

## 香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2020)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Extracted from the Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Isolated in Kagawa Prefecture (2020)

福田 千恵美 関 和美 岩下 陽子 多田 郁美\*  
Chiemi FUKUDA kazumi SEKI Yoko IWASHITA Ikumi TADA

## 要 旨

2020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目細菌(carbapenem-resistant *Enterobacterales*: CRE) 14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ケンス解析により variant を検索した。菌種は、*Klebsiella aerogenes* 9株、*Enterobacter cloacae* complex 2株、*Klebsiella pneumoniae* 2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型2株、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子であるEBC型1株、ESBL遺伝子であるCTX-M-1型1株、SHV型2株であった。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は14.3%(2株)であった。シーケンス解析の結果、IMP型2株は、*bla*<sub>IMP-1</sub>と判明した。*bla*<sub>IMP-1</sub>保有の*K. pneumoniae* 2株は、2019年に1株、同じ医療機関から検出されている。全ゲノム解析の結果、3株とも同じ薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子を保有しており、プラスミドInc typeもIncFIB(K)と、同じプラスミドを保有する同一の菌の伝播の可能性が示唆された。医療機関へは、保健所を通じて指導を行った。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ことが必要である。

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

## I はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*)感染症は、平成26年9月から感染症法全数把握対象疾患となった。また、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目標が発出されている。

2016年、腸内細菌目細菌(*Enterobacterales*)の分類が変更され、これまで腸内細菌科細菌(*Enterobacteriaceae*)に属していた菌種が他の科に移籍されたため、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌からカルバペネム耐性腸内細菌目細菌(carbapenem-resistant *Enterobacterales*: CRE)とするようCLSIのM100-S30より変更されている。本文では、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌をCREと用いる。

CREの薬剤耐性機序には、カルバペネム系薬剤を分解す

る酵素カルバペネマーゼを産生する場合と、カルバペネマーゼ以外のクラスA β-ラクタマーゼやAmpC β-ラクタマーゼの過剰産生に加え、菌の外膜の変化による薬剤透過性の低下や薬剤排出機構の亢進等による場合がある。院内感染対策上、カルバペネム系薬剤の耐性が広がりやすいカルバペネマーゼ産生菌かどうか院内感染対策上重要である。

今回、2020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

2020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 14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。

\*香川県立中央病院中央検査部

### 3 薬剤耐性検査

(1) 阻害剤を用いた  $\beta$ -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>2)</sup>、メルカプト酢酸ナトリウムディスク<sup>3)</sup>、クラブラン酸含有ディスク<sup>4)</sup>による阻害試験及び、CarbaNP test<sup>5)</sup>、mCIM<sup>6)</sup>を行った。

(2) PCR法による  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子検出

カルバペネマーゼ遺伝子：IMP型、VIM-2型、NDM型、KPC型、GES型、OXA-48型、クラスA  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子：TEM型、SHV型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-8 group、CTX-M-9 group、プラスミド性AmpC  $\beta$ -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>7)</sup>。

(3) シークエンス解析

IMP型遺伝子が検出された菌株を対象に、河原ら<sup>8)</sup>の方法により、BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher SCIENTIFIC) を使用し、SeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて解析を行い、NCBI Blast で variant を検索した。

(4) 全ゲノム解析

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された菌株を対象に、FastDNA spin kit for Soil (MP バイオメディカル) を用い DNA 抽出を行い、Illumina DNA prep (M) tagmentation (Illumina) を使用し試料調整を行った後、iSeq 100 system (Illumina) にて解析を行った。検出データを CLC Genomics Workbench (フィルジエン株式会社) 及び GenEpid-J (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター) で薬剤耐性遺伝子、MLST、プラスミド Inc type を検索した。

### 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、*Klebsiella aerogenes* 9株、*Enterobacter cloacae* complex 2株、*Klebsiella pneumoniae* 2株、*Escherichia coli* 1株であった。

$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子はIMP型及びSHV型2株 (*K. pneumoniae* 2株)、EBC型1株 (*E. cloacae* complex 1株)、CTX-M-1型1株 (*E. coli* 1株)、SHV型2株 (*K. pneumoniae* 2株) が検出された。このうち、カルバペネマーゼはIMP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型は陽性であったが、カルバペネマーゼ遺伝子非検出株は陰性であった。

ディスクによる阻害試験結果は、IMP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。

IMP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。

同一医療機関より検出された *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有の *K. pneumoniae* 3株 (昨年1株、今年2株) の全ゲノム解析の結果、3株とも薬剤耐性遺伝子は、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の *bla*<sub>IMP-1</sub>、*bla*<sub>SHV-11</sub>、アミノグリコシド耐性の *aac*(6')-Iae、ホスホマイシン耐性の *fosA*、キノロン耐性の *oqxA7*、*oqxB19*、四級アンモニウム化合物耐性の *qacEdelta1*、*qacG2*、サルファ剤耐性の *su11* が検出された。MLST は、3株とも ST:147 で、病原性遺伝子は、3株ともすべて同じものが検出された。プラスミド Inc type は、3株とも IncFIB(K) であった。

### IV 考察

*Enterobacter* 属 (*K. aerogenes* を含む) が全体の78.6%を占め、*K. aerogenes* はすべてカルバペネマーゼ非産生株であり、これまでの傾向と同じであった。

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一致していた。

今回、同一医療機関より検出された *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有の *K. pneumoniae* 3株は、同じ Inc type であった。IncFIB は、*E. coli* や *K. pneumoniae* に多く分布する Inc type である。また、MLST が3株とも ST:147 であり、病原性遺伝子、薬剤耐性遺伝子がすべて同一であることから同一プラスミドを保有する同一の菌の伝播の可能性が示唆された。

### 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。

*bla*<sub>IMP-1</sub> 保有の *K. pneumoniae* が検出された医療機関へは、保健所を通じ指導を行った。

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。

表1 菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況

	IMP-1	CTX-M-1型	EBC型	SHV型	不検出
<i>Escherichia coli</i>		1			
<i>Enterobacter cloacae complex</i>			1		1
<i>Klebsiella aerogenes</i>					9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2			2	

## 文献

- 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.
- 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.
- 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.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S20, Jan. 2010.
- Nordmann P., L Poirel, L Dortet, et al. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, Emerg. Infect. Dis. 18(9): 1503-1507.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S27, Jan. 2017.
- Watahiki M., R Kawahara, M Suzuki, et al. 2020. Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding *Enterobacteriaceae* Carbapenemase. Jpn. J. Infect. Dis., 73, 166-172.
- Kawahara R., M Watahiki, Y Matsumoto, et al. 2021. Subtype screening of *blaIMP* genes using bipartite primers for DNA sequencing. DOI:10.7883/yoken.JJID.2020.926