

細菌ゲノム シーケンスによる 医療関連感染症 サーベイランスの 強化

イルミナシーケンスと
SRST2 BaseSpace™ アプリを
使用した病原性分離株の包括的な
同定

illumina®

はじめに

医療関連感染 (HAI) は、特に重症の患者および免疫不全患者において医療上の重要な懸念事項です。HAIは患者の健康と生命を脅かすだけでなく、直接的な経済的損失や入院の長期化など、追加の経済的負担を患者と医療システムにもたらします。^{1,2} 医療施設環境における病原性細菌株のサーベイランスは、HAIの影響を防ぐのに役立ちます。qPCRや質量分析法などの検査方法により迅速に病原体を同定でき、タイムリーな治療決定が可能になります。しかし、これらの方法は、感染拡大の追跡や伝播調査の実施には不十分です。

次世代シーケンサー (NGS) は細菌ゲノムの完全な特性評価を行うことができ、サブタイピング、分離株間の識別、クラスター内の特性の分離株の強調表示、薬剤耐性 (AMR) および病原性マーカーに対する情報を提供します。³ シーケンスデータを迅速に解析し解釈することは、感染制御担当者が感染拡大の可能性に迅速に対応し、感染源を追跡することでさらなる伝播と感染を防ぐことに役立ちます。2日間で完了できる包括的な全ゲノムシーケンス (WGS) ワークフローに従って、HAIの原因となる病原体の拡散を効率的に監視し、適切に管理できます。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌株よりも罹患率と死亡率が高い多剤耐性病原体です。院内感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (HA-MRSA) 株によって引き起こされる感染症は、院内感染型メチシリン感受性黄色ブドウ球菌株によって引き起こされる感染症よりも長い入院期間を必要とし、通常、非β-ラクタム系抗生物質およびβ-ラクタム系抗生物質に対して耐性があります。

イルミナは、HA-MRSAまたは他の細菌種の分離株を特徴付けるために、イルミナのライブラリー調製とシーケンスを含む包括的なWGSソリューションの一部としてSRST2^{*} アプリを提供しています (図1)。BaseSpace Sequence Hubで利用できるSRST2アプリは、150を超える細菌の属および種にわたるサンプル間を比較して、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) データベース⁴からのシーケンスタイプ (ST) の存在、および毒素遺伝子、耐性遺伝子、プラスミドレプリコンの配列データベースからのリファレンス遺伝子を報告します。SRST2アプリが更新され、ResFinderに加えてComprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) とARG-Annotデータベースが追加されました。

このアプリケーションノートでは、病原性分離株を同定して特徴付けるために更新されたSRST2アプリの機能を実証し、NGSの経験がなくてもラボからHAIサーベイランスにアクセスできるようにします。

* ショートリードのシーケンスタイピング



図1: HAIサーベイランスワークフロー: SRST2 BaseSpace アプリは、イルミナのライブラリー調製とシーケンスを含む、HAIサーベイランスのための包括的なNGSワークフローの一部です。

メソッド

サンプル

この研究のための黄色ブドウ球菌分離株（胸水から1株、股関節滑液から1株、骨から1株、不特定の体液から1株、血液から23株）は、ミネソタ州保健省（MDH）による通常のサーベイランスの一環として2016年に（ミネソタ州ヘネピン郡とラムジー郡の複数の臨床施設から）収集されました。⁵

サンプル調製

分離株をMDHから凍結保存サンプルとして取得し、標準血液寒天培地プレートに画線塗布し、37℃でインキュベートして単一コロニーを得て、これをトリプチケースソイ寒天培地に植菌し、37℃で一晩増殖させました。ゲノムDNAは、ALバッファーにリソスタフィンを追加したQIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN、カタログ番号：51304）を使用して分離しました。DNAの濃度と品質は、NanoDrop 2000分光光度計とQubit Flex蛍光光度計（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：Q33327）を使用して測定しました。

ライブラリー調製とシーケンス

シーケンスライブラリーはNextera™ XT DNA Library Preparation Kit, 24 samples（イルミナ、カタログ番号：FC-131-1024）を用いて調製し、Nextera XT Index Kit v2 Set A（イルミナ、カタログ番号：FC-131-2001）を使用してマルチプレックス化しました。WGSは300 bp × 2のペアエンドランを使ってIllumina MiSeq™システムで実施しました。

データ解析

シーケンスファイルは、BaseSpace Sequence HubのSRST2アプリで解析しました。

結果

SRST2アプリは、複数のデータベースに基づいて、分離株を2つの異なるクラスターにグループ分けできることを示しました（図2）。いくつかのMLSTアリルから、これら2つの主要なクラスターが識別され、これらのクラスターは密接に関連した分離株のより小さなクラスターに細分化されます（図3）。SRST2アプリはCARDを使用して、*ErmA*のようなさまざまな耐性遺伝子を検出します。この遺伝子は、米国で最も多く処方されている経口抗生物質の1つであるマクロライド系抗生物質に対する耐性と関連しています（図4）。⁶

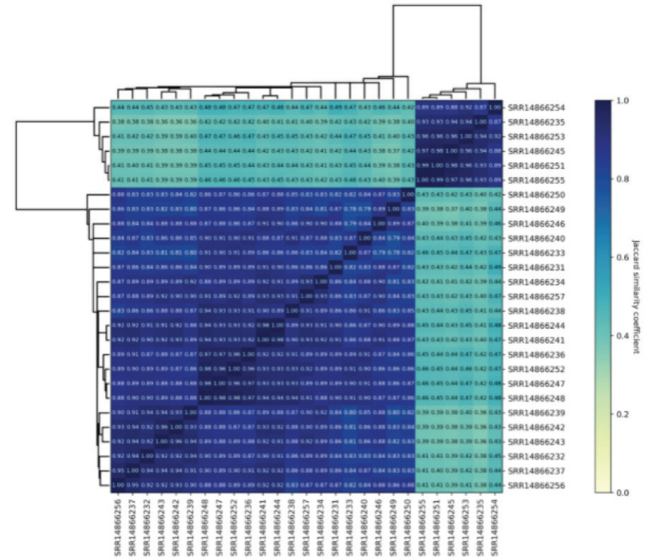


図2：SRST2アプリを使用した分離株のクラスタリング：WGSデータ解析により、複数のデータベースにわたって検出されたアリルに基づいて、類似した分離株（濃い青色）がクラスター化されます。

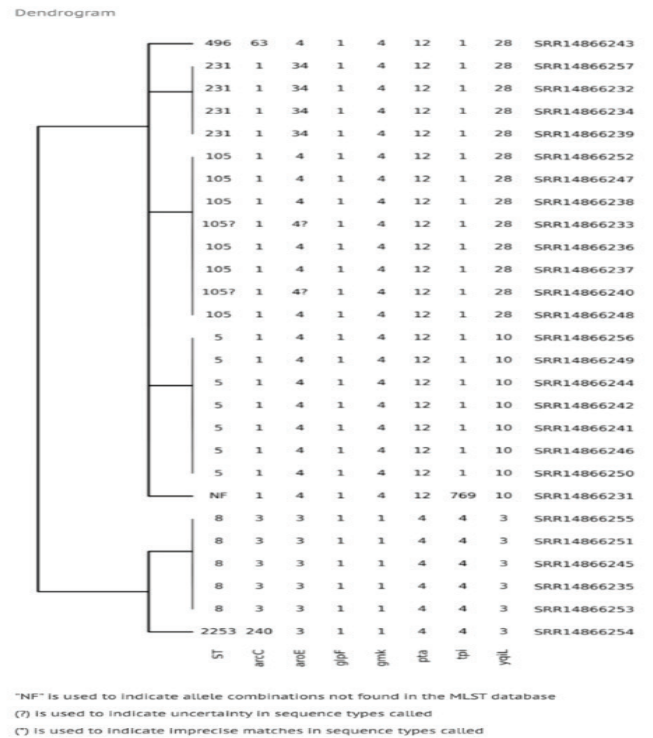


図3：WGSから計算されたMLSTアリルプロファイル：SRST2アプリは共有のアリル数に基づいて分離株をクラスター化します。

Resistance Gene Database - CARD

Show 25 entries

Search

Sample	ANT4_Agly	APH3_Agly	Erm_MLS	FosB_Fcyn	MphC_MLS	MsrA_MLS	NoirA_Fig
SRR14866231	-	+	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866232	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866233	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866234	ant4-ib_128*	+	ermA_2135*	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866235	-	aph3-IIIa_153	ermC_v1_2138*	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866236	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866237	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866238	ant4-ib_128*	aph3-IIIa_153	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866239	ant4-ib_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866240	ant4-ib_128*	aph3-IIIa_153	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866241	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866242	ant4-ib_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866243	ant4-ib_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866244	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866245	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866246	ant4-ib_128*	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866247	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866248	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866249	-	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	+	noirA_1920*
SRR14866250	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866251	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866252	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866253	-	aph3-IIIa_153	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*
SRR14866254	-	-	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906	-	+	noirA_1920*
SRR14866255	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noirA_1920*

図4：耐性遺伝子レポート：SRST2アプリには、CARDのどのアレルが各分離株で検出されたかを示すインタラクティブな表が含まれます。

まとめ

HAIは医療における重大な懸念事項であり、患者の罹患率および死亡率の高さや医療コストの増加の原因になっています。SRST2アプリによるデータ解析を特徴とするNGSワークフローを使用することで、毒素遺伝子、AMR遺伝子、血清型決定因子など、臨床的に関連する表現型につながる遺伝子の存在を検出できます。迅速なイルミナのライブラリー調製とMiSeqシステムを用いることで、細菌ゲノムを2日以内に完全にシーケンスして解析することができ、タイムリーなHAIサーベイランスが実現します。

詳細はこちら

[SRST2 BaseSpaceアプリ](#)

参考文献

- Henderson A, Nimmo GR. Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges. *Br Med Bull.* 2018;125(1):25-41. doi:10.1093/bmb/ldx046.
- Jia H, Li L, Li W, et al. Impact of Healthcare-Associated Infections on Length of Stay: A Study in 68 Hospitals in China. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2590563. Published 2019 Apr 18. doi:10.1155/2019/2590563.
- Mirande C, Bizine I, Giannetti A, Picot N, van Belkum A. Epidemiological aspects of healthcare-associated infections and microbial genomics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(5):823-831. doi:10.1007/s10096-017-3170-x.
- Huang W, Wang G, Yin C, et al. Optimizing a Whole-Genome Sequencing Data Processing Pipeline for Precision Surveillance of Health Care-Associated Infections. *Microorganisms.* 2019;7(10):388. Published 2019 Sep 24. doi:10.3390/microorganisms7100388.
- Khan SA, Gudeta DD, Aljahdali N, et al. Draft Genome Sequences of 27 Hospital-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Minnesota. *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(2):e0118621. doi:10.1128/mra.01186-21.
- Centers for Disease Control and Prevention. Outpatient antibiotic prescriptions — United States, 2021. [cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html](https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html). Updated October 4, 2022. Accessed January 25, 2023.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。