

令和3年度 希少感染症診断技術研修会

分子疫学解析の現状と問題点、課題など(総括)
一腸管細菌感染症、海外の例を中心に

国立感染症研究所・細菌第一部

泉谷秀昌

細菌の分子疫学解析

食品由来(腸管)細菌感染症

- 国内の分子疫学解析の現状
- 海外のゲノム解析導入について
 - 米国CDC
 - 英国PHE/GBRU

腸管感染症起因菌

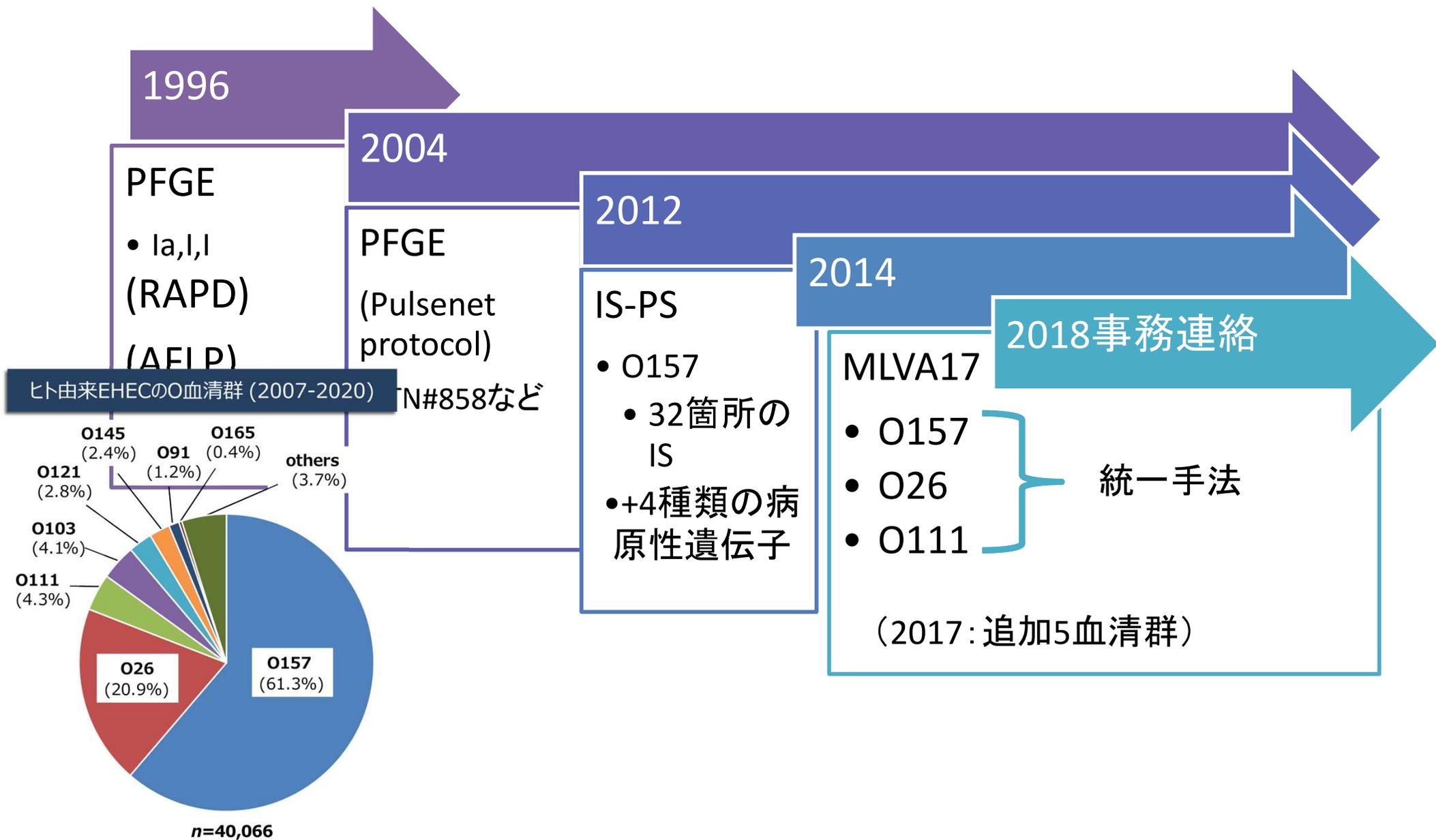
3類感染症起因菌

- 腸管出血大腸菌
- コレラ菌
- チフス菌
- パラチフスA菌
- 赤痢菌

食中毒病因物質

- サルモネラ属菌
- ブドウ球菌
- カンピロバクター
- ウェルシュ菌
- その他の大腸菌
- 腸炎ビブリオ
- ボツリヌス菌
- など(3類感染症起因菌も)

わが国で腸管出血性大腸菌 (EHEC) に使われてきた 分子疫学解析手法



EHEC以外の菌種

- パルスフィールドゲル電気泳動
 - サルモネラ, etc.
- MLVA
 - 赤痢菌 (*Shigella sonnei*)
 - コレラ菌
 - (*Salmonella* Enteritidis, Typhimurium)
- ゲノム解析 (Whole genome sequencing, WGS)
 - サルモネラ (行政検査)
 - 事例に応じて

機器の販売、サポート終了

血清群(型)特異的

コスト
リソース

海外の状況は？

海外の状況

米国CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

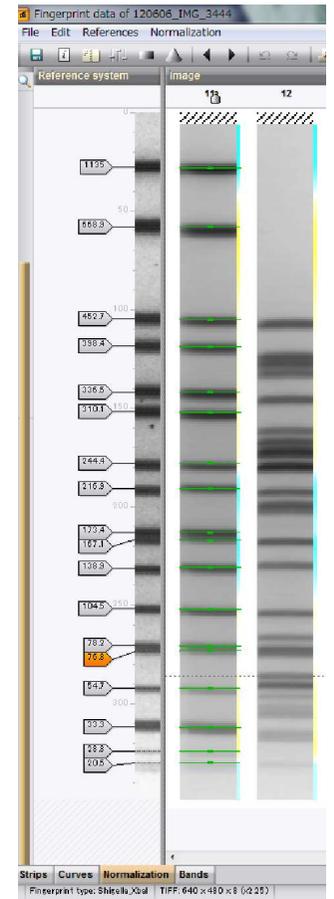
- PulseNet
- PFGEからWGS導入

英国PHE (Public Health England)

- WGS導入検討の報告
- サルモネラ2016-2018年

PulseNet (米国)

- パルスフィールドゲル電気泳動法による分離菌株のタイピング
- 米国CDC (Center for Disease Control and Prevention) による手法の標準化
 - PulseNet standardized protocols
 - *Salmonella* Braenderup H9812株サイズマーカー
 - 泳動条件
 - 例: 大腸菌O157 SW 2.2-54.2秒
 - 例: サルモネラ SW 2.2-63.8秒



PulseNet timeline

1993

- O157 hamburger outbreak

1996

- PulseNet launch

2005

- MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis)

2006

- O157 spinach outbreak

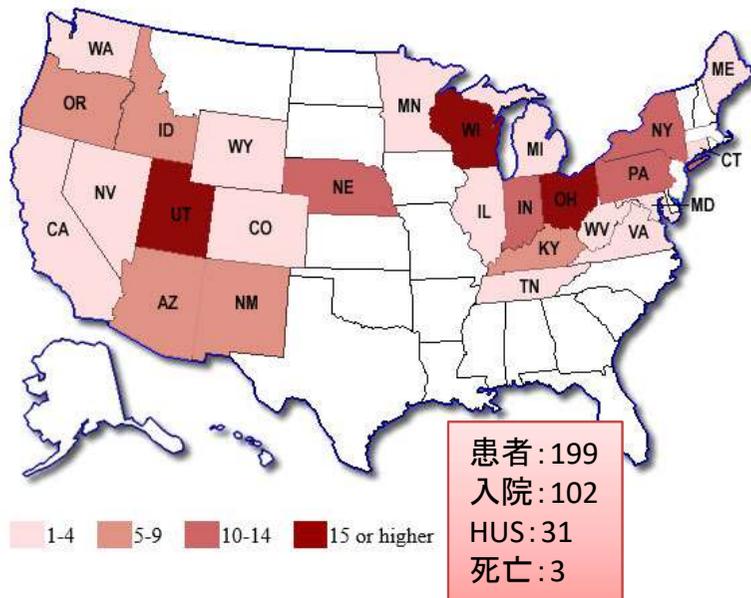
2010

- WGS introduction for cholera outbreak

MLVAの活用

O157 ホウレンソウによる広域事例(2006年)

Persons infected with the outbreak strain of *E. coli* O157:H7, by state of residence, as of October 6, 2006 (n=199)



<https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>



Foodborne Pathogens and Disease, Vol. 3, No. 1 | Original Papers

Second Generation Subtyping: A Proposed PulseNet Protocol for Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157)

Dr. Eija Hytti-Trees, Sandra C. Smole, Patricia A. Fields, Bala Swaminathan, and Efrain M. Ribot

Published Online: <https://doi.org/10.1089/fpd.1.2006.3.118> (Foodborne Pathogens and Diseases, 2006)

[View Article](#)

[Tools](#) [Share](#)

Journal of Food Protection, Vol. 79, No. 12, 2016, Pages 2024-2030
 doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-556
 Published 2016 by the International Association for Food Protection
 Not subject to U.S. Copyright. This is an open access article

Research Paper

Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006

UMID M. SHARAPOV,^{1,2*} ARTHUR M. WENDEL,^{1,3} JEFFREY P. DAVIS,³ WILLIAM E. KEENE,^{4†} JEFFREY FARRAR,⁵ SAMIR SODHA,^{1,2} EIJA HYYTIA-TREES,² MOLLY LEEPER,² PETER GERNER-SMIDT,² PATRICIA M. GRIFFIN,² CHRIS BRADEN,² AND THE OUTBREAK INVESTIGATION TEAM

¹Epidemic Intelligence Service and ²Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, Georgia 30329; ³Wisconsin Division of Public Health, 1 West Wilson Street, P.O. Box 2659, Madison, Wisconsin 53703; ⁴Oregon Public Health Division, 800 N.E. Oregon Street, Portland, Oregon 97232; and ⁵California Department of Health Services, P.O. Box 997377, MS 0500, Sacramento, California 95899, USA

MS 15-556: Received 2 December 2015/Accepted 8 June 2016

(J. Food Protection, 2016)

PulseNet timeline

1993

- O157 hamburger outbreak

1996

- PulseNet launch

2005

- MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis)

2006

- O157 spinach outbreak

2010

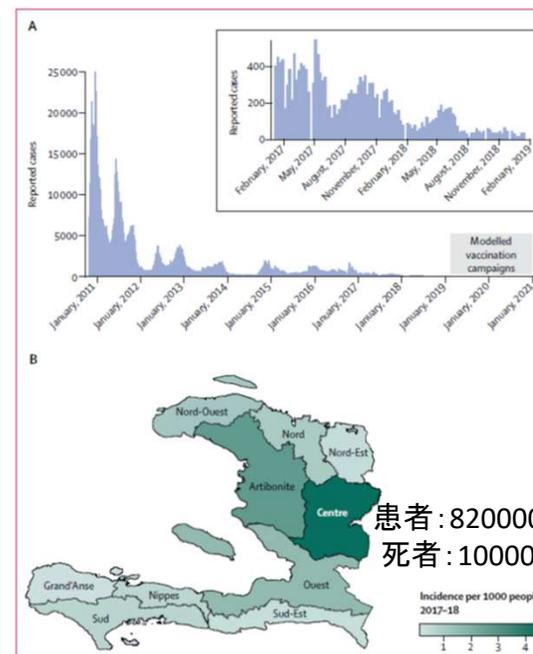
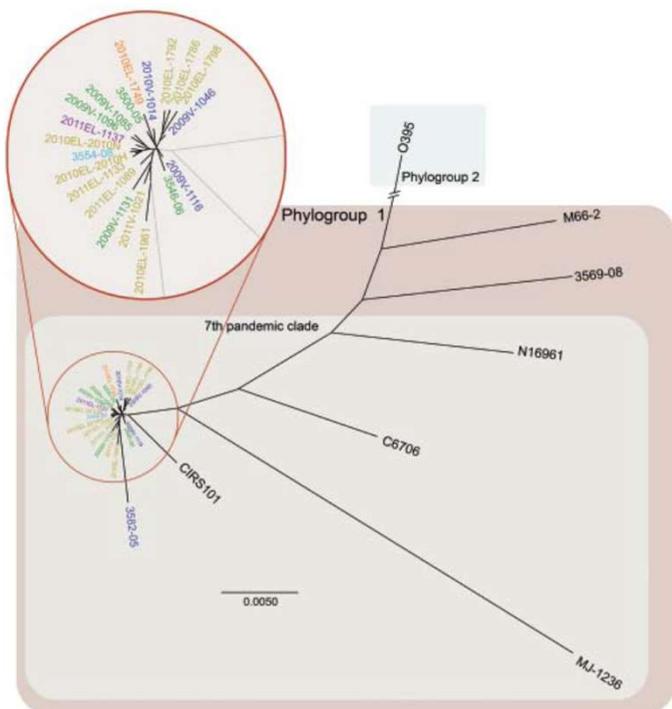
- WGS introduction for cholera outbreak

全ゲノム解析の活用 ハイチにおけるコレラの流行(2010年)

Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa

Aleisha R. Reimer, Gary Van Domselaar, Steven Stroika, Matthew Walker, Heather Kent, Cheryl Tarr, Deborah Talkington, Lori Rowe, Melissa Olsen-Rasmussen, Michael Frace, Scott Sammons, Georges Anicet Dahourou, Jacques Boncy, Anthony M. Smith, Philip Mabon, Aaron Petkau, Morag Graham, Matthew W. Gilmour, Peter Gerner-Smidt, and the *V. cholerae* Outbreak Genomics Task Force¹

(Emerging Infectious Diseases Vol. 17, No. 11, November 2011)



(Lancet Global Health, 8, 2020)

PFGEからWGSへ

2013

- *Listeria* WGS surveillance
- (GenomeTrakr by FDA)

2014

- WGS projects funded by Advanced Molecular Detection

2016

- Expand the use of WGS for *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella* surveillance

2019

- WGS is the New PulseNet gold standard instead of PFGE

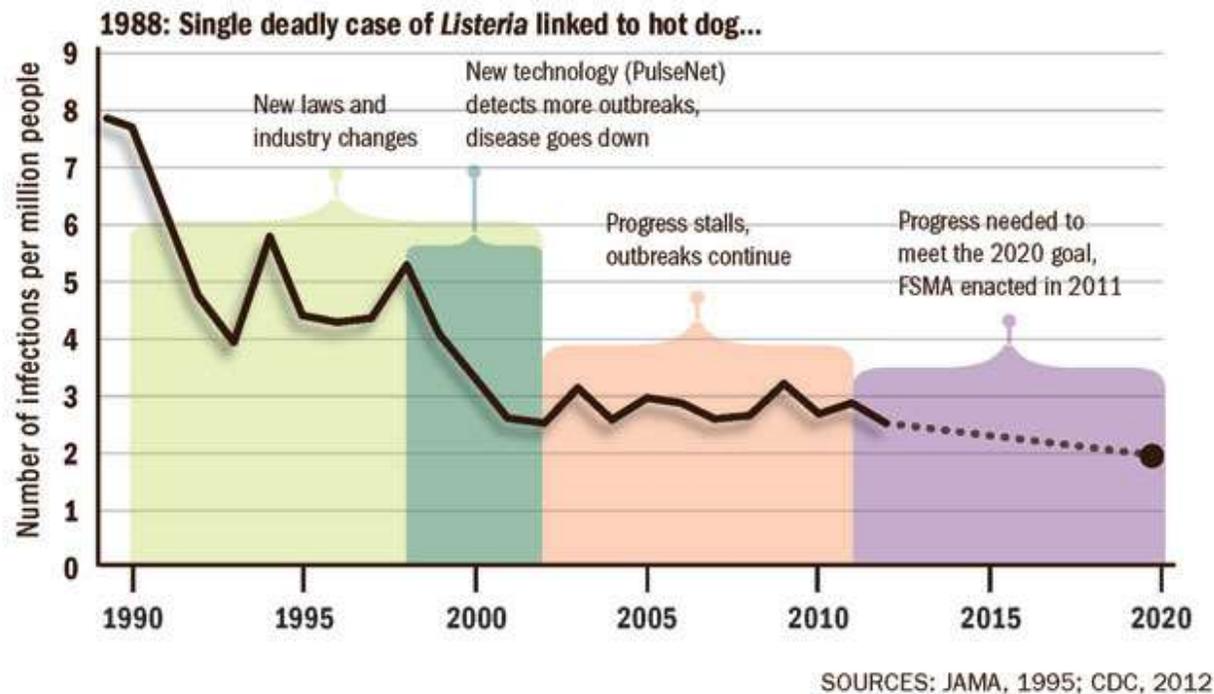
PFGEからWGSへ

Listeria Initiative, 2004～

Detecting more outbreaks points the way to prevention

Outbreaks from *Listeria* in the 1990's traced to hot dogs, and later to deli meats, led to changes that made processed meats safer and reduced the number of such outbreaks. But, *Listeria* infection rates have not gone down since 2001.

Faster detection and response saves lives and protects people



Listeria Outbreaks

Days from outbreak detection to first public warning

Soft Cheese



1985

31

Cantaloupe



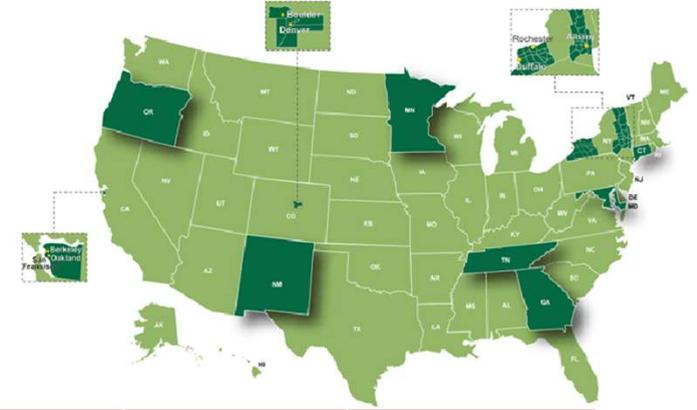
2011

7

SOURCES: New England Journal of Medicine, 1988; Morbidity and Mortality Weekly Report, 2011

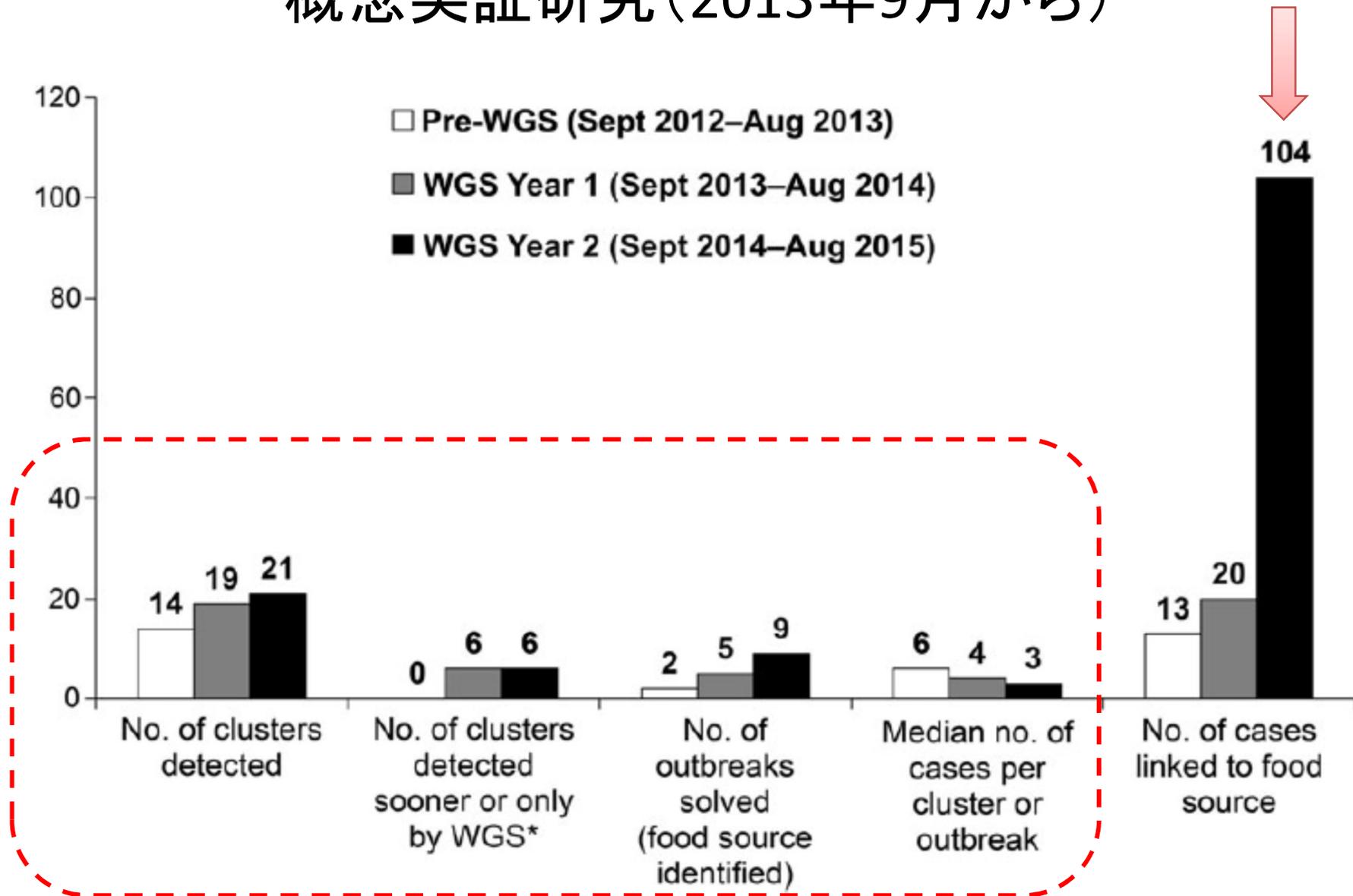
(<https://www.cdc.gov/vitalsigns/listeria/index.html>)

FoodNet (米国、2019年)



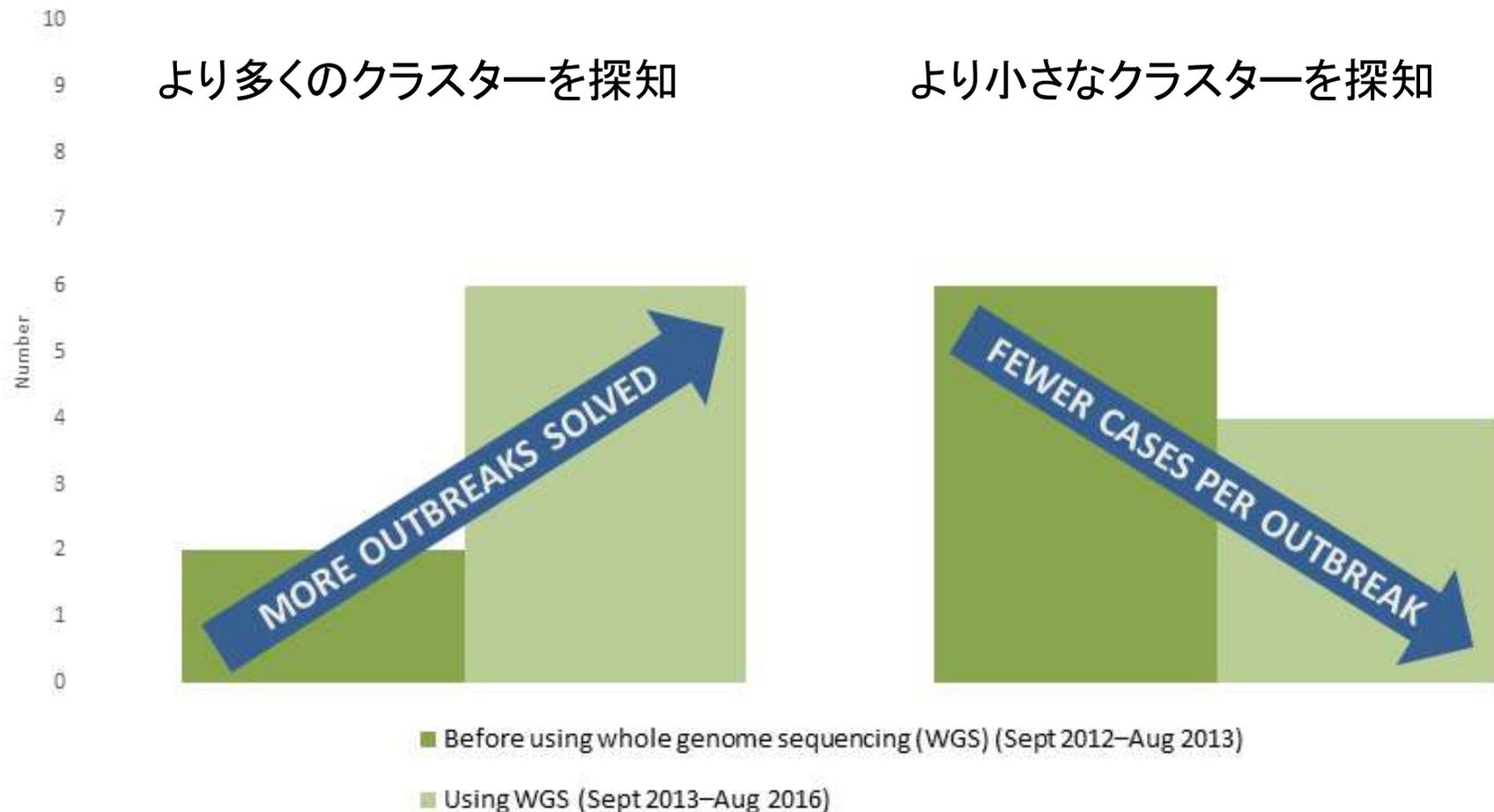
	症例	入院例	死亡例	集発関連	輸入例	対10万
<i>Campylobacter</i>	9799	2043	29	20	1570	19.61
<i>Listeria</i>	135	132	21	3	6	0.27
<i>Salmonella</i>	8596	2492	54	551	965	17.2
<i>Shigella</i>	2428	661	3	76	615	4.86
<i>STEC</i>	3144	667	10	265	634	6.29
<i>Vibrio</i>	481	137	13	24	50	0.96
<i>Yersinia</i>	681	146	4	0	37	1.36

リステリア症リアルタイムWGSサーベイランスのための 概念実証研究(2013年9月から)



リステリア症リアルタイムWGSサーベイランスのための 概念実証研究(2013年9月から)

これまで規模が大きい事例しか探知できなかったものが、



PFGEからWGSへ

2013

- *Listeria* WGS surveillance
- (GenomeTrakr by FDA)

2014

- WGS projects funded by Advanced Molecular Detection (AMD)

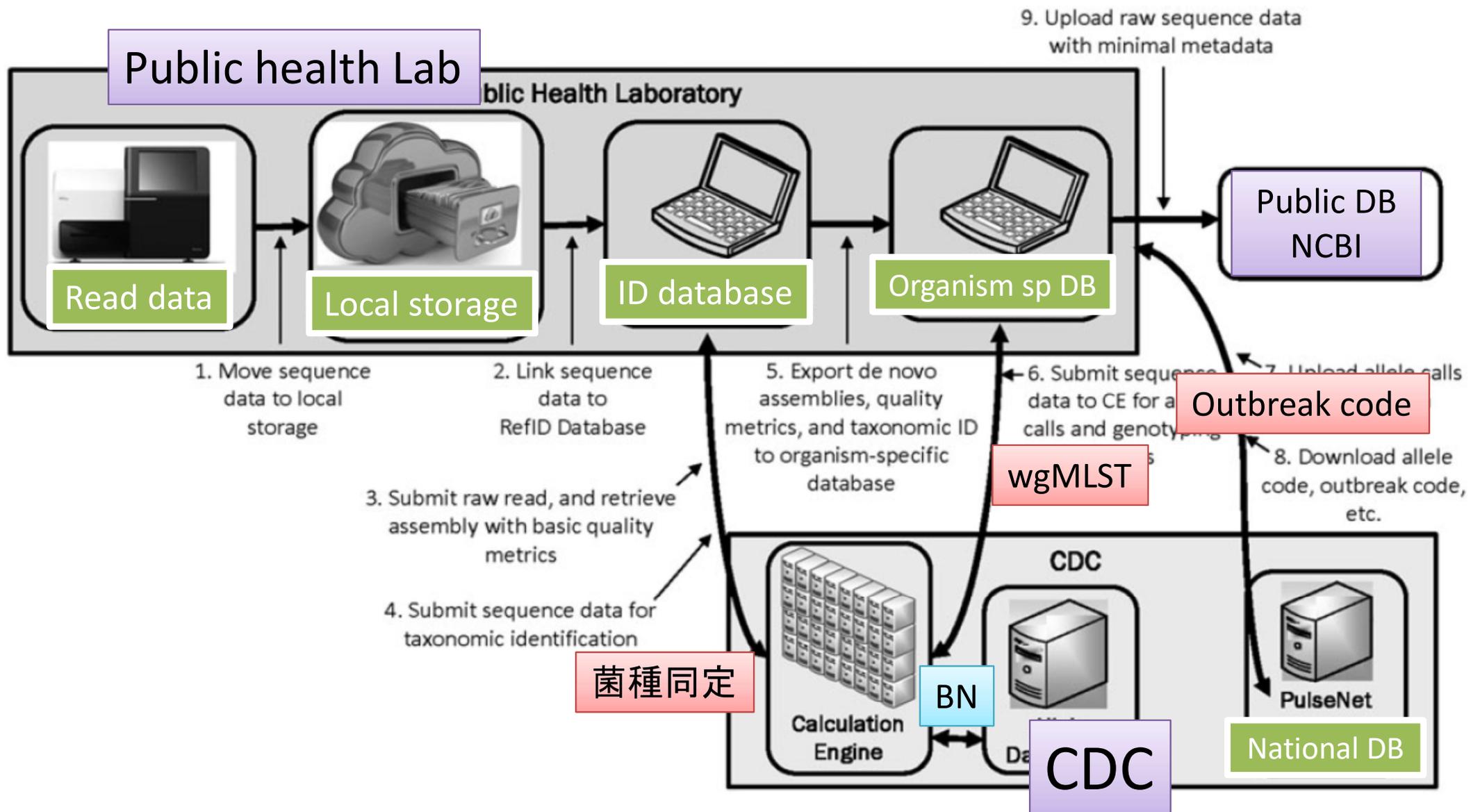
2016

- Expand the use of WGS for *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella* surveillance

2019

- WGS is the New PulseNet gold standard instead of PFGE

PulseNet USA WGS Data Analysis Workflow



(Foodborne Pathogens and Diseases, 2019)

wg/cgMLST in BioNumerics

- 2021年現在：～50菌種
- 遺伝子座数 wg/cg

<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	3529/1343
<i>Escherichia coli/Shigella</i>	17380/2513
<i>Listeria monocytogenes</i>	4804/1748
<i>Salmonella enterica</i>	15874/3002
<i>Staphylococcus aureus</i>	3904/1861

WGSによるサーベイランス、英国 サルモネラを例に

分離

同定

- 生化学性状
- 遺伝子検査 (PCR)

型別

- 血清型別
- O、H-1、H-2

型別2

- ファージ型別
- 分子疫学解析 (PFGE、MLVA)

報告

- サルモネラは届出感染症

英国の場合

- 従来法の問題点
 - 血清型別: 血清の維持
 - ファージ型別: ファージの維持
 - PFGE
- サルモネラ、大腸菌で試行研究

手技の専門性、継承
分解能
遺伝的近縁性、系統を表していない

(Frontiers in Public Health, 2019)



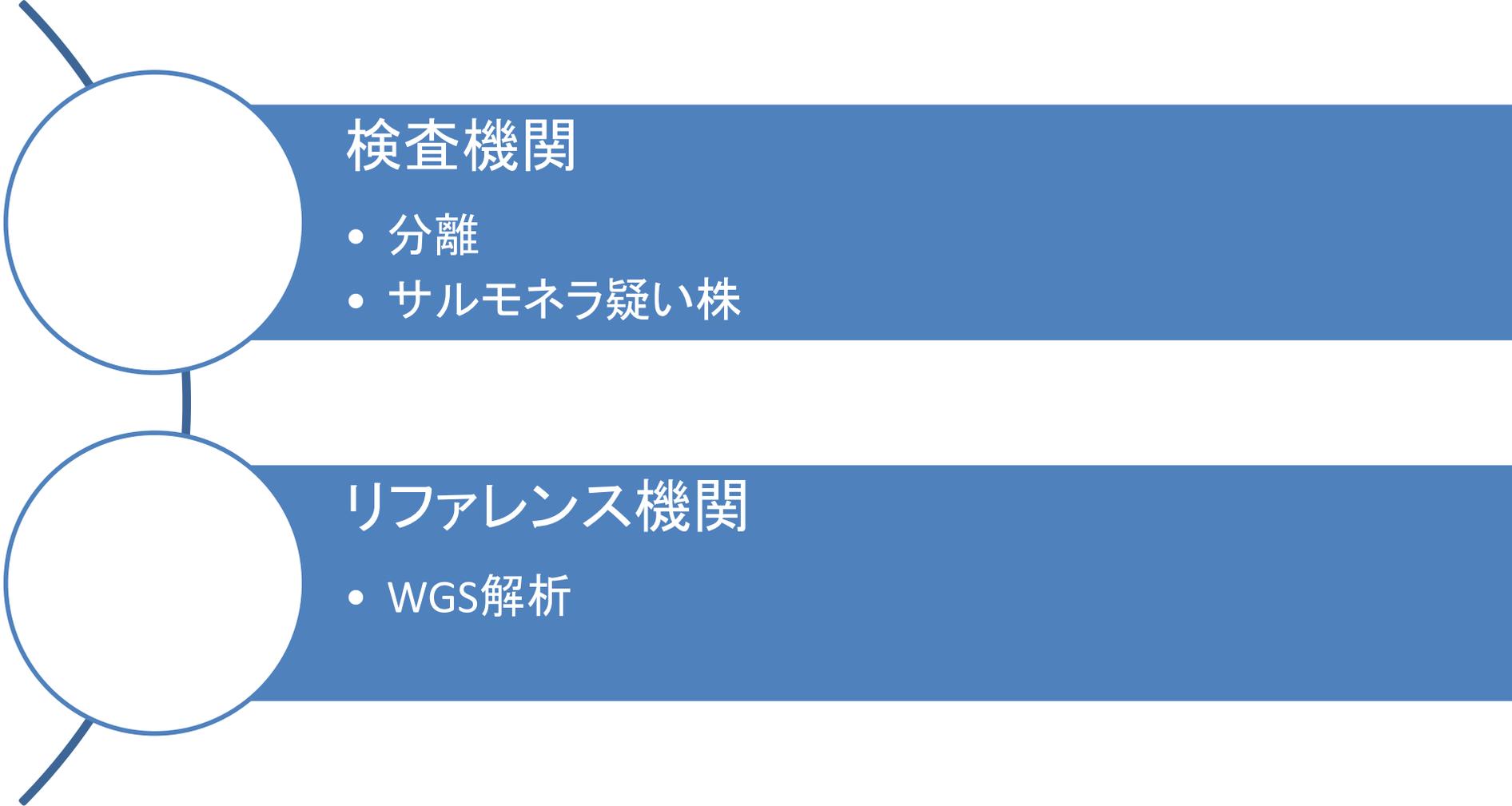
ORIGINAL RESEARCH
published: 21 November 2019
doi: 10.3389/fpubh.2019.00317



The Transformation of Reference Microbiology Methods and Surveillance for *Salmonella* With the Use of Whole Genome Sequencing in England and Wales

Marie Anne Chattaway^{1*}, Timothy J. Dallman¹, Lesley Larkin², Satheesh Nair¹, Jacquelyn McCormick², Amy Mikhail², Hassan Hartman¹, Gauri Godbole¹, David Powell¹, Martin Day¹, Robert Smith³ and Kathie Grant¹

解析の流れ



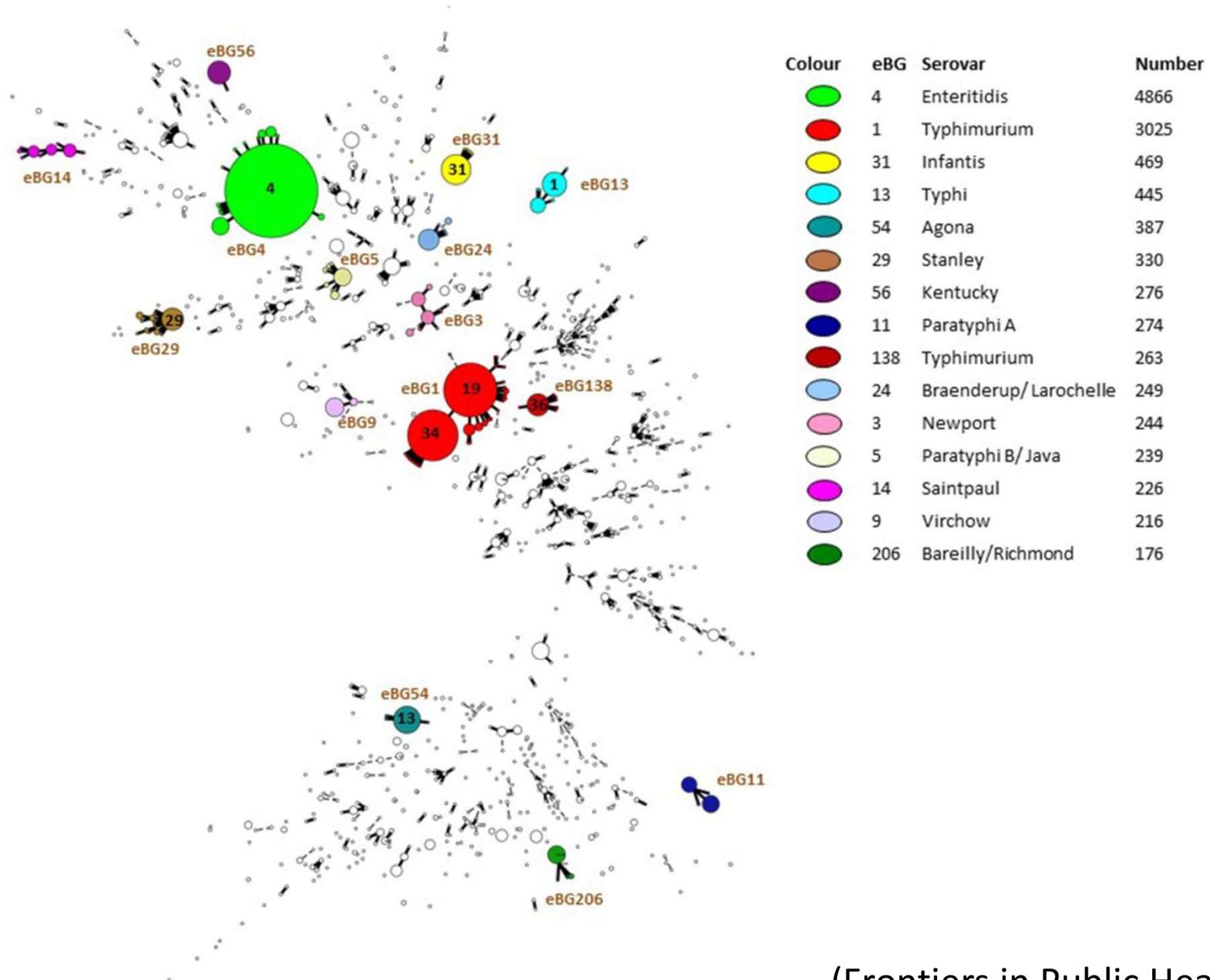
検査機関

- 分離
- サルモネラ疑い株

リファレンス機関

- WGS解析

Salmonella MLST/eBurst Group (eBG) vs 血清型



(Frontiers in Public Health, 2019)

情報とデータ

現場の検査室

サーベイランスシステム

公衆衛生局PHE

腸管系細菌リファレンスラボGBRU (Gastrointestinal Bacteria Reference Unit)

WGS: ST, eBG, serovar, SNPアドレス

データベース: Gastro Data Warehouse (GDW)

SNPアドレス(主要なeBGに対して、約86%)

“SNP Cluster Tool”(5-SNPレベルのクラスターを探知)

Turnaround time (TAT)

WGS以前



- 生化学性状5-28日
- 血清型別3-21日
- ファージ型別3-10日
- PFGE7-10日

WGS導入後



- 10日

解析データ

- PHE to NCBI
 - BioProject PRJNA248792
 - Metadata
 - 日付、国、由来(ヒト、食品など)
 - 血清型、ST
 - 45413株(2019/3/20現在)
- NCBI to Enterobase

Enterobase

<https://enterobase.warwick.ac.uk/>

The screenshot shows the Enterobase website interface. At the top, there is a navigation bar with the logo 'Enterobase' and the URL 'https://enterobase.warwick.ac.uk/'. Below the navigation bar, the main content area is titled 'Available Databases'. It displays a grid of database cards for different bacterial species. Each card includes the species name, the total number of strains, and a list of data sources and schemes. The species shown are Salmonella, Escherichia/Shigella, Streptococcus, Clostridioides, Vibrio, Yersinia, Helicobacter, and Moraxella.

Species	Strains	Assembled	Schemes
Salmonella	335342	Legacy: 4933 From NGS: 330409 In Progress: 3	Achtman 7 Gene MLST: 335335 cgMLST V2 + HierCC V1: 330678 rMLST: 330281 wgMLST: 330214
Escherichia/Shigella	201412	Legacy: 9623 From NGS: 191889 In Progress: 8	Achtman 7 Gene MLST: 201397 cgMLST V1 + HierCC V1: 192154 rMLST: 191881 wgMLST: 191818
Streptococcus	79335	From NGS: 79335 In Progress: 0	cgMLST v1: 79328
Clostridioides	23110	From NGS: 23110 In Progress: 2	cgMLST V1 + HierCC V1: 23110 Griffiths 7 Gene: 23111 rMLST: 23110 wgMLST: 23111
Vibrio	13549	From NGS: 13549 In Progress: 0	rMLST: 13550 Vibrio cgMLST + HierCC: 13549
Yersinia	5611	Legacy: 861 From NGS: 4750 In Progress: 0	Achtman 7 Gene: 5389 cgMLST V1 + HierCC V1: 4768 McNally 7 Gene: 4969 rMLST: 4751 wgMLST: 4750
Helicobacter	5442	Legacy: 1869 From NGS: 3573 In Progress: 0	rMLST: 3571
Moraxella	2781	Legacy: 416 From NGS: 2365 In Progress: 0	Achtman 7 Gene: 2782 rMLST: 2365

- *Salmonella*: 335342
- *E. coli/Shigella*: 201412
- *Streptococcus*: 79335
- *Clostridioides*: 23110
- *Vibrio*: 13549
- *Yersinia*: 5611
- *Helicobacter*: 5442
- *Moraxella*: 2781

(2022/02/17)

サーベイランス2016-2018年の評価(英国) 血清型別

- 報告数: 17899
 - eBG/ST による: 89.1 %
 - 血清による: 10.9 %
- 22.8%についてより詳細な解析
 - 新規 STs
 - 分離不十分
 - Polymorphic *Salmonella*
 - 1つのST内に複数の血清型がある場合

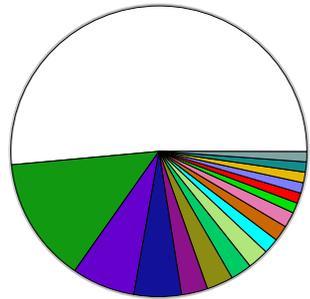
サーベイランス2016-2018年の評価(英国) クラスター解析

- 報告数:17899
- 5-SNPレベルで13948株(78%)がクラスターを形成
- 2007クラスター(46 eBGsにわたる)
 - 規模
 - 5以上:29%のみ
 - 中央値3(範囲:2-423)
 - 期間
 - 3か月以上:58%
 - 中央値6か月(範囲:0.03-115か月)
 - feeder miceに関連する事例:10年以上

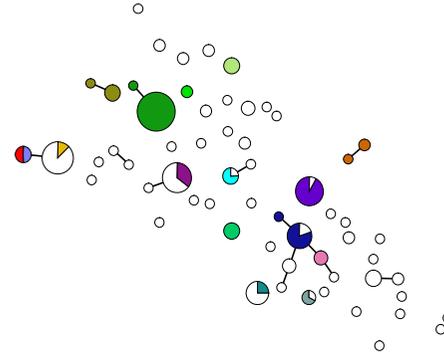
海外状況まとめ

- 2010年代前半からWGSへのシフトを検討
 - 2019年米国ではWGSに完全にシフト
- ★ 従来法(同定、血清型別、毒素型、薬剤耐性等)の置き換え
 - 中央のラボで従来検査を継続、WGSデータとの比較検証
- クラスター解析
 - 米国CDC: wgMLST/cgMLST
 - 英国: SNPアドレス
- ★ 生データ(個人情報以外)の公共データベースへの登録
 - データベース
 - NCBI、ENA
 - Enterobase
 - 国際的な流行への対応

分子疫学解析手法



機器の販売、サポート終了



コスト

リソース



血清群(型)特異的

事例対応への活用



分解能

低

中

高

データ

薄い

}}

厚い

參考資料

1. Hyytiä-Trees E, Smole SC, Fields PA, Swaminathan B, Ribot EM. Second generation subtyping: A proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathogens and Disease* 2006;3:118–31. doi: 10.1089/fpd.2006.3.118.
2. SHARAPOV UM, WENDEL AM, DAVIS JP, KEENE WE, FARRAR J, et al. Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006. *Journal of Food Protection* 2016;79:2024–30. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-556.
3. Reimer AR, Domselaar GV, Stroika S, Walker M, Kent H, et al. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:2113. doi: 10.3201/eid1711.110794.
4. Lee EC, Chao DL, Lemaitre JC, Matrajt L, Pasetto D, et al. Achieving coordinated national immunity and cholera elimination in Haiti through vaccination: a modelling study. *The Lancet Global Health* 2020;8:e1081–9. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30310-7.
5. Jackson BR, Tarr C, Strain E, Jackson KA, Conrad A, et al. Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2016;63:380. doi: 10.1093/cid/ciw242.
6. Tolar B, Joseph LA, Schroeder MN, Stroika S, Ribot EM, et al. An Overview of PulseNet USA Databases. *Foodborne Pathogens and Disease* 2019;16:457–62. doi: 10.1089/fpd.2019.2637.
7. Chattaway MA, Dallman TJ, Larkin L, Nair S, McCormick J, et al. The Transformation of Reference Microbiology Methods and Surveillance for *Salmonella* With the Use of Whole Genome Sequencing in England and Wales. *Front. Public Health* 2019;7. doi: 10.3389/fpubh.2019.00317.

参考資料2

CDCサイト

- <https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html>
- <https://www.cdc.gov/foodnet/foodnet-fast.html>
- <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>
- <https://www.cdc.gov/vitalsigns/listeria/index.html>
- <https://www.cdc.gov/listeria/surveillance/whole-genome-sequencing.html>