

## 香川県内の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2022)

## Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Isolated in Kagawa Prefecture (2022)

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

2022年1月から12月の間に香川県内の医療機関より当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クエンス解析及び全ゲノム解析により variant、MLST、plasmid replicon type を検索した。20株のうち届出のあったものが19株、依頼によるものが1株であった。菌種は、*Enterobacter cloacae* complex 8株、*Klebsiella aerogenes* 6株、*Escherichia coli* 4株、*Morganella morganii* 1株、*Acinetobacter baumannii* 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3株が検出された。*A. baumannii* のOXA-51-likeのプロモーター配列IS*Aba1*は検出されなかった。ESBL遺伝子は、CTX-M-1型1株、CTX-M-2型1株、CTX-M-9型2株が検出された。シークエンス解析の結果、IMP型3株は、*bla*<sub>IMP-1</sub>と判明した。今後も継続して、カルバペネマーゼ遺伝子の保有状況を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科細菌 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<sup>1)2)</sup>が出されている。当センターでは、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、2022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

2022年1月から12月の間に当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19株、保健所に相談があったものが1株であった。

## 2 菌種同定

普通寒天培地(島津ダイアグノスティクス株式会社)に純培養後、腸内細菌科細菌は、Api 20E(シスメックス・バイオメリュー株式会社)を用いた。

## 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>3)</sup>、メルカプト酢酸ナトリウムディスク<sup>4)</sup>、クラブラン酸含有ディスク<sup>5)</sup>による阻害試験、CarbaNP test<sup>6)</sup>又は、mCIM<sup>7)</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型、VIM-2型、NDM型、KPC型、GES型、OXA-48-like。

ESBL 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<sup>8)</sup>。

*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*Aba1*について検索した<sup>9)</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>10)</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、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Center for Genomic Epidemiology サイト<sup>11)</sup>のResFinder 4.1で薬剤耐性遺伝子を、MLST 2.0でMLSTを、PlasmidFinder 2.1でプラスミドreplicon typeを検索した。

### III 結果

菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況を表1に示す。

菌種は、*Enterobacter cloacae* complex 8株、*Klebsiella aerogenes* 6株、*Escherichia coli* 4株、*Morganella morganii* 1株、*Acinetobacter baumannii* 1株であった。

ディスクによる阻害試験結果は、IMP型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。

Carba NP test 又は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。

カルバペネマーゼ遺伝子はIMP型3株(*E. cloacae* complex 3株)であった。*A. baumannii* 1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ISAba1は検出されなかった。

ESBL遺伝子は、TEM型1株(*A. baumannii*)、CTX-M-1型1株(*E. coli*)、CTX-M-2型1株(*K. aerogenes*)、CTX-M-9型2株(*E. coli*)が検出された。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は15.0% (3株)であった。

IMP型カルバペネマーゼ遺伝子3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。

IMP型が検出された*E. cloacae* complex 3株の全ゲノム解析結果を表2に示す。

*E. cloacae* complexのうち1株は、*Enterobacter hormaechei*で、残り2株は*E. cloacae*であった。MLSTは、ST:78、ST:66、ST:252とそれぞれ異なり、県内に同一由来の株が広がっている可能性は無かった。

### IV 考察

*Enterobacter* 属(*K. aerogenes*を含む)が全体の70%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。

2015年以降、当センターに搬入された*bla<sub>IMP-1</sub>*保有の菌株は、*E. cloacae* complex が11株 (57.9%)、*K. pneumoniae* が4株 (21.1%)、*E. coli* が3株 (15.9%)、*A. baumannii* が1株 (5.3%) で、*E. cloacae* complexの割合が最も多かった。

カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は15.0% (3株) で、2018年8.0%、2019年10.5%、2020年14.3%、2021年30.0%と年々増加傾向にあったが、2022年はやや減少した。COVID-19の影響で人流が減少したことも一因と考えられた。

### 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、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) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知: 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第12条第1項及び第14条第2項に基づく届出の基準等について (一部改正), 健感発 0526 第17号 (令和5年5月26日)
- 3) Yagi T, Wachino J, kurokawa H, et al.: Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol, 2551-2558, (2005)
- 4) Arakawa T, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria

- by Using Thiol Compounds, J Clin Microbiol, 40-43, (Jan. 2000)
- 5) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S20, (Jan. 2010)
  - 6) Nordmann P, Poirel L, Dortet L, et al. : Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, Emerg Infect Dis, 18(9), 1503-1507, (2012)
  - 7) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S27, (Jan. 2017)
  - 8) 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)
  - 9) 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)
  - 10) Kawahara R, Watahiki M, Matsumoto Y, et al. : Subtype screening of *bla<sub>IMP</sub>* genes using bipartite primers for DNA sequencing., Jpn. J. Infect. Dis, 74, 592-599, (2021)
  - 11) <http://www.genomicepidemiology.org/services/> (2023/9/26 閲覧)

表1 菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況

菌種名	カルバペネマーゼ遺伝子		OXA型β-ラクタマーゼ遺伝子			ESBLβ-ラクタマーゼ遺伝子			不検出	株数
	IMP-1		OXA-51-like	ISAbal	TEM型	CTX-M-1型	CTX-M-2型	CTX-M-9型		
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	3								5	8
<i>Klebsiella aerogenes</i>							1		5	6
<i>Escherichia coli</i>						1		2	1	4
<i>Morganella morganii</i>									1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>			1	-	1					1

表2 全ゲノム解析結果

検体No.	菌名	MLST	Inc Type	薬剤耐性遺伝子
2022c12	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ST: 78	Col(pHAD28):1, IncHI2:1, IncHI2A:1	aac(6')-IIC, blaACT-24, blaIMP-1, fosA, qacEdelta1, qnrB6, sul1, tet(B)
2022c16	<i>Enterobacter cloacae</i>	ST: 66	Col(pHAD28):1, IncHI2:1, IncHI2A:1, IncHI2A:1	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-IIC, aadA16, ARR-3, blaACT-45, blaIMP-1, dfrA27, fosA, qacEdelta1, qnrB6, sul1, tet(A), tet(B)
2022c19	<i>Enterobacter cloacae</i>	ST: 252	IncFIB(K):1, IncHI2A:1, IncHI2:1, pKPC-CAV1321:1, repE(pEh60-7):1, IncFII(pECLA):1	aac(6')-IIC, blaACT-3, blaIMP-1, fosA, sul1, qnrE4, qnrB6, tet(B)