

香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2017)

Detection of the Antimicrobial-Resistant Gene Extracted from the Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Kagawa Prefecture (2017)

福田 千恵美 関 和美 岩下 陽子 内田 順子
Chiemi FUKUDA Kazumi SEKI Yoko IWASHITA Junko UCHIDA

要 旨

2017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科細菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: 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、*Enterobacter aerogenes* 4株、*Enterobacter cloacae* complex 5株、*Serratia marcescens* 3株、*Escherichia coli* 3株、*Citrobacter freundii* 1株、*Klebsiella pneumoniae* 1株、*Klebsiella oxytoca* 1株、*Proteus mirabilis* 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、DHA 型 1株、CIT 型 2株、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase: ESBL) 遺伝子である TEM 型 1株、CTX-M-1 型 2株、CTX-M-9 型 1株で、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。

Abstract

Using the PCR method, we carried out genetic analysis of 19 isolates of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) detected in medical institutions in Kagawa Prefecture from January to December 2017. Four isolates were *Enterobacter aerogenes*, five isolates were *Enterobacter cloacae* complex, three isolates were *Serratia marcescens*, three isolates were *Escherichia coli*. We also detected one isolate each of *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis*. Among the isolates analyzed, two of them were found to possess the Carbapenemase gene of *bla*_{IMP-1} group, four isolates contained the AmpC β-lactamase gene of the *bla*_{EBC} group, one isolate was of the *bla*_{DHA} group and two isolates were of the *bla*_{CIT} group. In addition, one isolate from the *bla*_{TEM} group, one from the *bla*_{CTX-M-1} group, and one from the *bla*_{CTX-M-9} group possessed the ESBL gene. The proportion of the Carbapenemase gene was 10.5% (two isolates). These isolates in which the Carbapenemase gene were detected were determined to be *bla*_{IMP-1} by sequence analysis. It is necessary to continue research of the Carbapenemase gene and to supply this information to medical institutions.

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 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) 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

努力目標が発出されている。

香川県では、平成27年6月より届出のあったCREを対象に薬剤耐性遺伝子の解析を行ってきた。

今回、2017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

2017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 株と調査研究協力施設より提供のあった CRE 5 株、合計 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 型、CTX-M-2 型、CTX-M-9 型、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、*Enterobacter aerogenes* 4 株、*Enterobacter cloacae* complex 5 株、*Serratia marcescens* 3 株、*Escherichia coli* 3 株、*Citrobacter freundii* 1 株、*Klebsiella pneumoniae* 1 株、*Klebsiella oxytoca* 1 株、*Proteus mirabilis* 1 株であった。

検出遺伝子は IMP-1 型 2 株 (*E. cloacae* complex)、EBC 型 4 株 (*E. aerogenes* 3 株、*E. cloacae* complex 1 株)、DHA 型 1 株 (*K. pneumoniae*)、CIT 型 1 株 (*C. freundii*)、TEM 型及び CIT 型 1 株 (*P. mirabilis*)、CTX-M-1 型 2 株 (*E. coli*)、CTX-M-9 型 1 株 (*E. coli*) 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 属が全体の 47.4% を占めた。*Enterobacter* 属でも *E. cloacae* は、カルバペネマーゼ産生遺伝子を持つ割合が 5 株中 2 株、*E. aerogenes* は、すべてカルバペネマーゼ非産生株であった。*E. cloacae* のカルバペネマーゼ保有割合が高く、これは前年度と同じ傾向であった。今後も動向に注意したい。

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 IMP-1 型では一致していた。

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、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。
- 2) Yagi.T., J. Wachino, H. Kurokawa, et al. 2005. Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol. June, p.2551-2558.
- 3) Arakawa.T., N Shibata, K Shibayama, et al. 2000. Convenient Test for Screening Metallo-β-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria

- by Using Thiol Compounds, J Clin Microbiol. Jan, p.40–43.
- 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. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, Emerg Infect Dis. 18(9): 1503-1507.
- 6) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-seventh Informational Supplement, M100-S27,Jan.2017.
- 7) 平成27年薬剤耐性菌研修会資料,国立感染症研究所細菌第二部.
- 8) 平成28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	DHA型	CIT型	TEM型 CIT型	CTX-M-1型	CTX-M-9型	不検出	収集数
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	2	1						2	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>		3						1	4
<i>Serratia marcescens</i>								3	3
<i>Escherichia coli</i>						2	1		3
<i>Citrobacter freundii</i>				1					1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1						1
<i>Klebsiella oxytoca</i>								1	1
<i>Proteus mirabilis</i>					1				1