

資 料 昭和大学病院における Multidrug resistant
Pseudomonas aeruginosa, ESBL 産生 *Escherichia coli*,
Klebsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca* および
Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* の
検出状況 (2006 ~ 2010 年度)

昭和大学医学部臨床病理学教室

高橋奈々子 安原 努 五味 一英
福地 邦彦

昭和大学病院臨床検査部

関口 孝次 立石 裕子 宇賀神和久

要約：昭和大学病院における多剤耐性緑膿菌 (MDRP: multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*), extended spectrum β lactamase (ESBL) 産生 *Escherichia coli*, ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae*, ESBL 産生 *Klebsiella oxytoca* 2006 ~ 2010 年度の分離頻度, および 2010 年度の多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の分離状況を報告する. MDRP は分離された緑膿菌の 0.5 ~ 6%, 毎月 1 ~ 5 株であった. ESBL 産生 *E. coli* は, 分離された *E. coli* のうち 10 ~ 20% を占め, 毎月 10 ~ 40 株検出された. ESBL 産生 *E. coli* は第三世代 cephalosporin 薬耐性 *E. coli* のほとんどを占めた. *K. pneumoniae* は総数の 10 ~ 20% が第三世代 cephalosporin 薬耐性株であり, その約半数の毎月 2 ~ 4 株が ESBL 産生 *K. pneumoniae* であった. *K. oxytoca* の第三世代 cephalosporin 耐性株は総数の 10 ~ 20% の 2 ~ 6 株であり, ESBL 産生株はほとんどなかった. MDRP と ESBL 産生菌の分離は, 2006 から 2010 年度で大きく変動することはなかった. 2010 年度の *A. baumannii* は毎月 10 ~ 20 株が分離され, 3 系統耐性株は, 4 患者の 6 部位から検出された. この中で, MDRA の定義である Imipenem, Amikacin, Ciprofloxacin 耐性株は 1 患者から検出された. 残りの 3 患者由来の 3 系統耐性 *A. baumannii* はいずれも Meropenem, Gemtamicin, Ciprofloxacin に耐性であり, Imipenem と Amikacin には感受性であった. 薬剤耐性菌の感染拡大の防止のためには, 的確な報告が必要であり, 今後耐性遺伝子解析を含めた感度の高い検査法の導入が必要となる.

キーワード：多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP: multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*), 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL: extended spectrum β -lactamase), 多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* (MDRA: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*), メタロ β ラクタマーゼ (metallo- β -lactamase)

医療行為関連感染防止が各医療施設での重要課題の 1 つとなっている. なかでも近年, Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), extended spectrum β -lactamase (ESBL) 産生 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* の分離が目立っている. 加えて, 2010 年には Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA)

による医療行為関連感染が都内大学病院で報告され, その後, 感染症法により MDRA が 5 類感染症に分類された. 当院においては, 2009 年度までは, *Acinetobacter* 属が検出された際には, *Acinetobacter* spp. として報告していたが, MDRA の分離同定が必須となったため, 2010 年度からは *A. baumannii* については菌種の同定を開始した. 本資料では, 昭

和大学病院で2006年度から2010年度の5年間の月別耐性菌分離状況を報告する。

方 法

1. 細菌の同定と抗菌薬感受性テスト

細菌の同定と抗菌薬感受性テストはMicroscan Walkaway 96 (Siemens Healthcare, USA) により施行した。腸内細菌用はMicroscan Neg Combo Panel 6.11J, ブドウ糖非発酵菌はMicroscan Neg Combo Panel 3.12Jを使用した。Clavulanic acid (CVA) 抑制試験は, NegMIC3.31Eを使用して行った。minimal inhibitory concentration (MIC) に基づくSIR判定はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁾に準じた。Sodium mercaptoacetic acid (SMA) 抑制試験は, SMA ディスク (栄研化学, 東京) とceftadizime (CAZ) ディスク (栄研) を用いたDouble-disk synergy Testを行った²⁾。同一患者の同一部位から検出された株は一株と算定し, 異なる部位から検出された場合は別株として算定した。

2. 薬剤耐性菌の定義

腸内細菌については, CLSIに示されたbreak pointに基づいてcefotaxime (CTX) のMIC値が $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, CAZ $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ あるいはaztreonam (AZT) $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ のいずれかを示した株をESBL産生菌の候補として, CVA抑制試験を施行し, 抑制の認められた株をESBLと判定し報告した。また, ESBL以外の第三世代cephalosporin系薬耐性株は, 薬剤耐性菌と表記し耐性薬剤名を報告した。*P. aeruginosa*と*A. baumannii*については, 感染症法(2004年一部改訂)によるMIC値の定義, Amikacin (AMK) $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, Imipenem (IPM) $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, Ciprofloxacin (CPFX) $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ を基準としてMDRP, MDRAとそれぞれ報告しているが, どちらの菌種についても, carbapenem系薬のIPMとMeropenem (MEPM)のいずれか, AMK, Gentamicin (GM), Tobramycin (TOB)のいずれか, fluoroquinolone系薬のCPFXとLevofloxacin (LVFX)のいずれか, の3系統薬に耐性を示したものは, 多剤耐性菌として報告し耐性薬剤を明記している。

3. 耐性遺伝子解析

遺伝子検出のPCRの条件は以下の通りである³⁾。IMP-1, 6, 10, 11を共通に増幅するForward 5'-CTA-

CCGCAGCAGAGTCTTT-3', Reverse 5'-CAACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'プライマーで588bpを産物とし, IMP-2はForward 5'-TGTAGCATTA-CTGCCGCG-3', Reverse 5'-CAGCCTGTTCCTATGTAC-3'プライマーで658bpを産物とし, VIM-2はForward 5'-TGACCGCTCTATCATGGC-3', Reverse 5'-GCTACTCAACGACTGAGCG-3'で768bpを産物とし, *A. baumannii* DNA抽出の完全性を確認するためのHomologous recombination factor (recA) 遺伝子を増幅するForward 5'-CCTGAATCTTCYGGTAAAAC-3', Reverse 5'-GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC-3'プライマーで425bpを産物とするPCRを, template DNAとして細菌ゲノムDNA 50ngを使用し, 94°C 30sec, 60°C 90sec, 72°C 90secを30cycleでGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems Japan, 東京) を用いて行った。PCR産物は5%ポリアクリルアミド電気泳動で確認した。それぞれのPCRの陽性コントロールとして, recAは当院で分離された*A. baumannii*を, IMP-1とIMP-2は当院で分離された*E. coli*を, VIM-2は*P. aeruginosa* M β -7⁴⁾を使用した。細菌DNAは血液寒天培地で24時間培養したコロニーから集菌し, SepaGene (三光純薬, 東京) を用いて抽出した。

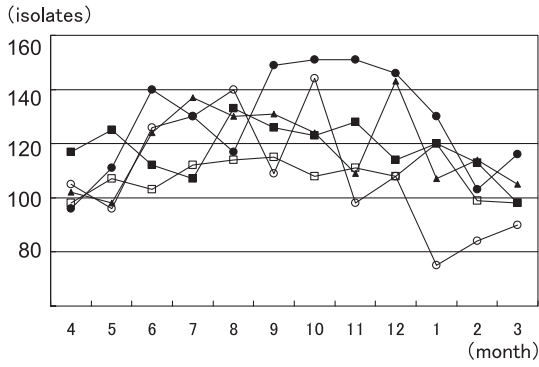
結 果

1. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) の検出状況

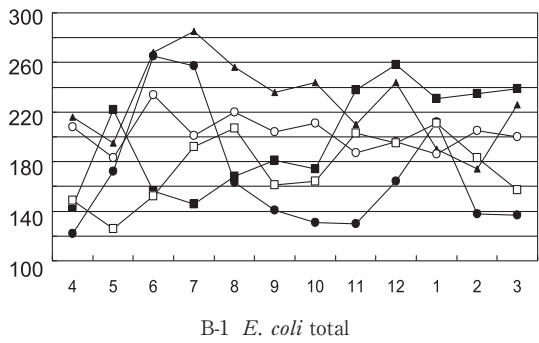
5年間のMDRPの月別検出比率をFig. 1Aに示す。*P. aeruginosa* 検出総数は毎月100~140株であり, そのうちMDRPは1~5株(0.5~6%)であった。この比率は最近5年間で変動しなかった。

2. ESBL産生 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* の検出状況

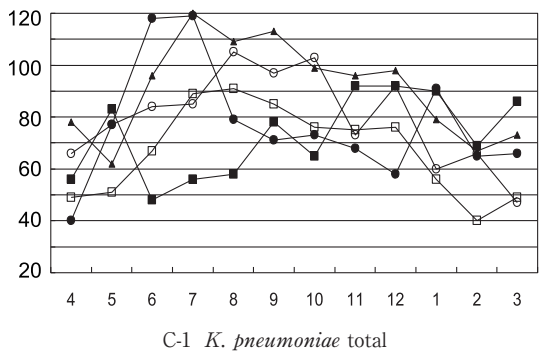
*E. coli*は, 毎月100~280株が検出された(Fig. 1B-1)。第三世代cephalosporin薬に耐性を示した株は10~40株(10~20%)存在し, 5年間で増加傾向にあったとはいえなかった(Fig. 1B-2)。第三世代cephalosporin薬耐性*E. coli*のほとんどをESBL産生株が占めていた(Fig. 1B-3)。*K. pneumoniae*は毎月50~100株が検出され(Fig. 1C-1), そのうち第三世代cephalosporin薬に耐性を示した株は4~8株(10~20%)で, 5年間で増減は無かった。



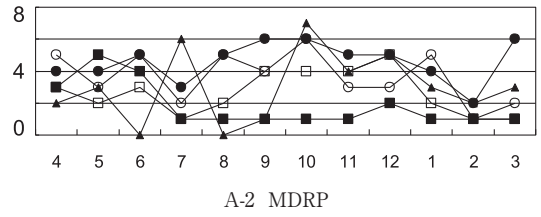
A-1 *Pseudomonas aeruginosa* total



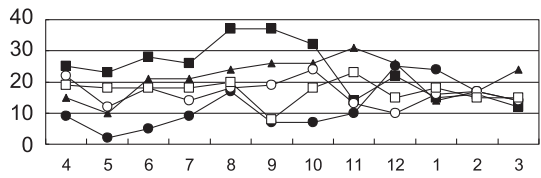
B-1 *E. coli* total



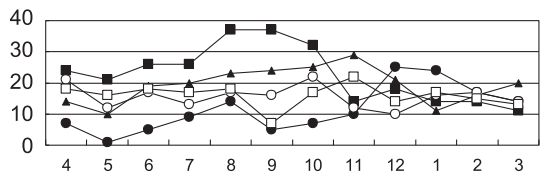
C-1 *K. pneumoniae* total



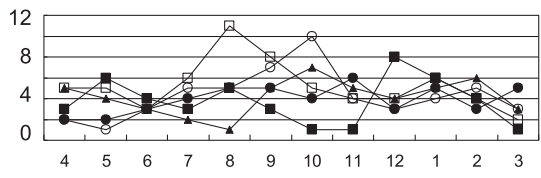
A-2 MDRP



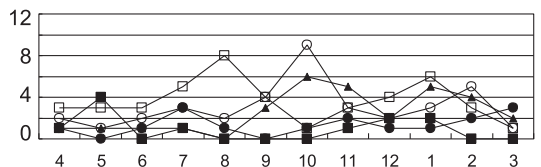
B-2 Third generation cephalosporin resistant *E. coli*



B-3 ESBL producing *E. coli*



C-2 Third generation cephalosporin resistant *K. pneumoniae*



C-3 ESBL producing *K. pneumoniae*

● : 2006, ■ : 2007, ▲ : 2008, ○ : 2009, □ : 2010

Fig. 1

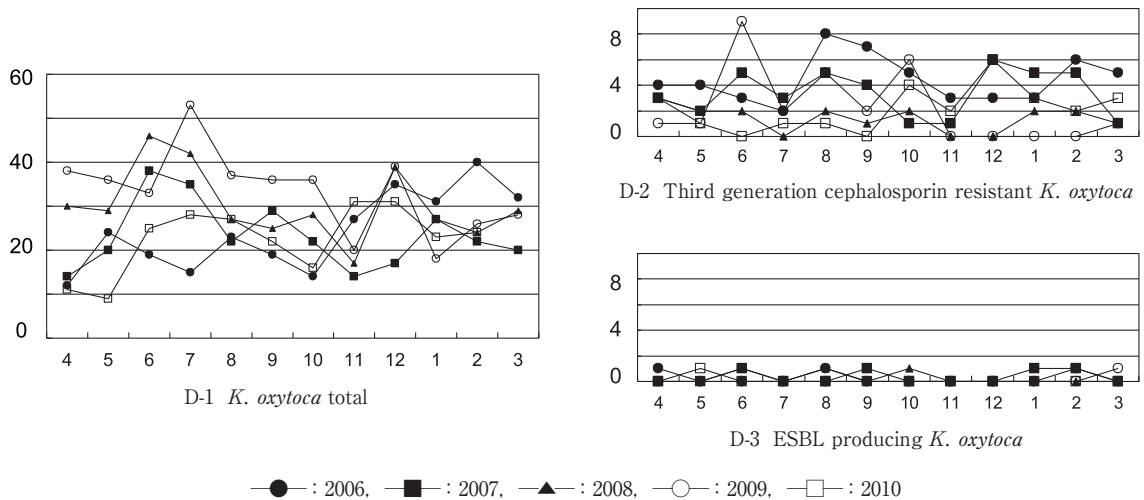


Fig. 1 Monthly Isolation

Table 1 Monthly isolation of drug resistant *Acinetobacter baumannii* in FY2010

	2010				2011							
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Total isolate number	23	23	21	19	24	18	33	14	9	8	10	12
Resistant to 3 groups	0	0	1	0	0	1	3	2	0	1	1	0
Resistant to 2 groups	4	3	1	1	1	1	4	2	1	1	0	0

ESBL 産生株は毎月2～4株で、第三世代 cephalosporin 薬耐性株の40～60%を占めた (Fig. 1C-2, 3)。 *K. oxytoca* は毎月20～40株が検出され (Fig. 1D-1), そのうち第三世代 cephalosporin 薬耐性株は2～6株 (10～20%) であり, その中に ESBL 産生株はほとんどなかった (Fig. 1D-2, 3)。

3. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA) の検出状況

A. baumannii の同定は2010年度から行っており, それまでは *Acinetobacter* spp. で報告していた。本資料では MDRA の報告が求められるようになった2010年度の結果を示す。Table 1 に示すごとく, 毎月 *A. baumannii* は10～20株程度が分離され, 3系統耐性株が10月には3株検出された。3系統耐性株の各薬剤の SIR 判定を Table 2 に示す。月別統計では, 月をまたいで入院している患者からの分離は2株とカウントされてしまう。そこで, 患者別にまとめなおしたところ, 3系統耐性株は4名の患者

の6部位から検出された。患者Cから分離された株のみが, IPM, AMK, CPFX に耐性を示す感染症法定義の MDRA であった。残りの3名の患者由来の4株はいずれも MEPM, GM, CPFX, LVFX に耐性を示したが, IPM と AMK には感受性であり, 典型的な MDRA ではなかった。2系統耐性株についても追跡を行ったところ, 毎月1～4株が分離された。3剤および2剤耐性株の検出部位は, 喀痰が最多で, ついで尿であった。2系統耐性株はいずれも, aminoglycoside 系薬と fluoroquinolone 系薬に耐性であった。また, carbapenem 系薬のみの耐性株も数株検出された。期間中 carbapenem 系薬に耐性の株が7株あり, 検討し得た6株について SMA 抑制試験を行ったところ, いずれも陰性であり metallo β -lactamase の可能性は低かった。さらに IMP-1, -2 VIM-2 を標的とした PCR を施行したところ, 増幅産物は得られなかった (Fig. 2)。

Table 2 Pattern of antibiotic resistances of 3 groups resistant-*Acinetobacter baumannii*

		IPM	MEPM	GM	TOB	AMK	LVFX	CFPX
A	sputum	S	R	R	S	S	R	R
B	sputum	S	R	R	S	S	R	R
B	urine	S	R	R	S	S	R	R
C	sputum	R	R	R	R	R	R	R
C	around gastrostoma	R	R	R	R	R	R	R
D	sputum	S	R	R	S	S	R	R

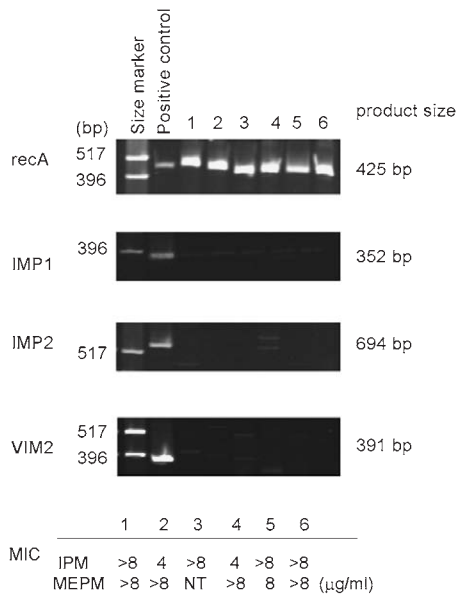


Fig. 2 PCR detection of metallo- β -lactamase gene. PCR was performed as described in Materials and Methods. PCR products were electrophoresed on 5% polyacrylamide gel and stained with SYBR[®] green. PUC19 digested with *Hinf*I was used for size marker. MIC of carbapenems are indicated. NT: not tested. MIC measurement of MEPM was not available in the plate used in April 2010.

考 察

MDRP, ESBLを含む第三世代 cephalosporin 耐性腸内細菌, および MDRA においては抗菌薬耐性機構が多様である。特に今回の検討では, MDRA の carbapenem 系薬耐性は既知の metallo- β -lactamase 以外の機構で獲得していることが示唆された。耐性の報告を行う上で以下に示すごとく, いくつかの問題点が挙げられる。

MDRP については, 感染症法により AMK, CFPX, IPM が判定薬剤として示されているが, しばしば, AMK と同系統の GM あるいは TOB の結果が乖離する。また, 2 系統耐性株もさらに耐性獲得し MDRP となる可能性があるため, その耐性薬剤をコメント欄に記載している。MDRA も同様に, carbapenem 系薬の IPM と MEPM, aminoglycoside 系薬の AMK, GM および TOB の結果が乖離することが多い。抗菌薬耐性については, 抗菌薬に暴露されることで耐性遺伝子の発現誘導が起り, 同一系統薬に対する耐性亢進が起きる可能性がある。高度耐性菌の出現と蔓延を防ぐためにも, 感染症法定義の 3 系統薬剤に含まれる薬剤のいずれかが耐性の際には, 耐性薬剤名を報告することに意義があると考えられる。

ESBL 産生は, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri* について CVA 抑制試験により確認している。われわれは CVA 抑制試験による ESBL 産生の判定の結果は遺伝子型と一致することを確認した³⁾。第三世代 cephalosporin 薬耐性の *E. coli* のほとんどが ESBL 産生株であった一方, *K. pneumoniae* では第三世代 cephalosporin 薬耐性株のおよそ半数が ESBL 産生株で, *K. oxytoca* では ESBL 産生株はほとんどなかったことは, ESBL 遺伝子の侵淫の頻度が菌種によって異なることを示している。ESBL 産生以外の第三世代 cephalosporin 耐性株の耐性機構の一つとして AmpC 型 β -lactamase 過剰産生株の存在が挙げられる。AmpC 型 β -lactamase は染色体性とプラスミド伝達するものがあるため⁵⁾, ESBL 産生株と同様に拡大防止が必須となる。

また、腸内細菌では IPM の MIC 値が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の株であっても SMA 抑制試験で阻止円拡大が認められ、かつ IMP 遺伝子保有する株の報告はしばしばある^{3,6)}。このため、meallo- β -lactamase 産生株の報告方法には考慮すべき点が残る。

さらに最近、KPC carbapenemase の腸内細菌への侵淫が増加し、KPC carbapenemase 保有菌検出の目的で、CLSI 基準が更新され、IPM と MEPM の MIC 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) が S : ≤ 1 , I : 2, R : ≥ 4 , Doripenem (DRPM) が S : ≤ 0.25 , I : 0.5, R : ≥ 1 , となった⁷⁾。また、*Acinetobacter* spp. での OXA 型 carbapenemase 産生など、carbapenem 系薬の MIC 値が低値の耐性菌の検出のためには、MIC 値測定や SMA 抑制試験だけでなく、PCR による耐性遺伝子の検出が必須となる。

以上示したように、抗菌薬耐性機構は複数存在する。感度良く耐性菌を検出するためには、表現型検査に加え、耐性遺伝子解析が必須であり、今後適切な PCR プライマーと positive control の普及が望まれる。

文 献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: twentieth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010. (Clinical and Laboratory Standards Institute: M100-S20, V30, no. 1)
- 2) 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* 38 : 40-43, 2000.
- 3) 高橋奈々子, 山口史博, 陳 戈林, ほか: 昭和大学病院で分離された多剤耐性 *Enterobacter cloacae* の耐性遺伝子解析. *臨病理* 58 : 442-447, 2010.
- 4) Yatsuyanagi J, Saito S, Ito Y, *et al*: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harboring the bla_{VIM-2} metallo- β -lactamase gene in Akita Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 57 : 130-132, 2004.
- 5) Jacoby GA: AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22 : 161-182, 2009.
- 6) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, *et al*: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 42 : 2006-2011, 1998.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: twentieth informational supplement (June 2010 update) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010. (Clinical and Laboratory Standards Institute: M100-S20-U, no. 15)

ISOLATION OF MULTIDRUG-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa*,
ESBL-PRODUCING *Escherichia coli*, ESBL-PRODUCING *Klebsiella*
pneumoniae, ESBL-PRODUCING *Klebsiella oxytoca* AND
MULTIDRUG-RESISTANT *Acinetobacter Baumannii*
IN SHOWA UNIVERSITY HOSPITAL
(FISCAL YEAR 2006-2010)

Nanako TAKAHASHI, Tsutomu YASUHARA, Kazuhide GOMI
and Kunihiko FUKUCHI

Department of Clinical Pathology, Showa University School of Medicine

Koji SEKIGUCHI, Yuko TATEISHI and Kazuhisa UGAJIN

Department of Clinical Laboratory, Showa University Hospital

Abstract — We report the isolation of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*, ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*, ESBL-producing *Klebsiella oxytoca* and multidrug-resistant *Acinetobacter Baumannii* in Showa University Hospital (Fiscal Year 2006-2010). MDRP were identified as 1 to 5 strains monthly, corresponding to 0.5-6% of total *P. aeruginosa* isolates. ESBL-producing *E. coli* were identified as 10-40 strains monthly, 10-20% of total *E. coli* isolates. ESBL-producing *E. coli* occupied most of the third generation cephalosporin-resistant *E. coli*. From 10-20% of total *K. pneumoniae* isolates showed resistance to the third generation cephalosporin. About half of the third generation cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*, 2-4 strains monthly, were identified as ESBL producing. From 10-20% of total *K. oxytoca* isolates showed resistance to the third generation cephalosporin-resistant, 2-6 strains monthly. ESBL producing strain. The number of MDRP and ESBL producing strains and the ratio to total isolates did not fluctuate from FY2006 to 2010. Ten to twenty strains of *A. baumannii* were isolated monthly in FY2010. Strains resistant to three antibiotic groups; Carbapenems, Aminoglycosides and Fluoroquinolones, were detected in 6 specimens of 4 patients in FY2010. Among them, 2 strains from 1 patient were resistant to Imipenem, Amikacin and Ciprofloxacin, and were identified as a definitive MDRA. The remaining 4 strains from 3 patients were resistant to Meropenem, Gemtamicin, and Ciprofloxacin, and were sensitive to Imipenem and Amikacin. To prevent the spread of drug-resistant bacteria, appropriate reporting efforts are necessary. Further, a sensitive method to detect drug-resistant strains using gene analysis should be established.

Key words: Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), extended-spectrum- β -lactamase (ESBL), Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA), metallo- β -lactamase

〔受付：9月1日，受理：9月16日，2011〕