

## 香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2016)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Extracted from the Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Kagawa Prefecture (2016)

福田 千恵美                      関 和美                      岩下 陽子                      内田 順子  
Chiemi FUKUDA              kazumi SEKI              Yoko IWASHITA              Junko UCHIDA

## 要 旨

2016年1月から12月の間に香川県内の医療機関で検出されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*:CRE) 21株について、PCR法による遺伝子解析を行った。また、カルバペネマーゼ遺伝子についてはシークエンス解析により variant を検索した。菌種は、*Enterobacter aerogenes* 10株、*Enterobacter cloacae* complex 5株、*Serratia marcescens* 3株、*Citrobacter freundii* 1株、*Citrobacter koseri* 1株、*Escherichia coli* 1株で、検出遺伝子はカルバペネマーゼ遺伝子であるIMP-1型2株、GES型1株、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子であるEBC型9株、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(extended-spectrum β-lactamase:ESBL) 遺伝子であるTEM型及びCTX-M-2型1株で、カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は14.3%(3株)であった。シークエンス解析の結果、カルバペネマーゼ遺伝子のうちGES型1株は、GES variant の*bla*<sub>GES-5</sub>、IMP-1型2株は、*bla*<sub>IMP-1</sub>と判明した。今後も継続して、医療機関へ情報を還元するとともにカルバペネマーゼ遺伝子保有株の検出状況を監視する必要がある。

## Abstract

We carried out genetic analysis, by means of the PCR method, of 21 isolates of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) isolated in medical institutions in Kagawa Prefecture from January to December 2016. Ten isolates were *Enterobacter aerogenes*, five were *Enterobacter cloacae* complex, three were *Serratia marcescens*, one was *Citrobacter freundii*, one was *Citrobacter koseri* and one was *Escherichia coli*. Among the isolates analyzed, two of them were found to possess the carbapenemases gene of *bla*<sub>IMP-1</sub> group, one was of the *bla*<sub>GES</sub> group, ten of them possess the AmpC β-lactamase genes of *bla*<sub>EBC</sub> group, and one of them possesses the ESBL genes of *bla*<sub>TEM</sub> group and *bla*<sub>CTX-M-2</sub> group. The proportion of the carbapenemase gene was 14.3%. The genes of the one *bla*<sub>GES</sub> group isolate were specified to be the GES variant *bla*<sub>GES-5</sub>, and the two *bla*<sub>IMP-1</sub> group isolates were specified to be *bla*<sub>IMP-1</sub> by sequence analysis. It is important to continue the research of the antimicrobial-resistant genes and to supply feedback in cooperation with medical institutions.

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 薬剤耐性遺伝子 PCR法 カルバペネマーゼ

## I はじめに

平成29年3月28日厚生労働省課長通知<sup>1)</sup>によりカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*:CRE)感染症等において、地域における薬剤耐性菌の蔓延などの流行状況を把握するために、地方衛生研究所で当該耐性菌に係る詳細な解析の実施等に努める努力目標が発出されている。CREはカルバペネマーゼ産生菌(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*:CPE)かどうか院内感染対策上重要である。CREの薬剤耐性遺伝子を地方衛生研究所で解析し

医療機関等に還元することにより院内感染対策に寄与することができる。また、感染症サーベイランスシステム(NESID)への報告により国内での流行状況の把握にも貢献することになる。CPEにおいて分離頻度が高く、国内で蔓延が警戒されているカルバペネマーゼにIMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型がある<sup>2)</sup>。その他、分離数は少ないものの、GES型、IMI型、SMB型、SME型など様々な遺伝子型が報告されている<sup>3)</sup>。

2016年に香川県内で検出されたCREの薬剤耐性遺伝子の県内での検出状況を報告する。

## II 方法

### 1 供試菌株

2016年1月から12月の間に香川県内で5類感染症全数把握により報告されたCRE 15株と調査研究協力施設より提供のあったCRE 6株、合計21株を対象とした。

### 2 方法

#### (1) 菌種同定

普通寒天培地(日水製薬株式会社)に純培養後、BBLクリスタルE/NF(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)により同定を行った。

#### 3 薬剤耐性検査

(1) 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認およびカルバペネマーゼ産生性の確認

ディスク法は、3-アミノフェニルボロン酸<sup>4)</sup>、クロキサシリン<sup>5)</sup>、メルカプト酢酸ナトリウムディスク<sup>6)</sup>、クラブラン酸含有ディスク<sup>7)</sup>による阻害試験及び、Carba NP test<sup>8)</sup>、mCIM<sup>9)</sup>を行った。

#### (2) PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子検出

カルバペネマーゼ遺伝子: IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型、NDM型、KPC型、GES型、OXA-48型、クラスA β-ラクタマーゼ遺伝子: TEM型、SHV型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group、プラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子: MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型について検索した<sup>10)</sup>。

#### (3) シークエンス解析

カルバペネマーゼ遺伝子は、シークエンス解析によりvariantを検索した。

IMP-1型は、国立感染症研究所のマニュアル<sup>11)</sup>に準じて行い、GES型は国立感染症研究所薬剤耐性研究センターおよび病原体ゲノム解析研究センターで実施した。

## III 結果

菌種と耐性遺伝子の検出状況を表1に示す。

菌種は、*Enterobacter aerogenes* 10株、*Enterobacter cloacae* complex 5株、*Serratia marcescens* 3株、*Citrobacter freundii* 1株、*Citrobacter koseri* 1株、*Escherichia coli* 1株であった。

検出遺伝子はIMP-1型2株(*E. cloacae* complex 2株)GES型1株(*S. marcescens* 1株)、EBC型10株(*E. aerogenes* 7株、*E. cloacae* complex 3株)、TEM型及びCTX-M-2型1株(*E. coli* 1株)が検出された。

このうち、カルバペネマーゼはIMP-1型とGES型であり、カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は、14.3%であった。

Carba NP test及びmCIMの結果は、IMP-1型は陽性であったが、GES型及びカルバペネマーゼ遺伝子非検出株(non-CPE)は陰性であった。

ディスクによる阻害試験結果は、IMP-1型検出株はメルカプト酢酸ナトリウムディスクによる阻害がみられた。GES型検出株は、クラブラン酸含有ディスク及び3-アミノフェニルボロン酸による弱い阻害がみられた。(図1、2)

IMP-1型カルバペネマーゼ遺伝子2株の塩基配列を解析した結果、*bla*<sub>IMP-1</sub>(GenBank Accession No.S71932)にコードされる配列とアミノ酸配列が一致した。

GES型β-ラクタマーゼ遺伝子を国立感染症研究所に解析依頼し、塩基配列を解析した結果、*bla*<sub>GES-5</sub>(GenBank Accession No. AY494717)にコードされる配列とアミノ酸配列が一致した。プラスミド解析の結果、*bla*<sub>GES-5</sub>は、replicon typeがIncP(6) groupのプラスミドに存在した。

## IV 考察

*Enterobacter*属が全体の7割を占めていた。*Enterobacter*属でも*E. cloacae*は、カルバペネマーゼ産生遺伝子を持つ割合が5株中2株、*E. aerogenes*は、すべてカルバペネマーゼ非産生株であった。*E. cloacae*のカルバペネマーゼ保有割合が高く、これは前年度と同じ傾向であった。反対に、カルバペネマーゼ産生遺伝子保有*E. aerogenes*が検出された場合、院内でのプラスミド伝播の可能性があるので、今後も動向に注意したい。

Carba NP test、mCIMのスクリーニング検査とPCR法によるカルバペネマーゼ産生遺伝子検出との結果はIMP-1型では一致していた。GES型はCarba NP test、mCIMは陰性で、クラブラン酸及び3-アミノフェニルボロン酸による阻害が弱くみられた。クラブラン酸含有ディスクによる阻害はGES-5で見られるが<sup>12)</sup>、GES型β-ラクタマーゼのvariantによってクラブラン酸阻害の強さが異なる<sup>13)</sup>。クラブラン酸含有ディスクのディスク間距離を通常より狭く配置すると確認が容易であった。(図1)クラブラン酸阻害試験が陽性的場合、CTX-M型やTEM型、SHV型等のよく検出される基質特異性拡張型β-

ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase : ESBL) 以外の場合もあることに留意したい。また、クラスA CRE (KPC型, GES型, SME型, IMI型, NMC-A型) ではボロン酸阻害試験が陽性になる可能性があると報告<sup>14)</sup>されており,今回もボロン酸で若干の拡張を認めた。クロキサシリンによる阻害はボロン酸阻害ほどははっきりしなかった。このようにGES-5は、スクリーニング検査のみでカルバペネマーゼを疑うのは困難であった。

## V 結論

カルバペネマーゼ遺伝子検出株は14.3%で、多くはカルバペネマーゼ非産生株と考えられ、カルバペネマーゼ産生株を検出するには遺伝子解析が不可欠である。

今後も継続して、医療機関へ情報を還元するとともにカルバペネマーゼ遺伝子保有株の検出状況を監視する必要がある。

## 謝辞

今回、遺伝子解析を賜りました国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 松井真理先生、鈴木里和先生、甲斐久美子先生、病原体ゲノム解析研究センター 関塚剛史先生、山下明史先生、加藤健吾先生、黒田誠先生、また、松井真理先生には査読も賜り、皆様に深謝いたします。

## 文献

- 1) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症等に係る試験検査の実施について. 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 平成 29 年 3 月 28 日健感発 328 第 4 号.
- 2) 鈴木里和, 松井真理, 柴山恵吾, 他. 外来型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況. 国立感染症研究所細菌第二部. <http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2302-iasr/related-articles/related-articles-418/5210-dj4184.htm>, IASR Vol.35: 287-288: 2014.
- 3) 松井真理, 鈴木里和, 柴山恵吾, 他. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査. 国立感染症研究所細菌第二部. <http://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2302-related-articles/related-articles-418/5205-dj4183.html>, IASR Vol.35 p.285-287: 2014.
- 4) CLSI, Performance Standards for Antimicro-

- bial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S20,Jan.2010.
- 5) Tan T.Y., et al Evaluation of Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*, Antimicrob Agents Chemother. Jan; 53(1): 146-149.
- 6) Yagi.T.,J.Wachino,H kurokawa,et al.2005.Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol. June, p.2551-2558.
- 7) Arakawa.T., N Shibata, K Shibayama, et al. 2000.Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, J Clin Microbiol. Jan, p.40-43.
- 8) Nordmann.P., L Poirel, L Dortet, et al. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, Emerg Infect Dis. 18(9): 1503-1507.
- 9) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S27,Jan.2017.
- 10) 平成27年薬剤耐性菌研修会資料,国立感染症研究所細菌第二部.
- 11) 平成28年薬剤耐性菌研修会資料,国立感染症研究所細菌第二部.
- 12) Picao, R. C., A. F. Santos, A. G. Nicoletti, et al. 2010. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil; J. Antimicrob. Chemother. 65(4): 796-7.
- 13) Frase, H., M Toth, M. M. Champion, et al. 2011.Importance of Position 170 in the Inhibition of GES-Type  $\beta$ -Lactamases by Clavulanic Acid. Antimicrob. Agents Chemother. 55(4): 1556-1562.
- 14) Pasteran. F, Mendez.T, Guerriero. L, et al. 2009. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*;J. Clin. Microbiol. 47(6):1631-1639.

表1 菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況

菌名	IMP-1	IMP-1 EBC型	GES-5	TEM型 CTX-M-2 group	EBC型	不検出	収集数
<i>Enterobacter aerogenes</i>					7	3	10
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1	1			2	1	5
<i>Serratia marcescens</i>			1			2	3
<i>Citrobacter freundii</i>						1	1
<i>Citrobacter koseri</i>						1	1
<i>Escherichia coli</i>				1			1
合計	1	1	1	1	9	8	21

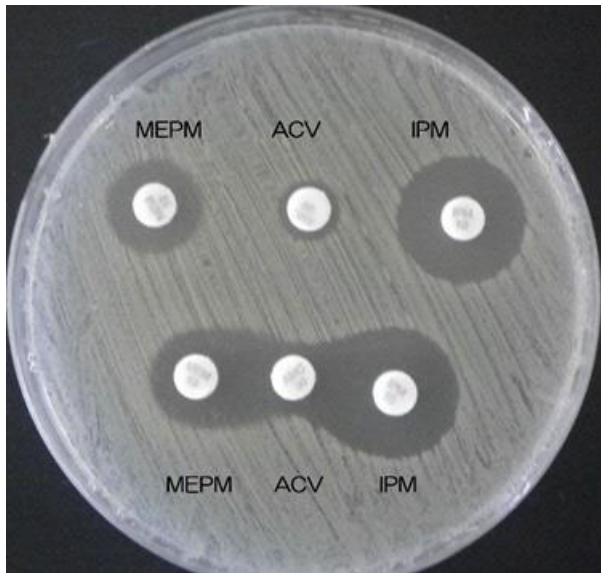


図1 クラバン酸による阻害試験

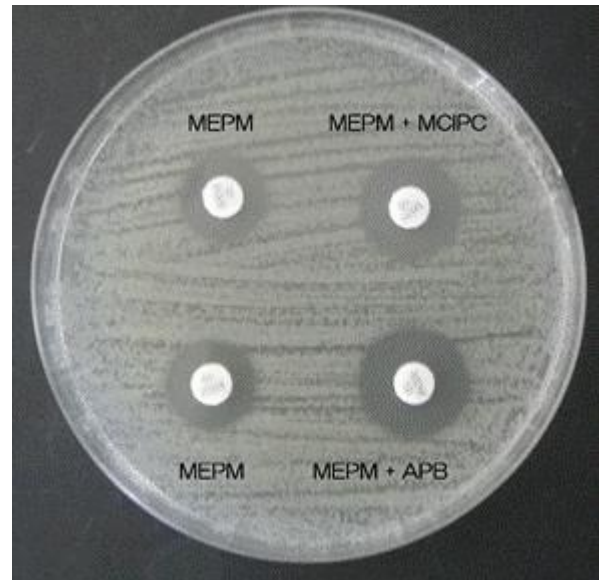
MEPM: meropenem

IPM: imipenem

ACV: amoxicillin/clavulanate

APB: 3-Aminophenylboronic acid

MCIPC: cloxacillin

図2 3-アミノフェニルボロン酸、  
クロキサシリンによる阻害試験