

マイコプラズマ診断における LAMP法の臨床的有用性

橋本 幸平¹⁾、戸口 明宏¹⁾、平田 雅子¹⁾、栗原 真澄¹⁾、
山田 智¹⁾、古村 絵理¹⁾、小栗 豊子¹⁾、細川 直登²⁾、
大塚 喜人¹⁾

1) 医療法人鉄蕉会 亀田総合病院 臨床検査部

2) 同 総合診療・感染症科



はじめに

- マイコプラズマ感染症の診断法として、分離培養法や、血清抗体検査などが挙げられるが、分離培養法は1週間以上要し、血清抗体検査は診断の確定にはペア血清を必要とする。
- 今回、我々はloop-mediated isothermal amplification(LAMP)法を用いて *M. pneumoniae* 遺伝子を検出し、マイコプラズマ感染診断の有用性について検討したので報告する。



対象

- 2012年1月から8月の間に当院にてマイコプラズマLAMP法の依頼があった551検体（喀痰392件、咽頭ぬぐい液157件、BALF2件）を対象とした。
- IgMを検出するイムノクロマト法が依頼された82例については2法の比較も行った。
- 年齢は平均15.5歳（0歳～93歳）



方法

- DNA抽出：QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）
- 試薬：Loopamp®マイコプラズマP
検出試薬キット（栄研化学）
- 機器：Loopamp®EXIA（栄研化学）
- 反応条件：65°C、60分間



●DNA抽出(QIAGEN法)

- 1) アシストチューブに検体100 μ l分注する
- 2) そのチューブにBuffer ATLを100 μ l、ProteaseKを20 μ l添加し混和する
- 3) 混合液を56 $^{\circ}$ Cで検体が20分または溶解するまで加温する
- 4) BufferALを200 μ l添加後、混和して、70 $^{\circ}$ Cで10分間加温する
- 5) エタノール200 μ l添加し混和する
- 6) DNeasy Miniスピンカラムスピンカラムに混合液を入れ8000rpm、1分遠心する
- 7) ろ液は捨て、新しいチューブをセットし、Buffer AW 1を500 μ l添加して、8000rpm、1分遠心する
- 8) ろ液は捨てチューブをセットし、Buffer AW 2を500 μ l添加して、15000rpm、4分遠心する
- 9) ろ液を捨て、15000rpm、2分遠心して乾燥させる
- 10) 新しいアシストチューブをセットしBuffer AE 50 μ lを滴下する
- 11) 室温で5分静置した後、8000rpm、1分遠心し、ろ液をDNA検体とする



測定

- 1) アシストチューブにDNA10 μ lを分注する
- 2) 95 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベート後、氷冷する
- 3) 新しいアシストチューブにマイコプラズマP
検出試薬キットのRM試薬をとそのチューブ
にBst-polymelase試薬分注する
- 4) 0.2ml LAMPチューブにDNA5 μ lと試薬混合液
20 μ lを分注し、混和する
- 5) 機器にセットし65 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる



結果①

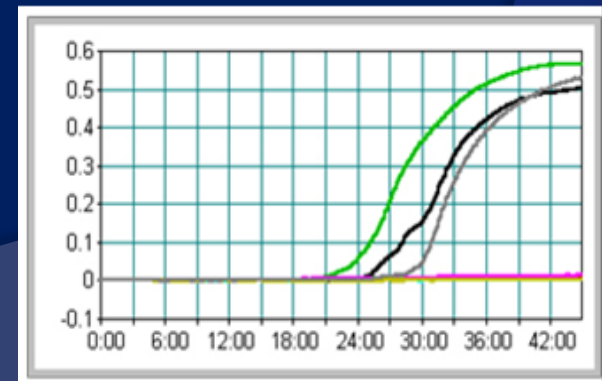
●LAMP法と臨床診断との比較



		臨床診断		
		(+)	(-)	計
LAMP法	(+)	202	2	204
	(-)	8	339	347
計		210	341	551

診断感度：96.1%

診断特異度：99.4%



結果②

●イムノクロマト法と臨床診断との比較

		臨床診断		計
		(+)	(-)	
イムノ クロマト法	(+)	26	8	34
	(-)	34	14	48
計		60	22	82

診断感度：43.3%

診断特異度：63.6%

LAMP法陽性でマイコプラズマ感染と 診断されなかった2例

- ①症状や既往から気管支喘息と診断された。
しかし、マイコプラズマ気管支炎は否定できなかった。
- ②画像所見、WBC： $242 \times 10^2/\mu\text{l}$ 、CTXの処方
で奏功したことから細菌性肺炎と診断された。

LAMP法陰性でマイコプラズマ感染と 診断された8例

- 検体は4例が喀痰、4例が咽頭ぬぐい液
- 喀痰4例中2例は小児科依頼でGeckler6。
残り2例はGeckler5。

考察①

- Geckler 5 の喀痰であったが、LAMP法陰性でマイコプラズマ感染と診断された2例は小児の吸引痰で検体量が少量であり菌量が少なく検出できなかったと考える。
- IgM抗体は感染後、1年は陽性が持続するという報告がある。また、小児の場合抗体の産生が弱く、感度、特異度が低くなった可能性がある。

考察②

- 近年、マイコプラズマの抗菌薬耐性化が指摘されており、診断の迅速化が必要。
- 培養結果や抗体価の上昇を確認するには時間を要する。
- 今後、遺伝子を迅速に検出できるLAMP法がマイコプラズマだけでなく、他の病原体による感染症診断で活用できるようになることを期待する。

