

香川県内の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2021)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Isolated in Kagawa Prefecture (2021)

福田 千恵美 関 和美 岩下 陽子 目黒 響子
Chiemi FUKUDA Kazumi SEKI Yoko IWASHITA Kyoko MEGURO

要 旨

2021年1月から12月の間に香川県内の医療機関よりセンターに搬入されたカルバペネム耐性菌20株について、PCR法による遺伝子解析を行い、カルバペネマーゼ遺伝子はシーケンス解析及び全ゲノム解析により variant、MLST、プラスミド replicon type を検索した。20株のうち届出のあったものが15株、依頼によるものが5株であった。菌種は、*Klebsiella aerogenes* 9株、*Enterobacter cloacae* complex 3株、*Klebsiella pneumoniae* 1株、*Escherichia coli* 2株、*Morganella morganii* 1株、*Proteus mirabilis* 1株、*Acinetobacter baumannii* 2株、*Acinetobacter nosocomialis* 1株であった。検出遺伝子はカルバペネマーゼ遺伝子であるIMP型4株、NDM型2株が検出された。*A. baumannii* のOXA-51-likeのプロモーター配列IS*AbaI*は検出されなかった。ESBL遺伝子は、TEM型2株、CTX-M-1型2株が検出された。シーケンス解析の結果、IMP型4株は、*bla_{IMP-1}*と判明した。NDM型2株は、*bla_{NDM-1}*であった。NDM型の検出は、県内初であった。*bla_{IMP-1}*保有の*K. pneumoniae* 1株は、2019年1株、2020年2株と同じ医療機関から検出されている。*bla_{IMP-1}*保有の*A. baumannii* 1株は、世界的に広がりを見せる国際クローンIIであった。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は30.0% (6株)で、2018年8.0%、2019年10.5%、2020年14.3%と年々増加傾向にあり、カルバペネマーゼ遺伝子の種類と合わせ今後も監視していく必要がある。

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 薬剤耐性アシネトバクター

I はじめに

感染症法5類全数把握の薬剤耐性菌感染症には、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症、バンコマイシン耐性腸球菌感染症がある。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よう通知¹⁾が出されている。センターでは、2015年よりカルバペネマーゼ遺伝子の解析を開始した。

今回、2021年に当センターで検出された薬剤耐性遺伝子の状況を報告する。

II 方法

1 供試菌株

2021年1月から12月の間にセンターに搬入されたカルバペネム耐性菌20株を対象とした。20株のうち届出のあったものが15株、感染症と診断されていないが院内感染対策のために保健所に相談があったものが5株であった。

2 菌種同定

普通寒天培地(日水製薬株式会社)に純培養後、腸内細菌目細菌は、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)を用い、*Acinetobacter*属は、全ゲノム解析で得られた*rpoB*遺伝子配列により菌種名同定を行った。

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²⁾、メルカプト酢酸ナトリウムディスク³⁾、クラブラン酸含有ディスク⁴⁾による阻害試験、CarbaNP test⁵⁾又は、mCIM⁶⁾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型、VIM-2型、NDM型、KPC型、GES型、OXA-48-like。

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-8 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⁷⁾。

Acinetobacter 属は、上記に加え OXA 型 β -ラクタマーゼ：OXA-58-like、OXA-23-like、OXA-40/24-like、OXA-51-like 及びプロモーター配列 IS*AbaI* について検索した⁸⁾。

(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⁹⁾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、Illumina DNA prep (M) tagmentation (Illumina) を用い試料調整を行った後、iSeq 100 system (Illumina) にて解析を行った。

検出データは GenEpid-J (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター) を用い薬剤耐性遺伝子、MLST、プラスミド replicon 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、カルバペネマーゼ保有菌株の全ゲノム解析結果を表2に示す。また、過去に検出された *bla*_{IMP-1} 保有の *K. pneumoniae* の全ゲノム解析結果を表3に示す。

菌種は、*Klebsiella aerogenes* 9株、*Enterobacter cloacae* complex 3株、*Klebsiella pneumoniae* 1株、*Escherichia coli* 2株、*Morganella morganii* 1株、*Protus mirabilis* 1株、*Acinetobacter baumannii* 2株、*Acinetobacter nosocomialis* 1株であった。

β -ラクタマーゼ遺伝子はカルバペネマーゼ遺伝子である IMP 型4株(*E. cloacae* complex 1株、*K. pneumoniae* 1株、*A. baumannii* 2株)、NDM 型2株(*P. mirabilis* 1株、*A. nosocomialis* 1株)であった。*A. baumannii* 2株は、染色体上に保有する OXA-51-like は検出されたが、OXA-51-like のプロモーター配列 IS*AbaI* は検出されなかった。クラス A β -ラクタマーゼである ESBL 遺伝子は、TEM 型2株(*M. morganii* 1株、*A. baumannii* 1株)、CTX-M-1 型2株(*E. coli* 2株)が検出された。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は30.0% (6株)

であった。Carba NP test 又は mCIM の結果は、IMP 型と NDM 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 型と NDM 型はメルクア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4株の塩基配列を解析した結果、*bla*_{IMP-1} (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。NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子2株は、*bla*_{NDM-1} (GenBank Accession No. FN396876) にコードされる配列と一致した。

*bla*_{IMP-1} が検出された *A. baumannii* 2株の MLST はそれぞれ、ST2、ST246 であった。

*bla*_{IMP-1} 保有の *K. pneumoniae* が同一医療機関より2019年1株、2020年2株、2021年1株検出された。MLST は、2019年1株、2020年2株の3株は ST:147 であったが、2021年の検出菌は ST:466 であった。プラスミド Inc type は、4株とも IncFIB(K) であった。

IV 考察

Enterobacter 属(*K. aerogenes* を含む)が全体の60%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様であった。

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た。

カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は30.0% (6株) と2018年8.0%、2019年10.5%、2020年14.3%と年々増加傾向にある。特に、*Acinetobacter* 属菌の割合が増加した。

今回、*bla*_{IMP-1} 保有の *K. pneumoniae* 1株は、過去に同一医療機関から2019年1株、2020年2株検出された菌と同じ 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。ただ、MLST が過去の3株は ST:147 に対し今回は ST:466 であることから、過去の3株は、同一菌株が広がった可能性が高く、今回は同一プラスミドが伝播した可能性が考えられた。

NDM 型カルバペネマーゼが、県内で初めて検出された。*bla*_{NDM-1} を保有している *P. mirabilis* と *A. nosocomialis* が検出された患者には渡航歴がなく、海外型とされる NDM 型が県内に浸潤している可能性がある。

bla_{IMP-1} が検出された *A. baumannii* 2 株は、異なる医療機関から検出され、MLST も ST2、ST246 と異なっており、県内に複数由来の菌株が広がっていることが危惧される。特に、ST2 の *A. baumannii* は、世界的な広がりを起こしている国際クローン II (International Clone: ICII) であり、院内感染との関連が指摘されている。松井ら¹⁰⁾の報告によると、国内で検出される *A. baumannii* ICII はフルオロキノロン耐性の特徴があり、今回も同様の結果であった。国内では *bla_{IMP-1}* 保有の *A. baumannii* ICII は稀なことから拡散させないよう院内感染防止対策が必要である。

また、カルバペネム耐性 *Acinetobacter* 属菌 3 株のうち 2 株は、2 剤耐性で感染症法に基づく薬剤耐性アシネトバクター感染症の届け出基準には当てはまらなかった。届け出基準にあてはまらないが、カルバペネマーゼを保有している *Acinetobacter* 属菌が県内の医療機関で見落とされている可能性もあり、2 剤耐性でも SMA ディスク法のスクリーニングを行うよう医療機関に啓蒙することも重要である。

V 結論

カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合がここ数年増加傾向にあり、NDM 型カルバペネマーゼが、県内で初めて検出された。薬剤耐性アシネトバクターも複数検出されており、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していく必要がある。

文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知: 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, 健感発 328 第 4 号 (平成 29 年 3 月 28 日)
- 2) Yagi T, Wachino J, kurokawa H, et al.: Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and

Escherichia coli, J Clin Microbiol., 2551-2558, (2005)

- 3) Arakawa T, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, J Clin Microbiol., 40-43, (Jan. 2000)
- 4) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S20, (Jan. 2010)
- 5) Nordmann P, Poirel L, Dortet L, et al.: Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, Emerg Infect Dis., 18(9), 1503-1507, (2012)
- 6) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S27, (Jan. 2017)
- 7) Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, et al.: Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding *Enterobacteriaceae* Carbapenemase., Jpn. J. Infect. Dis., 73, 166-172, (2020)
- 8) Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al.: The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett., 258, 72-77, (2006)
- 9) Kawahara R, Watahiki M, Matsumoto Y, et al.: Subtype screening of *bla_{IMP}* genes using bipartite primers for DNA sequencing., Jpn. J. Infect. Dis., 74, 592-599, (2021)
- 10) Matsui M, Suzuki M, Suzuki M, et al., Distribution and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* International Clone II Lineage in Japan, Antimicrob. Agents Chemother., 62, Issue 2, e02190-17, (2018)

表1 菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況

	カルバペネマーゼ遺伝子		OXA型β-ラクタマーゼ遺伝子		クラスAβ-ラクタマーゼ遺伝子		不検出	株数
	IMP-1	NDM-1	OXA-51-like	ISAbal	TEM型	CTX-M-1型		
<i>Klebsiella aerogenes</i>							9	9
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1						2	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1							1
<i>Escherichia coli</i>						2		2
<i>Morganella morganii</i>					1			1
<i>Proteus mirabilis</i>		1						1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2		2	-	1			2
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		1						1

表2 2021年に検出されたカルバペネマーゼ保有菌株全ゲノム解析結果

菌種名	MLST	Inc Type	薬剤耐性遺伝子	病原遺伝子
<i>Enterobacter kobei</i> (<i>Enterobacter cloacae</i> complex)	ST: 252	Col(pHAD28):1:KU674895 IncFIB(K):1:JN233704 IncHI2:1:BX664015 IncHI2A:1:BX664015 IncR:1:DQ449578	aac(6)-Iic, blaACT-3, blaIMP-1, fosA, qacEdelta1, qnrB6, qnrE4, sul1, tet(B)	terC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST: 466	Col(pHAD28):1:KU674895 Col(pHAD28):1:KU674895 IncFIB(K):1:JN233704	aac(6)-Iae, blaIMP-1, blaSHV-33, fosA6, oqxA3, oqxB12, qacEdelta1, qacG2, sul1	KP1, acrA, acrB, clpV/tssH, dotU/tssL, entA, entB, entC, entE, entF, entS, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fimK, fyuA, fyuA/psn, galF, gndA, hcp/tssD, iroE, irp1, irp2, iutA, mchF, mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkE, mrkF, mrkH, mrkI, mrkJ, ompA, rcsA, rcsB, rfbA, rfbB, rfbD, sciN/tssJ, traT, tssF, tssG, ugd, vasE/tssK, vipA/tssB, vipB/tssC, yagZ/ecpA, ybdA, ybdE, ybdF, ybdG, ybdH, ybdI, ybdJ, ybdK
<i>Proteus mirabilis</i>			ARR-3, aac(3)-IId, aac(3)-IVa, aac(6)-Ib-cr, aadA16, aph(3)-Ib, aph(3)-Ia, aph(3)-Via, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, blaNDM-1, ble, catA, dfrA1, dfrA27, floR, lnu(F), mph(E), msr(E), qacEdelta1, qnrA1, sul1, sul2, tet(3)	No hit found
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ST: 2		aac(6)-31, ant(3)-IIa, aph(3)-Ib, aph(3)-VI, aph(6)-Id, arma, blaADC-30, blaIMP-1, blaOXA-66, blaTEM-1D, mph(E), msr(E), qacEdelta1, sul1, tet(B)	ACICU, abal, abaR, adeF, adeG, adeH, bap, barA, barB, basA, basB, basC, basD, basF, basG, bash, basI, basJ, bauA, bauB, bauC, bauD, bauE, bauF, clpV/tssH, csuA, csuA/B, csuB, csuC, csuE, entE, fimT, fimU, fimV, galE, galU, gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspK, gspL, gspM, gspN, gspO/pilD, hcp, lpsB, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, ompA, pbpG, pgaA, pgaB, pgaC, pgaD, pgi, pilA, pilB, pilC, pilE, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, plc1, plc2, plcD, pseB, pseC, pseF, pseG, pseH, pseI, tagX, tsap, tssA, tssB, tssC, tssE, tssF, tssG, tssK, tssL, tssM, tvib, vgrG
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ST: 246		ant(2)-Ia, blaADC-163, blaIMP-1, blaOXA-556	ACICU, abal, abaR, adeF, adeG, adeH, barA, barB, basA, basB, basC, basD, basF, basG, bash, basI, basJ, bauB, bauC, bauD, bauE, bauF, csuA, csuA/B, csuB, csuC, csuD, csuE, entE, galE, galU, lpsB, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, ompA, pbpG, pgaA, pgaB, pgaC, pgaD, pgi, pilA, pilB, pilC, pilE, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, plc1, plc2, tssA, tssC, tssE, tssF, tssG, tssK, tssL, tssM, tvib, vgrG
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>			aph(3)-VI, blaADC-148, blaNDM-1, ble	ACICU, adeF, adeG, adeH, clpV/tssH, cpaA, csuA/B, csuC, galE, galU, gspF, gspH, gspI, gspM, gspN, gspO/pilD, hcp, lpxA, lpxC, lpxD, lpxL, ompA, pbpG, pilB, pilC, pilF, pilG, pilH, pilI, pilM, pilT, pilU, plc1, plc2, tssA, tssC, tssE, tssF, tssK, tssM, vgrG

表3 過去に検出されたbla_{IMP-1}保有の*K. pneumoniae*全ゲノム解析結果

検体No.	MLST	Inc Type	薬剤耐性遺伝子	病原遺伝子
2020c14	ST: 147	Col(pHAD28):1:KU674895, IncFIB(K):1:JN233704	aac(6)-Iae, blaIMP-1, blaSHV-11, fosA, oqxA7, oqxB19, qacEdelta1, qacG2, sul1	KPHS, acrA, acrB, clpV/tssH, cpsACP, dotU/tssL, entA, entB, entC, entE, entF, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fimK, galF, glf, gnd, hcp/tssD, icmF/tssM, impA/tssA, iroE, iutA, manB, manC, mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkF, mrkH, mrkI, mrkJ, rcsA, rcsB, sciN/tssJ, tle1, tli1, traT, tssF, tssG, ugd, vasE/tssK, vgrG/tssI, vipA/tssB, vipB/tssC, wbbM, wbbN, wbbO, wzm, wzt, yagZ/ecpA, ybdA
2020c02	ST: 147	Col(pHAD28):1:KU674895, IncFIB(K):1:JN233704	aac(6)-Iae, blaIMP-1, blaSHV-11, fosA, oqxA7, oqxB19, qacEdelta1, qacG2, sul1	KPHS, acrA, acrB, clpV/tssH, cpsACP, dotU/tssL, entA, entB, entC, entE, entF, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fimK, galF, glf, gnd, hcp/tssD, icmF/tssM, impA/tssA, iroE, iutA, manB, manC, mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkF, mrkH, mrkI, mrkJ, rcsA, rcsB, sciN/tssJ, tle1, tli1, traT, tssF, tssG, ugd, vasE/tssK, vgrG/tssI, vipA/tssB, vipB/tssC, wbbM, wbbN, wbbO, wzm, wzt, yagZ/ecpA, ybdA
2019c15	ST: 147	Col(pHAD28):1:KU674895, IncFIB(K):1:JN233704	aac(6)-Iae, blaIMP-1, blaSHV-11, fosA, oqxA7, oqxB19, qacEdelta1, qacG2, sul1	KPHS, acrA, acrB, clpV/tssH, cpsACP, dotU/tssL, entA, entB, entC, entE, entF, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, fimK, galF, glf, gnd, hcp/tssD, icmF/tssM, impA/tssA, iroE, iutA, manB, manC, mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkF, mrkH, mrkI, mrkJ, rcsA, rcsB, sciN/tssJ, tle1, tli1, traT, tssF, tssG, ugd, vasE/tssK, vgrG/tssI, vipA/tssB, vipB/tssC, wbbM, wbbN, wbbO, wzm, wzt, yagZ/ecpA, ybdA