

細菌核酸・薬剤耐性遺伝子同時検出検査 (Verigene血液培養・薬剤耐性核酸テスト)

Verigene blood culture nucleic acid tests

う の なお き やなぎ はら かつ のり
宇 野 直 輝 : 柳 原 克 紀
Naoki UNO Katsunori YANAGIHARA

はじめに

2017年6月に「Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テスト」が保険収載された。この検査は、血液培養が陽性になった培養液中の複数の細菌の核酸をマイクロアレイ法によって同時に検出する新しい微生物核酸検査である。医科診療報酬点数表では、これまでの微生物核酸同定・定量検査とは別区分に「細菌核酸・薬剤耐性遺伝子同時検出」という測定項目名で収載された。血液培養が陽性になったその日に培養液中の複数の細菌の核酸および主要な薬剤耐性遺伝子を検出することができるため、血流感染症の早期診断と早期標的治療に役立つ検査として注目される。血液培養陽性検体中の複数の微生物核酸を検出するシステムとしては、この他に FilmArray (BioMérieux) や ePlex (GeneMark Dx) の Blood Culture Identification (BCID) パネルがあるが、Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テストは本邦で最初に体外診断用医薬品として承認された。

I. システム概要

Verigene は米国 Nanosphere 社が開発した臨床検査用の遺伝子検査システムであり、血液培養検査以外にも複数のアプリケーションがある。カートリッジとプロセッサーとリーダーからなり(図1)、目的に応じたカートリッジをプロセッサーに挿入する。血液培養検査には、血液培養グラム陽性菌・薬剤耐性核酸検査 (Blood Culture Gram-Positive; BC-GP) と血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸検査 (Blood



((株)日立ハイテクノロジーズ資料より引用・改変)

図1 Verigene システム

Culture Gram-Negative; BC-GN) の2種類のカートリッジがある。陽性になった血液培養の培養液のグラム染色の結果から、どちらかあるいは両方を選択する。一つのプロセッサーには一つのカートリッジしか挿入できないため、複数検体を同時に検査する場合はプロセッサーの増設が必要になる。カートリッジを挿入すると、プロセッサーの中で核酸抽出とマイクロアレイハイブリダイゼーションが自動的に行われる。ハイブリダイゼーション終了後、カートリッジを抜き取り、マイクロアレイ基盤をリーダーに挿入してシグナルを検出する。この過程は自動化されており、手作業はほとんどなく、約2時間半で完了する。

II. 原理

Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テストはマイクロアレイ法を原理とする。血液培養陽性ボトル中には細菌が既に増殖しているため、核酸増幅は行わず、核酸ハイブリダイゼーションのみで標的核酸を検出する。マイクロアレイ基盤上には血流感染症の主要な原因菌および耐性遺伝子に特異的な塩基配列が配置されており、検体から抽出した微生物の核酸とハイブリダイゼーションする。マイクロアレイにハイブリダイゼーションした標的配列にさらに核酸プローブをハイブリダイゼーションさせて、そのプローブのシグナルを増幅して検出する(図2)。

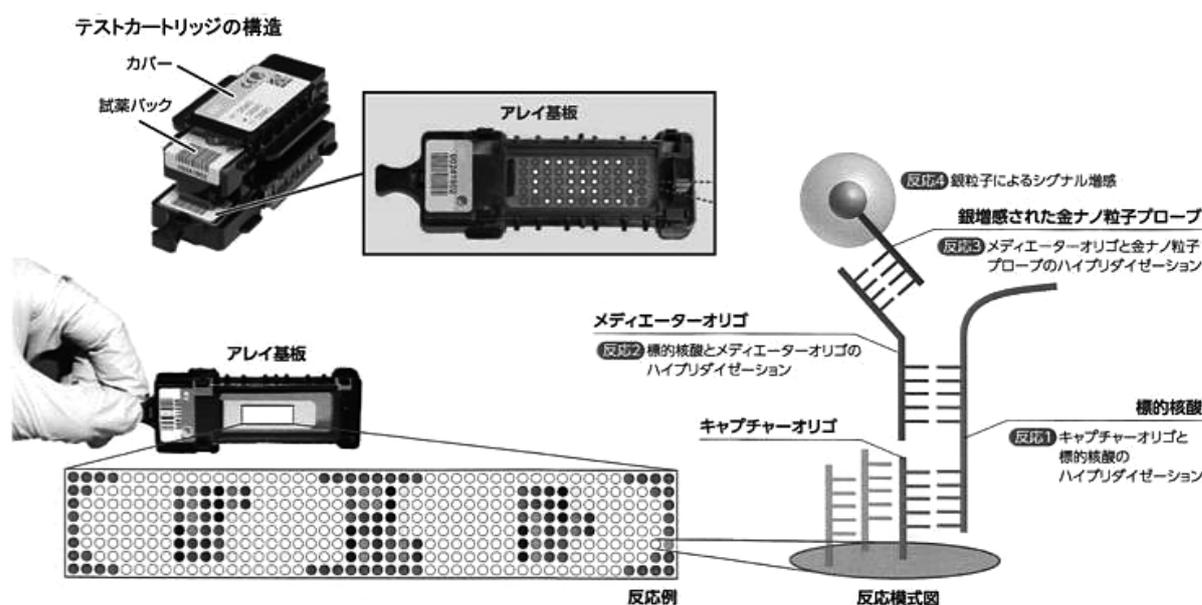
III. 手順

1. 陽性になった血液培養液をカートリッジに注入する。必要量は BC-GP は $350\mu\text{L}$ 、BC-GN は $700\mu\text{L}$ である。少量であるため、その後の分離培養を妨げない。
2. カートリッジをプロセッサに挿入する。
3. 自動的に核酸抽出とハイブリダイゼーションが

4. カートリッジを抜き取り、カートリッジ内にあるマイクロアレイ基盤をリーダーに挿入する。
5. マイクロアレイのシグナルが検出され、結果が出力される。この過程は約5分で完了する。

IV. 検出対象菌

BC-GP および BC-GN の検出対象を表1に示す。いずれも主要な原因菌をカバーしているが、全ての細菌をカバーするわけではない。われわれが行った臨床検体を用いた BC-GP の検討では、自動分析機で同定された 59 菌中 57 菌 (96.6%) が BC-GP の検出対象菌であった。一方、BC-GN の検討では、自動分析機で同定された 164 菌中 132 菌 (80.5%) が BC-GN の検出対象菌であった。BC-GN 検出対象外菌の中にはグラム陽性菌が少なからず含まれていた。Verigene はグラム陽性菌用と陰性菌用に分かれているため、グラム陽性菌と陰性菌の混合感染では必然的に片方が検出できない欠点がある。この点、FilmArray や ePlex の BCID パネルはこの区別がなく、グラム陽性菌と陰性菌に加えて真菌も一つのキットで検出できるため、見逃しを避けられる利点がある。



((株)日立ハイテクノロジーズ資料より引用)

図2 Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テストの検出原理

表 1 Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テストの検出対象

BC-GP		BC-GN	
グラム陽性菌 ¹	薬剤耐性遺伝子 ²	グラム陰性菌	薬剤耐性遺伝子 ³
<i>Staphylococcus</i> 属	<i>mecA</i>	<i>E. coli</i>	CTX-M
<i>S. aureus</i>	<i>vanA, vanB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP
<i>S. epidermidis</i>		<i>Klebsiella oxytoca</i>	VIM
<i>S. lugdunensis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM
<i>Streptococcus</i> 属		<i>Serratia marcescens</i>	KPC
<i>S. pneumoniae</i>		<i>Enterobacter</i> 属	OXA
<i>S. pyogenes</i>		<i>Acinetobacter</i> 属	
<i>S. agalactiae</i>		<i>Citrobacter</i> 属	
<i>S. anginosus group</i>		<i>Proteus</i> 属	
<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>Enterococcus faecium</i>			
<i>Listeria</i> 属			

1 ブドウ球菌と連鎖球菌は属レベルの同定と代表的菌種の同定ができる。腸球菌は*E. faecalis*と*E. faecium*の2菌種が同定できる。リステリアは属レベルで同定できる。

2 薬剤耐性遺伝子は、*S. aureus*あるいは*S. epidermidis*が同定された場合に限り、*mecA*を検出し、*E. faecalis*あるいは*E. faecium*が同定された場合に限り、*vanA*と*vanB*を検出する。

3 薬剤耐性遺伝子の検出は菌の同定の有無を問わない。

V. 細菌同定性能

BC-GP および BC-GN の検討は欧米に始まり、本邦でも行われ、その優れた性能が報告されている¹⁻³⁾。

1. BC-GP

われわれが長崎大学病院で行った検討では、血液培養が陽性になり、かつグラム陽性菌が観察された59本の血液培養ボトルから、自動分析機 (BD Phoenix, VITEK2) で59菌が同定され、そのうち57菌がBC-GPの検出対象菌であり、そのすべてでBC-GPと自動分析機の同定結果は一致した。BC-GP検出対象外菌が同定された2検体ではBC-GPは細菌を検出しなかった。つまり、自動分析機の結果とBC-GPの結果は完全に一致した。このように、BC-GPと従来法の一致率はかなり高いことが他施設の検討でも報告されている¹⁾。しかし、ボトル中に複数菌種が存在する場合は、検出率が低下することが知られている。

2. BC-GN

われわれが行った国内の多施設検討試験の結果、血液培養が陽性になり、かつグラム陰性菌が観察された141本の血液培養ボトルから、自動分析機 (BD Phoenix, MicroScan WalkAway) で164菌が同定され、このうちBC-GN検出対象菌である132菌が同定された検体について、BC-GNの同定結果は130菌で一致した。しかし、2菌はBC-GNで検出されな

かった。BC-GNで検出されなかった2菌はいずれも血液培養ボトル中に2菌種が存在した検体であり、2菌種のうち1菌種は同定されたが、もう1菌種は検出されなかった。一方、BC-GN検出対象外の32菌が同定された検体から、BC-GNが*Klebsiella oxytoca*を同定したケースがあった。この検体は自動分析機で*Raoultella ornithinolytica*が同定されており、この菌は*K. oxytoca*と配列相同性が高いため、BC-GNで*K. oxytoca*と同定されることがメーカー側の情報としてある。以上より、BC-GN検出対象菌について、血液培養ボトル中に単一菌種が存在する場合は、BC-GNと自動分析機の同定結果は完全に一致し、複数菌種が存在する場合であっても、その一致率は132菌中130菌(98.5%)とかなり高いことがわかった。

このことから、BC-GPおよびBC-GNは自動分析機に匹敵する同定性能を有することが示された。

VI. 薬剤耐性判定性能

1. メチシリン耐性ブドウ球菌

BC-GPは*S. aureus*あるいは*S. epidermidis*を同定した場合に限り、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびメチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌(MRCNS)の原因遺伝子である*mecA*を検出する。われわれの検討では、自動分析機でMRSAおよびMRCNSと判定された*S. aureus*および*S. epidermidis*が同定された検体すべてでBC-GPは

mecA を検出した。MRSA および MRCNA と判定されなかった *S. aureus* および *S. epidermidis* の由来検体からは BC-GP で *mecA* は検出されなかった。したがって、BC-GP のメチシリン耐性ブドウ球菌判定性能は自動分析機と同等であった。

2. 基質拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBLs)

ESBL の原因遺伝子のうち、BC-GN は CTX-M を検出する。本邦の ESBL のほとんどが CTX-M 型であることを考慮すると、BC-GN による CTX-M の検出は特に本邦で ESBL の検出に有用であることが期待される。BC-GN の検出対象菌のうち、自動分析機は、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*Proteus* spp. の4つについて、CLSI の判定基準に基づいて ESBL の判定をする。われわれが臨床検体で行った検討では、自動分析機で ESBL と判定された菌と判定されなかった菌がそれぞれ 15 菌と 59 菌あり、BC-GN による CTX-M の検出結果は ESBL の判定結果と完全に一致した。このことから、BC-GN の CTX-M 検出は本邦の ESBL 検出に極めて有用であることが示唆された。

3. カルバペネム耐性菌

BC-GN はカルバペネム耐性に寄与する遺伝子である IMP、VIM、NDM、OXA を検出する。このうち、本邦で頻度が多いのは IMP であり、その他の遺伝子が検出されるのは稀である。われわれは自動分析機のイミペネム耐性判定と BC-GN のカルバペネマーゼ遺伝子検出結果を比較した。その結果、自動分析機でイミペネム耐性と判定されたにも関わらず、BC-GN でカルバペネマーゼ遺伝子がまったく検出されなかったケースと、自動分析機でイミペネム耐性と判定されなかったが、BC-GN でカルバペネマーゼ遺伝子が検出されたケースが少なからず

あった。カルバペネム耐性はカルバペネマーゼ以外の機序でも獲得されるため、BC-GN でカルバペネマーゼ遺伝子が検出されなくてもカルバペネム耐性を否定することはできない。逆に、カルバペネマーゼ遺伝子が検出されたが、イミペネムが耐性判定とならなかったケースは、全例メルカプト酢酸ナトリウム試験が陽性であったことから、メタロ β ラクタマーゼ産生菌と判断された。したがって、BC-GN でカルバペネマーゼ遺伝子が検出された場合は、カルバペネム耐性と判断できる。

おわりに

血流感染症は致死率が高く、早期の適切な抗菌薬治療がなにより重要である。Verigene 血液培養・薬剤耐性核酸テストは現在の血液培養検査の過程を大きく短縮し、血流感染症の予後改善に寄与することが期待される。今後、Verigene システムを院内に導入するための環境整備が望まれる。

文 献

- 1) Wojewoda CM, Sercia L, Navas M, et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol* 2013 ; 51 : 2072-2076.
- 2) Uno N, Suzuki H, Yamakawa H, et al. Multicenter evaluation of the Verigene Gram-negative blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015 ; 83 : 344-348.
- 3) Suzuki H, Hitomi S, Yaguchi Y, et al. Prospective intervention study with a microarray-based, multiplexed, automated molecular diagnosis instrument (Verigene system) for the rapid diagnosis of bloodstream infections, and its impact on the clinical outcomes. *J Infect Chemother* 2015 ; 21 : 849-856.