

香川県内の薬剤耐性遺伝子の検出状況 (2023)

Detection of Antimicrobial-Resistance Genes in Kagawa Prefecture (2023)

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

2023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。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 (Multi locus sequencing typing)、plasmid replicon type を検索した。CRE 19株のうち届出のあったものが18株、依頼によるものが1株であった。菌種は、*Enterobacter cloacae* complex 10株、*Klebsiella aerogenes* 4株、*Klebsiella pneumoniae* 3株、*Escherichia coli* 1株、*Citrobacter braakii* 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2株、OXA-48-like 1株が検出された。ESBL 遺伝子は、TEM型2株、CTX-M-1 group 3株、CTX-M-9 group 2株が検出された。シーケンス解析の結果、IMP型は2株とも *bla*_{IMP-1}、OXA-48-like は *bla*_{OXA-48} と判明した。海外型とされる *bla*_{OXA-48} の検出は県内初であった。患者は渡航歴がなく、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。

19 carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) strains brought to our center from medical institutions in Kagawa Prefecture from January to December 2023 were genetically analyzed by PCR. Variants, MLST (Multilocus sequencing type), and plasmid replicon type were searched for by sequence analysis and whole genome analysis. Of the 19 CRE strains, 18 were reported and 1 was requested. The species were 10 strains of *Enterobacter cloacae* complex, 4 strains of *Klebsiella aerogenes*, 3 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 1 strain of *Escherichia coli*, and 1 strain of *Citrobacter braakii*. Detected genes were carbapenemase genes, IMP type 2 and OXA-48-like 1. ESBL genes were TEM type 2, CTX-M-1 group 3 and CTX-M-9 group 2. Sequence analysis revealed that the IMP type was *bla*_{IMP-1} in both strains and OXA-48-like was *bla*_{OXA-48}. This was the first detection of *bla*_{OXA-48}, which is considered to be an overseas strain, in the prefecture. The patient had no travel history, and it is necessary to continue monitoring carbapenemase gene possession in order to be aware of the spread of the overseas strain in the prefecture.

キーワード：カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 OXA-48

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、2023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

2023年1月から12月の間に当センターに搬入されたCRE 19株を対象とした。19株のうち届出のあったものが18株、保健所に相談があったものが1株であった。

* 退職

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、腸内細菌目細菌は、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⁹⁾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¹⁰⁾の ResFinder 4.1 で薬剤耐性遺伝子を、MLST 2.0 で MLST (Multi locus sequencing typing) を、Plasmid Finder 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 10株、*Klebsiella aerogenes* 4株、*Klebsiella pneumoniae* 3株、*Escherichia coli* 1株、*Citrobacter braakii* 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。OXA-48-like は、クラブラン酸による阻害がみられた。本来、OXA-48-like は阻害剤による阻害は見られないとされているが、同時に保有していた CTX-M-1 group の影響と考えられた。

Carba NP test 又は mCIM の結果は、IMP型、OXA-48-like 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。

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の結果は一致した。

カルバペネマーゼ遺伝子はIMP型2株(*E. cloacae* complex 1株、*K. pneumoniae* 1株)、OXA-48-like 1株であった。ESBL 遺伝子は、TEM型2株(*E. cloacae* complex 2株)、CTX-M-1 group 3株(*E. cloacae* complex 1株、*K. pneumoniae* 2株)、CTX-M-9 group 2株(*E. cloacae* complex 1株、*E. coli* 1株)が検出された。カルバペネマーゼ遺伝子の検出割合は15.8% (3株)であった。

IMP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) にコードされる塩基配列が一致した。

OXA-48-like カルバペネマーゼ遺伝子1株の塩基配列を解析した結果、*bla_{OXA-48}* (GenBank Accession No. AY236073.2) にコードされる塩基配列が一致した。

カルバペネマーゼ遺伝子が検出された3株の全ゲノム解析結果を表2に示す。

IV 考察

Enterobacter 属(*K. aerogenes*を含む)が全体の73.7%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。

*bla_{IMP-1}*保有の*K. pneumoniae* はこれまで同一病院の患者からのみ検出されていたが、今回検出された*bla_{IMP-1}*保有の*K. pneumoniae* はその病院からの転院患者であった。MLSTはST147と過去に検出されたMLSTと同じであった。ST147は、院内感染のハイリスククローン¹¹⁾とされている。

*bla_{IMP-1}*保有の*E. cloacae* は、2020年以降に当センターで検出された*bla_{IMP-1}*保有の*E. cloacae*のうち1株が同じST78であったが、保有プラスミドが異なったため関連は示唆されなかった。

海外型とされる*bla_{OXA-48}*が県内で初めて検出された。*bla_{OXA-48}*は、2004年トルコで初めて*K. pneumoniae*から分離

された¹²⁾。*bla*_{OXA-48}の世界的な広がりとは菌種間の広がりとは、主に複合トランスポゾン Tn 1999と、IncL 接合プラスミドの広がりが一因とされる。今回検出された*bla*_{OXA-48}保有の*K. pneumoniae*もIncL プラスミドを保有していた。MLSTのST15は、CC15¹³⁾に属し、CTX-M-15の保有率が高いことが知られる。患者は渡航歴がなく、感染経路は不明で県内への浸潤が危惧される。

V 結論

海外型とされる *bla*_{OXA-48} の検出は県内初であった。患者は渡航歴がなく、海外型の県内の広がりに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。

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 T, 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) Kawahara R, Watahiki M, Matsumoto Y, et al.: Subtype screening of *bla*_{IMP} genes using bipartite primers for DNA sequencing., Jpn. J. Infect. Dis, 74, 592-599, (2021)
 - 10) <http://www.genomicepidemiology.org/services/> (2023/9/26 閲覧)
 - 11) Peirano G., Chen L., Kreiswirth B. N. & Pituuta J. D. D.: 2020. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 64 (10).
 - 12) Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P.: 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 48:15-22.
 - 13) Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.: 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother 56:559-562.

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		不検出	株数	
	IMP-1	OXA-48-like	TEM型	CTX-M-1 group CTX-M-9 group			
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	1		2	1	1	7	10
<i>Klebsiella aerogenes</i>						4	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1		2			3
<i>Escherichia coli</i>					1		1
<i>Citrobacter braakii</i>					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
2023c01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST: 15	IncFII(pKP91)_1 IncL_1 IncFIB(K)_1	<i>blaSHV-106 oqxA6 oqxB20 fosA6 blaCTX-M-15 dfrA14 blaOXA-48</i>
2023c14	<i>Enterobacter cloacae</i>	ST: 78	IncFIB(pHCM2)_1 IncFII(pECLA)_1 IncR_1	<i>fosA5_fam blaSHV-11 oqxA6 oqxB19 blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1</i>
2023c15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST: 147	IncFII(pKP91)_1 IncFIB(K)_1	<i>fosA5_fam blaSHV-11 oqxA6 oqxB19 blaIMP-1 aac(6')-Iae sul1</i>