



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Development of a rapid diagnostic method for identification of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial resistance in positive blood culture bottles using a PCR-DNA-chromatography method

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2016-07-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大城, 健哉 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/54569">http://hdl.handle.net/20.500.12099/54569</a>

氏名（本籍）	大 城 健 哉（沖縄県）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 1025 号
学位授与日付	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Development of a rapid diagnostic method for identification of <i>Staphylococcus aureus</i> and antimicrobial resistance in positive blood culture bottles using a PCR-DNA-chromatography method
審査委員	(主査) 教授 小 倉 真 治 (副査) 教授 藤 崎 和 彦 教授 飯 田 宏 樹

### 論文内容の要旨

血液培養検査は感染症診療に必要な不可欠な検査であり、陽性検出時の検出菌情報は患者予後に影響するため、迅速報告が求められる。血液培養でグラム陽性ブドウ球菌が観察された場合、その菌が *Staphylococcus aureus* か否か、*mecA* や *blaZ* などの耐性遺伝子を保有しているか否かを迅速に知ることは抗菌薬選択に有用である。近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) を用いた分離菌株の同定が可能となり、コロニーから数分、血液培養陽性ボトルからでも 30 分以内に菌名の報告が可能となった。しかし抗菌薬感受性情報を同時に得る方法はまだ実用化されていない。菌名や抗菌薬感受性情報を迅速に得る方法として PCR 法は有用であるが、我が国の市中病院ではコストの問題や煩雑さから、PCR 法はほとんど診療に実施されていないのが現状である。これらの問題を解決する方法として我々は、血液培養が陽性となったボトルから培養液 10 ml 採取し、1 時間以内に *S. aureus* の *ftsY*, *mecA* および *blaZ* の遺伝子の有無を PCR-DNA-Chromatography 法（以下、PDC 法）を使って簡便に判定する遺伝子検査法を開発した。

#### 【材料および方法】

国内外から収集し、遺伝子型別が確定した MRSA 71 株、および *Staphylococcus* 属の基準株 30 株を用いた。*S. aureus* の同定にはこの菌種に共通に存在する細胞壁合成に関与する *ftsY* 遺伝子を選択した。耐性遺伝子は *S. aureus* 感染症の治療上、重要な耐性遺伝子として *mecA* および *blaZ* を選択し、特異性を調べた。PDC 法に使用するカクテルプライマーは下流の 5 末端にタグを付け、増幅した PCR 産物をストリップ上にプリントしたアンチタグでトラップし検出する方法を作成した。上流側のプライマーの 5 末端には biotin を標識し、クロマト展開時に streptavidin 標識ラテックスを結合させた。カクテル増幅産物を識別するため、一枚のストリップ上には 3 本の赤の位置情報ラインをプリントし、*ftsY*, *mecA*, *blaZ* および内部コントロールのカクテル増幅産物の青色ラインの識別を位置情報と比較して肉眼で確認できるようにした。

血液培養陽性ボトルからの集菌は遠心洗浄法で行った。血液培養陽性ボトルから 10 ml の培養液を採取し、低速遠心で血球を沈殿させた後、上澄みをマイクロチューブに分注し、高速遠心で菌を沈殿させ、上澄みの液体培地を除去したのち、上澄みが透明になるまで蒸留水で 2-3 回洗浄し、沈殿した菌を蒸留水に懸濁し、菌体を煮沸処理で破壊して DNA を抽出した。PCR は 10  $\mu$ l の反応液で増幅できる QuickBath thermal cycler (ThermoGen 社, 長野) を使用し、26 分で増幅が終了するプロトコールに設定した。PCR 増幅終了後、10  $\mu$ l の streptavidin 標識ラテックスとアンチタグがプリントされたストリップを PCR チューブに差し込み、5-10 分後に青色のラインの出現の有無を判定した。遠心洗浄法から PDC 法による結果判定まで、これら一連の工程は 1 時間以内に完了した。

PDC 法による *S. aureus* の同定，耐性遺伝子 *mecA* および *blaZ* の検出は血液培養陽性ボトル 42 件 (*S. aureus* 33 件，coagulase-negative staphylococci 9 件) を用いて評価した。

#### 【結果および考察】

4 本のカクテル増幅産物 *ftsY*，*mecA*，*blaZ* および内部コントロールラインは赤の位置情報を基にすべて肉眼で特異的に観察できた。遺伝子型別された MRSA 71 株もすべて *ftsY* 遺伝子および *mecA* で増幅が確認された。一方，*Staphylococcus* 属の基準株 30 株は *S. aureus* の基準株以外はすべて *ftsY* には反応しなかった。PDC 法に用いたカクテルプライマーは，遺伝子型別標準株すべてで *ftsY* および *mecA* が反応し完全に一致した。

血液培養陽性ボトル 42 件での評価は，培養法で *S. aureus* と同定された 33 件中 32 件 (97.0%) が PDC 法でも *S. aureus* と同定された。陰性であった 1 件は再検査で陽性となったことや，基準株を用いた特異性の確認は完全に一致したことから，検体前処理時の PCR 阻害因子の混入が考えられた。培養法にて *S. aureus* と同定された 33 件のうち，培養法で MRSA とした 12 件は全て *mecA* 陽性となった。MSSA であった 21 件中 1 件で PDC 法にて *mecA* が検出されたが，再検査で *mecA* の保有が確認されたため，遺伝子発現がない株と推測された。

培養法で MSSA とした 21 件について，12 件は  $\beta$  ラクタマーゼ確認試験陽性かつ *blaZ* 陽性であった。 $\beta$  ラクタマーゼ確認試験陰性とした 9 件中 1 件が PDC 法にて *blaZ* となった。再検査で *blaZ* の保有が確認されたため，遺伝子発現がない株と推測した。*blaZ* 陽性の 13 件中 2 件はセフィナーゼディスク陰性で Penicillin disc zone edge test が陽性となったことから， $\beta$  ラクタマーゼ確認試験は Penicillin disc zone edge test にて行った方がよいと結論した。

培養法と PDC 法との結果の乖離は全て PDC 法が耐性化をより検出しやすい傾向にあった。培養法では単独コロニーを用いて抗菌薬感受性検査を実施することが多く，耐性菌を見落としている可能性がある。PDC 法では血液培養陽性時のボトル液 10 ml を材料とするため，広く耐性菌を検出できたと考えられた。

血液培養陽性ボトル 42 件での評価は，PDC 法による *S. aureus* の同定は感度 97.0%，特異度 100%，*mecA* の検出は感度 100%，特異度 95.2%，*blaZ* の検出は感度 100%，特異度 88.9%となった。

#### 【結論】

血液培養からグラム陽性ブドウ球菌が検出された場合，簡単な前処理と安価な conventional PCR と DNA-Chromatograph 法で *S. aureus* の同定と耐性遺伝子である *mecA* および *blaZ* の有無を 1 時間以内に判定する PDC 法を開発した。本法は迅速性や簡便性に優れており，市中病院など限られた検査環境においても迅速診断ができるので有用である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 大城 健哉は，血液培養の結果を迅速に報告するために，自動血液培養装置が菌の増殖を検出してから 1 時間以内に黄色ブドウ球菌とその主要な薬剤感受性を報告する手法を確立した。この研究成果は感染症医療の迅速化に重要な貢献をしたものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Takeya Ohshiro, Chihiro Miyagi, Yoshikazu Tamaki, Takuya Mizuno, Takayuki Ezaki : Development of a rapid diagnostic method for identification of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial resistance in positive blood culture bottles using a PCR-DNA-chromatography method

Journal of Infection and Chemotherapy (in press).