

衛生微生物技術協議会・第40回研究会

リファレンスセンター会議

カンピロバクター

議 事

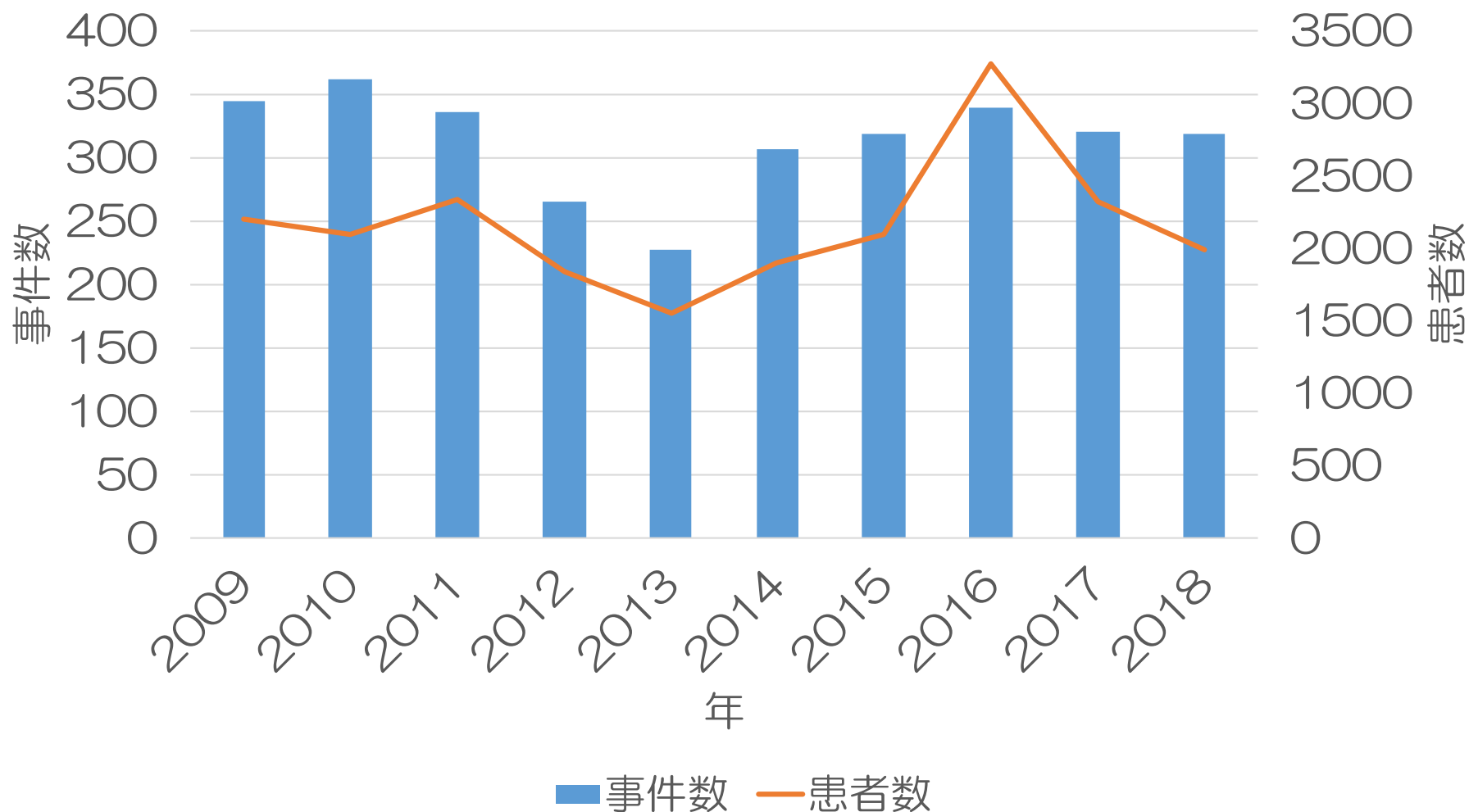
- 食中毒発生状況及び関連情報の紹介
- 前年度の検討内容報告
- リファレンスセンターからの報告（紹介）
 - 食中毒事例（秋田県）
 - 選択分離培地の検討（愛知県）
 - 定量試験法等の紹介（東京都）
- 本年度の検討計画（案）

令和元年度 カンピロバクター・リファレンス名簿

担当	担当者	所属（機関、部署）	
代表世話人	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
副世話人	山本 章治	国立感染症研究所	細菌第一部
北海道・東北	今野 貴之	秋田県健康環境センター	保健衛生部
関東・甲信越	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター	微生物部
東海・北陸	山田 和弘	愛知県衛生研究所	生物学部
近畿	坂田 淳子	大阪健康安全基盤研究所	微生物部
中国・四国	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター	保健科学部
九州・沖縄	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部

カンピロバクター食中毒の発生動向

- 平成30年（2018年）の発生状況：事件数 319件（全体の24.0%）
患者数 1,995名（全体の11.5%）
- 近年は下げ止まりの傾向が続いている。

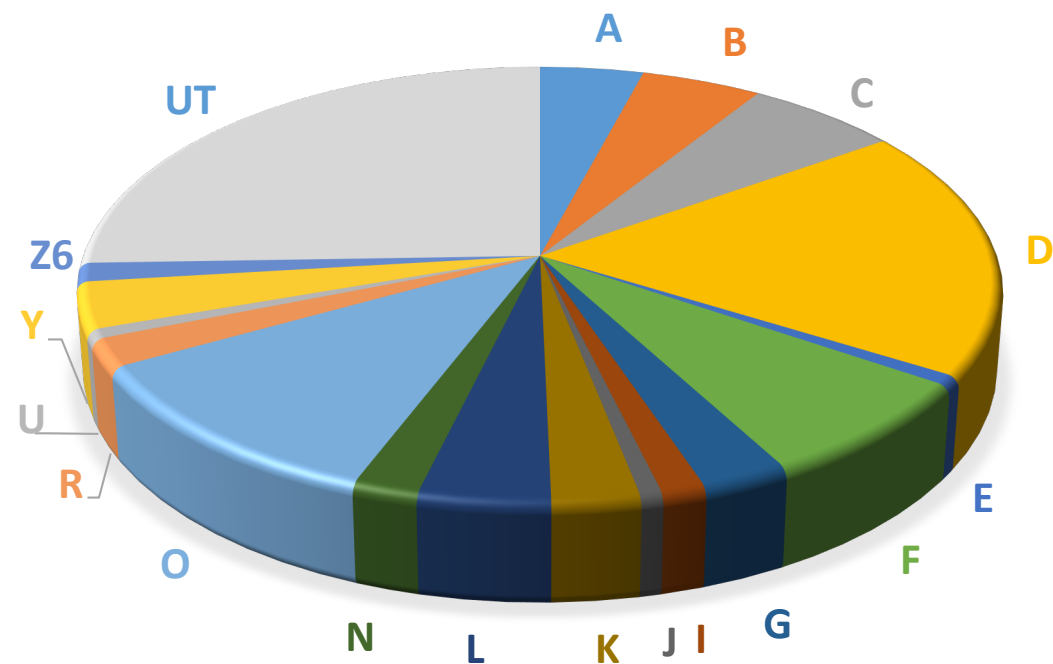


平成30年度の活動報告

① Penner血清型別

➤平成30年度 *C. jejuni* 散発事例由来株を中心に検討

型	菌株数	割合(%)
A	6	4.1
B	7	4.8
C	9	6.2
D	27	18.6
E	1	0.7
F	11	7.6
G	4	2.8
I	2	1.4
J	1	0.7
K	4	2.8
L	6	4.1
N	3	2.1
O	16	11.0
R	3	2.1
U	1	0.7
Y	5	3.4
Z6	2	1.4
UT	37	25.5



② 薬剤感受性試験

➤ **CPFX、TC、EM**を対象として、**EUCAST法**に基づき試行的に実施。

薬剤	ディスク濃度 (μg)	MICブレイク ポイント (mg/L)		阻止円直径 ブレイクポイント (mm)	
		S \leq	R $>$	S \geq	R $<$
CPFX	5	0.5	0.5	26	26
EM, <i>C. jejuni</i>	15	4	4	20	20
EM, <i>C. coli</i>	15	8	8	24	24
TC	30	2	2	30	30

- ISO 20776-1に基づくMIC判定基準/方法を採用
- 培地：MH broth + 5% 馬脱線血 + 20 mg/L β -NAD
- 培養条件：微好気， $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，48時間
- 接種菌数: 5×10^5 CFU/mL

EUCAST法に関する主な意見

項目	利点	欠点
接種菌の調整	菌数を明確に調整可能	一定の習熟が必要
培養・MIC判定	一部の菌株では良好な発育/ 明瞭な阻止円を認めた	定義される培地の市販品 がなく、自家調整が必要 (労力・費用面)
その他	TC判定はCLSIと一部で差異が認められた (利点・欠点の別は不明)	

- 6センターの全体成績(EUCAST法)

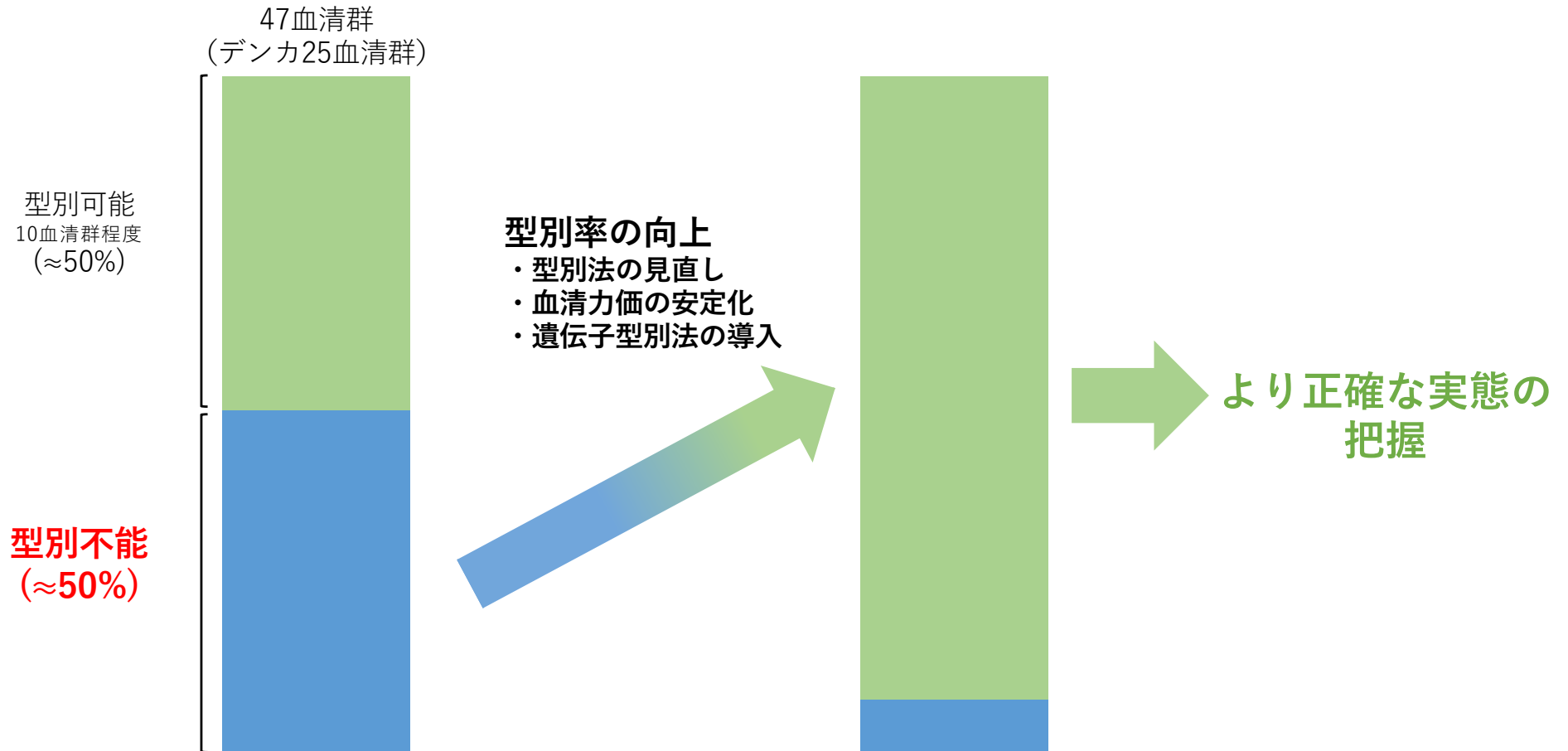
EM	TC	CPFX	菌株数	割合(%)
S	S	S	62	41.1
S	S	R	45	29.8
S	R	R	28	18.5
R	R	R	5	3.3
R	S	R	0	0
S	R	S	11	7.3

- うち3センターの成績 (EUCAST法/CLSI法の平行試験)

EM	TC	CPFX	CLSI	EUCAST
S	S	S	16	15
S	S	R	16	12
S	R	R	8	12
R	R	R	2	3
R	S	R	1	0
S	R	S	0	1

→不一致はTC判定で見られ易い？

Penner血清型別法の問題点と改善案

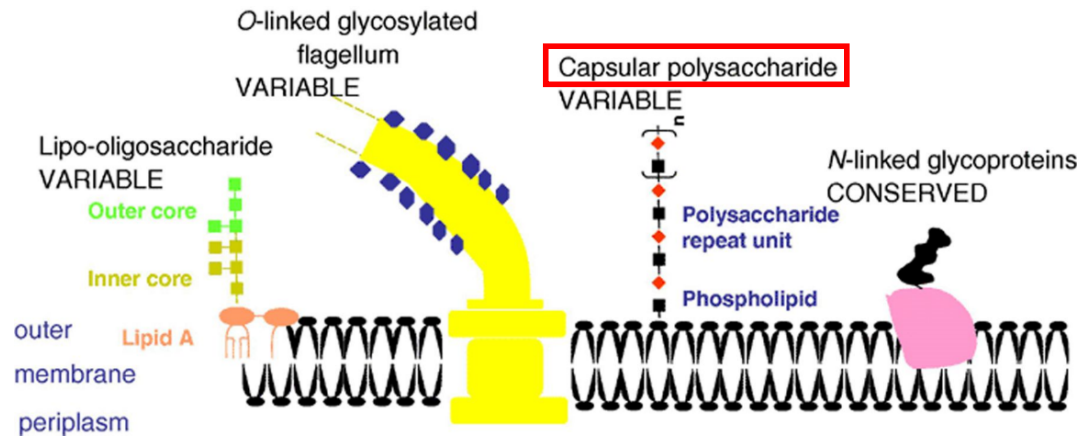


Penner血清型の遺伝子型別法の検討

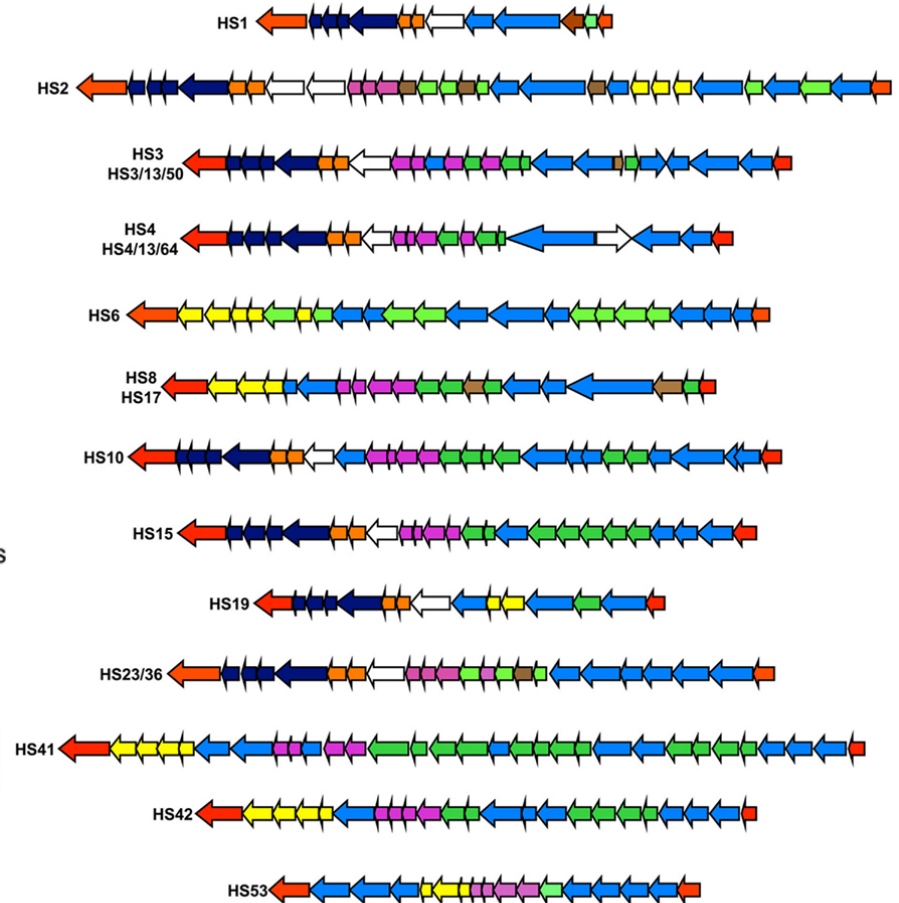
カンピロバクターの莢膜多糖 (CPS) = Penner血清型の決定因子



CPS合成遺伝子クラスターの多様性を基にした遺伝子型別法の導入



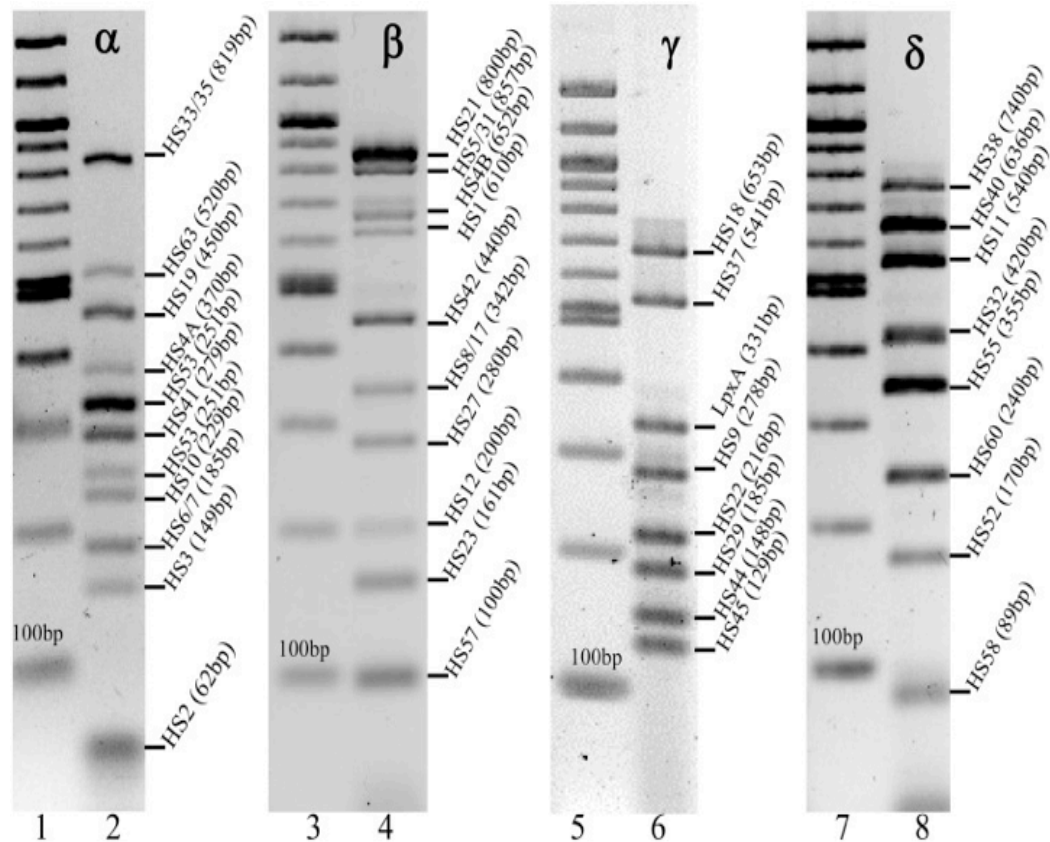
FEMS Microbiology Reviews, Volume 29, Issue 2, 01 April 2005, Pages 377-390



Front. Cell. Infect. Microbiol., 15 February 2012

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

マルチプレックスPCRによる遺伝子型別法：各血清群のCPS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)

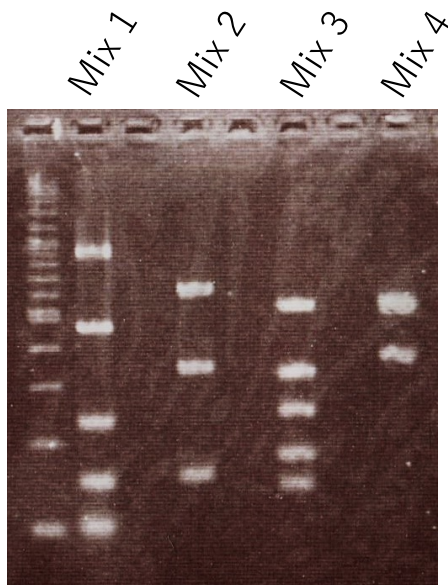
1. 長所

- ・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、誤判定の可能性が有る。

秋田式簡便法：市販血清型別試薬でカバーされる25血清群を型別可能



Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
<u>E/U (HS5/31): 857 bp</u>	<u>A (HS1): 607 bp</u>	Z (HS38): 741 bp	P (HS21): 801 bp
N (HS18): 653 bp	<u>G (HS8/17): 342 bp</u>	<u>Y (HS37): 541 bp</u>	D (HS4B): 652 bp
<u>O (HS19): 450 bp</u>	S (HS27): 280 bp	V (HS32): 420 bp	<u>J (HS11): 540 bp</u>
Z6 (HS55): 341 bp	K (HS12): 201 bp	<u>L(HS15), U(HS31), HS58: 325 bp</u>	<u>D (HS4A): 370 bp</u>
<u>I (HS10): 229 bp</u>	<u>R (HS23/36): 161 bp</u>	<u>R (HS53): 251 bp</u>	Z2 (HS41): 279 bp
<u>C (HS3): 149 bp</u>	Z7 (HS57): 100 bp	<u>F (HS6/7): 185 bp</u>	Z5 (HS52): 170 bp
<u>B (HS2): 102 bp</u>		<u>A (HS44): 148 bp</u>	E (HS5), V (HS32), Z4 (HS45), HS60: 128 bp

下線部：含まれる陽性コントロール（15種類）

太字：検出対象の血清型（14種類）

Mix 3のL(HS15), U(HS31)およびHS58は血清学的に関連性がないにもかかわらず同一プライマーで検出されます。今年度はカウントしないで下さい。

③ Penner-PCR型別法の検討

➤ Penner血清型別との整合性を詳細に検討するため、

- 1) 既に血清型別された菌株を対象に、遺伝子型別を実施。
- 2) 陽性コントロール用の標準株を整備（本年度活動用に調整を終えたところ）。

地衛研	検定株数	一致株数	不一致株数	一致率 (%)
A	30	30	0	100
B	35	32	3	91
C	27	24	3	89
D	12	12	0	100
E	30	30	0	100
F	8	8	0	100
全体	142	136	6	96

Penner-PCR型別法の検討～血清型別の一一致率（平成30年度）

血清群	検定菌株数	一致菌株数	不一致菌株数	一致率（%）
A群	7	6	1	86
B群	13	13	0	100
C群	14	14	0	100
D群	30	28	2	93
E群	1	1	0	100
F群	12	11	1	92
G群	5	5	0	100
I群	4	2	2	50
J群	2	2	0	100
K群	6	6	0	100
L群	4	4	0	100
N群	4	4	0	100
O群	22	22	0	100
P群	2	2	0	100
R群	6	6	0	100
U群	1	1	0	100
Y群	7	7	0	100
Z6群	2	2	0	100
全体	142	136	6	96

今後の計画（案）

1. Pennerの25血清群全てを対象にした試験を実施する。
2. 判定し難いバンドをピックアップし、プライマーを改良する。
3. その他の問題点も共有し、可能な限り改善する。
4. 秋田式手法をベースに、リファレンス用のプロトコールを作成する。

本年度の全体計画(案)

- 薬剤耐性試験：*C. jejuni*散発事例由来株等
- Penner血清型別試験：同上
- Penner-PCR試験：陽性対照を用いた検討
- 検査法の平準化に関する検討(アンケート含)