

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(2019)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Extracted from the Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Isolated in Kagawa Prefecture (2019)

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

2019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) 19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* 13株、*Enterobacter cloacae* complex 5株、*Klebsiella pneumoniae* 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、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子であるEBC型4株であった。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は10.5% (2株) であった。シーケンス解析の結果、カルバペネマーゼ遺伝子、IMP-1型2株は、*bla_{IMP-1}* 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。

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* : CRE) 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¹⁾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、7つの科、*Enterobacteriaceae*、*Erwiniaceae*、*Pectobacteriaceae*、*Yersiniaceae*、*Hafniaceae*、*Morganellaceae*、*Budviciaceae* に分類された。カルバペネム耐性菌において、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に表記を腸内細菌目細菌 (*Enterobacterales*) と目レベルの階層まで広げる必要が出てきた。例えば、*Proteus*属菌は*Morganellaceae*に移籍され、*Edwardsiella*属菌は*Hafniaceae*に移籍された。これらすべての菌種を含めるため、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より変更された。本文では、カルバペネム耐性腸内細菌

目細菌をCREと用いることとする。

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、2019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

2019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 19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⁾による阻害試験及び、CarbaNP test⁵⁾、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-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⁷⁾。

(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型シークエンス解析は、国立感染症研究所のマニュアル⁸⁾に準じて実施した。

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、*Klebsiella aerogenes* 13株、*Enterobacter cloacae* complex 5株、*Klebsiella pneumoniae* 1株であった。

検出遺伝子はIMP-1型2株(*E. cloacae* complex 1株、*K. pneumoniae* 1株)、EBC型4株(*E. cloacae* complex 1株、*K. aerogenes* 3株)が検出された。このうち、カルバペネマーゼはIMP-1型であり、カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は、10.5%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、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。

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*_{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。

IV 考察

Enterobacter 属(*K. aerogenes* を含む)が全体の94.4%を占め、前年度より *Enterobacter* 属の届出の割合が多くなった。*Enterobacter* 属でも *E. cloacae* complex は、カルバペネマーゼ産生遺伝子を持つ割合が5株

中1株(20%)、*K. aerogenes* は、すべてカルバペネマーゼ非産生株であり、前年と同じ傾向であった。県内で2015年より調査を行っているが、*K. pneumoniae* から *bla*_{IMP-1} の検出は初めてであった。

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。

V 結論

カルバペネマーゼ遺伝子検出株は10.5%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。

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」(平成29年3月28日、健感発328第4号、厚生労働省健康局結核感染症課長通知)
- 2) Yagi. T., J. Wachino, H. Kurokawa, et al. : Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol, June, 2551-2558 (2005)
- 3) Arakawa. T., N. Shibata, K. Shibayama, et al. : Convenient Test for Screening Metallo-β-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds, J Clin Microbiol, Jan, 40-43 (2000)
- 4) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing : Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S20, Jan. (2010)
- 5) Nordmann. P., L. Poirel, L. Dortet, 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) AMED研究費「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」研究開発分担者：四宮博人
- 8) 平成30年薬剤耐性菌研修会資料,国立感染症研究所細菌第二部

表1 菌種別薬剤耐性遺伝子検出状況

菌名	IMP-1	EBC型	不検出	収集数
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1	1	3	5
<i>Klebsiella aerogenes</i>		3	10	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1			1