

目視確認できる遺伝子増幅 LAMP法での薬剤耐性菌検出 ～ペニシリン耐性肺炎球菌の迅速検査～

赤堀ゆきこ¹、河野弥季¹、長沢光章¹

¹ 国際医療福祉大学 成田保健医療学部 医学検査学科

背景 ①

- 肺炎球菌ワクチンが広く普及した今も、肺炎球菌感染による肺炎は死因の上位に挙げられる
- ペニシリン耐性肺炎球菌感染は5類感染症定点把握疾患に指定されており、ペニシリンのMICまたはオキサシリンの感受性ディスク試験にて耐性の定点報告が義務付けられている

背景 ②

- 本邦にて分離された42%の肺炎球菌にペニシリン耐性が報告された
【WHO Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014】
- ペニシリン耐性肺炎球菌蔓延を抑制する方法の一つとして、発生動向の簡易検出が望まれる

目的

ペニシリン耐性肺炎球菌の迅速かつ検査施設の設備に依存しない検出方法であるLAMP法の確立

LAMP法

Loop-Mediated Isothermal Amplification

- ① FIPで鋳型DNAと相補的なDNA鎖を合成
- ② FIPの外側にF3 Primerがアニール
FIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長
- ③ F3 Primerから合成されたDNA鎖と鋳型DNAが2本鎖
- ④ 自己アニールを起してループを形成
BIPの外側にB3 Primerがアニール
BIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長
- ⑤ 上記過程よりできた2本鎖DNAを、ループを形成してタンベル型の構造となる

方法

- NCBI Nucleotide 肺炎球菌ペニシリン結合タンパクの塩基配列
- LAMP法プライマー設計支援ソフトウェア



<http://primerexplorer.jp/index.html>

Result: PBP1a

```
TATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGC
                                     F3 Primer
ATATTTCCGGTAATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAA
      B3 Primer
TGTCACAGCCGTTGAGACTTTGAATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTA
      F1P Primer                               B1P Primer
AAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAAGCATGCATTATG
                                     B3 Primer
CAAACGCCATTTC AAGTAATACAACAGAATCTAATAACAATACGGA
      F3 Primer
GCAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGG
```

Result: PBP2x

```
TGAAATCCTTGCTACCACC CAACGACCTACCTTTAATGCAGATACTAA
                                     F3 Primer                               B3 Primer
AGAAGGAATCACTGAGGACTTTGTTTGGCGTGATATTCTTTATCAA
GTAACTATGAACCAGGATCAGCCTTTAAGGTCATGATGTTAGCTTCT
      F1P Primer
TCTATGATAATAATACCTTCCCAAGTGGAGAATACTCAATAGCAGT
                                     B1P Primer
GAATTCAAATAGCGGATCGCAGACTCGAGAT TGGGATGTTAATGC
                                     B3 Primer                               F3 Primer
TGGTTTGACTACTGGTGGGATGATGACTTTCTACAAGGTTTCGCTC
```

Result: PBP2b

```
AGAAATCCATCTGGATAAATATGGCAATATGGAAAGCGTGGACACAA
                                     F3 Primer
TTGAGGAAGGTA GTAAGGGAAACAATATCAAAGTGA CCATTGATTTG
      B3 Primer
GCCTTCAAAGATAGCGTGGATGCTTTGCTGAAAAGTTATTTCAATTCT
      F1P Primer                               B1P Primer
CGAGCTAGGAAATGGTGGAGCCAAGTATTCTGAGGGTGTGTATGCA
                                     B3 Primer
GTCGCCCTTAA CCCCAAAACAGGTGCTGTTTTGTCTATGT CAGGACT
                                     F3 Primer
CAAACATGACCTGAAAACGGGAGAGTTGACTCCTGATTCTTGGGA
```

結論

- ペニシリン耐性肺炎球菌をLAMP法により検出するプライマーが設計された
- 複数の菌株を用いたプライマーの適性試験が必要である