

香川県内の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2024)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Isolated in Kagawa Prefecture (2024)

福田 千恵美 岩下 陽子 井原 絵美 目黒 響子
Chiemi FUKUDA Yoko IWASHITA Emi IHARA Kyoko MEGURO

要 旨

2024 年 1 月から 12 月の間に香川県内の医療機関より届出のあったカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*) 25 株について、遺伝子解析を行った。カルバペネマーゼ遺伝子保有株はシーケ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。菌種は、*Enterobacter cloacae* complex 8 株、*Klebsiella aerogenes* 8 株、*Klebsiella pneumoniae* 7 株、*Escherichia coli* 1 株、*Serratia marcescens* 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 5 株、KPC 型 1 株、NDM 型 1 株が検出された。ESBL 遺伝子は、TEM 型 2 株、CTX-M-1 group 2 株が検出された。AmpC 遺伝子は ACT-28 が 3 株、CMY-2 が 1 株、DHA 型が 1 株検出された。シーケンス解析の結果、IMP 型は 5 株とも *bla*_{IMP-1}、KPC 型は *bla*_{KPC-2}、NDM 型は *bla*_{NDM-5} と判明した。海外型とされる *bla*_{KPC-2} の検出は県内初であり、患者は時期をずらして *bla*_{NDM-5} も検出された外国籍の患者であった。海外型の県内の広がりには注意するため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。

Abstract

Genetic analysis was performed on 25 strains of carbapenem-resistant *Enterobacterales* reported from medical institutions in Kagawa Prefecture between January and December 2024. Carbapenemase gene carriers were searched for variant, MLST, and plasmid replicon type by sequencing and whole genome analysis. The bacterial species were: *Enterobacter cloacae* complex (8 strains), *Klebsiella aerogenes* (8 strains), *Klebsiella pneumoniae* (7 strains), *Escherichia coli* (1 strain), and *Serratia marcescens* (1 strain). The detected genes were carbapenemase genes: IMP type (5 strains), KPC type (1 strain), and NDM type (1 strain). ESBL genes detected included TEM-type in 2 strains and CTX-M-1 group in 2 strains. AmpC genes detected included ACT-28 in 3 strains, CMY-2 in 1 strain, and DHA-type in 1 strain. Sequence analysis confirmed that all 5 IMP-type strains carried *bla*_{IMP-1}, the KPC-type strain carried *bla*_{KPC-2}, and the NDM-type strain carried *bla*_{NDM-5}. The detection of *bla*_{KPC-2}, which is considered to be an overseas strain, was the first in the prefecture, and the patient was a foreign national whose *bla*_{NDM-5} was also detected at a different time. Continued monitoring of carbapenemase gene possession is necessary to watch for the spread of the overseas form in the prefecture.

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌

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目細菌 (Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*; CRE) 感染症、薬剤耐性アシネトバクター (Multiple drug-resistant *Acinetobacter*; MDRA) 感染症、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*; VRSA) 感染症、バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococci*; VRE) 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⁾²⁾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、2024年に届出のあった薬剤耐性遺伝子の状況を報告する。

II 方法

1 供試菌株

2024年1月から12月の間に届出のあったCRE 25株を対象とした。

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、菌種名は、API 20E（シスメックス・バイオメリュー株式会社）を用い同定した。

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及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³⁾、メルカプト酢酸ナトリウム⁴⁾、クラブラン酸含有ディスク⁵⁾による阻害試験、CarbaNP test⁶⁾又は、mCIM⁷⁾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⁸⁾。

（3）シーケンス解析

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された菌株及びmCIM結果と β -ラクタマーゼ遺伝子が不一致であった株を対象に国立感染症研究所マニュアル⁹⁾に記載のあったプライマー配列、Agnesら¹⁰⁾のプライマー配列で増幅後、BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher SCIENTIFIC) を使用し、SeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて配列を求めた。配列をNCBI Blastで検索しvariantを決定した。

（4）全ゲノム解析

Mueller Hinton II Agar (BD BBL) に純培養したコロニーを用い、Power Bead Tubes (QIAGEN) でDNAを抽出後、Sample Purification Beads (Illumina) でDNA精製を行い、Illumina DNA prep tagmentation (Illumina) のプロトコールに従いライブラリー調整を行った。iSeq 100 system (Illumina) にて全ゲノム情報を取得し、C LC genomics workbench 23.0.1 (Filgen) にて、トリミング後アセンブルを行い、コンティグ配列を取得した。

菌種名は、DFAST データベース (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/dfc/>) で、ANI (Average nucleotide identity) が95%以上を確認し種を確定した。

薬剤耐性遺伝子は、NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>) を用い、coverage, identity が95%以上のものを取得した。

MLSTは、Pub MLST データベース (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) で、Pasteur schemesを決定した。

（5）PFGE

純培養したコロニーを用いプラグを作成し、Lysozyme 2mg/mL でover night 後、Proteinase K 1mg/mL でover night 反応させ、制限酵素ApaI 30U/100 μ Lを用い、CHEF DRIII (Bio Rad) にて0.5 \times TBE Buffer 14°C、電圧6V/cm、パルスタイム2.9~21.8sec、22.5時間泳動の条件で行い、Et 染色後、Bio Numerics (infocom) にてBand based Dice, Optimization: 0.5%, Tolerance: 0.5%, UPGMA Method で系統樹解析を行った。

III 結果

菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況を表1、全ゲノム解析結果を表2に示す。

菌種は、*Enterobacter cloacae* complex 8株、*Klebsiella aerogenes* 8株、*Klebsiella pneumoniae* 7株、*Escherichia coli* 1株、*Serratia marcescens* 1株であった。

ESBL β -ラクタマーゼ遺伝子は、TEM型2株(*K. pneumoniae* 2株)、CTX-M-1 group 2株(*K. pneumoniae* 1株、*E. coli* 1株)が検出された。

カルバペネマーゼ遺伝子はIMP型5株(*E. cloacae* complex 1株、*K. pneumoniae* 4株)、KPC型1株(*K. pneumoniae*)、NDM型1株(*E. coli*)で、カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は28.0% (7株) であった。

IMP型カルバペネマーゼ遺伝子5株の塩基配列を解析した結果、*bla_{IMP-1}* (GenBank Accession No. S71932) にコードされる塩基配列が一致した。KPC型は *bla_{KPC-2}* (GenBank Accession No. AY034847)、NDM型は *bla_{NDM-5}* (GenBank Accession No. JN104597) と一致した。

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された7株の全ゲノム解析結果を表2に示す。

ディスクによる阻害試験結果は、IMP型、KPC型、NDM型が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。

mCIMの結果は、IMP型、KPC型、NDM型が陽性であった。カルバペネマーゼ遺伝子非検出株3株(*E. cloacae*

complex 3株)も陽性を示した。カルバペネマーゼ遺伝子非検出株3株のCarbaNP testは陰性であった。

カルバペネマーゼ遺伝子非検出のmCIM陽性株3株のシーケンス解析では、3株とも bla_{ACT-28} が検出された。

また、*K. aerogenes* 1株は、カルバペネマーゼ遺伝子非検出にもかかわらず、カルバペネム高度耐性を示したことから全ゲノム解析を行った。カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかったがプラスミド性AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子の bla_{IMP-2} が検出された。

その他の株からプラスミド性AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子として、DHA型1株(*E. coli*)が検出された。

bla_{IMP-1} 保有の*K. pneumoniae* 4株は、同一施設とその関連施設から検出されており、当該施設は2019年より断続的に bla_{IMP-1} 保有の*K. pneumoniae*が搬入されている。過去の菌株と合わせてPFGEによる分子疫学解析を行った。1株以外は同じMLST、plasmid replicon type、薬剤耐性遺伝子を保有しており、PFGEのsimilarityは90%以上と関連が示唆された。(図1)

IV 考察

海外型とされる bla_{KPC-2} の検出は県内初であり、患者は時期をずらして bla_{NDM-5} も検出された外国籍の患者であり、海外型遺伝子の海外からの持ち込みを確認した。国内での拡散を起こさないよう感染対策が急務である。

カルバペネマーゼ産生を直接確認する試験であるmCIMの偽陽性を経験した。 bla_{ACT-28} はmCIMの偽陽性を起こすことが報告¹⁰⁾されている。PCR法によるスクリーニングと不一致を起こした場合は、CarbaNP testによる確認を行う必要があった。

カルバペネマーゼ遺伝子非検出にもかかわらず、カルバペネム高度耐性を示す株について、全ゲノム解析を行い bla_{IMP-2} が検出された。 bla_{IMP-2} はポーリンの変異が同時に起こることによりカルバペネム耐性になることが報告¹¹⁾されている。今回、ポーリンの変異は確認出来ていないが、薬剤感受性結果と薬剤耐性遺伝子結果からポーリンの変異の可能性が推測された。

bla_{IMP-1} 保有の*K. pneumoniae*は県内では同一施設とその関連施設の患者からのみ検出されており、その都度、保健所による指導が行われてきたが、本年、 bla_{IMP-1} 保有の*K. pneumoniae*は4株が搬入された。MLSTは4株ともST147であった。過去に検出されたMLSTと同じであった。S

T147は、院内感染のハイリスククローン¹²⁾とされている。6年に亘り続いており、集積の終息まで継続的な支援が必要と考えられた。

V 結論

海外型の県内の広がり、集団事例に対応するため今後と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。

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 β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol, 2551-2558, (2005)
- 4) Arakawa Y, 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)
- 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) <https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/CRE20250407.pdf> (2025/5/2 閲覧)
 - 10) Jousset A B, Saoussen O, Sandrine B, et al.: False-Positive Carbapenem-Hydrolyzing Confirmatory Tests Due to ACT-28, a Chromosomally Encoded AmpC with Weak Carbapenemase Activity from *Enterobacter kobei*, Antimicrob Agents Chemother 2019, 63(5), e02388-18
 - 11) Goessens W H, van der Bij AK, van Bortel R, et al.: Antibiotic Trapping by Plasmid-Encoded CMY-2 β -Lactamase Combined with Reduced Outer Membrane Permeability as a Mechanism of Carbapenem Resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2013, 57(8):3941-3949. doi: 10.1128/AAC.02459-12
 - 12) Peirano G., Chen L., Kreiswirth B. N. & Pouta J. D. D.: 2020. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 64 (10).

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			ESBL遺伝子		AmpC遺伝子			不検出	株数
	IMP-1	KPC-2	NDM-5	TEM型	CTX-M-1 group	ACT-28	CMY-2	DHA型		
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1					3			4	8
<i>Klebsiella aerogenes</i>							1		7	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1		2	1					7
<i>Escherichia coli</i>			1		1			1		1
<i>Serratia marcescens</i>									1	1

表2 全ゲノム解析結果

検体番号	菌名	MLST	Inc Type	薬剤耐性遺伝子
24C-05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1 IncFIB(pKPHS1)_1 IncN_1 Col(pHAD28)_1	oqx B19 oxq A6 bleO fosA10 qnrB6 aac(6')-Ib-D181Y arr-3 dfrA27 aadA16 blaKPC-2 armA msr(E) mph(E) blaSHV-187 sul1 qnrB4
24C-08	<i>Escherichia coli</i>	131	IncFIA_1 IncFII(pRSB107)_1 IncFIB(AP001918)_1 ColRNAI_1	blaCTX-M-15 sul1 aac(6')-Ib-D181Y blaOXA-1 dfrA12 aadA2 aac(3)-Ile qnrB4 blaDHA-1 dfrA17 mph(A) blaEC-19 ble-MBL blaNDM-5
24C-06	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1	blaSHV-11 oxq A6 oxq B19 fosA5_fam blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1
24C-09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1	blaSHV-11 oxq A6 oxq B19 fosA5_fam blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1
24C-22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1	blaSHV-11 oxq A6 oxq B19 fosA5_fam blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1
25C-01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	147	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1	blaSHV-11 oxq A6 oxq B19 fosA5_fam blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1
24C-23	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	IncFII(p14)_1 IncHI1B(pNDM-CIT)_1 IncHI1A(NDM-CIT)_1	blaIMP-1 blaACT-116 oxq A10 oxq B9 fosA aac(6')-Ib-G aadA5 qnrS1
24C-11	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	125	IncFII(pECLA)_1 IncFIB(K)_1	blaACT-28 oxq B4 oxq A10 fosA mcr-10.1
24C-13	<i>Enterobacter kobei</i>	1141	-	blaACT-28 oxq B4 oxq A10 fosA
24C-15	<i>Enterobacter kobei</i>	125	-	blaACT-28 oxq B4 oxq A11 fosA
24C-03	<i>Klebsiella aerogenes</i>	261	-	fosA5_fam oxq B20 oxq A9 blaCMY-2

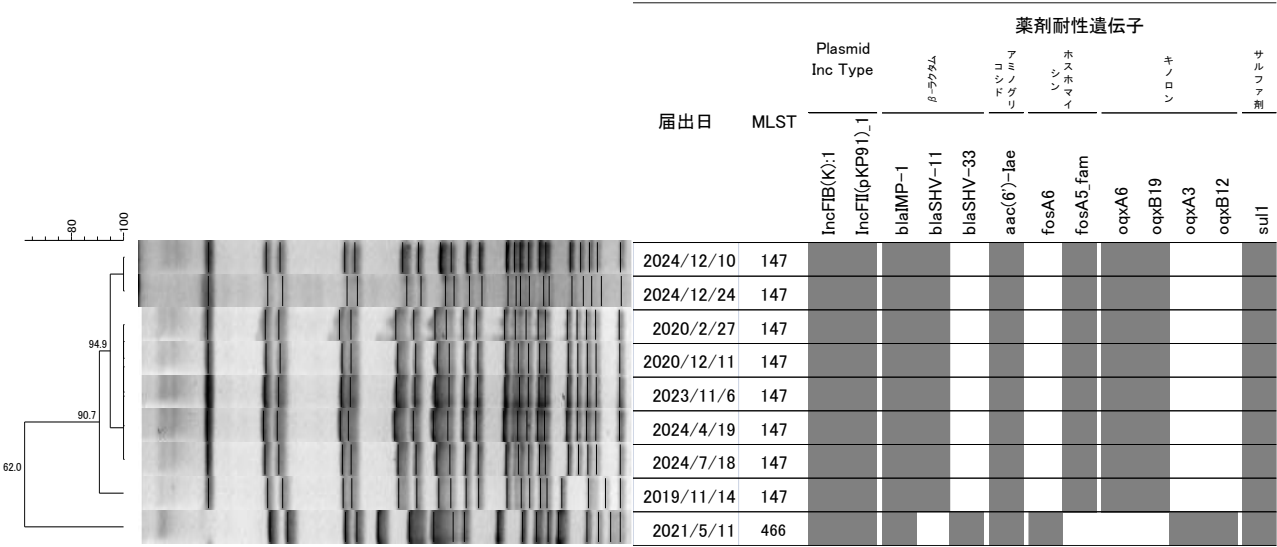


図 1 タイピング解析結果