

[原 著]

血流感染症に対する原因菌・薬剤耐性遺伝子迅速診断試薬（Verigene BC-GP, Verigene BC-GN）の性能評価

鈴木広道¹⁾・矢口勇治²⁾・上田淳夫³⁾・小金丸博⁴⁾・野竹重幸³⁾・森下絵梨⁵⁾
釋 悦子⁶⁾・高須光世⁶⁾・上村桂一⁷⁾・中尾英樹⁵⁾・明石祐作¹⁾・吉本雄太²⁾
赤津義文⁸⁾・伊藤裕司⁹⁾・石丸直人¹⁰⁾・志智大介¹¹⁾・渡邊卓哉¹²⁾・玉井清子²⁾
柳原克紀¹³⁾

¹⁾ 筑波メディカルセンター病院感染症内科・臨床検査医学科

²⁾ ミロクメディカルラボラトリー

³⁾ 筑波メディカルセンター病院臨床検査科

⁴⁾ 筑波大学附属病院感染症科

⁵⁾ 明石医療センター検査科

⁶⁾ 聖隷浜松病院臨床検査部

⁷⁾ 中東遠総合医療センター臨床検査室

⁸⁾ 日立総合病院検査技術科

⁹⁾ 中東遠総合医療センター総合内科

¹⁰⁾ 明石医療センター総合内科

¹¹⁾ 聖隷三方原病院感染症・リウマチ内科

¹²⁾ 聖隷浜松病院総合診療内科

¹³⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・診断学分野

(平成 29 年 8 月 15 日受付, 平成 30 年 1 月 30 日受理)

著者連絡先：(〒305-8558) 茨城県つくば市天久保 1-3-1
筑波メディカルセンター病院感染症内科・臨
床検査医学科
鈴木広道
TEL: 029-851-3511
FAX: 029-858-2773
E-mail: hsuzuki@tmch.or.jp

血液培養陽性検体に対して、Verigene システムの専用試薬である Verigene 血液培養グラム陽性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GP) 及び Verigene 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN) の性能を評価した。対照として、WalkAway96 及び用手法の生化学的性状試験による同定結果に加え、16S ribosomal RNA 遺伝子シーケンス解析による同定および PCR 法による耐性遺伝子解析を行って一致率を評価した。2014 年 7 月から 2016 年 3 月の期間で、血液培養陽性ボトル計 262 検体 282 株 (BC-GP: 101 検体 104 株, BC-GN: 171 検体: 178 株) に対して解析した。血液培養開始より Verigene システムの検査終了までの時間は中央値で 22.7 時間 (四分位範囲: 19.1-29.2 時間) であり、グラム陽性菌における一致率は、原因菌同定に対して 99.0% (103/104)、薬剤耐性に対しては 100% (53/53) であった。グラム陰性菌における一致率は、原因菌同定に対しては 97.8% (174/178)、薬剤耐性遺伝子は 15 検体 (bla_{CTX-M} : 13 検体, bla_{IMP} : 2 検体) で検出された。追加試験として、6 施設で血液培養より分離され、Cefotaxime (CTX) 非感性を示した 96 株 (*Escherichia coli*: 82 株, *Klebsiella pneumoniae*: 7 株, *Klebsiella oxytoca*: 3 株, *Proteus* spp.: 4 株) に対して、Verigene システム及び BC-GN を用いて評価した。96 株の内、88 株 (91.7%) で薬剤耐性遺伝子 (bla_{CTX-M} : 87 株, bla_{IMP} : 1 株) を検出し、既報の PCR 法及び POT 法による耐性遺伝子解析との比較では、全株の一致が確認された。Verigene システムは血液培養陽性検体に対する原因菌検出に対し、生化学的性状試験と比較し高い一致率を示した。CTX 非感性株の多くで Verigene システムにより薬剤耐性遺伝子を検出した。

Key words: Verigene システム, 遺伝子診断, 菌血症, 多項目同時遺伝子検査, 薬剤耐性菌

序 文

菌血症は迅速に適切な治療を要する病態であり、適切な治療の遅れは予後の悪化と相関する¹⁾²⁾。近年、菌血症の原因菌として methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) や基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamase: ESBL) 産生腸内細菌科細菌など薬剤耐性菌が増加しており³⁾、感染症治療に際しては菌名及び薬剤耐性の情報が必要となる。しかし、生化学的性状試験による同定・感受性検査では、血液採取より薬剤耐性の判明までに早くても約 2 日を要し、急性期に結果を得ることが困難である。近年、血液培養陽性検体に対する質量分析法を用いた直接同定が実用化されているが⁴⁾、薬剤感受性の推定には至っていない。

自動多項目遺伝子検査装置 Verigene システム (日立ハイテクノロジーズ) はマイクロアレイ法を測定原理とした全自動遺伝子検査システムである。本機器専用試薬である、Verigene 血液培養グラム陽性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GP) 及び Verigene 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN) は血液培養陽性検体から菌の分離培養を行わず直接 3 時間以内に、主要な原因菌及び薬剤耐性遺伝子の網羅的遺伝子解析を行うことができる。

先行研究において、BC-GP, BC-GN とともに菌血症

原因菌の同定、耐性遺伝子検出に対して高い精度が示されている^{5)~9)}。我々が実施した菌血症症例に対する Verigene 介入試験 (UMIN 試験 ID: UMIN 000014399)¹⁰⁾ では、血液培養開始から Verigene 検査終了までの時間は約 22 時間であり、介入試験を行う前 (対照期間) と比較して、介入期間では有意 ($p < 0.001$) に感性を有する抗菌薬が早期に投与され、30 日死亡率の低下 (3% vs. 13%, $p = 0.019$) 及び、抗菌薬処方コストの削減効果が認められた (3618 円 vs. 8505 円, $p = 0.001$)。

一方、先に実施した介入試験¹⁰⁾ は、期間が 6 ヶ月間と短く、試験途中で試薬の改良が行われていることから、従来の生化学的性状試験による同定及び感受性試験との比較検討が十分に行われていない。特に、グラム陰性菌菌血症に対する BC-GN による網羅的薬剤耐性遺伝子解析により、臨床で使用する Cefotaxime (CTX) などの薬剤感受性を予測できるかについては十分に検討されていない。今回、我々は約 2 年間の Verigene システム BC-GP, BC-GN の評価データ及び各施設より収集した菌株を用いた解析を元に、これらに対する検討を実施したので報告する。

Table 1. (a) Identification lists of the Verigene Gram-positive Blood Culture Test

Genus	Species	Resistance genes
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>vanA</i>
<i>Listeria</i> spp.	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>vanB</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i> Group	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Enterococcus faecium</i>	

Table 1. (b) Identification lists of the Verigene Gram-negative Blood Culture Test

Genus	Species	Resistance genes
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>
<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae/Klebsiella variicola</i>	<i>bla_{IMP}</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>bla_{KPC}</i>
<i>Proteus</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla_{NDM}</i>
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>bla_{OXA}</i>
		<i>bla_{VIM}</i>

材料と方法

1. 研究概要

本研究は、筑波メディカルセンター病院（453床）において、文書同意によるインフォームド・コンセントを得て、血液培養陽性培養液に対して Verigene システム及び BC-GP, BC-GN による遺伝子解析を行い、Turn around time (TAT), 生化学的性状試験による同定・感受性試験との一致率を解析した。研究期間は、BC-GP に対しては 2014 年 7 月 1 日から 2016 年 3 月 31 日の期間で行い、BC-GN に対しては、2014 年 11 月 1 日から 2016 年 3 月 31 日の期間で行った。本研究は筑波メディカルセンター病院の倫理審査委員会での承認を得て実施された（承認番号：2015-004）。

2. Verigene システム及び BC-GP, BC-GN の方法及び TAT 測定

自動血液培養装置（BacT/ALERT3D システム, ビオメリュー・ジャパン）で陽性シグナルを示した血液培養液を用い、グラム染色検査で菌体を確認した後、添付文書に従い Verigene システム及び BC-GP, BC-GN を用い遺伝子解析を行った（Table 1）。血液培養検査は検体到着後、夜間・休日を含め速やかに検査が開始され、血液培養装置で陽性シグナルを示した血液培養液については、平日日中は随時対応し、夜間・土日については翌日朝にグラム染色検査を行った。血液培養 2 セット 4 本陽性であった場合については、4

本中 1 本を用い評価を実施した。

評価として、血液培養開始から血液培養陽性までの時間、グラム染色の検査結果報告までの時間、Verigene システムによる解析終了までの時間についてそれぞれ計測した。

3. Verigene システム及び BC-GP, BC-GN の微生物学的評価

Verigene システム及び BC-GP, BC-GN で得られた結果については、日常検査で行っている生化学的性状試験と比較した。試験期間中の同定・薬剤感受性試験については WalkAway 96（ベックマン・コールター）及び専用試薬（PosCombo3.1J, Neg EN Combo 1J, Neg NF Combo 1J, MICroFAST 7J; ベックマン・コールター）、用手法による生化学的性状試験と比較した。用手法の同定として *Streptococcus pneumoniae* に対してはオプトヒン・ディスク“栄研”（栄研化学）、その他の *Streptococcus* spp. に対しては、プロレックス「イワキ」レンサ球菌（イワキ）、ラビッド ID32 ストレップアピ（ビオメリュー・ジャパン）、Neg NF Combo 1J で同定困難なブドウ糖非発酵菌に対しては ID テスト・NF-18「ニッスイ」（日水製薬）を用いた。

生化学的性状試験との菌名不一致株、生化学的性状試験で菌名同定が困難な分離株に対して ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1（サー

Table 2. General information on strain collection

	Total number of strains of Enterobacteriaceae isolated from blood culture bottles ^{a, b}	Total number of strains of Enterobacteriaceae non-susceptible to cefotaxime isolated from blood culture bottles	Total number of strains preserved for the current study
Hitachi General Hospital	133	16 (12.0%)	15
Chutoen General Medical Center	117	5 (4.3%)	5
Seirei Hamamatsu General Hospital	105	8 (7.6%)	5
Seirei Mikatahara General Hospital	116	14 (12.1%)	11
Akashi Medical Center	66	13 (19.7%)	13
Miroku Medical Laboratory ^c	298	47 (15.8%)	47
Total	835	103 (12.3%)	96

^a We analyzed *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus* spp. in the present study

^b Duplicated strains (e.g. strains isolated from the two sets of blood cultures) were not counted.

^c The duration of strains collection was three months in Miroku Medical Laboratory and six months in the other five hospitals.

モフィッシャー・サイエンティフィック) による, 16 S rRNA シークエンスと EzBioCloud により標準菌株との相同性解析¹¹⁾¹²⁾を実施して, 一致率を評価した。BC-GN で耐性遺伝子の検出が得られた分離株については, 検出された耐性遺伝子 (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}) についてそれぞれ既報の PCR 法を用い評価を行った¹³⁾¹⁴⁾。なお一部の遺伝子は, 前述した方法で PCR 産物のシークエンスを実施し型別を行った。非特異的バンドが疑われた *bla*_{CTX-M} 保有菌株においては, シカジーニアス分子疫学解析 POT キット (大腸菌用) (関東化学) を用い確認検査を実施した。血液培養より *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus* spp. が検出され, 薬剤感受性検査で CTX 非感性 (MIC : $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) であったが, Verigene システム及び BC-GN で耐性遺伝子の検出を認めなかった分離株は, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CIT}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{EBC}, *bla*_{FOX}, について既報の PCR 検査法によって解析し評価を行った^{13)~16)}。

4. Verigene システム及び BC-GN の耐性遺伝子解析に対する追加評価

追加試験として, 2015 年 7 月 1 日から 2016 年 3 月 31 日の期間で筑波メディカルセンター病院において血液培養陽性検体に対するグラム染色でグラム陰性桿菌が疑われたが, 介入試験の対象外となった検体に対して, Verigene システム及び BC-GN を用いた評価を実施した。

また, 6 施設 (日立総合病院, 聖隷浜松病院, 聖隷三方原病院, 中東遠総合医療センター, 明石医療センター, ミロクメディカルラボラトリー) より, 血液培

養で *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus* spp. を検出し, 各施設の薬剤感受性検査法で CTX 非感性 (MIC : $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) であった場合, 1 症例につき 1 菌株を保管し, 分離株の収集を行った。

収集した菌株は, ミロクメディカルラボラトリーにおいてドライプレート “栄研” (栄研化学) を用いて CTX に対する薬剤感受性の再検 (Table 2) 及び Walk-Away 96 と Neg EN Combo 1J を用いて, 同定・薬剤感受性試験を実施した。確認後, 菌液, 研究用全血 (4 × 10 ML SAMPLES OF HUMAN WHOLE BLOOD IN Na HEPARIN ; Tennessee Blood Services) 及び培養液 (トリプトソーヤブイヨン「ニッスイ」: 日水製薬) を 1 : 1 : 3 の比率で混合した疑似血液培養陽性液を作製し, 筑波メディカルセンター病院において, Verigene システム及び BC-GN に対する評価を実施した。疑似菌血培養陽性液の菌液濃度は, トリプトソーヤブイヨン「ニッスイ」を用い血液培養陽性時における血液培養陽性液での菌液濃度の約 1/10 (6.0×10^7 CFU/mL) で作製し, 耐性遺伝子の検出を認めなかった場合, 約 6.0×10^8 CFU/mL の菌液濃度で再検した。PCR 検査を用いた確認試験については前述の本試験での分離株と同様に評価を行った。

追加試験の実施に際しては, 筑波メディカルセンター病院での倫理審査承認後, 各施設における倫理委員会の承認「日立総合病院 (承認番号: 2015-17), 聖隷浜松病院 (承認番号: 第 1854 号), 聖隷三方原病院 (承認番号: 第 15-11), 中東遠総合医療センター (承認番号: コ-25), 明石医療センター (承認日: 2015 年 6 月 10 日)」を経て実施した。ミロクメディカルラボ

Table 3. General Information for the evaluation of the Verigene system with Verigene Gram-positive Blood Culture Test (BC-GP) and Verigene Gram-negative Blood Culture Test (BC-GN) for positive blood culture bottles

	Total N = 282	GP N = 104	GN N = 178
Incubation period for a positive signal obtained from blood culture bottle (h)	13.8 (11.8-18.4)	14.7 (11.8-20.3)	13.2 (11.9-18.2)
Duration between the initiation of incubation and reporting of the Gram stain examination (h)	19.5 (16.2-24.5)	19.5 (16.5-26.6)	19.8 (16.0-24.4)
Duration between the initiation of incubation and reporting of the Verigene system result (h)	22.7 (19.1-29.2)	22.5 (19.7-30.0)	22.9 (18.7-27.9)
Number of target pathogens	282	104	178
One specie	262	98	164
Two species	10	3	7
Three species	0	0	0

Continuous data are presented as the median (interquartile range)

ラトリーについては施設内に倫理審査委員会をもたないため、研究計画書において倫理審査を筑波メディカルセンター病院に委託することを明記の上、同院での倫理審査会の承認により実施した。

追試験は、連結可能匿名化による個人情報保護及びオプトアウトにより実施したが、2017年5月の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」改訂を踏まえ対応表について破棄し、匿名化情報・試料とした。

結 果

1. Verigene システム及び BC-GP, BC-GN を用いた TAT 測定結果

対象期間において、血液培養陽性ボトル計 272 検体 (BC-GP : 101 検体, BC-GN : 171 検体) に対して評価を実施した (Table 3)。血液培養開始より陽性シグナルが得られるまでの時間は中央値で 13.8 時間 (四分位範囲 : 11.8-18.4 時間)、血液培養開始よりグラム染色検査結果報告までの時間は 19.5 時間 (四分位範囲 : 16.2-24.5 時間)、血液培養開始より Verigene システム及び BC-GP, BC-GN を用いた検査終了までの時間は 22.7 時間 (四分位範囲 : 19.1-29.2 時間) であった。

2. グラム陽性菌に対する Verigene システム及び BC-GP の原因菌及び薬剤耐性の評価結果

血液培養陽性ボトル 101 検体 (104 株) を用いたグラム陽性菌に対する Verigene システム及び BC-GP での原因菌及び薬剤耐性評価と、生化学的性状試験での原因菌同定及び薬剤耐性評価の一致率を Table 4 に示す。原因菌同定に対する一致率は属レベルで 99.0%

(103/104)、種レベルで 99.0% (97/98)、薬剤耐性に対する一致率は 100% (53/53) であった。経過中 *vanA/vanB* の検出を示した検体は認められなかった。不一致を認めた 1 検体では、培養で複数菌種の検出を認め、BC-GP では *Streptococcus parasanguinis* を検出できなかった。

3. グラム陰性菌に対する Verigene システム及び BC-GN の原因菌及び薬剤耐性の評価結果

血液培養陽性ボトル 171 検体 (178 株) を用いたグラム陰性菌に対する Verigene システム及び BC-GN を用いた原因菌同定の評価と、生化学的性状試験での原因菌同定及び薬剤耐性評価の一致率を Table 5 に示す。全体一致率は 97.8% で乖離は 4 検体 (4 株) で認められた。4 検体の内、3 検体で複数菌種が検出され、1 検体は Verigene システム及び BC-GN での評価では *Serratia marcescens* と判定されたが、WalkAway 及び Neg EN Combo 1J では、*Serratia liquefaciens* と判定された。16S rRNA 領域に対するシーケンス解析 (759bp) の結果、*S. liquefaciens* ATCC 27592^T と 100% の相同性が確認された。

研究期間に Verigene システム及び BC-GN において、15 検体で薬剤耐性遺伝子 (*bla*_{CTX-M} : 13 検体, *bla*_{IMP} : 2 検体) が検出され、*bla*_{CTX-M} 陽性株 (*E. coli* : 13 株) は全例で CTX 非感性を示し、*bla*_{IMP} 陽性株 (*Pseudomonas aeruginosa* : 2 株) は全例で Imipenem (IPM) 非感性を示した。保存菌株に対する対照法を用いた遺伝子解析において、全例で Verigene システムによる解析結果と一致した (Table 6)。第 3 世代セファロスポリン系抗菌薬 (CTX) 非感性の *E. coli*,

Table 4. Concordance rate between the Verigene system with Verigene Gram-positive Blood Culture Test (BC-GP) and phenotypic microbiological tests for 101 blood culture bottles

Strains or antimicrobial resistance	Verigene System	
	(%)	Strains
<i>Staphylococcus</i> spp.	100%	(52/52)
<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	(38/38)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	(6/6)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	100%	(1/1)
<i>Streptococcus</i> spp.	97%	(36/37)*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	100%	(3/3)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100%	(6/6)
<i>Streptococcus anginosus</i> group	100%	(3/3)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100%	(9/9)
<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	(9/9)
<i>Enterococcus faecium</i>	N/A	(0/0)
Other bacteria**	100%	(6/6)
Oxacillin (methicillin) resistance	100%	(44/44)
Vancomycin resistance (<i>Enterococcus</i> spp.)	100%	(9/9)
Total concordance rate		
Genus	99.0%	(103/104)
Species	99.0%	(97/98)
Resistances	100%	(53/53)

*: The blood culture bottle contained multiple bacteria.

***: Abiotrophia adiacens* (1), *Brachybacterium* sp. (1), *Clostridium limosum* (1), *Corynebacterium striatum* (1), *Peptostreptococcus micros* (1), *Trueperella bernardiae* (1)

Klebsiella spp. (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Proteus* spp. が血液培養検査で検出された 15 検体の内、薬剤耐性遺伝子が Verigene system 及び BC-GN で検出できなかったのは 2 検体 (*E. coli* : 1 検体, *K. oxytoca* : 1 検体) のみであった。

4. Verigene システム及び BC-GN の耐性遺伝子解析に対する追加評価結果

筑波メディカルセンター病院以外の 6 施設において、対象期間で血液培養より検出された、CTX 非感受性を示した 96 株 (*E. coli* : 82 株, *K. pneumoniae* : 7 株, *K. oxytoca* : 3 株, *Proteus* spp. : 4 株) を用いた検討では、最終的に 88 株 (91.7%) で薬剤耐性遺伝子 (*bla*_{CTX-M} : 87 株, *bla*_{IMP} : 1 株) を検出した。88 株の内、10 株では初回検査 (菌液濃度 : 6.0 × 10⁷ CFU/mL) において偽陰性を示し、再検 (6.0 × 10⁸ CFU/mL) で耐性遺伝子の検出を認めた。検出された耐性遺伝子について既報の PCR 法と比較した結果、全例が一致した。

筑波メディカルセンター病院及び他 6 施設で、上記

検討の Verigene システム及び BC-GN で耐性遺伝子が検出されなかった 10 株 (*E. coli* : 5 株, *K. pneumoniae* : 1 株, *K. oxytoca* : 4 株) に対する追加遺伝子解析の結果、*E. coli* 5 株についてはいずれもプラスミド性 AmpC 遺伝子 (*bla*_{CT} : 4 株, *bla*_{DHA} : 1 株) を保有しており、1 株は *bla*_{TEM} も同時に保有していた。*K. pneumoniae* 株は *bla*_{SHV-II}, *bla*_{DHA} の保有が確認された。10 株のいずれの株も *bla*_{CTX-M} は検出されなかった。

5. 7 施設における血液培養由来 *bla*_{CTX-M} 陽性 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus* spp. の薬剤感受性測定結果

本研究で *bla*_{CTX-M} が検出された 100 株の薬剤感受性について Table 7 に示す。*bla*_{CTX-M} 陽性 *E. coli* (91 株) に対して良好な感性率を示した抗菌薬は、Meropenem (MEPM) : 100%, Cefmetazole (CMZ) : 98.9%, Amikacin (AMK) : 98.9%, Tazobactam/Piperacillin (TAZ/PIPC) : 95.6% であった。一方で、感性率の低かった抗菌薬は Gentamicin (GM) : 65.9%, Ceftaz-

Table 5. Concordance rate between the Verigene system with Verigene Gram-negative Blood Culture Test (BC-GN) and phenotypic microbiological tests for 171 blood culture bottles

Strains	Verigene System	
	(%)	Strains
<i>Escherichia coli</i>	98.9%	(92/93)*
<i>Klebsiella pneumoniae/Klebsiella variicola</i>	100%	(21/21)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%	(5/5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	(13/13)
<i>Serratia marcescens</i>	100%	(5/5)
<i>Proteus</i> spp.	100%	(6/6)
<i>Enterobacter</i> spp.	77.8%	(7/9)*
<i>Acinetobacter</i> spp.	100%	(10/10)
<i>Citrobacter</i> spp.	100%	(4/4)*
Others**	90.9%	(10/11)***
Total concordance rate	97.8%	(174/178)

*: The blood culture bottles contained two strains of bacteria.

** : *Bacteroides distasonis* (2), *Bacteroides uniformis* (1), *Capnocytophaga canimorsus* (1), *Moraxella osloensis* (1), *Morganella morganii* (1), *Providencia rettgeri* (1), *Pseudomonas* sp. (1), *Pseudomonas putida* (1), *Salmonella* sp. (2), *Serratia liquefaciens* (1)

***: The Verigene system identified the organism as “*Serratia marcescens*” using the BC-GN panel; however, it was ultimately confirmed as “*Serratia liquefaciens*” with a 16s rRNA sequence analysis.

Table 6. Validation of antimicrobial resistance gene determinants detected with the Verigene system and Verigene Gram-negative Blood Culture Test (BC-GN)

Clinical blood cultures (Tsukuba Medical Center Hospital)				
Verigene system		The conventional PCR		
		<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	<i>bla</i> _{CTX-M-2} group	<i>bla</i> _{CTX-M-9} group
<i>bla</i> _{CTX-M}	13	7	0	6
<i>bla</i> _{IMP} *	2	<i>bla</i> _{IMP-1} 2	<i>bla</i> _{IMP-2} 0	
Spiked blood cultures				
Verigene system		The conventional PCR		
		<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	<i>bla</i> _{CTX-M-2} group	<i>bla</i> _{CTX-M-9} group
<i>bla</i> _{CTX-M}	87	34	7	46
<i>bla</i> _{IMP} *	1	<i>bla</i> _{IMP-1} 1	<i>bla</i> _{IMP-2} 0	

*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA} and *bla*_{VIM}, were not detected in this study.

* *bla*_{IMP} was detected from *Klebsiella pneumoniae* (1) and *Pseudomonas aeruginosa* (2).

** Strains of the target bacteria (cefotaxime-non-susceptible strains of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *Proteus* spp.) that were isolated from blood culture bottles were preserved in six facilities and evaluated later with a human blood sample and blood culture medium.

Table 7. Antimicrobial susceptibility of the *bla*_{CTX-M}-positive strains (100 strains)

Antimicrobial agents	N	ABPC /SBT	PIPC /TAZ	CAZ	CFPM	CMZ	MEPM	MINO	ST	LVFX	GM	AMK
CLSI criteria (µg/mL)		≤8/4	≤16/4	≤4	≤2	≤16	≤1	≤4	≤2/38	≤2	≤4	≤16
<i>Escherichia coli</i>	91	25%	96%	47%	1%	99%	100%	90%	48%	18%	66%	99%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0%	60%	40%	0%	100%	100%	80%	40%	80%	80%	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	4	0%	100%	75%	0%	100%	100%	0%	100%	0%	50%	100%

ABPC/SBT: Ampicillin/Sulbactam, PIPC/TAZ: Tazobactam/piperacillin, CAZ: Ceftazidime, CFPM: Cefepime, CMZ: Cefmetazole, MEPM: Meropenem, MINO: Minocycline, ST: trimethoprim-sulfamethoxazole, LVFX: Levofloxacin, GM: Gentamicin, AMK: Amikacin

idime (CAZ) : 47.3% , Sulfamethoxazole-Trimethoprim 製剤 (ST 合剤) : 48.4% であった。さらに感性率が低く、大部分が非感性株であった抗菌薬は Sulbactam / Ampicillin (SBT / ABPC) : 25.3% , Levofloxacin (LVFX) : 17.6% であった。

考 察

今回の試験では、筑波メディカルセンター病院で採取され、血液培養から分離された原因菌の内、95% (267/282) で Verigene システム及び BC-GP, BC-GN による迅速判定が可能な菌であり、血液培養開始から Verigene システムの解析終了までに要した時間は約 23 時間であった。また、BC-GP, BC-GN ともに生化学的性状試験による同定・感受性試験との比較において高い一致率を示しており、本試験における不一致例は 1 例を除き、複数菌種による菌血症の血液培養陽性検体であった。

Verigene システムは、菌血症に対する迅速検査として迅速性と正確性において、優れたシステムであることが本研究でも示されているが、留意すべき事項がある。第 1 に Ledebouer らの研究では複数菌種による菌血症では、一つの菌種は同定できるものの、全菌種の正確な同定率は 54.5% であったことが報告されている⁵⁾。本研究でも、生化学的性状試験との不一致例の大部分は、複数菌種による菌血症から得られた血液培養陽性検体であった。複数菌種による菌血症の場合、血液培養装置において陽性シグナルが得られた段階では増殖速度が速い菌種のみが発育しており、発育の遅い菌種は検出し得ない場合がある。このためグラム染色検査で複数菌種による菌血症が疑われた場合や、腹膜炎など臨床所見から複数菌種による感染症が強く示唆される場合に Verigene システムを用いる際

は、検出菌以外の菌種及び薬剤耐性に対する偽陰性が認められる可能性について留意し、診療を行うべきである。

第 2 に遺伝学的に相同性の高い菌種については、Verigene システムで交差反応により誤同定される可能性がある。 *Serratia* spp. においては BC-GN を用いた場合、 *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens*, が *S. marcescens* 検出のプロープと交差反応により *S. marcescens* として解析される場合があることが示されており¹⁷⁾、本研究でも *S. liquefaciens*, が *S. marcescens* として表示され種の不一致を呈した。これらの交差反応は他の菌種でも認められ、BC-GP において *Streptococcus mitis* が *S. pneumoniae* と判定される場合などがある⁶⁾。このため、塗抹所見や生化学的性状試験による同定結果との乖離が認められた場合、相同性が高い菌種による誤判定の可能性も念頭に置き、結果の解釈を行う必要がある。

第 3 に微量液体希釈法などの薬剤感受性検査法によって得られる結果と異なり、Verigene システムでは薬剤耐性遺伝子保有の有無が結果となるため、日常診療で活用する際には得られた遺伝子検査結果の解釈が必要となる。グラム陽性菌による菌血症では、 *Staphylococcus* spp. に対する *mecA*, *Enterococcus* spp. に対する *vanA/vanB* は、それぞれ必要となる抗菌薬の薬剤耐性と 100% 近い精度で相関する。一方、グラム陰性桿菌による菌血症では、主に投与される β-ラクタム系抗菌薬の薬剤耐性に対して複数の薬剤耐性遺伝子が関与するため、その薬剤耐性は必ずしも一致しない。本邦では、腸内細菌科細菌における広域セフェム系抗菌薬に対する薬剤耐性が問題となっており³⁾¹⁸⁾、今回の試験においても施設間差はあるが、

CTX に対する薬剤耐性率は 10% を超えていた。検討の中で、CTX 非感性 *E. coli* の 95% (91/96 株) に *bla*_{CTX-M} 保有が確認され、残りの 5 株には *bla*_{SHV}, *bla*_{DHA} の保有が確認された。今回の多施設研究は、本邦の 3 県 6 施設及び微生物検査センター 1 施設から菌血症由来の菌株を収集しており、本邦における疫学を反映していると考えられる。今回の研究により、本邦において CTX 非感性 *E. coli* による菌血症は市中においても一般的であり、その耐性因子は CTX-M 型 β -lactamase 産生が主体であるが、稀に AmpC 型 β -lactamase 過剰産生が認められることが示された。また、Verigene システム及び BC-GN は *bla*_{CTX-M} の検出により、菌血症由来 *E. coli* の大部分に対して CTX 非感性株を予測し得ることが示唆された。

今回、*bla*_{CTX-M} 陽性株に対する薬剤感受性結果では、*E. coli* において MEPM, AMK, TAZ/PIPC に加え、CMZ に対する薬剤感受性が良好であった。カルバペネム系抗菌薬は多剤耐性グラム陰性桿菌感染症における切り札のひとつであるが、世界的に同抗菌薬の使用は増加しており¹⁹⁾、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は世界的な懸念事項となっている。松村らの ESBP 産生 *E. coli* 菌血症に対する多施設研究では²⁰⁾、CMZ, Flomoxef (FMOX) は 30 日死亡率においてカルバペネム系抗菌薬と同等の効果 (8.9% vs. 7.7%) が示されている。*bla*_{CTX-M} 陽性 *E. coli* に対する Verigene システム及び BC-GN を用いた迅速診断による CMZ の投与については、今後検討を行っていく必要がある。

2016 年に行われたメタ解析では、菌血症に対する迅速遺伝子診断は介入を伴う場合において有意に有効であると結論づけられ²¹⁾、米国の抗菌薬適正使用ガイドラインにおける菌血症診療においても、抗菌薬適正使用チームによる介入下での実施が推奨されている²²⁾。BC-GP, BC-GN は、本邦でも 2016 年に体外診断用医薬品認可 (承認番号 BC-GP: 22800AMI 00001000, BC-GN: 22800EZX00025000) を取得し、2017 年 5 月に菌血症に対する迅速遺伝子検査として、新規保険収載 (1,700 点) されている。今後、更なるデータの蓄積を行い、診療に役立てていく必要がある。

今回、我々の研究ではいくつかの制限事項がある。まず、本研究において示された血液培養採取から Verigene システムの結果が得られるまでの時間は筑波メディカルセンター病院 1 施設で測定されており、他施設における運用で異なる可能性がある。次に、本研究では単菌種による菌血症から得られた血液培養陽性検

体が多く、複数菌種による菌血症由来の血液培養陽性検体に対する検討が十分に行われていない。さらに、今回の検討では多施設より CTX 非感性菌株を収集し、疑似菌血症検体を作製し評価を実施したが、血液培養陽性検体に対する検討ではないため、実検体では異なる可能性がある。今回の CTX 非感性株に対する検討は *E. coli* 以外では菌株数が少なく十分に検討されていない。よって今後の追加解析により明らかにする必要がある。

結語として、Verigene システムは血液培養陽性検体より原因菌を迅速に検出でき、生化学的性状試験による結果と高い一致率を示した。CTX 非感性 *E. coli* の多くで Verigene システムにより薬剤耐性遺伝子を検出し得た。

謝辞: 本試験の実施に際して御助力頂いた筑波メディカルセンター病院臨床検査科及び関連部署の皆様方、菌株収集に御尽力頂きました聖隷浜松病院臨床検査部 森本典子様、直田健太郎様、同臨床研究管理センター 浅野正宏様、明石医療センター検査科 笹野隆生様及び各施設の関係者の方々、筑波大学附属病院感染症科 人見重美先生に深謝致します。また、本試験実施中の Verigene システム及び専用試薬 (BC-GP, BC-GN) に関する技術的指導に際して多大な御支援を頂きました日立ハイテクノロジーズ 三浦哲男様、杉山雅英様、岡田英治様及び関係者の方々に厚く御礼を申し上げます。

利益相反: 本試験に実施に際して、本研究で用いられた専用検査試薬 (BC-GP, BC-GN)、研究用血液製剤 (全血) は日立ハイテクノロジーズより無償で提供を受けた。また、本研究で使用した Verigene システムプロセッサ 3 台の内、2 台について日立ハイテクノロジーズより無償で貸与を受けた。

文 献

- 1) Lodise, T. P., P. S. McKinnon, L. Swiderski, et al. 2003. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 36: 1418-1423.
- 2) Rodriguez-Bano, J., P. Picon, P. Gijon, et al. 2010. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 50: 40-48.
- 3) Hara, T., T. Sato, T. Horiyama, et al. 2015. Prevalence and molecular characterization of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*

- from 2000 to 2010 in Japan. *Jpn J Antibiot* 68: 75-84.
- 4) 日本臨床微生物学会. 2017. 質量分析計での細菌同定法, 臨床微生物質量分析計検査法ハンドブック. 日臨微誌 27: 9-23.
 - 5) Ledebor, N. A., B. K. Lopansri, N. Dhiman, et al. 2015. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol* 53: 2460-2472.
 - 6) Buchan, B.W., C. C. Ginocchio, R. Manii, et al. 2013. Multiplex identification of gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood culture broths: evaluation of an automated microarray-based nucleic acid test. *Plos Med* 10: e1001478.
 - 7) Kikuchi, K, M. Matsuda, S. Iguchi, et al. 2017. Potential Impact of Rapid Blood Culture Testing for Gram-Positive Bacteremia in Japan with the Verigene Gram-Positive Blood Culture Test. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2017: 4896791.
 - 8) Tojo, M., T. Fujita, Y. Ainoda, et al. 2014. Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of Gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS One* 9: e94064.
 - 9) Uno, N., H. Suzuki, H. Yamakawa, et al. 2015. Multi-center 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* 83: 344-348.
 - 10) Suzuki, H., S. Hitomi, Y. Yaguchi, et al. 2015. 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* 21: 849-856.
 - 11) Stackebrandt, E., B.M. Goebel. 1994. A place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol* 44: 846-849.
 - 12) 鈴木健一朗, 他編. 2001. 微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に, シュプリンガー・フェアラーク東京.
 - 13) Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 41: 5407-5413.
 - 14) Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, et al. 2006. PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 791-795.
 - 15) Perez-Perez, F.J., N.D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2153-2162.
 - 16) Yagi, T, H. Kurokawa, N. Shibata, et al. 2000. Preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 184: 53-56.
 - 17) 添付文書「Verigene 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN)」日立ハイテクノロジーズ. http://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/22800EZK00025000_A_01_01/
 - 18) Noguchi, T., Y. Matsumura, M. Yamamoto, et al. 2017. Clinical and microbiologic characteristics of cefotaxime-non-susceptible Enterobacteriaceae bacteremia: a case control study. *BMC Infect Dis* 17: 44.
 - 19) Van Boeckel, T.P., S. Gandra, A. Ashok, et al. 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14: 742-750.
 - 20) Matsumura, Y, M. Yamamoto, M. Nagao, et al. 2015. Multicenter retrospective study of cefmetazole and flomoxef for treatment of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 5107-5113.
 - 21) Timbrook, T.T., J.B. Morton, K.W. McConeghy, et al. 2017. The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 64: 15-23.
 - 22) Barlam, T.F., S.E. Cosgrove, L.M. Abbo, et al. 2016. Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis* 62: e51-77.

The Performance Evaluation of the Verigene System with a Verigene Gram-positive and Gram-negative Blood Culture Tests for the Molecular Determination of Bacteria and Their Antimicrobial Resistances in Positive Blood Culture Bottles

Hiromichi Suzuki¹⁾, Yuji Yaguchi²⁾, Atsuo Ueda³⁾, Hiroshi Koganemaru⁴⁾, Shigeyuki Notake³⁾,
Eri Morishita⁵⁾, Etsuko Shaku⁶⁾, Mitsuyo Takasu⁶⁾, Keiichi Uemura⁷⁾, Hideki Nakao⁵⁾,
Yusaku Akashi¹⁾, Yuta Yoshimoto²⁾, Yoshibumi Akatsu⁸⁾, Yuji Ito⁹⁾, Naoto Ishimaru¹⁰⁾, Daisuke Shichi¹¹⁾,
Takuya Watanabe¹²⁾, Kiyoko Tamai²⁾, Katsunori Yanagihara¹³⁾

¹⁾ Division of Infectious Diseases, Department of Medicine/ Department of Clinical Laboratory Medicine, Tsukuba Medical Center Hospital

²⁾ Miroku Medical Laboratory Inc.

³⁾ Department of Clinical Laboratory, Tsukuba Medical Center Hospital

⁴⁾ Department of Infectious Diseases, University of Tsukuba Hospital

⁵⁾ Department of Clinical Laboratory, Akashi Medical Center

⁶⁾ Department of Clinical Laboratory, Seirei Hamamatsu General Hospital

⁷⁾ Department of Clinical Laboratory, Chutoen General Medical Center

⁸⁾ Department of Clinical Laboratory, Hitachi General Hospital

⁹⁾ Department of General Internal Medicine, Chutoen General Medical Center

¹⁰⁾ Department of General Internal Medicine, Akashi Medical Center

¹¹⁾ Department of Infectious Diseases and Rheumatology, Seirei Mikatahara General Hospital

¹²⁾ Department of General Internal Medicine, Seirei Hamamatsu General Hospital

¹³⁾ Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

We prospectively evaluated the performance of the Verigene System with the Verigene Gram-positive Blood Culture Test (BC-GP) and Verigene Gram-negative Blood Culture Test (BC-GN) in positive blood culture bottles between July 2014 and March 2016. The concordance rates were evaluated with phenotypic identification methods and conventional molecular examinations. In total, we evaluated 272 positive blood cultures bottles (282 strains), and the median duration between the initiation of the blood culture incubation and the reporting of the Verigene system result was 22.7 h (interquartile range 19.1-29.2 h). For the evaluation with the BC-GP, the concordance rates were 99.0% (103/104) for bacterial identifications and 100% (53/53) for drug resistance. For the evaluation with the BC-GN, the concordance rate was 97.8% (174/178) for bacterial identifications, and antimicrobial resistance genes were identified in 15 bottles (*bla*_{CTX-M}: 13, *bla*_{IMP}: 2). For additional evaluations of the BC-GN, we collected 96 cefotaxime-non-susceptible strains (*Escherichia coli*: 82, *Klebsiella pneumoniae*: 7, *Klebsiella oxytoca*: 3, *Peroteus* spp.: 4) that had been isolated from patients with bacteremia at 6 facilities, and resistance genes were identified using the Verigene system with the BC-GN in 88 strains (91.7%). All of the resistance genes were confirmed with conventional molecular examinations. In our current study, we confirmed that Verigene system could promptly identify bacteria and resistance genes directly from positive blood culture bottles.