

Randomly amplified polymorphic DNA-PCR 法による *Burkholderia cepacia* の院内分離株の伝播の解析

- 1) 杏林大学医学部付属病院中央臨床検査部
- 2) 杏林大学保健学部臨床微生物学教室
- 3) 杏林大学医学部付属病院高度救命救急センター

岡崎 充宏¹⁾ 森田 耕司²⁾ 河内菜穂子¹⁾ 荒木 光二¹⁾
 吉沢 美枝³⁾ 和田 博志²⁾ 柴田 幹良²⁾ 渡辺 登²⁾
 江上 照夫¹⁾ 古谷 信滋¹⁾ 金森 政人²⁾ 島崎 修次³⁾
 内村 英正¹⁾

(平成9年12月8日受付)

(平成10年3月13日受理)

Key words: *Burkholderia cepacia*, RAPD-PCR method, intrahospital transmission

要 旨

本学付属病院において1995年11月から1996年9月の期間中に、13人の入院患者の臨床材料から28株の *Burkholderia cepacia* を検出した。本菌の28株中24株(85.7%)が喀痰由来であった。これらのうち1996年1月から2月の間に、集中的に8人の患者から20株が分離され、環境からは、同時期に高度救命救急センター(TCC)において使用されていたネブライザー薬液と蛇管の出口部分からそれぞれ1株が分離された。われわれは環境由来2株を含む30菌株について randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)法によるDNAの解析および各種同定キット(IDテスト・NF-18, API20NE, および Neg Combo 4J)による生化学的性状を指標とした表現型別を行った。

各種同定キットを用いた本菌の表現型別による解析は、菌株間の疫学的な関係を見いだせなかった。それに対し、RAPD-PCR法によって型別した本菌30菌株は、主要な5つのDNAパターンに区別された。その中で集中的に分離された期間中に、TCCから転床した2名の患者由来株を含む臨床材料由来20株のDNAパターンは環境由来2株と同一であった。これらの結果から、われわれはTCCを汚染源とする小規模な院内伝播が発生したことを推測した。また、RAPD-PCRによるDNAの解析は、本菌の院内伝播の疫学的調査に有効な方法であることが示された。

緒 言

Burkholderia cepacia (*B. cepacia*) は欧米における cystic fibrosis および本邦での免疫抑制を伴う患者に、重篤な日和見感染症を惹起する重要な起因菌の一つとして注目されている^{1)~4)}。また、本菌は抗菌薬や消毒薬の多くに耐性であることから^{5)~7)}、汚染した医療器具や医療スタッフの手を

介して、大規模な院内流行を引き起こすことが知られている^{8)~10)}。こうした院内流行の拡大防止には、流行株の汚染ルートの早期の解明が必要であり、迅速にかつ正確に流行株の型を特定することが重要である。

本菌の表現型別法の一つには、市販されている各種同定キットを用いた生化学的性状を指標とする型別がある。その操作性が簡便であるため検査室に導入されているが、本菌の型別の解析性が劣ることがあり、疫学的調査への応用は限界にな

別刷請求先：(〒181-8611) 三鷹市新川6-20-2

杏林大学医学部付属病院中央臨床検査部
 微生物検査室 岡崎 充宏

りつつある¹¹⁾。近年、本菌の遺伝子を基礎とした分子生物学的手法による型別法は再現性および解析性が極めて優れていることから、疫学的調査への応用に有効であることが報告されている¹²⁾¹³⁾。

今回、われわれは本院において1995年11月から1996年9月の間に分離された、臨床材料および環境由来の *B. cepacia* をDNA解析の一つである randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 法および日常検査に導入している各種同定キットを用いた表現型別に解析し、これらの型別による本菌の伝播経路などの疫学調査への有効性について検討した。

材料と方法

1. 供試菌株

1995年11月から1996年9月までの間に、本院に入院中の13人の患者の臨床材料から分離された *B. cepacia* 28菌株および1996年1月から2月にわたり、本菌が高度救命救急センター (TCC) の6名の入院患者から集中的に分離されたときに、本病棟で使用されていたネブライザーの薬液〔以下のものを含有：塩酸プロムヘキシシ (日本ベリンガーインゲルハイム)、チロキサポール (日本商事)、滅菌生理食塩水および滅菌蒸留水 (共に大塚製薬)) とネブライザーの蛇管から分離された2菌株を、RAPD-PCR法によるDNAパターンからの型別および各種同定キットによる表現型別に供試した。

2. RAPD-PCR法による *B. cepacia* のDNAパターンを指標とした型別

B. cepacia の全DNAの抽出はStaufferら¹⁴⁾の方法に準じて行い、SDSで溶菌後にフェノール、エーテルで抽出した。その後エタノール沈澱によってDNAを回収した。今回使用した2種類のプライマーは、われわれのグループが *Aeromonas sobria* のヘモリシン遺伝子を検出する目的で自家設計した¹⁵⁾。本プライマーは通常のPCRの条件のうち、アニーリング温度を42°Cで行った結果、種々の細菌のRAPD-PCRに使用できる可能性を認めた¹⁶⁾。

なお、プライマーの名称はRPKHM1およびRPKHM2に改称し、以下の通りRPKHM1：

5'-AAGCCGGTGAGTTATCTGGCC-3'およびRPKHM2：5'-CGTAACCGGACTGGGGCGT-GT-3'として自家設計した。増幅はザイモリアクターII (ATTO, 東京) を用い、94°C 5分間の前熱変性の後、熱変性94°C, 30秒, アニーリング42°C, 30秒, 伸長反応72°C, 30秒を35サイクル繰返し、最終伸長反応を72°C, 5分間行った。増幅した産物は10~20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動により分析し、エチジウムブロマイドを用いた染色によって検出した。

3. 各種同定キットによる型別

同定キットは、IDテスト・NF-18「ニッスイ」(ID-18, 日水製薬, 東京), API20NE (API, 日本ビオメリュー・バイテック, 東京), および Neg Combo 4J (NC4J, デイド, アメリカ) を使用し、全ての供試菌株をそれぞれのキットに添付してある説明書に準拠し同定した。各供試菌株はその同定結果から、生化学的性状の表現型を数値分類で示し型別された。

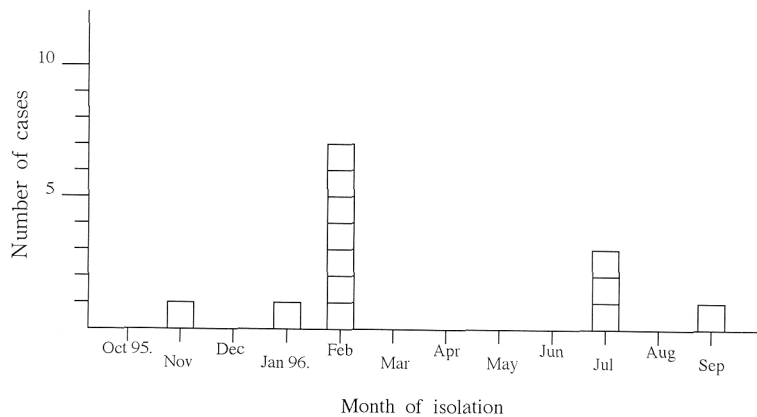
成績

1. 本院において *B. cepacia* が分離された月別の新規患者件数

本院における *B. cepacia* の分離件数を調査する前の1年間は、全ての病棟から分離例を認めなかった。本菌は1995年11月に呼吸器内科病棟の1人の患者、1996年1月31日から2月にかけて、TCCの入院患者6人およびTCCから転床した心臓内科と脳外科病棟の患者1人ずつから分離された。その後、6月までは分離例が無く、7月に3人および9月に1人から分離された (Fig. 1)。特に2月における本菌の分離された新規患者数は7人 (全体の約54%) であり、突発的に多くの患者がこの月に集中していた。また、この月の7人の全ての患者に同じネブライザー薬液を使用していたことが分かった。

2. 臨床材料別における *B. cepacia* の分離菌株数

臨床材料毎における本菌の分離菌株数は、喀痰から28株中24株 (85.7%) と最も多く分離された。残りの4株は血液、中心静脈カテーテルの先端チップ、膿、および咽頭分泌物からそれぞれ1株

Fig. 1 The epidemiology of *B. cepacia* in the Kyorin University Hospital.

ずつ分離された。

3. RAPD-PCR法のDNAおよび各キットによる表現型を指標とした型別の解析

RAPD-PCR法による供試菌株のDNAパターンは、2種類のプライマーを同時に使用した結果、主要な5つの型を示した (Fig. 2)。さらにこれらのパターンの中のR3は、約300bpの分子量のDNAの有無により2つのパターン (R3aおよびR3b) に区別された (Table 1)。なお、結果には示していないが、1種類のみプライマー (RPKHM1) を使用した時のDNAパターンは、R1およびR2の2つの型しか得られなかった。

これらの主要な5つのDNAパターンからの解析は、1996年1月から2月にかけてTCCを中心に分離された20菌株のDNAパターンがネブライザー由来の2菌株と一致した。また、その期間以外の菌株のDNAパターンは、それら20菌株のパターンと異った (Table 1)。本方法によるDNA解析の再現性は、供試菌株を繰返し3回行った結果、各菌株のDNAパターンが3回とも一致し、安定していた。

一方、各キットによる表現型別の解析は、ID-18とAPIではそれぞれ1および2パターンを示し、ネブライザー由来株のパターンは臨床材料由来株と一致した。また、NC4Jでは11パターンを示したが、患者Cから数回にわたって分離された6菌株の中で4パターンが認められた (Table 1)。

Fig. 2 RAPD profiles of *B. cepacia* isolates. Lane 1, isolate showed RAPD profile R1 from patient a (respiratory ward); lane 2, isolate showed RAPD profile R2 from patient b (TCC); lane 3, isolate showed RAPD profile R3 from patient j (thoracic surgery ward); lane 4, isolate showed RAPD profile R4 from patient i (TCC); lane 5, isolate showed RAPD profile R5 from patient m (respiratory ward); lane M, $\phi \times 174/Hinf$ I digest for DNA size marker. Numbers on the left are in base pairs.

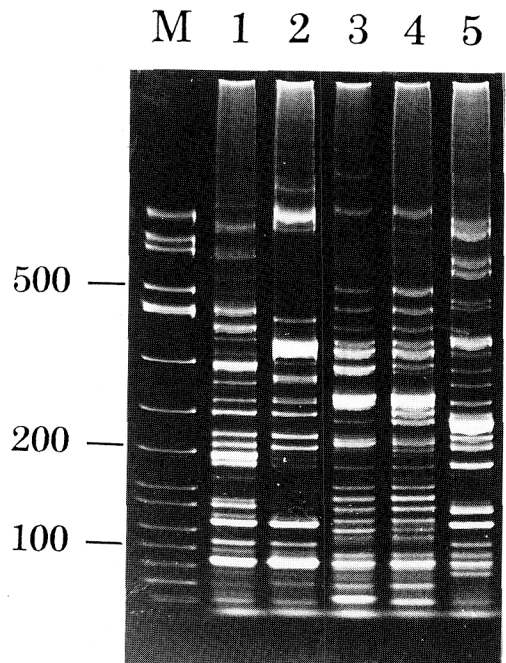


Table 1 Origins and phenotypic and genotypic characteristics of the *B. cepacia* isolates

Type of isolate	Patient	Strain of no.	Ward	Origin of strain	Date of isolate (day. mo. yr)	ID-18 profile	API profile	Dade profile	Random PCR profile
Clinical	a	1	Respiratory	Sputum	27.11.96	777604	0467577	04041772	R1
	b	2	TCC	Sputum	31.01.96	777604	0477577	04267772	R2
	b	3		Sputum	01.02.96	777604	0477577	04267772	R2
	b	4		Central venous catheter tip	05.02.96	777604	0467577	00041772	R2
	c	5	Cardiac medicine	Sputum	01.02.96	777604	0477577	04041772	R2
	c	6		Sputum	05.02.96	777604	0467577	00041772	R2
	c	7		Sputum	06.02.96	777604	0467577	00041772	R2
	c	8		Sputum	13.02.96	777604	0467577	04261772	R2
	c	9		Sputum	24.02.96	777604	0467577	04061772	R2
	c	10		Sputum	08.03.96	777604	0467577	04061772	R2
	d	11	TCC	Sputum	03.02.96	777604	0467577	04061772	R2
	e	12	TCC	Sputum	05.02.96	777604	0467577	04061772	R2
	f	13	Neurosurgery	Sputum	05.02.96	777604	0467577	04041772	R2
	g	14	TCC	Sputum	13.02.96	777604	0467577	00041772	R2
	h	15	TCC	Sputum	19.02.96	777604	0477577	04061772	R2
	h	16		Sputum	22.02.96	777604	0477577	04617772	R2
	h	17		Sputum	24.02.96	777604	0477577	04617772	R2
	h	18		Sputum	27.02.96	777604	0477577	04617772	R2
	h	19		Sputum	28.02.96	777604	0477577	04017772	R2
	h	20		Sputum	29.02.96	777604	0477577	04041772	R2
	i	21	TCC	Sputum	27.02.96	777604	0477577	04267772	R2
	j	22	Thoracic surgery	Sputum	16.07.96	777604	0467577	05041772	R3a
	j	23		Pus	16.07.96	777604	0477577	05041772	R3a
j	24		Pharynx secretion	20.08.96	777604	0477577	05261772	R3a	
k	25	Thoracic surgery	Blood	23.07.96	777604	0467577	01061772	R3b	
l	26	TCC	Sputum	31.07.96	777604	0477577	05061772	R4	
l	27		Sputum	02.08.96	777604	0467577	05261772	R4	
m	28	Respiratory	Sputum	18.09.96	777604	0467577	04041772	R5	
Environmental	29	TCC		Nebulized medication	29.02.96	777604	0467577	00041772	R2
	30	TCC		Nebulizer tube	29.02.96	777604	0467577	00041772	R2

考 察

院内流行の疫学的調査は、流行株の特定や伝播経路の追跡調査のために、従来から各種同定キットを使用して菌の生化学的表現を指標とした型別が行われている。しかしながら、*B. cepacia* の表現型別による解析は限界に成りつつあることが報告されている¹¹⁾。今回、われわれの検査室で導入している菌の同定キットを使用した本菌の表現型別は、ID-18では1パターンのみ、APIでは2パターンを示した。これらの結果からの解析では、本院での調査期間を通じてほぼ同一型の菌株による院内での伝播であることが示唆される。しかしながら、それぞれの分離菌株の関連性や伝播経路の追跡を行うためには、これだけのパターンでは限界

であり、より詳細な鑑別が必要であることが分かった。

近年、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) やリボタイピングを用いた菌の DNA パターンからの型別は、再現性および解析性に優れているため本菌の疫学的調査に有効であることが報告されている¹²⁾¹³⁾。RAPD-PCR も同様な方法であり、緑膿菌や黄色ブドウ球菌の院内流行における菌の伝播の解析に本方法が効果的であった^{17)~19)}。RAPD-PCR 法の操作性は PFGE に比し、簡単かつ短時間に結果を得ることができるため¹⁹⁾、われわれは RAPD-PCR が検査室に適した方法であることを考慮し、本方法により本菌を型別することを試みた。その結果、本菌30菌株は主要な5つの

DNA パターンに型別された。その中で1996年1月から2月にかけて、集中的に分離された臨床材料由来20株のDNAの型は、TCCのネブライザー由来2株と同一であった。それに対して、その期間以外に分離された菌株8株のDNAパターンとは異なることが分かった。これらのことは、TCCのネブライザー薬液が本菌の最初の汚染源として、TCC内で同一菌株による小規模な伝播が発生したことを示唆した。さらに、その5カ月後に分離された菌株のDNAの型は、伝播した菌株とは異なることから、TCCにおける一連の同一菌株による伝播は終息したことが推測された。また、興味あることに心臓内科の入院患者cと脳外科病棟の入院患者fからの分離菌株のDNAパターンは、TCCに入院中の患者由来株とネブライザー由来株のパターンと一致した。そこでこれら2名の患者の病棟の転床を追跡したところ、最初の入院病棟はTCCであり、その入院中に同じネブライザー薬液を受けていたことが判明した。以上のことから、今回のRAPD-PCRより得られた5つのDNAパターンの解析から、患者間の関連性を明らかにし、伝播した菌株の追跡調査が可能であった。

今後われわれは本院においてこれらの5つのDNAパターンを示す以外の菌株が、院内流行を引き起こさないとも限らないため、さらに*B. cepacia*の菌株を収集し、RAPD-PCRを用いてDNAパターンを決定して行きたい。こうした調査は本院において*B. cepacia*が院内流行したとき、流行拡大防止対策を迅速に行うために有効であると考えられる。

謝辞 稿を終えるに当たり、御協力を頂きました本院中央臨床検査部微生物検査室の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) Beryl JR, David EH: Pneumonia and septicemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. *Johns Hopkins Med J* 1980; 147: 188-189.
- 2) Mary C, Vernon F: Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970-1989. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 1007-1017.
- 3) Govan JRW, Deretic V: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid

Pseudomonas aeruginosa and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.

- 4) 藤田次郎, 根々山清, 瀧川圭一, 他: *Pseudomonas cepacia* による院内感染肺炎の検討. *日胸疾会誌* 1992; 30: 1215-1221.
- 5) Jack DS, Nehama H, Gabi R, David M: Nosocomial *Pseudomonas cepacia* infection associated with chlorhexidine contamination. *Am J Med* 1982; 73: 183-186.
- 6) Spencer RC: The emergence of epidemic, multiple-antibiotic-resistant *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* and *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Hosp Infect* 1995; 30: 453-464.
- 7) Hoiby N: Isolation and treatment of cystic fibrosis patients with lung infections caused by *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med* 1995; 46: 280-287.
- 8) David AP, Daniel VS, Ofclia CT, Loretta AC, Nancye CC, William RJ: Possible nosocomial transmission of *Pseudomonas cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 805-812.
- 9) Richard JH, Eric DH, Paul RG *et al.*: An outbreak of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas) cepacia* respiratory tract colonization and infection associated with nebulized albuterol therapy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 762-766.
- 10) Pegues CF, Pegues DA, Ford DS *et al.*: *Burkholderia cepacia* respiratory tract acquisition: Epidemiology and molecular characterization of a large nosocomial outbreak. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 309-317.
- 11) Rabkin CS, Jarvis WR, Anderson RL *et al.*: *Pseudomonas cepacia* typing systems: Collaborative study to assess their potential in epidemiologic investigations. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 600-607.
- 12) Daniel JA, Janet SK, Michael LV, Dale NG, Edward NJ: DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 648-649.
- 13) Eshwar M, Maureen EC, Deborah AH, David PS: Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: Analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2914-2920.

- 14) Stauffer GH, Plamann MD, Stauffer LT: Construction and expression of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli gylA* gene. *Gene* 1981; 14: 63-72.
- 15) 和田幹良, 森田耕司, 渡辺 登, 他: PCR 法による *Aeromonas sobria* のヘモリシン遺伝子の検出. *感染症誌* 1996; 70: 1266-1270.
- 16) 森田耕司, 和田幹良, 伊藤健一郎, 他: RPKM プライマーを用いた RAPD 解析の分子疫学的有用性. *日児誌* 1998; 53(1): 271.
- 17) Kerr JR, Moore JE, Curran MD *et al.*: Investigation of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care unit by random amplification of polymorphic DNA assay. *J Hosp Infect* 1995; 30: 125-131.
- 18) Edouard B, Stephane B, Pierre R *et al.*: Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O: 12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3226-3229.
- 19) Tambic A, Power EGM, Talsania H *et al.*: Analysis of an outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3092-3097.

Analysis of Transmission of *Burkholderia cepacia* Isolates in an Intrahospital by Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR Method

Mitsuhiro OKAZAKI¹⁾, Koji MORITA²⁾, Naoko KOCHI¹⁾, Koji ARAKI¹⁾,
Mie YOSHIZAWA³⁾, Hiroshi WADA²⁾, Mikiyoshi SHIBATA²⁾,
Noboru WATANABE²⁾, Teruo EGAMI¹⁾, Nobushige FURUYA¹⁾,
Masato KANAMORI²⁾, Shuji SHIMAZAKI³⁾
& Hidemasa UCHIMURA¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratories, Kyorin University Hospital

²⁾Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences

³⁾Trauma and Critical Care Center, Kyorin University Hospital

Strains of *Burkholderia cepacia* isolated in our hospital from November 1995 to September 1996 were classified with randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) and conventional biochemical tests (ID test • NF-18, API20NE, and Neg Combo 4J kit), and intrahospital isolates of *B. cepacia* were analysed. During the period 28 strains from inpatients and 2 from medical apparatus were isolated. Twenty four of 28 (85.7%) were from sputum. In 1996 from January to February, 20 strains were detected from 8 inpatients, and two strains were from the nebulizers at the Trauma and Critical Care Center (TCC). With typing of *B. cepacia* by conventional methods no epidemiological relations among isolates were found. However, DNA patterns of original isolates from the nebulizers at TCC by RAPD-PCR were identical with those of isolates in sputa from patients in other wards who had stayed at TCC, indicating that TCC was an initial source of transmission and the strain was transmitted with the patients to the wards.

These results suggest that RAPD-PCR method might be an useful tool to analyse an epidemiological survey for intrahospital transmission of isolate.