

現在、行っている *M. genitalium* 検出法

- Mgpa adhesin gene に対する realtime PCR 法
(mgpa realtime PCR)
- 16S rRNA に対する PCR 法 (16S PCR)
- *M. genitalium* の判定基準
mapa realtime PCR にて 10geq 以上
16S PCR 陽性

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2003, p. 261–266
0095-1137/03/S08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.1.261–266.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 41, No. 1

Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene

Jørgen Skov Jensen,^{1*} Martin B. Borre,² and Birthe Dohn¹

*Mycoplasma Laboratory, Department of Respiratory Infections, Meningitis, and Sexually Transmitted Infections,¹
and Laboratory of Molecular Biology,² Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen S, Denmark*

Received 13 June 2002/Returned for modification 16 August 2002/Accepted 15 October 2002

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2004, p. 683–692
0095-1137/04/S08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.42.2.683–692.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 42, No. 2

Use of TaqMan 5' Nuclease Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in Males with and without Urethritis Who Were Attendees at a Sexually Transmitted Disease Clinic

Jørgen Skov Jensen,^{1*} Eva Björnelius,² Birthe Dohn,¹ and Peter Lidbrink²

*Mycoplasma Laboratory, Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen S, Denmark,¹ and Department of
Dermatovenerology, Huddinge University Hospital, Karolinska Institutet, S-14 186 Huddinge, Sweden²*

Received 4 May 2003/Returned for modification 27 June 2003/Accepted 29 October 2003

TABLE 1. Primers for PCR deduced from *M. genitalium* 16S rRNA gene sequence used in initial evaluation

Primer	Sequence
MG16-45F.....5'	TAC ATG CAA GTC GAT CCG AAG TAG C
MG16-181R.....5'	ACC CTT GCA GGT CCT TTC AAC TTT A
MG16-252R.....5'	CGT CAT TGC CTT GGT AGG CCA
MG16-411R.....5'	TTC TTC CCA AAT AAA AGA ACT TTA CAA TCA A
MG16-447R.....5'	AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG
MG16-455R.....5'	GGT ACA GTC AAA CTC CAG CCA TTG
MG16-439F.....5'	GAA TGA CTC TAG CAG GCA ATG GCT G
MG16-636R.....5'	TCC AAA ACT CCC TAC CAC ACT CTA GAC TG
MG16-1117R.....5'	TCC TCC AAT TTA CAT TAG CAG TCT CGT TAA
MG16-1204F.....5'	CAA TGG CCA ATA CAA ACA GTA GCC AA
MG16-1301R.....5'	CTG ATT CGC GAT TAC TAG TGA TTC CAG
MG16-1428R.....5'	ACC GGT GCT ATC CTT GAC ATG CA
MG16-1421R.....5'	GTG CTA TCC TTG ACA TGC ACT TCC AA

^a Primer combinations MG16S-45F–MG16S-447R and MG16S-1204F–MG16S-1301R (underlined primers) were *M. genitalium* specific and used in the clinical evaluation.

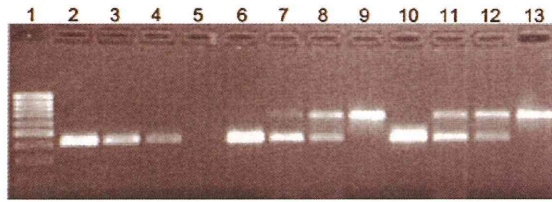


FIG. 2. Ethidium bromide-stained agarose gel showing the LOD of the *M. genitalium* 16S rRNA gene PCR and the effect of addition of the IPC and human DNA. Lane 1, 100-bp marker (Pharmacia); lane 2, ~500 genome copies of *M. genitalium* DNA; lane 3, ~50 genome copies of *M. genitalium* DNA; lane 4, ~5 genome copies of *M. genitalium* DNA; lane 5, negative control; lanes 6 to 9, same as lanes 2 to 5 but with addition of IPC; lanes 10 to 13, same as lanes 2 to 5 but with addition of IPC and 10 μ l of clinical urogenital specimen.

TABLE 1. Primers and probes deduced from the *M. genitalium* MgPa gene sequence^a used for TaqMan PCR and primers for construction of the IPC

Primer or probe	Primer or probe name	Sequence ^b	Nucleotide position
Primers for TaqMan assay	MgPa-355F	GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA	1420 in MgPa operon sequence
	MgPa-432R	GTAAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC	1497 in MgPa operon sequence
Primers for construction of IPC	MgPa-IPC-F	GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAATTCGGGACGTATCATGCT	13915 in phage lambda sequence
	MgPa-IPC-R	GTAAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATCACC	14061 in phage lambda sequence
	MgPa-380	FAM-ACTTTGCAATCAGAAGGT-MGB	1445 in MgPa operon sequence
Probe	Phage lambda IPC-R	TAMRA-TCCTTCGTGATATCGGACGTTGGCTG-BHQ2	14011 in phage lambda sequence

^a The GenBank accession number for the *M. genitalium* MgPa sequence is M31431.

^b Sequences in boldface correspond to the phage lambda sequence (GenBank accession number J02459). MGB denotes a minor groove binder and a nonfluorescent quencher, and BHQ-2 denotes Black Hole Quencher 2 (nonfluorescent quencher).

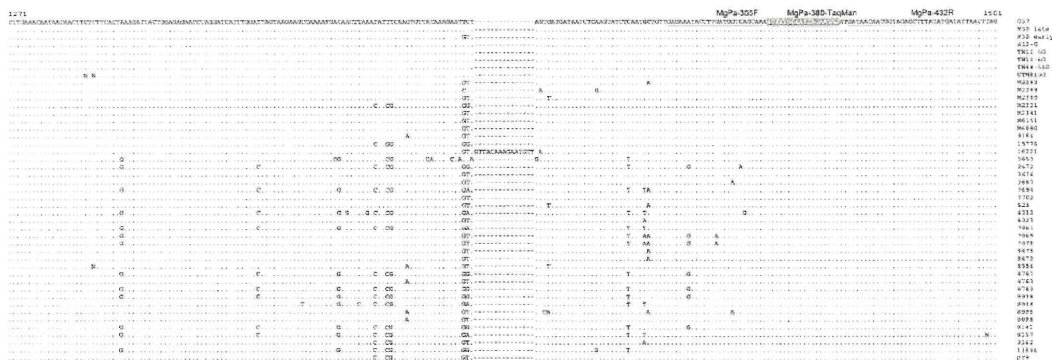


FIG. 2. Alignment of MgPa sequences from positions 1271 to 1501 of the MgPa operon sequence (GenBank accession number M31431) from cultured *M. genitalium* strains and PCR products from 30 specimens from 28 patients. The sequences of the primers used in the TaqMan assay are underlined, and the sequence of the TaqMan MGB probe is shaded.

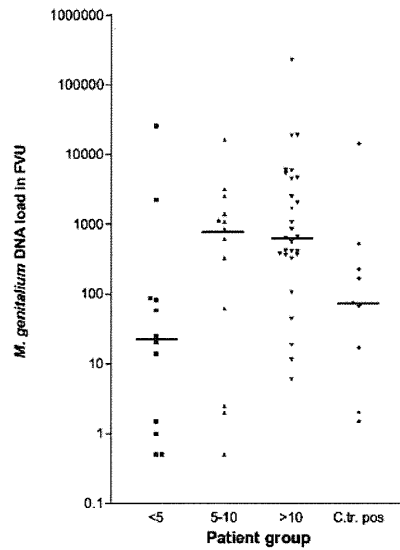


FIG. 3. *M. genitalium* DNA load in FVU specimens from patients without urethritis (<5 PMNLs/hpf), low-grade NCNGU (5 to 10 PMNLs/hpf), and high-grade NCNGU (>10 PMNLs/hpf) and patients with a concomitant *C. trachomatis* infection (C.tr. pos). The median DNA load for each group is marked by a horizontal line.

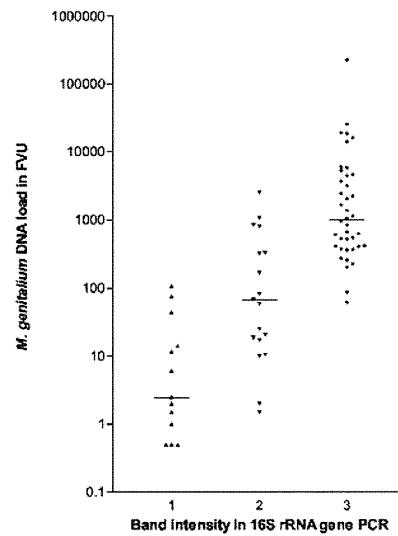


FIG. 5. *M. genitalium* DNA loads in 71 FVU specimens from men who attended the STD clinic for the first time during the study and who were grouped by the intensity of the 16S rRNA gene amplicon detected in an ethidium bromide-stained agarose gel. Column 1, a faint band; column 2, a clear band but the IPC is still visible; column 3, a strong band with no IPC visible. Data were recorded during the screening of the specimens. The median DNA load for each group is marked by a horizontal line.

検討した検体

- 臨床試験において治療前の初尿204検体
- 尿道炎症例で検査依頼のあった108検体
- 計312株
すべて尿道炎症状を有する症例

結果

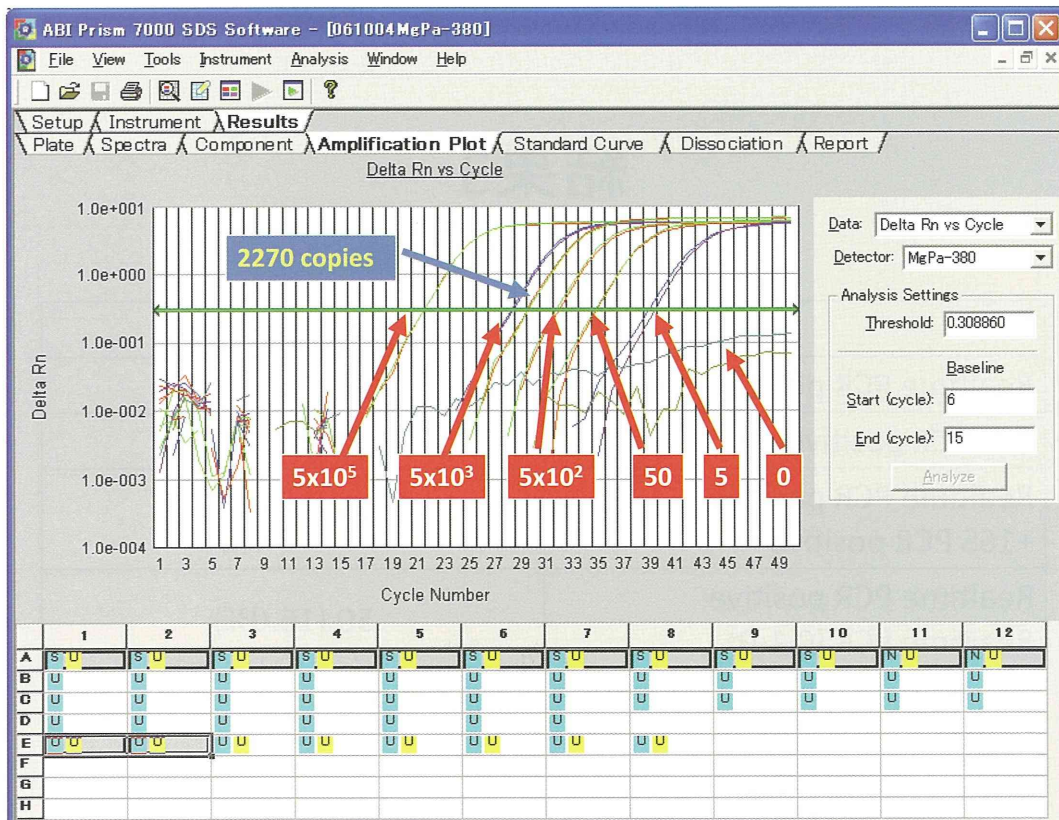
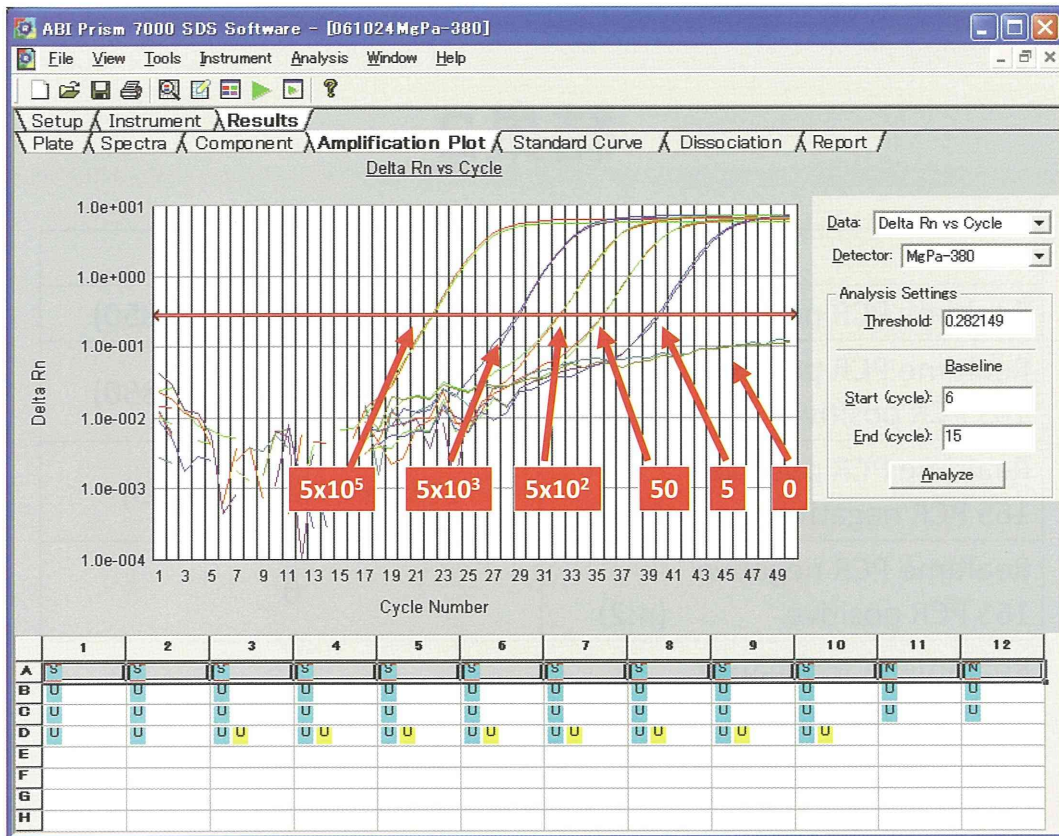
		realtime PCR		total
		positive	negative	
16S PCR	positive	25	2	27
	negative	10	275	285
total		35	277	312

陽性一致率: 71.4%

陰性一致率: 96.5%

結果2

	DNA copy
Realtime PCR positive	18246 ± 27541 (15-98850)
Realtime PCR positive 16S PCR positive (n:25)	25082 ± 30041 (15-98850)
Realtime PCR positive 16S PCR negative (n:10)	1150 ± 2162 (41-6053)
Realtime PCR negative 16S PCR positive (n:2)	0



結果2

	DNA copy
Realtime PCR positive (n:35)	18246 ± 27541 (15-98850)
Realtime PCR positive 16S PCR positive (n:25)	25082 ± 30041 (15-98850)
Realtime PCR positive 16S PCR negative (n:10)	1150 ± 2162 (41-6053)
Realtime PCR negative 16S PCR positive (n:2)	0
Realtime PCR negative 16S PCR negative (n:15)	1.5 ± 2.0 (0.1-4)

結果3

	Positive rates
Realtime PCR positive	35 (11.2%)
16S PCR positive	25 (8.0%)
Realtime PCR positive +16S PCR positive	37 (11.9%)
Realtime PCR positive Realtime PCR (0.1-9)	50 (16.0%)

実用化のために 今後の展開

- わが国の検査体制のスタンダードを作る
- 参入要請のある検査法と、比較検討する

- 検体をデンマークに送り、再検査
- 三菱化学の16S realtime PCR法との比較
- Seeplex systemとの比較

- 16S PCR法の再検討

性感染症に関する特定感染症予防指針に基づく対策の推進に関する研究 — センチネルサーベイランスの施行について —

- 【研究分担者】 谷畑 健生 (国立保健医療科学院)
- 【研究代表者】 荒川 創一 (神戸大学大学院医学研究科)
- 【研究分担者】 小野寺昭一 (東京慈恵会医科大学)
岡部 信彦 (川崎市健康安全研究所)
- 【研究協力者】 秋元 義弘 (岩手県立二戸病院産婦人科)
武島 仁 (龍ヶ崎済生会病院泌尿器科)
種部 恭子 (女性クリニック We! TOYAMA / 産婦人科)
伊藤 晴夫 (NPO 法人千葉健康づくり研究ネットワーク)
五十嵐辰男 (千葉大学大学院工学研究科)
佐藤 武幸 (千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部)
出口 隆 (岐阜大学医学部附属病院泌尿器科)
安田 満 (岐阜大学医学部附属病院泌尿器科)
金山 博臣 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部泌尿器科)

研究要旨

われわれの研究は性感染症の定点報告が国の性感染症の実態を示しているかを明らかにする研究である。定点報告は男女の比較、人口の比較が出来ないように設計されている。このため、研究対象県全体の診療所・病院の性感染症者の実態を明らかにすることを目標とした。

A. 研究目的

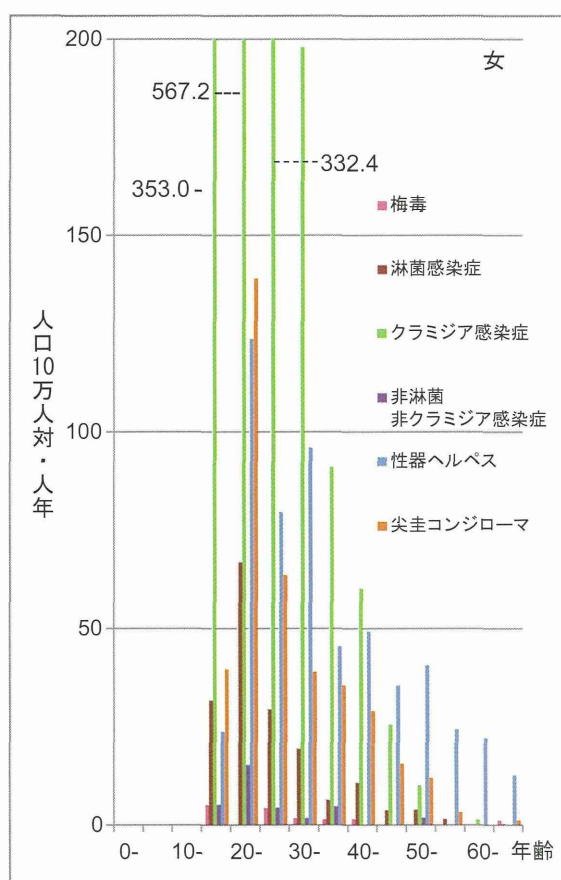
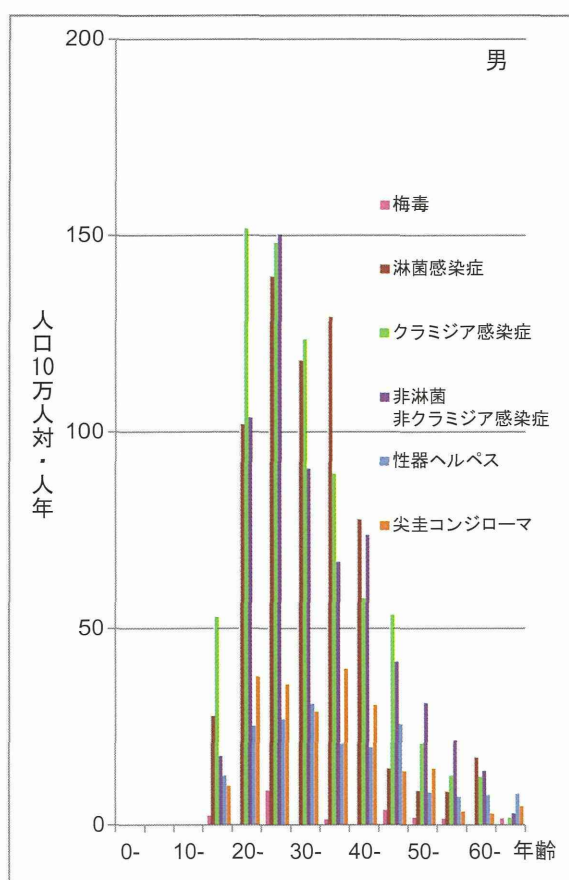
性感染症罹患者の推移は定点調査によれば、2002年以降淋菌感染症、性器クラミジア感染症に関しては漸減しているようである。今回7モデル県においての梅毒、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症、クラミジア感染症の実態調査する。

B. 研究方法

岩手県、茨城県、千葉県、岐阜県、富山県、兵庫県、徳島県の県医師会に登録されている産婦人科、泌尿器科、皮膚科、性病科の4診療科を標榜する医療機関において、サーベイランスをおこなう。時期は2012年度10月1日から31日までとし、上記医療機関受診の性感染症患者に対しておこなう。

1. 以下の入力方針でデータクリーニングを行った。

- 1) 診療科 無記入 → 入力せず
- 2) 定点施設／非定点施設 無記入 → 入力せず
- 3) 感染症例有無 無記入 & 個別症例無記入 → 「なし」とする
- 4) 感染症例有無 無記入 & 個別症例記入あり → 「あり」とする
- 5) 感染症例有無 なしに○ & 個別症例記入あり → 「あり」に変更する
- 6) 女性に○ & 男性尿道炎欄に記入はERROR → 男性尿道炎欄に記入を削除
- 7) 男性尿道炎欄で 非淋非ク のように○がついている場合は、非淋菌・非クラミジアの両方に「1」を入力



2. 研究班員、および協力研究者は患者の属性を知ることは不可能にしている。無名の患者に対して疾患別・県別・男女別・配偶者有無別の集計を行った。

3. 95%区間はその区間で真の値が確率的に

あることを示している。示されている推定値は、最も近い代表値を示している。この推定値はこの区間の代表とされる値であり、計算に用いられる。

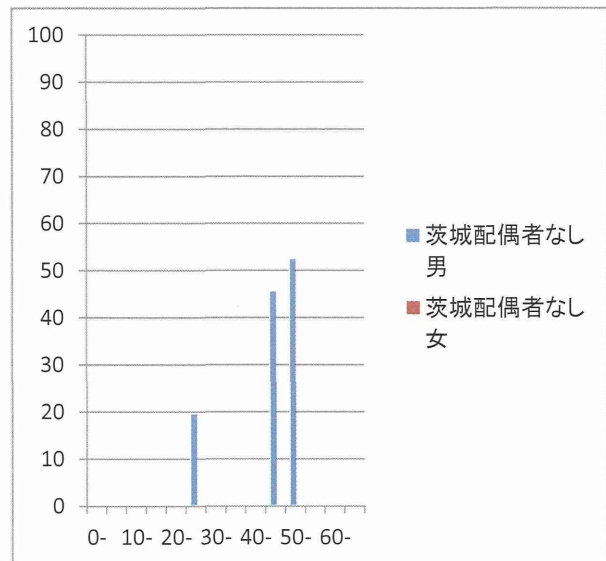
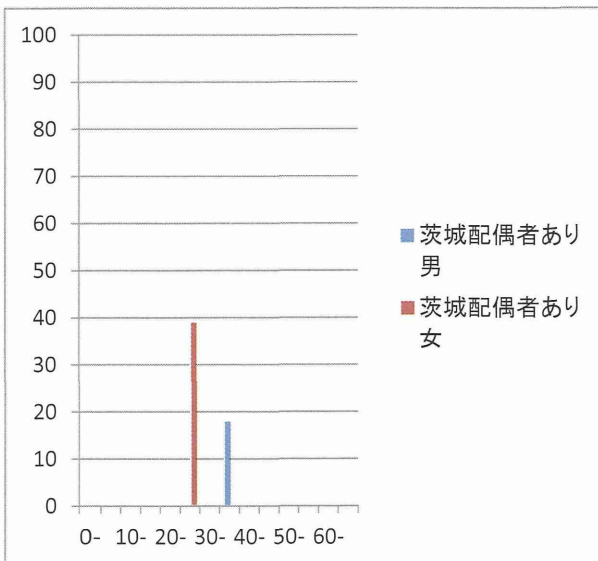
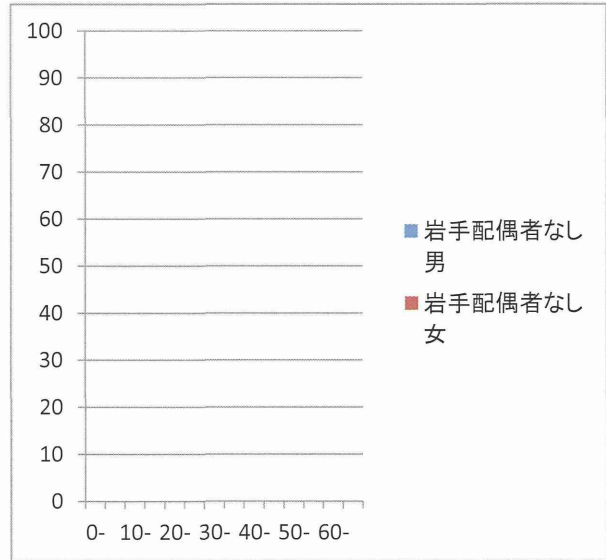
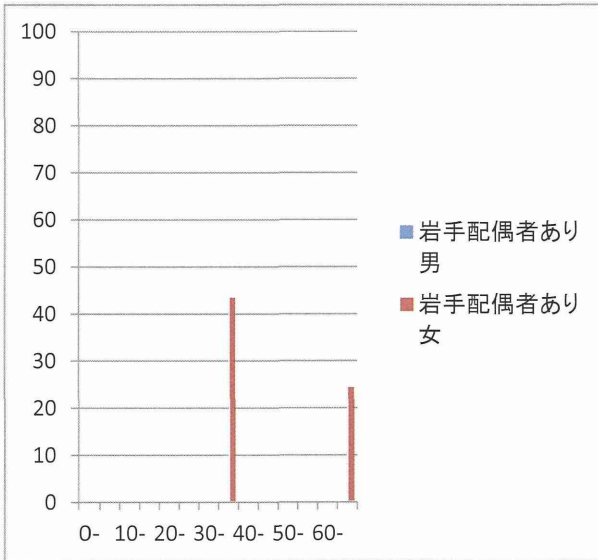
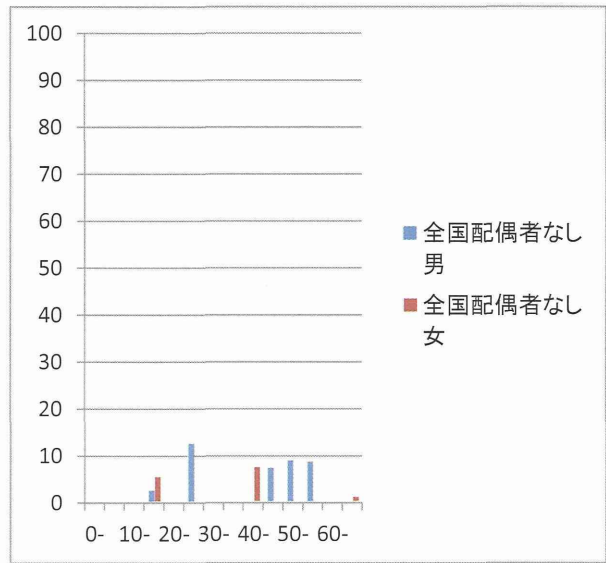
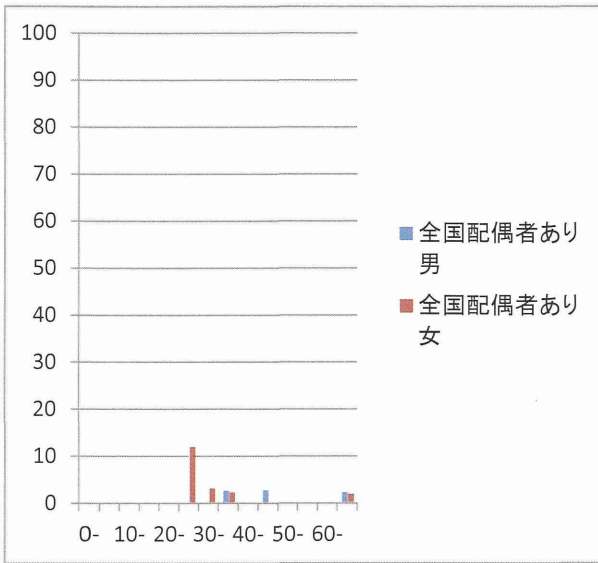
4. 縦軸は10万人対・人年を使用している。本研究では観察期間を10月の1か月31日間

の調査を行っており、1年356日に換算している。このことから縦軸は何人ではなく、何人年になる。この方法の方が、一日だけの調査よりも、真の実際受診値に近い。

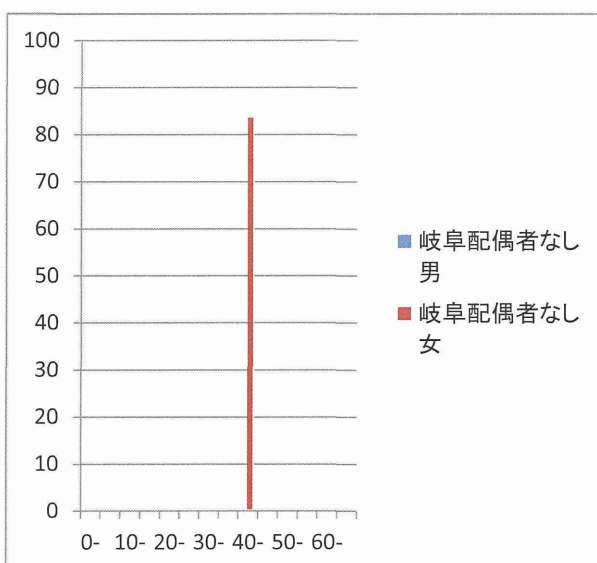
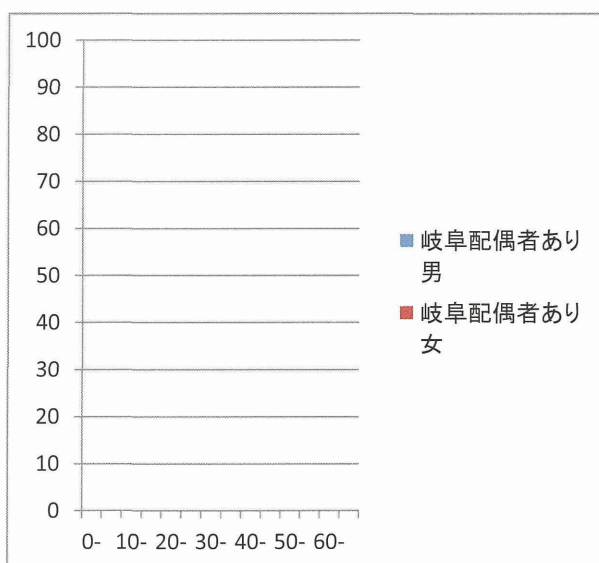
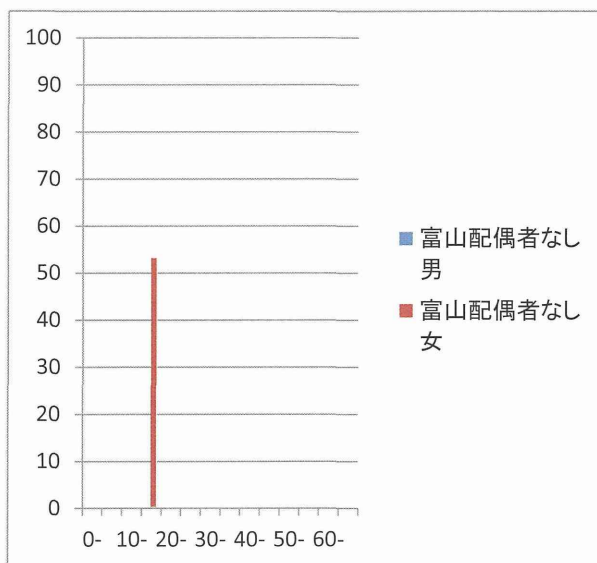
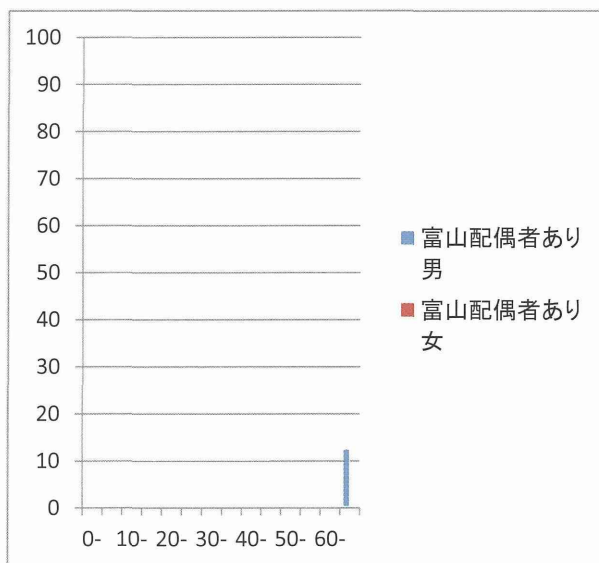
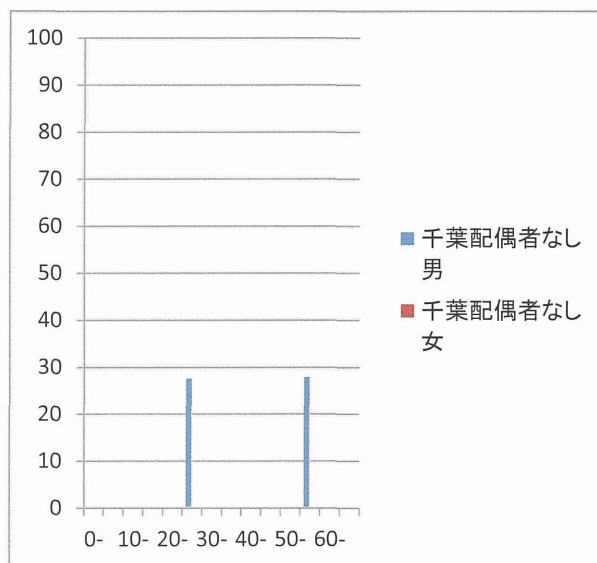
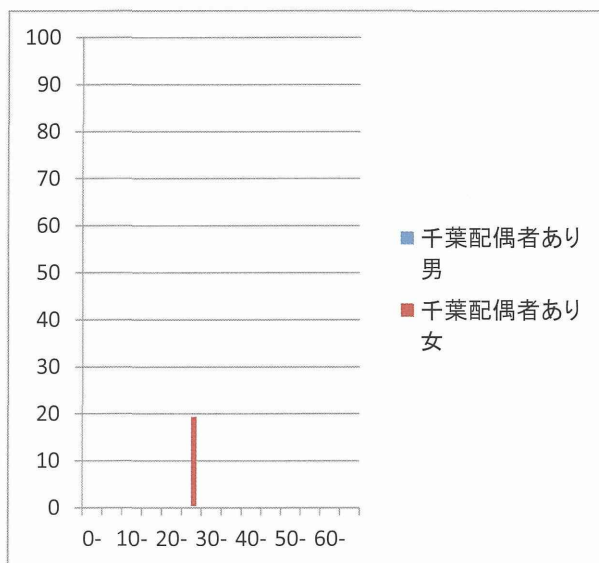
5. 研究結果

- 1) 男は配偶者なしの方が配偶者ありよりも性感染者が多い。
- 2) 男は配偶者なしの20代前半から40代前半までに感染者が多い。
- 3) 女は配偶者なしに多く、クラミジア感染症が最も多い。
- 4) 女は配偶者なしの10代後半から30代後半までに感染者が多く、男よりも全般に5歳若い。

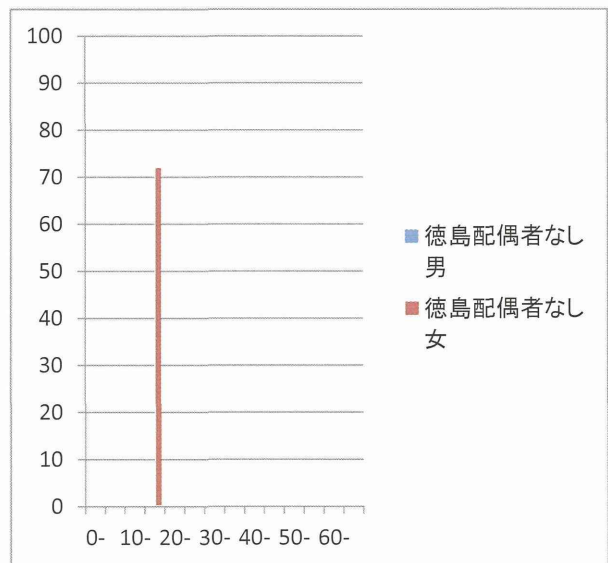
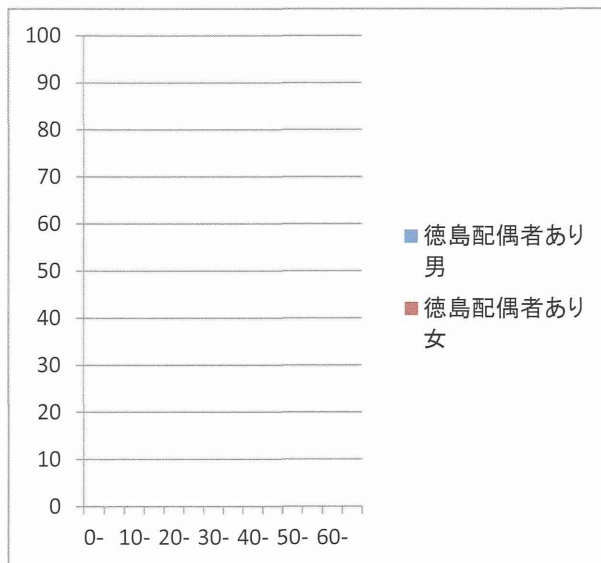
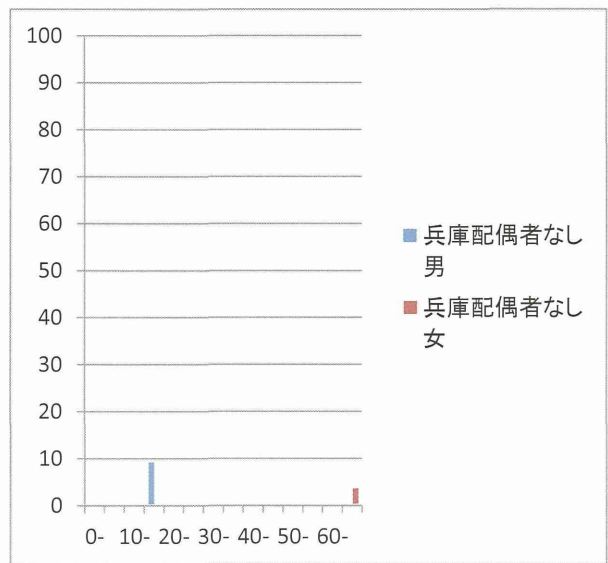
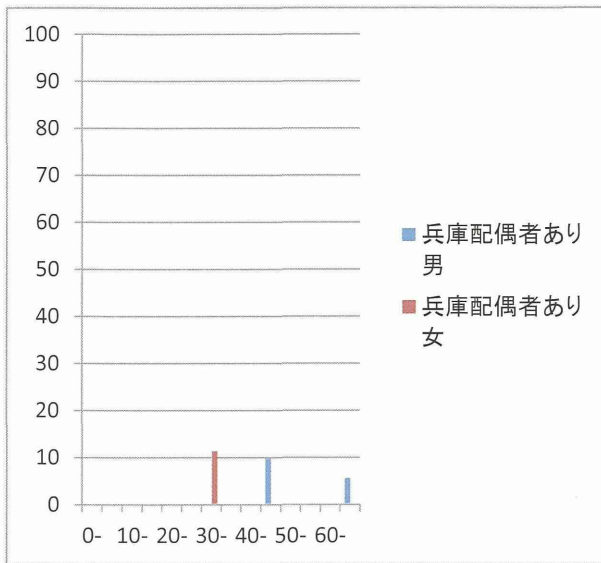
梅毒（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



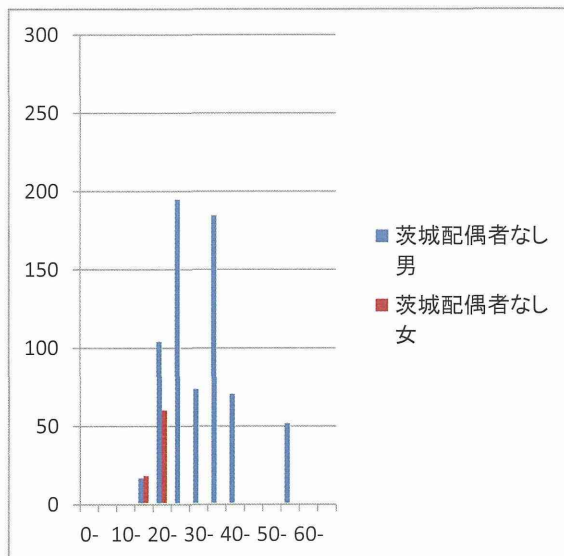
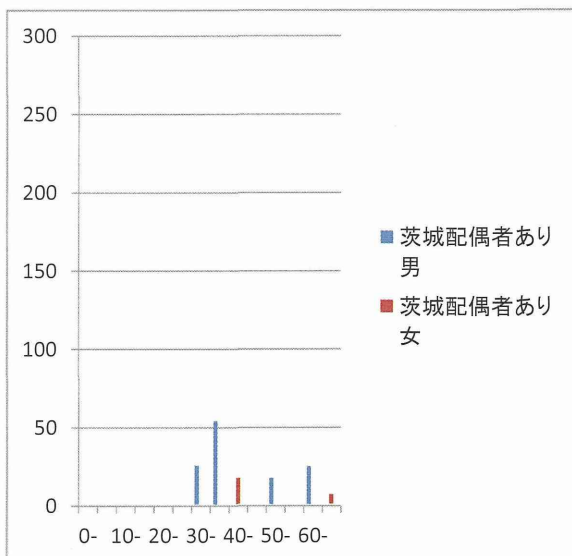
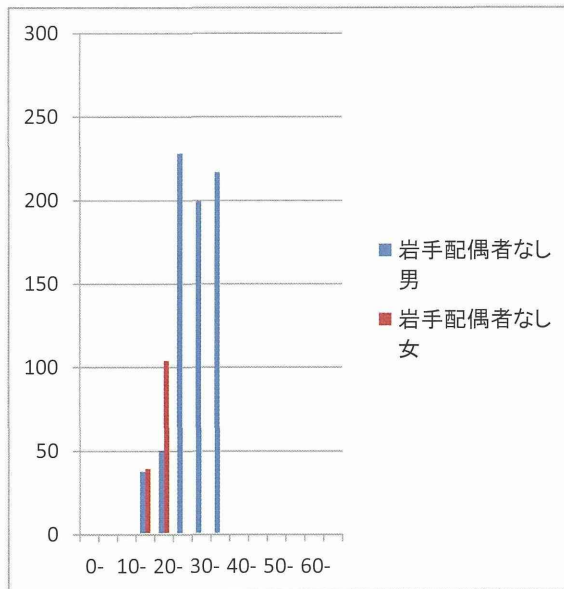
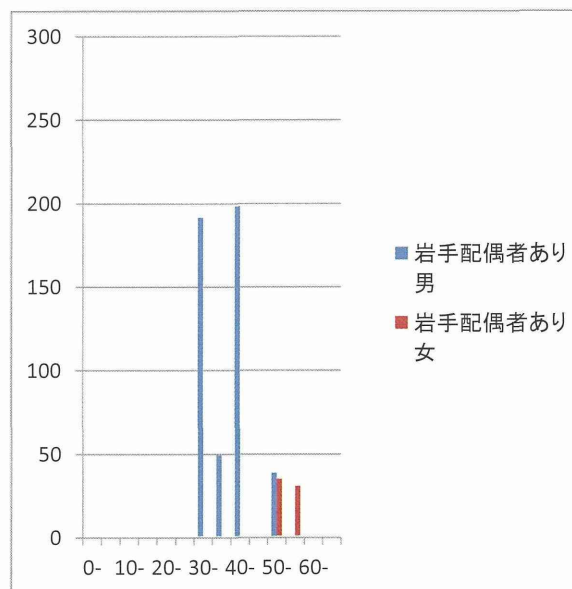
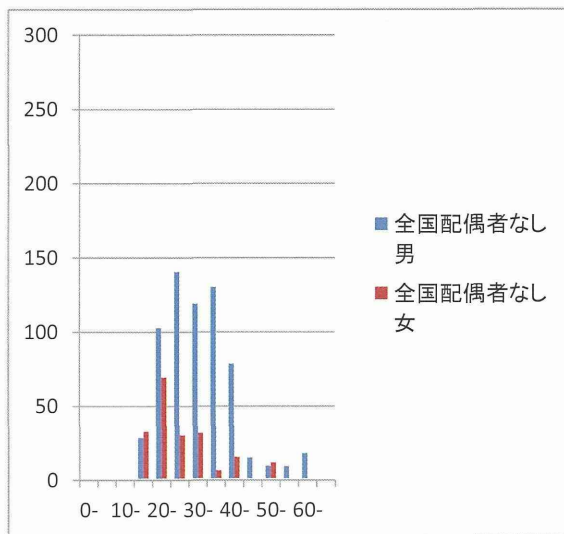
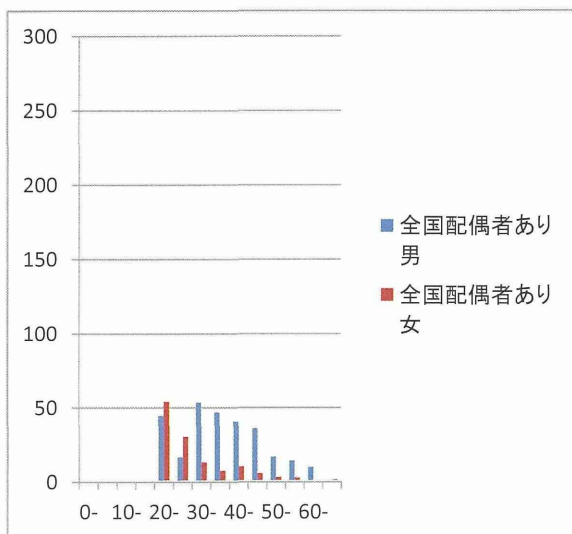
梅毒（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



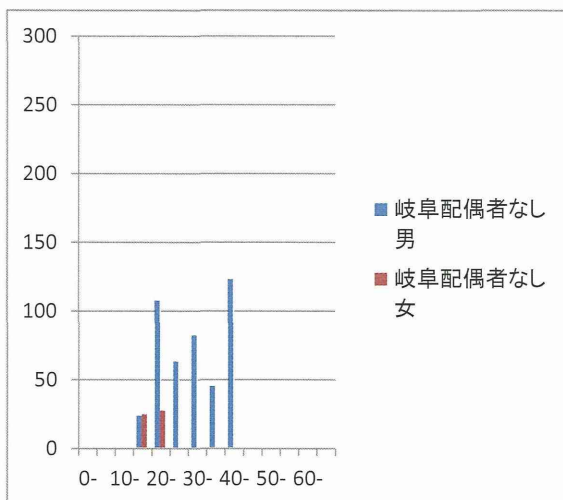
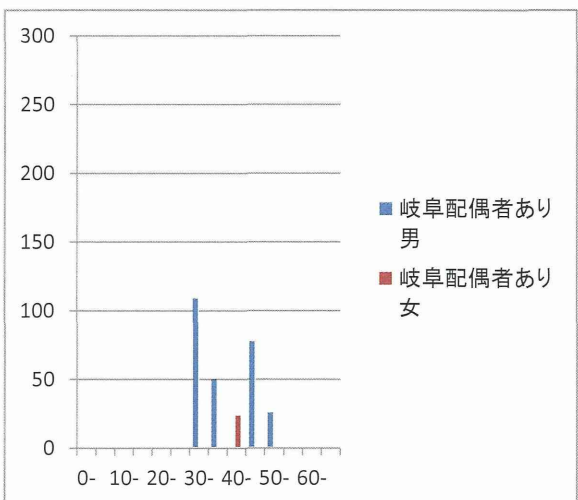
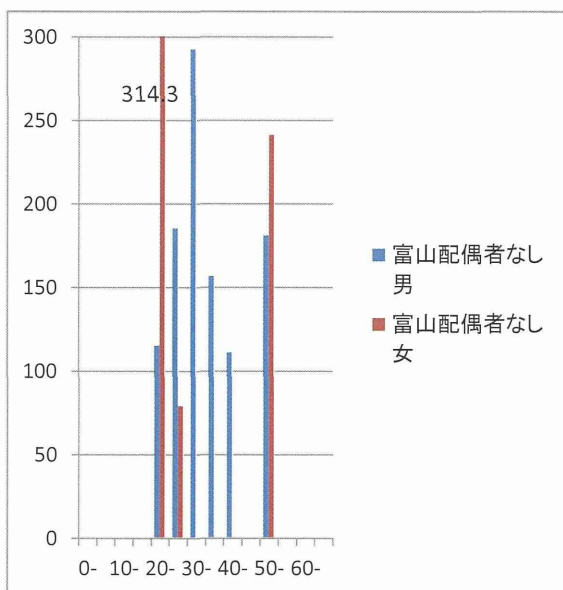
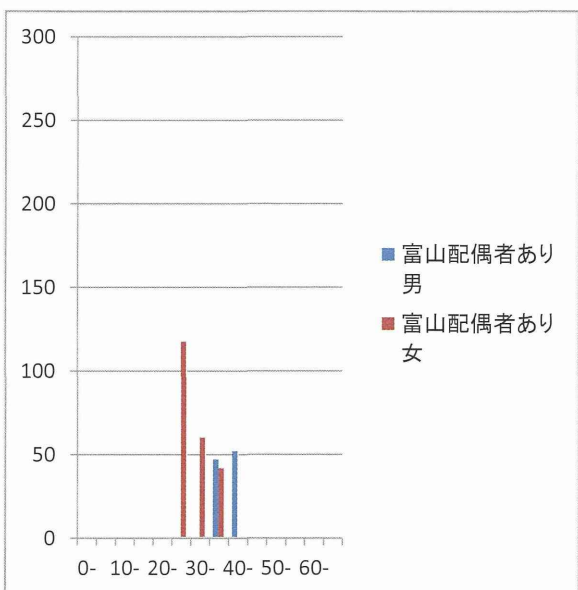
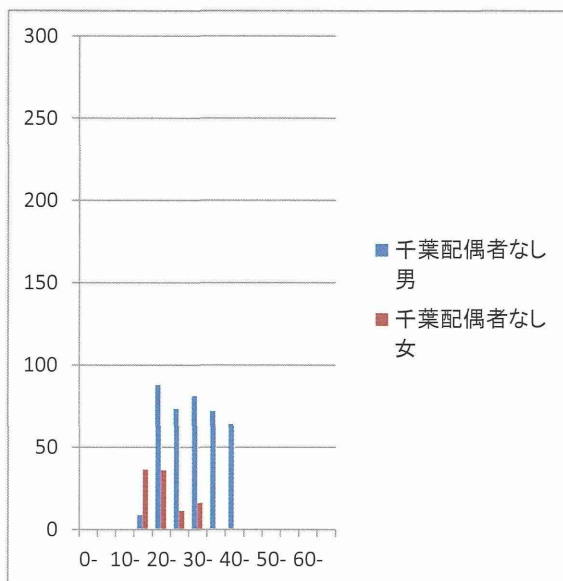
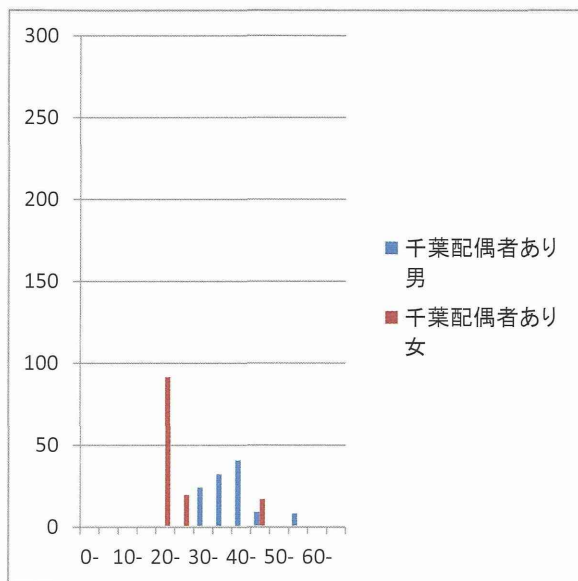
梅毒（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



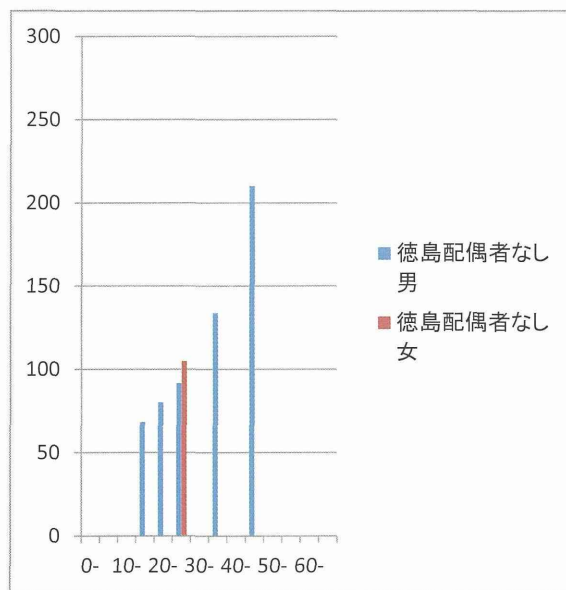
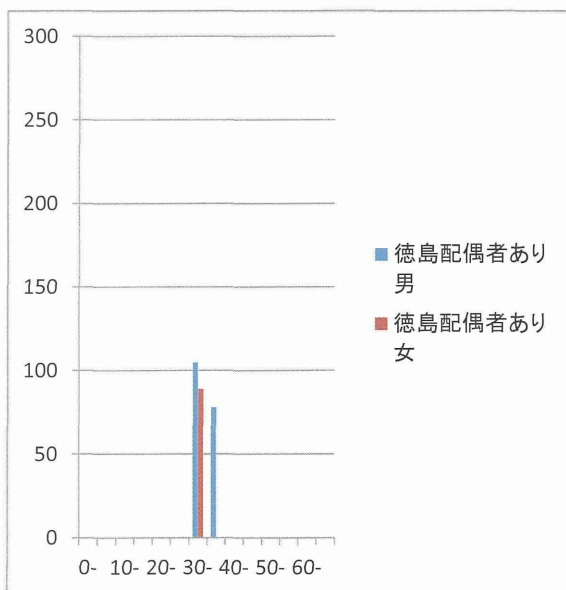
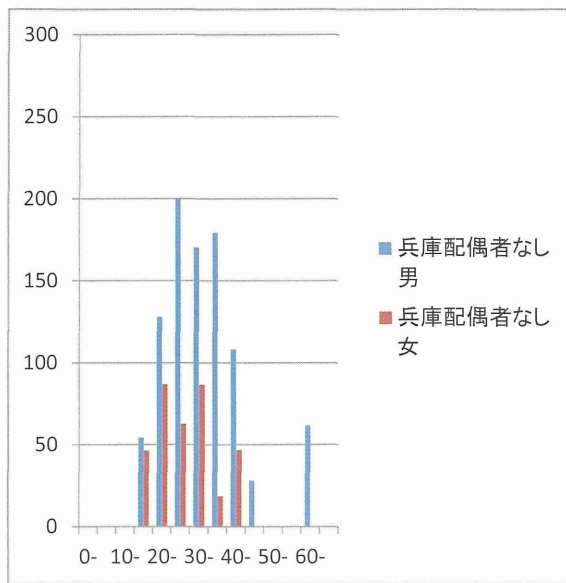
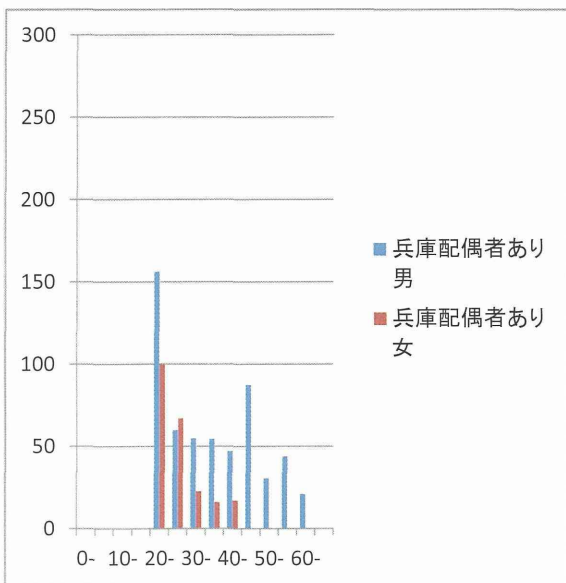
淋菌性尿道炎・頸管炎（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



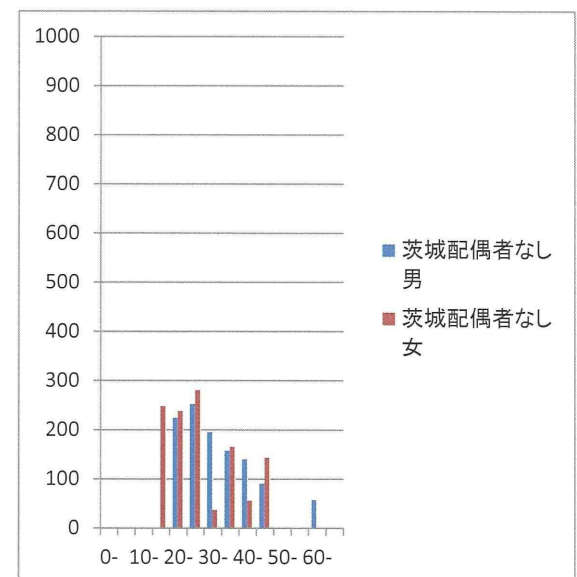
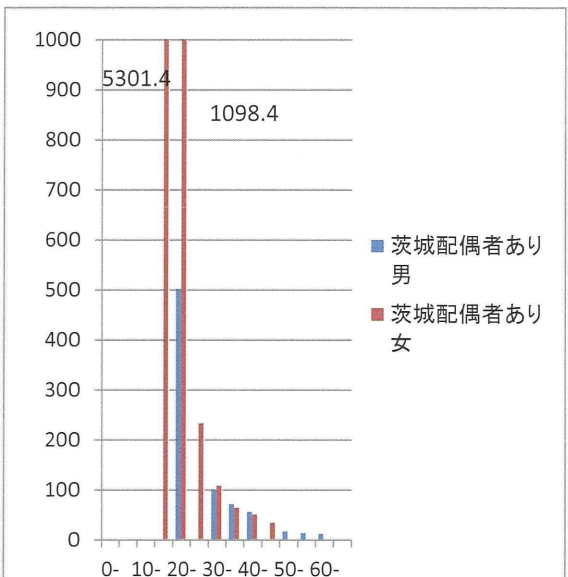
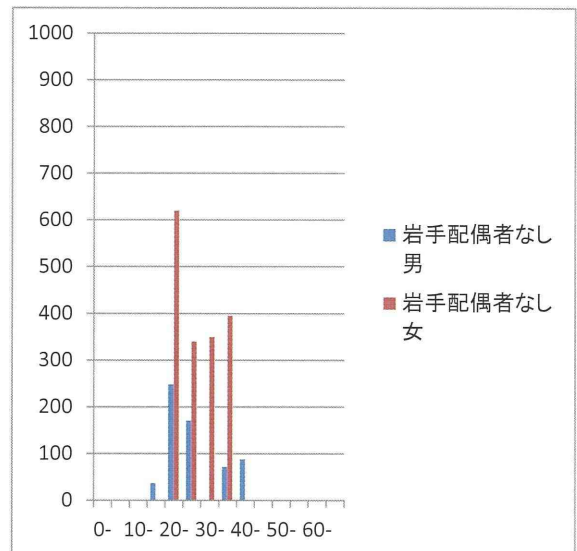
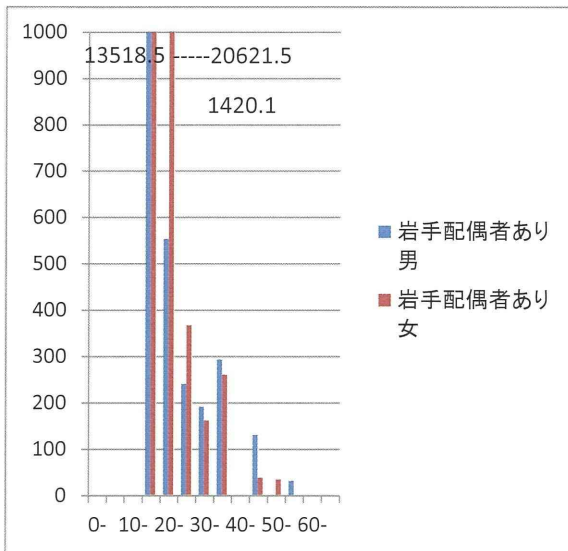
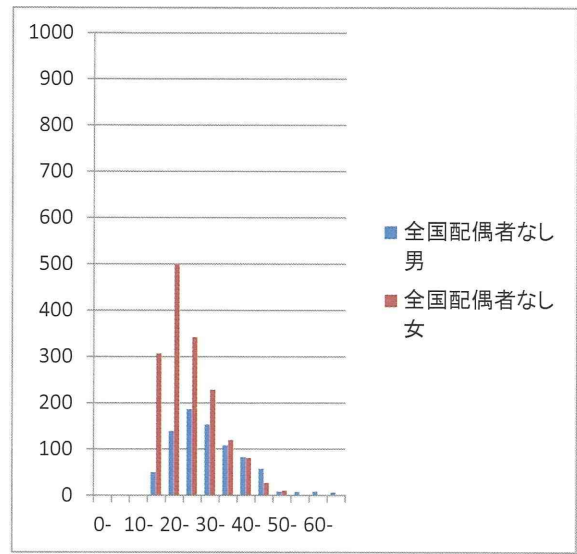
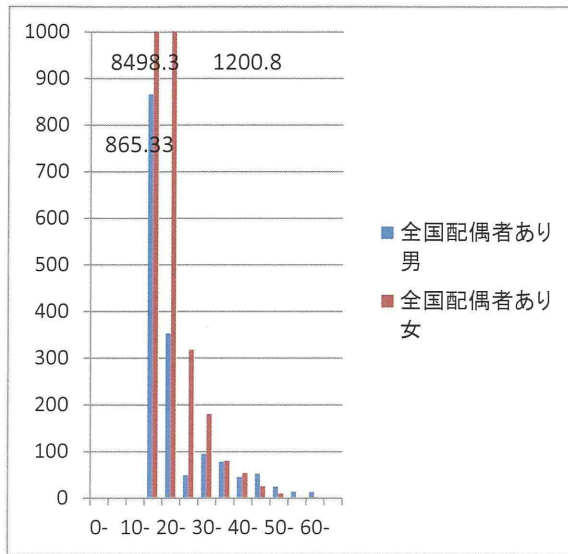
淋菌性尿道炎・頸管炎（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



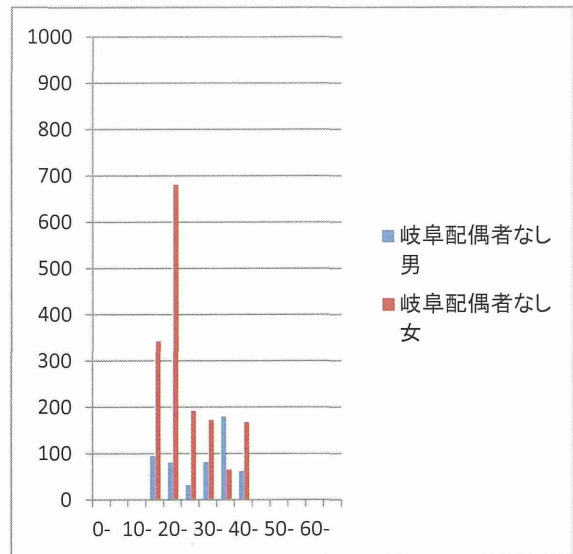
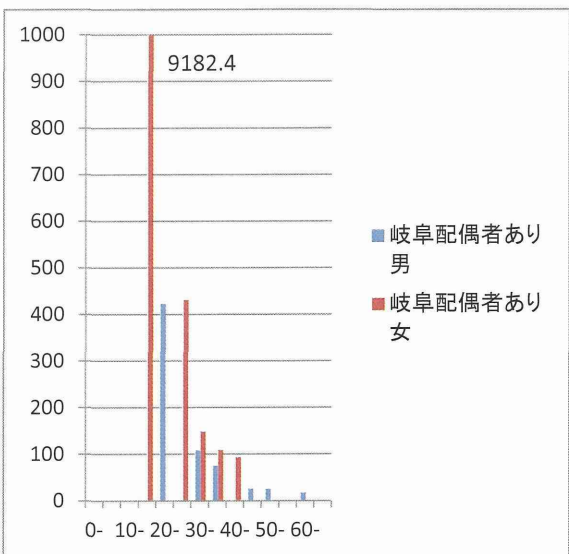
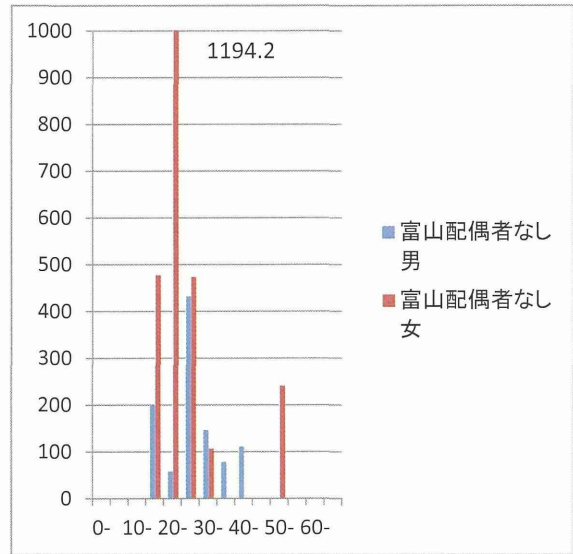
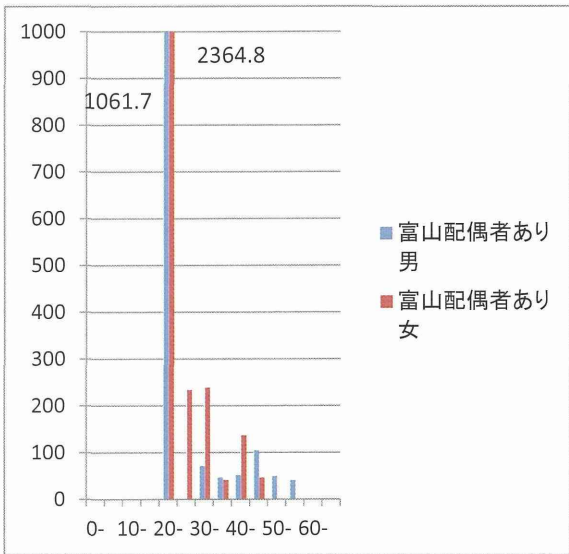
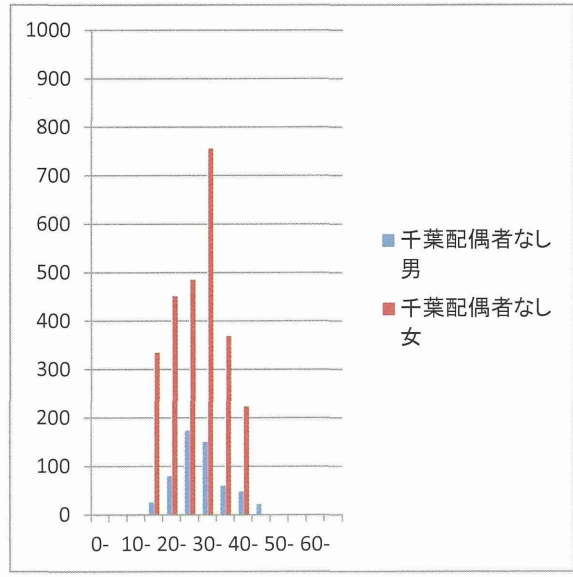
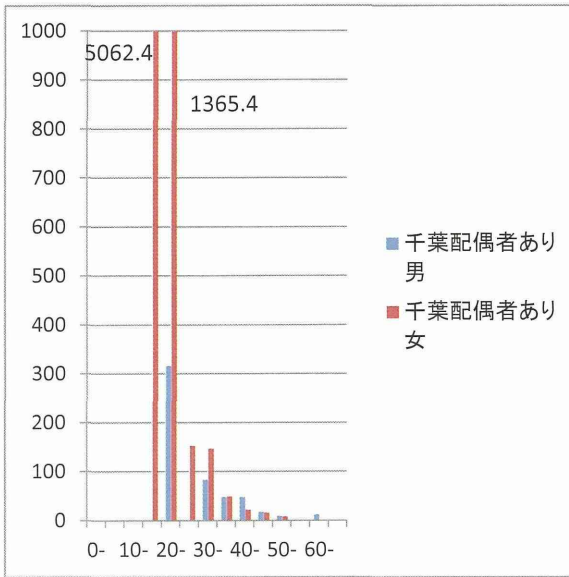
淋菌性尿道炎・頸管炎（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）



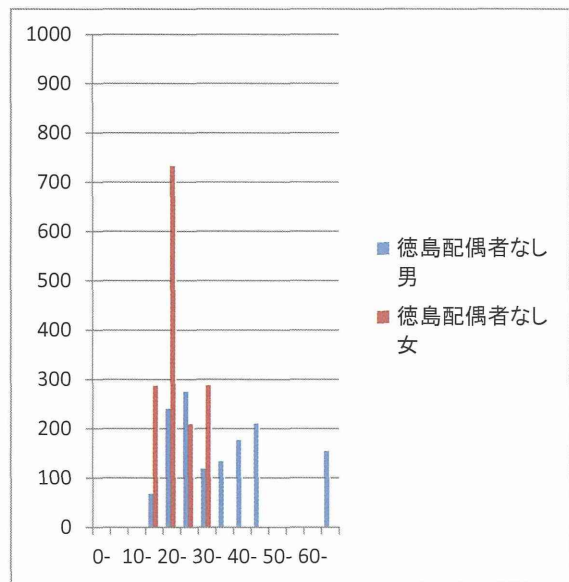
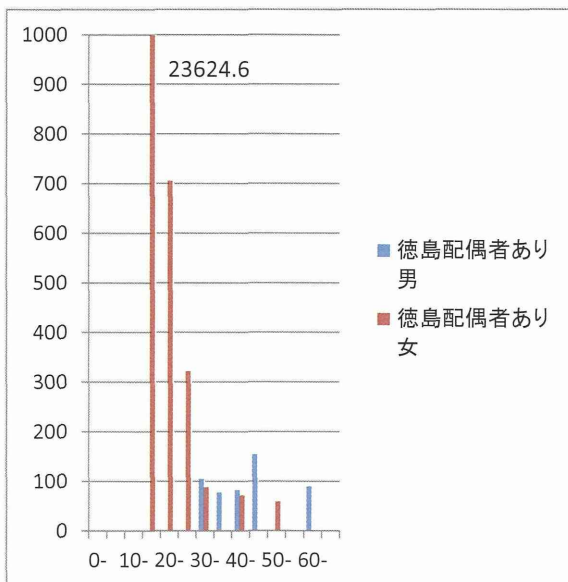
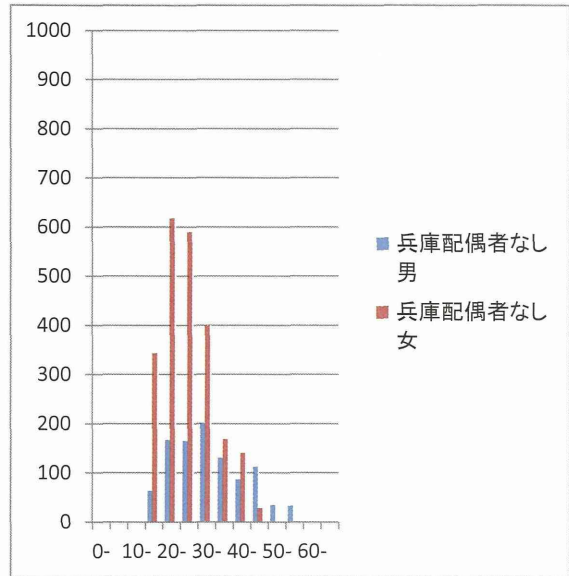
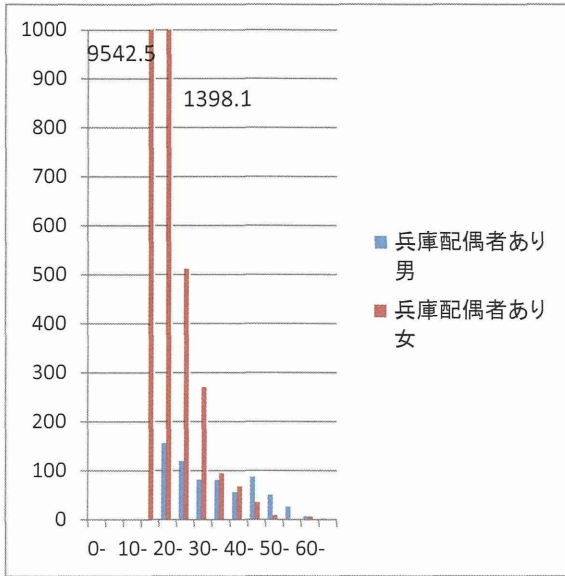
クラミジア 10万人年対 (縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢)



クラミジア 10万人年対 (縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢)



クラミジア 10万人年対 (縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢)



非淋菌非クラミジア尿道炎・頸管炎（縦軸：人口10万人対・人年、横軸：年齢）

