

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌の サーベイランスに関する研究

分担課題 地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的
調査解析機能の強化に関する研究
「アシネトバクター属菌の鑑別法に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所）
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

研究要旨 この研究では、*Acinetobacter* 属菌、特に *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) を構成する 4 つの菌種のうち、臨床的に重要な 3 つの *genospecies* (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) を迅速に鑑別する遺伝子検査法を開発した。当初は *gyrB* 遺伝子を標的としたが、その後 *rpoB* 遺伝子を対象とした multiplex PCR 法を考案し、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* を鑑別することが可能となった。この PCR 法の有用性を評価は、富山県内医療機関から分離された ACBC 109 株と愛媛県内の医療機関から分離された ACBC 28 検体を用いて、*rpoB* 遺伝子の塩基配列決定の結果と比較することで実施した。その結果、ACBC 構成菌種の鑑別能は *rpoB* 配列による系統解析結果とよく一致した。従って、実用レベルの鑑別法として使用できると思われる。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地衛研）は、公衆衛生領域で発生する様々な健康危機事例に際し、検査を通じて科学的エビデンスを提供し、健康危機事例の早期探知や拡大防止に資することを目的の一つとする。従って、近年問題となりつつある医療機関における薬剤耐性菌の広がりに対して、地衛研の役割が期待されるなかで、検査機能の強化が望まれている。

アシネトバクター属菌は、ブドウ糖非発酵グラム陰性短桿菌で、ヒトに病原性を示す菌種としては *Acinetobacter baumannii* がよく知られている。さらに、ヒトに対して感染症を起こす可能性がある *A. calcoaceticus*, *A. genospecies* (GS) 13TU (以下、*A. nosocomialis*)、*A. genospecies*

3 (以下、*A. pittii*) とは、ほぼ同様な生化学的性状を示すため、医療機関等で汎用されている自動同定機器や一般の検査法では正しく鑑別することは難しく、そのため *A. calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) と呼ばれている。さらに、アシネトバクター属菌は高い形質転換能をもち外来遺伝子を取り込むシステムを有していることに関連して、*A. baumannii* の多剤耐性化と医療機関でしばしば検出される *A. nosocomialis* や *A. pittii* との関連性など不明な点が多いのも事実である。アシネトバクター属菌は、医療機関内で院内感染や日和見感染を起こすことが知られており、特に *A. baumannii* は多剤耐性化しやすく、しばしば集団発生による死亡例も報告されている。このような中で 2011 年 1 月、薬剤

耐性アシネトバクターは感染症法の5類感染症(定点)に追加され、また、2014年9月には全数報告対象感染症となり、報告基準が設けられた。従って、*A. baumannii*の院内対策上、アシネトバクター属菌の分離状況を把握することは重要である。それには、ACBC構成菌種を簡便に鑑別する方法が必要である。

アシネトバクター属菌は、DNA-DNA分子交雑法で区別された遺伝子型(genospecies)で歴史的には分類されており、ACBCは生化学的性状での鑑別が難しいため、遺伝子型による簡便な鑑別法が利用されている。例えばbla_{OXA51-like}遺伝子を検出するアシネトバクター属菌は、*A. baumannii*とほぼ判定できることが知られている。しかし、この方法は極めて簡便ではあるが、細菌の鑑別法としての意味づけは不明である。また、16SrRNA配列による分類もDNA-DNA分子交雑法による分類には及ばない。そこで、極めて近縁な細菌の鑑別法として、蛋白質をコードしている遺伝子配列の多型を利用した鑑別法が開発されており、その対象遺伝子は、*recA*, *gyrB*, *rpoB*などがよく利用される。

本研究では、ACBCを構成する上記4つの菌種を迅速に鑑別することを可能にするPCRベースの方法を開発することを目的とし、当初は*gyrB*配列を対象とし、その後アシネトバクター属菌の鑑別に有効であるとされる*rpoB*の配列多型を複数のプライマーで検出するMultiplex PCR法を考案し、その有用性について検討、評価したので報告する。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株および供試DNA

臨床分離*A. baumannii* 8株(Ab1~8)は、感染研細菌第二部から分与を受けた。また、*Acinetobacter*属臨床分離株50株(Ab25~74, 民間検査会社より買上)109株(AcT001~069, 071~078, 080~111;平成25~26年度に富山県内で分離された臨床分離株、

表1)及び28株(E01~E28;平成26年度に愛媛県内で分離された臨床分離株、表2)を用いた。

*Acinetobacter*属菌の陽性コントロールとして、感染研細菌第二部より、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, 及び*A. calcoaceticus*由来のゲノムDNAを用いた。

B-2. 培養とDNA抽出

トリプチケースソイ寒天培地(TSA;日本ベクトン・ディッキンソン、BD)で生育させた新鮮コロニーの一部を100µL 5%(W/V)キレックス100(バイオ・ラッドラボラトリー)に懸濁し、100 10分間処理を行い、遠心上清をPCRの鋳型とした。

PCRは、市販Multiplex PCR Amplification Kit (Qiagen)あるいはKODFX (Toyobo)を使用した。

B-3. 感受性試験

アシネトバクター属菌の薬剤感受性試験は、センシディスク(日本BD)を用い、判定はディスクの判定法に従った。使用した12ディスクは以下の通りである:セフトキシム(CTX), セフトジジム(CAZ), イミペネム(IPM), メロペネム(MEPM), アズトレオナム(AZT), セフェピム(CFPM), ピペラシリン(PIPC), アミカシン(AMK), シプロフロキサシン(CPFX), ミノサイクリン(MINO), コリスチン(CL), スルフィソキサゾール(G.25)。

B-4. PCRとDNA sequencing

供試菌株から抽出したDNAを用いたPCRは、bla_{OXA51-like}遺伝子、bla_{OXA23-like}遺伝子及びintegronマーカーであるintegrase遺伝子を検出するプライマーを用いて実施した(表5、bla_{OXA51-like}遺伝子のPCR結果のみ記載)。PCRは、QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Inc.)を用いて、増幅産物は、1.5%アガロースS(ニッ

ポンジーン)で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

ACBC 鑑別 PCR は、KODFX (Toyobo) を使用し、プライマーセットは MC-6/MD-6 を用いた (図 5、表 5)。増幅産物の検出は、2% NuSieve®3:1 Agarose (Takara) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

rpoB の部分配列決定は、La Scola らの報告 (J.Clin.Microbiol., 44:827-832, 2006) を参照して、*rpoB* 内の Zone1 及び Zone2 の配列解析を行った (図 5)。配列決定用の鋳型調製は、PCR 後、増幅物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver3.1 を用いて解析した。得られたデータは、Sequencher® で塩基配列の品質チェック、トリミング後、Web ベースの Blast 検索を実施し、菌種を推定し、*rpoB* 塩基配列による鑑別結果とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離れた臨床分離株のみを用いているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

C-1. *gyrB* 遺伝子を標的とした ACBC 鑑別のための Multiplex PCR 用プライマーの設計と評価

gyrB 遺伝子をターゲット遺伝子として鑑別するためのプライマーの設計を行った。*gyrB* 遺伝子の配列は Yamamoto ら (Int.J.Syst. Bacteriol., 49:87-95, 1999) の配列を用いた。今回、解析に使用した配列の Accession No. は、*A. baumannii* 由来の配列は、AB008684, AB008699, AB008700, *A. calcoaceticus* 由来配列は、AB008685, AB008702, AB008701, *A. pittii* 由来配列は、AB008704, AB008703, AB008686, 及び *A. nosocomialis* 由来配列は、AB008708, AB008706, AB008705 である。

これらの配列を多重配列させ (図 1) Multiplex PCR のプライマーを設計する位

置として、Site A~D を選定して、ACBC 構成菌種を特異的に認識することができるプライマーを設計した。(図 2、表 3)。ただし、表 4 中の Ac#4-6 プライマーの SiteD を検出するプライマーは、公的データベースからこの領域の配列が得られなかったため今回は省略した。従って、Ac#4-6 プライマーは 6 本のオリゴプライマーで構成されている。

表 4 で示した 4 つの GS に特異的に検出するように設計した 4 つのプライマー混合溶液の特異性を、臨床分離 8 株 (Ab1~8) を用いて調べた。

今回、使用した鋳型 DNA はいずれも *A. baumannii* であり、Ac#1-8 のプライマーセットのみ増幅物が観察され、その他のプライマーセットは全く反応しなかった (図 3)。しかし、結合部位の異なる複数のプライマーを完全に相補的な形で使用しており、図 2 で示すように、添加したすべてのプライマーが増幅に関与するとすれば、約 250~800bp の増幅物が 3 本程度 (図 4 の a, b, c) 検出されると予想されたが、Ac#1-8 プライマーの増幅物は約 500bp であった (図 4)。

C-2. 標準 DNA を鋳型として使用した場合の *gyrB* 遺伝子を標的とした ACBC 鑑別のための Multiplex PCR の評価

Acinetobacter 属菌の標準 DNA を用いて Multiplex PCR 用プライマー混合液 (表 4) を特異性を調べた。その結果、GS13TU 検出用に作製した Ac#4-6 はいずれの DNA に対しても全く増幅しなかったが、他のプライマー混合液はほぼ GS 特異的な増幅物が得られた。その増幅物の電気泳動像から、図 4f に示した増幅物 b がよく増幅していた。また、*A. baumannii* と *A. nosocomialis*, *A. pittii* と *A. calcoaceticus* の鋳型を用いたとき、使用したプライマーが相互に反応し、増幅物が観察された。

C-3. *rpoB* 遺伝子を標的とした ACBC 鑑別のための Multiplex PCR 用プライマーの設計

gyrB 遺伝子をターゲットとして、

multiplex PCR 法により、菌種同定が可能となるか検討し、完全には ACBC の鑑別を行うことは困難であった。そこで、次に *rpoB* 遺伝子をターゲットとして、プライマーの設計を行った(表 5、図 5)。La Scala, B ら (J.Clin.Microbiol., 44:829, 2006)の論文に記載されている *rpoB* 遺伝子の Zone1 と Zone2 をほぼカバーする 861bp を含む、*A.*

baumannii 由来 26、*A. calcoaceticus* 由来 13、*A. nosocomialis* 由来 19、及び *A. pittii* 由来 21 配列を公的 DNA バンクから得た。これらの配列から、ACBC の構成各菌種を PCR で区別可能か検討したが、いずれも種特異的な 4 つのプライマーの設計は困難であった。そこで、この 861bp の配列中、4 種のアシネトバクテリウム属菌を鑑別可能とするためのプライマー結合部位を検索した。4 種に共通、*A. baumannii* と *A. nosocomialis* に共通、*A. calcoaceticus* と *A. pittii* に共通、あるいは種特異的な鑑別プライマーの結合部位として、領域 1 ~ 5 (図 5 の *rpoB*-1 ~ 5 と表示、ただし、*rpoB*-1, 4 は省略、また、*rpoB*-45 は、*rpoB*-4 と 5 の間の部位であることを示している)を選択し、いくつかの組合せで、種特異的な Multiplex PCR の泳動パターンが得られるかを検討した。最終的に、2 つの反応チューブを用いる Multiplex PCR で、*A. baumannii* と *A. nosocomialis* を主に鑑別する PCR-A と *A. calcoaceticus* と *A. pittii* を鑑別する PCR-B として設計した。また、今回反応は 2 反応として実施するため、2 つの反応を泳動後、確認できるようにアシネトバクテリウム属菌を共通に増幅する 16SrRNA 配列を検出し、異なる増幅サイズとなるようにプライマーを新たに設計し、それぞれ加え、前者についての混合プライマー MC-6、後者については混合プライマー MD-6 を構築した(表 5)。

この PCR の条件は、以下の通り実施した。

鋳型 DNA 溶液	2 μ L
混合プライマー	4 μ L
2mM dNTP	μ L
2 \times KODFX master mix	10 μ L
KODFX (Toyobo)	0.4 μ L
Total	(up to) 20 μ L

サイクル条件

94 $^{\circ}$ C, 2min.
(98 $^{\circ}$ C, 10sec.- 55 $^{\circ}$ C, 30sec.- 68 $^{\circ}$ C, 1min.), 30 cycles
68 $^{\circ}$ C, 2min.

C-4. プライマーの評価

混合プライマー MC-6 (PCR-A) 及び MD-6 (PCR-B) を用いて、ACBC 構成アシネトバクテリウム属菌の標準株 DNA と一部臨床分離株を用いて、PCR を実施した(図 6)。その結果、PCR-A で、数本の増幅物が検出されるなかで 600bp 増幅物が検出された場合には、*A. baumannii*、120bp と 700bp 増幅物が検出された場合には、*A. nosocomialis*、PCR-B では、同じく複数の増幅物が検出されるなかで、120bp 付近と 700bp 増幅物が検出された場合は、*A. pittii* と判定することが可能であることを確認した。ここで、PCR-B で 120bp 付近に 2 バンド検出された。

一方で、*A. calcoaceticus* については、積極的に鑑別する増幅物が得られなかった。

C-5. 医療機関で分離されたアシネトバクテリウム属菌を用いた PCR 鑑別法の評価

平成 25 年度及び 26 年度、富山県内の医療機関に協力を依頼し、アシネトバクテリウム属菌の収集した 69 株を用いて、MC-6/MD-6 混合プライマーを用いた PCR を評価した。供試した 109 株の薬剤感受性試験、PCR による遺伝子保有状況、及び *rpoB* 配列による菌種の同定結果を示した(表 1)。この 109 株の *rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 45/109(41%); *A. nosocomialis*, 16/109 (15%); *A. pittii*, 19/109 (17%); ACBC 以外を *A. spp.* とすると、30/109 (28%)であり、その内訳は *A. soli*, 6/109 (5%); *A. bereziniae*, 2/109 (2%); *A. radioresistens*, 2/69 (2%); *A. grimontii*, 2/69 (2%); *A. guillouiiiae*, 2/109 (2%); *A. hemolyticus*, 1/109 (1%); *A. calcoaceticus*, 1/109 (1%); *A. junii*, 1/69 (1%); *A. ursingii*, 1/109 (1%)であった(図 7)。

この 109 株を用いた、MC-6/MD-6 を用い

た PCR を実施した。

A. baumannii と *A. nosocomialis* については、*rpoB* 配列結果と PCR の結果は完全に一致した。また、PCR で ACBC 構成菌種に該当しない場合は、*A. spp.* にカウントしているが、*rpoB* 配列と PCR の結果が一致しない株が 3 株 (AcT037, 082 及び 092) が存在した。従って、*rpoB* 配列で *A. spp.* と判定された株を除いた 80 株の、*rpoB* 配列と PCR の結果の一致率は、96% (77/88) であった。

C-6. 愛媛県内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いた PCR 鑑別結果

愛媛県内で分離された *Acinetobacter* 属菌 28 株を用いて、本鑑別法で評価した。

まず、感受性試験の結果であるが、カルバペネム (MEPM) に耐性、ニューキノロン (CPFX) に耐性株が 1 株検出された。この株は、その他 CTX, CAZ, AZT, CFPM, PIPC, G.25 に耐性を示した。残りの 27 株はほとんどの薬剤に対して感性であった (表 7)。

この 28 株について、*rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 19/28 (68%); *A. nosocomialis*, 1/28 (3.6%); *A. pittii*, 4/28 (14%); *A. spp.*, 4/28 (14%) であり、*A. spp.* 株の内訳は、*A. soli*, 2/28 (7.1%) と *Acinetobacter* GS13B と *A. spp.* が一株ずつであった (図 8、表 7)。*rpoB* 配列の同定結果と PCR での鑑別結果を ACBC に限定して比較すると *A. baumannii*, *A. nosocomialis* 及び *A. pittii* については、完全に一致していた。

D. 考察

アシネトバクター属菌、特に ACBC を構成する 4 つの菌種を迅速に鑑別する遺伝子検査法を検討した。昨年度は、*gyrB* 遺伝子をターゲットとしたが、今年度は *rpoB* を対象とした Multiplex PCR 法を開発し、その型別能力を検討した。

rpoB 配列によるアシネトバクター属菌の鑑別については、La Scola, Bらは、*rpoB*

配列および *RpoB* 遺伝子上流と下流のスペーサー領域の配列を用いると鑑別することが可能であることを報告している。ここで彼らの報告している *rpoB* 配列中の Zone1 および Zone2 の領域は、鑑別能力が高く、*A. baumannii* のこの領域の配列を抽出して blast 検索を行うと、公的データベースに登録されている *rpoB* 配列が、*A. baumannii* - *A. nosocomialis* - *A. pittii* - *A. calcoaceticus* のビットスコアの高い順にヒットした。これは、相同性の高さをビットスコアで換算し、スコアの高い順に並べているが、菌種ごとにクラスターを形成していることがわかる (図 9)。従って、この配列により、ほぼ ACBC を構成菌種が *rpoB* 配列で鑑別できる可能性を示している。しかし、*A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. calcoaceticus* の各クラスター内に、*A. spp.* とされる配列が存在すること (図 9. 白抜きの配列) また *A. pittii* クラスター内に *A. calcoaceticus* の配列が存在しており (図 9. 矢印で示した配列) blast 検索に依存するアシネトバクター属菌の同定には注意が必要であることがわかる。以上のような問題点はあるものの ACBC の鑑別を迅速に決定する方法の要望は高く、*rpoB* 配列上の種特異的な多型を検出する PCR 法の開発を行った。

しかし、鑑別する対象の ACBC の構成種は非常に近縁であるので、この 4 種の菌種を同定する単一の PCR プライマーの設計は困難を極めたので、multiplex PCR 法とし、ACBC の *rpoB* 配列の Zone1 および Zone2 領域をカバーする領域を対象とした、プライマー効率の差を利用した multiplex PCR、さらに *A. baumannii*-*A. nosocomialis* と *A. pittii* -*A. calcoaceticus* それぞれの検出能力を高めるため 2 反応系 (PCR-A と PCR-B) として開発した (表 5)。また、今回の PCR 法は、アガロース電気泳動にてその増幅物を検出するため、アシネトバクター属菌特異的な 16SrRNA を検出するプライマーを加え、サイズの異なる増幅物が検出できるように添加した、MC-6/MD-6 混合プライマーを作製した。

MC-6/MD-6 混合プライマーの評価を、富山県の医療機関で分離された 109 株のアシネトバクテリウム属菌を用いて行った。評価に用いた 109 株の感受性試験等の検査結果は表 1 に示した。この 109 株を用いた PCR 鑑別結果を *rpoB* 配列解析と比較したところ、109 株中 67 株は、*rpoB* 結果と一致し (106/109, 97%) ACBC 構成菌種の鑑別がほぼ可能と思われた (表 3)。

ここで *rpoB* 配列と PCR の結果について、3 株が一致しなかった。そのうちのひとつである AcT037 は、*rpoB* 配列から *A. calcoaceticus* とされたが、この配列は、ゲノム解析株として登録されていたが、図 9、10 では *A. pittii* の配列に含まれる配列と同一であり、PCR の結果、*A. pittii* と判定されたことと矛盾しない。

また、AcT082 及び AcT092 でも同様であった (図 11)。*rpoB* 配列の Blast 検索の結果から、典型的な *A. pittii* の配列とは異なっており、*A. spp* と判定が正解と思われた。この株は、*A. pittii* の variant 株の可能性はあるが、これを明らかにするためにはさらに解析が必要である。

以上のように、*rpoB* 遺伝子内の塩基配列の違いを Multiplex PCR に反映させた鑑別法であるが、鑑別能を検討したところ、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* について、迅速な鑑別が可能であることを分かった。さらにこの方法を評価するため、愛媛県で分離された株で評価した。その結果、*rpoB* 配列結果と PCR の結果はほぼ相関することが確認された。

また、*Acinetobacter* 属菌の分離割合をみると、富山県では合計 109 株のうち、*A. baumannii* は、41.3%で、ほとんどの薬剤に感性であり、現在、薬剤耐性となりやすいとされる *A. baumannii* 内の遺伝系統と知られている international clone II (ICII) は、含まれていない可能性がある (未実施)。別の全国調査によると *A. baumannii* の分離率は 74%であるとされており、また愛媛県ではニューキノロンとカルバペネム耐性株が一株分離されているが、*A. baumannii* の分離率は 68%であった。このことから、*A.*

baumannii の分離率が高いほど、高度な薬剤耐性菌とされる ICII の系統が入り込んでいることが示唆される。今後、更なる調査が必要である。

E. 結論

ACBC 構成アシネトバクテリウム属菌を PCR で鑑別する実用的な方法を開発し、その有用性を評価した。

今回、開発した ACBC 構成菌種の鑑別法は、医療機関で分離される、*A. calcoaceticus* 以外の 3 種が対象である。わずかに非典型株の存在のため、*rpoB* 配列の解析が必要となる場合もあるが、今回の鑑別法は、迅速な方法として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 綿引正則、清水美和子、金谷潤一、木全恵子、磯部順子、松井真理、鈴木匡弘、荒川宜親、柴山恵吾、佐多徹太郎。*A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (ACBC) の PCR による同定法開発の試み。第 88 回日本感染症学会学術講演会、平成 26 年 6 月 18 日 ~ 20 日 (福岡市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 謝辞

愛媛県立衛生環境研究所・微生物試験室の仙波敬子先生には、今回開発した検査法について、評価試験にご協力を頂きました。

ここに感謝の意を表します。

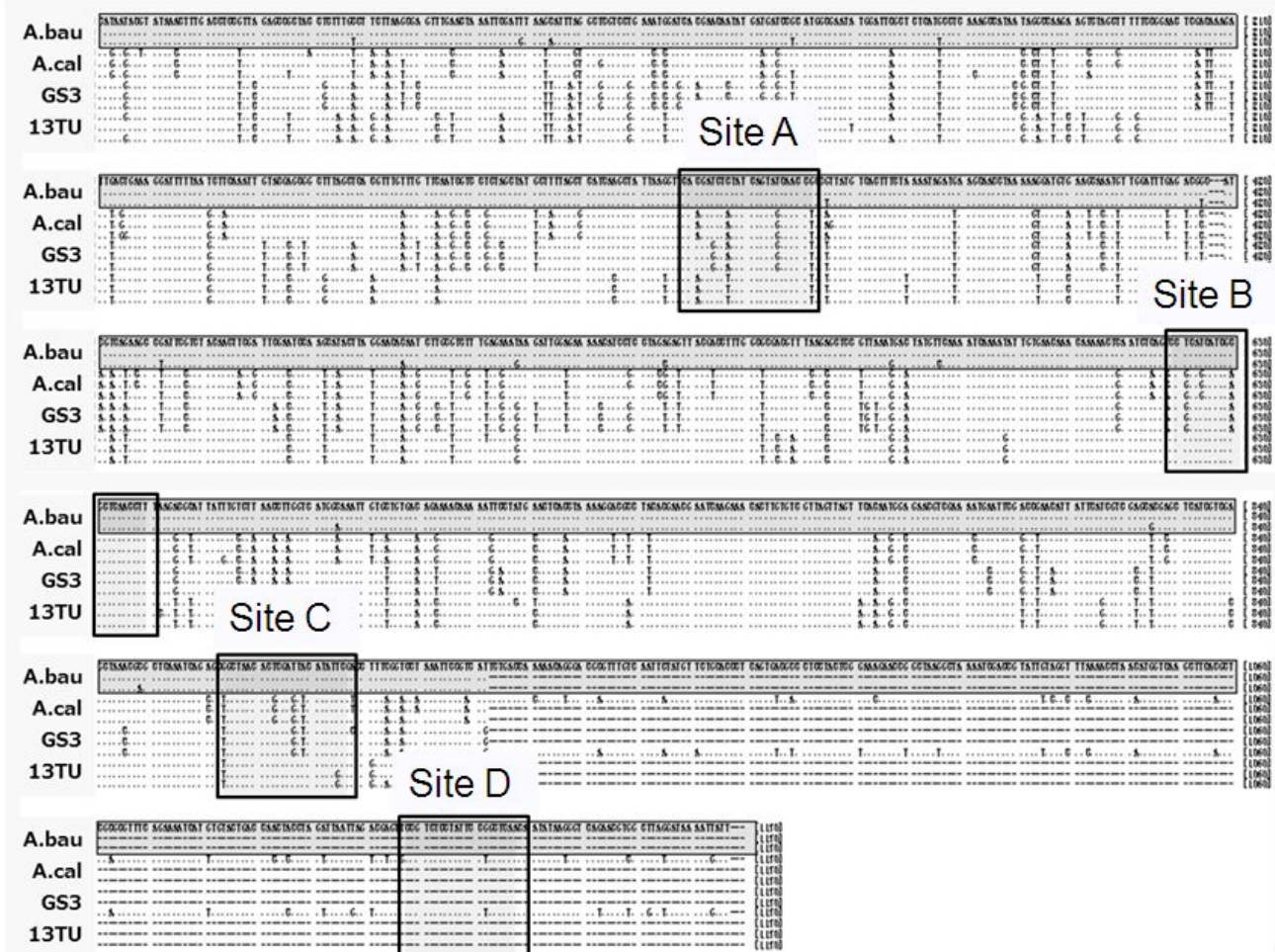


図1. *Acinetobacter* 属菌の *gyrB* 配列の多重配列と PCR 用プライマーのターゲット領域 (SiteA~D) *A. bau*, *A. baumannii*; *A. cal*, *A. calcoaceticus*; GS3, *A. pittii*; 13TU, *A. nosocomialis*.

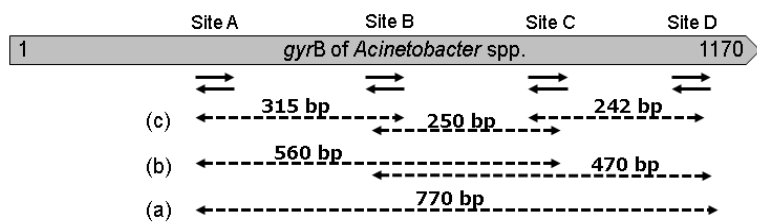


図2. *Acinetobacter* 属菌の *gyrB* 遺伝子と multiplex PCR

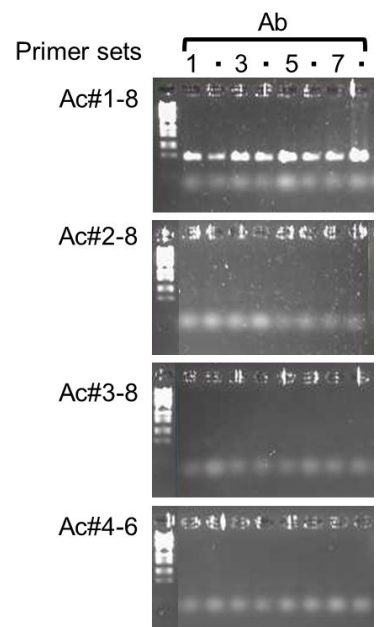


図3. *Acinetobacter* 属菌の *gyrB* 遺伝子と multiplex PCR プライマーの評価

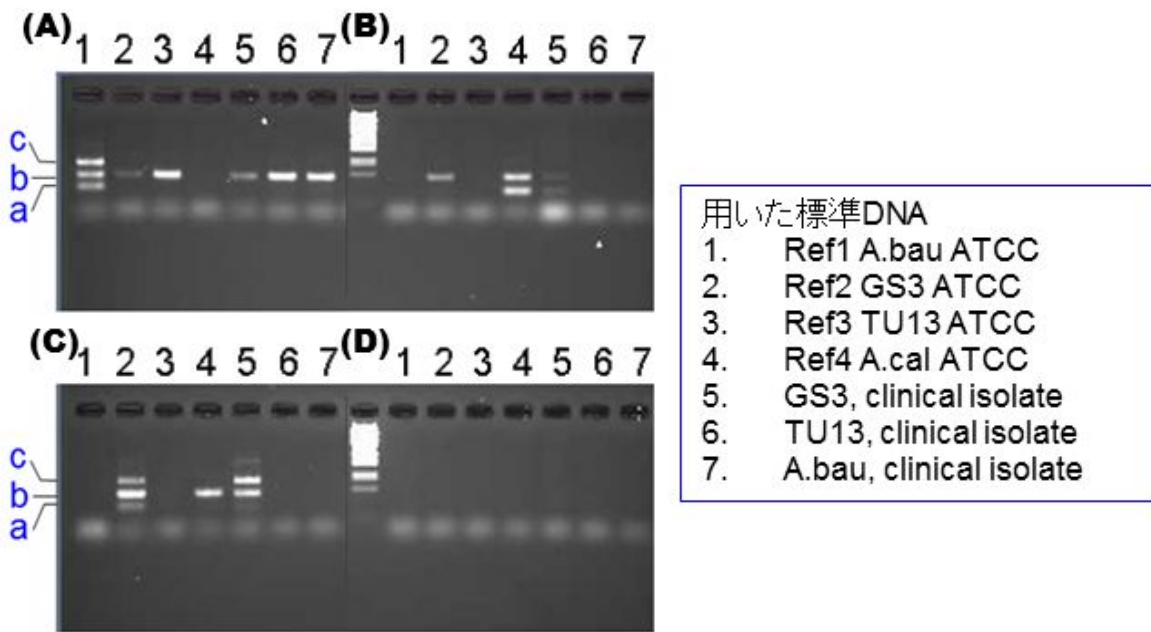


図4. *gyrB* 遺伝子をターゲットとした multiplex PCR による ACBC の鑑別

標準 DNA (lane 1~7) を鋳型として、用いたプライマー混合液は(A)Ac#1-8, (B)Ac#2-8, (C)Ac#3-8, (D)Ac#4-6 を使用した (詳細は、表 3 , 4 を参照)。

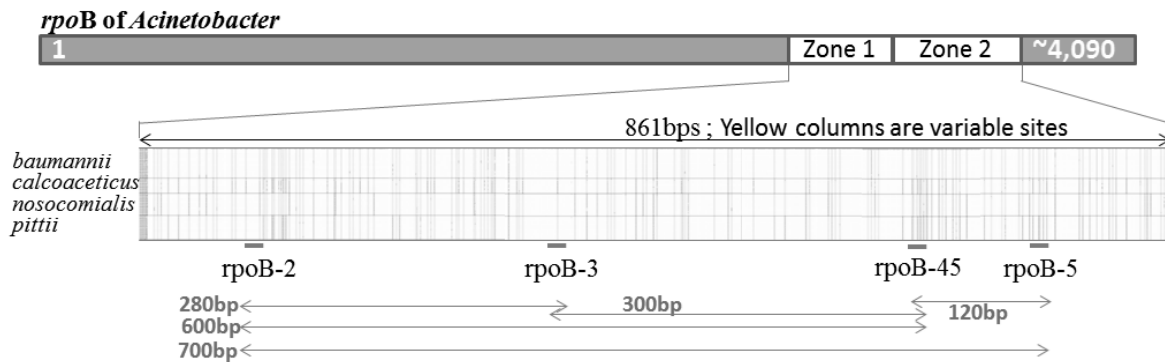
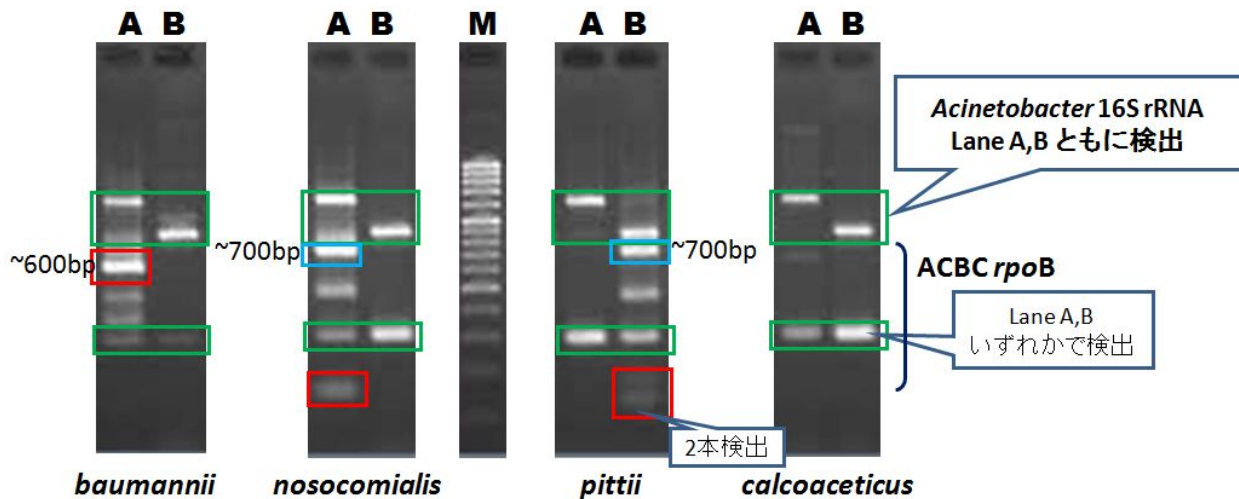


図5 . *rpoB* をターゲットとした鑑別 PCR のプライマー結合部位

MC-6/MD-6を用いたACBC構成4菌種の鑑別点:まとめ

Lane A: preference reaction for *A. baumannii* or *nosocomialis*

Lane B: preference reaction for *A. pittii* or *calcoaceticus*



本法のPCRは、KODFX(Toyobo)を使用

7

鑑別点：

PCR (lane) A 及び B とともに 16S rRNA 由来の増幅サイズが異なる増幅物が検出されること。

A.baumannii と *A.nosocomialis* は、PCR (lane)A の増幅物で以下のとおり、判定する。

- ・ 600bp が検出されれば、*A.baumannii* と判定
- ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A.nosocomialis* と判定

A.pittii は、PCR (lane)B の増幅物の有無で判定する。

- ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A.pittii* と判定
- ・ *A.calcoaceticus* は、今のところ判定できない。

図6 . MC-6/MD-6 プライマーセットを用いた ACBD 構成 4 菌種の鑑別点

平成25-26年度 医療機関分離ACBC 109株の同定結果(富山県)

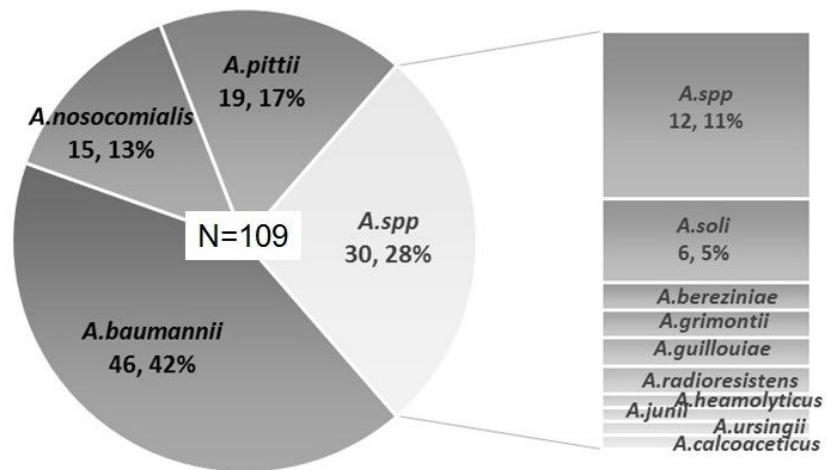
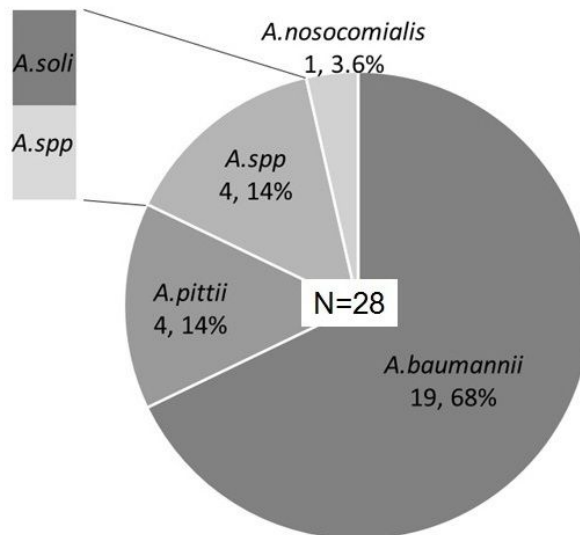


図7. 平成25-26年に富山県の医療機関から分離されたACBC株の同定結果



- *baumannii*の分離率は、68%と全国データ(74%)に近い。
- 二剤耐性(MEPM&CPFX)の*baumannii*が1株分離されている。

図8. 平成26年に愛媛県の医療機関から分離されたACBC株の同定結果

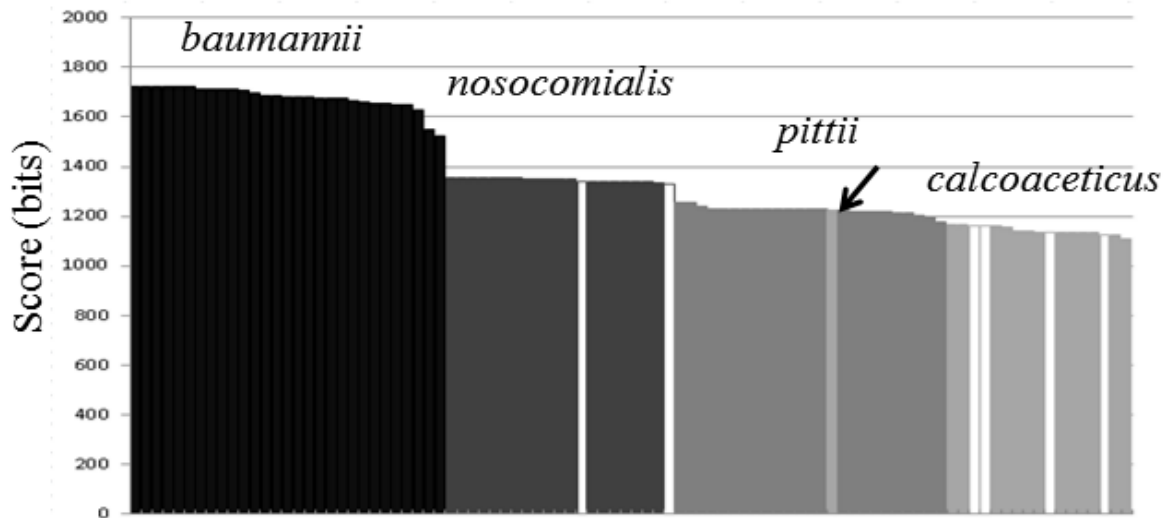


図9 . *A.baumannii* の *rpoB* 861 配列をクエリーとして、Blast 検索したときの ACBC 構成菌種のビットスコア (については、本文参照)

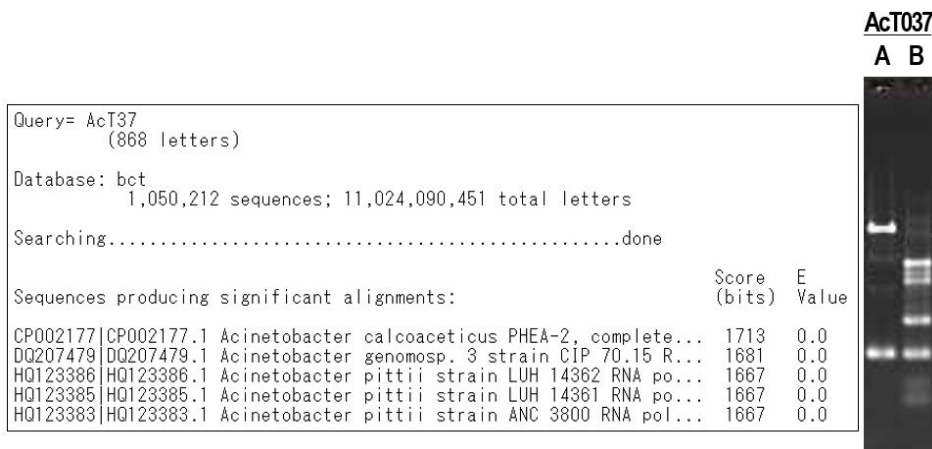
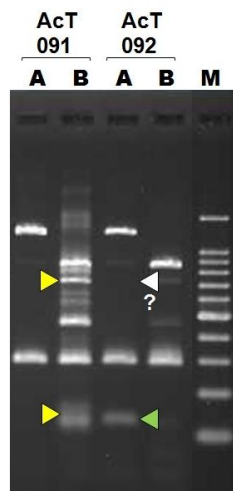


図10 . *rpoB* 配列で *A.calcoaceticus* と判定されるが PCR で *A.pittii* と判定された例 (AcT037)

PCR判定と*rpoB*配列の不一致例 (AcT082, 092)



rpoB PCRの判定

AcT091: 典型的な *pittii* パターン
rpoB 配列も *pittii* と一致
 AcT-92: 非典型 *nosocomialis*?
*rpoB*配列は *pittii* にヒット

rpoB sequenceとのblast結果

AcT091: Identities=861/861(100%)
pittii と一致
 AcT092: Identities=842/867(97%)
pittii と判定

• 配列の多型を検出: PCRの限界

図12 . PCR 判定と *rpoB* 配列解析による鑑別結果の不一致例

表1. Multiplex PCR の評価に使用したアシネトバクター属菌の薬剤感受性及び遺伝子解析結果

菌株ID	使用薬剤ディスク													OXA51遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	M EPM	AZT	CFPM	PIPC	AM K	CPFX	M INO	CL	G 25	PCR	PCR	sequencing		
Act001	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act002	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act003	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act004	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act005	I	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act006	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.berezinae	A.berezinae		
Act007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.grimontii	A.grimontii		
Act008	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.soli	A.soli		
Act009	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act010	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act011	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act012	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act013	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	-	A.soli	A.soli		
Act014	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act015	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act016	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act017	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act018	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act019	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act020	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act021	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.berezinae	A.berezinae		
Act022	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act023	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act024	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act025	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act026	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act027	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act028	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act029	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.junii	A.junii		
Act030	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.guillouiae	A.guillouiae		
Act031	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act032	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act033	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	-	A.pittii	A.pitti		
Act034	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act035	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act036	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.soli	A.soli		
Act037	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.calcoaceticus		
Act038	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.radioresistens	A.radioresistens		
Act039	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.radioresistens	A.radioresistens		
Act040	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act041	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act042	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act043	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act044	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act045	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act046	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act047	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act048	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act049	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act050	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act051	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act052	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act053	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act054	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act055	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act056	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act057	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act058	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act059	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act060	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act061	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act062	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act063	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.grimontii	A.grimontii		
Act064	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act065	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act066	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act067	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act068	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.soli	A.soli		
Act069	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		

表1. Multiplex PCR の評価に使用したアシネトバクター属菌の薬剤感受性及び遺伝子解析結果
(続き)

菌株ID	使用薬剤ディスク													OXA51遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	M EPM	AZT	CFPM	PIPC	AM K	CPFX	M INO	CL	G 25	PCR	PCR	sequencing		
Act070	no growth																
Act071	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act072	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act073	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act074	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act075	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act076	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act077	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act078	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act079	no growth																
Act080	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli		
Act081	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act082	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.pitti		
Act083	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act084	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act085	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.guillouiae		
Act086	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.ursingii		
Act087	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act088	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act089	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act090	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act091	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act092	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.pitti		
Act093	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act094	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act095	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act096	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act097	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act098	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act099	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act100	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act101	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act102	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act103	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp		
Act104	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act105	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis		
Act106	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act107	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii		
Act108	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act109	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli		
Act110	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pitti		
Act111	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	-	A.spp	A.heamolyticus		

表2

平成26年度 医療機関分離ACBC 28株の同定結果(愛媛県)

菌株ID	使用薬剤ディスク												OXA51遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G.25	PCR	PCR	sequencing	
E01	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E02	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E03	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E04	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.soli</i>	
E05	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E06	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E07	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E08	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.soli</i>	
E09	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E10	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E11	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E12	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E13	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E14	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	-	<i>A.nosocomialis</i>	<i>A.nosocomialis</i>	
E15	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E16	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pitti</i>	
E17	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.spp</i>	
E18	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E20	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E21	I	S	S	S	I	S	I	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E22	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	R	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E23	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pitti</i>	
E24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pitti</i>	
E26	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	<i>A.pittii</i>	<i>A.pitti</i>	
E27	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	+	<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>	
E28	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	-	<i>A.spp</i>	<i>A.GS13B</i>	

表3. gyrB 遺伝子を検出するためのプライマー配列

Primer No.	Primer Name	Sequence (5' -> 3')	Target GS ^a
2447	AB_gB319f	GAGCATGTGTATGACTATGAAGG	bau
2448	AB_gB319r	CCTTCATAGTCATACACATGCTC	bau
2449	AG3_gB319f	GAGCACGTATATGACTACGAAGG	GS3
2450	AG3_gB319r	CCTTCGTAGTCATATACGTGCTC	GS3
2451	AC_gB319f	GAACATGTATAAGACTACGAAGG	cal
2452	AC_gB319r	CCTTCGTAGTCTTATACATGTTT	cal
2453	AT13_gB319f	GAACATGTTTATGACTATGAAGG	13TU
2454	AT13_gB319r	CCTTCATAGTCATAAACATGTTT	13TU
2455	AB_gB636f	GGTGATGATGCGCGTGAAGGT	bau&13TU
2456	AB_gB636r	ACCTTCACGCGCATCATCACC	bau&13TU
2457	AG3_gB636f	GCGGATGATGCACGTGAAGGT	GS3
2458	AG3_gB636r	ACCTTCACGTGCATCATCGCC	GS3
2459	AC_gB636f	GCGGACGATGCACGTGAAGGT	cal
2460	AC_gB636r	ACCTTCACGTGCATCGTCGCC	cal
2461	AB_gB883f	CCGTAAGAGTGCATTAGATATTG	bau
2462	AB_gB883r	CAATATCTAATGCACTCTTACGG	bau
2463	AG3_gB883f	TCGTAAGAGTGCCTTGATATTG	GS3
2464	AG3_gB883r	CAATATCAAGTGCCTCTTACGA	GS3
2465	AC_gB883f	TCGTAAGAGCGCACTTGATATTG	cal
2466	AC_gB883r	CAATATCAAGTGCCTCTTACGA	cal
2467	AT13_gB883f	TCGTAAGAGTGCATTAGATATCG	13TU
2468	AT13_gB883r	CGATATCTAATGCACTCTTACGA	13TU
2469	AB_gB1125f	GGCTGTGGTATTGGCCGTGAA	bau
2470	AB_gB1125r	TTCACGCGCAATACCACAGCC	bau
2471	ACG3_gB1125f	GGCTGTGGTATTGGTCGTGAA	GS3 & cal
2472	ACG3_gB1125r	TTCACGACCAATACCACAGCC	GS3 & cal

^a GS, genospecies; bau, *A.baumannii*; GS3, *A.GS3 (A.pittii)*; 13TU, *A.GS13TU (A. nosocomialis)*

表4 . *gyrB* 遺伝子をターゲットとした ABC-GS 型別のために設計した Multiplex PCR 用プライマー液の構成

Primer Mix# ^a	Target GS ^b	A	B	C	D
Ac#1-8	<i>A. baumannii</i>	2447 ^c	2455	2461	2469
		2448	2456	2462	2470
Ac#2-8	<i>A. calcoaceticus</i>	2451	2459	2465	2471
		2452	2460	2466	2472
Ac#3-8	<i>A. GS3</i>	2449	2457	2463	2471
		2450	2458	2464	2472
Ac#4-6	<i>A. GS 13TU</i>	2453	2455	2467	
		2454	2456	2456	-

表5 . プライマーリスト

Primer Name	Sequence, 5' to 3'	Reference
OXA-51-likeF	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	JCM, 44:2974(2006)
OXA-51-likeR	TGGATTGCACTTCATCTTGG	JCM, 44:2974(2006)
OXA-23-likeF	GATCGGATTGGAGAACCAGA	JCM, 44:2974(2006)
OXA-23-likeR	ATTCTGACCGCATTTCAT	JCM, 44:2974(2006)
Int1F	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	JCM, 44:2974(2006)
Int1R	CCCGAGGCATAGACTGTA	JCM, 44:2974(2006)

For *rpoB* sequencing

Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	JCM, 44:827(2006)
Ac1093R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA	JCM, 44:827(2006)
Ac1055F	GTGATAARATGGCBGGTCGT	JCM, 44:827(2006)
Ac1598R	CGBGCRTGCATYTTGTCTRT	JCM, 44:827(2006)

表6 . *rpoB*PCR と *rpoB* 塩基配列による鑑別結果の比較

		multiplex <i>rpoB</i> PCRによる鑑別					合計
		bau.	noso.	pittii	cal.	spp.	
rpoB 塩基配列解析による鑑別	bau.	45					45
	noso.		16				16
	pittii			16		2	18
	cal.			1			1
	spp.					29	29
合計		45	16	17	0	31	109