

BD マックス™ 全自動核酸増幅検査システムを用いた バンコマイシン耐性遺伝子検出

坂梨大輔¹⁾・山岸由佳^{1,2)}・宮崎成美¹⁾・鈴木隆佳¹⁾・大野智子¹⁾・
山田敦子¹⁾・小坂 功¹⁾・宮島節雄¹⁾・末松寛之¹⁾・三嶋廣繁^{1,2)}

¹⁾ 愛知医科大学病院感染制御部

²⁾ 愛知医科大学病院感染症科

(2014年7月25日受付)

BD マックス™ 全自動核酸増幅検査システムを用いたバンコマイシン耐性遺伝子 (*van* 遺伝子) の全自動検出について検討した。同時再現性の検討においては、各 *van* 遺伝子の real-time PCR における Ct 値の変動係数: CV (%) は *vanA* 2.09%, *vanB* 1.72%, *vanC1* 1.41%, *vanC2/C3* 1.52% と良好な結果が得られた。腸球菌 43 株 (*vanA* 保有菌 4 株, *vanB* 保有菌 14 株, *vanB* および *vanC1* 同時保有菌 1 株, *vanC1* 保有菌 6 株, *vanC2/C3* 保有菌 4 株, 全 *van* 遺伝子陰性菌 14 株) を用いた従来の conventional PCR 法との比較においては、一致率 100% の結果を得た。本システムは従来法でマニュアル操作が必要であった DNA の抽出, template DNA の分注などの PCR 前検体処理, ゲル電気泳動やエチジウムブロマイド染色などの Amplicon 検出操作がすべて自動化され, 業務負担およびコンタミネーションのリスクが大幅に軽減されたうえ測定時間も約半分に短縮されており, 検査の迅速化, 省力化に大きく貢献できるものと考えられた。

バンコマイシン耐性腸球菌 {vancomycin (VCM)-resistant enterococci: VRE} は院内感染対策上重要な菌である。1999年に感染症法上の全数把握疾患となって以降, 届出数は増加傾向にあり¹⁾, 医療の地域連携が盛んになってきている昨今では施設内のみならず医療・介護施設間の伝播も問題となっている^{2,3)}。このような背景から, 当院では2008年4月から従来の細菌同定・薬剤感受性試験に加え, VCMの最小発育阻止濃度 (MIC; minimum inhibitory concentration) 値が4 µg/mL以上を示した腸球菌について conventional PCR を用いた *van* 遺伝子 (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) の検索をルーチン業務として開始するとともに, 近隣施設

からの検査依頼も受託してきた。しかしながら, 本方法は検査に4時間以上要するうえ, 各検査行程で多くのマニュアル操作を必要とするため業務負担も決して少なくなかった。このような状況の中, 2013年7月にベクトン・ディッキンソン社より BD マックス™ 全自動核酸増幅検査システム (BD マックス) が上市された。本機器は, 核酸の抽出, 増幅, 検出の工程をすべて全自動で行う検査システムで, 専用試薬による迅速検査のほか, オープン試薬およびオリジナルデザインのプライマー・プローブを用い独自の測定系を構築できることを特徴とする。

今回, われわれは BD マックスを用いた *van* 遺

伝子の全自動real-time PCRについて検討し、BD マックス™オープン試薬による本邦初の検査系を確立した。同検査系の基礎的検討を行うとともに、本システムがもたらした検査の迅速化および業務負担の軽減状況について報告する。

対象と方法

1. 対象菌株

ATCC 株、GTC 株および以前の検討⁴⁾により VCM耐性遺伝子 (*van* 遺伝子) の確認がなされた腸球菌のうち、*vanA* 保有 *Enterococcus faecium* 4 株、*vanB* 保有 *Enterococcus faecalis* 2 株、*vanB* 保有 *E. faecium* 11 株、*vanB* 保有 *Enterococcus* sp. 1 株、*vanB* および *vanC1* 保有 *Enterococcus gallinarum* 1 株、*vanC1* 保有 *E. gallinarum* 6 株、*vanC2/C3* 保有 *Enterococcus casseliflavus* 4 株、全 *van* 遺伝子陰性 *E. faecalis* 14 株、計 43 株を対象とした (Table 1)。また、菌株 GTC 1754^T, v309 および v633 をそれぞれ 0.5 マクファーランドに調整し、等量混和した菌液を全 *van* 遺伝子陽性菌液として検討に用いた。

2. BD マックスによる *van* 遺伝子の検出

1) プライマーおよびプローブの調整 (Table 2)

vanA および *vanB* の増幅・検出には FANG ら⁵⁾ のプライマー・プローブを用い、*vanC1* および *vanC2/C3* については Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用いて設計したのち、Basic local alignment search tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) にて特異性を確認した自製プライマー・プローブを用いた。プライマー・プローブ調整液は 1 サンプルあたり 12.5 μ L の容量で作成した。各プライマーおよびプローブの終濃度を 0.5 μ M とし、BD MAX マスターミックス (PC 入り) (日本ベクトン・ディッキンソン) 付属 Primer and Probe Diluent を 2 μ L 添加したのち PCR グレードの滅菌蒸留水にて 12.5 μ L にメスアップした。

2) 試料菌液の調整

VRE 選択培地またはミュラー・ヒントン寒天培地に発育した腸球菌 1 コロニーを BD MAX DNA 抽出キット-2 (日本ベクトン・ディッキンソン) 付属 Sample Buffer Tube (SBT) に直接懸濁し試料とした。

Table 1. Strains used for this study

<i>van</i> gene type	Identification name (No.)	Strain number
<i>vanA</i> positive	<i>E. faecium</i> (4)	GTC 1756 ^T , v336, v482, v654
	<i>E. faecalis</i> (2)	ATCC 51299 ^T , v507
<i>vanB</i> positive	<i>E. faecium</i> (11)	GTC 1757 ^T , v85, v95, v135, v136, v137, v142, v156, v157, v207, v404
	<i>Enterococcus</i> sp. (1)	v328
<i>vanB</i> and <i>vanC1</i> positive	<i>E. gallinarum</i> (1)	v309
<i>vanC1</i> positive	<i>E. gallinarum</i> (6)	v612, v613, v614, v650, v655, v792
<i>vanC2/C3</i> positive	<i>E. casseliflavus</i> (4)	v633, v783, v786, v787
All negative	<i>E. faecalis</i> (14)	v610, v615, v618, v619, v620, v623, v624, v625, v627, v628, v629, v631, v793, v794
Total (43)		

Table 2. Real-time PCR primers and probes used for analysis

Primer/Probe	Sequence 5'-3'	Final conc.(μ M)	Amplicon size(bp)	Reference
vanA-f	AGT CAA TAC TCT GCC CGG TTT C	0.5		
vanA-r	GCA GCG GCC ATC ATA CG	0.5	59	
probe-A	FAM -CGT CAT ACA GTC GTT ATC- MGBNFQ	0.5		5)
vanB-f	TCC GGT CGA GGA ACG AAA	0.5		
vanB-r	GCC CTC TGC ATC CAA GCA	0.5	70	
probe-B	VIC -ACG GCA AAG AAA GTA TAT C- MGBNFQ	0.5		
vanC1-f	GAA AAA CGA ATC GTC CCT GA	0.5		
vanC1-r	GCA ACC AAC ATA AGG CAG G	0.5	111	This Study
probe-C1	ROX -AAG TAT GGC GAG GAT GGC TG- BHQ2a-ROX	0.5		
vanC2/C3-f	CGG CTT TTT CGA TTT TGA AG	0.5		
vanC2/C3-r	TTC AAT CGT TTC AGG CAA TG	0.5	82	This Study
probe-C2/C3	Cy5 -ATC AGC GCC AAA ATC ACC GT- BHQ2a-Cy5	0.5		

3) BD マックスによる核酸抽出および real-time PCR

2) で調整した SBT および BD MAX DNA 抽出キット-2 付属 Unitized Reagent Strips をサンプルラックにセットした後, BD MAX DNA 抽出キット-2 付属 DNA extraction reagent および PCR reagent tubes, BD MAX マスターミックス (PC 入り), プライマー・プローブ調整液を Unitized Reagent Strips のそれぞれのストリップにセットした。BD マックス本体に BD マックスカートリッジ (日本ベクトン・ディッキンソン) およびサンプルラックをセットし, 核酸抽出条件「ExK™ DNA-2 モード」, real-time PCR 条件「95°C10 分の後, 95°C10 秒 (変性), 60°C17.9 秒 (アニーリング, 伸長, 検出) を 40 サイクル」の設定で全自動核酸増幅を行った。

3. 全 *van* 遺伝子陽性菌液を用いた同時再現性の検討

全 *van* 遺伝子陽性菌液を 10 重測定し *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* 各遺伝子の real-time PCR における Ct 値の変動係数: CV (%) を求めた。

4. 従来の conventional PCR 法との比較検討

従来の conventional PCR 法⁴⁾ と BD マックスを比較し, 結果一致率, 測定時間, 操作性等の検討を行った。

結果

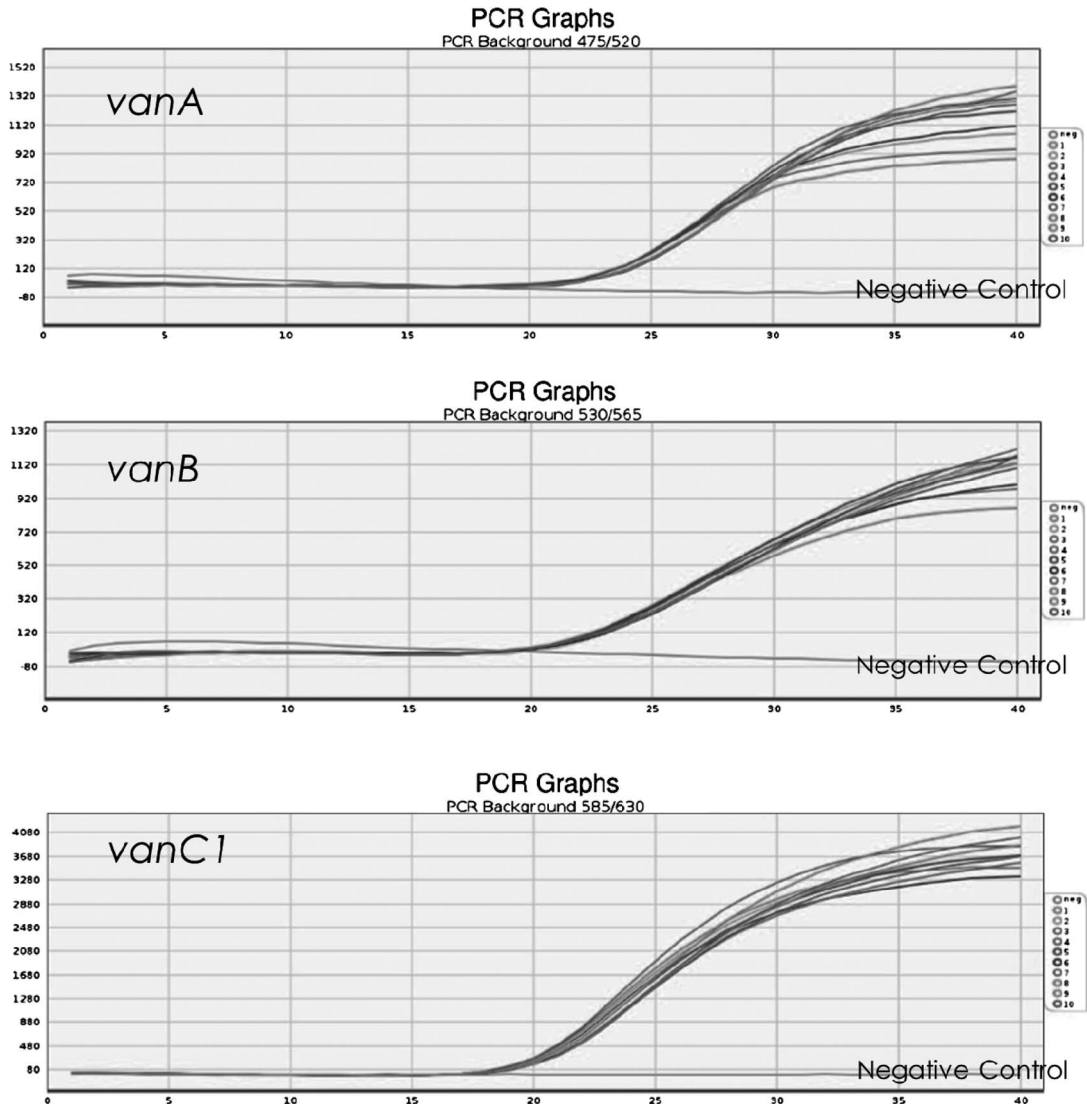
1. 全 *van* 遺伝子陽性菌液を用いた同時再現性の検討

各 *van* 遺伝子とも良好な増幅曲線が観察された (Fig. 1)。また, 各 *van* 遺伝子の Ct 値の CV (%) は *vanA* 2.09%, *vanB* 1.72%, *vanC1* 1.41%, *vanC2/C3* 1.52% と良好な結果が得られた (Table 3)。

2. 従来の conventional PCR 法との比較検討

一致率の比較では, 対象全株とも従来の conventional PCR 法と一致した結果が得られた。測定時間については, 従来法がおおよそ 240 分であったのに対し, BD マックスはおおよそ 130 分と大幅な短縮を認めた (Fig. 2)。また, 従来法でマニュアル操作が必要であった DNA の抽出, template

Fig. 1. Amplification curves of real-time PCR simultaneous repeatability test



DNAの分注などのPCR前検体処理, ゲル電気泳動やエチジウムブロマイド染色などのAmplicon検出操作がすべて自動化されたため, 業務負担およびコンタミネーションのリスクが大幅に軽減した。

考察

VRE感染症は1999年に施行された感染症新法により5類感染症として全例報告が義務付けられ

て以降, その報告数は増加傾向にある。VRE感染症の感染症法上の扱いに関しては, 2013年4月の一部改定を受け届出基準が「分離・同定による腸球菌の検出かつ分離菌に対するVCMのMIC値が $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上」の感染症例に変更となり遺伝子型の検索は不要となった。しかし, 以前の我々の研究⁴⁾では*vanB*保有腸球菌のうち6.6%が $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$ に満たないVCMのMIC値であったことなどから, 依然*van*遺伝子の検索は感染対策上重要な検

Fig. 1. Continued

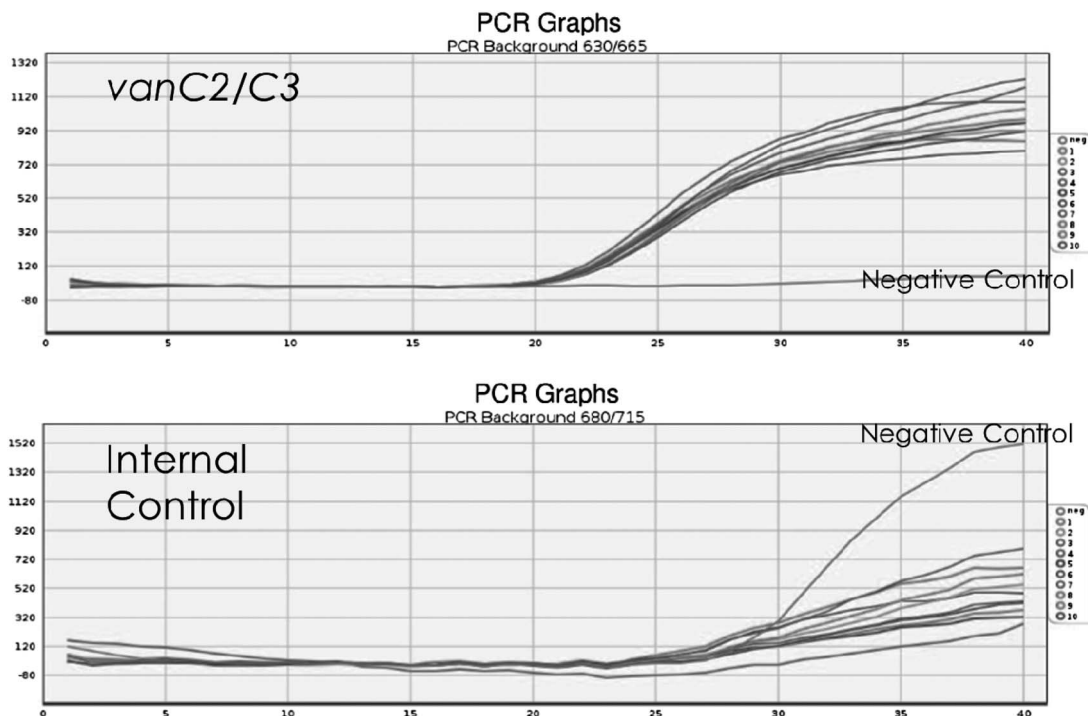


Table 3. Ct value analyses of real-time PCR simultaneous repeatability test

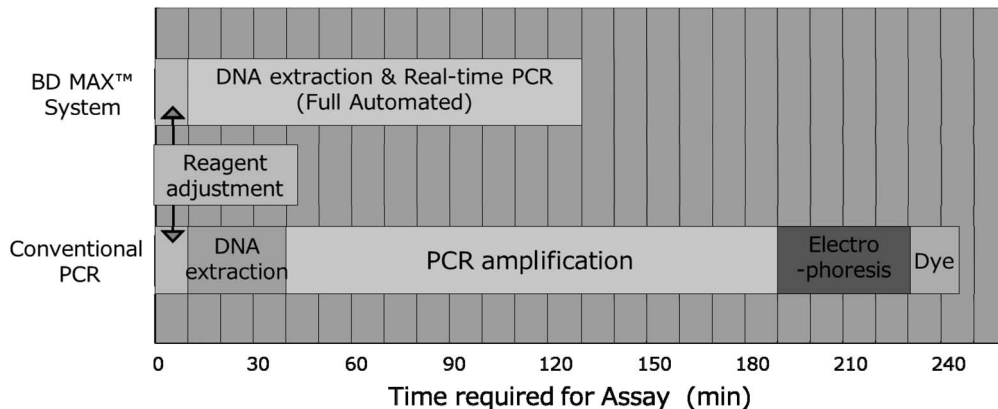
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2/C3</i>	Internal Control
Repeat counts	10	10	10	10	10
Ct Maximum	24.05	22.52	20.74	22.20	26.48
Ct Minimum	22.61	21.50	20.03	21.38	23.28
Ct Mean	23.50	21.97	20.44	21.79	24.74
SD	0.49	0.38	0.29	0.33	0.93
CV (%)	2.09	1.72	1.41	1.52	3.74

査であると考えられる。*van* 遺伝子の分子生物学的検索法としては DUTKA-MALEN らの Multiplex PCR⁶⁾ が汎用されているが、本法を当院の日常検査の中で実施するにあたっては検査時間や操作性の問題が少なからず存在し、業務負担の一因となる実情があった。

そこでわれわれは BD マックスを用いた全自動 Multiplex real-time PCR による *van* 遺伝子の検出を検討し、検査法を確立させた。BD マックスは

核酸の抽出、増幅、検出の工程をすべて全自動で行う。機器の特性上 Nested PCR、アンプリコンのシーケンシング、電気泳動によるアンプリコンサイズ確認など PCR 増幅産物の 2 次的利用は不可能であるが、既存の様々な real-time PCR 技術を導入可能で高い拡張性をもつ。BD マックスを用いたオリジナルの Multiplex real-time PCR については SYBR Green によるインターカレーションと Melt curve analysis による検出法⁷⁾、蛍光プロ

Fig. 2. Comparison of BD MAX™ system and conventional PCR method with assay time



ブ・ハイブリダイゼーション法による検出法⁸⁾が報告されているが、今回われわれは高い特異度を得るために蛍光プローブによる検出を試みた。本法の基礎的性能の検討では、全 *van* 遺伝子陽性菌液を用いた同時再現性試験で得られた各 *van* 遺伝子の Ct 値の CV (%) は *vanA* 2.09%, *vanB* 1.72%, *vanC1* 1.41%, *vanC2/C3* 1.52%, 腸球菌 43 株を用いた従来の conventional PCR 法との比較では一致率 100% とそれぞれ良好な結果が得られた。また、操作性・迅速性の観点においては、本法は被検菌コロニーを Sample Buffer Tube に懸濁し、あらかじめ調整したプライマー・プローブ調整液等とともにサンプルラックに設置するのみで *van* 遺伝子検出が可能となり、操作が極めて容易になった。また、real-time PCR を測定原理としていることから、従来のゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色などの検出行程を省略でき、検査時間の大幅な短縮が実現された。

BD マックス上市以降、関連する文献報告が増え続けているが、そのほとんどはメーカーが提供する専用試薬の性能評価⁹⁻¹²⁾であり、2014 年 6 月現在、BD マックス™ オープン試薬を用いた全自動 real-time PCR の報告は前述の DALPKE らの *Pneumocystis jirovecii* 検出系⁸⁾のみである。すなわち、本法は 2 例目、そして本邦初の BD マックス™

オープン試薬による全自動 real-time PCR 検査系確立の報告となった。

今回の結果は培地上に発育したコロニーから得られたものであるが、院内感染防止を目的としたアクティブサーベイランスに寄与する臨床検体からの直接検出へと繋がる成果であると考えられる。

文献

- 1) 国立感染症研究所ホームページ : <http://www.nih.go.jp/niid/ja/idwr/2085-ydata/1615-report-ja.html>
- 2) SHIRANO, M.; S. TAKAKURA, M. YAMAMOTO, *et al.*: Regional spread of *vanA*- or *vanB*-positive *Enterococcus gallinarum* in hospitals and long-term care facilities in Kyoto prefecture, Japan. *Epidemiol. Infect.* 139: 430~436, 2011
- 3) MATSUSHIMA, A.; S. TAKAKURA, M. YAMAMOTO, *et al.*: Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 1095~1100, 2012
- 4) 坂梨大輔, 山岸由佳, 鈴木隆佳, 他: 愛知県で分離された腸球菌の疫学解析. *Jpn. J. Antibiotics* 67: 123~132, 2014
- 5) FANG, H.; A. K. OHLSSON, G. X. JIANG, *et al.*: Screening for vancomycin-resistant enterococci: an efficient and economical laboratory-developed test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 261~

- 265, 2012
- 6) DUTKA-MALEN, S.; S. EVERS & P. COURVALIN: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24~27, 1995
 - 7) HOFKO, M.; A. MISCHNIK, M. KAASE, *et al.*: Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. *J. Clin. Microbiol.* 52: 1701~1704, 2014
 - 8) DALPKE, A. H.; M. HOFKO & S. ZIMMERMANN: Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* on the fully automated BD MAX platform. *J. Clin. Microbiol.* 51: 2337~2343, 2013
 - 9) LE GUERN, R.; S. HERWEGH, B. GRANDBASTIEN, *et al.*: Evaluation of a new molecular test, the BD Max Cdiff, for detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 50: 3089~3090, 2012
 - 10) SCHWARTZ, J.; B. ROBINSON-DUNN, J. MAKIN, *et al.*: Evaluation of the BD MAX GBS assay to detect *Streptococcus* group B in LIM broth-enriched antepartum vaginal-rectal specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73: 97~98, 2012
 - 11) ANDERSON, N. W.; B. W. BUCHAN & N. A. LEDEBOER: Comparison of the BD MAX enteric bacterial panel to routine culture methods for detection of *Campylobacter*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O157), *Salmonella*, and *Shigella* isolates in preserved stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 52: 1222~1224, 2014
 - 12) DALPKE, A. H.; M. HOFKO & S. ZIMMERMANN: Comparison of the BD Max methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay and the BD GeneOhm MRSA achromopeptidase assay with direct-and enriched-culture techniques using clinical specimens for detection of MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 50: 3365~3367, 2012
-

Development of a simplified assay for detection of *van* gene harbored enterococci using the automated BD MAXTM platform

DAISUKE SAKANASHI¹⁾, YUKA YAMAGISHI^{1,2)}, NARIMI MIYAZAKI¹⁾, TAKAYOSHI SUZUKI¹⁾, TOMOKO OHNO¹⁾, ATSUKO YAMADA¹⁾, ISAO KOITA¹⁾, SETSUO MIYAJIMA¹⁾, HIROYUKI SUEMATSU¹⁾ and HIROSHIGE MIKAMO^{1,2)}

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention,
Aichi Medical University Hospital

²⁾ Department of Clinical Infectious Diseases,
Aichi Medical University Hospital

We developed and evaluated of multiplex real-time PCR assay for detection of vancomycin-resistant genes (*vanA*, *vanB*, *vanC1* and *vanC2/C3*) using the new, fully automated BD MAX platform. Ct value analyses of real-time PCR simultaneous repeatability test have showed the usefulness; coefficient of variation: CV (%) were determined 2.09%, 1.72%, 1.41% and 1.52% with *vanA*, *vanB*, *vanC1* and *vanC2/C3*, respectively. We also evaluated with 43 strains of enterococci were characterized by conventional PCR method; 4/4 for *vanA*-positive, 14/14 for *vanB*-positive, 1/1 for *vanB* plus *vanC1*-positive, 6/6 for *vanC1*-positive, 4/4 for *vanC2/C3*-positive and 14/14 for all-*van* gene-negative strains were identified correctly. This assay was automatically performing before and after PCR operations previously done manually by operator, such as DNA extraction, sample dispensing and gel electrophoresis or the ethidium bromide dyeing. As a result, work burden and the risk of the contamination were largely reduced and were shortened to about half for measurement time. We conclude that this assay could greatly contribute to efficient and rapid detection of vancomycin-resistant genes.