

20100123 第 54 回日本臨床検査医学会 九州地方会シンポジウム

細菌感染症検査と臨床決断—検査結果をどう使うか—

呼吸器感染症診療における迅速検査の現状と将来

長崎大学病院検査部

柳原克紀、上平 憲

はじめに

呼吸器感染症の代表的な疾患である肺炎による死亡者は年間約 10 万人であり、高齢者になればなるほど多くなる。超高齢社会を迎えるわが国では、呼吸器感染症はますます重要な疾患となる。呼吸器感染症の原因微生物は多彩であり、肺炎球菌、インフルエンザ菌といった細菌群に加え、マイコプラズマ、クラミジアならびにレジオネラなどの非定型病原体が関与する。そのため、最適な抗菌薬を選択するのは専門医であっても難しい。抗菌化学療法は微生物を制御する原因療法であるため、薬剤の選択は科学的に行われるべきである。しかしながら、1. 治療前に原因菌が推定できない症例が多い。2. 感染症の治療は早く開始しなければ、予後が悪くなる。などの理由で広域抗菌薬が安易に投与される症例が少なくない。広域抗菌薬の頻用が耐性菌増加に関与しており、早急に是正する必要がある。適切な治療薬の選択には原因菌の推定が必要であり、微生物検査が果たす役割はきわめて大きい。

本稿では、呼吸器感染症における原因菌の耐性状況と微生物検査の重要性に関して概説する。

Key words 日本語: 呼吸器感染症、薬剤耐性菌、肺炎球菌、緑膿菌、遺伝子診断

Key words 英語: **respiratory tract infection, resistant bacteria, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, PCR**

市中肺炎の原因菌と耐性状況

Table 1 に市中肺炎の一般的な原因微生物の頻度を示す。肺炎球菌、マイコプラズマ、インフルエンザ菌、肺炎クラミドフィラ（クラミジア）が挙げられ、重症で入院加療が必要な肺炎では、肺炎球菌やインフルエンザ菌の他、黄色ブドウ球菌、レジオネラ、グラム陰性桿菌が加わる。薬剤耐性菌の存在は大きな問題であり、特にマクロライドやペニシリンに対する耐性菌が多いことに留意すべきである。

以下、おもな原因菌の特徴を示す。

(1)肺炎球菌

肺炎球菌は呼吸器感染症、特に市中肺炎において最も高頻度に分離される極めて重要な原因菌である。肺炎球菌の薬剤耐性化は深刻であり、日本では、肺炎球菌のマクロライド系への耐性は80%以上、ペニシリン系への耐性も60%程度となっている。ペニシリン耐性肺炎球菌 (Fig. 1)¹⁾ならびにマクロライド耐性肺炎球菌(Fig.2) のデータを示す。これは、 β -ラクタム系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬が多用されてきたことに加え、これらが特に低用量で使用されてきたことが影響しているものと予想される。我が国における肺炎球菌性肺炎 308例の臨床的解析では、耐性菌症例は慢性閉塞性肺疾患を有する症例に多くかつ難治であることが明らかにされた²⁾。経口抗菌薬で最も抗菌活性が高いのは、レスピラトリーキノロンであり、有効性が期待される。しかし、キノロン系抗菌薬が投与されることが多い高齢者でキノロン耐性の *S. pneumoniae* が増加しているとの報告もみられ³⁾、適正使用が求められている。

(2)インフルエンザ菌

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*) は、肺炎球菌とならび、成人市中肺炎の主要な原因菌の一つである。また、小児科領域においては難治性中耳炎、細菌性髄膜炎などの原因菌としても重要である。近年、*H. influenzae* は抗菌薬の耐性化が進み、 β -ラクタム系抗菌薬をはじめとする多くの抗菌薬に対し耐性を示すようになった。我が国では、これまで β -ラクタム系抗菌薬耐性は β ラクタマーゼ産生によるものが主体であったが、近年、 β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR)が急速に拡がり (Fig. 3)⁴⁾、治療に抵抗する症例が増加してきている⁵⁻⁷⁾。近年では免疫抑制剤ならびにステロイド投与症例など易感染性患者での感染例や、高齢者人口の増加に伴い高齢者での重症例などが報告されている。また、小児と接触する機会が多い 30-40 代の女性において、BLNAR による肺炎を発症しやすいことが明らかにされた⁸⁾。経口薬ではニューキノロン系や第3世代セフェム系薬が第一選択薬となる。注射薬では、PIPC、第3世代セフェム系薬ならびにカルバペネム系薬の有効性が高い。但し、BLNAR に対する抗菌活性は同系統の薬剤間でも差異があることも知っておく必要がある。⁴⁾

(3)マイコプラズマ

マイコプラズマは自己増殖可能な最小の微生物であり、光学顕微鏡では観察することができない。従って細菌性肺炎と異なり、喀痰のグラム染色による原因菌の推定はできない。診断はほとんどの症例において、ペア血清によって行われるが、発病早期に上昇する IgM という抗体を検出する迅速反応キット (イムノカード・マイコプラズマ抗体) を用いることで診断できる。

マクロライド系薬が第一選択となるが、2000 年以降マイコプラズマにおいて

もマクロライド耐性菌が報告されるようになった。マクロライド耐性マイコプラズマの増加を危惧する報告も我が国の研究者からなされている⁹⁾ その耐性機序は 23SrRNA 遺伝子の変異 (A2063G, A2064G) によるものと考えられており感性株の MIC=0.015-0.030ug/ml であるのに対して耐性株では MIC=256ug/ml 以上になる。現在はほとんどの株が感受性であるためマクロライド系薬が第一選択となるが、耐性化の動向を十分監視していく必要がある。

(4)レジオネラ

レジオネラは細胞内寄生菌であるため β -ラクタム薬は無効である。シプロフロキサシン (CPFX) やパズフロキサシン (PZFX) などの注射用ニューキノロン薬は良い適応であり単剤での有効性が報告されている。

2. 迅速診断の有用性

塗抹鏡検

最も簡便で迅速な診断法であり、グラム染色、チールニールセン染色、ヒメネス染色、蛍光染色などが挙げられる。特にグラム染色は、塗抹、染色、乾燥、鏡検の全行程が 5 分程度で可能であり、最も迅速かつ有用な検査である。

信頼できるグラム染色結果を得るためには、良質な喀痰を採取する必要がある。Gleckman らは喀出痰を分類し、単一の菌が多量に観察される良質な喀痰を用いれば、85%以上の確率で推定できると報告した¹⁰⁾。しかしながら、実際には良質な喀痰が採取される頻度は、40%程度とする報告もあり、喀痰すら得られないこともしばしばである。このような際には、高張食塩水 (3%) の吸入による誘発喀痰などを試みる。採取された喀痰が泡沫状で唾液と予想される場合は、複数回の採痰を行い、良質な検体を得る努力を行う。

また、喀痰中には口腔内常在菌が混入する可能性があるため、喀出前とうがいを行わせる。採取された検体の膿性部分のみのグラム染色を行うことで、口腔内常在菌の影響を除去する。得られた検体を滅菌生理食塩水で洗浄し膿性部分のみ取り出す喀痰洗浄法も優れた方法である。抗菌薬の投与もグラム染色の判断に大きな影響を与えるので、抗菌薬投与前の検体採取を原則とするべきである。

Roson らの入院加療が必要となった肺炎球菌およびインフルエンザ菌による市中肺炎におけるグラム染色の有用性の検討 (Table 2)¹¹⁾では、高い有用性を示した。グラム染色では、グラム陽性球菌、グラム陰性桿菌などの区別だけでは不十分であり、連鎖状、ぶどうの房状などの増殖形態や正円形や楕円形などの細かい特徴も考慮する。市中肺炎の主要な原因菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌、肺炎桿菌、S.millieri group、緑膿菌、ブドウ球菌などの鑑別は可能である。

抗原検出法

抗原検出は、感染症の迅速診断として有用であるが、その検体としては、血液、尿、髄液があげられる。呼吸器感染症の診断には、尿および血液が用いられる。

尿中抗原検出法

呼吸器感染症においては、現在は肺炎球菌とレジオネラ菌の尿中抗原検査が臨床応用されている。肺炎球菌尿中抗原キットは、病初期から尿中に排泄される肺炎球菌の莢膜多糖抗原をイムノクロマトグラフィー（ICT）で検出するもので感度 70～80%、特異度 94～99%（肺炎球菌のほとんどの血清型を検出可能）程度である。（Table 3）Binax Now シリーズの尿中抗原検出キットは、所要時間は 15 分と短く、迅速性は極めて高い。検出する肺炎球菌尿中抗原検査における留意事項として、他の微生物と交差反応性はないが、*Streptococcus mitis*（共通抗原をもつ）による偽陽性がある。鼻咽腔に肺炎球菌が常在している乳幼児などでも、偽陽性となることがある。（接種後 5 日以内は）肺炎球菌ワクチンの影響を受ける。肺炎球菌感染症罹患後、数週間にわたって陽性が持続し、軽快した後でも 70%が陽性持続したとの報告もみられる。

尿中抗原検査は感度がやや低いことが問題であった。現在申請中である喀痰中の肺炎球菌抗原迅速検出キットは、感度が 90%程度まで向上されており、臨床応用が期待されている。¹³⁾

レジオネラ症では、症状の出現 2-3 日後より尿中に抗原が出現し、2 週間程度抗原陽性が持続する。肺炎球菌と同様に ICT で検出する方法であり簡便である。従来は血清抗体価のみの診断であり、尿中抗原検出により診断率が格段に向上した。注意点は、*Legionella pneumophila* serogroup 1 のみしか検出できないため、血清型が異なる *Legionella pneumophila* や *L.pneumophila* 以外のレジオネラ属は診断できないことである¹⁴⁾。

遺伝子診断の現況と将来像

上述したように呼吸器感染症には薬剤耐性菌が関与することが多い。耐性化はきわめて深刻であり、グラム染色や抗原検出による原因菌の推定だけでは適切な抗菌薬を選択できない可能性がある。広域抗菌薬が使用される傾向にあり、さらに耐性菌を誘導してしまうことが懸念されている。このような状況で、臨床診断や適切な化学療法の推進に貢献できる遺伝子診断法を開発中である。

multiplex PCR を用いた多剤耐性肺炎球菌の診断

肺炎球菌の耐性化は分子レベルで解明されており、ペニシリンやマクロライドへの耐性機序や関与する遺伝子変異が報告されている。ペニシリン結合蛋白遺伝子の変異 (*pbp1a, 2b, 2x*)、マクロライド耐性に関わるリポソームのメチル化(*ermB*)と薬剤排出ポンプ遺伝子(*mefA*)を用いて、喀痰などの臨床検体を用いて、multiplex PCR により原因微生物を検出し、耐性遺伝子も同定する。また、*lytA* 用いて肺炎球菌の同定および定量を実施した (Fig.4)。これらの遺伝子検査の結果は培養検査とほぼ同等の成績が得られた (Fig. 5)¹⁵⁾。検体採取後数時間で結果が判明する本法は、抗菌薬選択に有用であると思われる。これらの結果に基づく抗菌薬の適正使用は、有効性のみならず耐性菌抑制にもつながる。

Real-time PCR を用いた耐性緑膿菌の迅速検出法

膿菌は感染防御能力の低下した患者に日和見感染症をひきおこす重要な微生物である。最近、緑膿菌に効果が期待されるカルバペネム系薬やフルオロキノロン系抗菌薬ならびにアミノ配糖体系抗菌薬などに幅広く耐性を獲得した「多剤耐性緑膿菌 (MDRP : Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*)」による院内感染症や院内肺炎が問題になっている。MDRP 感染症においては、迅速かつ正確な診断が有用であるが従来の方法では、数日を要するため、より迅速な検査法が求められている。

MDRP に関与することが多いメタロβラクタマーゼ遺伝子の検出を組み合わせ、real-time PCR 法による臨床検体からの耐性緑膿菌迅速定量法を試みた。臨床検体から緑膿菌の検出と定量を行い培養法と比較した。定量法は、*gyrB gene* の primer を用い LightCycler にて測定した。また、定量後にメタロβラクタマーゼ遺伝子の検出を行った。

臨床検体については、培養法にて緑膿菌が検出された臨床検体全てから *gyrB* の増幅が認められた。また、メタロβラクタマーゼ産生菌と判定された緑膿菌から高い頻度で *blaIMP* 遺伝子が検出された。*gyrB gene* を指標とした real-time PCR 法による緑膿菌の定量法が確立され、臨床検体への応用も可能であった。

(Fig. 6) 遺伝子抽出からメタロβラクタマーゼ遺伝子の検出まで最短4時間以内で可能であり、MDRP を範疇に入れた緑膿菌迅速モニタリング法として有用であることが示唆された¹⁶⁾。

解決すべき点として、非特異的PCR反応やPCR阻害等の一般的な問題に加え、喀痰中の常在菌が有する耐性遺伝子の混入など呼吸器感染症特有の問題が挙げられる。問題視されていた検査の手間や高価なコストも自動機器の進歩により、改善されつつある。呼吸器感染症の診療においても遺伝子検査を臨床応用することで耐性菌を迅速に診断し、適切な抗菌薬療法ができるものと期待される。

おわりに

呼吸器感染症の原因菌は多種多様であり、最適な抗菌薬を選択するのは容易ではない。そのため、広域抗菌薬が使われる傾向にあるが、耐性菌抑制の点からは好ましくない。グラム染色や尿中抗原検査可能な限り実施し、推定した原因菌に基づく治療を行うことがわが国や米国のガイドラインで推奨されている。日本呼吸器学会市中肺炎ガイドラインでも基本的に全ての患者に、外来であっても肺炎球菌尿中抗原検査を、入院の場合には肺炎球菌はもちろん、レジオネラの迅速診断検査、グラム染色、喀痰培養を推奨している。

また、PCR と質量分析装置を併用する (PCR-mass spectrometry) 迅速検出システムの開発も進められている。DNA ポリメラーゼの塩基伸長反応をリアルタイムに検出し、高い定量性を有する Pyrosequencing 法も新しい検査として注目されている。正確な診断は適切な抗菌薬療法につながるものであり、遺伝子検査の実用化が期待される。

Rapid and accurate detection of resistant bacteria for respiratory tract infection

We evaluated the combined use of real-time and multiplex PCR to which we referred as RQ-mPCR (real-time quantitative PCR combined with multiplex PCR) assay, using 200 clinical strains and 200 purulent sputum samples. The data indicate our RQ-mPCR method can rapidly and accurately quantify *S. pneumoniae* and simultaneously detect drug resistance genes in sputum samples. We employed a *lytA* primer/probe set for real-time PCR and simultaneously performed multiplex PCR for altered *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* genes and for *mef(A)* and *erm(B)* macrolide resistance genes. The sensitivity and specificity of the assay in sputum samples relative to isolated *S. pneumoniae* was 100% and 99.3% for *lytA*, 100% and 93.9% for *erm(B)*, 100% and 94.8% for *mef(A)*, 94.4% and 97.5% for *pbp1a*, 100% and 94.1% for *pbp2x*, and 100% and 95.6% for *pbp2b*.

We also established the rapid quantitative detection of metallo-beta-lactamase-producing *P. aeruginosa* in clinical isolates and samples using real-time PCR targeting *gyrB* (identification of *P. aeruginosa*) and *blaIMP* (identification of metallo-beta-lactamase). With clinical isolates, it was demonstrated that *gyrB*-PCR had a linear quantitative detection range of 7 logs with a lower detection limit of 10^3 copies per reaction. The relative sensitivities and specificities of this real-time PCR assay were as follows: 100.0% and 100.0% for clinical isolates, 100.0% and 98.4% for clinical specimens, respectively.

The present PCR assay was thus easily and quickly performed, and accurately detected *Pseudomonas aeruginosa* and metallo-beta-lactamase, and it should be helpful in the diagnosis and control of nosocomial infection.

We expect that the genetic diagnosis will be an adjunct to, or a replacement of, conventional culture methods and susceptibility tests.

文献

1. Goto H et al : **The Japanese Journal of Antibiotics**, **58 (3), 326 (2005)**
2. Yanagihara K, Otsu Y, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Hirakata Y, Tomono K, Kadota J, Tashiro T and Kohno S. Clinical characteristics of pneumonia caused by penicillin resistant and sensitive *Streptococcus pneumoniae* in Japan. Internal Medicine 43: 1029-33, 2004
3. Yokota S, Sato K, Kuwahara O, Habadera S, Tsukamoto N, Ohuchi H, Akizawa H, Himi T, Fujii N. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains occur frequently in elderly patients in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3311-5
4. 中村茂樹、柳原克紀、森永芳智、木谷貴嘉、松田淳一、泉川公一、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、迎 寛、田代隆良、上平 憲、河野 茂 下気道由来呼吸器検体から分離された β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) の検出動向と薬剤感受性試験の検討 日本化学療法学会誌 57 (1) 32-36, 2009
5. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistant in β -lactamase-negative ampicillin-resistnat *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemoter. 2001;45:1693-1699
6. Ohkusu K, Nakamura A, Sawada K: Antibiotic resistance among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in Japanese children. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2007;36: 249-254
7. 坂田 宏: 小児の呼吸器感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の注射用抗菌薬に対する薬剤感受性. 日化療会誌 51: 569-573, 2003.
8. Nakamura S, Yanagihara K, Seki M, Izumikawa K, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Hirakata Y, , Mizuta Y, Kohno S. Clinical characteristics of pneumonia caused by β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) Scand J Infect Dis. 39(6):521-4, 2007
9. Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, Chiba N, Takayanagi R, Matsubara K, Nakayama E, Sunakawa K, Ubukata K; Acute Respiratory Diseases Study Group. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 2008 ;52(1):348-50
10. Gleckman et al. Sputum gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia. J Clin Microbiol 26; 846-849, 1988
11. Rosón B, Carratalà J, Verdager R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective Study

of the Usefulness of sputum gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clinical infectious disease* 2000;31:869-874.

12. Murdoch DR, Laing RT, Mills GD, Karalus NC, Town GI, Mirrett S, Reller LB. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 39:3495-3498.
13. Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, Okada K, Kazuyama Y, Takayanagi N, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Fukushima K, Ishida T, Sawai T, Yoshimura K, Nakahama C, Ohmichi M, Kakugawa T, Nishioka Y, Aoki N, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum from patients with lower respiratory tract infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 ;16(5):672-8.
14. Murdoch D.R. Diagnosis of Legionella Infection *Clinical Infectious Disease* 2003;36:64-69
15. Fukushima K, Yanagihara K, Hirakata Y, Sugahara K, Morinaga Y, Kohno S, Kamihira S. Rapid Identification of Penicillin and Macrolide Resistance Genes and Simultaneous Quantification of *Streptococcus pneumoniae* in Purulent Sputum Samples Using a Novel Real-time Multiplex PCR Assay *J. Clin. Microbiol*. 2008;46(7):2384-8
16. Motoshima M, Yanagihara K, Yamamoto K, Morinaga Y, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S Quantitative detection of metallo-beta-lactamase of *blaIMP*-clusters -producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR with melting curve analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection *Diagn Microbiol Infect Dis*. 61(2):222-6, 2008

Rapid and accurate detection of resistant bacteria for respiratory tract infection

-Present situation and future-

Respiratory tract infection (RTI) is a common and potentially life-threatening illness that continues to be a major medical problem. The rapid detection system such as Gram staining or urinary antigen detection for respiratory infection is useful. However, the genetic diagnosis for resistant pathogens has been expected because they have been prevalent.

We evaluated the RQ-mPCR (real-time quantitative PCR combined with multiplex PCR) assay for drug-resistant *S. pneumonia* infection. The RQ-mPCR method developed here had high sensitivity and specificity for pneumococci and could detect drug resistance in both clinical *S. pneumoniae* strains and in sputum samples.

Furthermore, the results can be obtained directly from clinical samples within 3 h. This method may be helpful for the rapid screening of resistance in pneumococcal isolates, and should allow the administration of earlier, more focused and effective treatment of drug-resistant *S. pneumonia*.

We also established the rapid quantitative detection of metallo-beta-lactamase-producing *P. aeruginosa* in clinical isolates and samples using real-time PCR targeting *gyrB* (identification of *P. aeruginosa*) and *blaIMP* (identification of metallo-beta-lactamase). The present PCR assay was thus easily and quickly performed, and accurately detected *Pseudomonas aeruginosa* and metallo-beta-lactamase, and it should be helpful in the diagnosis and control of nosocomial infection.

We expect that the genetic diagnosis will be an adjunct to, or a replacement of, conventional culture methods and susceptibility tests.

Table 1 Causative agents from CAP in Japan

report source published year in/out patient total number of cases	Saito A, et al. J Infect Chemother 12:63, 2006 inpatient 232	Miyashita N, et al. J Med Microbiol 54:395, 2005 inpatient 372	Ishida T, et al. J Infect Chemother 10:359, 2004 inpatient 350
<i>S. pneumoniae</i>	<u>24.6</u>	<u>30.1</u>	<u>53.5</u>
<i>H. influenzae</i>	18.5	16.7	8.3
<i>M. pneumoniae</i>	5.2	12.4	15.4
<i>C. pneumoniae</i>	6.5	9.0	4.7
<i>Legionella</i> spp.	3.9	1.7	2.0
<i>S. aureus</i>	3.4	4.3	2.0
<i>C. psittaci</i>	2.2	1.3	0.4
<i>Moraxella</i> spp.	2.2	4.7	2.4
<i>Klebsiella</i> spp.	1.3	2.7	2.0
<i>S. milleri</i> group	1.3	2.0	1.6
Anaerobe	2.5	7.4	1.6
<i>Coxiella</i> spp.	0.9	0.7	
<i>P. aeruginosa</i>	0.4	2.7	1.6
Fungus	0.4		0.4
Virus	22.4	3.3	2.4
others	2.8	1.0	3.5
Unknown	23.7	33.6	33.1

(%)

Table 2 Clinical usefulness of sputum Gram stain for pneumococcal and *Haemophilus influenzae pneumonia* in 533 patients with community-acquired pneumonia that required hospitalization.

Variable	Definitive and presumptive diagnosis (<i>n</i> = 283)		Definitive diagnosis (<i>n</i> = 170)	
	Pneumococcal pneumonia	<i>H. influenzae pneumonia</i>	Pneumococcal pneumonia	<i>H. influenzae pneumonia</i>
Sensitivity	57.0	82.3	35.4	42.8
Specificity	97.3	99.2	96.7	99.4
Positive predictive value	95.1	93.3	90.6	75.0
Negative predictive value	71.3	97.6	62.7	98.2

NOTE. Data are percentages. Overall, 135 patients had a final diagnosis of pneumococcal pneumonia, of which 82 were classified as definitive, and 34 patients had a final diagnosis of *H. influenzae pneumonia*, of which 7 were classified as definitive.

Table 3 Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples

References	sensitivity	specificity
Boulware DR. et al. J Infect 55:300–9, 2007.	74 %	94 %
Smith M. D. et al. J Clin Microbiol. 41:2810-2813, 2003.	82 %	97 %
Farina C. et al. New Microbiol. 25: 259-263, 2002.	77.7 %	98.8 %
Dominguez J. et al. Chest. 119: 243-249, 2001.	80.4 %	97.2 %

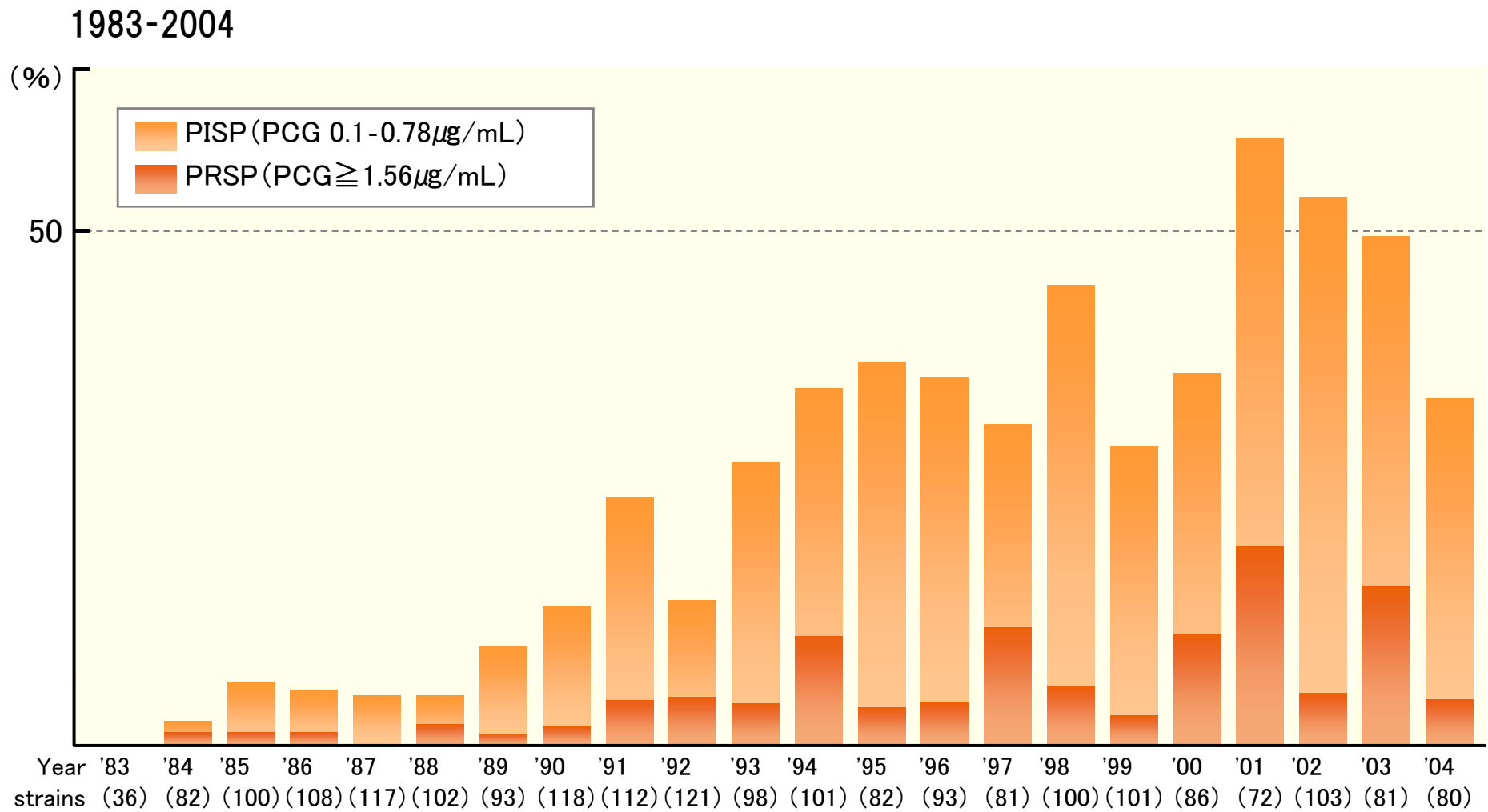


Fig. 1 Prevalence of Penicillin-resistant pneumococci in Japan

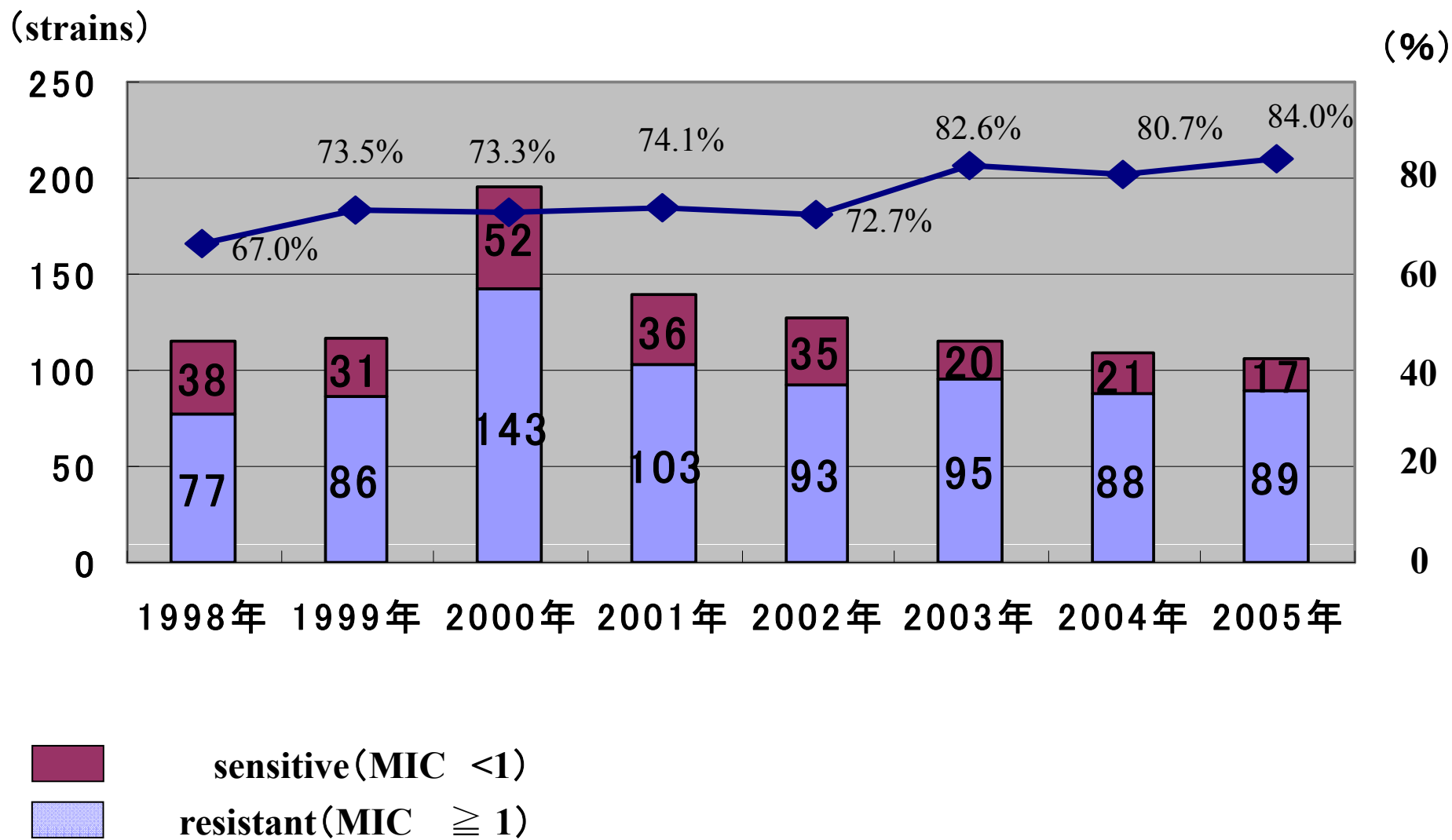


Fig.2 Prevalence of Macrolide-resistant pneumococci in Nagasaki Univ. Hospital

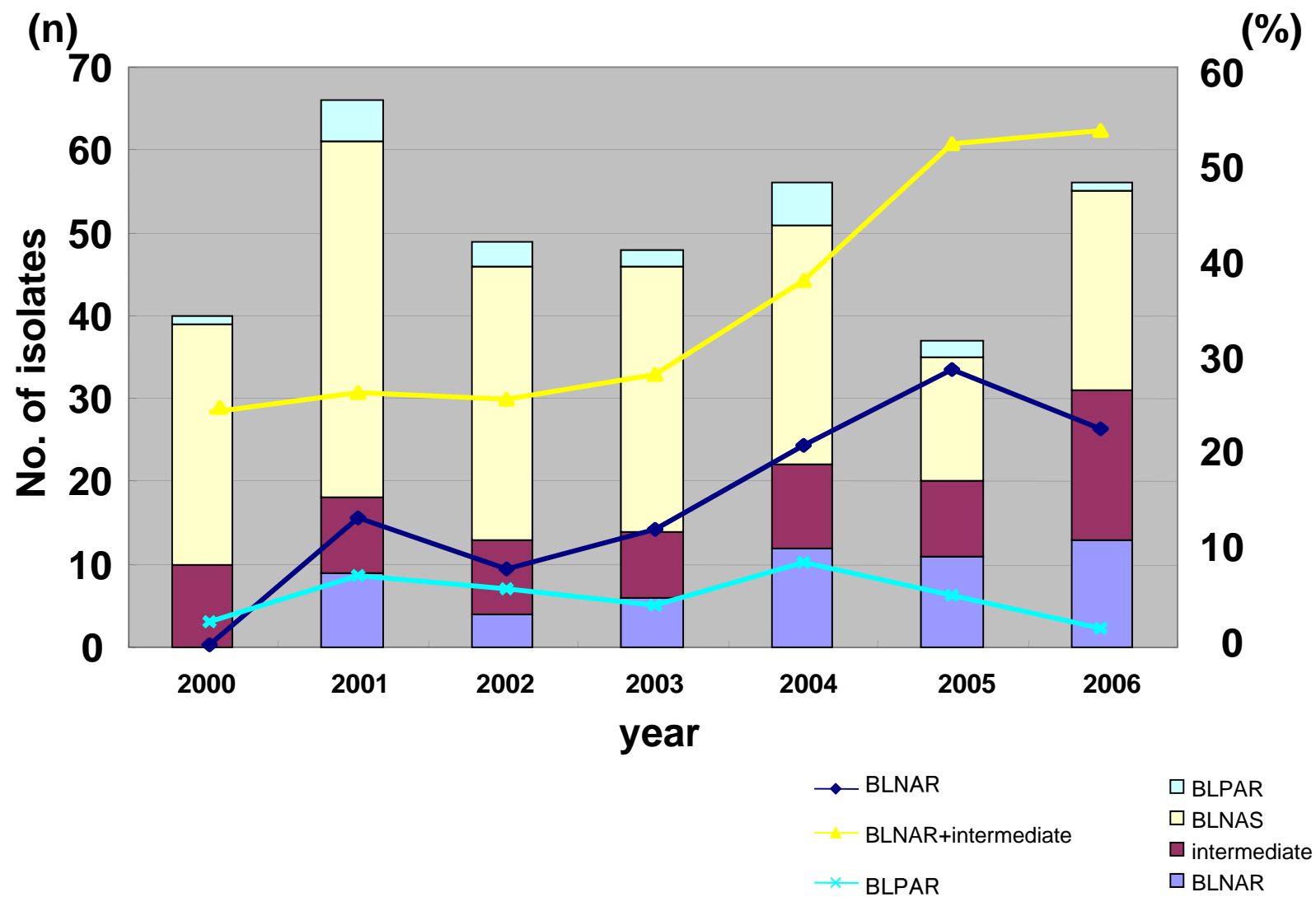


Fig. 3 Prevalence of β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) in Nagasaki Univ. Hospital

200 clinical strains and 200 sputum

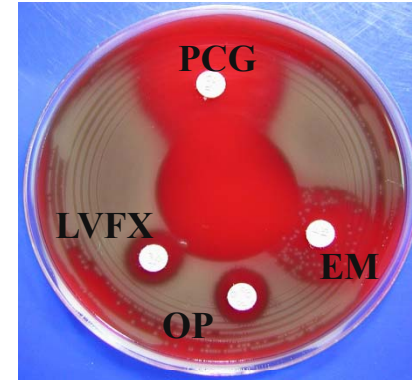
RQ-mPCR

1. Enzymatic digestion of sputum
treated with SPUTAZYME® solution
2. DNA extraction
QIAamp® DNA Blood Mini Kit
3. RQ-mPCR (1hr)



- 1) *S. pneumoniae* identification (*lytA*)
- 2) *S. pneumoniae* quantification (*lytA*)
- 3) Gel based detection of drug-resistant genes
(*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*, *ermB*, *mefA*)

culture and MIC tests



- 1) *S. pneumoniae* identification
Optochin sensitivity and bile solubility
- 2) quantitative culture
- 3) MICs (broth dilution method)
Penicillin G, Erythromycin

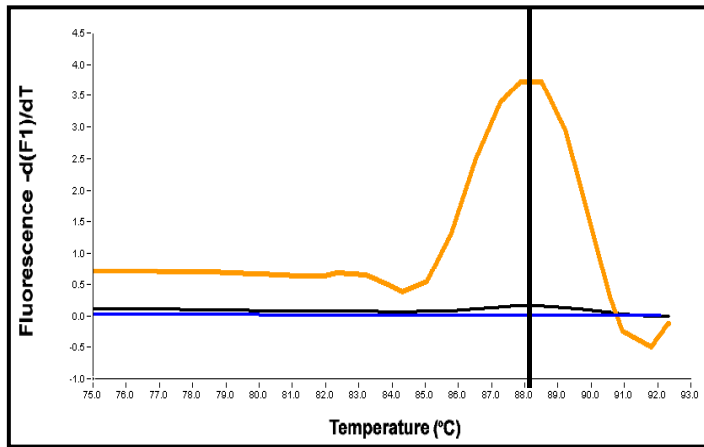
Fig. 4 Methods in comparison with classical techniques.

(Rapid Identification of Penicillin and Macrolide Resistance Genes and Simultaneous Quantification of *Streptococcus pneumoniae* Using a Novel Real-time Multiplex PCR Assay)

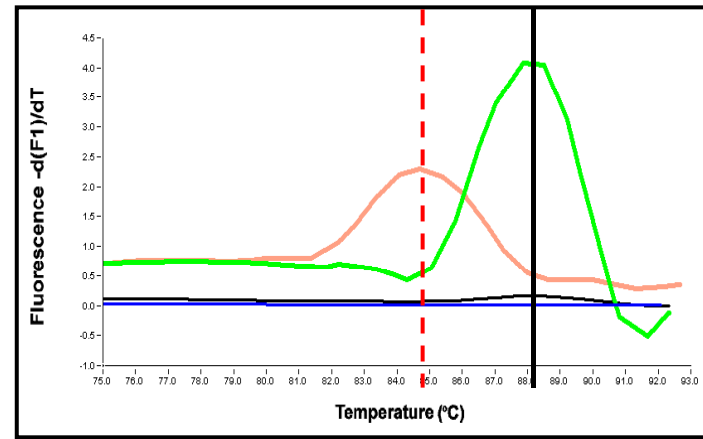
RQ-mPCR results	MIC ($\mu\text{g/ml}$) distribution of Penicillin G									
	≤ 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
none	50	26	10	2						
only <i>pbp2x</i>		1	6	9	4					
only <i>pbp1a</i>			2	4	7	4				
<i>pbp1a</i> + 2 <i>x</i>				4	1	3	2			
<i>pbp1a</i> + 2 <i>x</i> + 2 <i>b</i>					4	6	16	20	18	1

RQ-mPCR results	MIC ($\mu\text{g/ml}$) distribution of Erythromycin						
	<0.5	1	2	4	8	16	≥ 32
none	56						
only <i>mef(A)</i>		4	15	17	9	1	
only <i>erm(B)</i>				3	7	10	67
<i>mef(A)</i> + <i>erm(B)</i>					1	2	8

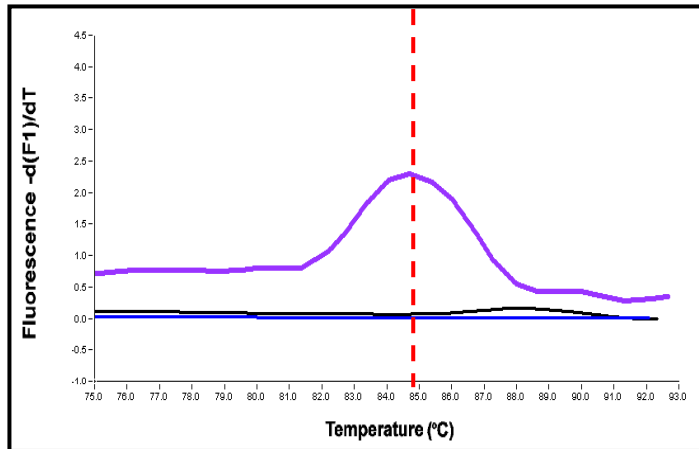
Fig. 5 PCR results and MICs of penicillin G and erythromycin in 200 pneumococcal isolates



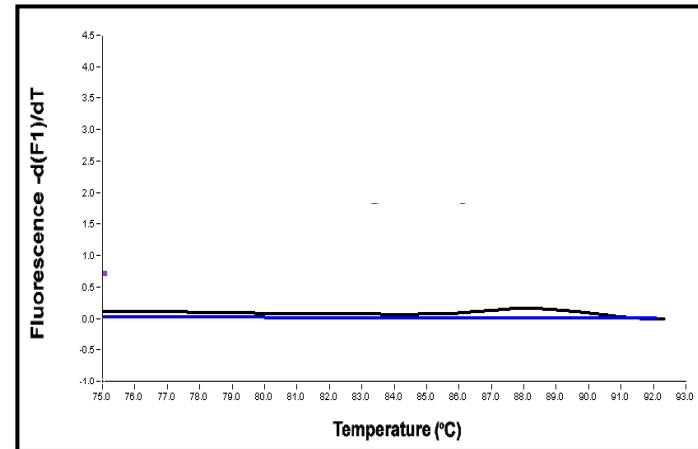
Type 1: non-metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa*.



Type 2: metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa*.



Type 3: metallo- β -lactamase-producing non-*P. aeruginosa*.



Type 4: non-metallo- β -lactamase-producing non-*P. aeruginosa*.

Fig.6 Melting peak patterns for *P. aeruginosa* and metallo- β -lactamase. Types 1-4 were classified based on combinations of the two melting peak patterns. The black line indicates 88°C, and the red dotted line indicates 85°C.