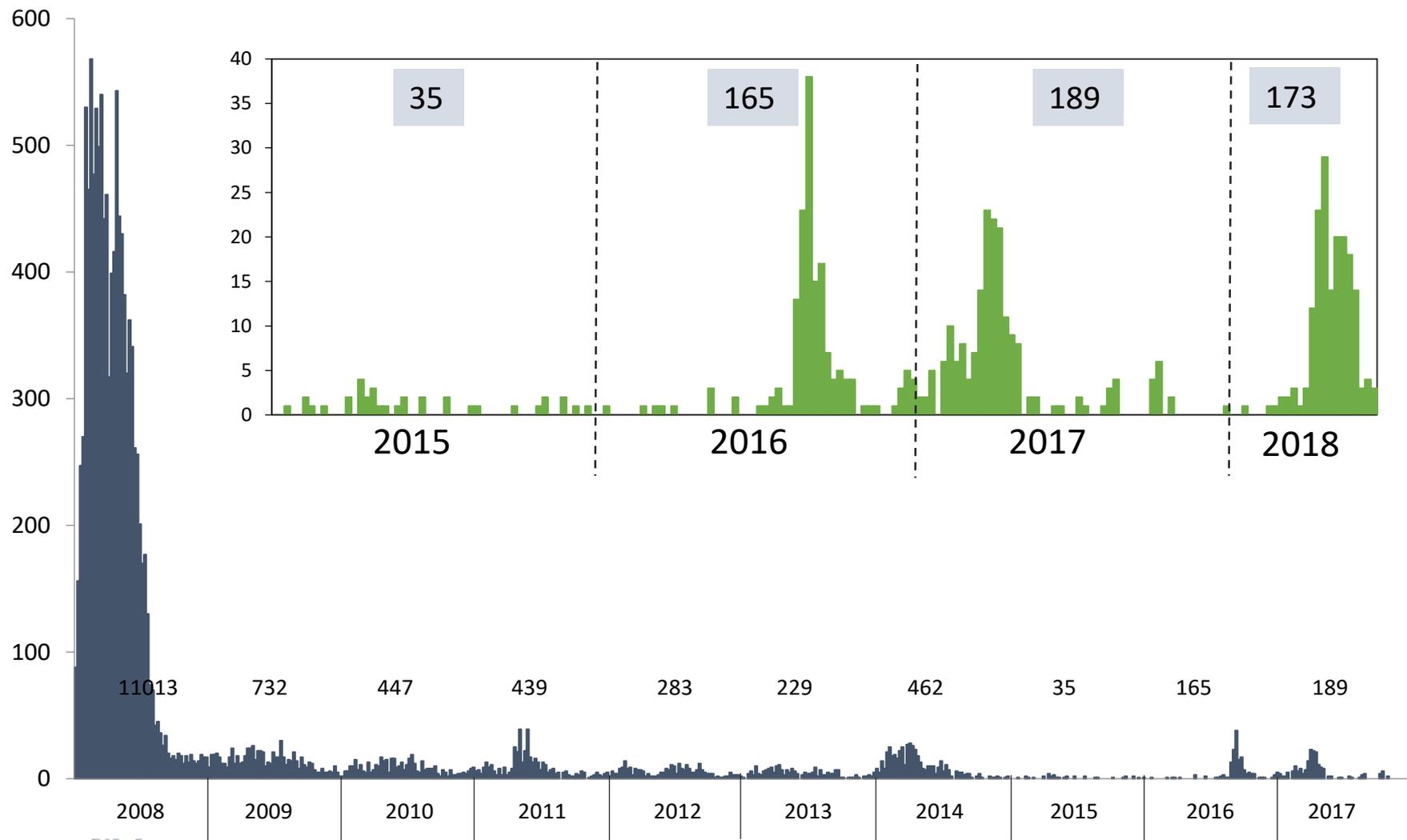


麻疹・風疹レファレンスセンター等関連会議

平成30年度麻疹・風疹レファレンスセンター

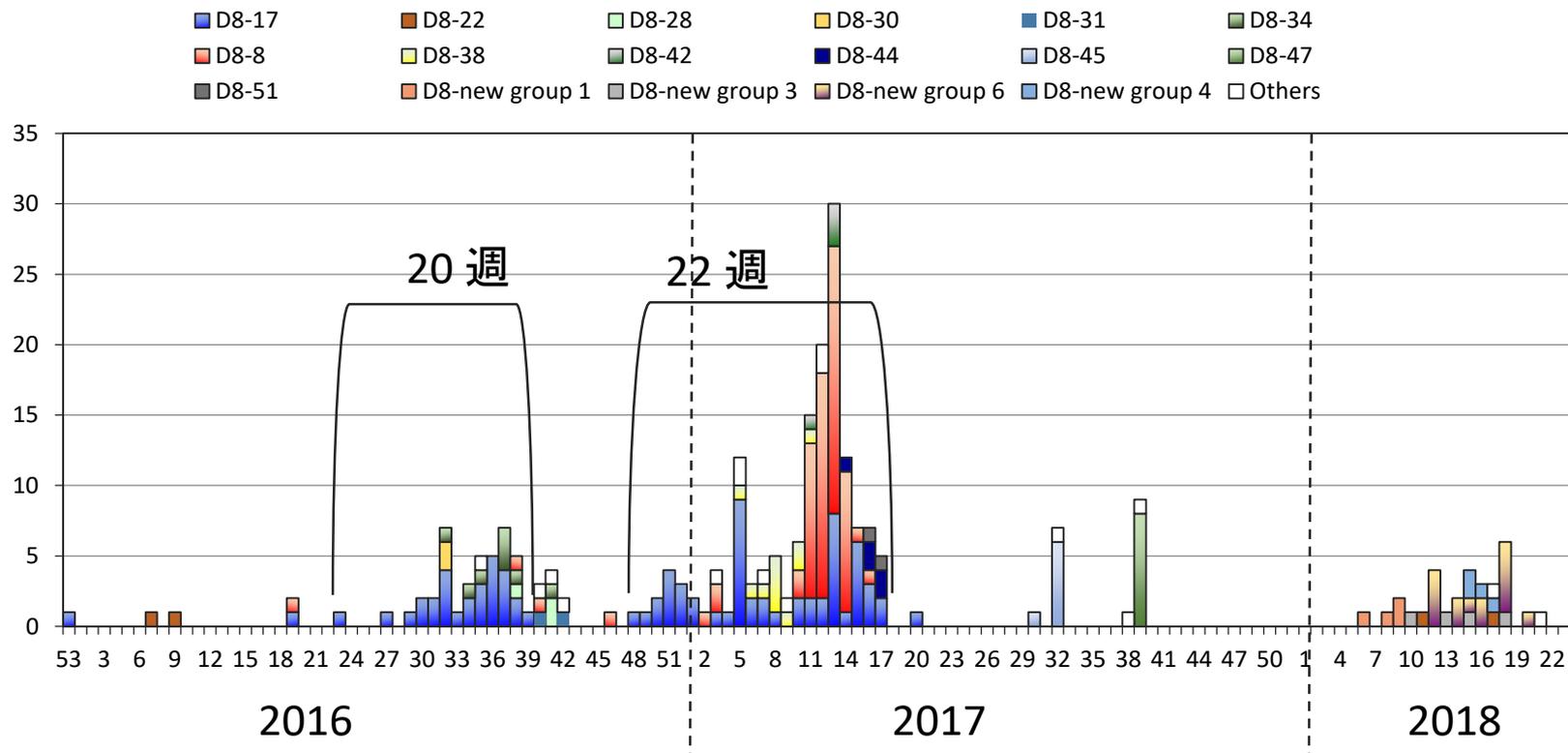
ブロック	施設	担当者
世話人	国立感染症研究所	森嘉生・關文緒
北海道	北海道立衛生研究所	長野秀樹・三好正浩
東北・新潟	山形県衛生研究所	池田辰也
北関東・千葉・東京	千葉県衛生研究所	小川知子・西嶋陽奈
神奈川・甲・信・静岡	横浜市衛生研究所	七種美和子
東海	愛知県衛生研究所	安井善宏・皆川洋子
北陸	富山県衛生研究所	板持雅恵
近畿	大阪健康安全基盤研究所	倉田貴子
中国・四国	鳥取県衛生環境研究所	大友麗
九州	福岡県保健環境研究所	梶原淳睦
沖縄	沖縄県衛生環境研究所	大山み乃り*

麻疹報告数の推移 (2008 ~ 2018 week23)



D8 検出数の推移(2016 ~ 2018week23)

麻疹の排除状態：適切なサーベイランス体制の下で、麻疹ウイルスによる伝播の連鎖が12ヶ月間以上継続しない事



地方衛生研究所で解析された遺伝子情報が麻疹排除状態の維持の確認に大いに役立っている

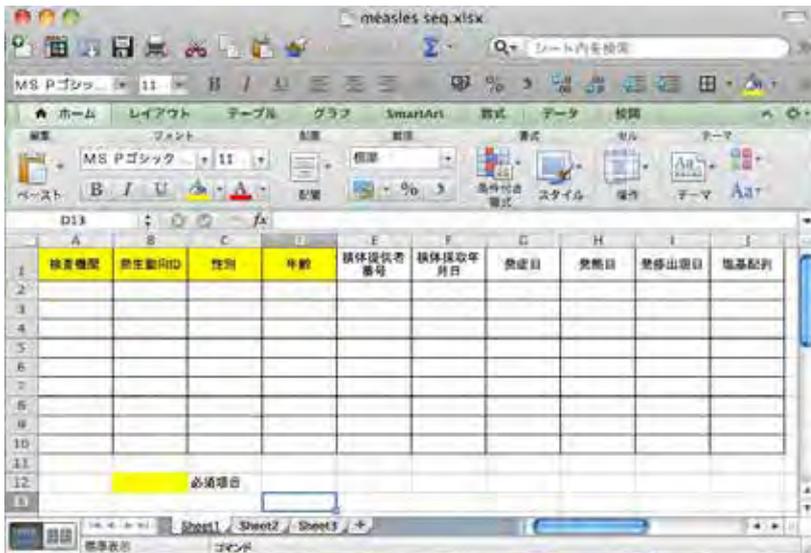
メーリングリストmeasles@nih.go.jpへの 麻疹遺伝子配列情報ご提供のお願い

目的：麻疹リンク推定の迅速化を目的としています

- NESIDへご登録までに時間がかかる事例があります。適時、このメーリングリストへ情報を御提供頂けますと大変助かります。
- 適時ご登録頂いている事例に関しては、登録したことをご連絡頂けますと幸いです。

ご提供頂きたい情報

- 検出機関名、発生動向ID、性別、年齢、塩基配列についてお願い致します。
- 他の項目はデータがございましたら、入力頂けますと大変助かります。



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	検出機関	発生動向ID	性別	年齢	検体提供者番号	検体採取年月日	発症日	発熱日	発疹出現日	塩基配列
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

送付先：measles@nih.go.jp

- 宛先「ウイルス第三部第一室 關文緒」宛で
ご送付下さい。
- 感染症疫学センター1室、2室、3室、FETP、
ウイルス第三部1室関係者で構成されるメー
リングリストです。

感染研にご報告頂いた麻疹ウイルス遺伝子 配列を用いた情報提供について

1. 経過

昨年度の本会議でリファレンスセンターの皆様に意見募集

四宮感染症対策部会長より全地衛研へ意見照会

意見照会の集計結果をふまえて、遺伝子情報の条件付き提供を感染研内で決定

厚労省結核感染症課から了承

四宮感染症対策部会長より麻疹遺伝子情報の提供について、全地衛研へ連絡

2. 遺伝子情報提供の内容

① 使用に際して、制限を付けています

- 自治体内での使用に限って下さい。
- 一般公開には、遺伝子配列を検出した地衛研の承諾が必要です。
- 一般公開には、公開されるウェブサイト、報道発表資料、冊子、学会発表等が含まれます。

② 提供可能な情報

- 感染研にすでに在るウイルス株の情報、但し遺伝子配列、検体採取日、検出自治体名にかぎられます。
- 系統樹：依頼があれば作成します。

③ 依頼先

- fseki@nih.go.jp : 「ウイルス第三部第一室 關文緒」宛にご依頼下さい。
- measles@nih.go.jp : こちらで御連絡頂いても対応いたします。

3. 情報提供依頼書

麻疹ウイルスの遺伝子解析データ等の情報提供依頼

使用目的について
今回提供させていただく自治体からの共有情報は、貴自治体内で発生した麻疹の流行(伝播経路)調査・把握の目的のために貴自治体内でのみ使用できます。一般に公開されるウェブサイト、プレスリリース(報道発表資料)、冊子(報告書)、学会発表等に使用する場合には、情報提供元の自治体(地研)の承諾が必要です。
上記内容に同意する(承諾される場合には、チェックを入れてください)

依頼者:
氏名:
所属名・所属・役職:
日付: 年 月 日

必要な情報(該当するものにチェックしてください)

1. 系統樹
 (貴自治体の流行株を含んだ)国内流行株の系統樹(註)
註: 特定の海外の株を含んで欲しいなど、必要な追加事項がありましたら、下記の空欄に記載頂くか、担当者に直接ご相談ください。

2. 特定のウイルス株の情報(遺伝子配列情報、検体採取日、検出場所に限る)
 遺伝子配列情報 検体採取日 検出場所(県名もしくは自治体名)
(上記以外の情報については、ご提供できません)
下記にどのウイルス株の情報が必要か、できるだけ詳しく記載ください。
例: 特定のウイルス株名を記載。検出年や検出場所を記載。

依頼先責任者: 国立感染症研究所ウイルス第三部 部長 竹田 誠
(連絡先: 欄文様: bak@nih.go.jp)

情報提供依頼書

- 依頼書を用意しましたので、ご活用下さい。メールに直接記載でも大丈夫です。

使用制限への同意欄

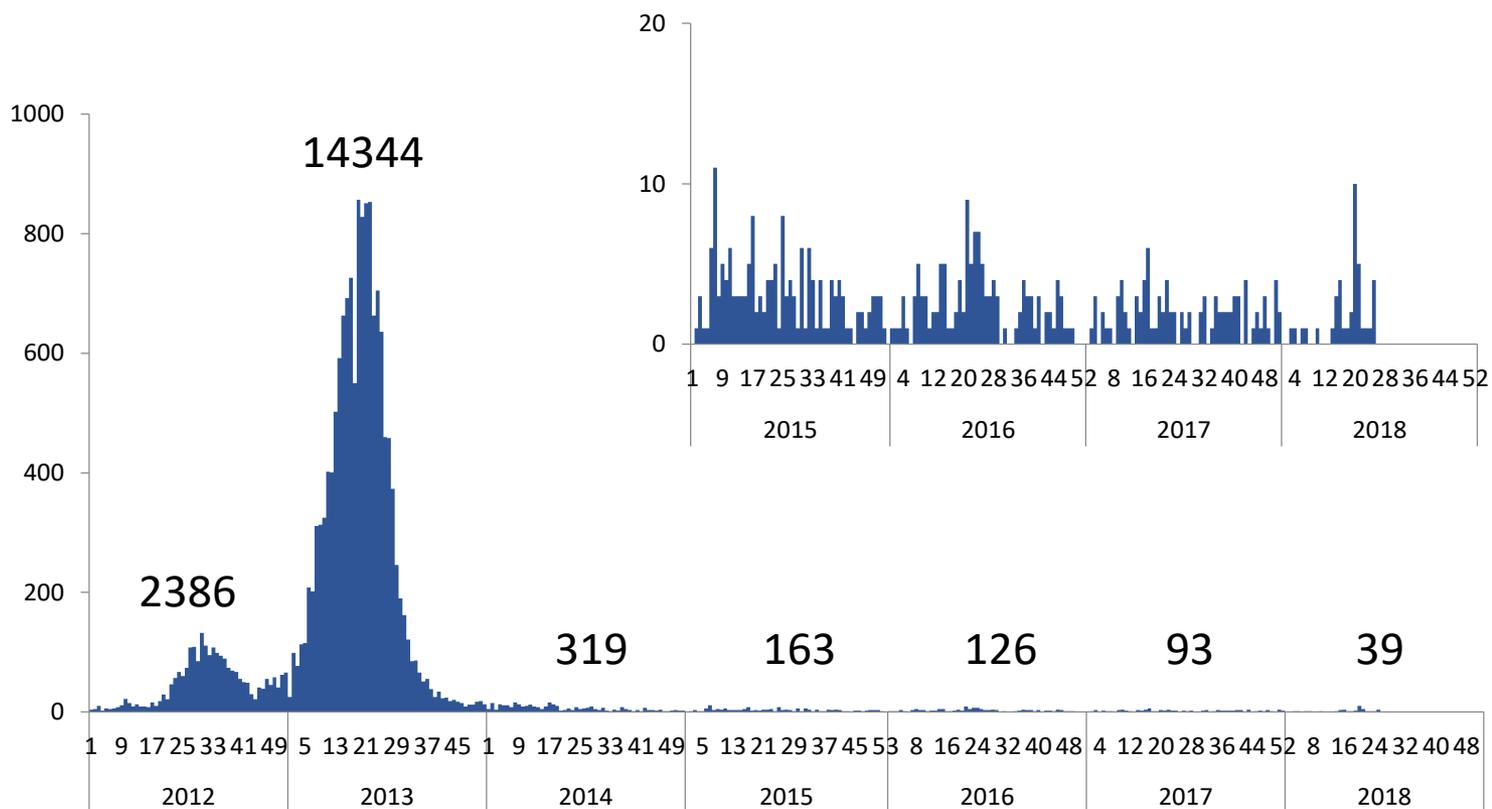
- 使用制限について記載しています。

記載欄

- 情報提供を依頼する株についてご記載下さい。
- 例) 渡航歴のあるXX国で最近同じ配列の株が検出されているか知りたい
- 例) 〇〇県で最近流行している株について配列情報が欲しい。

麻疹疫学的リンクの把握等に御利用下さい

週別風疹患者報告数、2012-2018.25w



風しんに関する特定感染症予防指針の改訂について

平成29年12月21日一部改正、平成30年1月1日適用

1. 風しんの届出：

「診断後7日以内」→「**診断後直ちに**」

2. 積極的疫学調査：

「地域で風しんの流行がない状態において、風しん患者が同一施設で集団発生した場合等」→

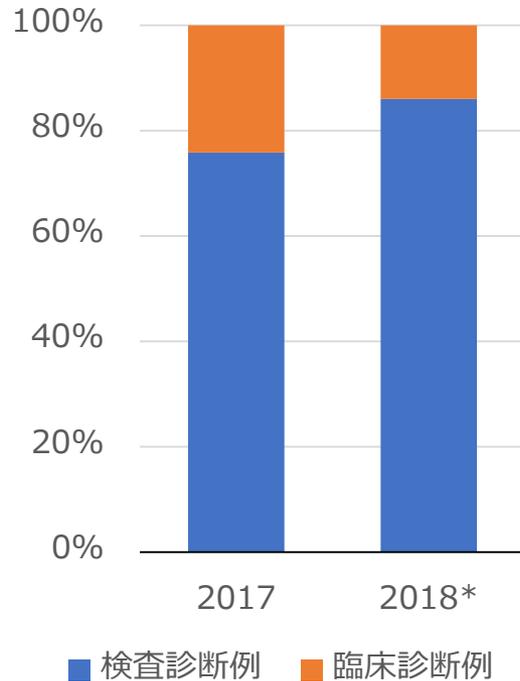
「**風疹の患者が一例でも発生した場合**」

3. ウイルス遺伝子検査：

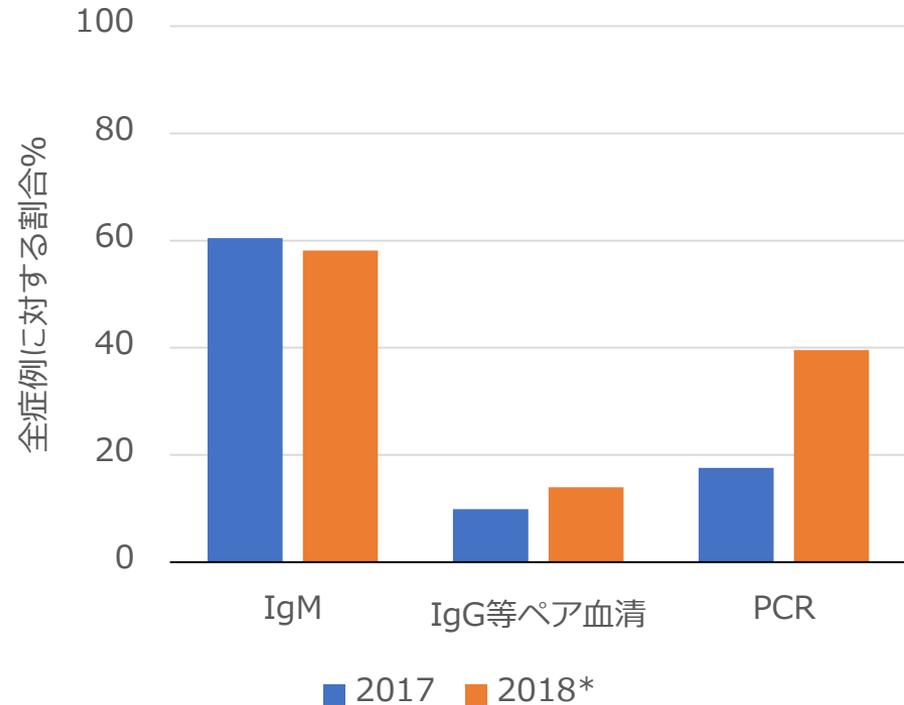
「可能な限り」→「**原則として全例**」

風疹の診断と検査法の状況

診断方法別（病型別）



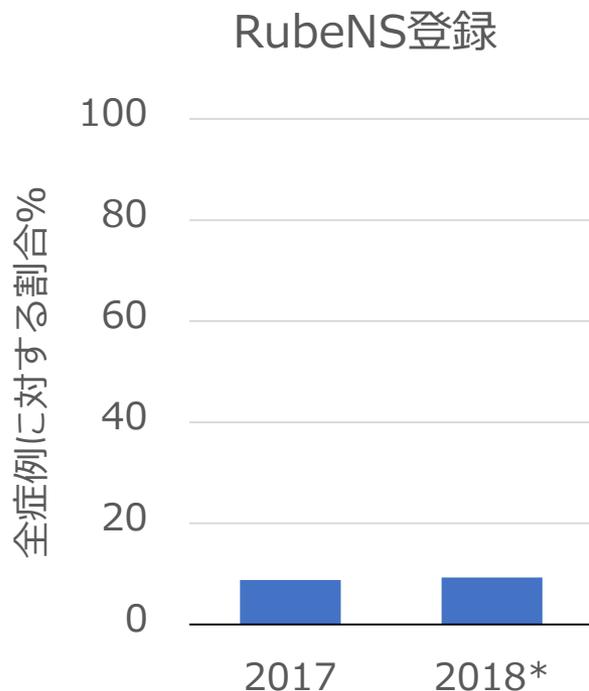
検査診断に用いられた検査法（重複あり）



検査診断に用いられる検査のうちPCRの実施割合が上昇しているが、まだ十分とは言い難い

*2018/7/2時点の感染症発生動向調査データを元に作成

風疹ウイルスの遺伝子型解析状況



RubeNS登録した遺伝子型別ウイルス数

	遺伝子型	
	1E	2B
2017	5	3
2018*	1	3

風疹ウイルス遺伝子情報の解析割合は、昨年と同様非常に低いままである

RubeNS : WHOの風疹ウイルス遺伝子データベース
国内情報のうち、完全な遺伝子配列情報のあるもののみ登録

*2018/7/2時点

今年度の活動予定

1. 風疹ウイルス遺伝子型決定部位増幅RT-PCRの改良
2. 参照RNAの改訂
3. 地方衛生研究所の検査実績調査
4. 厚生労働省外部精度管理事業 平成30年度
課題 1 麻疹・風疹 →ウイルスの検出（6～8月）
5. AMED研究班（代表森）調恒明先生分担班
外部精度管理 風疹ウイルス遺伝子解析（9～11月予定）
6. AMED研究班（代表森）木村博一先生分担班
実地研修 風疹ウイルス遺伝子解析（年度後半予定）

2. 薬剤耐性菌

レファレンスセンター等関連会議 薬剤耐性菌

担当：国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター
鈴木里和、松井真理

- ◆ マルチプレックスPCRのトライアル結果について
発表者：大阪健康安全基盤研究所 河原 隆二 先生
- ◆ 各ブロックレファレンスセンター報告
発表者：各ブロックレファレンスセンター担当者
- ◆ 平成29年度活動報告及び平成30年度活動予定
発表者：国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 松井真理
 - ・ 薬剤耐性菌検査に関する研修
 - ・ 陽性コントロール配布
 - ・ NESID病原体サーベイランスについて
 - ・ 薬剤耐性菌検査に関する問い合わせ（事例紹介）
 - ・ その他連絡事項など

平成30年度 薬剤耐性菌検査に関する研修

NEW

①基本コース	②実践コース	③タイピングコースI*	④タイピングコースII*
<p>2.5日 9月11日（火）9:00～ 13日（木）～12:30</p> <ul style="list-style-type: none"> ・薬剤耐性菌検査の基本 ・国内で分離が多い遺伝型株や典型的な表現型の株の判定 <p>耐性菌検査は初めて... 基本を知りたい</p>	<p>1.5日 9月13日（木）13:00～ 14日（金）～16:00</p> <ul style="list-style-type: none"> ・国内で分離が稀な遺伝子型株や非典型的な表現型株の判定 <p>既に検査を実施している 以前に研修参加したが、 情報をアップデートしたい</p>	<p>1.5日 9月19日（水）9:00～ 20日（木）～12:30</p> <p>パルスフィールドゲル 電気泳動（PFGE）に よるタイピング手法と その解釈</p> <p>タイピング解析方法を知りたい</p>	<p>1日（1泊2日） 9月20日（木）13:00～ 21日（金）～13:00</p> <p>プラスミドゲノムの データの解釈</p> <p>プラスミド解析方法を知りたい GPATを活用して、学 会・論文発表したい</p>

*タイピングコースI, IIは連続参加可能

陽性コントロールDNA・菌株送付

- **陽性コントロールDNA 一斉送付**

平成29年度 73施設

(平成27年度、28年度：各63施設 あわせて77施設に送付済)

⇒ 平成30年度も研修終了後に送付予定

- **陽性コントロールDNA 追加送付**

平成29年度 8施設

内容：CRE検査用（一斉配布と同じ遺伝子型）

バンコマイシン腸球菌（VRE）、薬剤耐性アシネトバクター検査用

⇒ 随時発送可能 taiseikin@niid.go.jp まで

- **陽性コントロール菌株送付**

平成29年度 15施設

内容：IMP-1, IMP-6

CTX-M-1型, CTX-M-2型, CTX-M-9型, TEM型, SHV型, CIT型

⇒ 随時対応可能（書類手続き約2カ月）

taiseikin@niid.go.jp まで

NESID病原体検出情報システムへのCRE検査結果報告

平成29年3月28日 健康局結核感染症課長通知

「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症等に係る試験検査の実施について」

検査結果については、NESIDの病原体検出情報システムを通じて・・・厚生労働省に報告する

薬剤耐性菌レファレンスセンターにて、入力マニュアルを作成

- 検査結果を『特記すべき生化学性状等』欄に半角英数でテキスト入力（検査未実施は*入力）
- 入力支援ツール（大阪健康安全基盤研究所 河原先生作成）も併せて配布

2017年検体採取分の検査結果入力依頼・結果集計

7月6日 シンポジウムI ①薬剤耐性菌の分離状況と耐性機序（鈴木里和）にて結果を発表

S	BT	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
結果3. 特記すべき生化学的性状等		検出病原体その他内容	Formal	特記すべき生化学的性状等	IMP	NDM	KPC	OXA-48	MB	BA	VIM	GES	IMI
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;IMI*;KHM*;SMB*;CaNP*;CIM-	Escherichia coli	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-	Enterobacter aerogenes	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	*	*	*
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-	Enterobacter aerogenes	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IMP1;NDM-;KPC-;OX48-;MB+;BA-	Enterobacter aerogenes	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;IMI*;KHM*;SMB*;CaNP*;CIM*	Enterobacter cloacae	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	1	-	-	-	+	-	-	-	*
	IMP+;NDM-;KPC-;OX48-;MB+;BA-	Enterobacter aerogenes	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM*;GES*;IMI*;KHM*;SMB*;CaNP*;CIM-	Serratia marcescens	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-	Escherichia coli	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	カルバペネマーゼ遺伝子 (IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型) 陰性	Enterobacter cloacae	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	IMP-;NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES*;IMI*;KHM*;SMB*;CaNP*;CIM*	Serratia marcescens su	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	IMP-1/2 VIM-2 NDM-1 KPC- OXA-48遺伝子は不検出	Serratia marcescens su	1	IMP-NDM-;KPC-;OX48-;MB-;BA-;VIM-;GES-;KHM-;SMB*;CaNP*;CIM-	-	-	-	-	-	-	-	-	*

プログラムで項目ごとに集計

NESID今後の予定

- 2017年検体採取分（今回の集計結果）
 - ⇒ IASR公表予定
 - 4月24日以降に追加入力いただいた検体 順次精度管理予定
- 2018年検体採取分 順次集計予定
 - ⇒ 1月～3月分離検体：7月～ 精度管理問い合わせ予定
- 精度管理問い合わせ対象項目
 - 入力形式が異なるもの
 - 海外型カルバペネマーゼ遺伝子陽性かつ渡航歴無し（シーケンスをお願いします）
 - 遺伝子検査と表現型不一致（必須試験項目対象）

検査に関する問い合わせ

β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンスについて

- β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンス型別の標準配列は？ (GenBank accession No.)

<http://www.lahey.org/Studies/> (現在は更新終了)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>

$bla_{IMP-1} \Rightarrow S71932$

$bla_{IMP-6} \Rightarrow AB040994$

$bla_{NDM-1} \Rightarrow FN396876$

$bla_{NDM-5} \Rightarrow JN104597$

$bla_{KPC-2} \Rightarrow AY034847$

$bla_{OXA-48} \Rightarrow AY236073$

- β-ラクタマーゼ遺伝子の表記方法は？

PCR検出のみ、シーケンス型別未実施

例) IMP型β-ラクタマーゼ遺伝子、IMP-1型β-ラクタマーゼ遺伝子 など

シーケンス型別を実施した場合

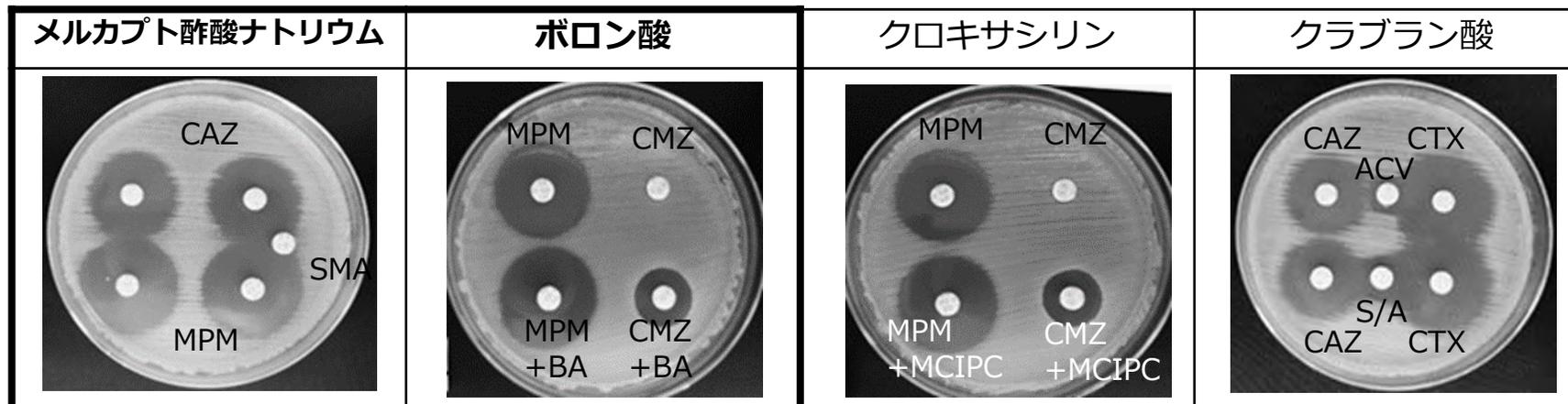
例) IMP-1 β-ラクタマーゼ遺伝子、IMP-6 β-ラクタマーゼ遺伝子 など

検査結果問い合わせ例①

KPC型カルバペネマーゼ産生株？

<医療機関からの情報> 菌種：*Klebsiella pneumoniae*

CRE判定基準を満たす薬剤：イミペネム&セフトアゾール



陰性

陽性

陽性

陰性

(ディスク法の写真は感染研実施分)

カルバペネマーゼ遺伝子		カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼ遺伝子	
IMP型	-	CTX-M-1 group	
NDM型	-	CTX-M-2 group	
KPC型	+	CTX-M-9 group	
OXA-48型	-	MOX型	-
VIM型		CIT型	-
GES型		DHA型	-
IMI型		ACC型	-
KHM型		EBC型	-
SMB型		FOX型	-

Carba NP test: 陰性 (感染研実施)

mCIM: 陰性 (感染研実施)

PCR法でKPC型陽性、表現型はAmpC

→ 菌株分与を依頼し、感染研で再検

PCR KPC型陰性

菌種再同定 *Enterobacter aerogenes*

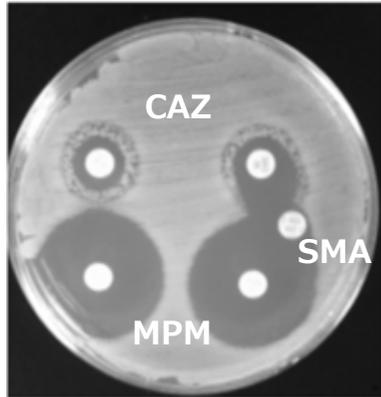
***E. aerogenes*では、KPC型非特異バンドが出現する株があるようです(問い合わせ数件あり)**



検査結果問い合わせ例②&③

IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株？

事例② *Escherichia coli*



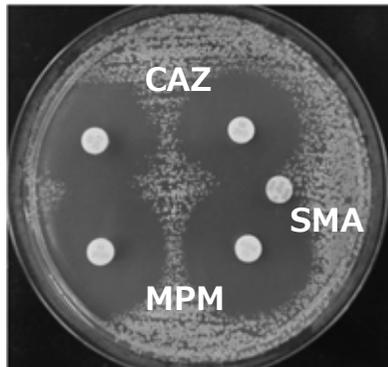
IMP-1型検出用プライマーPCR：陽性（+）

SMAディスク法：陰性（-）



⇒ IMP型遺伝子シーケンス（IMP-1 allプライマー増幅産物）の結果、IMP型β-ラクタマーゼ遺伝子ORF中に挿入配列あり！

事例③ *Serratia marcescens*



IMP-1型検出用プライマーPCR：陽性（+）

SMAディスク法：陰性（-）

mCIM：陰性（-）



⇒ IMP型遺伝子シーケンスの結果、*Serratia marcescens*の染色体遺伝子（PCR非特異バンド）であった

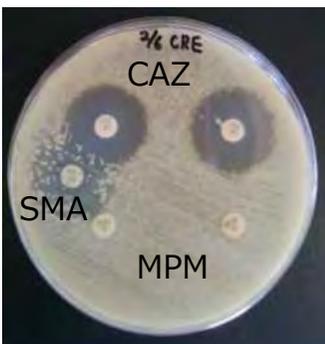
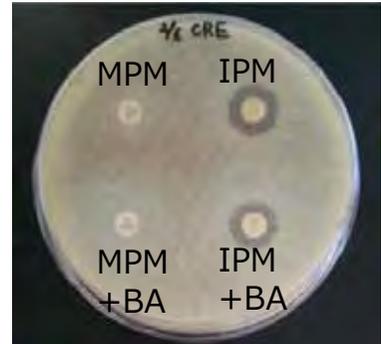
遺伝子型と表現型に矛盾がある場合は、シーケンス、別プライマー（multiplex用など）など、必ず確認をお願いします。

検査結果問い合わせ例④

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌？

<医療機関からの情報>

菌種：Serratia sp. mCIM陽性

メルカプト酢酸ナトリウム	ボロン酸	クロキサシリン	クラブラン酸
			
陰性	陰性		



Carba NP test:
mCIM: **陽性 (6mm)**

カルバペネマーゼ遺伝子		カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼ遺伝子	
IMP型	-	CTX-M-1 group	-
NDM型	-	CTX-M-2 group	-
KPC型	-	CTX-M-9 group	-
OXA-48型	-	MOX型	-
VIM型	-	CIT型	-
GES型	-	DHA型	-
IMI型		ACC型	-
KHM型		EBC型	-
SMB型		FOX型	-

カルバペネマーゼ遺伝子PCRとディスク法はどちらも陰性
mCIMは、カルバペネマーゼ産生が示唆

→ 地方衛生研究所での菌種再同定の結果
Aeromonas hydrophila
(腸内細菌科細菌ではないがCREと間違えられやすい)

結果に疑問がある場合、コンタミや菌種誤同定の可能性あり

その他、CRE検査に関する参考情報

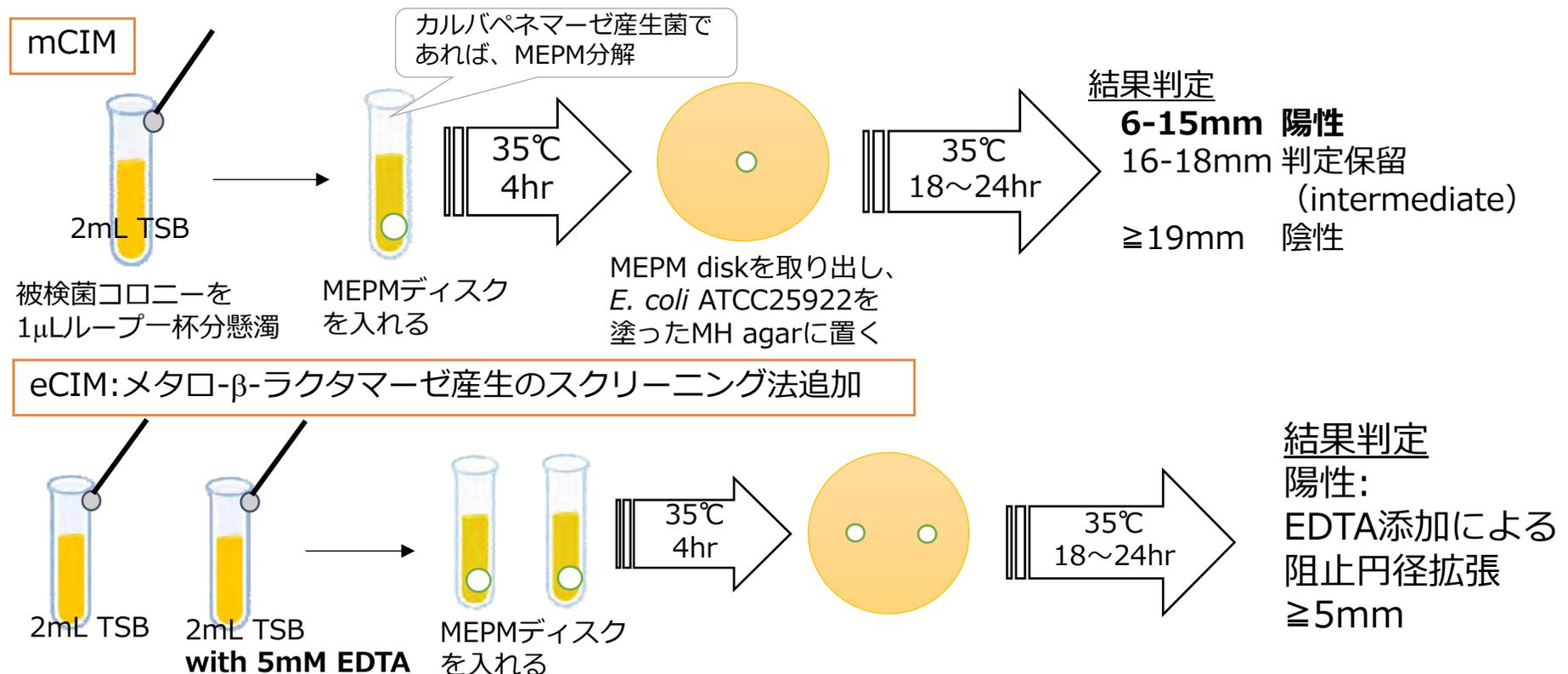
- 菌種名の変更

Enterobacter aerogenes ⇒ *Klebsiella aerogenes*

医療機関からの届出菌種名が少しずつ変更されるのではと思います

参考文献：Int J Syst Evol Microbiol 2017,67(2):502-404

- eCIMの報告：Carbapenem inactivation method (CIM) の変法
(CLSI M100, 2018に掲載)



まとめ

- 研修
 - ⇒ 参加希望は各ブロックのレファレンスセンターまで
- 陽性コントロールDNA・陽性コントロールDNA配布
 - ⇒ 研修後にDNA一斉配布予定
 - 個別依頼はtaiseikin@niid.go.jpへ
- 病原体検出マニュアル
 - ⇒ 平成30年度に改訂予定
 - (改訂時はレファレンスセンターを通じて連絡)
- NESID入力結果
 - ⇒ 順次、精度管理・集計予定
- 薬剤耐性菌検査等に関するお問い合わせ
 - taiseikin@niid.go.jp
 - 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター第一室

3. HIV関連

第39回衛生微生物協議会レファレンスセンター等関連会議

HIV関連感染症

(2018.7.5 滋賀県立県民交流センター)

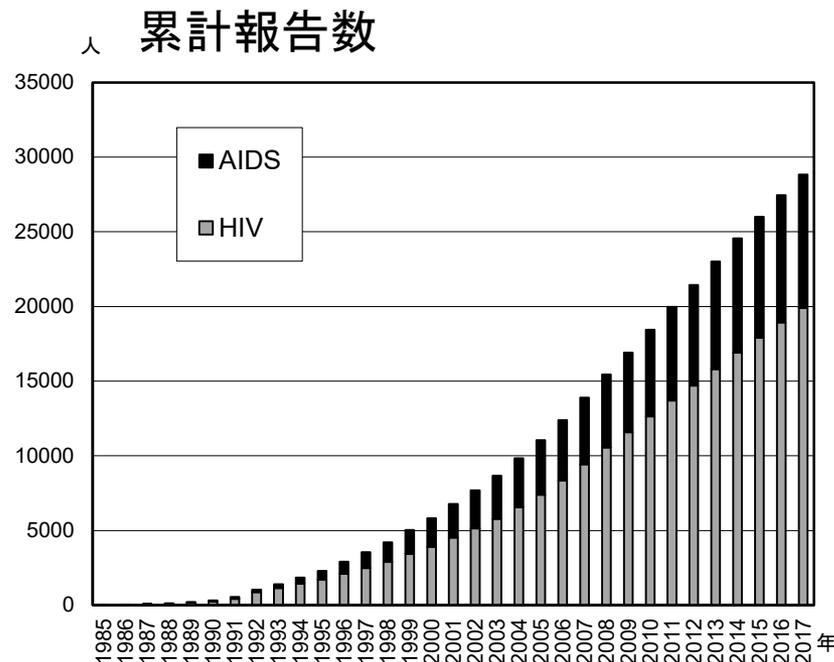
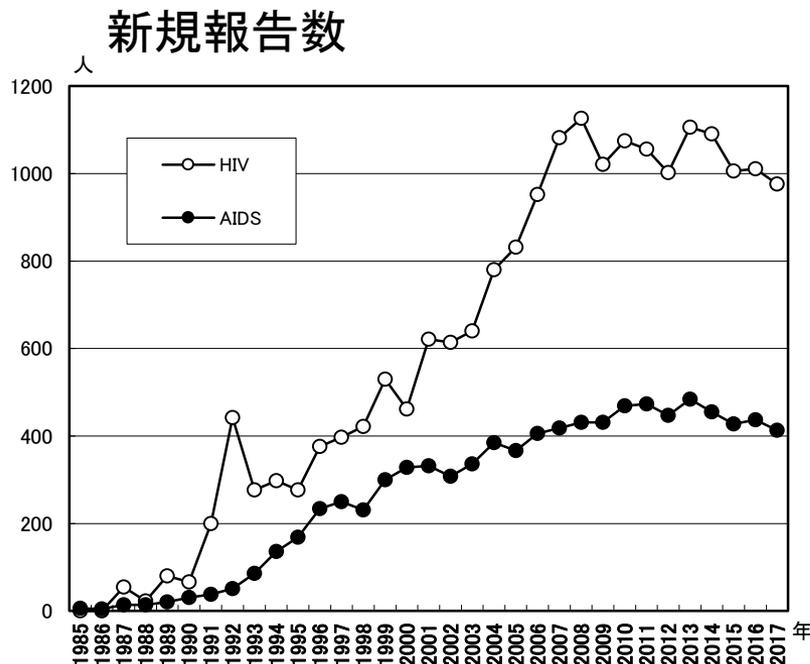
1. 2016年HIV発生動向の概要、および届け出票の改訂に関する
情報提供 (国立感染症研究所エイズ研究センター 松岡佐織)

1. HIV検査マニュアルの改訂案に関する要点の解説
 - 1-1.抗体検査 (東京都健康安全研究センター 長島真美)

 - 1-2.遺伝子検査および精度管理の案内
(国立感染症研究所エイズ研究センター 草川茂先生)

日本国内の年間新規診断数、及び累積報告数

(平成28年エイズ発生動向調査年報)



- 近年の新規報告数は概ねHIV:1,000件、AIDS:500件、合計1,500件で推移。
- 新規報告数に占めるAIDS患者の割合(AIDS比)は約3割。

2017年新規報告数 1389件
(HIV感染者 976件、AIDS患者 413件)

病原体検出マニュアルの改訂に関する要点の解説、 および討議

2018年版の改正点のポイント

- HIV-2の診断について
- 核酸増幅検査(NAT)の実施、および精度管理について

討議内容を踏まえ、最終版(2018年)をHPに掲載致します(8月末予定)。ご参照下さい。

HIV-1 NAT検査用参照品の配布 に関するお知らせ

目的

HIV NAT検査精度管理での活用を目的とし、

- ・ HIV NAT検査用参照品候補検体の配布
- ・ 各施設においてHIV-1コピー数の評価を行うとともに
- ・ 測定結果を比較検討することで

参加施設のHIV-1 NAT検査精度の確認に役立てる。

参加いただける衛生研究所を募集致します。

費用負担、測定方法、結果の報告方法など、詳細をお知らせしますので、参加を検討いただける場合は、感染研エイズ研究センター 松岡(s-matsu@nih.go.jp)までご連絡下さい。

折り返し、ご案内を差し上げます。

4. 百日咳・ボツリヌス

百日咳・ボツリヌス

世話人

国立感染症研究所・細菌第二部

第一室 蒲地一成

第三室 加藤はる

百日咳レファレンスセンター

計10施設

秋田県健環セ

大阪健安基盤研

岡山県環保セ

山口県環保セ

東京都健安研セ

感染研・細菌二

福岡県保環研

熊本県保環科研

三重県保環研

愛媛県衛環研

平成29年度の活動報告

● レファレンス関係の分与実績

レファレンス	地方衛生研究所	
	レファレンスセンター	その他
<i>Bordetella holmesii</i> -LAMPキット	0	0
4PlexリアルタイムPCRキット	1	9
陽性コントロール	百日咳菌	0
DNA	百日咳類縁菌	0
計	1 (1施設)	9 (8施設)

● 百日咳に関する情報還元

1. 百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（初版）平成 30 年4月25 日
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/pertussis-m/610-idsc/7994-pertussis-guideline-180425.html>
2. Moriuchi T, *et al.* A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. *PLoS One* 2017;12:e0181181.
3. Moriuchi T, *et al.* Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. *Int J Infect Dis* 2017;62:56-58.

平成30年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

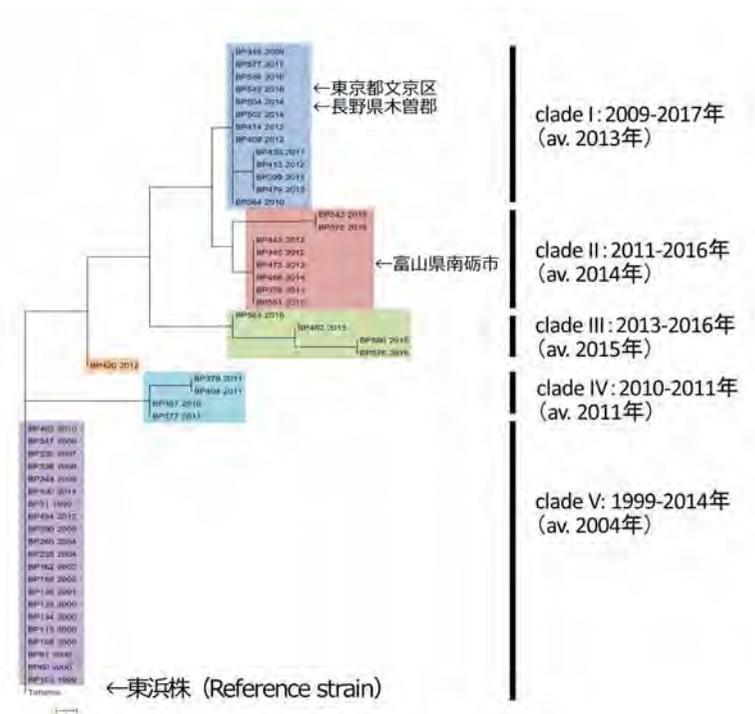
- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

2) 百日咳病原体サーベイランス

- 百日咳菌のSNP型別法の開発
- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌



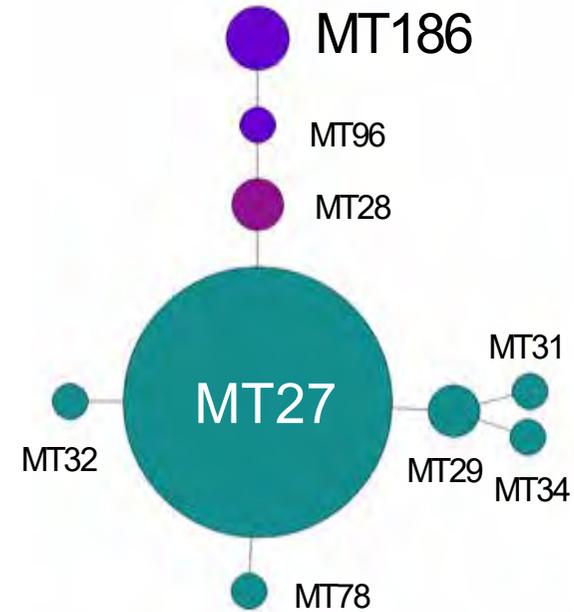
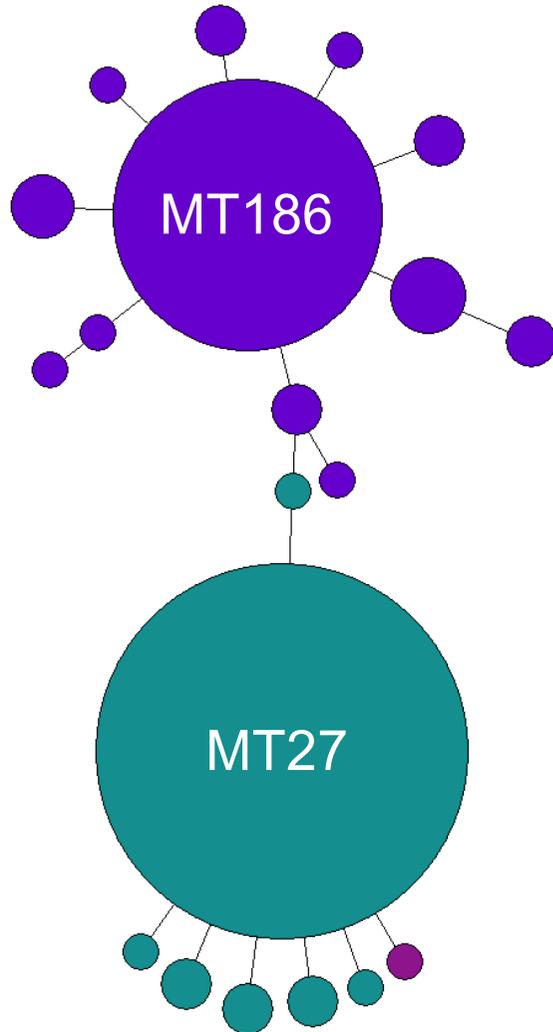
地域流行発生時などには百日咳菌・百日咳類縁菌の収集にぜひご協力ください



日本における百日咳菌の遺伝子型変化 (MLVA法)

2005-2013年 (n=178)

2014-2017年 (n=65)



minimum spanning tree

新規SNP型別法の開発 (SNaPshot multiplexシステム)

- 日本を含め先進国ではMT27株が増加し，現行MLVA法による型別が困難となっている
- MT27株に対する新規SNP型別法を検討中
- SNP型別のため35個のSNPマーカーを選択（参照株：東浜株）

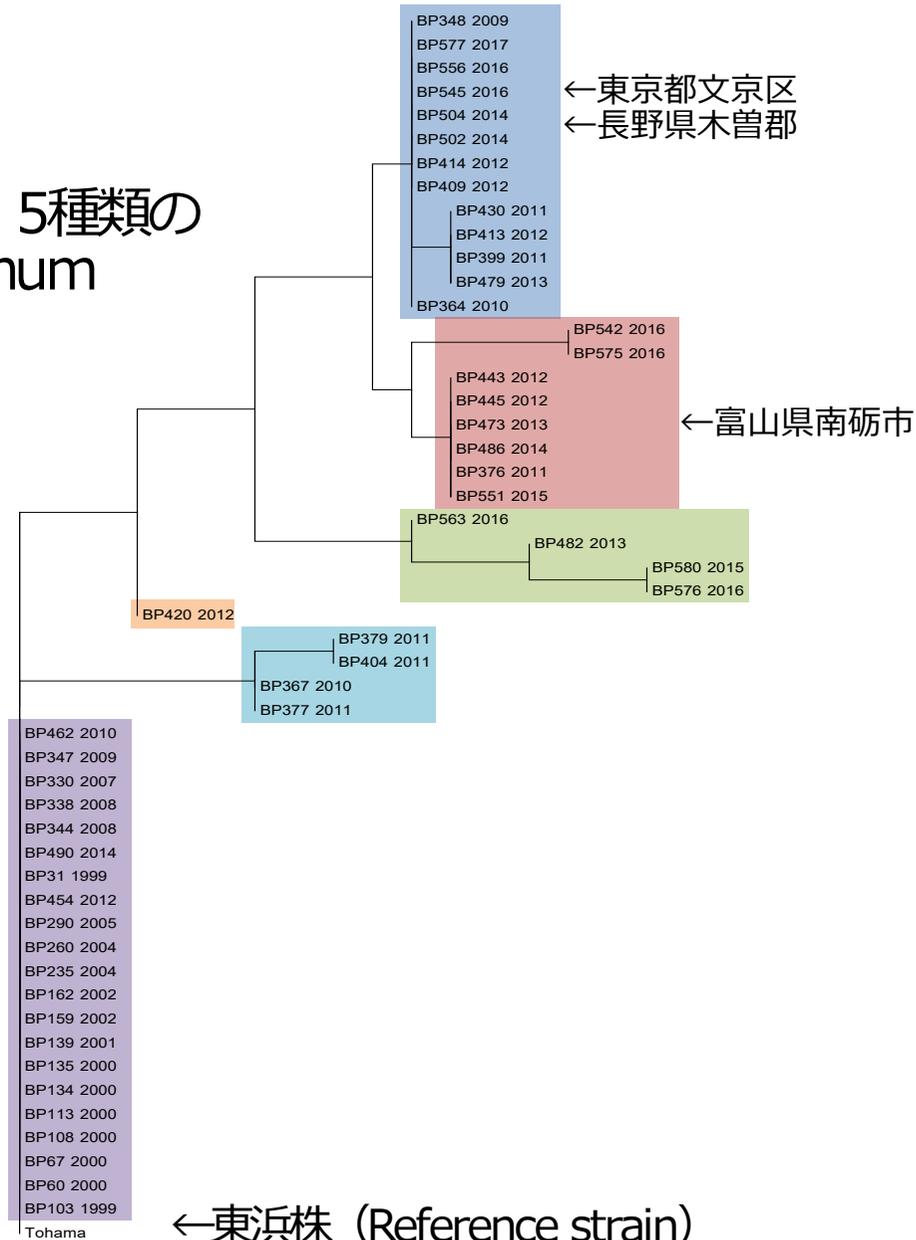
Gene	SNP	n
pseudo		3
hypothetical protein	coding SNP	1
	silent SNP	2
CDS	coding SNP	18
	silent SNP	11
total		35

百日咳菌MT27株のSNP型別 (検討中)

MT27株 : 51株



11種類のSNPタイプ, 5種類の系統群に分類 (Maximum parsimony)



clade I : 2009-2017年
(av. 2013年)

clade II : 2011-2016年
(av. 2014年)

clade III : 2013-2016年
(av. 2015年)

clade IV : 2010-2011年
(av. 2011年)

clade V : 1999-2014年
(av. 2004年)

**ボツリヌス症
リファレンス・センター**

北海道 秋田県 福島県
東京都 千葉県 神奈川県
大阪
三重県
山口県 岡山県
福岡県 熊本県 沖縄県

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

1. A, B, E, F型の診断用抗毒素は、リクエストに応じて配布していますので、国立感染症研究所まで連絡ください。
2. C, D, G型の診断用抗毒素は国立感染症研究所に保存してあります。C, D, G型毒素産生性ボツリヌス症を疑う場合は、国立感染症研究所までご連絡ください。
3. ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRのための、陽性コントロールが必要な場合はご連絡ください。

ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

1. 稀少感染症であること，動物実験を必要とすることから，検査の技術継承が難しい
2. 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催
3. 今年度は，参加者によるマウス接種実施ができるよう準備中
4. 参加ご希望の場合は細菌第二部 加藤まで

第7回講習会：

2018年11月7～9日，現在2自治体が参加予定

第6回講習会

2017年11月15～17日

参加自治体：広島市，埼玉県，
富山県，神戸市

第5回講習会

2016年11月16～18日

参加自治体：埼玉県，さいたま市，
大阪府

5. 動物由来感染症

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

国内の病原体サーベイランスに資する 機能的なラボネットワークの強化に関する研究

動物由来感染症レファレンスセンター

目的：動物由来感染症の実験室診断方法の整備
バイオテロ時を含めた緊急時に迅速対応が可能な体制の整備

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所 獣医科学部 部長

衛生微生物技術協議会第39回研究会
平成30年7月5日 滋賀県大津市

動物由来感染症レファレンスセンター活動

H29：ブルセラ症検査のEQA

目的：動物由来感染症の実験室診断方法の整備
バイオテロ時を含めた緊急時に迅速対応が可能な体制の整備

研究協力者（実施担当者） 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
研究協力者 鈴木道雄 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

日本におけるブルセラ症(1999.4.1 ~ 2018.6.30)

B. melitensis 感染 9例



B. abortus 感染 4例

BM or BA感染 (未同定) 1例

B. canis 感染 28例

すべて国内感染
(日本人)
2008 : 重症例 2例

年	年齢	推定感染地	
2005	30代	シリア	Travel to
2006	50代	エジプト	Travel to
2009	10代	インド	Visit from
2010	40代	ペルー	Visit from
2011	40代	中国	Homecoming to
2014	40代	中国	Visit from
2015*	60代	フランス	Travel to
2015	50代	カメルーン、スーダン	Visit from
2015	50代	ソマリア	Visit from

*抗体はB. canisのみ陽性だが、症状と地域より推定

年	年齢	推定感染地	
2006	20代	エジプト	Visit from
2008	60代	ペルー	Visit from
2016	60代	タンザニア	Visit from
2017	40代	中国	Homecoming to

年	年齢	推定感染地	
2015	40代	マダガスカル	Travel to

年	報告数	年	報告数	年	報告数	年	報告数
2002	1	2008	3	2012	0	2016	1
2005	1	2009	1 (1)	2013	1	2017	1
2006	3	2010	1	2014	9 (4)	2018	2
2007	1	2011	1	2015	2 (1)		

* ()内は無症状病原体保有者として届出

ブルセラ症の検査・診断

臨床症状
感染機会の有無
など

+

細菌学的検査 : 分離・同定
血清学的検査 : 抗体の測定
遺伝子の検出 : PCR など

ブルセラ症の感染症法における届出基準

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	血液、骨髄
試験管凝集反応による抗体の検出 (抗原がアボルタスの場合は40倍以上、 カニスの場合は160倍以上の抗体価)	血清

医師は、患者の渡航歴・母国が**流行地** + **不明熱**を呈する場合は、ブルセラ症も疑いうる

ブルセラ症検査の実態（背景）

*ブルセラ症の検査については、医療機関よりの依頼が想定され、基本的に**血清抗体検査と分離培養**、もしくは**分離菌株の同定**依頼となる。

*このうち、**血清抗体検査**については、市販の抗原菌液を使用した検査も実施可能だが、民間の臨床検査センターにおいて保険診療に基づく検査を実施しているので、医療機関から当該センターに検査依頼することが可能である。

*そのため、**感染研**においては、医療機関等からの問い合わせの際には、行政検査でない場合は、**まず検査センターに抗体の検査依頼をする**よう伝えている。**大半のケースで、抗体が検出されず、その時点でブルセラ症が否定される。**

*ただし、検査センターでの**抗体検査の結果が陽性であった、菌（未同定）が分離された**、もしくは**患者背景**（流行地域出身の外国人、流行地への海外渡航歴、臨床症状等）から**ブルセラ症が強く疑われる**、などの場合については、原則、行政検査として、抗体検査および菌の分離培養・菌の同定検査を受けることとしている。

ブルセラ症検査EQA (抗体検出:TAT, 遺伝子検出:PCR)

感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加可能地研でモデル検体を用いた検査を試行し、検査法・手技等の検証を行う

参加地研数： 21地研

実施期間： 2017.10.3-2018.2.28

実施内容：

1. 抗体検査法：

B. abortusを抗原とした

試験管凝集反応 (TAT)の実施

2. 遺伝子検出法 (PCR)：

- 1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) での実施
- 2) 各施設で通常使用しているTaq Polymeraseでの実施
- 3) 血清からのDNA抽出とPCR
- 4、5) 感染研および各施設の方法で検体希釈列を用いた検出限界の検討

岩手県環境保健研究センター	京都府保健環境研究所
山形県衛生研究所	兵庫県立健康生活科学研究所
東京都健康安全研究センター	神戸市環境保健研究所
群馬県衛生環境研究所	広島県立総合技術研究所
横浜市衛生研究所	保健環境センター
静岡県環境衛生科学研究所	徳島県立保健製薬環境センター
富山県衛生研究所	香川県環境保健研究センター
愛知県衛生研究所	長崎県環境保健研究センター
名古屋市衛生研究所	長崎市保健環境試験所
岐阜県保健環境研究所	宮崎県衛生環境研究所
三重県保健環境研究所	沖縄県衛生環境研究所

抗体検出:TAT

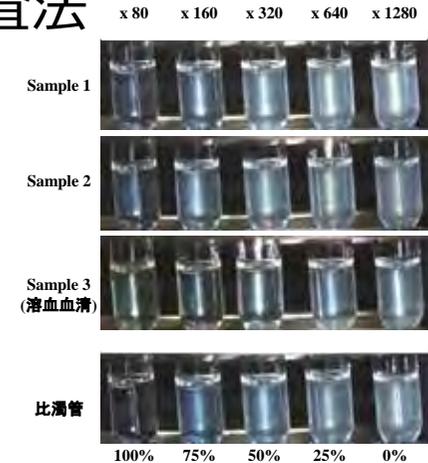
目的： ブルセラ症の診断として最も有効な方法である抗体検査法（試験管凝集反応）の実態を知る

使用（送付）サンプル等：

抗原：凝集反应用菌液（不活化B. abortus全菌体）

1. B. suis免疫ウサギ血清
2. B. canis免疫ウサギ血清
3. Y. enterocolitica O9免疫ウサギ血清

PC. B. abortus免疫ウサギ血清



結果の考察：

概ね良好な結果が得られている。

抗原にB. abortus (smooth-type) を使用しているため、B. suisは反応するが、B. canis (rough-type) は反応しない
Y.e.O9のLPSはB. abortusと類似、交差反応する

1地研、1,2,PCの価がおかしい

1地研、PCの価が高すぎる

9地研、1の価が？ -Endpoint出ていないので、640<が正しい

	1	2	3	PC
<10	1	20		
10		1		
20				
40			4	1
80			15	
160			2	14
320	3			5
640	9			
640<	8			1(?)

遺伝子検出:PCR

使用機器（サーマルサイクラー）、アガロースが多岐にわたる — 地研間で統一性がない
アガロースの選択 — 目的サイズ（今回は 200bp前後）に合っていない

サーマルサイクラー	Applied Biosystems	Veriti (5)	GeneAmp9700 (3)	2720 (2)
		SimpliAmp	ProFlex	
	BioRad	C1000 Touch (2)	T100	MyCycler
	Takara	TP600	TP650	TP350
	Astek	GeneAtlasG02		
	日本ジェネティクス	G-Storm GS4		
アガロース	Nusieve3:1 (3)	Agarose LO3 (4)	AgaroseS (3)	AgaroseX
	AgaroseME	Agarose Typel	Agarose Typell	et.al.
	MultiNA (マイクロチップ電気泳動、島津)			
	QIAxcel (キャピラリー電気泳動、QIAGEN)			
染色試薬	EtBr (15)	GelRed (3)	ミドリグリーンDirect	

DNA polymeraseや、抽出キットは、比較的限られた物が使用されている

(未実施：1地研)

DNA polymerase

- Takara ExTaq (HotStart含む) (14)
- Promega GoTaqGreenMasterMix (3)
- puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (1)
- Takara EmeraldAmp PCR Master Mix (1)
- Takara Tks Gflex (1)

DNA抽出キット

- QIAamp DNA Mini Kit (17)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (2)
- Takara NucleoSpin Tissue (1)

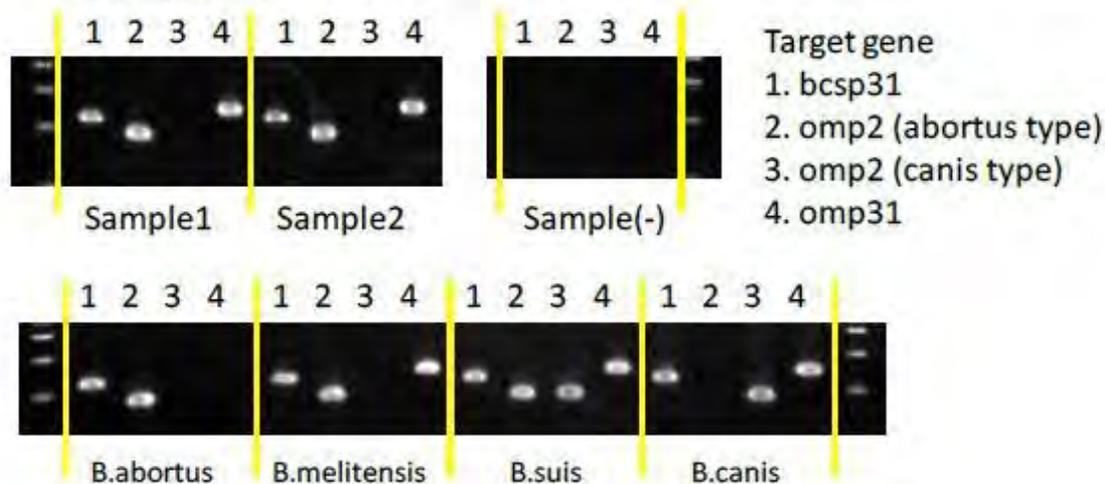
遺伝子検出:PCR

4種類のプライマーセットを組み合わせて菌種を同定する

- 1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads)での実施
- 2) 各施設で通常使用しているTaq Polymeraseでの実施
- 3) 血清からのDNA抽出とPCR

6) 泳動結果の判定

- (1) 下記、各菌種の増幅パターンより、検体の陽性・陰性、陽性の場合の菌種を同定 (B. abortus biovar 1 125 株、B. canis QE13 株、B. melitensis biovar 1 16M 株、B. suis biovar 1 1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターン。Sample1&2 は B. melitensis)



- B. abortus では、bcsp31、B. abortus 型の omp2 遺伝子。
B. melitensis では、bcsp31、omp31、B. abortus 型の omp2 遺伝子。
B. canis では、bcsp31、omp31、B. canis 型の omp2 遺伝子。
B. suis では、4種類すべての遺伝子。

遺伝子検出:PCR

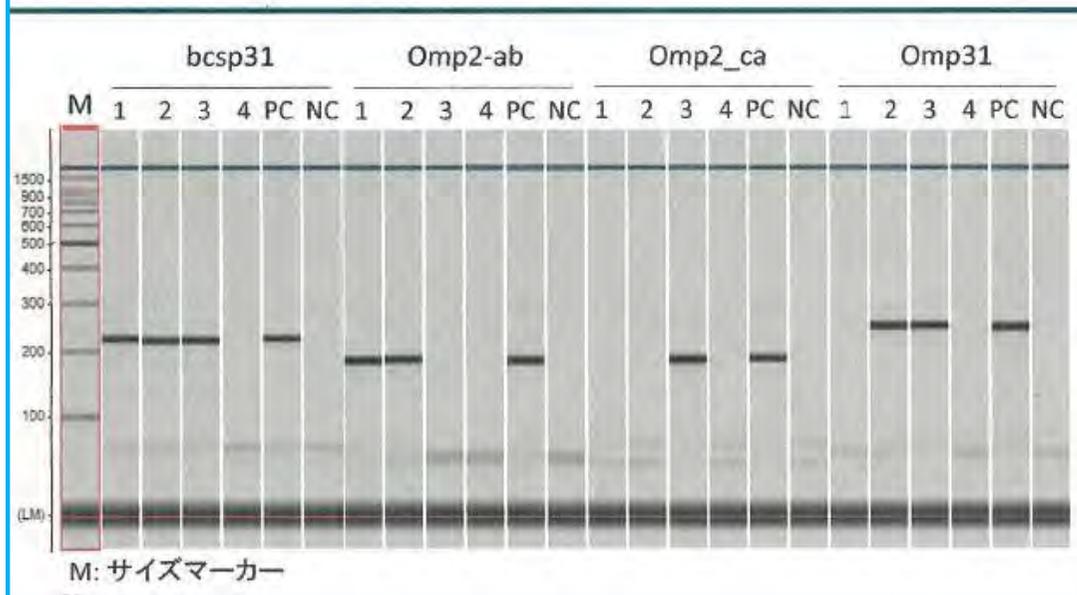
定性的な検査については、どの地研も、1) ~ 3) いずれも良好な結果が得られている

DNA抽出も問題なし

#1	BA 544
#2	BM 16M
#3	BC QE13
#4	<i>Streptobacillus notomytis</i>
#PC	BS 1330

検体番号	反応結果 (目的サイズの増幅)				判定結果	
	bcbp31 (224bp)	omp2-ab (186bp)	omp2-ca (187bp)	omp31 (249bp)	陽性 or 陰性	同定菌種名
例#0	+	+	-	+	陽性	<i>B. melitensis</i>
#1	+	+	-	-	陽性	<i>B. abortus</i>
#2	+	+	-	+	陽性	<i>B. melitensis</i>
#3	+	-	+	+	陽性	<i>B. canis</i>
#4	-	-	-	-	陰性	
#PC	+	+	+	+	陽性	<i>B. suis</i>

(ブルセラ属菌でない場合は、“陰性”との判定)



遺伝子検出:PCR

4、5) 感染研および各施設の方法で検体希釈列を用いた 検出限界の検討

検出感度検討用BA 544 DNA希釈列

(1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01,
0.003, 0.001ng/ul, DW)

標的遺伝子はbcsp31

#	3	4	5	6	7
RTG	1	7	6	4	2
他*	1	8	4	5	1

検出感度は#4(0.03ng/ul)までが
多い

感度の違いはPolymeraseによる
差よりも施設による差?

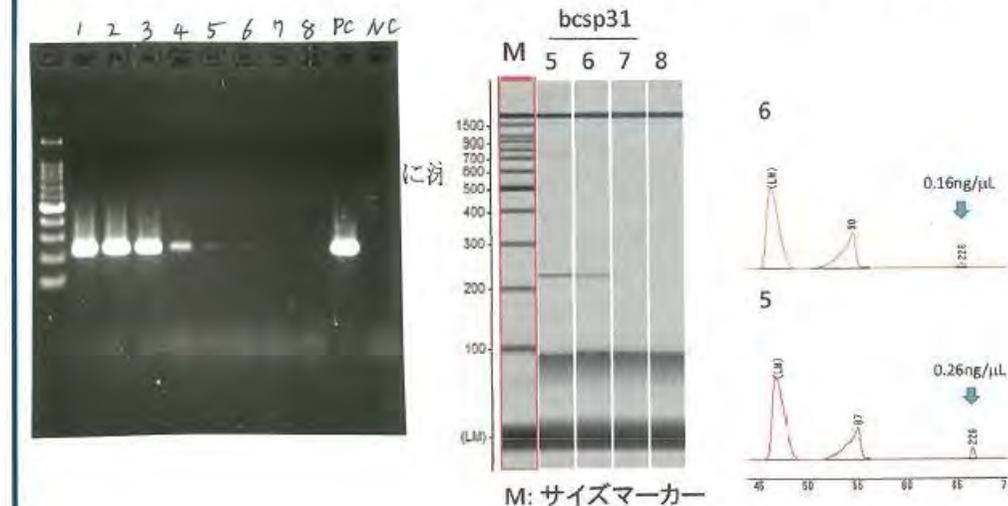
—使用機器・染色液の違い? (*未実施: 1地研)

5. 泳動結果

- エンドポイントを求める。
(特異的増幅が見られた物に「+」を記入)

No	1	2	3	4	5	6	7	8	PC	NC
増幅判定	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

PCR産物 5ul アプライ, 40分泳動 MultiNA; No.5~8 について 原液を測定



まとめ

ブルセラ症（4類感染症）の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地方衛生研究所（地衛研）でブラインド検体を用いた検査（抗体検査：TAT、遺伝子検出：PCR）について、外部精度管理（検査法・手技等の検証）を実施した。

抗体検出については、うまく結果が出なかったところや**結果の判定方法が誤っている**地衛研も認められた。

遺伝子検出に関しては、**定性試験（菌種同定）は良好**であったが、**検出感度は各地衛研により差**が大きく見られた。

これは、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間でまちまちで、感度に違いが出ているのではないかと推測された。本来ならば、行政検査対象項目に関しては、使用機器、アガロースについて、統一を図る事が望ましいと考えられた。

ただ、全体的にみて参加21地衛研において、今回の結果のフォローを行うことで、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた

動物由来感染症レファレンスセンター 平成30年度活動予定について

炭疽菌 遺伝子検査 検出限界の算定

国立感染症研究所 獣医科学部
奥谷 晶子

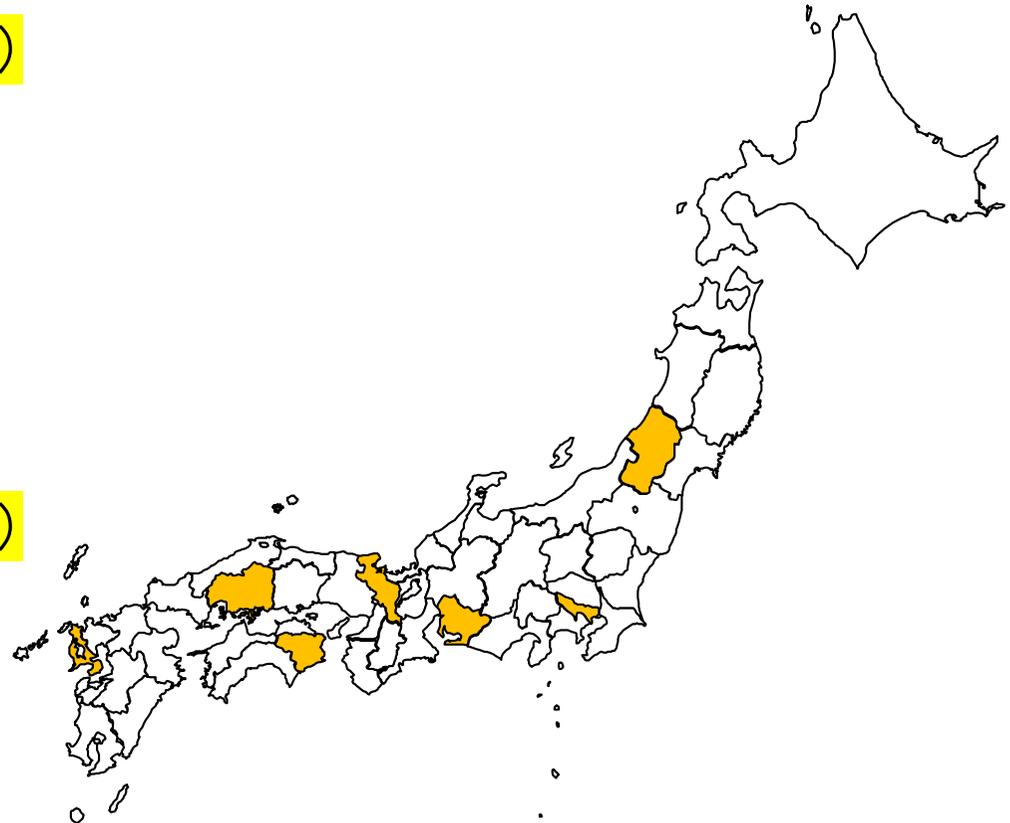
平成24年度および平成25年度 炭疽菌遺伝子検査を実施

平成24年度 参加衛生研究所(5カ所)

- ◆ 山形県衛生研究所
- ◆ 東京都健康安全研究センター
- ◆ 愛知県衛生研究所
- ◆ 京都府保健環境研究所
- ◆ 長崎県環境保健研究センター

平成25年度 参加衛生研究所(7カ所)

- ◆ 山形県衛生研究所
- ◆ 東京都健康安全研究センター
- ◆ 愛知県衛生研究所
- ◆ 京都府保健環境研究所
- ◆ 広島県立総合技術研究所保健環境センター
- ◆ 徳島県立保健製薬環境センター
- ◆ 長崎県環境保健研究センター



平成24年度および平成25年度 炭疽菌遺伝子検査を実施

平成24年度

ブラインド・テスト

炭疽菌および近縁菌種由来のDNAを用いたconventional PCR法による遺伝子検出

目的

地方衛生研究所 自前の所有機器および試薬で検査を行えるかを確認する

平成25年度

検出限界算定

炭疽菌由来DNAの段階希釈液を用いたconventional PCR法による遺伝子検出限界の算定

目的

DNAおよびプライマーを配布して各研究所の所有機器での検出限界を算定する

今後の予定

今年度後半～

炭疽菌および近縁菌DNA溶液、PCRプライマーの配布
EQAの実施

白い粉検体の取り扱い要領の作成
アンケートなどにより改訂を加える

希望があれば

枯草菌芽胞液を配布し各研究所で
芽胞の取り扱いを実習

(DNA抽出、白い粉を模した実習、汚染度の測定など)

6. インフルエンザ

レファレンスセンター報告

インフルエンザ

衛生微生物技術協議会 第39回研究会
平成30年7月5-6日 大津、滋賀

インフルエンザレファレンスセンター

コア地衛研:

岩手県環境保健研究センター

東京都健康安全研究センター

大阪健康安全基盤研究所

愛媛県立衛生環境研究所

福岡県保健環境研究所

サポート地衛研:

北海道立衛生研究所

横浜市衛生研究所

富山県衛生研究所

堺市衛生研究所

沖縄県衛生環境研究所

○愛知県衛生研究所

H29年度のレファレンス活動報告

- ✓ インフルエンザ株サーベイランスの実施
HI試験用サーベイランスキットの配布
AX-4細胞の配布(希望地衛研)
- ✓ 薬剤耐性株サーベイランスの実施
TaqMan PCRで検出(地衛研)、感受性試験(感染研)
- ✓ 外部精度管理事業(インフルエンザ)の実施
- ✓ 薬剤耐性株検出系(TaqMan PCR)の動作確認
コア・サポート地衛研対象に試験的に実施
- ✓ ウイルス分離培養技術の実態調査
北海道・東北・新潟地区および近畿地区を中心に希望地衛研に実施

AX-4細胞

ヒト型レセプターを多く発現しているMDCK細胞

東京大学医科学研究所・ウィスコンシン大学の
河岡研究室で樹立

Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF) と
Material Transfer Agreement (MTA: 研究試料提供
契約) の締結が必要

随時、締結可能です。

渡邊 (sw@nih.go.jp) までお問合せください。

AX-4細胞

- ✓ これまでは、基本的にはH3亜型ウイルスの分離への使用をお願いしてきましたが、今後は、H1pdm09亜型およびB型ウイルスにも使っていただけるようにしました。
- ✓ 所長あるいは担当者(MTAに署名された方)が変更になった場合には、変更誓約書の提出をお願い致します。

渡邊 (sw@nih.go.jp) までお問合せください。

H30年度のレファレンス活動報告

- ✓ インフルエンザ株サーベイランスの実施
サーベイランスキットを10月に配送予定
- ✓ 薬剤耐性株サーベイランスの実施
実施要綱を8月に配布予定
- ✓ 薬剤耐性株検出系 (TaqMan PCR) の動作確認
希望地衛研対象に実施予定
- ✓ ウイルス分離培養技術の実態調査
関東・甲・信・静地区および東海・北陸地区を中心に
希望地衛研に実施予定

引き続きインフルエンザサーベイランスへのご協力をよろしくお願い致します。



Flu
Influenza Virus
Research Center

7. 大腸菌

EHEC MLVAについて

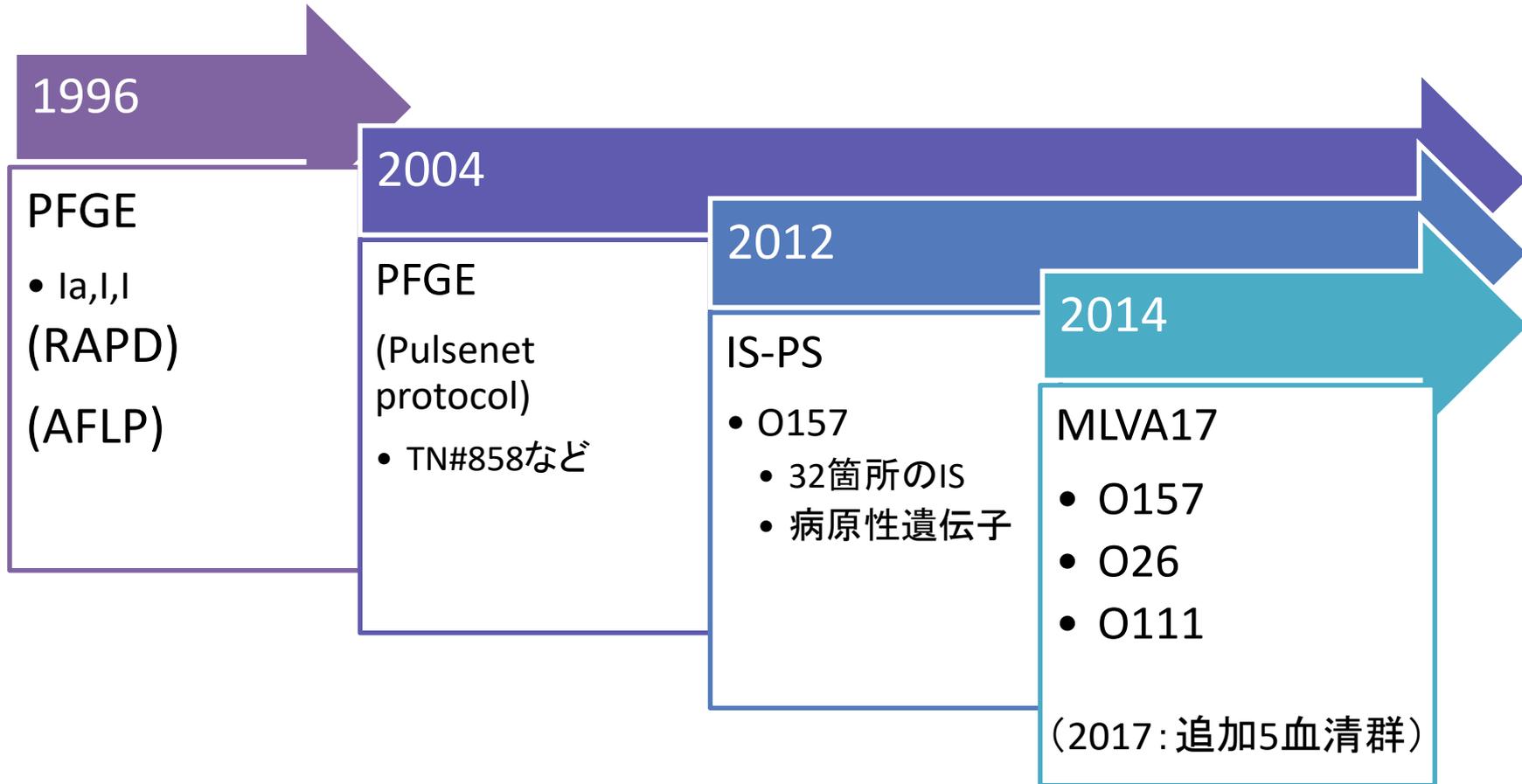
衛生微生物技術協議会第39回研究会

—大腸菌リファレンス会議

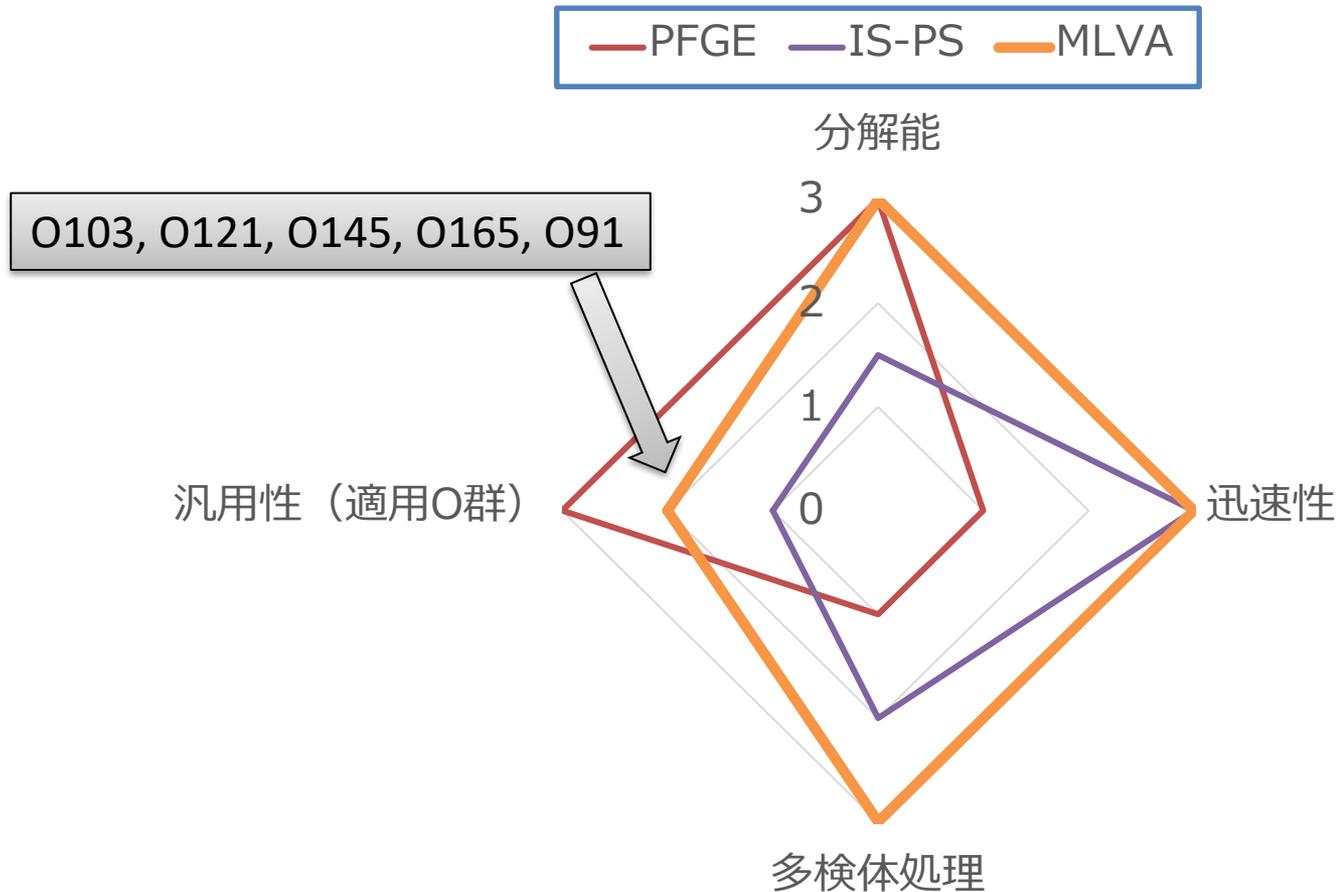
国立感染症研究所細菌第一部

泉谷秀昌、伊豫田 淳

わが国でEHECに使われてきた 分子疫学解析手法



EHEC分子疫学解析法



(多検体処理能力はラボ環境に依存)

MLVA17 遺伝子座について

Reaction mix 1

<i>O157-34</i>	<i>EHC-1</i> (SVL-3*)	<i>EHC-2</i> (SVL-1*)	<i>O157-9</i> (SVL-2*)	<i>EHC-5</i>	<i>O157-3</i>	<i>O157-25</i>	<i>EH111-8</i>	<i>EH157-12</i>
----------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------	---------------	----------------	----------------	-----------------

9か所

Reaction mix 2

<i>EH111-14</i> (SVL-7*)	<i>EH111-11</i>	<i>O157-17</i>	<i>O157-10</i>	<i>O157-36</i>	<i>O157-19</i>	<i>EHC-6</i> (SVL-12*)	<i>O157-37</i> (SVL-11*)	<i>EH26-7</i>
-----------------------------	-----------------	----------------	---------------------------	----------------	----------------	---------------------------	-----------------------------	---------------

9(8)か所

CDC(O157) : 8か所
PNJ(2014年4月～) : 17か所

(Izumiya, et al., Microbiol Immunol. 54, 569-577, 2010.)

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125, 70-80, 2016.)

MLVA43 追加遺伝子座について

追加5血清群用 (O103, O121, O145, O165, O91)

Reaction mix q1

q1701 q1702 q1705 q1708 q1710 q1712 q1716 q1724 q1725 q1726 q1727 q1730 q1731
(SVL-5*) (SVL-6*)

13か所

Reaction mix q2

q1704 q1707 q1711 q1714 q1715 q1717 q1718 q1720 q1721 q1722 q1723 q1728 q1729
(SVL-23*)

13か所

17か所 + 26か所 ⇒ 43か所

(* Timmons C, et al., J. Microbiol. Met. 125: 70-80, 2016)

MLVA型表記

	MLVA型
O157	18m0xxx
O26	18m2xxx
O111	18m3xxx
O103	18m4xxx
O121	18m5xxx
O145	18m6xxx
O165	18m7xxx
O91	18m8xxx

型数及びDiversity Indexの比較 (2017年株)

MLVA17	株数	型数	SID
O157	1668	608	0.973
O26	710	256	0.986
O111	135	55	0.924

MLVA43	株数	型数	SID
O103	146	46	0.910
O121	78	33	0.957
O145	45	20	0.871
O165	8	8	1
O91	42	34	0.988

2017年広域株(5機関以上、株数上位12)

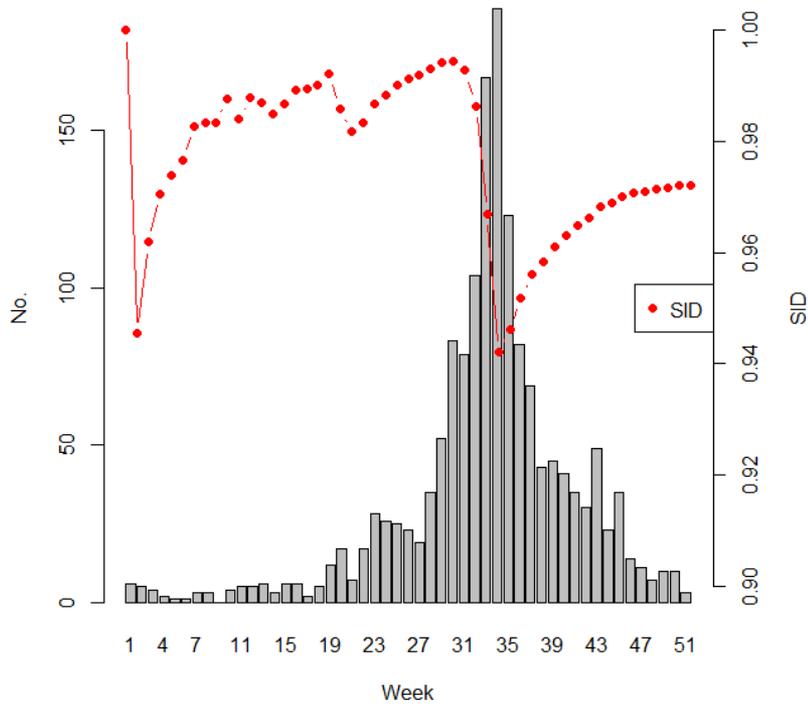
	O群	VT型	株数	機関	コンプレックス	関連事例
17m0121	O157	VT2	258	35	17c013	ポテトサラダ
17m2005	O26	VT1	39	20	17c201	
17m0210	O157	VT1+VT2	33	15	17c027	介護福祉施設
17m0129	O157	VT1+VT2	25	16	17c044	焼肉食中毒
13m2040	O26	VT1	22	6	17c213	保育園
17m0144	O157	VT2	21	8	17c013	
17m0212	O157	VT1+VT2	17	6	17c028	
16m0039	O157	VT1+VT2	17	9	17c050	
17m0351	O157	VT1+VT2	16	9		
17m0104	O157	VT1+VT2	15	7		
16m6009	O145	VT2	15	6		事業所弁当
17m0143	O157	VT1+VT2	15	6	17c027	

MLVA-SIDについて

2017年O157

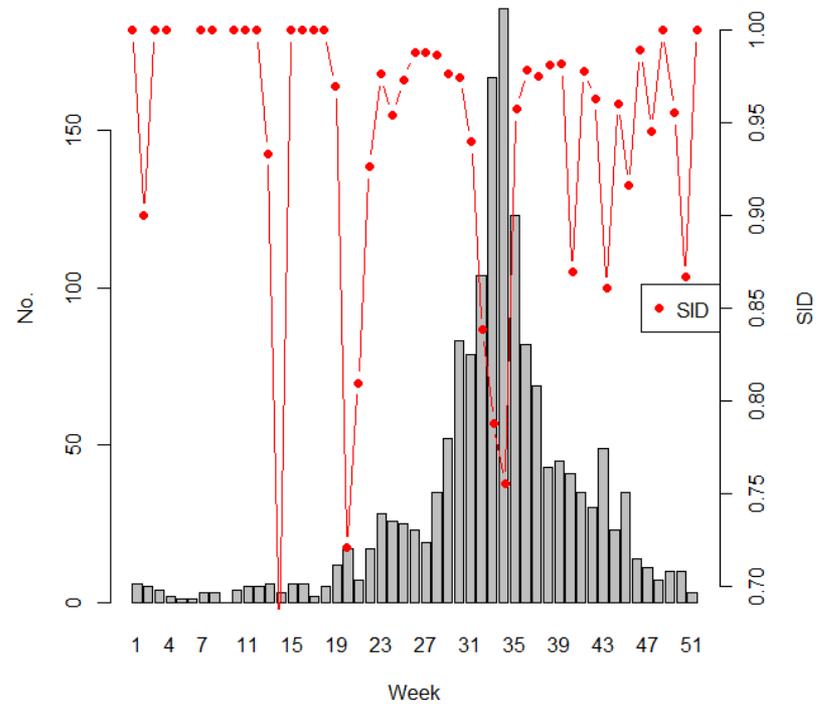
累計

O157 (2017)

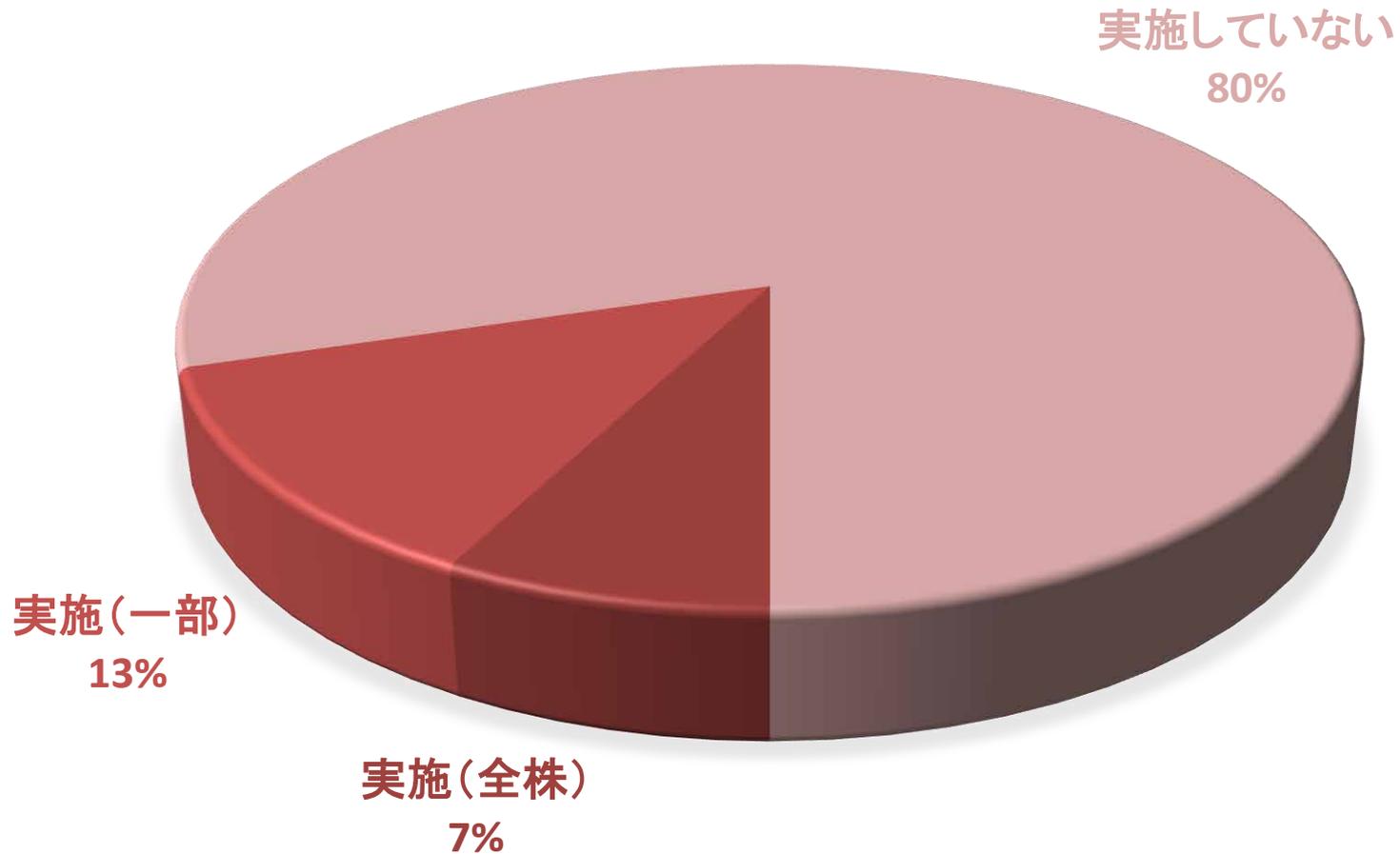


週計

O157 (2017)



MLVA実施状況(2017年)



平成29年11月以後

腸管出血性大腸菌感染症・食中毒事例の調査結果取りまとめ

平成29年11月17日

医薬・生活衛生局食品監視安全課
健康局結核感染症課

- 遺伝子型別としてMLVA法に統一へ
 - 健感発0208第1号
(薬生食監発0208第1号)平成30年2月8日
 - MLVA17
- 2018年3月に研修会

18c000(あるいは18m0000) ZZZ県

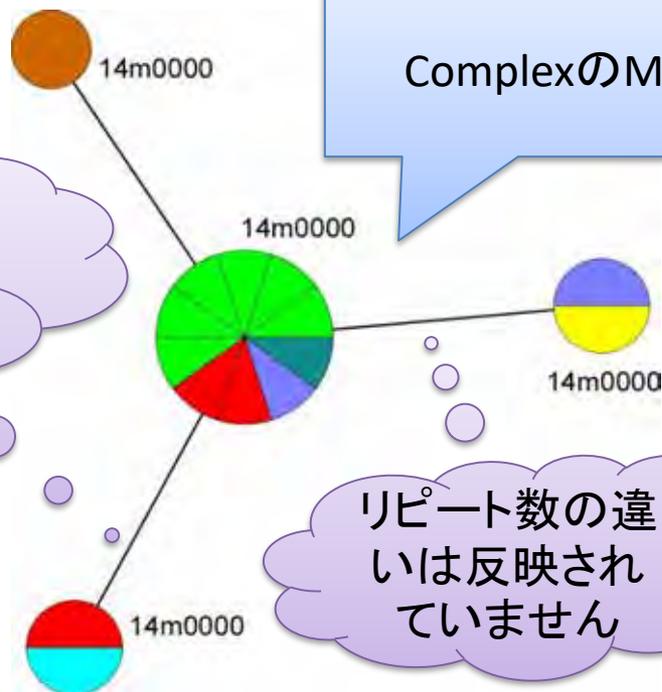
型名もしくはComplex名
都道府県名

Key	date	source	MLVA Type	MLVA Comp
co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000
co14xxxx	2014/m/d	ZZZ	14m0000	14c000

該当菌株
菌株番号、分離日、機関、型名、Complex名
【機関で色分け】

線の長さは
異なる遺伝子座の
数を表します

ComplexのMST



リピート数の違
いは反映され
ていません

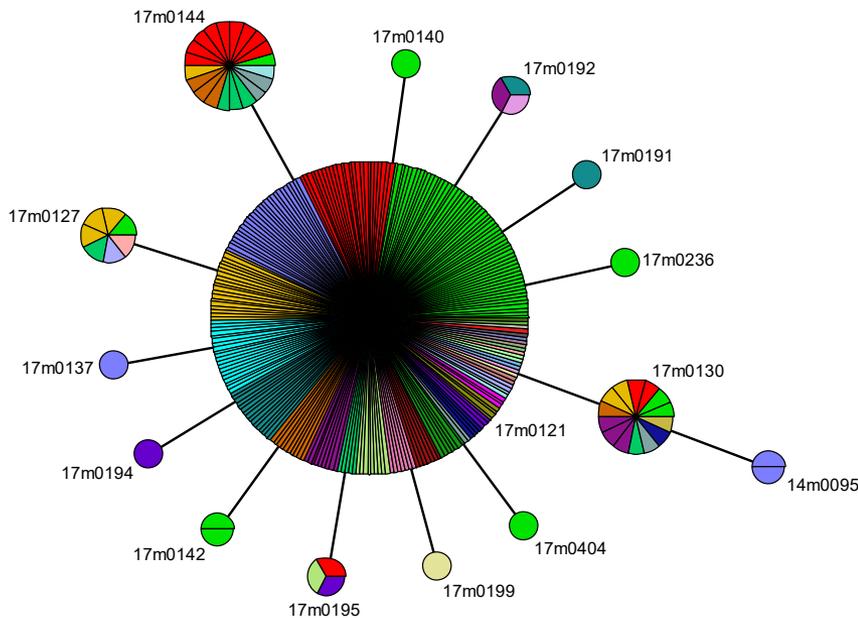
現在(過去1-2か月以内)発生中の集発の一部と考えられます。
追加情報等ございましたらお知らせください。

送付MLVAデータ由来について
は"co"がつきません

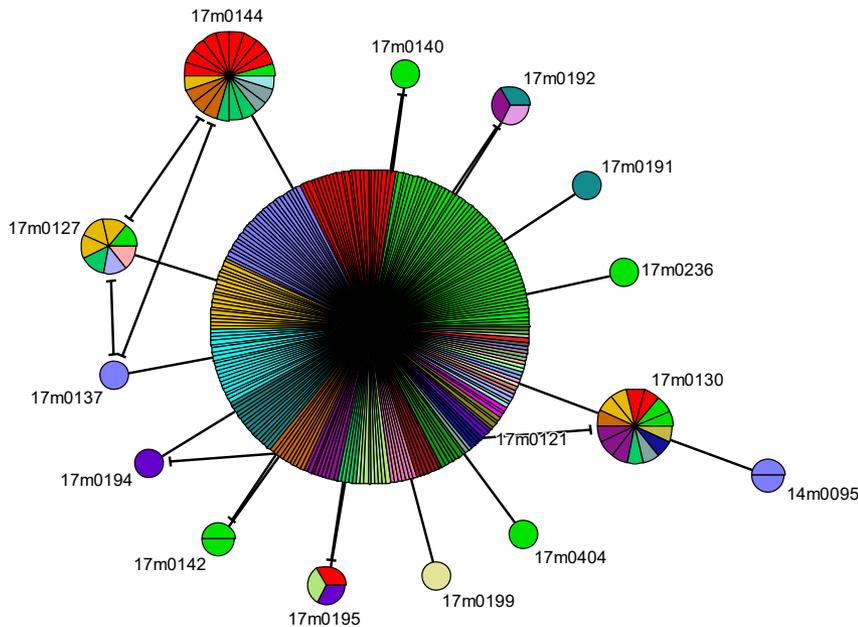
コメント(参考)

回覧している Minimum Spanning Treeについて

- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - 線の角度の意味はない



回覧している Minimum Spanning Treeについて



- 本来のMST
 - 構成要素すべてを網羅する
 - 各要素を結ぶ辺の重みが最小のもの
- Bionumericsで作成
 - Single locus variantがわかるように、クロスリンクを付加している
 - 「⊥」で区別

MLVAフローチャート 操作

鋳型DNA

- 菌株培養
- DNA抽出

PCR

- マルチプレックスPCR 2種類(8血清群)+2種類(追加5血清群)
- 産物の希釈(HiDi Formamideで)

電気泳動

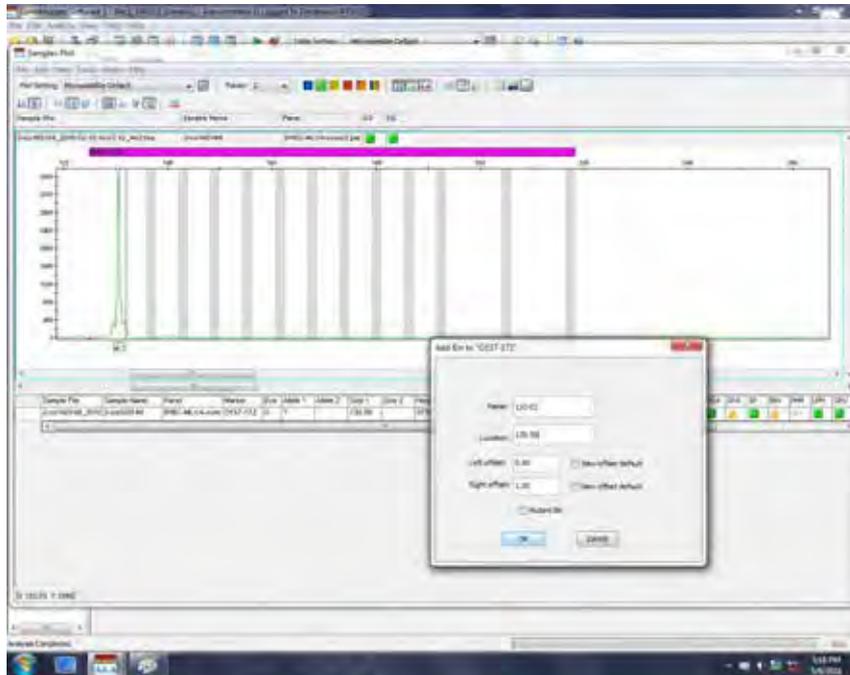
- シークエンサー
- GeneScanサイズマーカー

解析

- ピーク検出
- リポート数への変換

Genemapperのパネル・
bin設定ファイル

Binの修正



- 機器によってBinの位置を修正する必要があります。
- Samples Plot画面等で修正してください。
- 全てのピーク位置をカバーしているわけではありませんので、Binの追加が必要な場合があります。

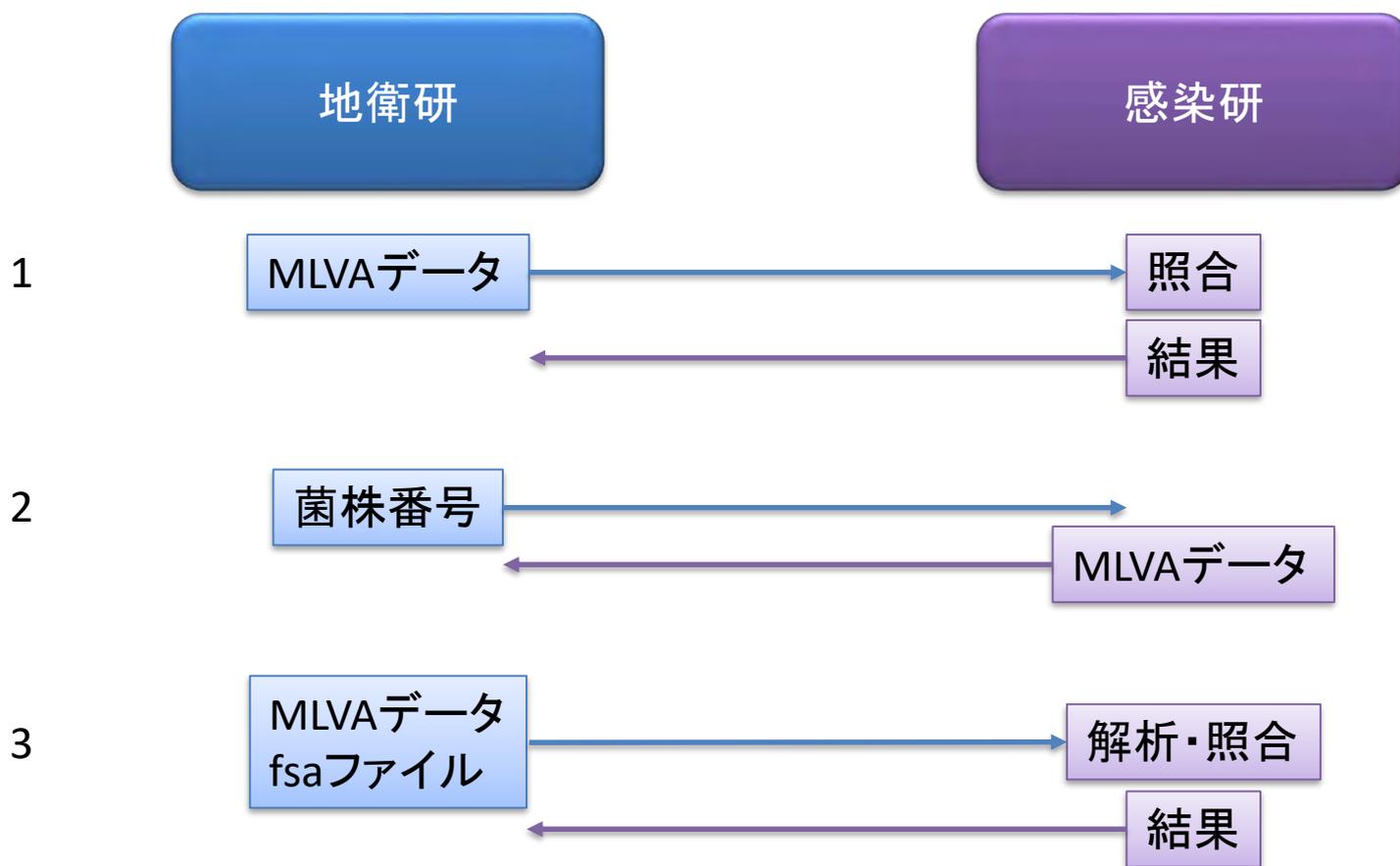
MLVA精度管理

- 菌株もしくはDNAを配布
 - 結果を送付→判定
- 感染研に送付(済み)の菌株について、データを照合

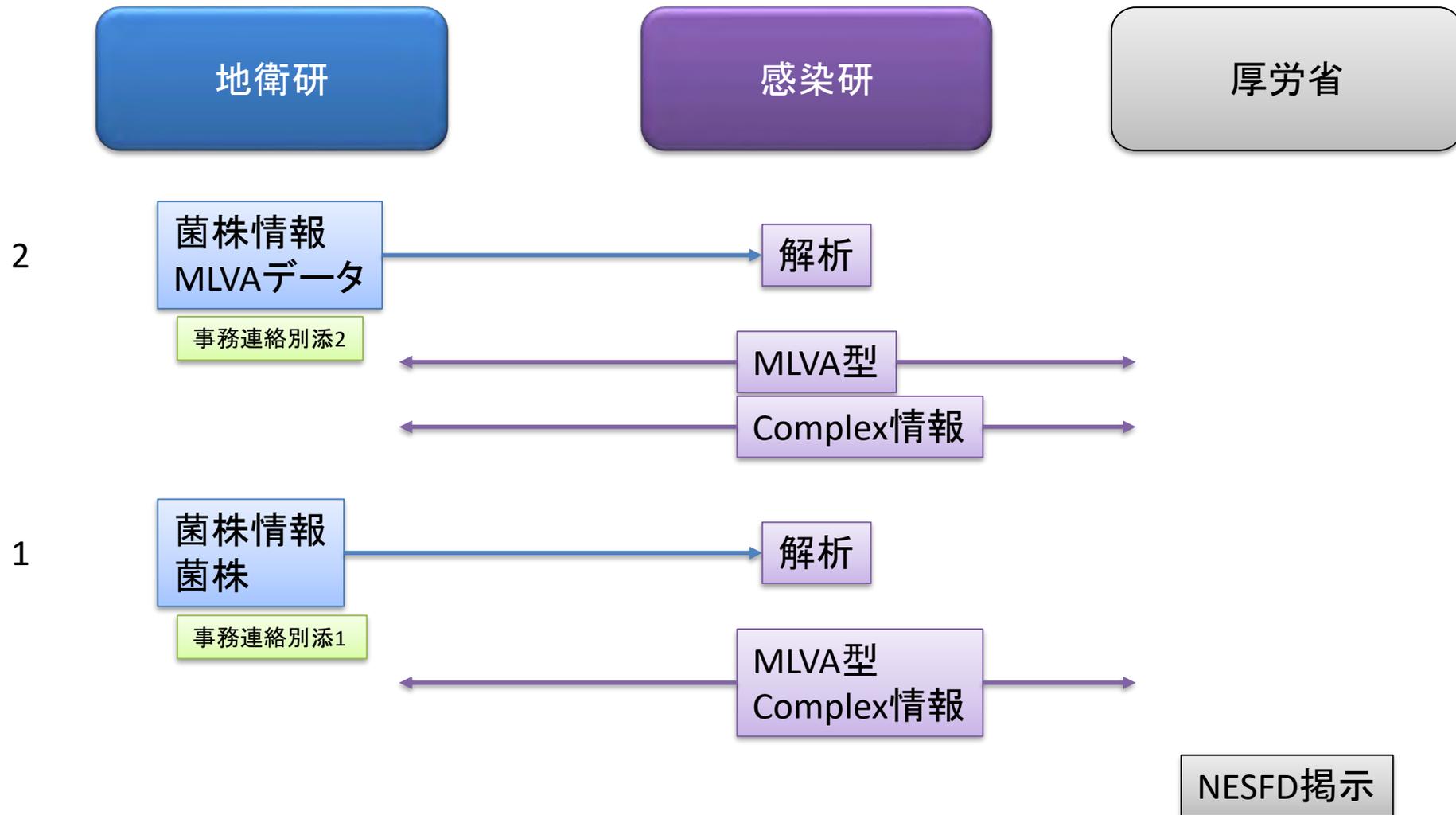
	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

MLVAデータ照合について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6



送付MLVAデータに基づく MLVA型付与について(厚労省事務連絡)



厚労省事務連絡後の菌株送付について

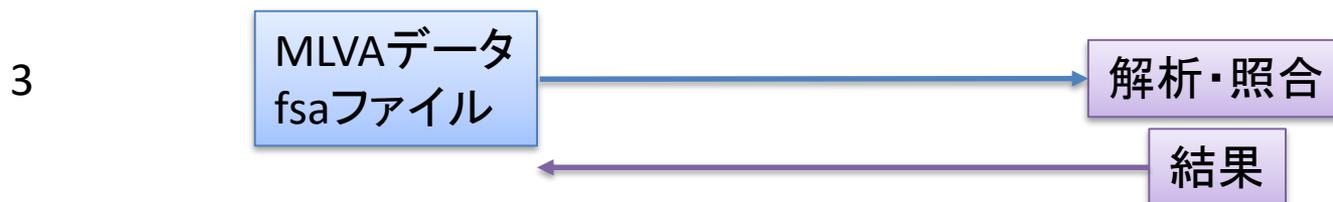
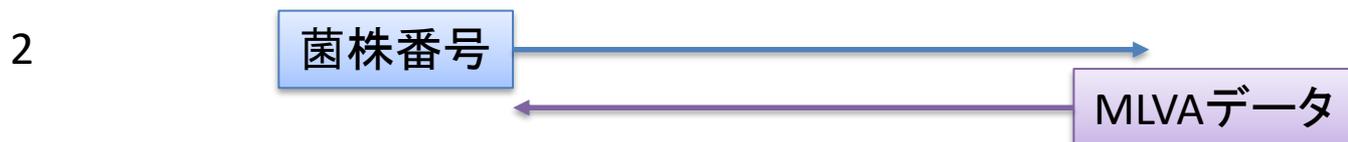
- 地衛研でMLVAを実施した菌株については菌株を送る必要はありませんが、結果の精度確認をする必要があります。最初にMLVAデータを送るにあたり、昨年もしくは今年の株でリピート数の答え合わせをしてください。
- MLVAデータとともに菌株を送付していただければ、毎回答え合わせをすることが可能です。（こちらの方が望ましい。菌株送付は後日で構いません。）

MLVAデータ精度確認について

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V
[菌株#]	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6

地衛研

感染研



お知らせ

- 7月以後は2018年株のみと比較を行います。
- 引き続き、菌株(ならびに情報・データ)送付のほどよろしくお願いいたします。

8. エンテロウイルス

エンテロウイルス レファレンスセンター報告

福島県衛生研究所	(北海道・東北・新潟)
神奈川県衛生研究所	(関東・甲信・静)
愛知県衛生研究所	(東海・北陸)
大阪健康安全基盤研究所	(近畿)
愛媛県立衛生環境研究所	(中国・四国)
福岡県保健環境研究所	(九州)

内容

1. 2017-18シーズンのエンテロウイルス検出状況について、各ブロックより報告
 - ・ 2017年秋より、手足口病患者よりEV-A71が検出されている。
 - ・ 2018年6月現在、定点あたりの患者報告数も増加傾向でありEV-A71が主に検出されている。
 - ・ ヘルパンギーナは報告数が少ないものの今後の動向に注視。
2. 新たに5類感染症に追加された急性弛緩性麻痺 (AFP)患者の検査について、他
3. 厚生労働科学研究班*による手足口病を対象とした外部精度管理手法の研究結果報告

*健康安全・危機管理対策総合研究事業「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」分担研究(平成28-29年度)

4. その他

- ・H29(2017)年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査結果サマリー(情報提供)
- ・宮崎班**で作成した事例集の紹介

**厚労科研 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」分担研究(平成29年度)

抗血清、細胞の配布 (H29年度実績)

抗血清分与	延べ6衛研(49種類)
細胞分与	延べ5衛研(RD-A:5衛研、L20B:3衛研)

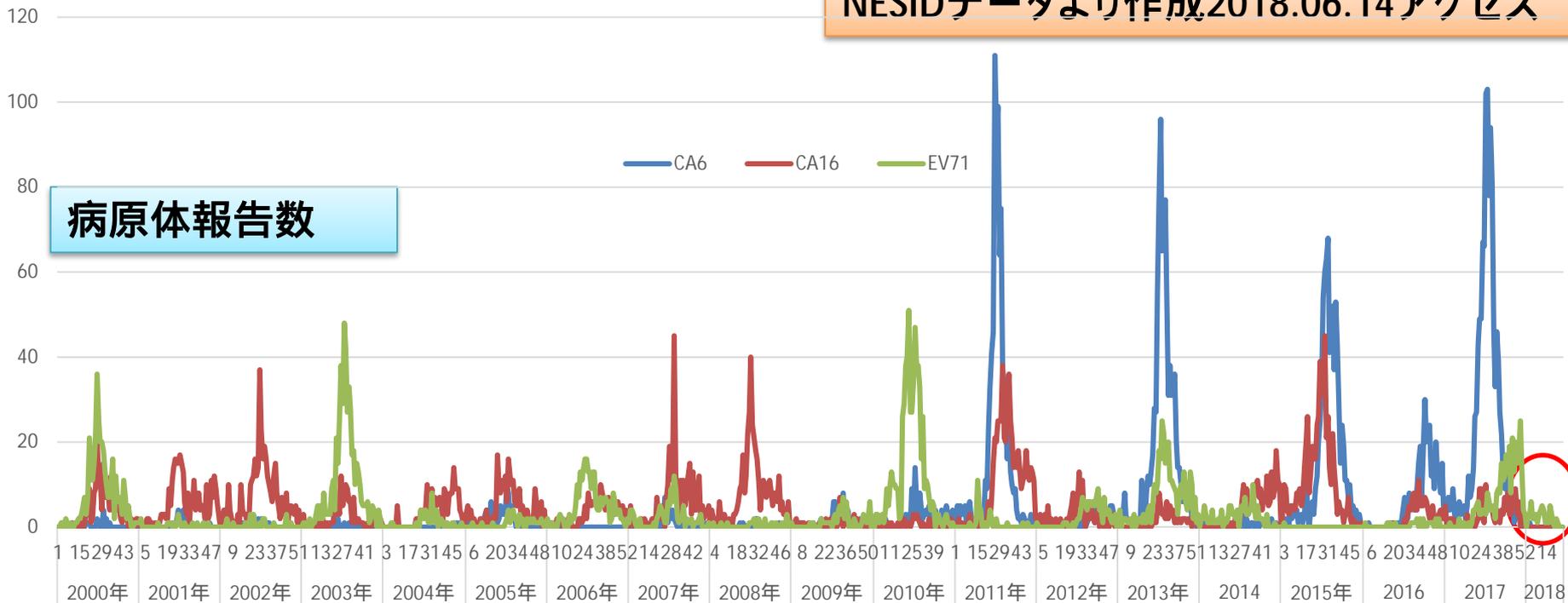
エンテロウイルス抗血清EP95*は各ブロックへ依頼ください。
その他の単味抗血清はウイルス二部へ照会ください。

RD-A細胞、L20B細胞は分与可能です。

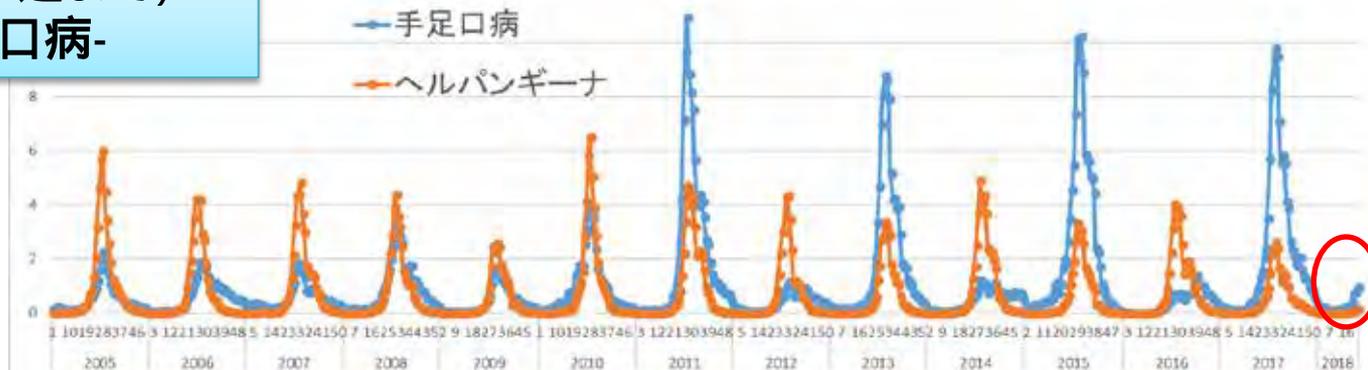
*EP95とは、1995年にエンテロウイルスレファレンス支部と共同で作成したプール抗血清。
国内で流行した代表的な血清型を含む。
「無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル」に使い方など詳細を記載

手足口病患者由来EV71,CA16,CA6の検出数(2000-2018年24週までの登録)

NESIDデータより作成2018.06.14アクセス

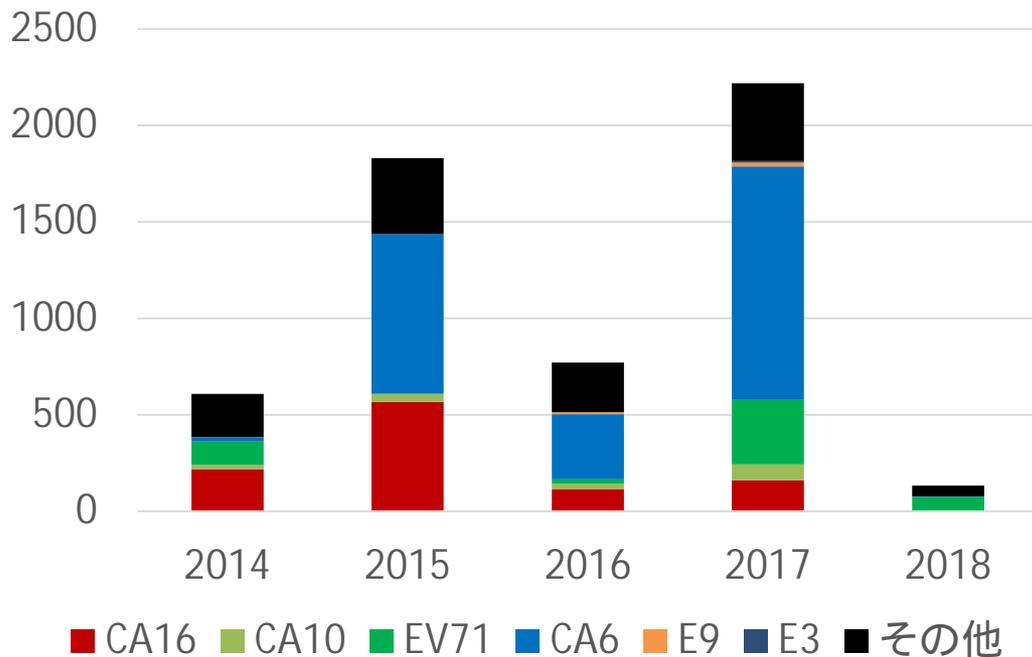


定点あたりの報告数(-22週まで) -ヘルパンギーナと手足口病-

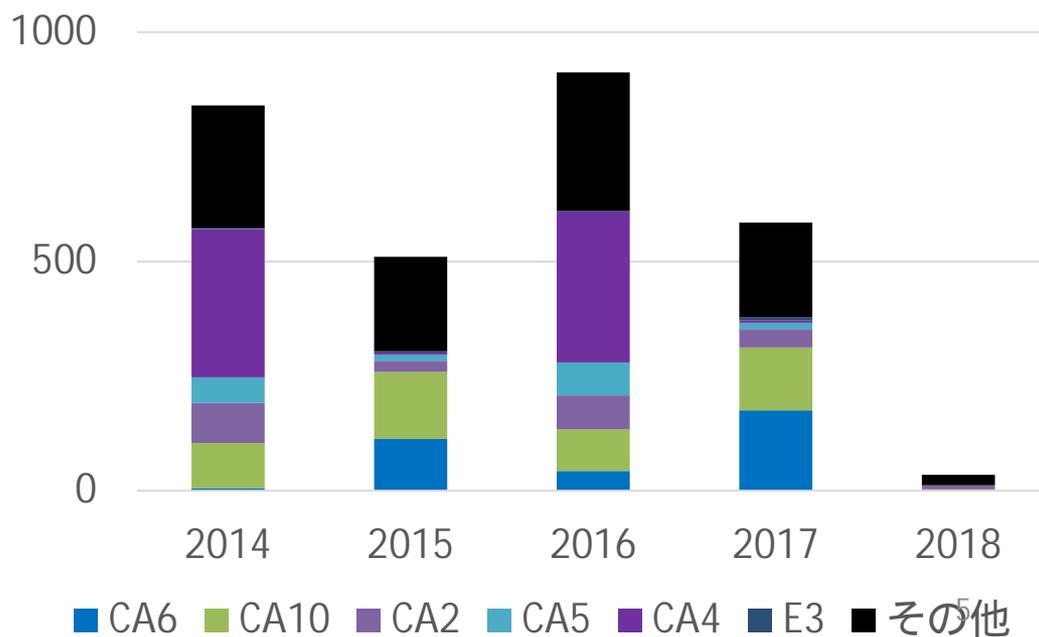


IDWRデータより作成
2018.06.14アクセス

手足口病患者から検出されたエンテロウイルス



ヘルパンギーナ患者から検出されたエンテロウイルス



NESIDデータより作成
2018.06.29アクセス

2018年1月1日以降採取された検体についての検査結果

血清型

年齢	CA 10	CA 16	CA2	CA4	CA6	CA9	CB2	CB3	CB4	CB5	E11	E18	E25	E3	E30	E6	E7	E9	EV 71	Un typed	HPe V1	HPe V3	HPe VNT
0	1		2		1	2	5			1				1	2	2	6	1	6	3	3	3	1
1	1		7		2				1	1	1	3		2			1		30	1	1		4
2	2	1	1	1		1	2					1	1	2		1			21		3		1
3			1					1	1										9	2		1	
4				1		1								2		2			7	1			
5	1			1					2					1					1	1			
6			1							1									3		1		
7																		1	2	1			
8																			2	1			
9																							
10																			1				
11																							
12																							
13																							
14																2							
15																							
16																							
17														1									
25						1																	
45																					1		
不明	1		1																				6

NESIDアクセス2018.06.26

環境水ポリオサーベイランス(2017年度の調査状況)

H29年度流行予測調査事業(16か所)

調査研究(2か所)

下水利用人口は約600万人



	~ H21 (2009以前)	H22 (2010)	H23 (2011)	H24 (2012)	H25 (2013)	H26 (2014)	H27 (2015)	H28 (2016)	H29 (2017)
調査場所	1	2	2	4	13(8)**	19(14)	18(16)	18(16)	18(16)
備考				大石班参加 事業化準備	事業開始				

(*H25年度流行予測調査事業開始以降、事業参加衛研数)

9. 寄生虫

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人：永宗喜三郎(感染研・寄生動物)

レファレンスセンター活動・寄生虫

- ・各ブロックの拠点となる地研は指定していない。
- ・課題となる寄生虫を選び、関連の地研・検疫所とメーリングリストを利用して情報交換(研修)。

・課題の寄生虫

- (1) 4類 マラリア, エキノコックス **(感染症法)**
- (2) 5類 クリプトスポリジウム, ジアルジア, 赤痢アメーバ

-
- (3) 食品媒介寄生虫 **(食品衛生法)**

クドア, サルコシスティス, アニサキス等

食中毒事件票・病因物質の種別

レファレンスセンター等関連会議：寄生虫

話題の提供と情報交換(演者・所属:敬称略).

A. 赤痢アメーバの抗体検査について

- 1.赤痢アメーバ抗体検査キット生産中止による影響とその対応 (八木田健司・感染研)
- 2.大阪健康安全基盤研究所における赤痢アメーバ検査対応 (阿部仁一郎・大阪健康安全基盤研)
- 3.東京都における赤痢アメーバ抗体検査 (鈴木 淳 東京都健康安全研究センター)

B. 本州におけるエキノкокスの現状

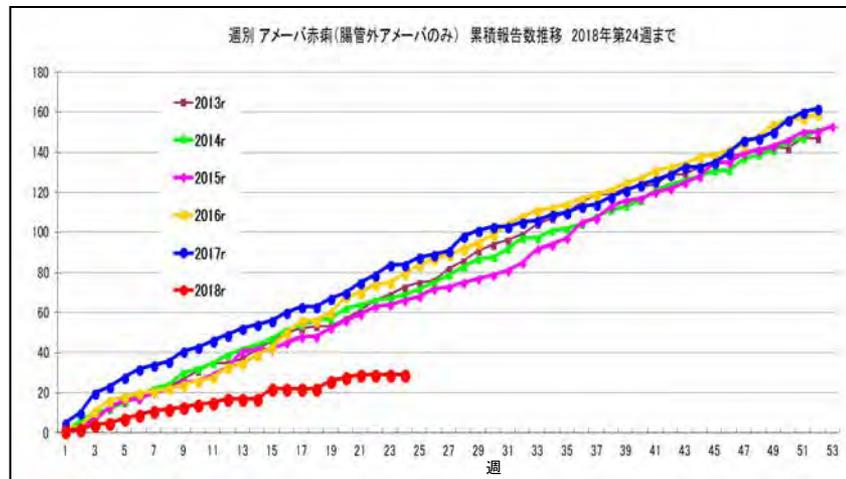
- 4.愛知県で2018年に発見された3件のエキノкокス陽性犬と行政対応 (長谷川晶子・愛知県衛研)
- 5.「犬のエキノкокス症対策ガイドライン2004」の追補について (森嶋康之・感染研)

赤痢アメーバ抗体検査キット生産中止による影響とその対応

国立感染症研究所寄生動物部 八木田健司

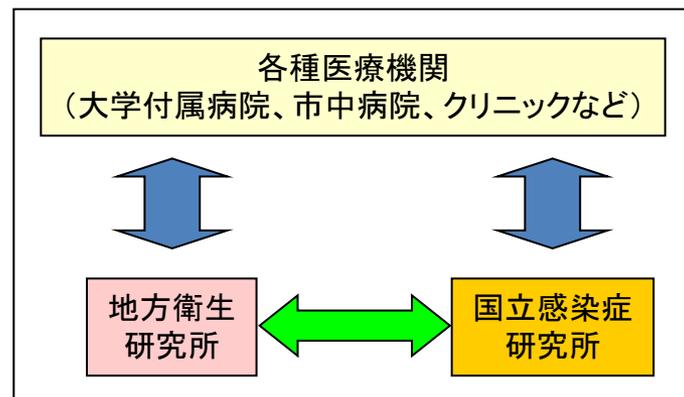
●現状分析－発生動向に影響

- ・2017年末より、保険適用の赤痢アメーバ抗体検査試薬「アメーバスポットIF」が製造中止となった。
- ・主として民間検査センターで行われていた同検査件数は年間およそ10,000件と推定。
- ・抗体検査が困難な現状は、赤痢アメーバ症の報告数減少という発生動向上の影響を及ぼしている。
- ・特に抗体検査が診断根拠になる腸管外アメーバ症(重症化する可能性のあるアメーバ性肝膿瘍例)の報告数減少が顕著(右)。原因不明症例の増加、赤痢アメーバ症全体のneglect化が懸念される。



●感染研ならびに地衛研の対応

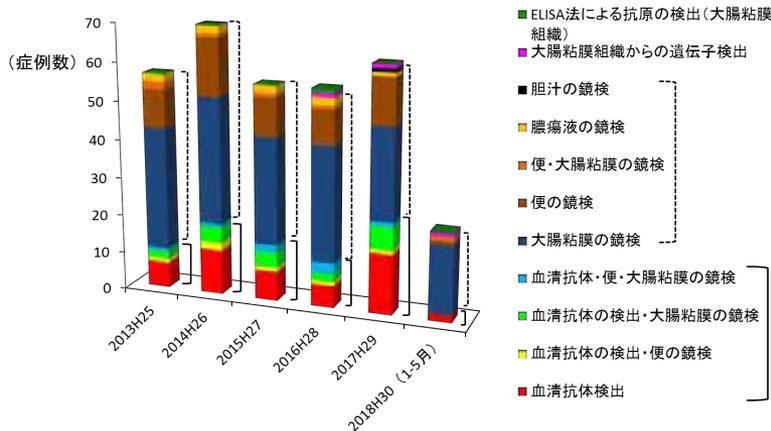
- ・感染研への抗体検査等の依頼検査は顕著に増加。依頼/行政検査対応を強化。>ELISA(血清抗赤痢アメーバIgG検出)、赤痢アメーバ特異的PCR検査。
- ・地研では現状、外部からの検査依頼増加の傾向はないが、今後の状況変化に備え検査体制を整備。>感染研は地研をサポート。ELISA等検査法研修、抗原・血清の分与等。



大阪健康安全基盤研究所における赤痢アメーバ検査対応

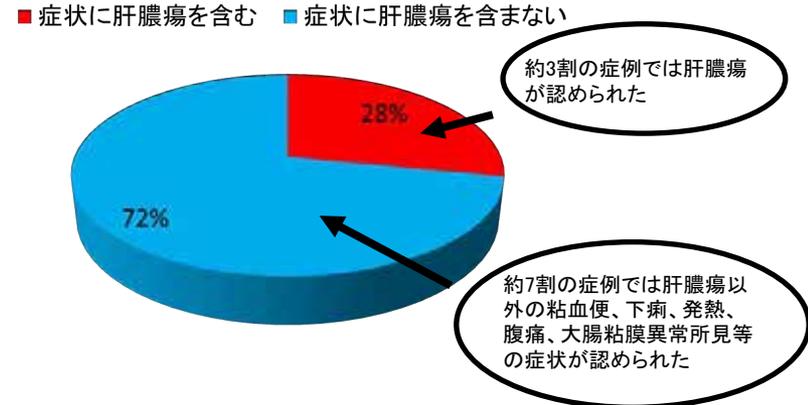
(大阪健康安全基盤研究所 微生物課 阿部仁一郎)

過去5年間(2013~2017)に大阪市内でアメーバ赤痢を届け出するのに用いられた検査方法



- ・血清抗体検査は毎年2~3割の症例で用いられている
- ・症例の2割前後は血清抗体検査のみが用いられている

血清抗体検査が用いられた症例に肝臓病が含まれていた割合(過去5年間、同左)



約3割の症例では肝臓病が認められた

約7割の症例では肝臓病以外の粘血便、下痢、発熱、腹痛、大腸粘膜異常所見等の症状が認められた

- 血清抗体検査が用いられる理由(推測)**
- ・民間検査機関に外注できる?
 - ・患者への侵襲も少ない?
 - ・大腸粘膜や粘血便等からの虫体検出の経験がない?

血清抗体検査キットの製造販売中止を受けて、今後、アメーバ赤痢の試験室内診断はどのように対応する予定か？

○血清抗体検査に頼っていた医療機関では、その代替検査方法を用いることになる

- ⇒ 膿瘍採取が可能な場合は、そこからの遺伝子検査が求められる(対応可能)
- ⇒ 大腸粘膜や下痢便からの虫体の検出同定が求められる(対応可能、必要に応じて研修受け入れ可能)
- ⇒ 症例によっては血清抗体検査が必要になる(腸管症状なく、虫体排出もなく、転移性膿瘍を認める場合; 大腸粘膜や糞便採取が困難な場合等)
 - ⇒ 感染研寄生動物で実施のELISA法を導入し、サーベイランス抜きの検体として抗体検査を行う
 - 感染研寄生動物において研修を受講済み。必要試薬の入手、抗原固相化マイクロストリップの分与および稼働確認を経て血清抗体検査を実施予定

○血清抗体検査に頼っていた医療機関では、血清抗体検査可能な施設を検索

- ⇒ 引き続き血清抗体検査を届け出のための検査方法として用いる
 - ⇒ 検査可能施設への負担が増加、抗原の備蓄も必要(将来的に赤痢アメーバ無菌培養株の継代維持を考えている)

東京都における赤痢アメーバ抗体検査

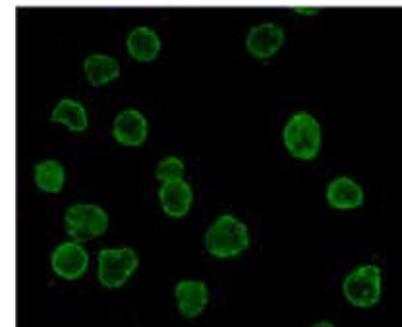
アメーバスポットIF

問題点：販売中止（唯一の体外診断用医薬品として認可）、
血清100倍希釈検体でも判断に迷うことがある

プレートELISA（都健安研採用）

問題点：抗原の供給、ポジコンの入手、
精度管理（特に診断に用いる場合）

利点：検査費用はアメーバスポットIFと比較し
安価、機器測定により客観的判断が可能



都健安研の場合

疫学調査の一環で抗体検査を実施、
費用は8ウェルのプレートと2次抗体の
費用が中心でキットより安価



愛知県で2018年に発見された3件の エキノコックス陽性犬と行政対応

長谷川晶子 (愛知県衛生研究所 生物学部 医動物研究室)

- 愛知県では、2014年4月に阿久比町でエキノコックス陽性犬が発見されたことから、エキノコックス汚染状況把握の為、2014年6月より知多半島で保護された野犬等の糞便調査を開始
- 調査期間内(2014年6月～2018年3月)に野犬等の糞便245件から、エキノコックス虫卵は検出されず(0/245)
- 上記検体の内の冷凍保存糞便180件を用いた糞便からのDNA抽出によるエキノコックス遺伝子検査でエキノコックス遺伝子を3件検出(3/180)
- 平成30年4月調査より調査方法を虫卵検査と糞便からのDNA抽出による遺伝子検査の併用に変更

「犬のエキノコックス症対策ガイドライン2004」の追補について

「犬のエキノコックス症対策ガイドライン2018 –非流行地における感染犬発見後の対応–」

- 背景：埼玉県（2005年）や愛知県（2014年）など、既知流行地（北海道）以外の県における捕獲犬からのエキノコックス感染例発見
- ガイドライン2004では想定外だった非流行地における捕獲犬の陽性事例に対応
- 調査対象とする区域・動物種・検査材料・検査方法を記述

レファレンスセンター等関連会議

寄生虫

世話人：**永宗喜三郎**(感染研・寄生動物)

地研に寄生虫に関する問い合わせや検査の依頼があれば、是非引き受けて下さい。感染研・寄生動物部にその内容をご照会下さい。対応にご協力します。

10. レンサ球菌

衛生微生物技術協議会溶血レンサ球菌 レファレンスシステムセンター

北海道・東北・新潟ブロック
福島県衛生研究所

東海・北陸ブロック
富山県衛生研究所

九州ブロック
大分県衛生環境研究センター

関東・甲・信・静ブロック
神奈川県衛生研究所

東京都健康安全研究センター

近畿ブロック
大阪府立公衆衛生研究所

中国・四国ブロック
山口県環境保健センター



溶血性レンサ球菌レファレンス

溶血性レンサ球菌

A群

- T血清型別
- M血清型別
- *emm*遺伝子型別など

B群

- 血清型別など

C,G群

- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

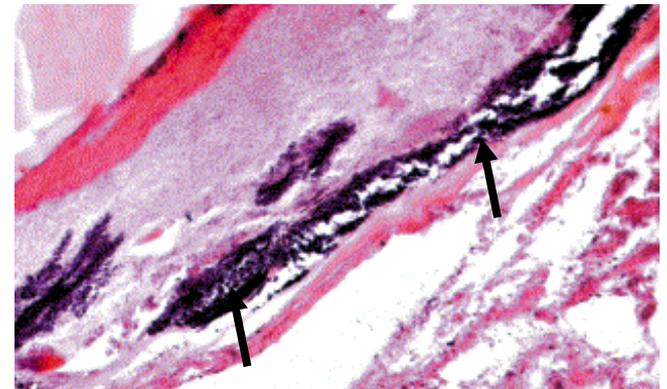
(感染症法) 5類感染症

- A群溶血性レンサ球菌咽頭炎（小児科定点報告疾患）
A群レンサ球菌による上気道感染症
- 劇症型溶血性レンサ球菌感染症（全数報告疾患）
β溶血を示すレンサ球菌を原因とし、突発的に発症して急激に進行する敗血症性ショック病態

咽頭炎



劇症型感染症



筋膜内の菌 (Hidalgo-Grass et al. Lancet 2004)

溶血性レンサ球菌レファレンス

溶血性レンサ球菌

A群

- T血清型別 ← 簡便
- M血清型別
- *emm*遺伝子型別など

B群

- 血清型別など

C,G群

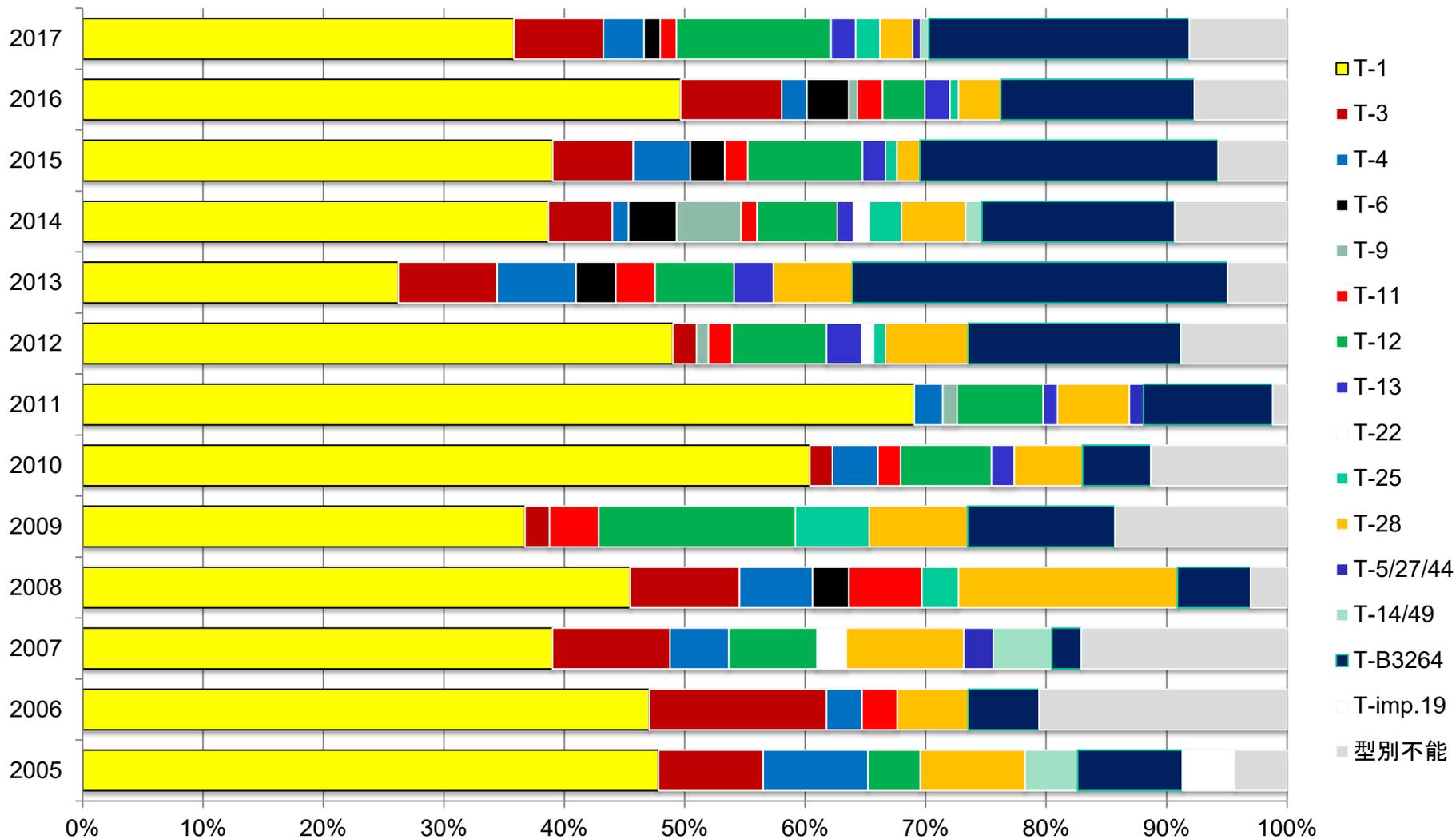
- 菌種の同定
- *emm*遺伝子型別など

その他のレンサ球菌

- 菌種の同定など

薬剤感受性試験

劇症型溶レン菌感染症患者由来株（A群レンサ球菌）の T型別（2005-2017）



11. アルボウイルス

衛生微生物技術協議会第39回研究会 滋賀県大津市

2018年7月5日(木)

国立感染症研究所 ウイルス第1部

イム チャンガン
世話人 林 昌 宏

アルボウイルスレファレンスセンター

担当ブロック	機関	担当部・課
世話人	国立感染症研究所	ウイルス第1部第2室 林 昌宏
北海道・東北ブロック	宮城県保健環境センター	微生物部
関東・甲信越ブロック	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科
東海・北陸ブロック	名古屋市衛生研究所	微生物部
	三重県保健環境研究所	微生物研究課
近畿ブロック	大阪健康安全基盤研究所	微生物部ウイルス課
	神戸市環境保健研究所	感染症部
中国・四国ブロック	広島県立総合技術研究所保健環境センター	保健研究部
九州ブロック	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部

H29年度レファレンス活動報告

- 近年の日本脳炎の流行状況について情報提供
- フラビウイルス・アルファウイルスに対する実験室診断の実施
- フラビウイルス遺伝子検査用プライマープローブセットの情報更新
- デングウイルス遺伝子検査用陽性コントロールの配布

当室におけるリアルタイムRT-PCR法によるアルボウイルス遺伝子検出法

患者検体(血液、血清、血漿、尿、唾液等)



RNA抽出

(Roche社 High Pure Viral RNA kit)



ワンステップ
リアルタイム
RT-PCR

48°C (RT reaction)	5 min	1 cycle
95°C	20 sec	1 cycle
95°C	3 sec	40 cycles
57°C	30 sec	

Thermo Fisher社
・StepOnePlus
・Quantistudio5
を使用

必要に応じて通常のRT-PCR法によりウイルス遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し、遺伝子解析を行っている

当室で使用しているJEVおよびWNV用リアルタイムPCRプライマープローブセット

Geno-type	Primer	Sequence	Probe	Sequence	
GI,III	JEen562s-585	CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	JEen585pb	FAM-ACT RAA CAC TGA AGC GT-MGB	GI,III共通
	JEen623c-585	GAH CCC ACG GTC ATG A			
GI	JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE1en1082pb	FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB	GI特異的
	JE1en1119c-1082	GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA			
GIII	JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE3en1082pb	FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB	GIII特異的
	JE3en1119c-1082	AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA			
JEV GI,III,V (WNV)	JENS5s269	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	JENS5p294	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	実際は3'NCR (10500付近) WNVにも反応
	JENS5r330.2	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG			
I,III,V	JE(I,III,V)E819f	GTA YTC DAG CTC AGT GAA GTT	JEVGV.F843fM	FAM-TTC TGG YCA CCT CA-MGB	GV特異的
	JE(I,III,V)E927r	VGA GAA YTT YTC TGT RCA CAT	JEVG13c.F871fM	FAM-ATG GAC AAA CTG GCT C-MGB	感度低い
WNV com	WNVcommon.3451f:	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV3538p	FAM-ATG ATT GAY CCT TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA	WNV特異的であるが、非常に弱くJEVが増幅することがある
	WNVcommon.3590r:	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC			

赤が第一選択。3セットすべてを使用することにより、JEVとWNVの両方に対応可能。

3セットすべてを使用することにより、JEVとWNVの両方に対応可能なリアルタイムPCRプライマープローブセット

	Name	Sequence	
Primer	JEen562s-585	CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	GI,III共通
	JEen623c-585	GAH CCC ACG GTC ATG A	
Probe	JEen585pb	FAM-ACT RAA CAC TGA AGC GT-MGB	
Primer	JENS5s269	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	GI,III,V WNV共通
	JENS5r330.2	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
Probe	JENS5p294	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	
Primer	WNVcommon. 3451f:	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV
	WNVcommon. 3590r:	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	
Probe	WNV3538p	FAM-ATG ATT GAY CCT TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA	

当室で使用しているダニ媒介脳炎ウイルス用リアルタイムPCR プライマープローブセット

	Name	Sequence
Primer	F-TBE1	GGG CGG TTC TTG TTC TCC
	R-TBE1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT
Probe	TBE-Probe-WT	FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA

Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003

当室で使用している黄熱ウイルス用リアルタイムPCR プライマープローブセット

Set B

	Name	Sequence
Primer	YF-4769F	TTGATTCCATCTTGGGCTTC
	YF-4862C	GGACCTCTTCCTCTCCATCC
Probe	YF-4804FAM	FAM-TGTCGCCTATGGTGGCTCATGGAAG-TAMRA

Set D (set Bを改変)

	Name	Sequence
Primer	YFcom-4769F	TTGRTTCCATCYTGGGCYTC
	YFcom-4862C	GGACCTCYTCYTCHCCATCC
Probe	YFcom-4803FAM	FAM- TKGTBGCCTATGGTGGCTCATGGAAGCTG-TAMRA

両方とも使用することにより、より広範な黄熱ウイルスに対応可能。

尿や全血からの日本脳炎ウイルス(ゲノム)の検出例

Open Forum Infect Dis. 2017 Sep 27;4(4):ofx203. doi: 10.1093/ofid/ofx203.

Prolonged Detection of Japanese Encephalitis Virus in Urine and Whole Blood in a Returned Short-term Traveler.

Huang GKL, Tio SY, Caly L, Nicholson S, Thevarajan I, Papadakis G, Catton M, Tong SYC, Druce J.

Abstract

We describe a fatal case of Japanese encephalitis virus infection following short-term travel to Thailand. Viral RNA was detected in urine and whole blood out to 26 and 28 days, respectively, after the onset of symptoms. Live virus was isolated from a urine specimen from day 14.

しかし、否定的な報告もある。

Clin Infect Dis. 2013 Jul;57(1):157-8.

Japanese encephalitis virus RNA **not detected in urine.**

Zhao H, Wang YG, Deng YQ, Song KY, Li XF, Wang HJ, Zhu CM, Qin ED, Qin CF.

H30年度レファレンス活動報告

- これまでのジカウイルス輸入症例について情報提供
- フラビウイルス・アルファウイルスに対する実験室診断の実施
- フラビウイルス遺伝子検査用プライマープローブセットの情報更新
- ダニ媒介脳炎ウイルス遺伝子検査用陽性コントロールの配布

本年度もアルボウイルスサーベイランス
についてご協力をお願いします

12. ノロウイルス

衛生微生物技術協議会

第39回研究会

ノロウイルスレファレンスセンター報告

染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

someya@niid.go.jp

2018年7月6日



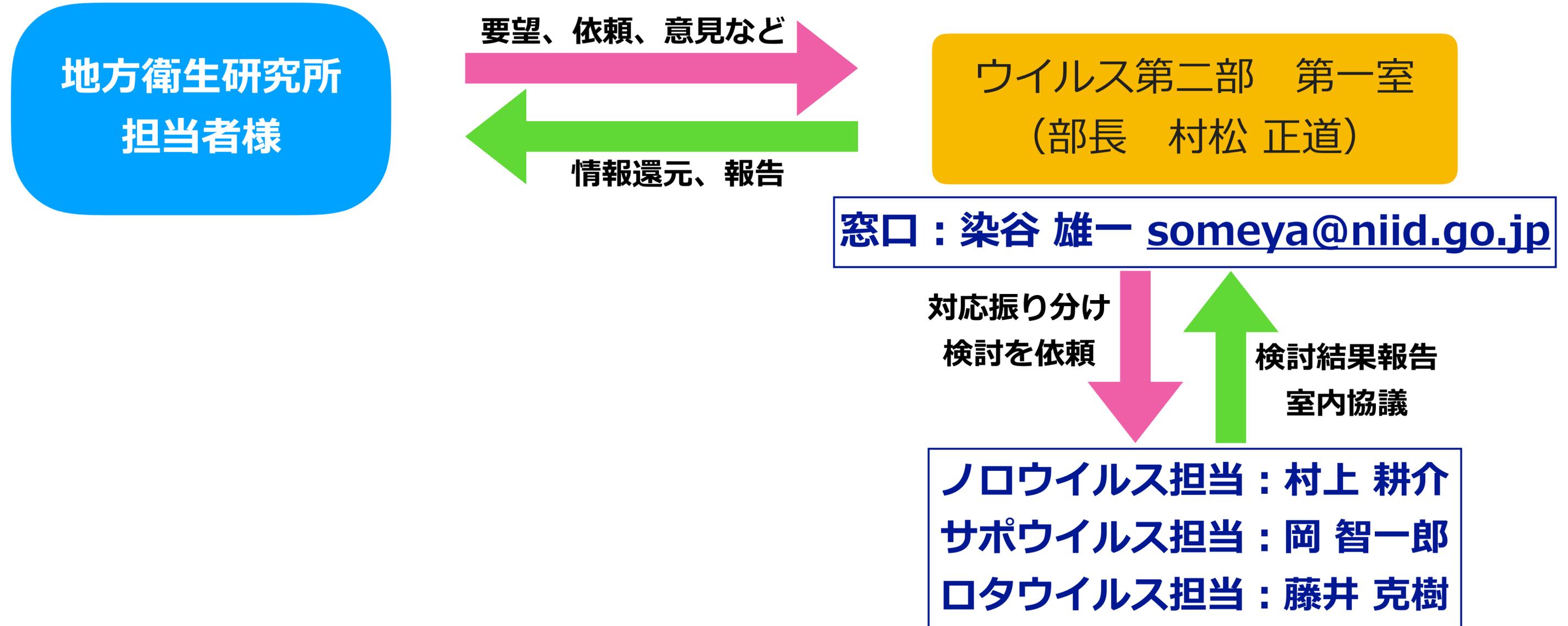
世話人交代のお知らせ

2018年4月付で、**ノロウイルスレファレンスセンター**が
国立感染症研究所 感染症疫学センター 第六室 より
同 **ウイルス第二部 第一室** に移りました。

これに伴い、本会議の世話人を
前任の 木村 博一 先生（現 群馬パース大学）に代わって
染谷 雄一 が担当いたします。

ノロウイルスレファレンスセンター

- ウイルス第二部第一室は、ノロウイルスレファレンスセンターとして、以下の体制を採ります。



ロタウイルスの疫学について

- 2012年のロタウイルスワクチン導入後、**流行株の遺伝子型に明らかな変化**が認められる。シーズン毎の**主要遺伝子型の変化**も顕著であった。
- また、11分節RNAが複数のウイルス株間で再集合を起こした株（**リアソータント**）の検出例も目立つ。
- ➡ サーベイランスの実施、強化の必要性
- ➡ 今後も引き続き地方衛生研究所の担当者の方には協力をお願いしたい

ロタウイルス検出法の改良について

1. マルチプレックスPCRによるタイピング

- 従来法のプライマーセット（1990年報告）では最近の流行株検出が困難
 - ➡ **新たなプライマーセットを開発し、現在最終調整中**
- 従来法で検出困難な場合、シーケンス解析で報告をお願いしたい

2. 自動電気泳動装置MultiNA（島津製作所）によるタイピング

- 抽出したRNAをキャピラリー電気泳動し、バンドパターンを解析する。タイピングソフト（β版）が札幌医科大学のサーバに構築されている。
- 現時点では、**Wa型（ロングパターン）かDS-1型（ショートパターン）かの区別、C群ウイルスの検出が可能**
- データが蓄積されれば全国的な流行状況を把握することが可能であるので、協力をお願いしたい

サポウウイルス検出法の改良について

- 従来法ではヒトに感染するサポウウイルス全18遺伝子型を検出することは困難であった。
- ➔ プライマーを再検討し、**18遺伝子型すべてを検出可能な改良版リアルタイムRT-PCR法**を構築した。

従来の標準物質（プラスミド）を使用することができる。

ノロウイルスの疫学について

- 近年、RNAポリメラーゼ領域とVP1タンパク質領域の境界部分で遺伝子組換えを起こした株（**リコンビナント**）の検出例増加が顕著である。
- RNAポリメラーゼ領域とVP1タンパク質領域の両方で遺伝子タイピングが必要であり、そのための検出法マニュアル作成が必須。
➡ いくつかの地方衛生研究所の担当者の方により**新たな検出法の検討が進行中**

レファレンスセンターからの提案

- 「ウイルス性下痢症診断マニュアル」（編集・発行：国立感染症研究所ウイルス第二部、衛生微生物技術協議会レファレンス委員会）

最新版は第2版。平成12年（2000年）7月10日発行。

すでに18年が経過し、実状と合わない点が多く見受けられる。

- 一方、ロタウイルスについては、「病原体検出マニュアル」（PDF版）（<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>）で、「感染性胃腸炎（ロタ）」（2014年12月版）として更新されている。

＊まず、地方衛生研究所担当者様のご協力のもと、ノロウイルスに関するマニュアルを更新し、PDF版として公開する方針

13. カンピロバクター

衛生微生物技術協議会・第39回研究会
リファレンスセンター会議

カンピロバクター

平成30年度リファレンス名簿

担当ブロック	所属		担当者
代表世話人	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	朝倉 宏
副世話人	国立感染症研究所	細菌第一部	山本章治
北海道・ 東北・新潟	秋田県健康環境センター	保健衛生部	今野貴之
関東甲信静	東京都健康安全研究センター	微生物部	赤瀬 悟
東海・北陸	愛知県衛生研究所	生物学部細菌研究室	山田和弘
近畿	大阪健康安全基盤研究所	微生物部	坂田淳子
中国地区 (除広島県)	山口県環境保健センター	生物・細菌グループ	尾羽根紀子
九州	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部	原田誠也

- 情報提供

- 平成29年カンピロバクター食中毒発生状況
- 内閣府食品安全委員会リスクプロファイルの改訂

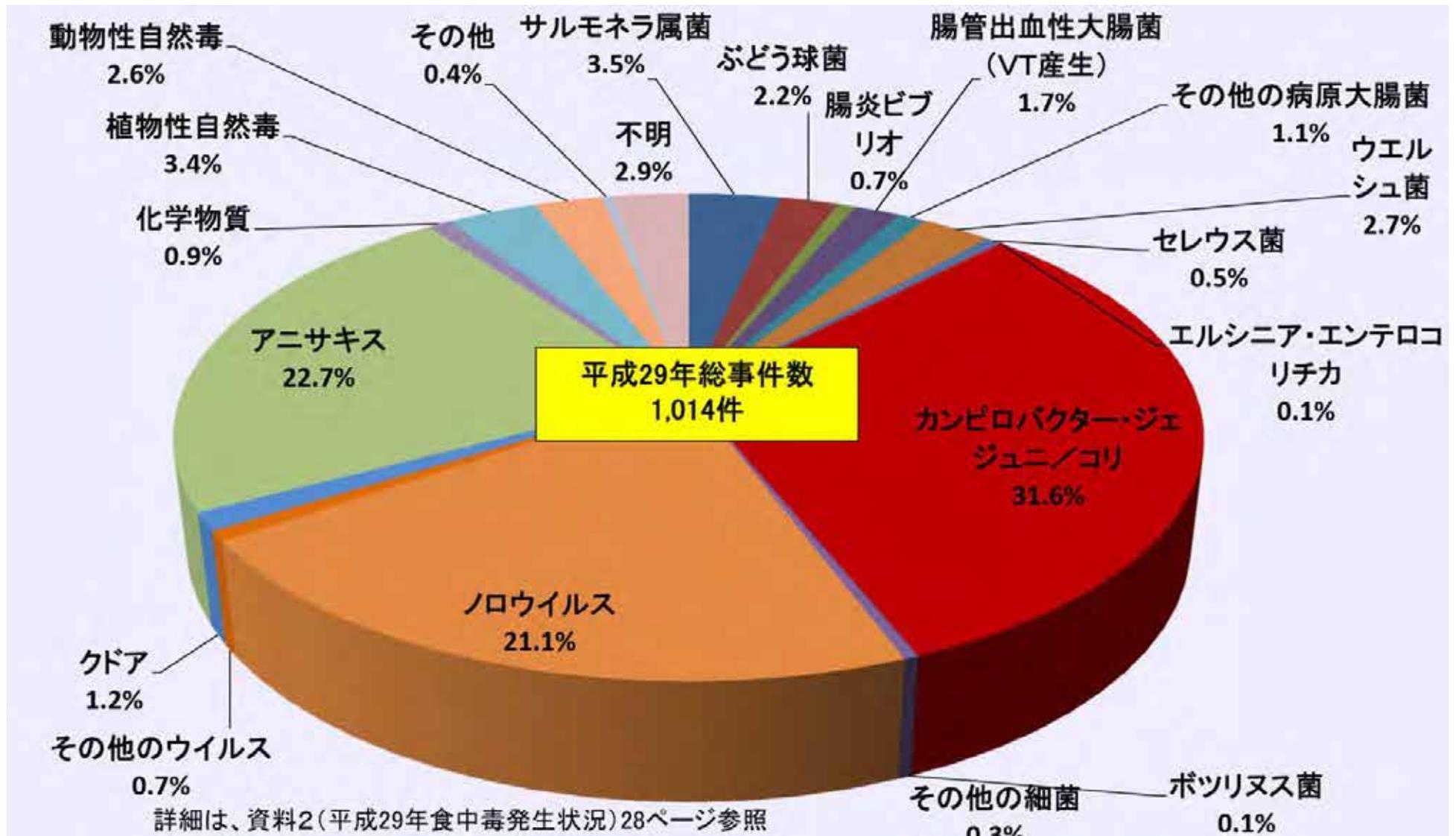
- 昨年度の活動報告

- 薬剤耐性・血清型別試験の結果（*C. jejuni*散発事例）
- 検査法に関するアンケート調査
- Penner遺伝子型別法
- 食中毒事例の紹介：東京都

- 本年度の活動予定

- 血清型別、薬剤耐性試験
- Penner遺伝子型別試験
- その他

平成29年食中毒発生状況（原因物質別事件数）



事件数：320件、患者数：2315名

カンピロバクター食中毒発生時の加熱用表示等に関する状況

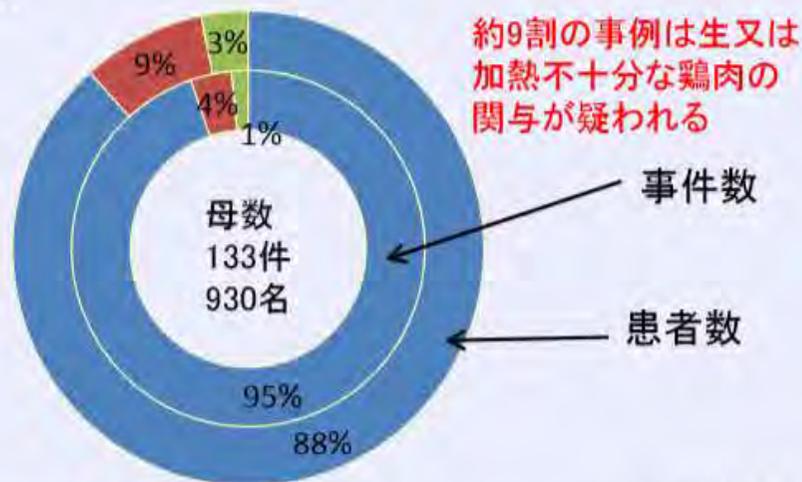
平成29年に発生したカンピロバクター食中毒事例にて、都道府県等の報告に基づき集計したところ、約半数の事例は仕入れ品に加熱用表示があるにもかかわらず、生又は加熱不十分な鶏肉を提供していた。

※3月31日付け通知発出後の平成29年4月1日以降発症、かつ原因施設が判明した事例について、詳細より以下の集計を行った

- ①生又は加熱が不十分な鶏肉・鶏内臓の提供状況
- ②生又は加熱不十分な鶏肉・鶏内臓のあった事例における加熱用表示の有無

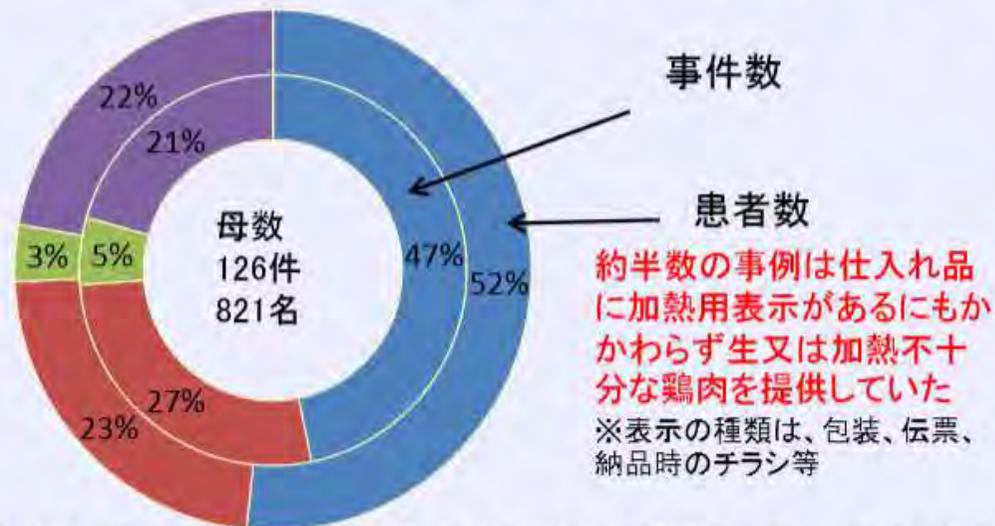
カンピロバクター食中毒事例における鶏肉の提供状況

- 生又は加熱が不十分な鶏肉・鶏内臓の提供あり
- 生又は加熱が不十分な鶏肉・鶏内臓の提供なし
- 不明



生又は加熱が不十分な鶏肉・鶏内臓の提供があった事例における加熱用表示の有無

- 加熱用表示あり
- 加熱用表示なし
- その他
- 不明



※提供有りとしたものは推定を含む
 ※母数は、4月1日以降発症、かつ原因施設が判明した事例において、平成30年2月23日までに詳細を受領した事例(事例数133件、患者数930名)について集計。

※飲食店や施設で食品を調理し提供している場合は、仕入れ品の表示の有無を集計。客が自分で焼く形式の場合は、客側への情報伝達が口頭のみではなくメニュー等に記載のあった場合を「表示あり」として集計。
 ※「その他」は一部の仕入れ品で表示あり/なし、一部の仕入れ品で「生食用」との表示有りとの事例
 ※母数は生又は加熱不十分な鶏肉・鶏内臓の提供有り(推定含む)とした事例(事例数126件、患者数821名)について集計

内閣府食品安全委員会
食品健康影響評価のためのリスクプロファイル
～鶏肉等における *Campylobacter jejuni/ coli*～
(平成30年5月改訂)

カンピロバクター食中毒が減っていない理由

- 加熱用として流通・販売されるべき鶏肉の生食又は加熱不十分な状態での喫食が行われている。
- ① 事業者及び消費者に加熱用鶏肉の生食又は加熱不十分な状態での喫食による食中毒のリスクが十分に伝わっていない。
- ② 食中毒の発生防止のための鶏肉における推定汚染菌数が把握できていない。
- ③ 非汚染鶏肉を区分製造するインセンティブがない。
- 効果的に鶏肉の菌数を下げることが困難である。

(1) モニタリング計画の策定及び実施

- ・ 迅速、簡便な検査方法の開発を進める。
- ・ 精度管理された検査法で統一的にモニタリングを実施する。
- ・ フードチェーンを通じ、継続的に定量的モニタリングを実施する。

⇒求められるリスク評価

- ① 食中毒が発生しないと推定される菌数を明らかにする。
- ② 菌数が多い汚染鶏肉の流通割合を減らす為の菌数目標値及びそのサンプリング計画を策定する為、定量的リスク評価を実施する。

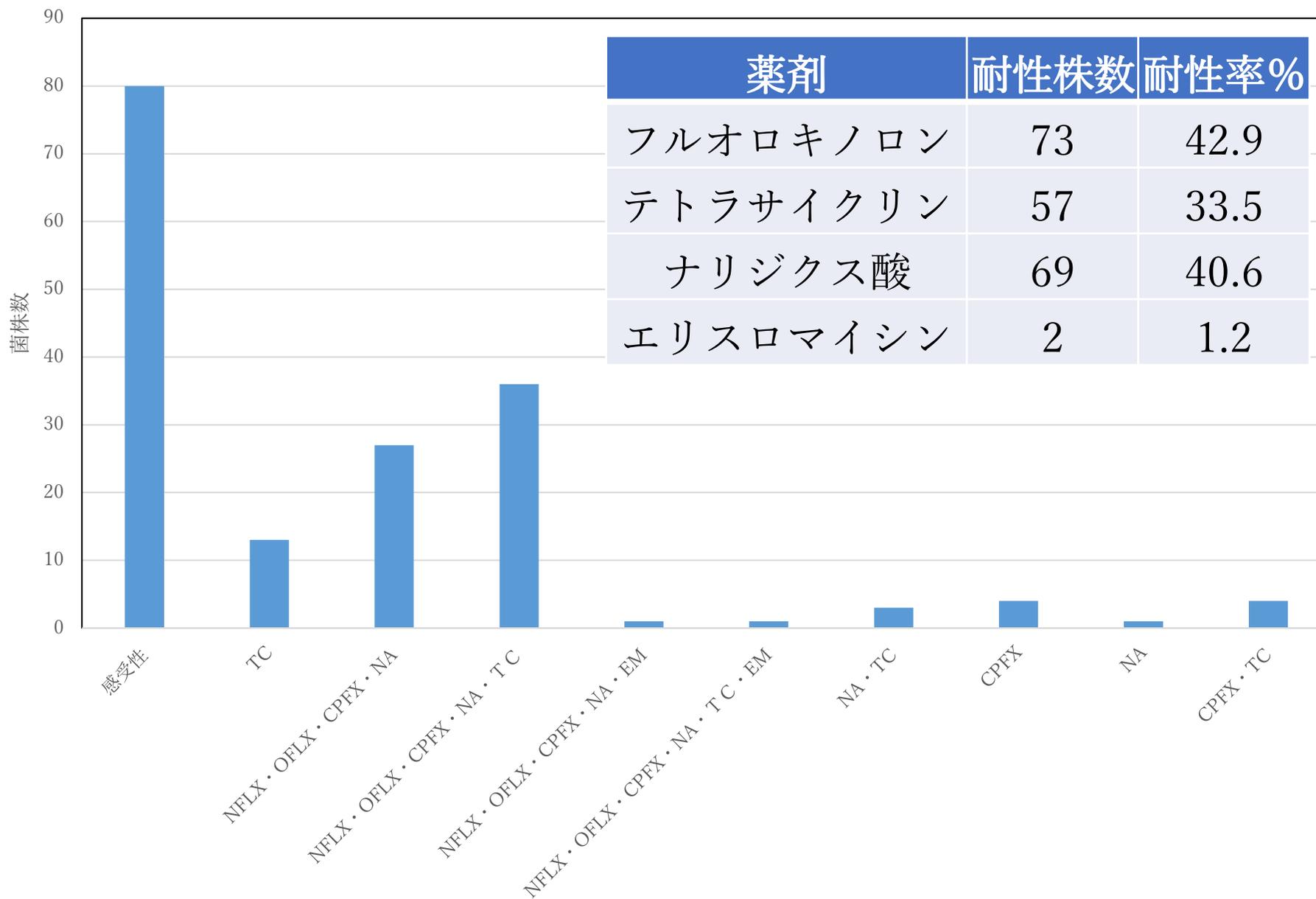
(2) 効果的なリスク管理措置の導入及び実施

- ・ 新たなリスク管理技術を開発する。
- ・ 食鳥処理場においてHACCPを導入・実施し、検証する。

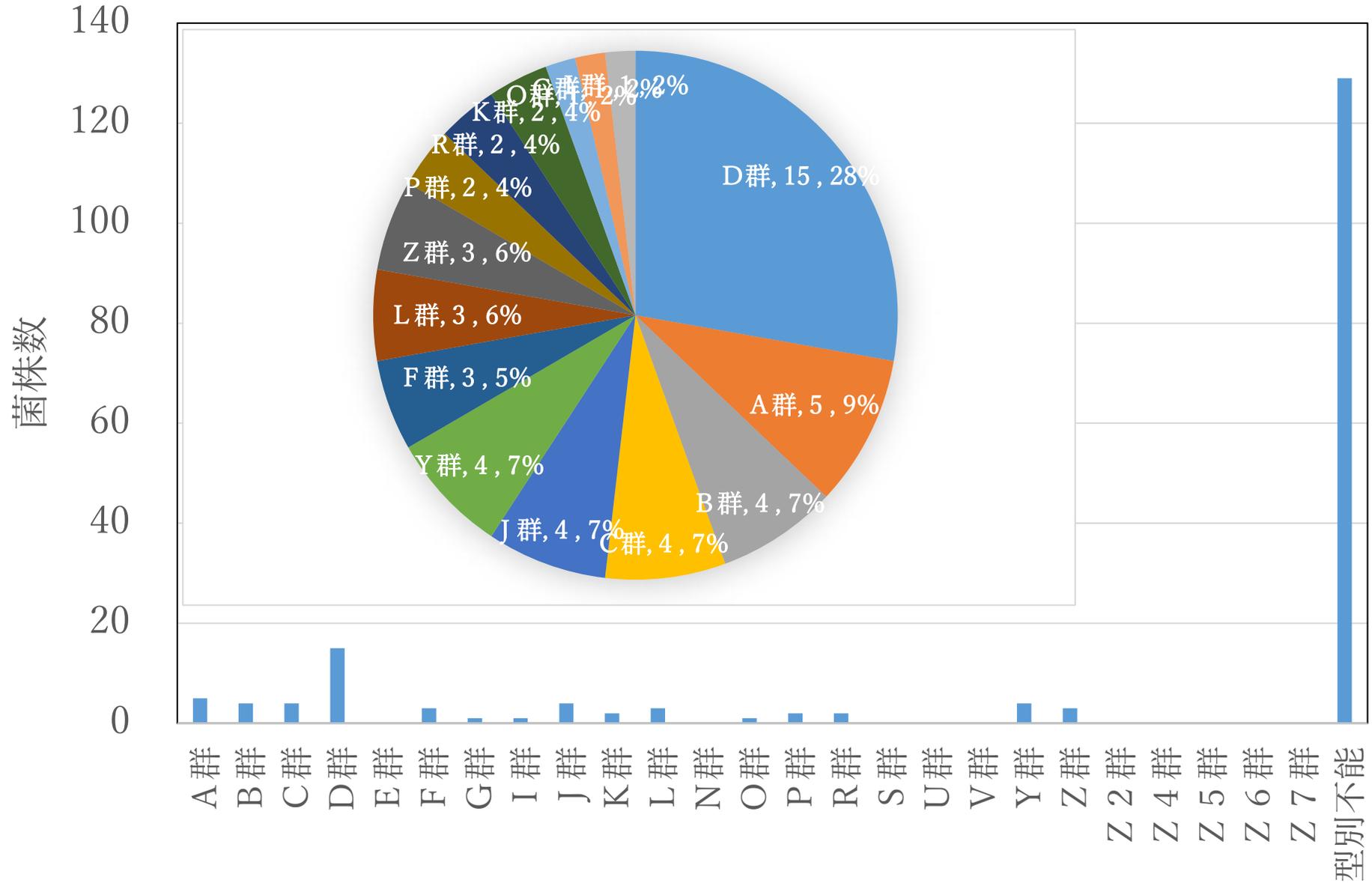
⇒求められるリスク評価

- ① 各段階で用いられるリスク低減策の効果の定量的な推定を行う。

● 薬剤耐性状況

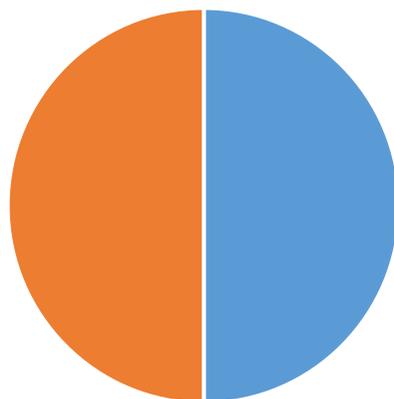


● Penner血清型別の状況



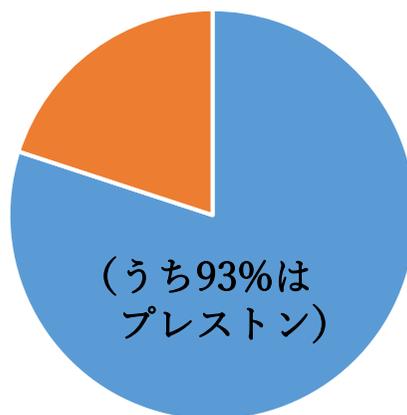
● 検査法に関するアンケート集計（臨床検体）

年間検体数



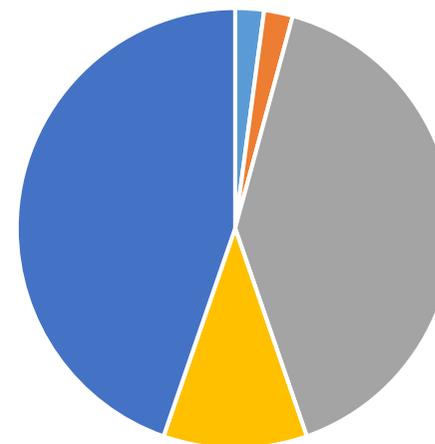
■ 100検体以上 ■ 0~99検体

増菌培養



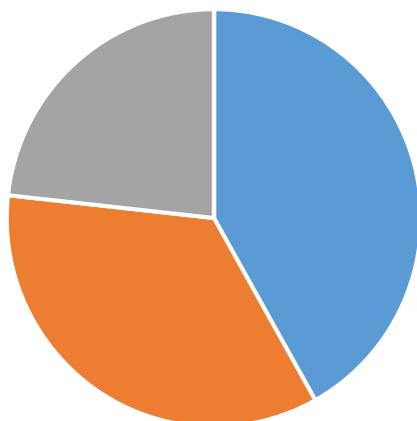
■ 有 ■ 無

増菌培養時間



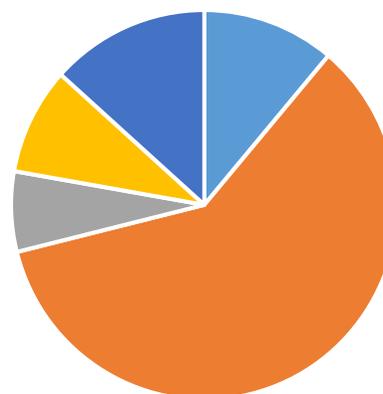
■ 18 h ■ 18~24 h ■ 24 h ■ 24~48 h ■ 48 h

菌株保存に用いる資材



■ スキムミルク ■ グリセロール ■ マイクロバンク

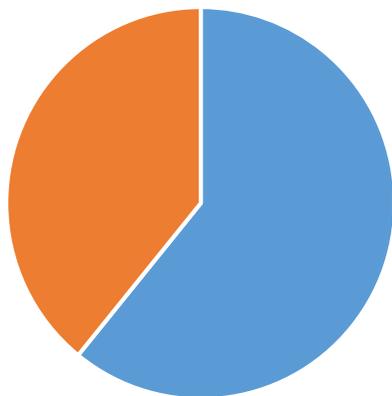
選択分離培養



■ Campylobacter Selective Agar
 ■ mCCDA
 ■ CCDA (SEL)
 ■ バッター
 ■ スキロー

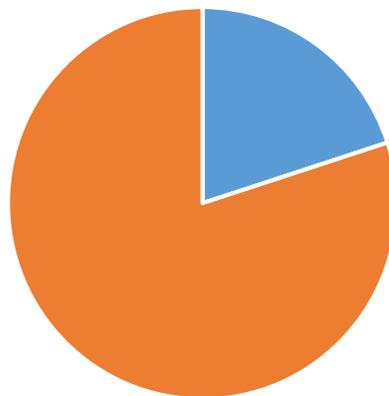
● 検査法に関するアンケート集計（食品検体）

年間検体数



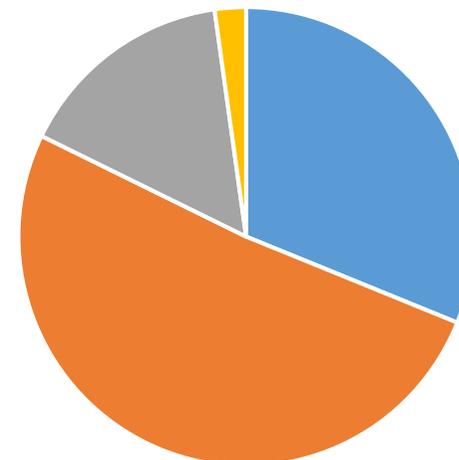
■ 0~100検体 ■ 100検体以上

検体の状態



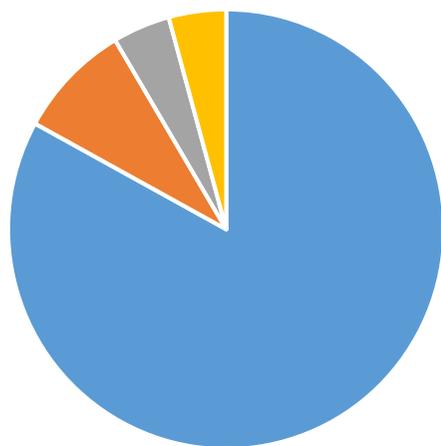
■ 冷蔵 ■ 冷凍

検体重量



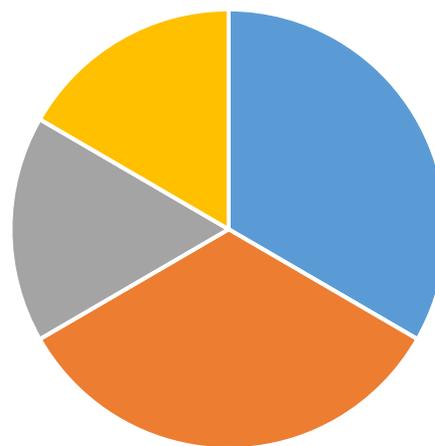
■ 10g ■ 25g ■ 搬入量による ■ その他(25g以上)

増菌培養



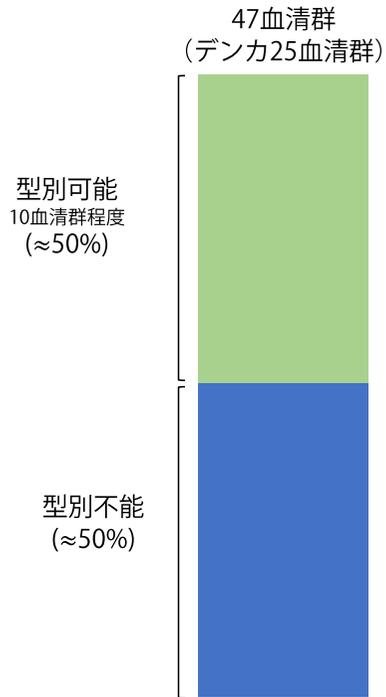
■ プレストン ■ ボルトン ■ その他 ■ 実施していない

迅速簡便法の利用



■ リアルタイムPCR ■ PCR ■ イムノクロマト ■ miniVidas

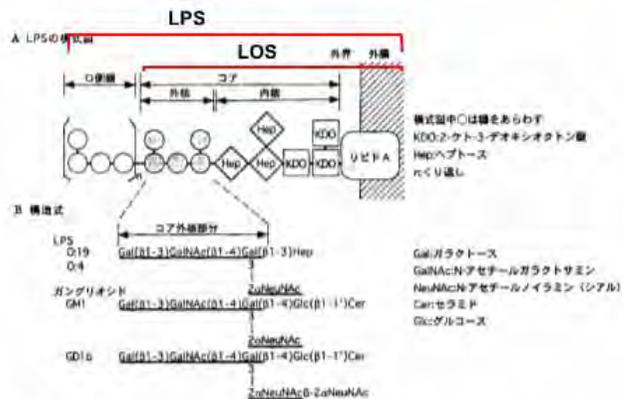
Penner血清型別法の問題点と改善案



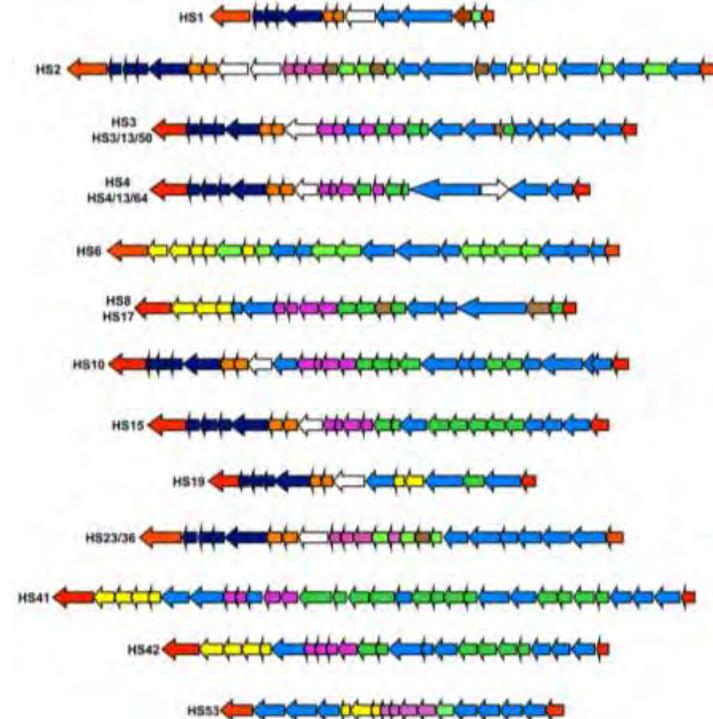
型別率の向上
 ・型別法の見直し
 ・血清力価の安定化
 ・遺伝子型別法の導入

より正確な実態の把握

カンピロバクターの表層多糖=Penner型別法の主要抗原

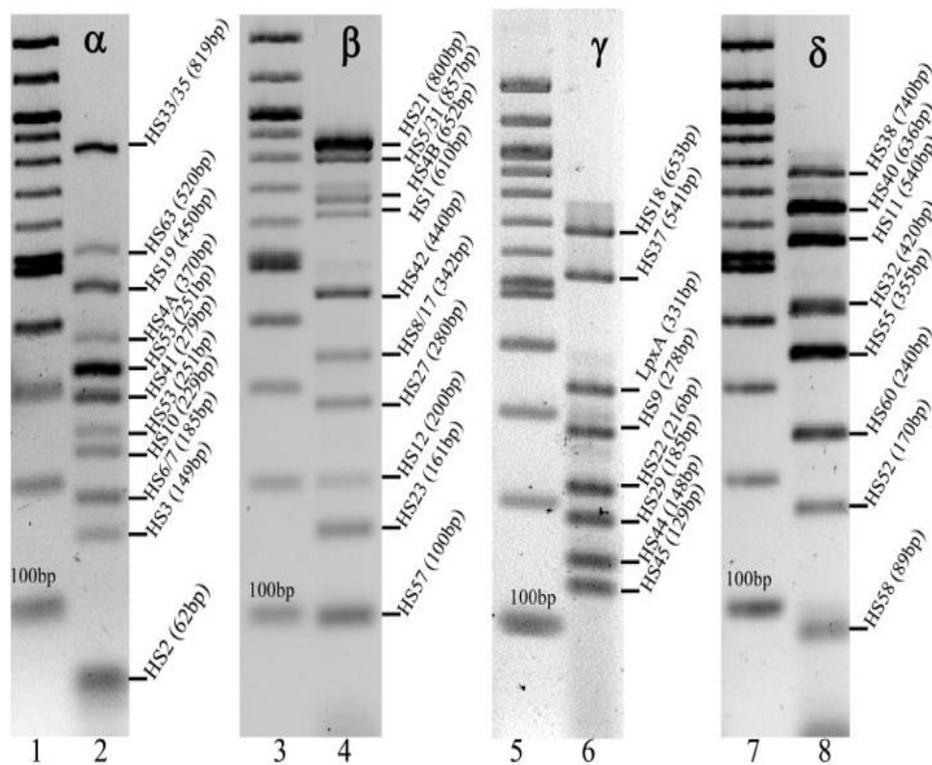


藤本秀士, 九州大学医療技術短期大学紀要(2000)



■ Capsule transport and assembly
■ Sugar transferases
■ Genes with no obvious link to sugar biosynthesis
■ MeOPN biosynthesis
■ Hypothetical genes
■ Putative methyl transferase
■ Sugar biosynthesis
■ Putative MeOPN transferase
■ Heptose biosynthesis

マルチプレックスPCRによる型別法：各血清群のO側鎖合成遺伝子クラスター内で特異的な遺伝子を検出



Poly et al, PLoS ONE(2015)

1. 長所

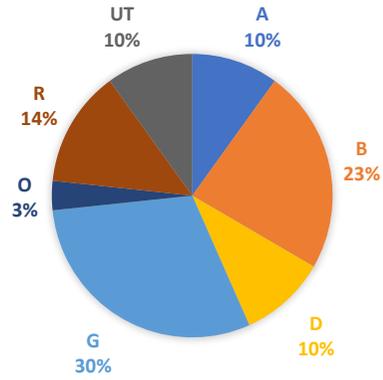
- 44血清群を型別可能である。
- 血清型別法に比べて簡便・安価である。
- 型別率が高い (>90%)。

2. 短所

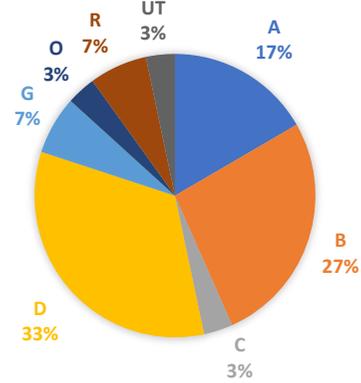
- 判定しづらいバンドがいくつかある。
- いくつか交差反応が見られる。
- 検出対象の遺伝子が血清型を決定しているかどうかは不明なため、誤判定の可能性はある。

2017年度 Penner血清型別不能株のPCR型別結果

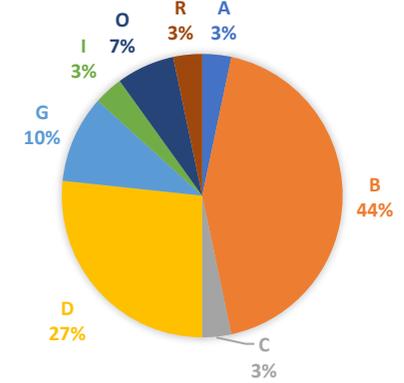
愛知県 n=30 (型別率：90%)



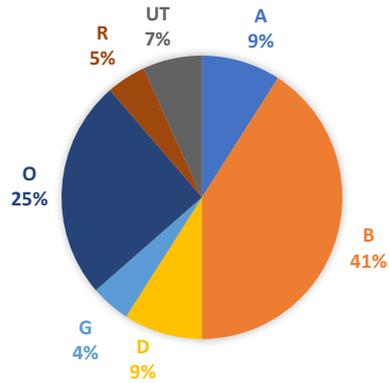
秋田県 n=30 (型別率：97%)



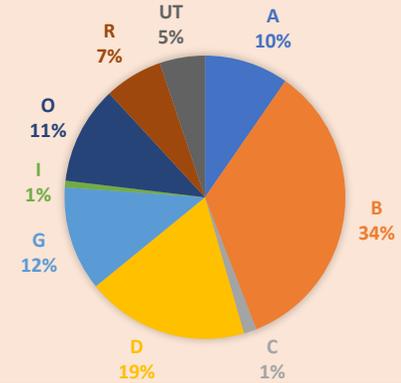
東京都 n=30 (型別率：100%)



山口県 n=30 (型別率：90%)



全体 n=120 (型別率：94.1%)



まとめ

1. 方法

- ・秋田式簡便法を用い、4衛研でPenner血清型別が不能な30株について実施した。
- ・本年度はデンカ生研カンピロバクター免疫血清に含まれる25群のうち、15群（14 complex: E/U, O, I, C, B, A, G, R, Y, R, F, A, J, D）を検出対象にした。

2. 結果

- ・90～100%と非常に高い型別能を示した。検出対象を広げると型別率が100%に向上した例もあった。
- ・血清型別不能株のうち、全体的に最も多かったのがB群、次いでD群であった。これは血清型別可能な株の場合と同じ傾向であった。

3. 今後

- ・陽性コントロールを完備し、検出対象を拡大させる。
- ・血清型別が可能な株に対しても解析し、正確性を検証する。

4. その他意見, 感想

- ・DNA精製の手間を省くため、コロニーからアルカリ熱粗抽出したDNAを用いてPCRを行うと、非特異的バンドが多く見られた。
- ・一部のプライマーセットで増幅にムラがあり、バンドが薄くなる傾向があった。
- ・マルチプレックスPCRでは非特異的バンドが検出されたが、シングルPCRで確認すると検出されないケースがあった。



平成30年7月5日
衛生微生物技術協議会第39回研究会
カンピロバクターレファレンスセンター会議

【食中毒事例紹介】 同一営業者が複数の店舗で 発生させたカンピロバクター食中毒

東京都健康安全研究センター

赤瀬 悟

事例概要

喫食日：平成29年5月26日～6月19日

発症日：平成29年5月27日～6月23日

症状：下痢、発熱、腹痛、頭痛、倦怠感等

原因施設：A, B, C, D, Eの5店舗（すべて同じ営業者）

喫食者数：159名（A～E店の総数）

患者数：60名（同上）

原因食品：鶏刺し、鶏わさ、鶏ユッケ（推定）

病因物質：カンピロバクター・ジェジュニ



検査結果(患者、調理従事者)

由来	検査 件数	<i>C. jejuni</i> 陽性数*	血清型(Penner法)			
			P群	C群	Z群	UT**
患者(A店)	6	5	4			1
患者(B店)	13	5	4		1	
患者(C店)	11	3	3			
患者(D店)	7	3				3
患者(E店)	3	3		1		2
調理従事者 (A~E店)	21	1 (B店)	1			
計	61	20	12	1	1	6

**C. coli* は未検出

**UT: 型別不能

検査結果(参考食品等)

検体	検査 件数	<i>Cj / Cc</i> 陽性数	<i>Salmonella</i> *			<i>S. aureus</i>
			O4群	O7群	O8群	
鶏肉(A店)	1	0				1
鶏肉(B店)	4	0	1	1		
鶏肉(C店)	1	0	1			
鶏肉(D店)	3	0				
鶏肉(E店)	2	0			1	1
ふきとり(A~E店)	31	0				
計	42	0	2	1	1	2

* O4群 (*S. Agona*), O7群 (*S. Infantis*), O8群 (*S. Blockley*)

発生要因

- ◎鶏肉販売業者が、飲食店営業者に対して
「加熱用鶏肉」の旨を伝達せず
- ◎飲食店が、加熱用の鶏肉を刺身
または加熱不十分な状態で提供
- ◎飲食店営業者らは、鶏肉による
カンピロバクターのリスク認識が不足
- ◎複数の店舗で同じ仕入れ先の鶏肉を提供

今後の課題(飲食店対策)

◎飲食店対策

⇒加熱用鶏肉を生食・加熱不十分で
提供させない！

厚労省通知①

平成29年3月31日付け生食監発0331第193号

「カンピロバクター食中毒対策の推進について」

⇒食鳥処理業者等から飲食店営業者に対し、鶏肉は「加熱用」である旨を
確実に伝達すること。

厚労省通知②

平成30年3月29日付け薬生食監発0329第5号

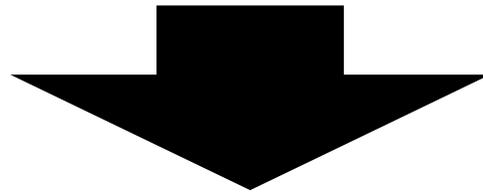
「カンピロバクター食中毒事案に対する告発について」

⇒悪質性、広域性の高い食中毒事案は告発等、厳正な措置を講じること。

しかし・・・

今後の課題（飲食店対策）

- ★一部の消費者の間で、生食・加熱不十分な食肉メニューの人気は根強く、店へのリクエストも少なくない・・・
- ★店側も鶏肉の加熱不十分のリスクは承知しているが、近隣他店が提供を続けており、やむなく加熱用鶏肉を使用している場合も・・・



カンピロバクター等の病原細菌汚染を低減させた「**生食用鶏肉**」の生産・流通が実現可能となれば、上記の課題はクリアできる！？

今後の課題(消費者対策)

◎消費者対策

⇒加熱不十分な鶏肉のリスクを周知徹底！

東京都民の意識調査 (1,000名、H23年実施)
「消費者の食肉の生食及び半生食に関する意識調査」

食肉の生食の有無について (n=1,000)



■ よく食べる

■ 以前は食べていたがやめた

■ その他

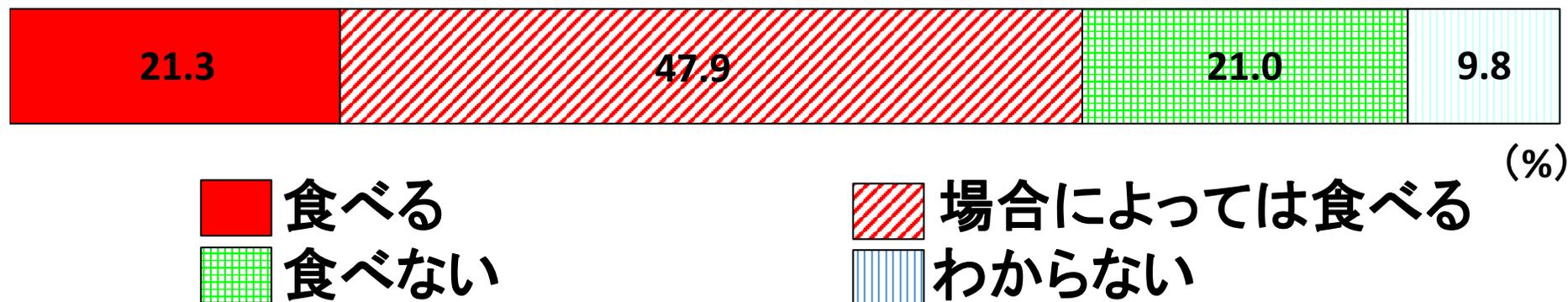
■ たまに食べる

■ 生で食べたことはない

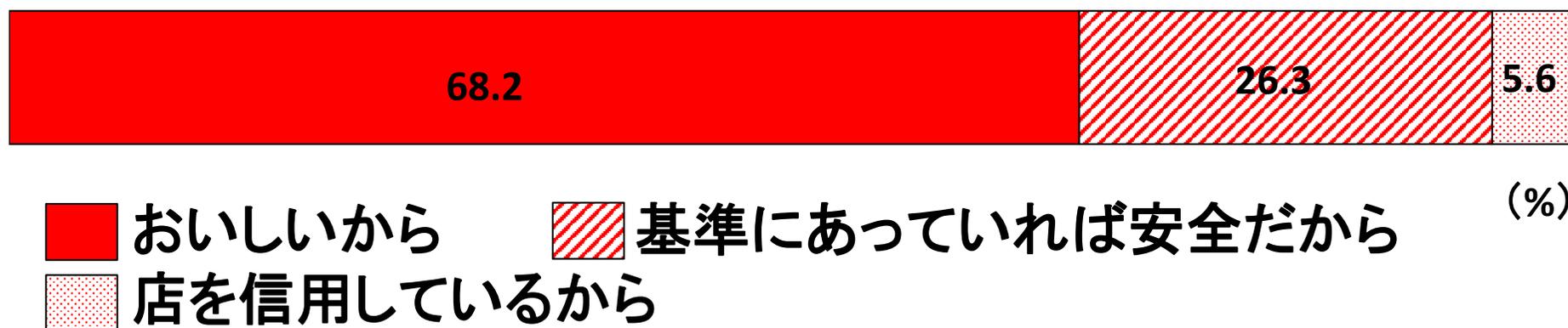
(%)

今後の課題(消費者対策)

食肉を生で食べると食中毒になる可能性があることが分かった上で、今後の食肉の生食行動をどうするか？ (n=286)



食肉の生食リスクを知った上で食べる理由 (n=198)



⇒食肉の生食を嗜好する消費者への普及啓発方法は？

牛肉、豚肉の生食に関する規制(国)

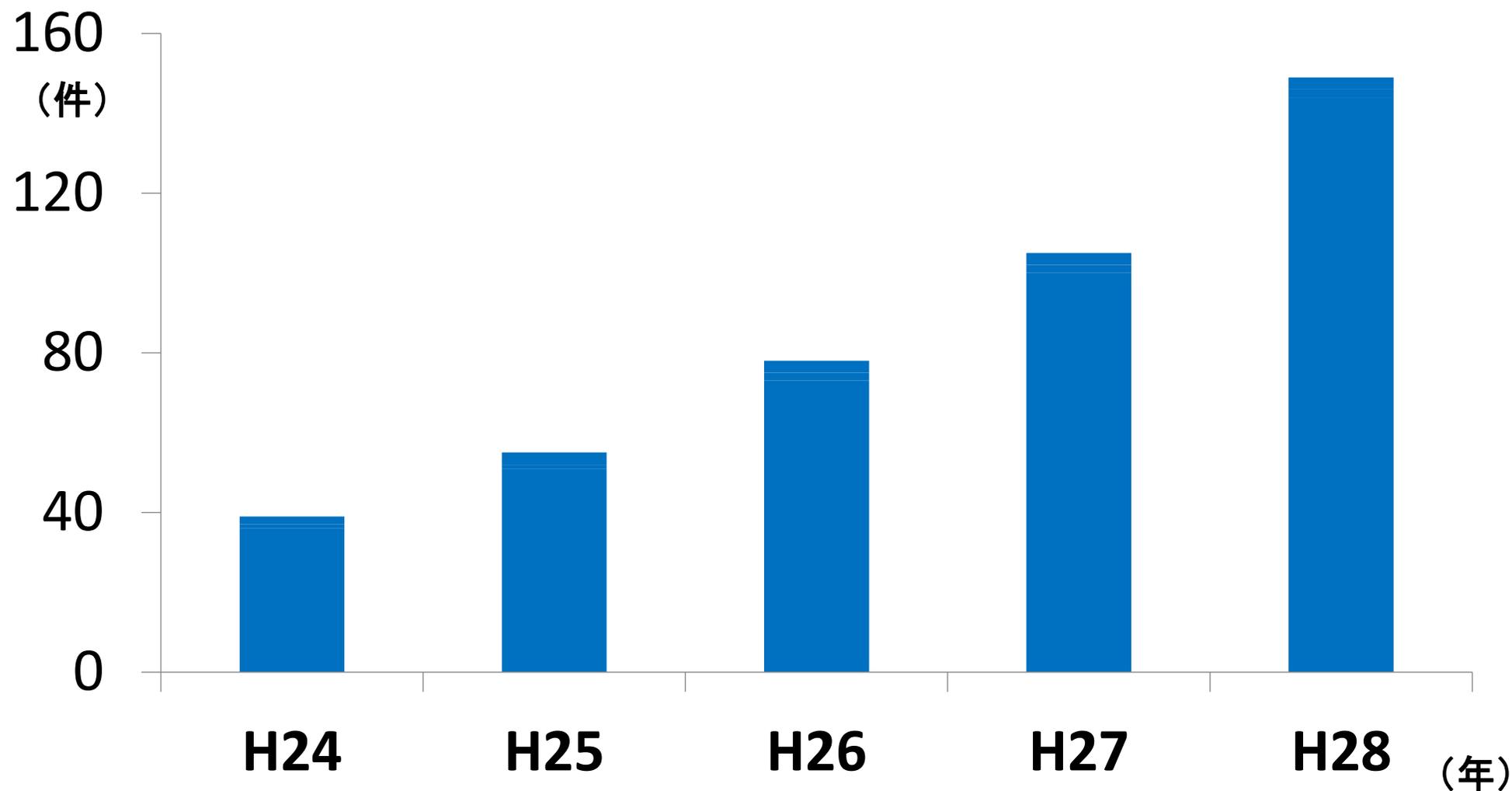
- ★H23年 生食用食肉(牛肉)の規格基準の設定
- ★H24年 牛レバーの生食提供の禁止
- ★H27年 豚肉(内臓含む)の生食提供の禁止

「牛レバ刺し」の喫食を含むカンピロバクター食中毒発生件数(都内)

年	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29
件	8	8	9	0	0	0	0	0

H25年以降、牛レバ刺しを原因とする
カンピロバクター食中毒は発生しなくなったが...

生食用食肉(牛肉)の取扱施設数(都内)



牛肉ユツケ、タタキ等を提供する店舗が都内で増えると、鶏肉の生食提供は減少する？それとも減少しない？

都内カンピロバクター食中毒・疑い事例の鶏肉銘柄

(H30年1～4月分)

番号	発生月	患者数	病因物質	鶏肉銘柄
1	1月	26	<i>C. jejuni</i> / coli	A鶏、B鶏
2	2月	2	<i>C. jejuni</i>	C鶏
3	2月	3	<i>C. jejuni</i>	D鶏
4	2月	3	<i>C. jejuni</i>	A鶏
5	2月	6	<i>C. jejuni</i>	E鶏
6	2月	4	<i>C. jejuni</i>	A鶏等
7	2月	2	<i>C. jejuni</i>	A鶏等
8	2月	3	<i>C. jejuni</i>	A鶏
9	3月	5	<i>C. jejuni</i>	F鶏
10	3月	3	<i>C. jejuni</i>	不明
11	4月	5	<i>C. jejuni</i>	不明
12	4月	3	<i>C. jejuni</i>	C鶏、G鶏
13	4月	12	<i>C. jejuni</i> / coli	G鶏
14	4月	2	<i>C. jejuni</i>	A鶏等
15	4月	3	<i>C. jejuni</i>	D鶏
16	4月	7	<i>C. jejuni</i>	A鶏
17	4月	7	<i>C. jejuni</i>	A鶏
18	4月	5	<i>C. jejuni</i> / coli	A鶏
19	4月	2	<i>C. jejuni</i>	A鶏
20	4月	3	患者は陰性	不明
21	4月	1	調査協力拒否	A鶏

21事例中11事例
(52%)でA鶏が提供
されている

保健所の調査では
A鶏は「加熱用」
表示あり

本年度の計画案

- 散発事例由来株を対象とした主要薬剤感受性試験並びにPenner血清型別のプロファイリング
～統一的な薬剤感受性試験の在り方を協議
- Penner血清型別が判別可能となる株を主体にマルチプレックスPCR型別法を検討
- *C. coli*を対象とするMLST解析
- その他

14. アデノウイルス

第39回衛生微生物協議会研究会
2018年7月5日(木曜日)
ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター

アデノウイルスの型と 疾患・流行

国立感染症研究所 感染症疫学センター

藤本 嗣人(ふじもと つぐと)

Tsuguto FUJIMOTO, Ph.D.



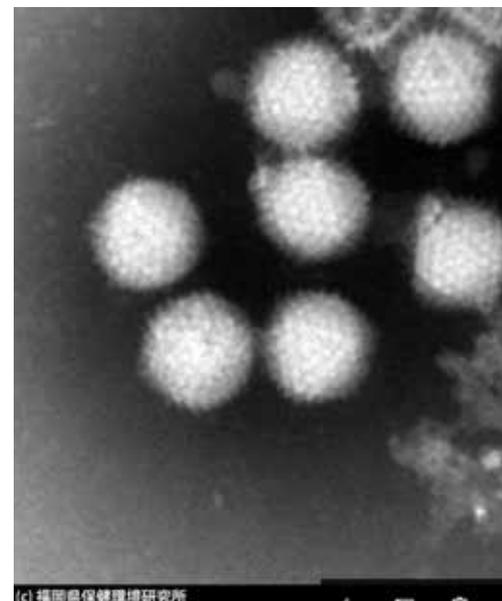
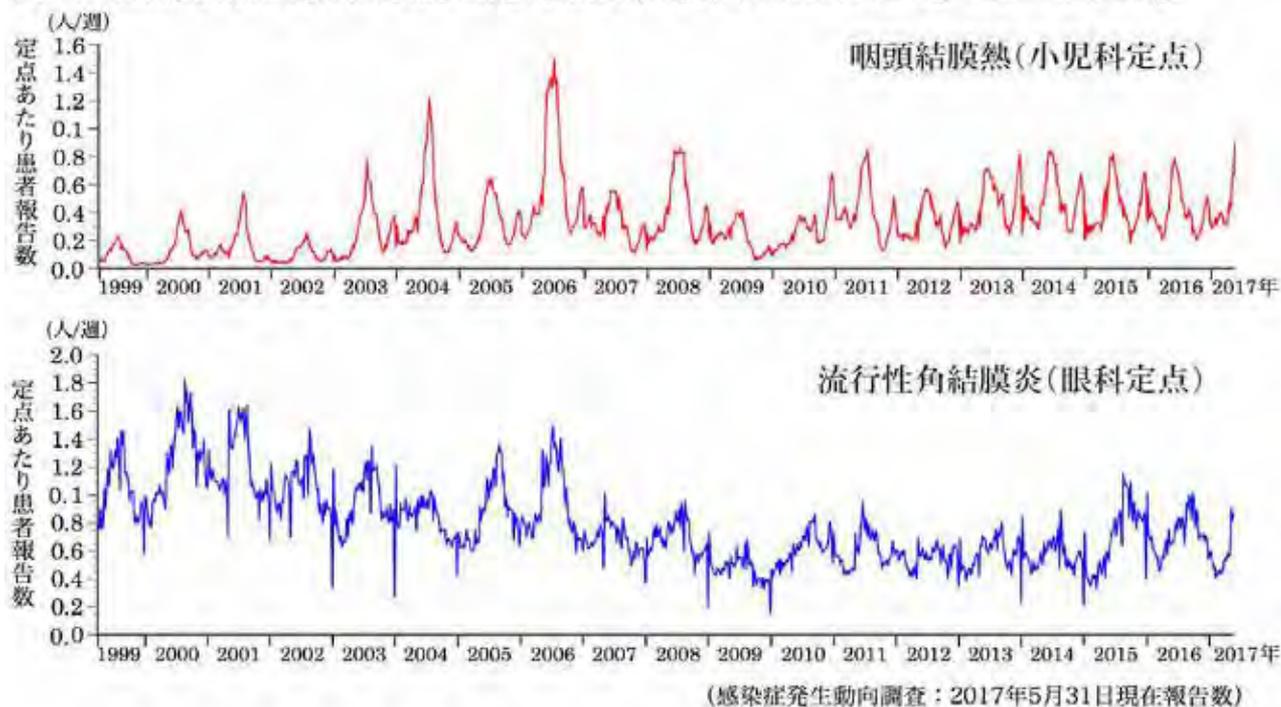
304会議室 11:10~12:10

アデノウイルス

- **流行性角結膜炎**（はやり目）、**咽頭結膜熱**（プール熱）の起因ウイルス
- 上気道感染では飛沫感染でヒト→ヒト感染
- **しばしばプールの水を介して感染するのでプール熱とも呼ばれる。**
- 一般的な疾患は発熱、咽頭痛、咳嗽などを主訴とした**急性咽頭炎**。
- 急性咽頭炎からさらに結膜炎を起こしたのが、**咽頭結膜炎**である。
- **流行性角結膜炎**は眼瞼浮腫や眼の痛みなどの症状が強く、ときに集団感染。家族内や集団生活においては、タオルや眼薬などの共同使用をしないこと。
- 迅速診断キットによる抗原の検出可能。しかし治療薬なし。
- アデノウイルス科に属する二本鎖DNAウイルスで、エンベロープを持たない。
- 感染経路は主に飛沫感染と**接触感染**。**塩素系消毒剤**が有効
- 潜伏期は7～10日

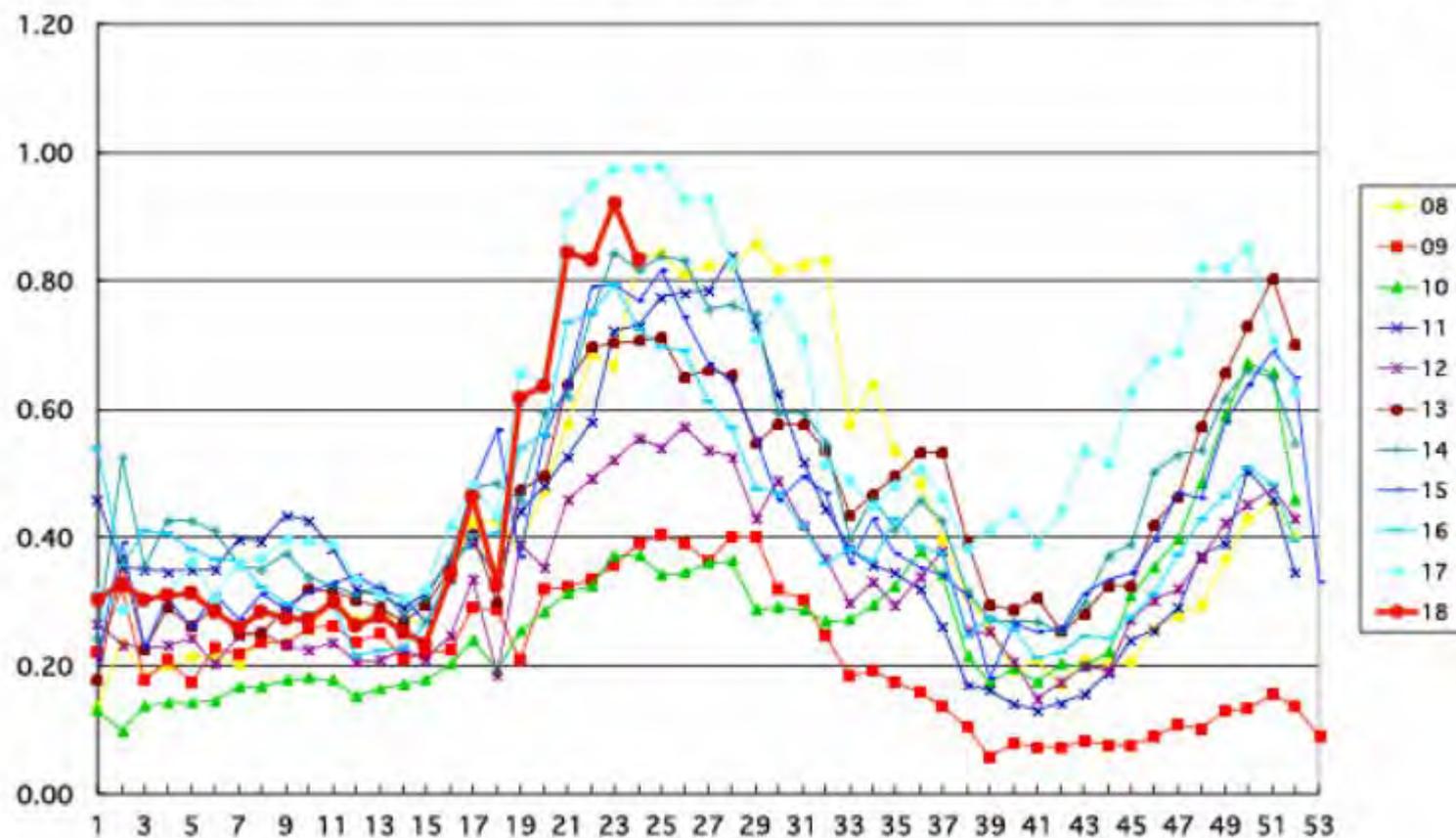
咽頭結膜熱と流行性角結膜炎

図1. 咽頭結膜熱と流行性角結膜炎患者報告数の推移, 1999年第14週~2017年第21週



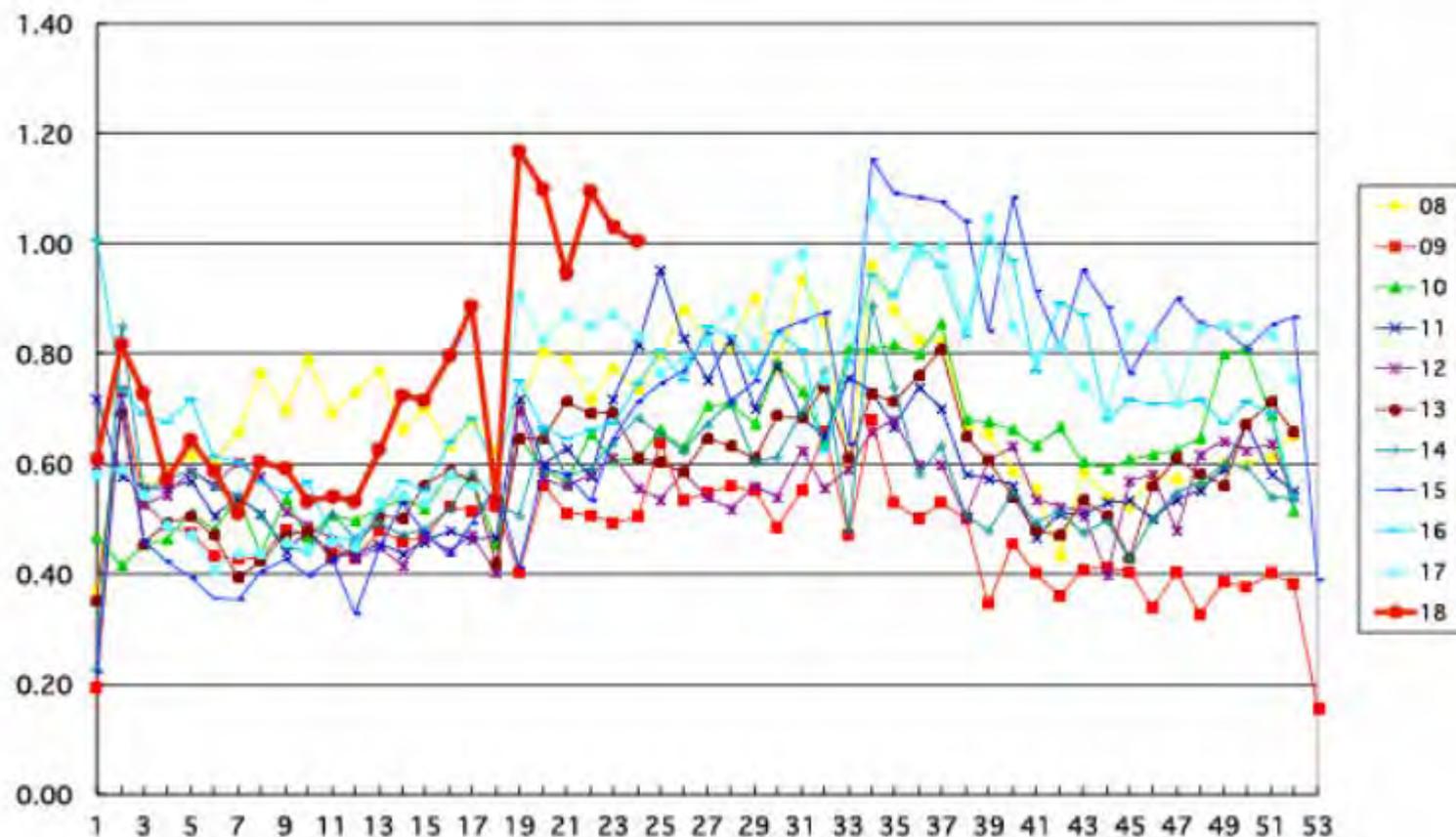
咽頭結膜熱 昨年に続いて報告 多め

Pharyngoconjunctival fever cases reported per sentinel weekly [定点当たり報告数]



流行性角結膜炎 今年は特に報告多い

Epidemic keratoconjunctivitis (EKC) cases reported per sentinel weekly [定点当たり報告数]



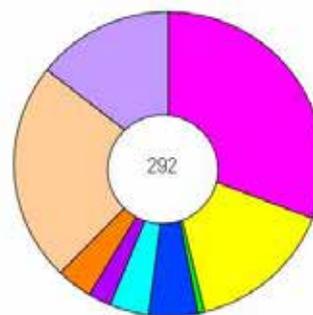
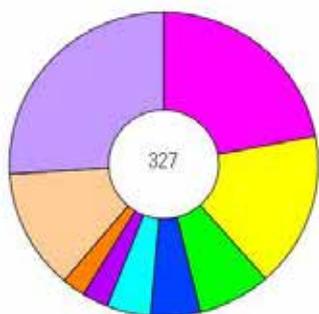
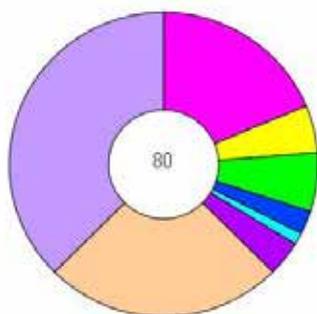
流行性角結膜炎

2018年は Other adeno が多い

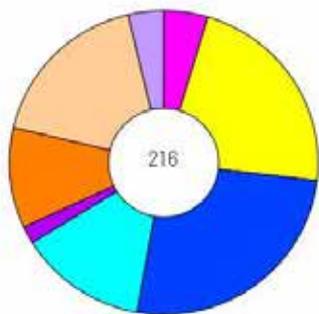
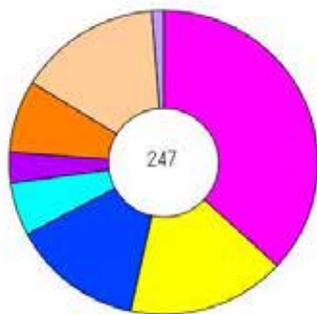
*各都道府県市の地方衛生研究所等からの分離/検出報告を図に示した

IASR

Infectious Agents Surveillance Report



HAdV-D85
の影響？



- Adenovirus 54
- Adenovirus 3
- Adenovirus 64 (19a)
- Adenovirus 37
- Adenovirus 56
- Adenovirus 53
- Adenovirus 4
- Other adeno
- Coxsackievirus A24
- その他

地区レファレンスセンター：このうち
今回は赤で示した2ヶ所の地方衛生研究所にも
ご発表いただきます

青森県環境保健センター、
新潟県保健環境科学研究所、
東京都健康安全研究センター、
川崎市健康安全研究所、
福井県衛生環境研究センター、
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所、
広島市衛生研究所、
宮崎県衛生環境研究所

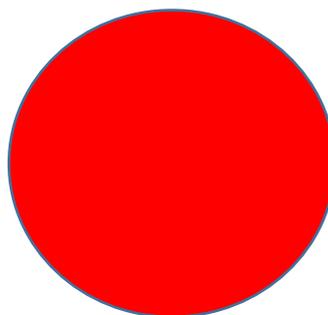
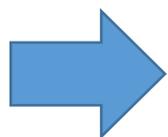
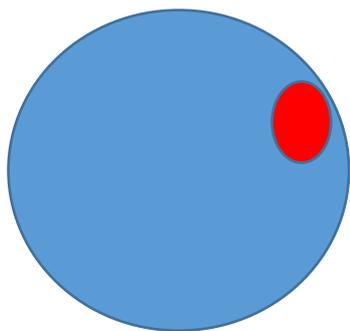
2007～2018年

- アデノウイルスの型別に関して大きな変化がみられた10年であった。
- どんな変化があったのか、ここでまとめると：
 - 1) 型の概念が変化した。新たにG種が加わった。
 - 2) サルアデノウイルスがE種やG種に影響
 - 3) 新型アデノウイルスによる流行性角結膜炎流行
 - 4) 組換えのメカニズムが明らかになってきた

発表の目的

アデノウイルスの型別は**血清型**から、全塩基配列の決定による**遺伝型**へと2007年から変化した。

状況が分かりにくくなっているので、**型別について状況を整理して理解することを目的**とした。



約2700塩基対 以下
部分

から

約35000塩基対
全体 へ



背景：次世代シーケンサー出現 & バイオインフォマティクス発展

アデノウイルスの種と型

ヒトアデノウイルス(HAdV)はA～Gの7の種に分類される。
さらに、HAdVは85を超える型に分類される。

種：血清学、赤血球凝集、齧歯類の発がん性、細胞の変形およびゲノム塩基配列決定による。 **AからG**

型：2007年から従来の血清型から**型**とされた。

1～51型：**血清型** 52～86型：**遺伝型**

アデノウイルス型の中和

- 2007年まではウイルス分離と中和反応が検査の中心



(利点) 獲得免疫と関連付けやすい。

(欠点) 多数の血清型の抗体確保が困難。組換え無視。

日本で市販されている中和抗体は、
1～7型、11、19、31および37型の **11種類のみ**。

血清型から遺伝型

2007年～

Serotype → **Genotype**

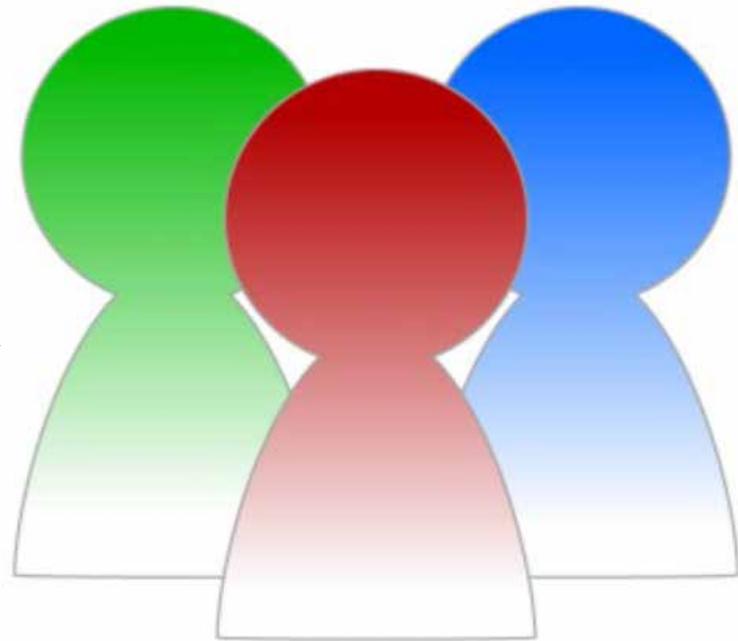
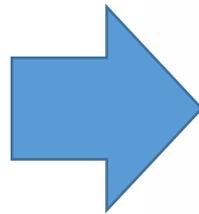


52型： **G種** 下痢症の病原体 **新種**（2007年）
血清型から遺伝型への流れの端緒となった

ヒトアデノウイルス52型



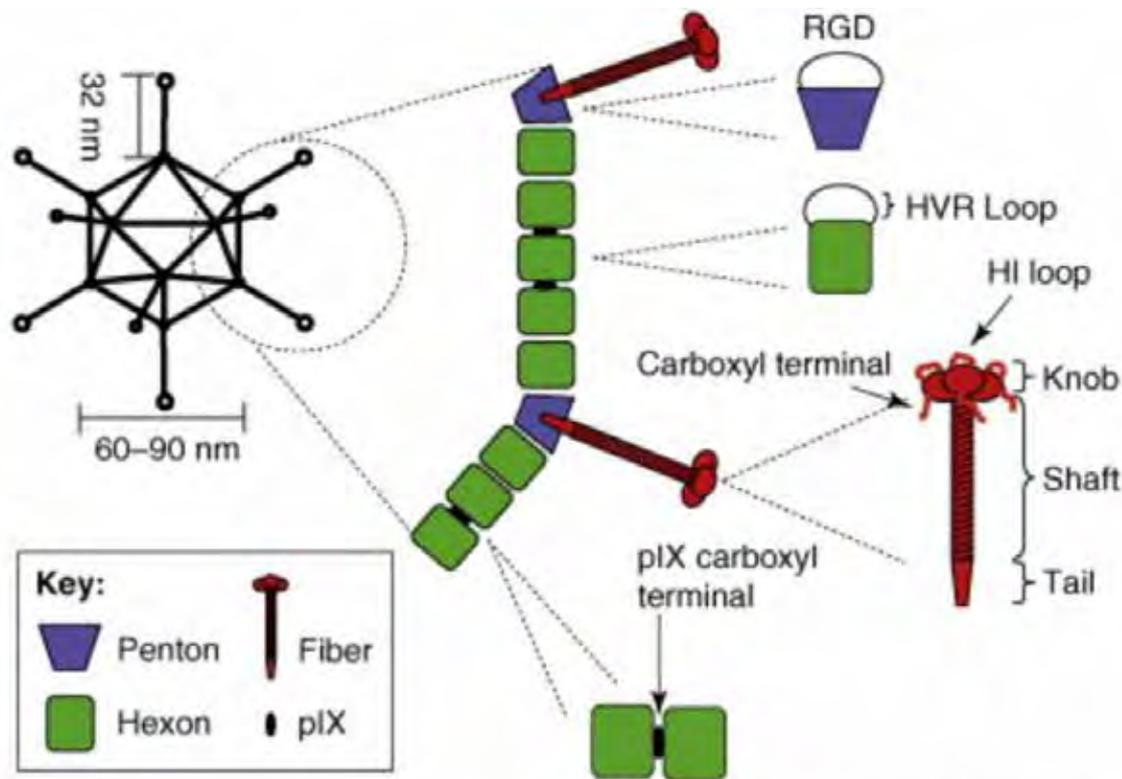
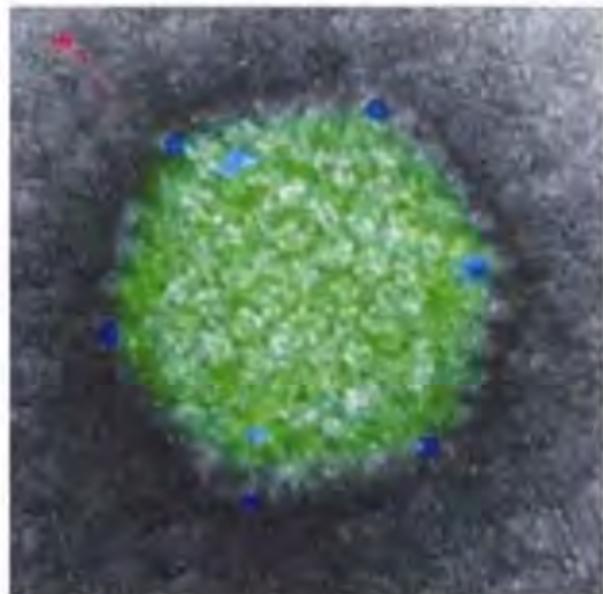
サル



ヒト

下痢症

アデノウイルスの構造



TRENDS in Biotechnology

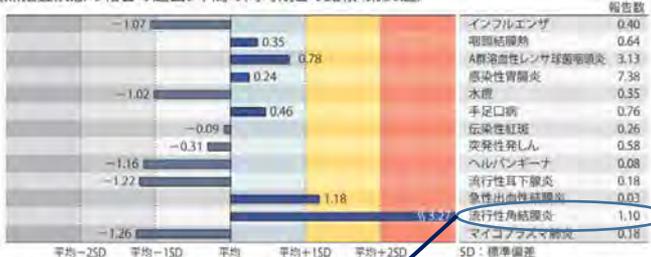
ペントンのRGDループや、ファイバーノブのHIループなどもアデノウイルス表現型の重要な要素である。

新型54型の流行

◆定点把握の対象となる5類感染症

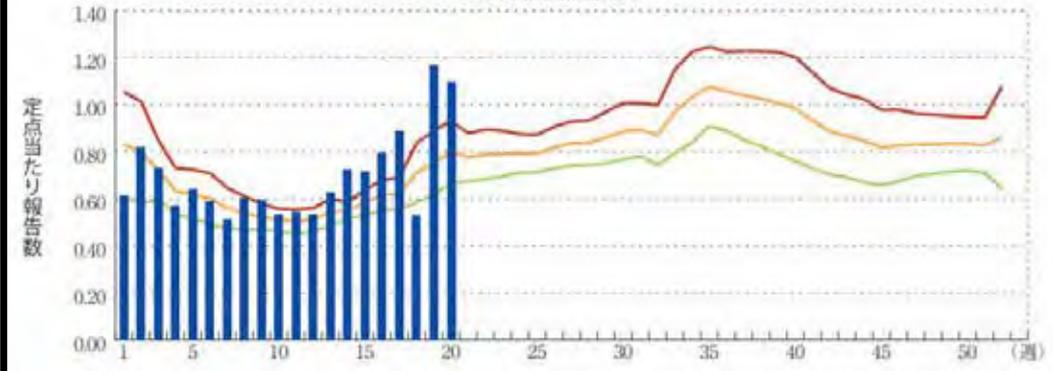
全国の指定された医療機関(定点)から報告され、疾患により小児科定点(約3,000カ所)、インフルエンザ(小児科・内科)定点(約5,000カ所)、眼科定点(約600カ所)、基幹定点(約500カ所)に分かれています。また、定点当たり報告数は、報告数/定点医療機関数です(増減の目安は小数点第3位以下を含む)。

定点把握疾患の報告の過去5年間の同時期との比較(第20週)

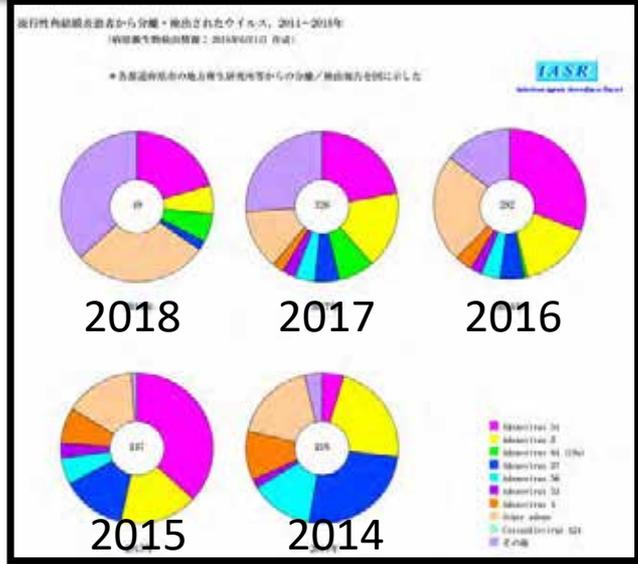


当該週と過去5年間の平均(過去5年間の前週、当該週、後週(合計15週の平均)との差をグラフ上に表現した。

流行性角結膜炎



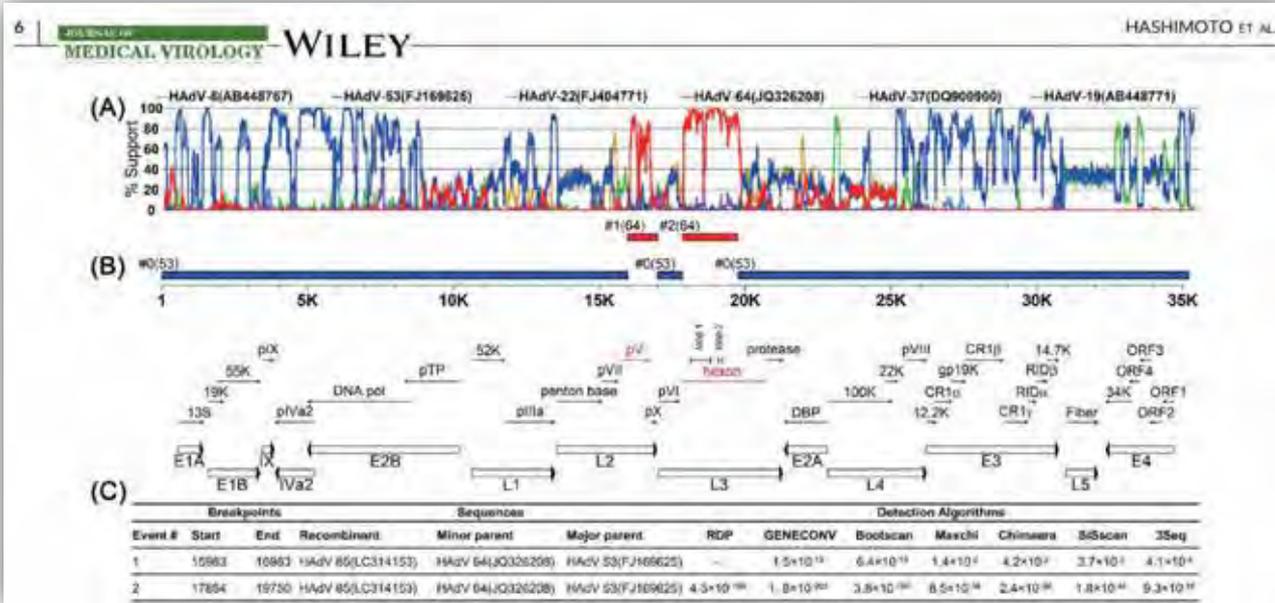
流行性角結膜炎(2018年第20週:5月14～20日)
 定点当たり1.1で過去5年間の同時期と比較してSD 3.27



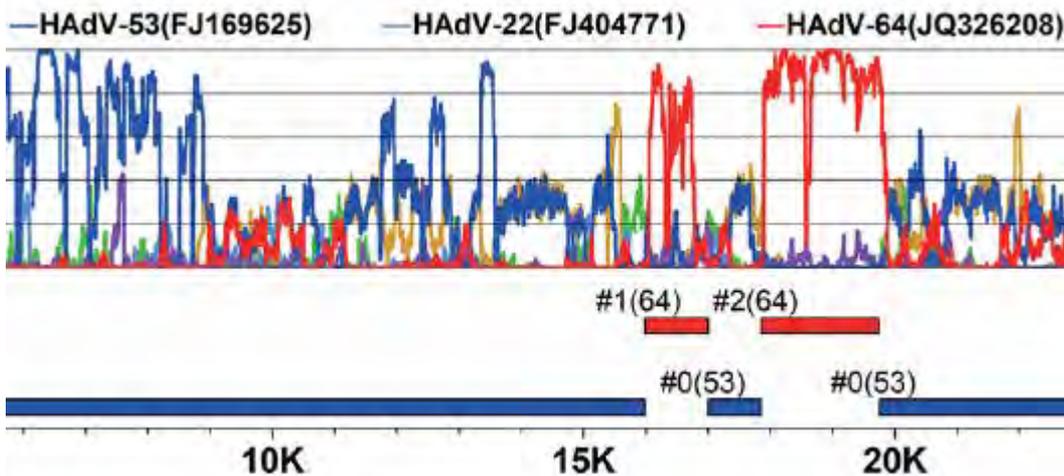
- Adenovirus 54
- Adenovirus 3
- Adenovirus 64 (19a)
- Adenovirus 37
- Adenovirus 56
- Adenovirus 53
- Adenovirus 4
- Other adeno
- Coxsackievirus A24
- その他

85型の出現

HAdV-85



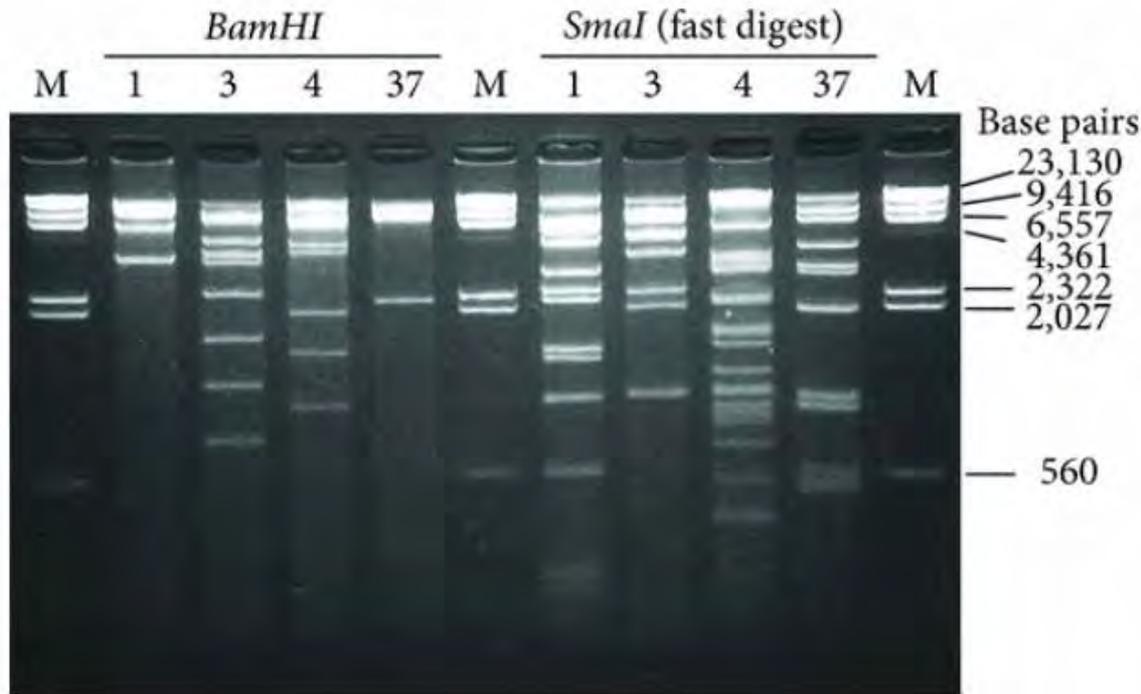
JMV2018



P53H64F53

Genome type ゲノム型

アデノウイルスのゲノムを制限酵素で切断して電気泳動したパターンにより血清型の内での鑑別をすることが古くからおこなわれてきた。



19型の標準株は眼への病原性なし
しかしgenome type 19aはEKCを引き起こす。



19a型は、血清型では19型
遺伝型では64型

日本で発見された 7 遺伝型

HAdV-85 (doi: 10.1002/jmv.25041)

P37H64F8/2015/JPN

Journal of Medical Virology 熊本県と感染研等 2018 中和では19型か

HAdV-82 (doi: 10.1099/jmm.0.042176-0042176 G)

P56H56F37/2011/JPN

Journal of Medical Microbiology 大阪府2012

HAdV-81 (doi: <https://doi.org/10.7883/yoken.67.282>) **P65H48F60/2012/JPN**

Japanese Journal of Infectious Diseases 千葉県と感染研等2014

HAdV-79 (doi: 10.1002/jmv.24749)

P11H34F11/2015/JPN

Journal of Medical Virology 福岡県と感染研等 2016

HAdV-65 (doi: 10.3201/eid1805.111584)

P58H10F9/2004/BGD

Emerging Infectious Diseases 川崎市と感染研等 2012

HAdV-61 (doi: 10.1099/vir.0.034744-0.)

P31H12F12/2004/JPN

Journal of General Virology 川崎市等 2011

中和では12型か

HAdV-54 (doi: 10.1128/JCM.01835-07.)

P54H54F8/2000/JPN

Journal of Clinical Microbiology 三菱化学と北大等 2008 中和では8型(クロス)

組換：

D種とB種が多い。

52型以降 2018年7月4日現在

38の型が登録され、現在90まで確認
できた。

A種：1件 (2.6%)

B種：7件 (18.4%)

C種：2件 (5.3%)

D種：28件 (73.7%)

アデノウイルス2型とPが異なる89型

HAdV-C89 P89H2F2/2015/DEU

咽頭結膜熱患者から分離・検出されたウイルス、2014～2018年
 (病原体微生物検出情報 2018年7月4日 作成)

* 各都道府県の地方衛生研究所等からの分離/検出報告を関に示した



J-STAGE Browse About J-STAGE Support & News

Japanese Journal of Infectious Diseases

Journal home Advance online publication Journal issue About the journal

J-STAGE home | Japanese Journal of Infectious Diseases | Advance online publication | Article overview

The first identification of human adenovirus 57 (HAdV-57) in Japan

Chika Tatsumi, Setsuko Iizuka, Tetsuo Mita, Mieko Wada, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto

Author information

Keywords: Human adenovirus 57, Neutralization test, Hexon, Penton, Fiber

JOURNALS FREE ACCESS ADVANCE ONLINE PUBLICATION

Article ID: JJID.2017.476

DOI <https://doi.org/10.7883/jynken-JJID.2017.476>

C種の状況

- C種には57型と89型がgenotypeとして報告されている。
- 57型は日本に侵入していることが明らかになっている。
- 2型とヘキソンとファイバーが同じでペントンが異なる89型が現在、報告される予定である。
- 日本での2型流行の中に、ペントンが異なる89型が入っているかもしれない。

型に関するまとめ

型：アデノウイルスは 1～51型までの血清型、52～86型の遺伝型に分類される。

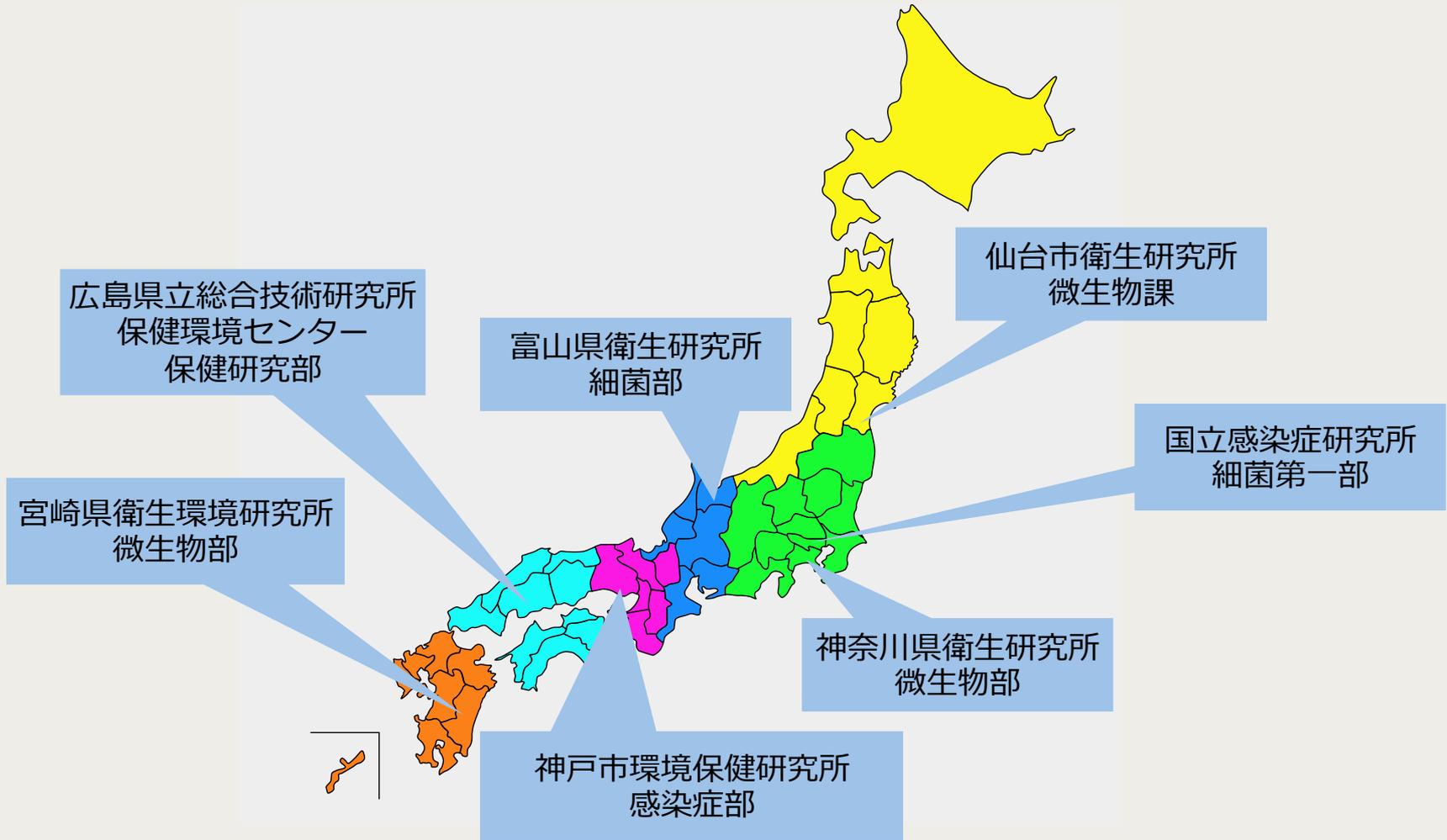
血清型：ヘキソンに対する中和反応性で決定されると考えられてきたがファイバー等も関与。

遺伝型：全塩基配列の決定で新型と認められ、ヘキソンに加えてペントン、ファイバーの塩基配列の系統樹解析で決定される。

日本：7つの新しい遺伝型が発見、論文報告されている。54型による流行性角結膜炎など大規模流行中。

15. レジオネラ

レジオネラ・レファレンスセンター会議



衛生微生物技術協議会第39回研究会
平成30年7月5日 ピアザ淡海

- 感染研センター報告

 - レジオネラ症発生動向

 - 臨床分離株の収集と遺伝子型別

 - 迅速検査実施状況

 - 外部精度管理

- 支部センター報告

- トピックス

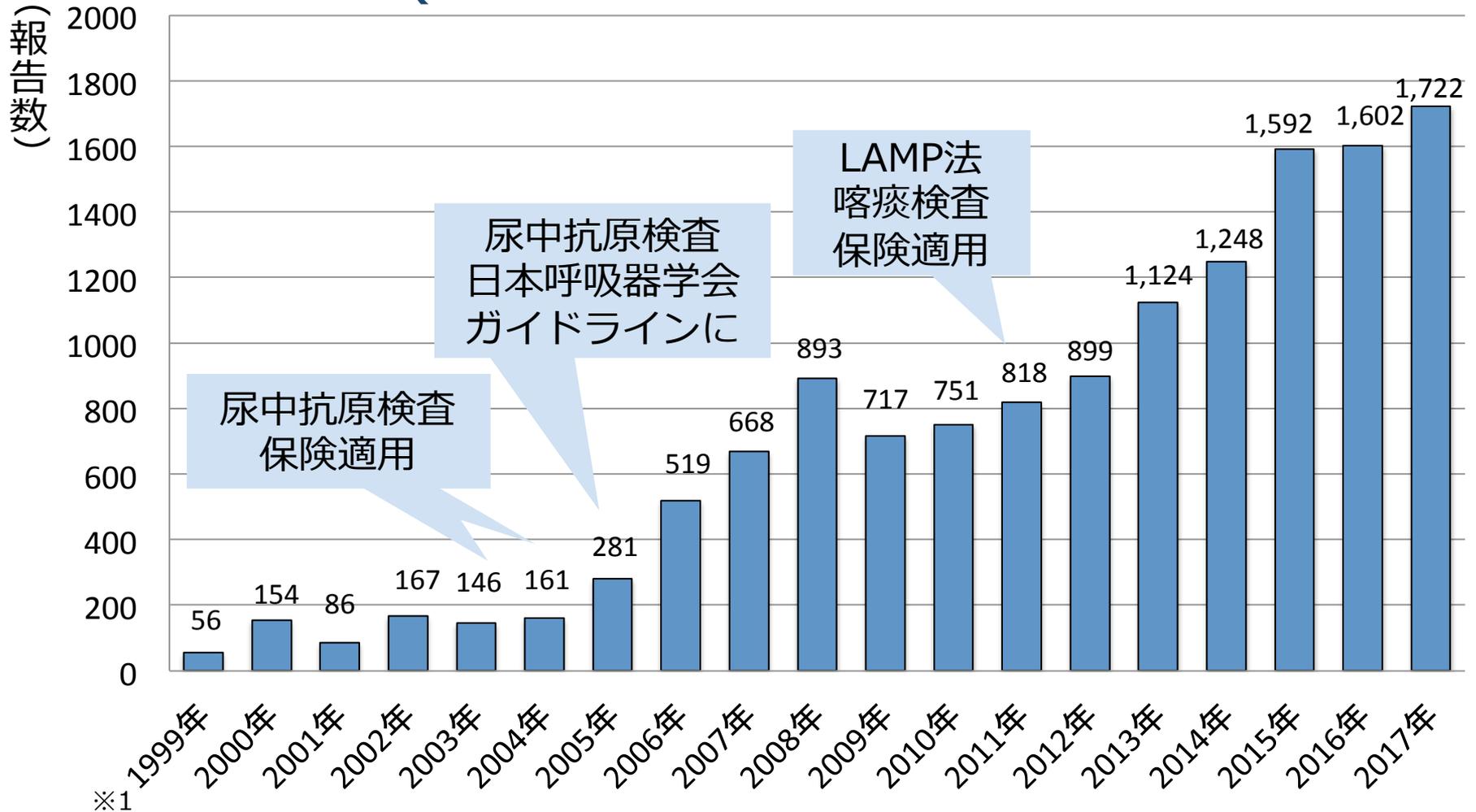
 - MLVA（神戸市環境保健研究所）

 - 加湿器を感染源とした集団感染事例

 - （大分県衛生環境研究センター）

年別レジオネラ症報告数

(感染症発生動向調査)

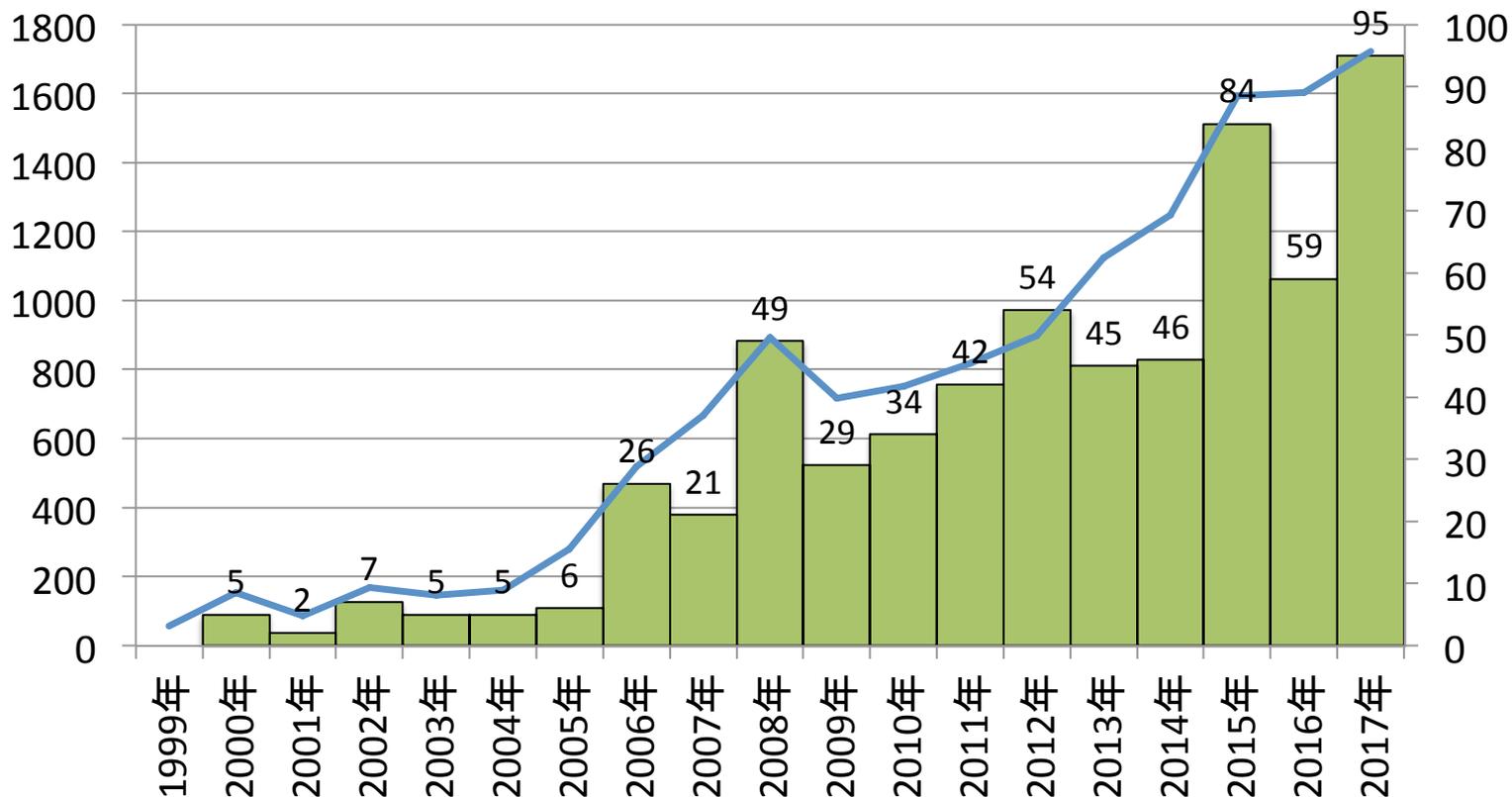


※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

分離年別 収集レジオネラ臨床分離株 (2018年6月現在、2017年分まで)

報告数

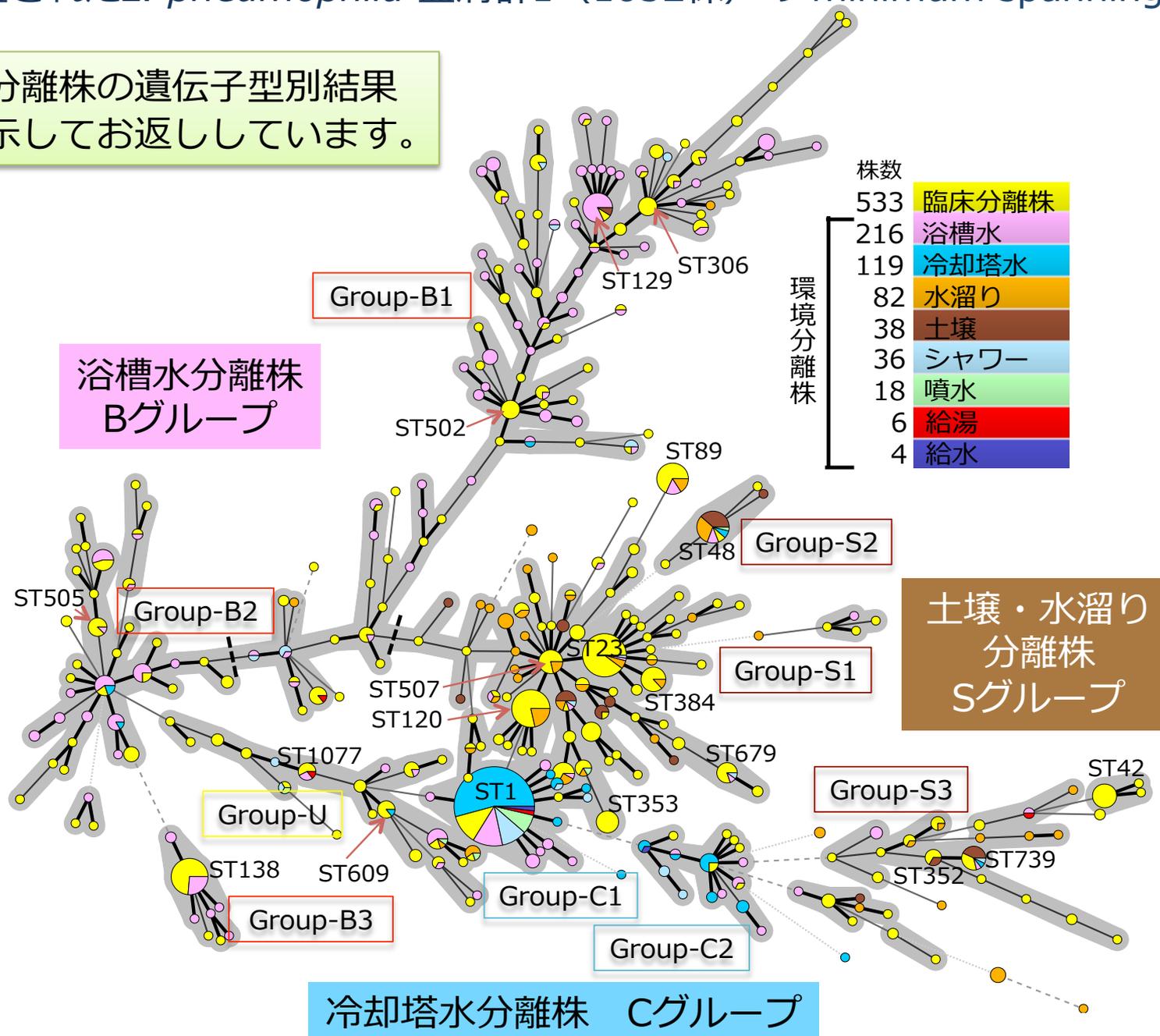
株数



レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行っている。
2017年度は88株受付。

国内で分離された*L. pneumophila* 血清群1 (1052株) の minimum spanning tree 図

臨床分離株の遺伝子型別結果を
図示してお返ししています。



レジオネラ迅速検査実施状況調査

昨年6月にレジオネラレファレンスセンターの
協力で実施。

- ◆ 環境検体、臨床検体のレジオネラ属菌検査に迅速検査法を導入しているか。
- ◆ 回答数：地方衛生研究所 74機関

レジオネラ迅速検査実施状況調査

結果

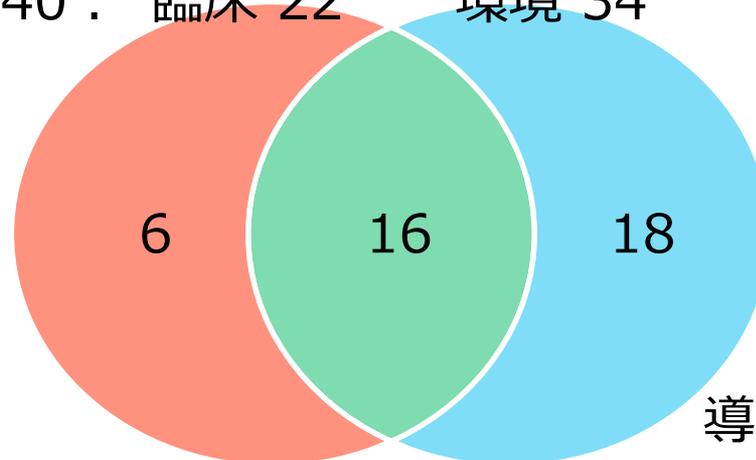
◆ 40/74 地方衛生研究所で導入。

臨床検査 22/74 機関

環境検査 34/74 機関

地方衛生研究所 74

導入している 40 : 臨床 22 環境 34



導入していない 34

レジオネラ迅速検査実施状況調査

結果

- ◆ 臨床検体で迅速検査（LAMP法）を実施 22機関
 - 全臨床検体で培養と並行してLAMP法を実施 17
 - 一部臨床検体で実施 5
- ◆ 環境検体で迅速検査を実施 34機関
 - 全検体で実施
 - 再検査
 - 患者発生時
 - 調査研究

培養法から迅速法に置き換えているところはなかった。

レジオネラ迅速検査実施状況調査

結果

◆ 環境検体	迅速検査を実施	34機関
	LAMP法	19
	リアルタイムPCR法	4
	LAMP/リアルタイムPCR	5
	記載なし	6

外部精度管理

- ◆ 厚労科研費で地衛研を対象に実施していたものを2015年から、対象を行政/民間に拡大して、日水製薬株式会社が実施。
- ◆ 2015年、2016年、2017年 と3回実施。

結果概要

(H27,28,29年度の良好施設割合の比較)

	H27	H28	H29	H26 (参考)
非濃縮①	91 (62/68)	97 (68/70)	99 (69/70)	—
非濃縮②	—	94 (66/70)	93 (65/70)	90 (37/41)
ろ過濃縮	62 (38/61)	77 (47/61)	75 (49/65)	65 (13/20)
遠心濃縮	36 (8/22)	56 (5/ 9)	80 (4/ 5)	—

% (良好施設数 / 参加施設数)

良好範囲外の結果を連続して報告している機関は、試料の混ぜ方、培地の状態、培地への各接種量が安定していたか、コンラージの力加減、濃縮操作等、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。

2018年度外部精度管理実施予定

－実施母体：日水製薬－

日 程	内 容
7月中旬	参加募集開始

今年もレジオネラレファレンスセンターを通じて
参加を募集します。

16. 結核

レファレンスセンター報告 結核

御手洗聡, 村瀬良朗
結核予防会結核研究所抗酸菌部

討議事項

- 2017年度に実施した結核菌VNTR型別法の外部精度評価結果に関する協議
- 外部精度評価を受けた訓練(研修)に関する調整
- 非結核性抗酸菌症増加を受けた非結核性抗酸菌に関する衛生研究所の役割

精度保証の要素

- 精度管理 (Internal Quality Control: IQC)
- 外部精度評価 (External Quality Assessment: EQA)
 - Proficiency testing
 - Blinded Cross Re-checking
 - Supervision/Inspection
- 訓練 (Training)

VNTR分析に関する外部精度評価の方法

- レファレンス委員を介して、EQA実施プロトコールの配布・参加募集
- 参加希望のあった衛生研究所を対象
- 結果既知の結核菌3株のDNAを送付
- 内部精度管理用結核菌DNAの配布
- 各施設でのVNTR分析結果を結核研究所にて標準結果と比較解析

外部精度評価で用いたVNTR分析結果報告シートの概要

施設名

PCR産物の測定方法

分析結果シート

分析施設 担当者)
XX研究所 (X)

分析方法
キャピラリー電気泳動 (ロスモアイ)

ID	JATA No.															HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	3232	3820	4120	3690 (Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 (Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
入力	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション						
H37Rvの コピー数	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2						
Strain A(QC-DNA 1)	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	8	11	4	1	11	4	2	2	5	2	3	4
Strain B(QC-DNA 2)	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	8	4	7	N	3	6	8	4	3	2	1	4	1	4
Strain C(QC-DNA 3)	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	9	3	3	2	4	3	5

JATA(12/15)

HV

Supply(15)

国内で推奨される共通の分析対象

超可変領域、
高識別能
(オプション)

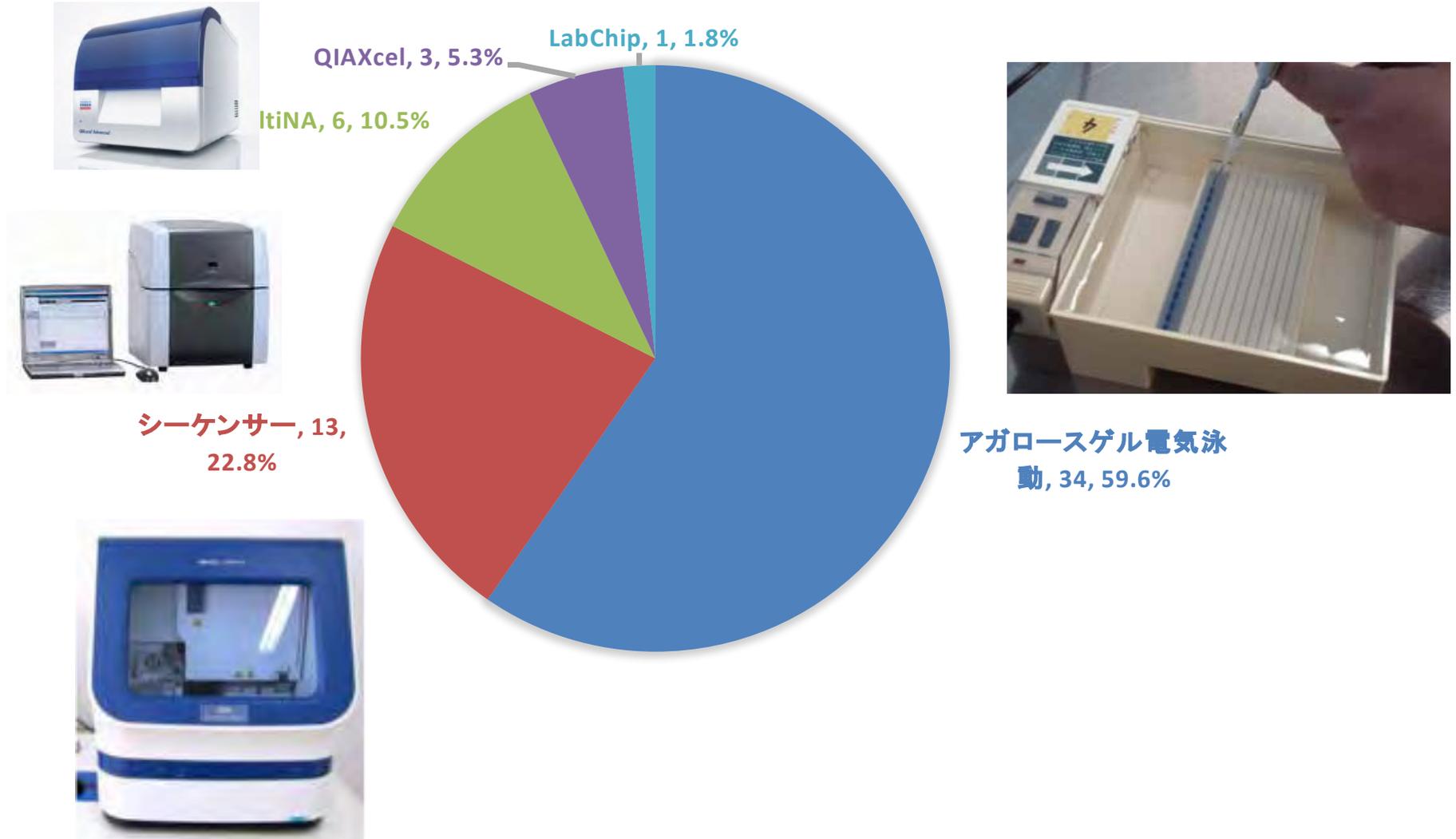
国際比較
(オプション)

参加施設から電子メール等で報告シートを回収し、集計・分析を実施

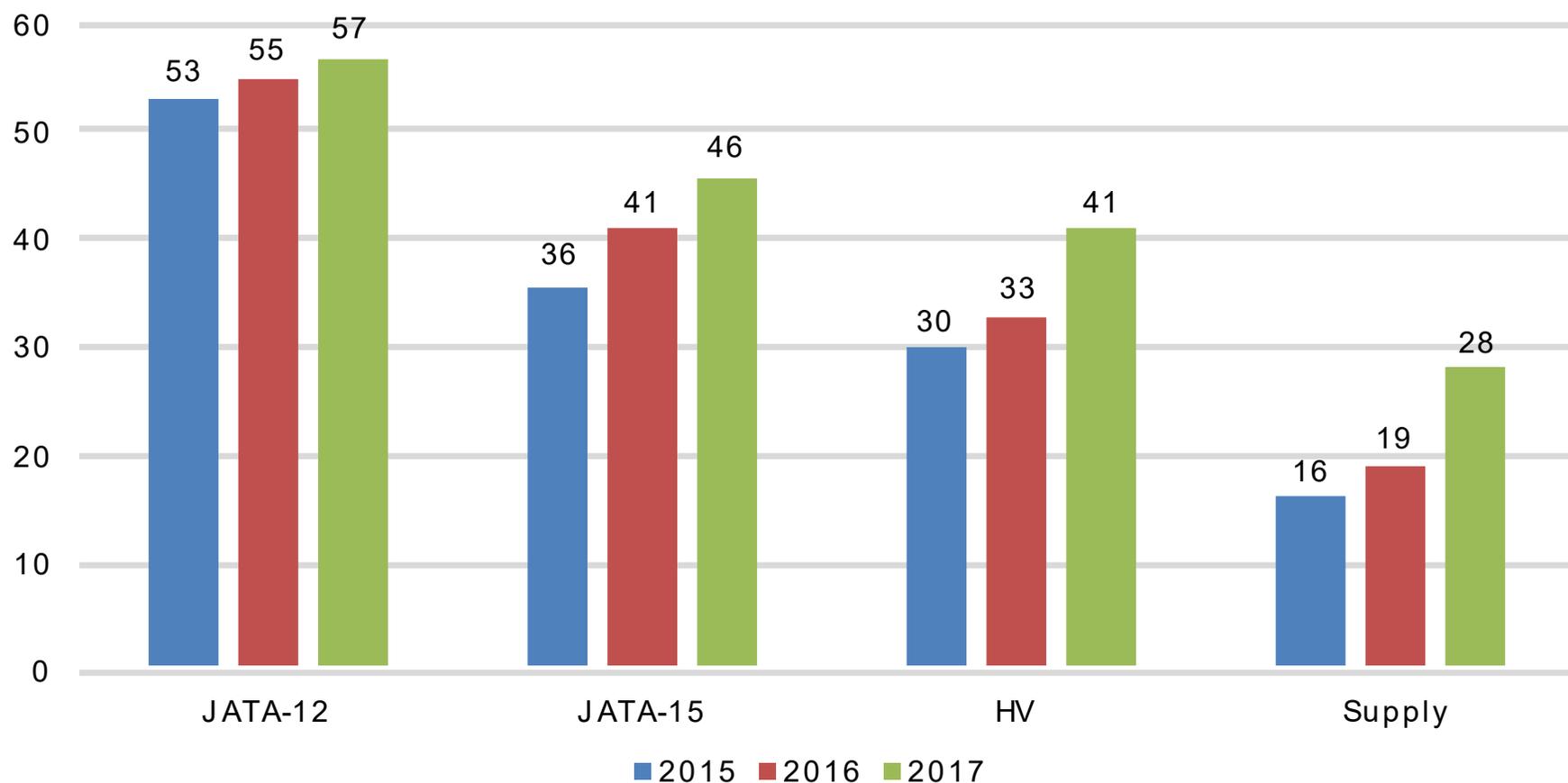
2017年度VNTR分析外部精度評価

- 全国の地方衛生研究所を対象
- 58施設の参加（2016年度[n=56]）
- 57施設から分析結果を回収（-2018.3.31）

2017年に実施した外部精度評価 各施設で用いられているDNA分子量の測定法(57施設)



参加施設で採用されているVNTR分析システム



JATA-12は基本的に全施設実施。識別能を上げるためにJATA-15、HV、Supplyを追加分析する施設数が年々増加

外部精度評価：標準判定

正解

ID	JATA No.															HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	3232	3820	4120	3690 (Mtub 39)	MIRU 40	MIRU 04	2401 (Mtub 30)	MIRU 16	ETR-C
入力	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	必須	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション						
H37Rv	2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	5	2	3	4	3	2	5	1	3	2	2	4
内部精度管理株 A	3	3	3	3,4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	3	3	2	4	4	4
内部精度管理株 B	1	4	10	3	7	2	2	4	3	7	7	2	11	11	4	1	11	4	2	2	5	2	3	4
外部精度評価株 1	5	3	5	3	2	3	7	4	5	8	7	4	14	8	4	15	15	13	3	3	2	2	3	4
外部精度評価株 2	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	5	4	7	7	3	5	7	3	3	2	1	4	1	4
外部精度評価株 3	4	3	4	3	0*	3	7	4	5	7	11	3	8	5	3	14	14	10	4	4	2	4	3	4

* 1500bp以上のためコピー数判定不能のため、便宜的に0と表示。もしくは (コピー数) ≥ 等の表記でも正解としました。

外部精度評価株 1	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	13	12	10	3	3	2	4	3	4
外部精度評価株 2	2	5	2	1	2	3	1	2	3	13	7	4	7	7	3	4	8	2	2	2	1	4	1	4
外部精度評価株 3	1	3	4	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4	15	8	5	3	3	2	4	3	4

参考：2016年度の対象株と標準判定

2017年度 外部精度評価の結果

結核菌3株をJATA-12 VNTR法で分析した場合の正答との一致率

	2015 施設数(53施設中, %)	2016 施設数(55施設中, %)	2017 施設数(57施設中, %)
完全一致	49 (92.4%, 49/53)	48 (87.3%, 48/55)	40 (70.2%, 40/57)
1 locus違い	1 (1.9%, 1/53)	5 (9.1%, 5/55)	12 (21.1%, 12/57)
2 loci以上の違い	3 (5.7%, 3/53)	2 (3.6%, 2/55)	5 (8.8%, 5/57)

2017年度に全ローサイ完全一致した施設の割合は、2016年度と比べると有意に低下していた(87.3% vs. 70.2%, $p=0.027$)。

結論

- 2017年度は57施設に対して外部精度評価を実施(4回目)
- 3株のEQA用検体をJATA 12で分析した場合、2016年と比べて全株12ローサイ完全正答した施設数と割合は48施設87.3%(2016)から40施設70.2%(2017)に減少した。
- 株のセレクションに左右される側面あり。
- 担当者の交代が精度の低下と関係している可能性が示唆された。
- 外部精度評価後のフィードバック(フォローアップ)、再訓練や研修を実施し、分析精度の維持と向上を図る必要がある。

今後の精度保証(2018–2019年度)

1. 本年度・来年度の実施について
 1. 継続してVNTR外部精度評価を実施する。
 2. 各ローカスについて、全参加者の80%以下の一致率である場合は評価対象から除外する。
 3. 再検査を可能とするため、配布するDNA量を増やす。
2. 外部精度評価実施後のフィードバック(follow-up)
 1. 問題点の洗い出しと改善効果の評価のための調査を今年度から実施する。
 2. 来年度結核菌の取扱とVNTRに関する研修を二回実施する。

結核レファレンス委員会

委員

- 北海道東北新潟：山形県衛生研究所・瀬戸順次
- 関東甲信静：神奈川県衛生研究所・相川勝弘

→大屋日登美

- 東海北陸：富山県衛生研究所・磯部順子
- 近畿：大阪市立環境科学研究所・山本香織
- 中国四国：岡山県環境保健センター・河合央博
- 九州：大分県衛生環境研究センター・一ノ瀬和也

→神田由子

世話人

- 結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡，村瀬良朗

17. リケッチア

リケッチア症レファレンスセンター会議2018

全国衛生微生物技術協議会, 2018年7月5日, 大津(滋賀)

- 北海道東北
福島県衛生研究所
青森県環境保健センター
- 関東甲信静
東京都健康安全研究センター
千葉県衛生研究所
- 東海北陸
三重県保健環境研究所
富山県衛生研究所
- 近畿
和歌山県環境衛生研究センター
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター
- 中国・四国
岡山県環境保健センター
広島県総合科学研究所環境保健センター
高知県衛生研究所
- 九州
宮崎県衛生環境研究所
鹿児島県環境保健センター

世話人 安藤秀二
国立感染症研究所
ウイルス第一部第五室
shuando@nih.go.jp

本日の予定

- **イントロ（現状確認、発生状況 等）**
- **診断マニュアルについて（方針）**
- **情報発信について1**
- **情報発信について2**
- **意見交換**

感染症法

- ・日本紅斑熱 (*R. japonica*, 3種)
- ・つつが虫病 (*O. tsutsugamushi*)
- ・ロッキー山紅斑熱 (*R. rickettsii*, 3種)
- ・発疹チフス (*R. prowazekii*, 3種)

その他

- ・発疹熱 (*R. typhi*)
- ・極東紅斑熱 (*R. heilongjiangensis*)
- ・地中海紅斑熱 (*R. conorii*)
- ・*R. helvetica*
- ・African tick bite fever (*R. africae*)
- ・Flinder tick bite fever (*R. honei*)
- ・*R. sibirica* ほか多種

過去10年で日本が経験したリケッチア症

- ・つつが虫病
- ・日本紅斑熱
- ・極東紅斑熱
- ・地中海紅斑熱
- ・African tick bite fever
- ・Queensland tick fever (*R. australis*)
- ・*R. tamurae*
- ・*R. helvetica*
- ・*Ca R. indica*
- ・発疹熱



2017年暫定
 つつが虫病: 439例
 日本紅斑熱: 337例

25w	JSF	Sabtychus	SFTS
2018	75/?	86/?	35/?
2017	89/337	91/439	37/90
2016	63/275	79/500	25/60
2015	56/212	65/415	24/60
2014	48/240	78/317	23/61



本日の予定

- **イントロ（現状確認、発生状況等）**
- **診断マニュアルについて（方針）**
- 情報発信について1
- 情報発信について2
- **意見交換**

ツツガムシ病診断マニュアル

はじめに	1
血清診断法	
I. 間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF法)	2
1. 培養および抗原スライドの作成法	
2. 検査法	
3. 判定	
II. 間接免疫ペルオキシダーゼ法 Indirect immunoperoxidase assay (IP法)	6
1. 抗原スライドの作成法	
2. 検査法	
3. 試薬調整	
4. 留意点	
5. 参考文献	
病原体検出法	
III. PCRによる遺伝子検出法	9
1. 検査材料	
2. DNAの抽出法	
3. NestedPCR法による遺伝子検出	
4. NestedPCR法による遺伝子型別	
5. 参考文献	
IV. 病原体の分離法	17
1. はじめに	
2. 野ネズミの捕獲法	
3. 捕獲後の処置, (麻酔, 全採血, 計測, 解剖, 材料摘出)	
4. マウスへの接種法	
5. マウスの観察および飼育管理 (給餌, 給水, 床敷交換など)	
6. マウスの病変観察, <i>O. tsutsugamushi</i> 感染の確認および継代	
7. 注意	

紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル

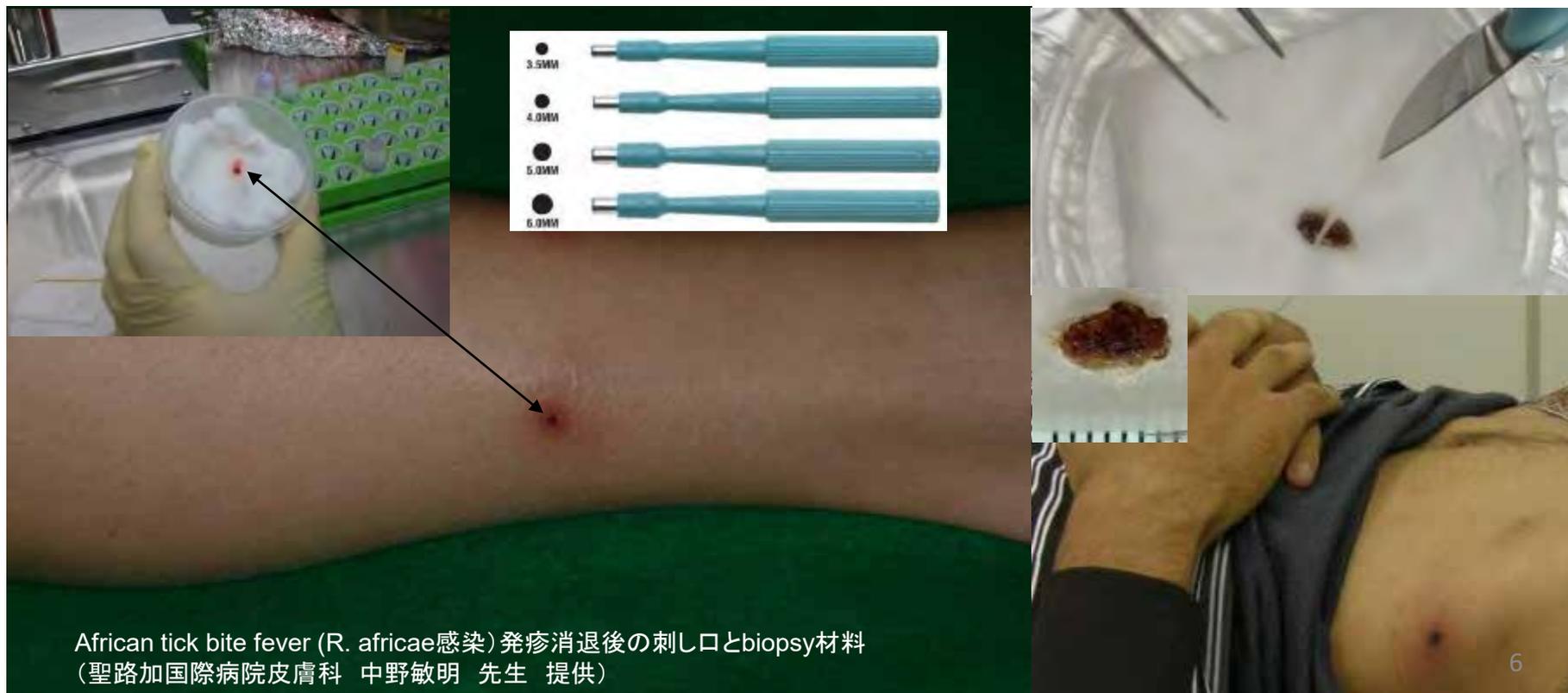
はじめに	1
血清診断法	
I. 間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF法)	2
1. 紅斑熱群リケッチアの継代に使用する細胞	
2. <i>Rickettsia japonica</i> の継代	
3. 抗原スライドの作成	
4. 検査法	
5. 診断基準 写真 (IF法)	
病原体検出法	
II. 遺伝子増幅法 (PCR法)	7
1. DNA抽出法	
2. DNA抽出材料	
3. プライマー	
4. PCR法	
III. リケッチアの分離法	8
1. 分離材料	
2. 分離方法	
今後の課題	11
参考文献	11

リケッチア症の遺伝子検査検体

紅斑熱群リケッチア(日本紅斑熱): 痂皮(Eschar) > 紅斑部生検 ≧ 急性期血液*
つつが虫病: 痂皮(Eschar) > 紅斑部生検 ≧ 急性期血液*
発疹チフス群リケッチア: 紅斑部生検 ≧ 急性期血液
* 血液は抗菌薬投与前

検査への提出は,

- 痂皮等は乾燥しない程度に生食等で湿らせたガーゼ等に包んで検査室に。
- セーラムチューブやスピッツ等では綿球を使うと便利。



リケッチア症に用いる遺伝子検出

- Hanaoka et al (*R. japonica* Realtime PCR, *R. heilongjiangensis*, *Emerg Infect Dis* 15:1994-7, 2009)
- Conventional PCR (*Rickettsia* spp 17kDa, *gltA*, H20希少感染症研修会, *R. japonica* 17kDa Furuya et al,)
- Conventional PCR (*O. tsutsugamushi* TSA, Furuya et al: *J Clin Microbiol* (1991) 29:2628-, (1993) 31: 1637-

& Satoh H et al: *Med. Entomol. Zool* (2014) 65:183-

- | | |
|--|--|
| 1. 国内の紅斑熱群リケッチア症の多様性
(<i>R. japonica</i> , <i>R. heilongjiangensis</i> , <i>R. tamurae</i> ,
<i>R. helvetica</i> etc) | 5. 輸入感染症(<i>O. tsutsugamushi</i> , <i>R. africae</i> ,
<i>R. conorii</i> , <i>R. australis</i> , <i>Cand. R. indica</i> etc) |
| 2. 日本紅斑熱発生地拡大 | 6. ダニ媒介感染症の多様化 |
| 3. 日本紅斑熱とつづが虫病の発生時期の
重なり(=臨床的には鑑別困難) | 7. その他(血清診断の不適用、迅速性、単
純化・・・) |
| 4. つづが虫病 <i>Orientia</i> の多様性(最低6型) | |

- Kawamori et al (SFG and Scrub typhus Realtime PCR, H26衛微協)

 <Primer 1組 + Probe 2種 (for 紅斑熱群リケッチア, for つづが虫病リケッチア)>

PCR flow

1. Realtime PCR (universal and/or specific), and/or LAMP
2. Conventional PCR (specific and/or universal)

The 1st target for *Rickettsia* spp: 17k Da antigen, citrate synthase (*gltA*)

for Scrub typhus: TSA (56 k Da) and/or 47 k Da

3. Sequencing

Format: Abstract Send to

Jpn J Infect Dis, 2018 Apr 27. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.447. [Epub ahead of print]

Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan.

Kawamori F^{1,2}, Shimazu Y³, Sato H⁴, Monma N⁵, Ikegaya A¹, Yamamoto S⁶, Fujita H⁷, Morita H⁸, Tamaki Y⁹, Takamoto N², Su H², Shimada M², Shimamura Y², Masuda S², Ando S¹⁰, Ohashi N².

Author information

Abstract
 Tsutsugamushi disease (TD) and Japanese spotted fever (JSF) are known as representative rickettsioses in Japan, and caused by infection with *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia japonica*, respectively. For molecular-based diagnosis, conventional PCRs which independently amplify respective rickettsial DNAs are usually used, but it's time-consuming. Here, we describe a new duplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *O. tsutsugamushi* and spotted fever group rickettsiae, and evaluated under several PCR conditions in 6 public health laboratories. The detection limit of the assay was estimated 10² copies and the sensitivity was almost same as that of 3 conventional PCRs. Total of 317 febrile patients were selected as clinically suspected or confirmed cases for rickettsioses. The detection efficiency of this assay for *O. tsutsugamushi* from specimens of blood or skin (eschar) seems to be almost same as that of conventional nested PCR even in different laboratory tests, while the efficiency for SFG rickettsiae tends to be higher than that of 2 traditional double PCRs. Our duplex real-time PCR is a powerful tool for rapid diagnosis of rickettsioses, especially at the acute stage of infection.

KEYWORDS: *Orientia tsutsugamushi*; *Rickettsia japonica*; diagnosis; duplex real-time PCR; rickettsiosis

PMID: 29709963 DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.447

Free full text



LinkOut - more resources +

You are here: NCBI > Literature > PubMed

GETTING STARTED	RESOURCES	POPULAR	FEATURED
NCBI Education	Chemicals & Bioassays	PubMed	Genetic Testing Registry
NCBI Help Manual	Data & Software	Bookshelf	PubMed Health
NCBI Handbook	DNA & RNA	PubMed Central	GenBank
Training & Tutorials	Domains & Structures	PubMed Health	Reference Sequences
Submit Data	Genes & Expression	BLAST	Gene Expression Omnibus
	Genetics & Medicine	Nucleotide	Genome Data Viewer
	Genomes & Maps	Genome	Human Genome
	Homology	SNP	Mouse Genome
	Literature	Gene	Influenza Virus
	Proteins	Protein	Primer-BLAST
	Sequence Analysis	PubChem	Sequence Read Archive
	Taxonomy		
	Variation		

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
 Policies and Guidelines | Contact

Advance Publication by J-STAGE

Japanese Journal of Infectious Diseases

Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan

Fumihiko Kawamori, Yukie Shimazu, Hiroko Sato, Naota Monma, Asaka Ikegaya, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Hiroshi Morita, Yukiko Tamaki, Naoya Takamoto, Hongru Su, Masahiko Shimada, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Shuji Ando, and Norio Ohashi

Received: October 7, 2017. Accepted: March 6, 2018.

Published online: April 27, 2018.

DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.447

Advance Publication articles have been accepted by JJID but have not been copyedited or formatted for publication.

Specificity of Ot-Rj-duplex real-time PCR in Rickettsiales bacteria

Species	Strain (serotype)	Source	Ot-Rj-duplex real-time PCR		Hanaoka Rj-FAM ¹⁾
			Ot-FAM	Rj-VIC	
(Orientia)					
<i>O. tsutsugamushi</i>	Gilliam	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Karp	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Kato	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Irie/Kawasaki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Hirano/Kuroki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Shimokoshi	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JP-2: Sato Gilliam)	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JG: Kasei (Karp)	Apodemus speciosus	Ot-FAM positive	Negative	Negative
(Rickettsia)					
<i>R. japonica</i>	YH	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
	FT	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. heilongjiangensis</i>	CH8-1	Haemaphysalis concinna	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. asiatica</i>	IO-1	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IO-46	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. conorii</i>	Malindi	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. helvetica</i>	PP-1	Ixodes persulcatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IC-1	Ixodes columnae	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. honei</i>	TT-118	Ixodes sp.	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. rickettsii</i>	Sheila Smith	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. sibirica</i>	246	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. tamurae</i>	AT-1	Amblyomma testudinarium	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	HM-1	Haemaphysalis megaspinoso	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. australis</i>			Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Rickettsia</i> sp. LON	LON-2	Haemaphysalis longicornis	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. monacensis</i> (formaly In-56)	IN-1	Ixodes nipponensis	Negative	Ri-VIC positive	Negative
<i>R. prowazekii</i>	brein1	Human	Negative	Negative	Negative
<i>R. typhi</i>	Wilmington	Human	Negative	Negative	Negative
<i>R. canadensis</i>	FLA-2	Haemaphysalis flava	Negative	Negative	Negative
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HZ	Human	Negative	Negative	Negative
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	Arkansas	Human	Negative	Negative	Negative
<i>E. muris</i>	AS145 ^T	Eothenomys kageus	Negative	Negative	Negative
<i>Ehrlichia</i> sp. HF (<i>E. ovatus</i>)	HF565	Ixodes ovatus	Negative	Negative	Negative

R. africae未検出可能

Detection assays of *O. tsutsugamushi* (Ot) and *R. japonica* (Rj) DNAs from febrile patients by Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and serological tests in 6-endemic prefectures of Japan, 1997-2016

Location (year)	Total nos. of febrile patients tested	Laboratory tested ¹⁾	Ot				Rj					Ot-Rj-duplex real-time PCR
			Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs ²⁾	Serological test of IFA ³⁾ or IPA ⁴⁾	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) ⁵⁾	Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs ²⁾	Serological test of IFA ³⁾ or IPA ⁴⁾	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) ⁵⁾		
			Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of nested PCR positive/patients tested (%)	Nos. of seropositive/patients tested (%)		Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of double PCR positive/patients tested (%)	Nos. of SFGR-double PCR positive/patients tested (%)	Nos. of seropositive/patients tested (%)	Range of Cq value	
Akita (1997-2015)	33	秋田県	33/33 (100)	33/33 (100) ⁶⁾	18/33 (55%) ⁴⁾	33/33 (100)	0/33	NT ¹⁰⁾	NT	NT	0/33	24.4-37.7
Fukushima (2010-2013)	67	福島県	64/67 (96)	67/67 (100) ⁶⁾	67/67 (100) ⁴⁾	67/67 (100)	0/67	NT	NT	NT	0/67	21.6-41.0
Shizuoka (2010-2016)	28	静岡県	18/28 (64)	18/28 (64)	21/28 (75) ³⁾	21/28 (75)	3/28 (11) ⁸⁾	NT	NT	3/28 (11)	4/28 (14)	27.9-40.0
Wakayama (2008-2012)	22	静岡県	3/22 (14)	3/22 (14)	3/22 (14) ³⁾	3/22 (14)	9/22 (41)	5/22 (23)	5/22 (23)	12/22 (55) ⁴⁾	12/22 (55)	21.3-40.1
Miyazaki (2008-2009)	28	静岡県	11/28 (39)	11/28 (39)	11/28 (39) ³⁾	11/28 (39)	7/28 (25)	2/28 (7)	2/28 (7)	9/28 (32) ³⁾	9/28 (32)	22.6-41.0
Subtotal ⁷⁾			129/178 (72)	132/178 (74)	120/178 (67)	135/178 (76)	16/50 (32)	7/50 (14)	7/50 (14)	21/50 (42)	21/50 (42)	
Hiroshima (2013-2015)	139	HPTRI	6/139 (4) ⁸⁾	6/33 (18)	2/13 (15) ³⁾	6/139 (4)	55/139 (40) ⁸⁾	12/31 (39)	54/102 (53)	4/13 (31) ³⁾	56/139 (40)	22.0-37.9
Total	317		135/317 (43)			141/317 (44)	74/317 (23)				81/317 (26)	

²⁾: Conventional PCRs were performed by the procedures of previous studies: Ot-nested PCR (9, 13), Rj-double PCR (10), and SFGR-double PCR (6).

³⁾: Assayed by indirect immunofluorescent assays (IFA: potentially positive of more than 40 antibody titer).

⁴⁾: Assayed by indirect immunoperoxidase assays (IPA: potentially positive of more than 80 antibody titer).

⁵⁾: Final results of rickettsiosis determined by a combination of Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and/or serological tests (IFA or IPA).

⁶⁾: Ot-nested PCR was done by some modifications to improve the low detection efficiency of *O. tsutsugamushi* Shimokoshi strain as described previously first-step PCR and the PCR was run with the 3 primers.

An alternative degenerate primer (10m2: 5'-CCDCCTCARCCTAMTATRATGCC-3') instead of 11' primer in Table 1 was used for second-step PCR.

⁷⁾: The subtotal consisting of confirmed cases of rickettsioses was obtained for statistics analysis as shown in Table 5.

⁸⁾: Ot-Rj-duplex real-time PCR was used for diagnosis in clinically suspected cases of rickettsioses.

Instrument:

- ABI7500
- ABI StepOnePlus
- LightCycler 480 (Roche)
- LightCycler Nano (Roche)

Reagents:

- Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TAKARA BIO)
- LightCycler 480 Probes Master (NIPPON Genetics)

学術誌に掲載された系について

- 測定機器(メーカー、機種)
- Master mix(メーカー、試薬種)
- トラブル
- その他の情報
 - ブロックのレファレンスセンター(感染研)へ情報を
 - 情報共有、課題、トラブルシューティングの共有

本日の予定

- イントロ（現状確認、発生状況 等）
- 診断マニュアルについて（方針）
- **情報発信について1**
- **情報発信について2**
- 意見交換

課題(活動)

- ~~マニュアル更新~~
- ~~検査系の評価~~
- 死亡例解析(症例解析) ～EBMの実践
 - 倫理申請
 - 協力要請
- 感染研HP(感染症の話)のupdate
 - 検査施設情報 ～アンケート調査による情報の更新

リケッチア・レファレンスセンター

- 必要性

- 国内のリケッチア症(つつが虫病と日本紅斑熱)は、決して少なくない患者数が報告され、日本紅斑熱は増加している。
- 有効な抗菌薬がありながら、死亡例、重症化例もいまだ報告される。
- 地域によって発生時期が異なり、**地域状況に即した**症例対応が必要となる。
- 国内のリケッチア症の多様性ととも、様々な輸入症例が確認される。
- 報告に必須とされる実験室的診断技術の大部分がイン・ハウスの検査法である。
- リケッチア症は、患者発生地域に固有のベクターの消長に関する情報の把握や感染推定地域における感染源(ベクター、動物)の調査が重要であり、その調査技術の伝承・伝達や維持の課題。
- **関係機関が密に協議・連携し、情報共有、技術の標準化に必要な情報分析、相互支援。**

- 目的・役割

- 標準株、分離株の維持(リスク分散)。
- 診断用抗原並びにPCR陽性コントロールの分担作製と供給。
- 実験室診断技術の相互評価(技術の維持)
- 新規診断法等の相互評価。
- 疫学情報、診断情報の収集・分析と共有。
- 緊急時のバックアップ体制
- 検査マニュアルの作成、改訂
- 検査技術の研修
- その他

本日の予定

- イントロ（現状確認、発生状況 等）
- 診断マニュアルについて（方針）
- 情報発信について1
- 情報発信について2
- **意見交換**