

# 薬剤耐性菌の検査法 ～日常検査でここまでできる～

## 薬剤耐性菌の検査法 ～日常検査でここまでできる～

21世紀の問題として人口増加や環境汚染と同様に、微生物における**薬剤耐性が世界的にクローズアップ**されている。中でも**グラム陰性桿菌の耐性化は深刻**であり、その対策が世界規模で行われている。日本においても、2016年4月に“**薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン**”が発表され、耐性菌問題に関して日本が進むべき方向性が明確に示された。このような背景から、薬剤耐性菌の検出を担う微生物検査室として、様々な薬剤耐性菌を迅速かつ正確に検出することが責務であると考えられ、“**出来る検査室**”を目指し“**最大のパフォーマンスを発揮できる体制を構築**”することが必要となる。

そこで、本ワークショップでは**薬剤耐性菌の検査法 ～日常検査でここまでできる～**と題して、**グラム陰性桿菌（主に腸内細菌目細菌：Enterobacterales）**の薬剤耐性菌の検出法について様々な角度からディスカッションできればと思う。

➤ **Enterobacterales（腸内細菌目細菌）**：2016年、**Enterobacterales（腸内細菌目細菌）**に属する7つの科が新たに提唱された。これまでのEnterobacteriaceae（腸内細菌科細菌）に属していた菌種が他の科に移籍されたために表記をEnterobacterales（腸内細菌目細菌）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。本ワークショップでは、これらすべての菌種を含むため、**Enterobacterales（腸内細菌目細菌）**を使用することとした。

### 第31回日本臨床微生物学会総会 ワークショップ 関西チーム

名前	施設	所属
中村 竜也	京都橋大学	健康科学部 臨床検査学科
口広 智一	公立那賀病院	臨床検査科
木下 愛	滋賀医科大学医学部附属病院	検査部
中辻 瑞穂	滋賀県立総合病院	臨床検査部
加藤 香	公立甲賀病院	臨床検査課
志村 敏史	大手前病院	中央検査部
仁木 誠	大阪市立大学医学部附属病院	感染制御部
木村 圭吾	大阪大学医学部附属病院	臨床検査部
大友 志伸	松下記念病院	臨床検査科
大瀧 博文	関西医療大学	保健医療学部 臨床検査学科
山田 幸司	京都府立医科大学附属病院	医療技術部 臨床検査技術課
谷野 洋子	京都府立医科大学附属病院	医療技術部 臨床検査技術課
藤原 里紗	京都鞍馬口医療センター	検査科
岩本 久美	京都第一赤十字病院	検査部
藤原 麻有	京都橋大学	健康科学部 臨床検査学科
北川 大輔	奈良県総合医療センター	臨床検査部
中村 彰宏	天理医療大学	医療学部 臨床検査学科
阿部 教行	天理よろづ相談所病院	臨床検査部
中松 純一	済生会和歌山病院	臨床検査科
大沼 健一郎	神戸大学医学部附属病院	検査部
奈須 聖子	神戸市立医療センター中央市民病院	臨床検査技術部
水阪 隆	加古川中央市民病院	臨床検査室
小松 方	天理医療大学	医療学部 臨床検査学科



# 薬剤耐性菌を検出するための考え方

京都橋大学 健康科学部 臨床検査学科 中村竜也

## Check Point!

1: 「菌種毎の自然耐性や各種抗菌薬の基礎抗菌力を知ろう」

2: 「獲得耐性（プラスミド性等）の薬剤感受性パターンを知ろう」

3: 「各種耐性機序のスクリーニング基準や検査フローを明確にしよう」

### 1: 「各菌種の自然耐性や各種抗菌薬の基礎抗菌力を知る」

問題となっている薬剤耐性は主にプラスミドにより伝播するものであり、耐性が付加される形で検出される。ゆえに、菌種毎に内因性耐性（自然耐性）である抗菌薬を知っておく必要がある。表1はEUCASTに記載されているintrinsic resistanceであるが、ここに記載されている“R”の抗菌薬は通常耐性と考える。これを基本として、どのような耐性が付加されたのかを予測することができる。要は、通常ではないパターンを見抜くことで、耐性因子を検出することが可能となる。また、各抗菌薬に対する耐性化は低度～高度まで耐性機序により異なる。特に低度の耐性化は“ステルス型”とも呼ばれ注意を要する。このような耐性を見出すには、抗菌薬の各菌種に対する基礎抗菌力を知り、MICの上昇がみられた場合は耐性の発現もしくは獲得を疑うことになる。基礎抗菌力は各薬剤のインタビューフォームで確認することができる（表2）EUCASTやCLSIは、epidemiological cut off値を設定し、薬剤耐性を見逃さない工夫がされている。それらを活用することも薬剤耐性菌を見逃さないための一助になる。

表1 腸内細菌目細菌におけるintrinsic resistance (EUCAST)

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Amoxicillin-clavulanic acid	Ampicillin-sulbactam	Ticarcillin	Ceftazidime, Ceftiofur, Cefepime, Ceftriaxone, Cefuroxime	Tetracyclines	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Polymyxin B, Colistin	Nitrofurantoin
1.1	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> <sup>1</sup>	R			R					
1.2	<i>Citrobacter freundii</i> <sup>2</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.3	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.5	<i>Escherichia hermannii</i>	R			R					
1.6	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R			R					
1.8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R			R					
1.9	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.10	<i>Proteus mirabilis</i>							R	R	R
1.11	<i>Proteus penneri</i>	R			R	R	R	R	R	R
1.12	<i>Proteus vulgaris</i>	R			R	R	R	R	R	R
1.13	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.14	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.15	<i>Raoullella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.16	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.17	<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1.18	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>									R



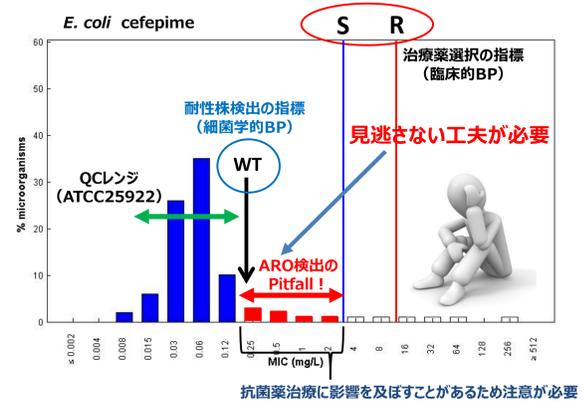
表2 Meropenem (MEPM) の各標準菌株に対する抗菌力

菌種	標準菌株No	MIC (μg/mL)
<i>E. coli</i>	NHJ IC-2	0.013
	K-12 C600	0.013
	B	0.025
	ID976	0.025
<i>C. freundii</i>	ATCC27156	0.05
<i>C. diversus</i>	ID901	0.013
<i>S. typhi</i>	ID1015	0.025
<i>S. paratyphi</i>	ID971	0.013
<i>S. typhimurium</i>	ID8006	0.025
<i>S. schottmulleri</i>	GI	0.013
<i>S. enteritidis</i>	ATCC10031	0.013
<i>K. pneumoniae</i>	GIFU3162	0.013
<i>K. oxytoca</i>	ID977	0.013
<i>E. cloacae</i>	963	0.013
<i>E. aerogenes</i>	ATCC13048	0.025
<i>H. alvei</i>	ID978	0.05
<i>S. marcescens</i>	X 100	0.013
<i>P. mirabilis</i>	IAM1184	0.025
<i>P. vulgaris</i>	IFO3849	0.025
	OX-19	0.025
	IX-19	0.05
	ID874	0.05
<i>M. morganii</i>	IFO3848	0.05
	Kono	0.05
<i>P. rettgeri</i>	IFO3850	0.025

標準菌株に対するMEPMのMICは腸内細菌目細菌の場合高くても0.05μg/mLであることがわかる。現在のCPEのスクリーニング基準は0.25μg/mLであり、通常よりも5倍以上のMICを基準としている。



表3 EUCASTにおけるCFPMの*E. coli*に対するepidemiological cut off値



### 2: 「獲得耐性（プラスミド性等）の薬剤感受性パターンを知る」

各菌種の自然耐性や各種抗菌薬の基礎抗菌力を基本として、検出された菌株における薬剤感受性の妥当性を検証し、何らかの薬剤耐性が検出されれば、その耐性因子の種類を判別することとなる。グラム陰性桿菌の薬剤耐性に関与する因子の多くはプラスミド性に獲得し、特にβラクタマーゼが問題となる。βラクタマーゼは、その種類により薬剤感受性パターンが異なる。このパターンを知ることで、獲得している耐性因子の検出や推測が可能となる。表4には、例として*Klebsiella pneumoniae*におけるβラクタマーゼ毎の薬剤感受性パターンを記載した。

表4 *Klebsiella pneumoniae*におけるβラクタマーゼ毎の薬剤感受性パターン

β-lactamase Class	遺伝子	ABPC	PIPC	PIPC/TAZ	CEZ	CPDX	CTX	CAZ	CFPM	AZT	CMZ	LMOX	IPM	MEPM
基礎抗菌力		>16	3.13	0.06	1.56	0.12	0.02	0.05	0.06	0.02	0.78	0.12	0.12	0.015
LEN-1	A 染色体	R	S(r)	S	S(r)	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CTX-M	A プラスミド	R	R	S	R	R	R	S(R)	R	S(R)	S	S	S	S
SHV-12	A プラスミド	R	R	S	R	R	S(R)	R	R	R	S	S	S	S
CTX-M+外膜	A プラスミド	R	R	S	R	R	R	S(R)	R	S(R)	r	r	r	r
AmpC	C プラスミド	R	R	r	R	R	R	r	S	r	R	R	S	S
AmpC+外膜	C プラスミド	R	R	r	R	R	R	r	S	r	R	R	r	r
IMP-1	B プラスミド	R	r	r	R	R	R	R	R	S	R	R	r	r
IMP-6	B プラスミド	R	r	r	R	R	R	R	R	S	R	R	S	r
KPC	A プラスミド	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OXA-1	D プラスミド	R	R	R	S(r)	S	S	S	r	S	S	S	S	S
OXA48	D プラスミド	R	R	R	S(r)	S	S	S	S	S(r)	S	S	r	r

“column” グラム陰性桿菌のMICって？

MIC 1μg/mL

βラクタム系の場合・・・PBPIに結合し、菌を死滅させることができる濃度⇒MIC値

以下の障害物を乗り越えて、βラクタム系薬の標的であるPBPIに結合する

- ① ポーリンへの入りやすさ（分子量）
- ② ポーリン通過スピード
- ③ ポーリンの量
- ④ 排出蛋白の影響
- ⑤ βラクタマーゼに対する安定性
- ⑥ βラクタマーゼの産生量
- ⑦ PBPへの結合力
- ⑧ PBPの変異

グラム陰性菌はここだけ考える！

### 3: 「各種耐性機序のスクリーニング基準や検査フローを明確にしておく」

上記で示した耐性機序毎のパターンも全て当てはまるわけではない。薬剤耐性菌を見逃さないためには、問題となる薬剤耐性菌検出のスクリーニング基準や検査フローを明確にしておくことが重要である。図1、2はEUCASTに記載されているESBLおよびCREの検査フローを示した。日本においても本フローは十分に活用できるものとする。また、CPEのスクリーニングにはヨーロッパを中心にFaropenemが使用されている。図3には我々が検討した結果を掲載しておく。FRPMディスク（5 μg）を使用することでCPEのスクリーニングを感度良く実施することが可能である。

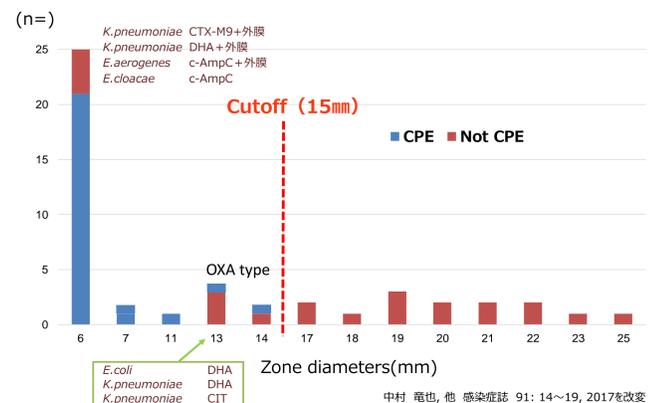
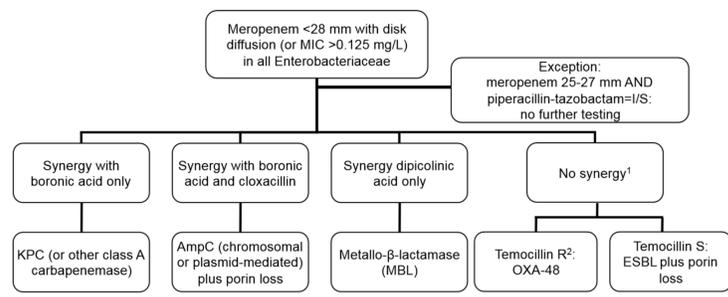
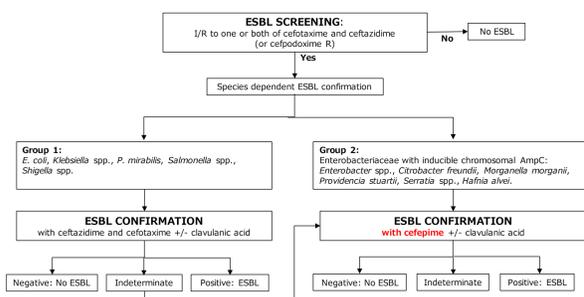


図1 EUCASTにおけるESBL産生腸内細菌目細菌の検出フロー

図2 EUCASTにおけるCREの検出フローと阻害剤を使用した型別方法

図3 FRPMディスク（5 μg）を用いたCPEスクリーニング



# 耐性菌検出キットを用いてAST・ICTに貢献する

滋賀医科大学医学部附属病院 検査部 木下 愛  
 公立甲賀病院 臨床検査課 加藤 香  
 滋賀県立総合病院 臨床検査部 中辻 瑞穂

## Check Point!

1: 「キットの特徴を理解して使用」

2: 「迅速！初期投資不要！AST・ICT活動に貢献できる！」

3: 「解釈は感受性検査結果、表現型検査等組み合わせる総合的に評価」

### はじめに

薬剤耐性菌の検出方法には、表現型検査およびPCR法等を用いた遺伝子検査が存在する。主な検出フローチャートおよび検査法の特徴を図1、表1に示す。表現型検査は、特別な手技を必要としないが、判定までに1日要する事が多く、迅速性に欠ける。また、遺伝子検査は、数時間で耐性遺伝子の検出が可能であるが増幅装置などの初期投資が必要である。耐性菌検出キットの多くは、必要物品がキット化されており、特別な手技を用いずとも耐性菌の検出が可能である。近年は反応時間数十分で遺伝子型まで検出可能なキットが販売されており、PCR法と同等の相関を有している。また、検出キットの多くが、コロニーを対象としているため、血液培養やその他臨床検体を培養して得られたコロニーから直接検査を実施する事が可能である。これら検出キットを活用する事で、より早期に耐性菌検出が可能であり、抗菌薬適正使用支援、感染対策に寄与できると考えられる。本邦で発売されている耐性菌検出キットは、イムノクロマト法、発色基質等を原理としており、キットの特性（対象とする表現型、遺伝子）を理解して使用することが重要である。また、一部試薬を除き、研究用試薬としての販売であるため、単独で用いず、感受性検査結果、表現型検査等他法と組み合わせる上で総合的に判断する事が必要である。



表1 表現型、遺伝子検査、検出キットにおける薬剤耐性菌検査法の特徴

	表現型検査	遺伝子検査	耐性菌検出キット
コスト	○ 培地、薬剤ディスクのみ	△～○ (in house PCRの場合は低コスト)	△ キットによっては高コスト
迅速性	× 1日必要	○ 数時間	◎ 数十分～数時間
手技	○ 特別な手技を必要としない	△～○ 習得までに慣れが必要	○ 特別な手技を必要としない
設備	○ 培地、薬剤ディスク等	×～△ 増幅装置などが必要	○ キット化されており不要

## 本邦にて入手可能な耐性菌検出キットおよび特徴

	シカベータテスト (関東化学)	クイックチェイサーIMP (ミズホメディー)	RAPIDEC CARBA NP テスト (バイオリュウ)	NG test CARBA5 (日水製薬)																																																																																																																																															
検出可能耐性菌	ESBL、AmpC、MBL産生菌	IMP型MBL産生菌	カルバペネマーゼ産生菌全般	カルバペネマーゼ産生菌全般 (KPC型、OXA型、VIM型、IMP型、NDM型)																																																																																																																																															
原理	基質 (HMRZ-86) と酵素を反応させ発色を確認	イムノクロマト法 IMP存在下で赤紫色ラインが出現	基質 (IPM) と菌酵素を反応させ、フェノールレッドで発色を確認	カルバペネマーゼモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法																																																																																																																																															
検査方法	テストストリップに基質溶液を滴下、被検菌を塗り付けて判定	抽出容器に抽出液を分注、コロニーを懸濁、テストストリップに滴下し判定	専用カセットのウェル内に被検菌を添加し、ふ卵器にて反応、フェノールレッドの色調で判定	抽出用緩衝液に被検菌を懸濁・攪拌し、テストプレートに滴下、テストラインの出現の有無により判定																																																																																																																																															
反応時間	2分～15分	15分	5分～2時間	～15分																																																																																																																																															
コスト (定価ベース)	1ストリップ: 270円	1テスト: 1000円	1テスト: 1200円	1テスト: 3000円																																																																																																																																															
検出感度	既知の陽性菌株 (遺伝子検査にて確認) を用いた検討では以下の通りであった。酵素産生量に影響を受けるため、一部偽陰性を示す株も認められた。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>文献</th> <th>ESBL (+/全株) 感度(%)</th> <th>MBL (+/全株) 感度(%)</th> <th>AmpC (+/全株) 感度(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>13/17 76.5</td> <td>8/11 72.7</td> <td>ND ND</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>63/74 85.1</td> <td>20/26 76.9</td> <td>18/25 72</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>109/115 94.7</td> <td>6/7 85.7</td> <td>56/67 83.5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>39/52 75</td> <td>ND ND</td> <td>ND ND</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ND ND</td> <td>51/51 100</td> <td>ND ND</td> </tr> </tbody> </table>	文献	ESBL (+/全株) 感度(%)	MBL (+/全株) 感度(%)	AmpC (+/全株) 感度(%)	1	13/17 76.5	8/11 72.7	ND ND	2	63/74 85.1	20/26 76.9	18/25 72	3	109/115 94.7	6/7 85.7	56/67 83.5	4	39/52 75	ND ND	ND ND	5	ND ND	51/51 100	ND ND	既報4報全て感度は100%であった。 ・PCR法との一致率: 100% (腸内細菌目細菌330株 非発酵菌605株) ・SMA法との相関性: 100% (腸内細菌目細菌256株 非発酵菌250株) SMA法にて陽性を示し、本法で陰性であった株→PCR法にてbla IMP遺伝子を検出せず。 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">SMA法</th> <th colspan="2">陽性</th> <th rowspan="2">全体</th> </tr> <tr> <th>陽性</th> <th>陰性</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>本法</td> <td>401</td> <td>42</td> <td>453</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1</td> <td>62</td> <td>63</td> </tr> <tr> <td>全体</td> <td>402</td> <td>104</td> <td>506</td> </tr> </tbody> </table>	SMA法	陽性		全体	陽性	陰性	本法	401	42	453		1	62	63	全体	402	104	506	既知のCPE菌株、non-CPE菌株を用いた検討では以下の通りであった。OXA型等特定の遺伝子型にて偽陰性を示す株が認められた。 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">文献</th> <th colspan="2">Enterobacteriales</th> <th colspan="2">Pseudomonas sp.</th> <th colspan="2">Acinetobacter sp.</th> </tr> <tr> <th>感度(%)</th> <th>特異度(%)</th> <th>感度(%)</th> <th>特異度(%)</th> <th>感度(%)</th> <th>特異度(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>91.9</td> <td>83.9</td> <td>90.9</td> <td>88.2</td> <td>36.4</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>99.1</td> <td>ND</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>86.7</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>93.7</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>90.2</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>92</td> <td>96</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>99</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> </tbody> </table>	文献	Enterobacteriales		Pseudomonas sp.		Acinetobacter sp.		感度(%)	特異度(%)	感度(%)	特異度(%)	感度(%)	特異度(%)	1	91.9	83.9	90.9	88.2	36.4	75	2	99.1	ND	100	ND	86.7	ND	3	100	ND	ND	ND	ND	ND	4	93.7	100	ND	ND	ND	ND	5	90.2	100	ND	ND	ND	ND	6	92	96	ND	ND	ND	ND	7	99	100	ND	ND	ND	ND	既知のCPE菌株、non-CPE菌株を用いた検討では以下の通りであった。カルバペネム系のMICが低値であっても、検出可能であった。 文献1: IMP型 IPMのMIC $\leq$ 0.5、MEPMのMIC $\geq$ 1 OXA型 IPMのMIC $\leq$ 0.5、MEPMのMIC $\leq$ 0.125 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">文献</th> <th colspan="2">OXA型 IPMのMIC<math>\leq</math>0.5、MEPMのMIC<math>\leq</math>0.125</th> <th colspan="2">特異度(%)</th> </tr> <tr> <th>(+/全株)</th> <th>感度(%)</th> <th>(-/全株)</th> <th>感度(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>98/99</td> <td>98.9</td> <td>51/51</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>2-1</td> <td>20/20</td> <td>100</td> <td>20/26</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>2-2</td> <td>17/18</td> <td>94.4</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>70/70</td> <td>100</td> <td>45/45</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>4-1</td> <td>13/13</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> <tr> <td>4-2</td> <td>12/12</td> <td>100</td> <td>ND</td> <td>ND</td> </tr> </tbody> </table>	文献	OXA型 IPMのMIC $\leq$ 0.5、MEPMのMIC $\leq$ 0.125		特異度(%)		(+/全株)	感度(%)	(-/全株)	感度(%)	1	98/99	98.9	51/51	100	2-1	20/20	100	20/26	100	2-2	17/18	94.4	ND	ND	3	70/70	100	45/45	100	4-1	13/13	100	ND	ND	4-2	12/12	100	ND	ND
文献	ESBL (+/全株) 感度(%)	MBL (+/全株) 感度(%)	AmpC (+/全株) 感度(%)																																																																																																																																																
1	13/17 76.5	8/11 72.7	ND ND																																																																																																																																																
2	63/74 85.1	20/26 76.9	18/25 72																																																																																																																																																
3	109/115 94.7	6/7 85.7	56/67 83.5																																																																																																																																																
4	39/52 75	ND ND	ND ND																																																																																																																																																
5	ND ND	51/51 100	ND ND																																																																																																																																																
SMA法	陽性		全体																																																																																																																																																
	陽性	陰性																																																																																																																																																	
本法	401	42	453																																																																																																																																																
	1	62	63																																																																																																																																																
全体	402	104	506																																																																																																																																																
文献	Enterobacteriales		Pseudomonas sp.		Acinetobacter sp.																																																																																																																																														
	感度(%)	特異度(%)	感度(%)	特異度(%)	感度(%)	特異度(%)																																																																																																																																													
1	91.9	83.9	90.9	88.2	36.4	75																																																																																																																																													
2	99.1	ND	100	ND	86.7	ND																																																																																																																																													
3	100	ND	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																													
4	93.7	100	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																													
5	90.2	100	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																													
6	92	96	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																													
7	99	100	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																													
文献	OXA型 IPMのMIC $\leq$ 0.5、MEPMのMIC $\leq$ 0.125		特異度(%)																																																																																																																																																
	(+/全株)	感度(%)	(-/全株)	感度(%)																																																																																																																																															
1	98/99	98.9	51/51	100																																																																																																																																															
2-1	20/20	100	20/26	100																																																																																																																																															
2-2	17/18	94.4	ND	ND																																																																																																																																															
3	70/70	100	45/45	100																																																																																																																																															
4-1	13/13	100	ND	ND																																																																																																																																															
4-2	12/12	100	ND	ND																																																																																																																																															
現場での活かし方	幼若コロニーで迅速に耐性菌推定→抗菌薬適正使用支援、感染対策に 救急外来、夜間に腎盂腎炎で入院となった患者、血液培養および尿培養採取後、CTX投与。翌朝、血液培養よりGMR発育。同日夕方、発育したコロニーを用いてシカベータテストを実施したところESBL+。 主治医にESBLの可能性を伝えたと、抗菌薬をCMZに変更。薬剤感受性検査および表現型による確認試験を実施。翌日ESBL産生 <i>Escherichia coli</i> と確定した。 	本邦に多いIMP型に特化して迅速判定が可能→アウトブレイク、水平伝播例に迅速に対応 IMP型MBL産生 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> が検出された患者病棟の保菌検査で耐性菌スクリーニング培地にコロニーの発育を認めた。コロニーを用いてクイックチェイサーIMPを実施、陽性ラインを認めた。 水平感染を疑い、感染対策の強化および環境培養を実施。後日PFGEにていずれの株も同一の泳動パターンを示した。 	遺伝子型にとらわれず網羅的にカルバペネマーゼ産生菌の検査が可能 入院患者喀痰より <i>Enterobacter cloacae</i> を検出した。(感受性検査結果は左表参照) SMA試験陰性であり、クラスB以外のカルバペネマーゼを考へRAPIDEC CARBA NPを実施。陽性であり、CPEとして主治医・ICT・病棟に報告した。後に遺伝子検査にて、本邦では報告例が少ないGES-4産生株と判明した。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>薬剤</th> <th>MIC</th> <th>SIR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ABPC</td> <td><math>\geq 32</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>PIPC</td> <td><math>\geq 128</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>AMP/CVA</td> <td><math>\geq 32</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>CEZ</td> <td><math>\geq 64</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>CTX</td> <td><math>\leq 1</math></td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>CPDX-PR</td> <td>4</td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>CAZ</td> <td>16</td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>CFPM</td> <td><math>\leq 1</math></td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>CMZ</td> <td><math>\geq 64</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>IPM</td> <td><math>\geq 16</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>MEPM</td> <td>8</td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>GM</td> <td><math>\geq 16</math></td> <td>R</td> </tr> <tr> <td>AMK</td> <td>16</td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>MINO</td> <td><math>\leq 1</math></td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>CPFX</td> <td>1</td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>LVFX</td> <td>1</td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>ST</td> <td><math>\leq 20</math></td> <td>S</td> </tr> <tr> <td>FOM</td> <td><math>\leq 16</math></td> <td>S</td> </tr> </tbody> </table>	薬剤	MIC	SIR	ABPC	$\geq 32$	R	PIPC	$\geq 128$	R	AMP/CVA	$\geq 32$	R	CEZ	$\geq 64$	R	CTX	$\leq 1$	S	CPDX-PR	4	R	CAZ	16	R	CFPM	$\leq 1$	S	CMZ	$\geq 64$	R	IPM	$\geq 16$	R	MEPM	8	R	GM	$\geq 16$	R	AMK	16	S	MINO	$\leq 1$	S	CPFX	1	S	LVFX	1	S	ST	$\leq 20$	S	FOM	$\leq 16$	S	遺伝子型も含むカルバペネマーゼ産生菌検査が可能 海外での入院歴がある患者が入院した。耐性菌の持ち込み確認のため、個室管理の上、便・喀痰・尿が提出された。耐性菌スクリーニング培地に腸内細菌科細菌と推測されるGMRが発育し <i>Klebsiella pneumoniae</i> と同定。コロニーを用いてNG-test CARBA5を実施したところ、OXA型が陽性となったため、主治医・ICT・病棟に報告した。海外からの持ち込み耐性菌をいち早く検出でき、伝播を防ぐことが出来た。 																																																																																						
薬剤	MIC	SIR																																																																																																																																																	
ABPC	$\geq 32$	R																																																																																																																																																	
PIPC	$\geq 128$	R																																																																																																																																																	
AMP/CVA	$\geq 32$	R																																																																																																																																																	
CEZ	$\geq 64$	R																																																																																																																																																	
CTX	$\leq 1$	S																																																																																																																																																	
CPDX-PR	4	R																																																																																																																																																	
CAZ	16	R																																																																																																																																																	
CFPM	$\leq 1$	S																																																																																																																																																	
CMZ	$\geq 64$	R																																																																																																																																																	
IPM	$\geq 16$	R																																																																																																																																																	
MEPM	8	R																																																																																																																																																	
GM	$\geq 16$	R																																																																																																																																																	
AMK	16	S																																																																																																																																																	
MINO	$\leq 1$	S																																																																																																																																																	
CPFX	1	S																																																																																																																																																	
LVFX	1	S																																																																																																																																																	
ST	$\leq 20$	S																																																																																																																																																	
FOM	$\leq 16$	S																																																																																																																																																	
注意点	<i>Klebsiella oxytoca</i> (KOXY過剰産生株) で偽陽性例あり。菌種により内因性酵素が反応する場合もあるため、内因性耐性を理解した上で総合的に判断が必要。	SIM-1型MBLのようにIMP型MBLと類似の構造を有するMBLとは交叉反応する可能性がある。(添付文書)	OXA48型など、特定の遺伝子型で検出感度が劣ることがある。本検査が陽性であっても遺伝子型の確定はできない。	KPC型、OXA型、VIM型、IMP型、NDM型以外のカルバペネマーゼ産生菌は検出できないため、他法を用いる必要がある。																																																																																																																																															
参考文献	1. 中村 竜也 他, JARMAM 15: 15-20, 2004. 2. Livermore DM, et al. J Antimicrob Chemother, 60:1375-79, 2007. 3. Lavigne JP, et al. Pathol Biol (Paris), 59: 7-11, 2011. 4. Garrec H, et al. J Clin Microbiol, 49: 1048-57, 2011. 5. 藤島 正行, 感染症誌 80: 391-398, 2006 6. シカベータテスト ユーザーマニュアル	1. クイックチェイサー IMP 添付文書 2. 藤島 正浩, 他: 医学と薬学 68(3): 557-563, 2012. 3. T Kitano, et al. J Microbiol Methods, 87:330-337, 2011. 4. S Notale, et al. J Clin Microbiol, 51:1762-1768, 2013.	1. Noël A, et al. J Clin Microbiol, 55: 510-518, 2017. 2. Kabir MH, J Antimicrob Chemother, 71:1213-1216, 2016. 3. Varsha Gupta, et al. J Lab Physicians, 10: 101-105, 2018. 4. Mancini S, et al. Diagn Microbiol Infect Dis, 88:293-297, 2017. 5. Hombach M, et al. J Clin Microbiol, 53:3823-3833, 2015. 6. Garg A, et al. Antimicrob Agents Chemother, 59:7870-2, 2015. 7. Dortet L, et al. J Antimicrob Chemother, 70: 3014-3022, 2015.	1. 安藤 淳佳 ほか, 第30回日本臨床微生物学会 総会・学術集会, P1-077-2019. 2. 藤原 麻有, 中村 竜也, 第68回日本検査医学会, 46, 2019. (2-1は血液培養増殖地およびCPE選択培地上のコロニーを用いた検討, 2-2はトリプルロスを用いた検討) 3. NG-Test CARBA5 日本製薬株式会社 検査試薬添付文書 4. 加藤 香, 日本臨床微生物学会 微生物部門夏季研修会, 2019. (4-1は菌株から, 4-2は模擬血液培養検体を用いた検討)																																																																																																																																															

# 薬剤感受性自動測定機器を比較する

## ～付加価値の高い感受性検査報告を目指して～

神戸市立医療センター中央市民病院 奈須 聖子  
加古川中央市民病院 臨床検査室 水阪 隆  
神戸大学医学部附属病院検査部 大沼 健一郎

### Check Point!

- 1: 「機器のスペックを比較する」: 自施設の運用に合致する機器を選択する!
- 2: 「機器の結果を比較する」: 測定薬剤の種類や測定レンジの違いを知る!
- 3: 「機器のイチオシを比較する」: 付加価値の高い感受性検査で感染症診療支援!

### 【1. 機器のスペックを比較する!】

※1 VITEK2ブルー、VITEK2 Compact ※2 幅×奥行×高さ (単位: cm)

	VITEK2ブルー XL	スマートキャリアステーション	BDフェニックスM50	BDフェニックスAP	DPS192iX	イノキュレータ SMART
機器性能	機器名称	VITEK2ブルー XL (他2機種※1)	BD PhoenixM50		DPS192iX	
	メーカー	バイオメュー・ジャパン	日本ベクトン・ディッキンソン		栄研化学	
	大きさ※2/重量	140×71×67/145kg	81.5×76.5×53.5/約53.5kg		35×65×60/約50kg	
	処理能力 (搭載可能枚数)	120カード	49枚		40プレート	
	測定原理・方法	Rate assay 同定: 比色法 感受性: 比濁法	Rate assay 同定: 比色法、蛍光法 感受性: 比色法、比濁法		Continuous monitoring 同定: 測定不可 感受性: 比濁法	
操作性	耐性菌エキスパートシステム	AES (Advanced Expert System)	BDエキスパートシステム		無し	
	菌液調整方法	マニュアル	自動 (BDフェニックスAP) マニュアル		マニュアル	
	菌液接種方法	自動	マニュアル		自動 (SMART) マニュアル (FunDropper)	
	菌液濃度	Mcf0.5	Mcf0.5 または Mcf0.25		Mcf1.0	
	必要処理時間 (1株あたり)	約2分	約3分		約3分	
パネル性能	コスト (定価ベース) ※大腸菌1株の感受性検査の場合	¥1,595	¥1,406 (機器法) ¥1,250 (用手法)		¥1,446 (SMART) ¥1,700 (FunDropper)	
	パネルの種類 (感受性用)	13種類	6種類		6種類	
	測定可能薬剤数	GP: 11-19薬剤 GN: 17-19薬剤	GP: 30薬剤 GN: 25薬剤		GP: 37薬剤 GN: 33薬剤	
	測定時間 (感受性)	4~18時間	4~16時間		1~24時間	
	目視確認	不可	不可		可	

- Point! 3機種とも迅速報告可能な測定原理  
・VITEK2は同定検査用、感受性検査用で測定カードが独立しているため、用途に応じた運用が可能
- Point! VITEK2、Phoenixは感受性結果を自動的に検証するエキスパートシステムを装備
- Point! Phoenixは機器による自動菌液調整が可能
- Point! Phoenix、DPS192iXはCPEスクリーニング薬剤として注目されているFRPM、LMOXが測定可能  
・Phoenixでは一部のパネルでTAZ/CTLZの測定が可能  
・DPS192iXはパネルの目視確認が可能であり、用手法でも対応可能 (機器トラブル時に有用)

### 【2. 機器の結果を比較する!】

抗菌薬*	測定レンジ			ESBL型 (bla <sub>CTX-M-9</sub> )			AmpC型 (bla <sub>MOX</sub> )			MBL型 (bla <sub>IMP-1</sub> )			MBL型 (bla <sub>IMP-6</sub> )			MBL型 (bla <sub>NDM-1</sub> )			KPC型 (bla <sub>KPC</sub> )		
	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix	DPS192iX	VITEK2	Phoenix
ABPC	0.5-16	2-32	2-16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16
PIPC	2-64	4-128	2-64	>64	>128	>64	>64	>128	>64	>64	>128	>64	>64	>128	>64	>64	>128	>64	>64	>128	>64
CEZ	0.5-16	4-64	2-16	>16	>64	>16	>16	>64	>16	>16	>64	>16	>16	>64	>16	>16	>64	>16	>16	>64	>16
CAZ	0.5-16	1-64	0.5-16	4	4	4	4	16	16	>16	16	>16	8	4	8	>16	>64	>16	>16	16	>16
CPDX	1-4	0.25-8	1-4	>4		>4	>4		>4	>4		>4	>4		>4	>4		>4	>4		>4
CTRX	1-32	1-64	0.5-32	>32		>32	4		>32	>32		32	>32		>32	>32		>32	>32		>32
CTX		1-64	1-32		64	>32		>64	>32		8	32		>64	>32		>64	>32		8	>32
CFPM	0.5-16	1-64	1-16	>16	8	16	≤0.5	≤1	≤1	2	≤1	4	>16	>64	>16	>16	>64	>16	>16	2	>16
CPR	0.5-16			>16			8			1			>16			>16			>16		
AZT	0.5-16	1-64	0.5-16	>16	16	>16	2	≤1	2	2	16	>16	>64	8	≤0.5	≤1	≤0.5	>16	>64	>16	>16
CMZ	1-32	1-64	8-32	8	8	≤8	>32	>64	>32	>32	>64	>32	>32	>64	>32	>32	>64	>32	>32	32	>32
FMOX	0.5-16	2-64		≤0.5	≤2		>16	>64		>16	>64		16	8		>16	>64		>16	8	
FRPM	0.12-4			2			4			>4			>4			>4			>4		
LMOX			4-32			≤4			≤4			>32			>32			>32			>32
DRPM	0.25-8	0.12-8		≤0.25			≤0.25			2			8			>8			>8		
IPM	0.25-8	0.25-16	0.25-8	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	0.5	1	1	0.5	≤0.25	≤0.25	8	>16	>8	>8	>8	8	>8
MEPM	0.25-8	0.25-16	0.125-8	≤0.25	≤0.25	≤0.125	≤0.25	≤0.25	≤0.125	2	≤0.25	0.5	8	>16	2	>8	>16	>8	>8	≥16	>8
CVA/AMPC	0.5-16			16			>16			>16			8			>16			>16		
SBT/ABPC	0.5-16	2-32	2-16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	>32	>16	>16	≥32	>16
SBT/CPZ	1-32			32			16			32			32			>32			>32		
TAZ/CTLZ			1-8			≤1			≤1			>8			8			>8			>8
TAZ/PIPC	4-64	4-128	4-64	32		8	4		8	16		>64	≤4	≤4	>64		>64	>64	>64		>64
CPFX	0.12-2	0.25-4	0.06-4	>2	>4	>4	≤0.12	≤0.25	≤0.125	≤0.12	≤0.25	≤0.125	>2	>4	>4	>2	>4	>4	>2	>4	>4
LVFX	0.25-4	0.12-8	0.25-4	>4	>8	>4	≤0.25	≤0.12	≤0.25	≤0.25	≤0.12	≤0.25	>4	>8	>4	>4	>8	>4	>4	>8	>4
STFX	0.25-4			2			≤0.25		≤0.25	1			1		2			>4			>4
AMK	1-32	2-64	4-32	8	>2	≤4	8	16	16	2	≤2	≤4	4	≤2	≤4	>32	>64	>32	>32	>64	32
GM	0.25-8	1-16	2-8	2	>1	≤2	0.5	≤1	≤2	2	≤1	4	4	4	4	>8	8	>8	2	2	≤2
CL			1-4			≤1			≤1			≤1			≤1			≤1			≤1
FOM	4-128			≤4			16			>128			≤4		32			>128			>128
MINO	0.25-8	1-16	1-8	>8	8	>8	1	2	2	2	4	>64	2	4	2	8	>16	>8	>8	>16	>8
ST	2.38/0.12-38/2		19/1-76/4	>38/2		>76/4	>38/2		>76/4	9.5/0.5		≤19/1	4.75/0.25		≤19/1	>38/2		>76/4	>38/2		>76/4
自動判定結果				4時間でCTRX耐性判明	ESBL	ESBL	3時間でCMZ耐性判明	ESBL+膜透過性低下(セファマイシン系薬剤)、後天性セファロスポリナーゼ	Amp Cの過剰産生やESBLの可能性	4時間でFRPM >4	ESBL	クラスDカルバペネマーゼ産生菌	カルバペネマーゼ (+またはESBL)	Amp Cの過剰産生やESBLの可能性	4時間でMEPM耐性判明	カルバペネマーゼ (+またはESBL)、膜透過性低下カルバペネム (+ESBLまたは+HL AmpC)	クラスBカルバペネマーゼ産生菌	①3時間でFRPM >4 ②8時間でMEPM耐性判明	カルバペネマーゼ (+またはESBL)、膜透過性低下カルバペネム (+ESBLまたは+HL AmpC)	クラスAカルバペネマーゼ産生菌	
耐性判明所要時間				7h43m	5h36m		9h46m	5h16m		10h43m	7h36m		9h58m	5h36m		9h25m	7h16m		8h19m	7h16m	

\* ABPC: ampicillin, PIPC: piperacillin, CEZ: cefazolin, CAZ: ceftazidime, CPDX: cefpodoxime, CTRX: ceftriaxone, CTX: cefotaxime, CFPM: cefepime, CPR: cefpirome, AZT: aztreonam, CMZ: cefmetazole, FMOX: flomoxef, FRPM: faropenem, LMOX: latamoxef, DRPM: doripenem, IPM: imipenem, MEPM: meropenem, CVA/AMPC: clavulanic acid/amoxicillin, SBT/ABPC: sulbactam/ampicillin, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, TAZ/CTLZ: tazobactam/ceftolozane, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, CPFX: ciprofloxacin, LVFX: levofloxacin, STFX: sitafloxacin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, CL: colistin, FOM: fosfomicin, MINO: minocycline, ST: sulfamethoxazole-trimethoprim

# 薬剤感受性自動測定機器を比較する ～付加価値の高い感受性検査報告を目指して～

## 〔結果比較〕

耐性菌 (遺伝子型)	ESBL型 (CTX-M-9)	AmpC型 (MOX)	MBL型 (IMP-1)	MBL型 (IMP-6)	MBL型 (NDM-1)	KPC型 (KPC)
感受性結果	ESBLを予測	CMZ >32 AmpCを予測	IPM、MEPMは感受性 DPS192iX : FRPM >4	IMPは感受性 DPS192iX、VITEK2でMEPM耐性	カルバペラムが耐性	IPM、MEPMは感受性 DPS192iX : FRPM >4
機器耐性判定 ・VITEK2 ・Phoenix	VITEK2 : ESBL Phoenix : ESBL	VITEK2 : ESBL +膜透過性低下 Phoenix : AmpCや ESBL	VITEK2 : カルバペナメーゼ Phoenix : クラスD (カルバペナメーゼ)	VITEK2 : カルバペナメーゼ or ESBL Phoenix : AmpCやESBL	VITEK2 : カルバペナメーゼ or ESBL+膜透過性低下 Phoenix : クラスB (カルバペナメーゼ)	VITEK2 : カルバペナメーゼ +膜透過性低下 Phoenix : クラスA (カルバペナメーゼ)
考察	ESBL推定可能	AmpCを推定可能	VITEK2、Phoenixはカルバペラムは感受性であるが、耐性因子ルールによりカルバペナメーゼ判定可能 DPS192iX : FRPMでCPE推定可能	感受性結果よりDPS192iX、VITEK2はカルバペナメーゼ推定可能 Phoenix : LMOXでカルバペナメーゼの推測が可能	感受性結果よりカルバペナメーゼ推定可能	VITEK2、Phoenixはカルバペラムは感受性であるが、耐性因子ルールによりカルバペナメーゼ判定可能 DPS192iX : FRPMでCPE推定可能

《耐性株測定について》

※VITEK2、Phoenixはエキスパートシステムにより耐性菌の推測が可能である。しかし、ロジックに当てはまらない場合は耐性菌を疑うコメントが表示されないため、注意が必要である。

※耐性ロジックの感度・特異度を理解しておく必要がある。(BD CPO detect test 感度97.1% 特異度68.6%※1)

※稀な耐性菌やステルス型など感受性結果を見て、耐性菌を推定できる知識をもつことが大事である。

※1 Gina Thomson et al, Journal of Clinical Microbiology,12,2017 : 3437-3443

## 〔3. 機器のイチオシを比較する！〕

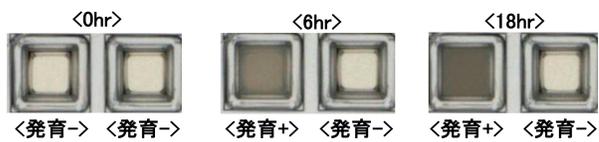
### DPS192iX

①耐性薬剤が3時間から報告可能

適切な抗菌薬の選択、投与に貢献！



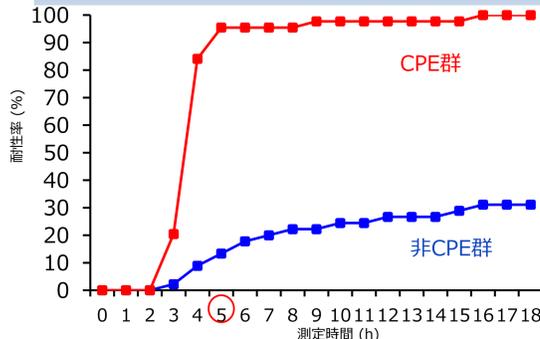
- ＜微生物感受性分析装置 DPS192iX＞  
(栄研化学株式会社)
- 1時間おきにウェルを自動撮影(カインテック機能)
  - 自動で発育の有無を判定しMIC値を表示
  - 従来のプレートの半分の大きさ(省スペース)
  - 192ウェル30種以上の薬剤を搭載(高効率)



自動撮像された画像は明瞭で容易に発育の確認が可能

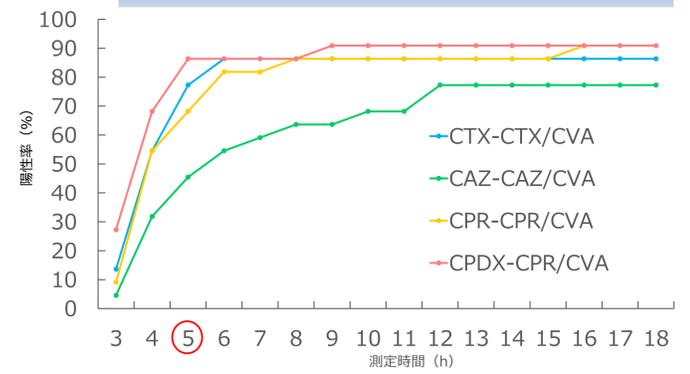
② CPEの迅速スクリーニングが可能

FRPMの5時間時点での耐性確認は、感度95.5%、特異度86.7%でCPEをスクリーニング可能※2



③ ESBL産生菌の早期報告が可能！

4薬剤を指標とすれば、5時間時点で全ての株がESBLと報告可能であった※3



### PhoenixM50

① B Dエキスパートシステムにより耐性菌の推定が可能！

ESRtest によるESBL、CPO detect testによるカルバペナメーゼ産生菌の推定※

- イントリンシクルール
- 耐性マーカールール
- 機体関連ルール
- 薬剤関連ルール
- 分離報告ルール
- 治療関連ルール

CPO type	No. tested	No. of positive carbapenemase tests	Classification by BD Phoenix CPO Detect			
			Class A	Class B	Class D	Unclassified positive
Class A	110	107	91	3	0	13
Class B	91	87	0	63	2	22
Class D	35	35	1	1	31	2
Dual <sup>a</sup>	7	7	0	1	4	2

<sup>a</sup>The classification results for the dual carbapenemase producers were as follows: positive unclassified, *A. baumannii* (OXA-23 + OXA-40) and *E. cloacae* (KPC-18 + VIM-1); class D, *A. baumannii* (OXA-23 + NDM), two isolates of *K. pneumoniae* (OXA-181 + NDM), and *K. pneumoniae* (OXA-232 + NDM); and class B, *E. cloacae* (KPC-18 + VIM-1).

Gina Thomson et al., "High-Stringency Evaluation of the Automated BD Phoenix CPO Detect and Rapidec Carba NP Tests for Detection and Classification of Carbapenemases" Journal of Clinical Microbiology, Volume 55 Issue 12: 3437-3443, December 2017

② CPE検出感度が上がる

LMOXをスクリーニングに使用

Waka Imai et al., "Simple Screening for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* by Moxalactam, Susceptibility Testing" Journal of Clinical Microbiology, Volume 55 Issue 7: 2276-2279, July 2017

④ MEPM

0.125 µg/mLから搭載※

EUCAST では大腸菌および肺炎桿菌におけるメロペネムの疫学的カットオフ値を0.125 µg/mL と設定

③リアルタイム報告が可能！

同定2h～、感受性4h～



⑤ TAZ/CTLZの測定が可能

市販試薬では国内で唯一※

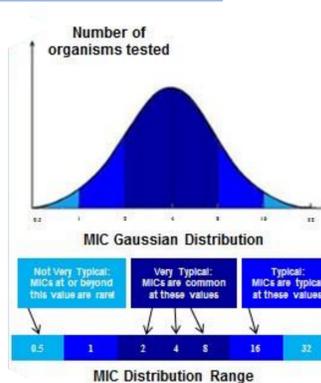
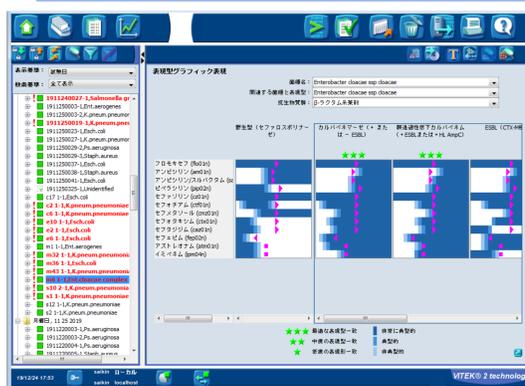
※一部パネル使用時のみ

### VITEK 2

①Advanced Expert System(AES) 自然耐性を考慮した報告や耐性機構の推測が可能！

45,000以上のMIC分布からなる15の薬剤系統/137菌種、104種類の表現型から構成

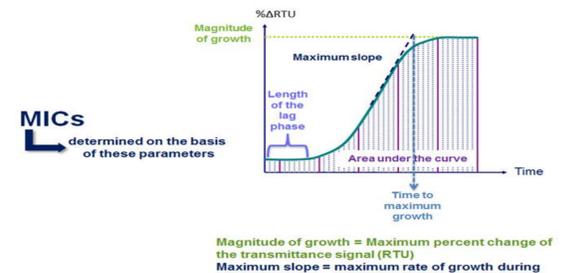
カテゴリー判定値ではなく、MIC値そのものを検証に使用



②同定のみ、感受性のみでの測定が可能

③酵母様真菌の同定、感受性が可能

④Rate assayのため結果が早い



## 〔まとめ〕

- 測定可能薬剤の種類や測定レンジの違いは選択のポイントとして重要
  - ✓□ TAZ/CTLZ (tazobactam/ceftolozane) など新規抗菌薬への対応
  - ✓□ FRPMやLMOXなどのCPEスクリーニングが可能な薬剤の搭載はあるか？
  - ✓□ カルバペネム系薬は低濃度から測定可能か？
  - ✓□ ニューキノロン系薬など、βラクタム系薬以外の抗菌薬は何種類測定可能か？
- 独自のロジックで耐性機序の推測が可能なものもあり、自動機器の付加価値として認識しておくことが重要である
- 耐性薬剤の迅速報告は3機種とも可能であり、抗菌薬適正使用の面から感染症診療に大きく寄与すると考えられる

# ESBL産生菌の表現型確認試験

大阪市立大学医学部附属病院 仁木 誠  
 松下記念病院 大友 志伸  
 大手前病院 志村 敏史

関西医療大学 大瀧 博文  
 大阪大学医学部附属病院 木村 圭吾

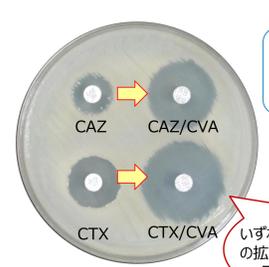
## Check Point!

1: 「感受性検査×表現型検査で耐性菌検査の基本をマスター！」

2: 「菌種、感受性検査結果から最適な表現型検査薬剤を選択！」

3: 「ESBL、AmpCは表現型検査で確実に捕まえよう！」

### 1. CLSI法



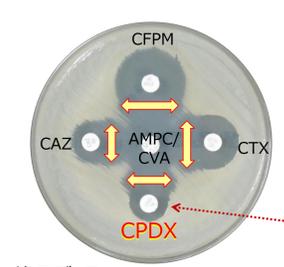
CLSI基準 (M100-ED29)

スクリーニング基準  
 いずれかで5mm以上の阻止円の拡大あり = ESBL産生菌

ディスク阻止円径 (mm)	MIC (μg/mL)
CPDX (10μg) : ≤17 or	CPDX : ≥8 or
CAZ (30μg) : ≤22 or	CAZ : ≥2 or
AZT (30μg) : ≤27 or	AZT : ≥2 or
CTX (30μg) : ≤27 or	CTX : ≥2 or
CTRX (30μg) : ≤25	CTRX : ≥2

使用ディスク  
 ・CAZ単剤ディスク  
 ・ESBLs-CAZ/CVA'栄研'  
 ・CTX単剤ディスク  
 ・ESBLs-CTX/CVA'栄研'

### 2. Double Disk Synergy Test(DDST)法



CLSI法で使用されている薬剤に加え、セファロスポリナーゼに比較的安定な第4世代セファロスポリン系薬 (CFPM、CPR、CZOP) や AZTを用いてCVAとの間に形成される阻止帯を確認する手法。

Disk間距離: 20~25mm

菌による使用ディスクの使い分けが重要!

- ✓ *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis* → CPDX
- ✓ その他の腸内細菌 → CPR or CZOP
- ✓ メタロ-β-ラクタマーゼと同時産生疑い → AZT

使用ディスク  
 ・AMPC/CVA、・CTX  
 ・CAZ、・CFPM  
 ・CPDX、CPR、CZOP、AZTなど

### 3. AmpC/ESBL鑑別ディスク

製造: MAST DIAGNOSTICS  
 販売: 関東化学株式会社

4枚のディスク阻止円径の差をみることで、ESBL産生菌、AmpC産生菌、両方同時産生菌を鑑別可能

条件*	判定
①  a-b  ≤ 2mm かつ  a-c  ≤ 2mm かつ  a-d  ≤ 2mm	ESBL(-), AmpC(-)
② ①を満たさず、b-a ≥ 5mm および d-c ≥ 5mm, さらに  b-d  ≤ 4mm および  a-c  ≤ 4mm	ESBLのみ(+)
③ ①を満たさず、d-c ≥ 5mm さらに  a-b  ≤ 4mm	ESBL(+), AmpC(+)
④ ①を満たさず、d-b ≥ 5mm および c-a ≥ 5mm, さらに  a-b  ≤ 4mm および  c-d  ≤ 4mm	AmpCのみ(+)

\* a, b, c, d : ディスクA, B, C, D各々の阻止円径

### 4. ESBL-NDP test 原法 (JCM 2012;50(9):3016-22.)

✓ Nordmannらによって報告されたESBL産生菌の迅速検出法  
 ✓ 基質であるCTXが加水分解 → H<sup>+</sup>が放出 → pH低下 → phenol redが黄変

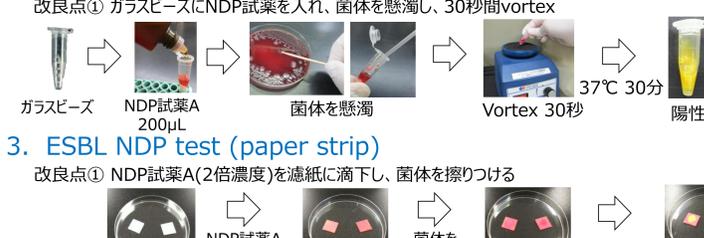
NDP試験A: フェノールレッド溶液(pH7.8) 1mLにcefotaxime sodium salt 3mgを溶解  
 NDP試験B: フェノールレッド溶液(pH7.8) 1mLにcefotaxime sodium salt 3mgと tazobactam 4mgを溶解  
 \*1フェノールレッド溶液(pH7.8): 2mL 0.5% phenol red solution(pH8.0) + 16.6mL distilled water]を1N NaOH pH7.8に調整

#### 改良法

1. modified ESBL NDP test (日臨微誌 2018;28(3):173-182.)  
 改良点① vortex adapterを用い、室温で30分間強く混和する → 15-30秒vortex後、室温で30分間静置  
 改良点② tazobactam → CTX/CVAディスク (栄研化学)

(迅速スクリーニング法)

2. ガラスビーズを用いた方法 (医学検査 2018;67(5):727-733.)  
 改良点① ガラスビーズにNDP試験薬を入れ、菌体を懸濁し、30秒間vortex



Point! 迅速・安価・簡便!  
 血培からの直接検出も可能  
 早期に有効抗菌薬の選択が可能となる

3. ESBL NDP test (paper strip)  
 改良点① NDP試験A(2倍濃度)を濾紙に滴下し、菌体をすりつける



Point! 抗菌薬適正使用  
 感染対策  
 診断支援に有用!

### ESBLのみ産生株 (*K. pneumoniae*, SHV)

薬剤	MIC (μg/mL)	薬剤	MIC (μg/mL)
CTRX	>2	PIPC	>64
CTX	>2	CMZ	≤4
CAZ	>8	FMOX	≤8
CFPM	2	IPM	≤0.5
AZT	>8	MEPM	≤0.25

感受性測定パネル: マイクロスキャンパネル Neg MIC EN 2J



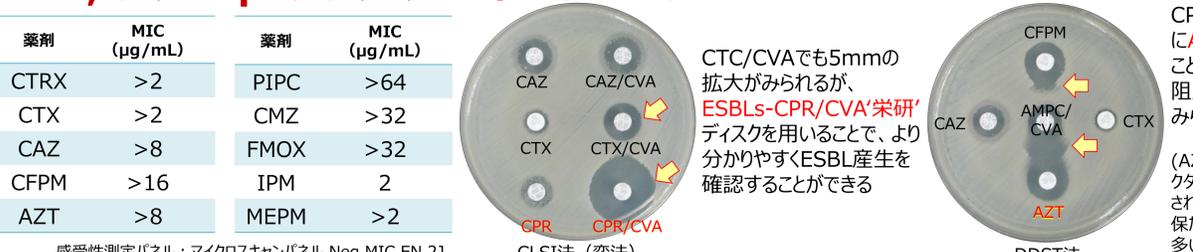
CLSI法 DDST法 AmpC/ESBL鑑別ディスク

Point! ESBL単独産生株であれば、いずれの手法においても検出可能! CMZやFMOXのMICが低いことから、容易にESBLを推定できる。

### ESBL, メタロ-β-ラクタマーゼ同時産生株 (*K. pneumoniae*, CTX-M-2 + IMP-6)

薬剤	MIC (μg/mL)	薬剤	MIC (μg/mL)
CTRX	>2	PIPC	>64
CTX	>2	CMZ	>32
CAZ	>8	FMOX	>32
CFPM	>16	IPM	2
AZT	>8	MEPM	>2

感受性測定パネル: マイクロスキャンパネル Neg MIC EN 2J



CLSI法(変法) DDST法 AmpC/ESBL鑑別ディスク

CTC/CVAでも5mmの拡大がみられるが、ESBLs-CPR/CVA'栄研'ディスクを用いることで、より分かりやすくESBL産生を確認することができる

CPDXの代わりにAZTを用いることで、明瞭な阻止帯の拡大がみられる (AZTはメタロ-β-ラクタマーゼでは分解されにくく、感受性が保たれていることが多いため)

Point! CMZ, FMOXのMIC上昇 → ESBL以外のβ-ラクタマーゼ産生? → AmpCやカルバペナーゼを疑う  
 AmpC/ESBL鑑別ディスクは検出困難  
 CPRとCVAとの合剤ディスクの使用や、AZTを用いたDDSTの実施が重要!

### ESBL, AmpC同時産生株 (*E. coli*)

薬剤	MIC (μg/mL)	薬剤	MIC (μg/mL)
CTRX	>2	PIPC	>64
CTX	>2	CMZ	>32
CAZ	>8	FMOX	>32
CFPM	>16	IPM	≤0.5
AZT	>8	MEPM	≤0.25

感受性測定パネル: マイクロスキャンパネル Neg MIC EN 2J



CLSI法(変法) DDST法 AmpC/ESBL鑑別ディスク

\*BA:boronic acid (ボロン酸)  
 ボロン酸(50mg/mL 6μL)添加により、阻止円が5mm以上拡大

AmpC産生株 ESBLs-CPR/CVA'栄研'ディスクを用いることでAmpC同時産生株であっても阻害がみられる

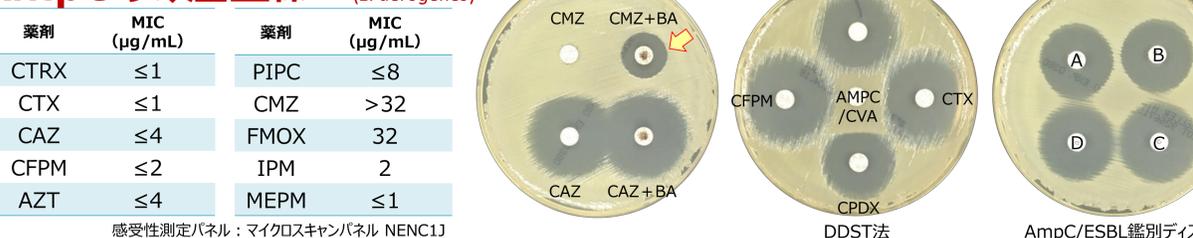
CFPMのみ阻止帯の拡大がみられる |a-b|=0, |a-c|=0, |a-d|=0 → ESBL(-)? AmpC(-)?

Point! CMZ, FMOXのMIC上昇 → AmpCの同時産生?  
 第4世代セファロスポリン系薬MIC上昇 → ESBLの同時産生? を、それぞれ疑うことが重要!  
 AmpC/ESBL鑑別ディスクでは検出困難な場合もある!

### AmpCのみ産生株 (*K. aerogenes*)

薬剤	MIC (μg/mL)	薬剤	MIC (μg/mL)
CTRX	≤1	PIPC	≤8
CTX	≤1	CMZ	>32
CAZ	≤4	FMOX	32
CFPM	≤2	IPM	2
AZT	≤4	MEPM	≤1

感受性測定パネル: マイクロスキャンパネル NENC1J



CLSI法(変法) DDST法 AmpC/ESBL鑑別ディスク

判定できる場合もある

第3世代セファロスポリン系薬のMICが低い場合、AmpC/ESBL鑑別ディスクでは判定できない場合があるため注意!

Point! 第3世代セファロスポリン系薬のMICが低い場合、AmpC/ESBL鑑別ディスクでは判定できない場合があるため注意!

# AmpC β-ラクタマーゼ産生菌の検出法

済生会和歌山病院 中松純一  
公立那賀病院 口広智一

## Check Point!

1: 「AmpC プラスミドには 気をつけて！」

2: 「検出は クロキサシリン ボロン酸！」

3: 「プラスミド性かどうかは、最終遺伝子検査！」

### AmpC β-ラクタマーゼとは

- ◆ Amblerの分類にてクラスCに分類されるセファロスポリナーゼである。
- ◆ 多くの腸内細菌目細菌, *Enterobacterales* (*Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter koseri*等を除く) や *Pseudomonas aeruginosa* など多くのグラム陰性桿菌が染色体上に *ampC* を保有している。(表1)
- ◆ 多くがAmpRと呼ばれる調節因子の支配を受け、環境中にβ-ラクタム系薬が存在すると多量の酵素を産生する。→ **誘導型AmpC**
- ◆ 特にセファマイシン系、カルバペネム系薬は誘導能が高く、誘導時は顕著に産生量が増加する。  
→セファマイシン系、第三世代セファロスポリン系、モノバクタム系薬なども分解。第四世代セファロスポリン系薬は分解されにくく、カルバペネム系薬は分解されない。
- ◆ *Escherichia coli*, *Shigella* spp.は環境中で常にごく少量のみ産生しているが、稀に酵素発現に関与するプロモーターの変異で過剰産生する。→ **構成型AmpC**
- ◆ AmpC β-ラクタマーゼ過剰産生 + 外膜タンパク変異 (薬剤排出機構の亢進、薬剤透過性の低下など) →時にカルバペネム系薬のMICが上昇、耐性となる。  
⇒カルバペネマーゼ非産生のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌, *Enterobacterales*
- ◆ 染色体上に *ampC* を保有する菌種については、プラスミド性が染色体性かの判定は遺伝子検査を実施しないと判定できない。

表1. 腸内細菌目細菌, *Enterobacterales* のβ-ラクタム系薬における内因性耐性 (CLSI M100-S29より一部抜粋)

Organism	Antimicrobial agent	Antimicrobial agent									
		Ampicillin	Amoxicillin/clavulanate	Ampicillin/sulbactam	Piperacillin	Ticarcillin	1st Cephalosporins: cefazolin, cephalothin	Cephamycins: cefoxitin, cefotetan	2nd Cephalosporin: cefuroxime	Imipenem	
<i>Citrobacter freundii</i>	誘導型クラスC	R	R	R			R	R	R		
<i>Citrobacter koseri</i>	クラスA (CKO-1) クラスA	R				R					
<i>Citrobacter amalonaticus</i> group <sup>a</sup>	誘導型クラスC	R	R	R			R	R			
<i>Enterobacter cloacae</i> complex <sup>b</sup>	構成型クラスC	β-ラクタム薬に内因性耐性は認められない									
<i>Escherichia coli</i>	誘導型クラスC	R	R	R			R	R			
<i>Hafnia alvei</i>	誘導型クラスC	R	R	R			R	R			
<i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes</i>	誘導型クラスC	R	R	R			R	R			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	クラスA (LEN-1)	R				R					
<i>Klebsiella oxytoca</i>	クラスA (K1)	R				R					
<i>Morganella morganii</i>	誘導型クラスC	R	R				R		R	c	
<i>Proteus mirabilis</i>	-	ペニシリン系とセファロスポリン系に対して内因性耐性は認められない									
<i>Proteus penneri</i>	クラスA (Cxase)	R					R		R	c	
<i>Proteus vulgaris</i>	クラスA (Cxase)	R					R		R	c	
<i>Providencia rettgeri</i>	誘導型クラスC	R	R				R			c	
<i>Providencia stuartii</i>	誘導型クラスC	R	R				R			c	
<i>Salmonella</i> spp.	-	これらの菌種でβ-ラクタム薬に内因性耐性は認められない: 注d									
<i>Shigella</i> spp.	構成型クラスC										
<i>Serratia marcescens</i>	誘導型クラスC	R	R	R			R		R		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	誘導型クラスC	R	R				R				

《注釈》  
a. *Citrobacter amalonaticus* group: *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, and *C. sedtakii*  
b. *E. cloacae* complex: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*  
その他complexに含まれる *E. kobei* と *E. ludwigii* に対しては検査データを適応できない。  
c. *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. はカルバペネマーゼ産生とは異なるメカニズムでIPMのMICが上昇することがある。検査で感性和判定されたものは感性和報告すべき。  
d. *Salmonella* spp., *Shigella* spp. について、アミノグリコシド系、第一、第二世代セファロスポリン系およびセファマイシン系薬は *in vitro* で感性和となることがあるが、臨床的効果がないため感性和報告すべきでない。

### PABLs (plasmid-mediated AmpC β-lactamases)

- ◆ 染色体性以外にプラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ(PABLs)が見つかり、菌種を越えて伝播することが可能であるため、院内感染対策上も重要である。
- ◆ 染色体に *ampC* を有しない *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. で第三世代セファロスポリン系やセファマイシン系薬のMICが上昇し、ESBL産生が否定された場合などは、PABLsが強く疑われる。
- ◆ 各由来菌種により6群に分類される (最も多く分離されているのはCIT型)。  
  - *Enterobacter* 属の染色体遺伝子由来... **ACT型 (EBC型)**
  - *Citrobacter freundii* の染色体遺伝子由来... **CIT型**
  - *Morganella morganii* の染色体遺伝子由来... **DHA型**
  - *Hafnia alvei* の染色体遺伝子由来... **ACC型**
  - *Aeromonas* 属の染色体遺伝子由来... **MOX型、FOX型**

Perez-Perez FJ, et al. 2002. J. Clin. Microbiol. 40:2153-2162

### ※セファマイシン系薬による誘導試験: 図1

プラスミド性AmpC酵素は殆どが調節遺伝子 *ampR* が欠損しているが、DHAとACT型は調節遺伝子 *ampR* を持ち誘導性を示すため、Cefoxitinディスクを用いて誘導性を確認することができる。  
**CTX、CAZの阻止円が"D"型になり、誘導耐性を示している。**

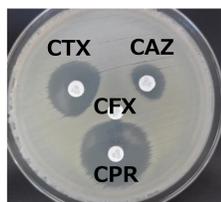


図1: DHA型産生 *K. pneumoniae*

## 検出法

### 1. 変法hodge test(MHT): 図2

- ① *E. coli* ATCC 25922株をMcF0.5濃度に調整し、10倍希釈した菌液を塗布
- ② CFXまたはCMZディスクを設置
- ③ ディスク端から被検菌を画線



図2: セファマイシン系薬を用いたMHT

### 2. 三次元拡散法: 図3

- ① 被検菌を液体培地で増菌後、遠心集菌、凍結融解5回
- ② *E. coli* ATCC 25922株をMcF0.5濃度に調整して塗布
- ③ CFXディスクを設置
- ④ ディスク端から5mmの位置から切れ込みを入れる
- ⑤ 切れ込みに被検菌の粗酵素液20~30μLを注入

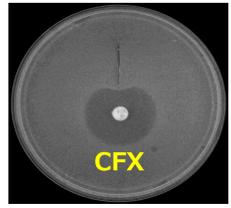


図3: セファマイシン系薬を用いた三次元拡散法

判定: 両試験とも培養後に交差部分に *E. coli* の発育増強を認めれば陽性

クラスBやカルバペネマーゼ産生菌も陽性となるため、本試験陽性でもすぐにクラスCとは判定できない。三次元拡散法も同様の原理だが、菌体破壊により検体中の酵素量が多くなるため感度が高い。

### 4. PCR法を用いた遺伝子型の決定

市販されている試薬は関東化学のシカジーニクス® AmpC遺伝子型検出キットのみ。1検体につき2種類のマルチプレックスPCRを行うことで、代表的な AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子ファミリー6種類の検出が可能。

### 3. 阻害剤を用いた阻害試験: 図4

クラスC β-ラクタマーゼの阻害剤を使用する。  
**・m-アミノフェニルボロン酸 (m-aminophenylboronic acid; APBA)**  
**・クロキサシリン (Cloxacillin; MCIPC)**  
これらの薬剤をセファマイシン系や第三世代セファロスポリン系薬のディスクに添加して阻害試験を実施することで、AmpCの存在を確認する。

- ① 被検菌をMcF0.5濃度に調整して塗布
- ② セファマイシン系や第三世代セファロスポリン系薬のディスクを設置 (図4は1例)
- ③ **APBA 50mg/mL, 6μL添加 又は MCIPC 75mg/mL, 10μL添加**

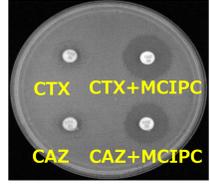
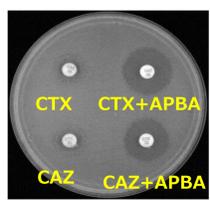


図4: AmpC阻害試験 (上: APBA添加, 下: MCIPC添加)

判定: 添加なしと比較して5mm以上の阻止円の拡大を認めれば陽性

※APBAはクラスAカルバペネマーゼであるKPC型にも例外的に阻害を示すため、KPC型の存在が疑われる場合は偽陽性に注意が必要。  
Yagi T, et al. 2005. J. Clin. Microbiol. 43:2551-2558.  
Brenwald NP, et al. 2005. J. Antimicrob. Chemother. 56: 600-601.

### 3'. ESBL/AmpC同時産生株の検出

- ・ESBL阻害試験が第4世代セファロスポリン系薬でのみ陽性
- ・AmpC β-ラクタマーゼ阻害試験がセファマイシン系薬でのみ陽性
- ・ESBL阻害試験、AmpC β-ラクタマーゼ阻害試験いずれも陰性

上記の結果を示す場合はESBL/AmpC同時産生が疑われる。ESBL阻害剤とAmpC阻害剤を組み合わせた阻害試験を実施することで鑑別が可能。関東化学からAmpC/ESBL鑑別ディスクが市販されている。

# カルバペネマーゼ産生菌の表現型試験

大阪市立大学医学部附属病院 仁木 誠  
松下記念病院 大友 志伸  
大手前病院 志村 敏史

関西医療大学 大瀧 博文  
大阪大学医学部附属病院 木村 圭吾

## Check Point!

1: 「阻害剤の特徴を理解しよう！」

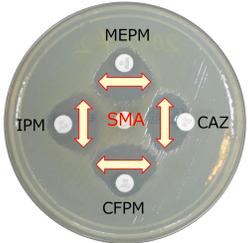
2: 「阻害剤を組み合わせせて酵素を推定しよう！」

3: 「CIM×阻害剤で、カルバペネマーゼを捕まえる！」

### メトロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 検出法

Ambler分類でclass B に分類

#### 1. SMA法



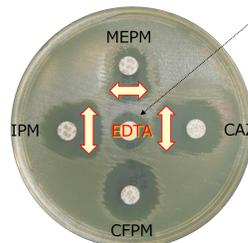
Disk間距離: 20-25mm

使用ディスク: メトロ-β-ラクタマーゼSMA'栄研'  
MEPM, IPM, CFPM, CAZの各ディスク

Arakawaらの2-mercaptopropionic acidを用いたIMP-1型 MBL産生株の検出法<sup>1)</sup>をもとに、安定で細菌に対し抑制の低い Sodium Mercaptoacetic Acid (SMA) を3mg含みディスク化したもの。活性中心にある亜鉛をキレートする。  
1) J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):40-3.

SMAと周囲のディスクの中心をつないだ軸方向に対し、**垂直方向**に5mm以上阻止帯が拡大した場合、MBL産生と判定する。

#### 2. EDTA法<sup>2)</sup>



Disk間距離: 20-25mm

ブランクディスクに 0.5M Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) を 10μL滴下 (1.5mg/diskに相当)。

培地中の亜鉛をキレートすることで、間接的にMBLの活性を低下させる。さらに、細菌の生育に不可欠な他の二価の金属イオンも同様に吸着除去するため、**ディスク周囲に発育阻止帯**が形成されてしまう。

EDTA自体による発育阻止に注意し、SMA同様、垂直方向の阻止帯の拡大を観察する。

2) Clin Microbiol Infect. 2001 Feb;7(2):88-91.

#### 3. カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

製造: MAST DIAGNOSTICS (内容は、カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus添付文書より抜粋)  
販売: 関東化学株式会社



5枚のディスク阻止円径の差により、  
・MBL産生株  
・KPC産生株  
・AmpC+外膜透過性変異株、  
・OXA-48産生株  
を鑑別可能

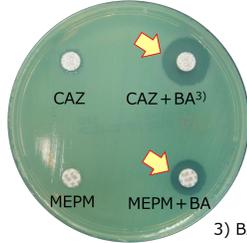
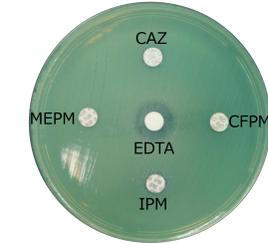
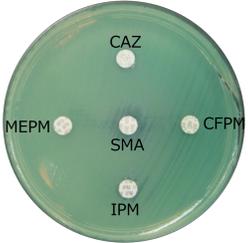
ディスク	含有薬剤
A	FRPM (10μg)
B	FRPM (10μg) + MBL阻害剤
C	FRPM (10μg) + KPC阻害剤
D	FRPM (10μg) + AmpC阻害剤
E	Temocillin (30μg) + MBL阻害剤

条件*	判定
b-a ≥ 5mm かつ  c-a  < 5mm および  d-a  < 5mm	MBL(+)
c-a ≥ 5mm かつ  b-a  < 5mm および  d-a  < 5mm	KPC(+)
e ≤ 10mm かつ a, b, c, dに阻止円径差なし	OXA-48(+)
b-a  < 4mm かつ c-a ≥ 5mm および d-a ≥ 5mm	AmpC(+) かつ porin loss
e > 10mm かつ a, b, c, dに阻止円径差なし (±2mm以内)	カルバペネマーゼ(-)

\* a, b, c, d, e: ディスクA, B, C, D, E各々の阻止円径

### KPC検出法

Ambler分類でclass A に分類



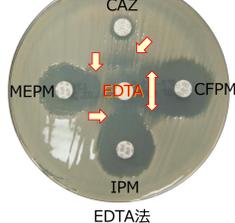
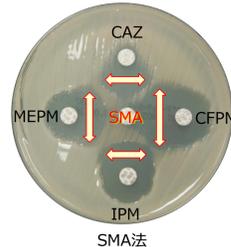
SMA, EDTAによる発育阻止帯の拡大: なし (class A β-ラクタマーゼであるため)

ボロン酸による発育阻害: **あり**

本来ボロン酸は、class C β-ラクタマーゼの阻害剤であるが、KPCは**例外的に**ボロン酸による阻害が認められる

3) BA:boronic acid (ボロン酸)

### IMP型 (IMP-1 *K. pneumoniae*)



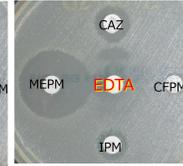
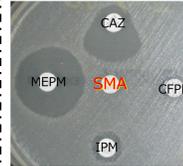
SMA: 4剤すべてに阻止帯の拡大あり  
EDTA: 阻止帯の拡大なし阻止帯の形成あり



カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

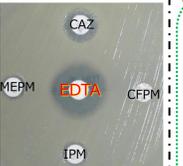
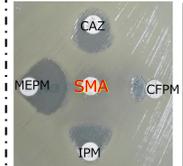
b-a=10  
|c-a|=1  
|d-a|=2  
↓  
MBL(+)

#### IMP-1型 *E. coli*



あきらかな阻止帯の拡大が認められるのはCAZのみ

#### IMP-2型 *Acinetobacter sp.*

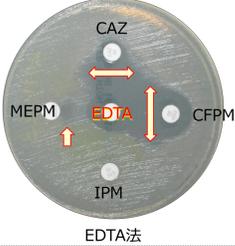
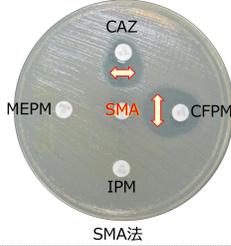


阻止帯の拡大あり 阻止帯の拡大なし

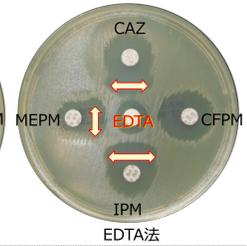
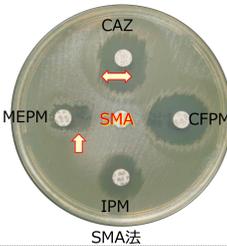
Point

- ほとんどのIMP型MBLは、SMA, EDTAで検出可能
- 株によっては、阻止帯がみられる薬剤に限られる
- IMP-2型はEDTAによる阻害がかかりにくい?

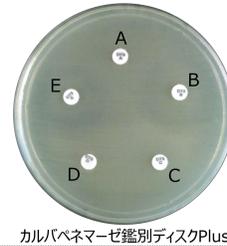
### VIM型 (*P. aeruginosa* ①)



### VIM型 (*P. aeruginosa* ②)



### VIM型 (*P. aeruginosa* ③)



カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

e=6mm  
a,b,c,d:阻止円径差なし  
↓  
OXA-48-like?

Point

- VIM型MBLの阻害効率: EDTA > SMA?
- カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusは元来、対象が腸内細菌であるため、被検菌種には注意!

\* *P. aeruginosa* ①~③は異なる患者由来株

### NDM型 (*E. coli*)



カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

Disk間距離: 15mmの場合

EDTAを20μL滴下した場合

阻止帯の拡大あり...?

EDTA自体の阻止円は大きくなるが、あきらかな阻止帯の拡大あり

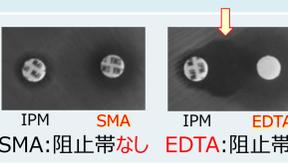
石井良和, 日本化学療法学会雑誌58 (6): 639-643, 2010

#### NDM-1型 *E. coli* (国内分離株)



SMAで発育阻止帯形成あり

#### NDM-1型 *K. pneumoniae* (海外分離株)



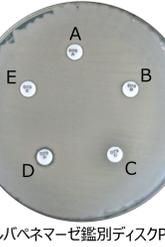
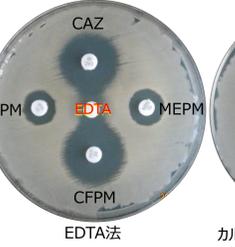
SMA:阻止帯なし EDTA:阻止帯あり

0.5M EDTA 20μL滴下

Point

- Disk間距離を短くしても、株によってはSMAで検出できない可能性あり
- EDTAで検出可能であると思われるが、ブランクディスクへの滴下量を工夫(通常は10μL, 20μLへの増量)することで、判定しやすくなる場合も考えられる

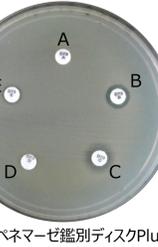
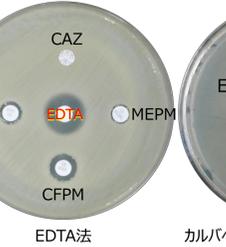
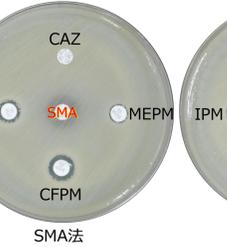
### OXA型 (OXA-48-like *K. pneumoniae*)



カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

e=6mm  
a,b,c,d:阻止円径差 ≤ 2mm  
↓  
OXA-48-like?

### OXA型 (OXA-23 *Acinetobacter sp.*)



カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus

e=6mm  
a,b,c,d:阻止円径差 ≤ 2mm  
↓  
OXA-48-like?

Point

- 腸内細菌目細菌, *Enterobacteriales* での検出報告が散見されるOXA-48-likeは、テモシリン高度耐性であり、カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlusで推定可能
- ただし、被検菌種には注意が必要!
- OXA-48-like以外のOXA型においても同様の結果となる場合があるため、型の同定には遺伝子検査が必要!

# Carbapenem Inactivation Method (CIM) と各種変法

## Check Point!

1: 「カルバペネマーゼ検出に有用な表現型試験！」

2: 「菌種、迅速性、遺伝子型などにより各法の使い分けが必要！」

カルバペネマーゼ産生菌の増加は本邦だけではなく世界中の問題となっており、未だ確実な検出法は確立されていない。Zwaluwらは2015年にカルバペネマーゼ検出法の一つとして Carbapenem Inactivation method (CIM) test を発表した。簡便かつ低コストで実施可能であり、優れた検査法であったが、菌種や遺伝子型によっては検出が困難な場合があった。CLSIは2017年にその感度を向上させた改良案としてM100-S27にてmodified CIM test (mCIM) を提案し、以後カルバペネマーゼ検出法として推奨している。しかしながら、適応できる菌種や感度特異度、迅速性などに課題があることから、世界各国より様々なCIM改良法が報告されているため、それらを紹介する。

**CIM (原法)** Van der Zwaluw K. et al., PLoS ONE 10.2015: e0.1253690-13.

精製水400μL+10μLループ1杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク添加 35°C, 2h

*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
インキュベートディスクを設置 35°C, 6h or 18h

Negative Control  
*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705  
Positive Control  
*K. pneumoniae* ATCC 3205

阻止円の有無にて判定  
(6hでも阻止円明瞭なら判定可能)  
阻止円あり : Positive  
阻止円なし : Negative

**mCIM (modified CIM)** ◆ CLSI推奨! 精製水の代わりにトリプチケースソイブロス(TSB)を使用することで感度を向上 (Acinetobacter属は非推奨) CLSI M100-S27

トリプチケースソイブロス2mL+*Enterobacteriaceae*  
1μLループ1杯の菌  
*Pseudomonas*  
10μLループ1杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク添加 35°C, 4h

*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
インキュベートディスクを設置 35°C, 18h

Negative  
Positive IMP-6

Satellite Colony (SC)  
阻止円内の発育に注意!  
ディスク周囲の狭い発育は無視!

阻止円直径にて判定  
6~15mm : Positive  
15~18mm+SC : Positive  
15~18mm : Indeterminate  
≥19mm : Negative

**CIMTris** ◆ 精製水に変わってトリス塩酸bufferを使用することでPseudomonas属、Acinetobacter属でも検出感度が良好 Uechi K et al., J Clin Microbiol 55. 2017. 3405-3410.

0.5M Tris-HCl buffer (PH7.6) 400μL+  
10μLループ1杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク添加 35°C, 2h

*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
インキュベートディスクを設置 35°C, 18h

Negative  
Positive IMP-1

阻止円直径にて判定  
6~15mm : Positive  
15~18mm+SC : Positive  
15~18mm : Indeterminate  
≥19mm : Negative

**CIMTris II** ◆ 改良法 (CIMTris II) にて感度特異度が上昇、対象菌種がEnterobacteriaceaeにも拡大 Uechi k et al., J Medical Microbiol 68. 2019. 124-131.

0.5M Tris-HCl buffer (PH7.6) 400μL+  
10μLループ1杯の菌 or  
5μLループ1杯の菌 10~15s 混和

MEPM5μgディスク添加 35°C, 1h

**SCIM (simple-CIM)** ◆ Imipenem (IPM) ディスクに直接菌コロニーを塗り付けて培養するため、前培養が不要 Jing X, et al., Frontiers in Microbiology 9. 2018

血液寒天培地に1~3日培養したコロニー1~3個分を  
IPMディスク裏面に塗り付ける

*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
コロニー塗布ディスクを設置 35°C, 18h

Negative  
Positive NDM-1

阻止円直径にて判定  
6~20mm : Positive  
21~22mm+SC : Positive  
21~22mm (non SC) : Indeterminate  
23~25mm : Indeterminate  
≥26mm : Negative

**rCIM (rapid CIM)** ◆ 約2.5時間で迅速な判定が可能 Muntean mm, et al., J Antimicrob Chemother 2018;73:900-908.

精製水1mL+10μLループ2杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク×2添加 35°C, 30min後、  
10,000rpm 5min遠心分離

TSB菌液2500μLにて  
*E. coli* ATCC 25922株  
菌液をMcF1濃度に調整  
上清500μLを  
菌液調整TSBに添加

35°C, 2h

比濁計を用いて濁度差にて測定菌の発育を測定

前後差  
A: 1.0→2.2⇒1.2...Positive  
B: 1.0→1.3⇒0.3...Negative

インキュベート前後の濁度差  
McF>0.5 : Positive  
McF≤0.5 : Negative

**zCIM** ◆ 亜鉛を加えることで活性の低いメタロβラクタマーゼ (MBL) を活性化し、MBLを高感度に検出 Baeza LL, et al., Clin Microbiol Infect. 2019;25(10):1286.

TSB400μLに濃度が  
0.3mMとなるよう硫酸亜鉛  
(ZnSO<sub>4</sub>) を添加  
10μLループ1杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク添加 35°C, 2h

*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
インキュベートディスクを設置 35°C, 18h

Negative  
Positive VIM-2

阻止円直径にて判定  
6~20mm : Positive  
>20mm : Negative

**Adjustment of mCIM condition** ◆ mCIMでの接種菌量などの条件を調整してAcinetobacter属を高感度で検出 Vu TN, et al., Ann Lab Med. 2020 Jan;40(1):21-26.

TSB400μL+10μLループ2杯の菌 10~15s 混和

MEPM10μgディスク添加 35°C, 4h

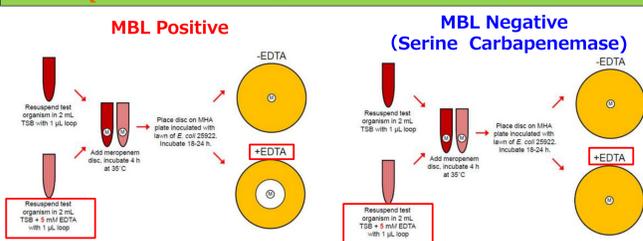
*E. coli* ATCC 25922株  
McF0.5菌液をMH培地に塗布  
インキュベートディスクを設置 35°C, 18h

Negative  
Positive OXA-23

阻止円直径にて判定  
6~15mm : Positive  
15~18mm+SC : Positive  
15~18mm : Indeterminate  
≥19mm : Negative

## MBL検出 (鑑別) を目的とするCIM変法

**eCIM (EDTA-mCIM)** CLSI M100-S28



◆ mCIMにクラスB阻害薬であるEDTAを添加することで阻害反応によるメタロ型とセリン型のカルバペネマーゼ鑑別が可能  
◆ 0.5M EDTA 20μLを添加  
◆ 5mm以上の阻止円拡大にて陽性と判定

**SMA-mCIM** Yamada K et al. J Microbiol Methods 2017;132:112-115.

A. 通常のmCIM  
TSB2mL  
MEPM10μgディスク  
35°C, 4h  
インキュベート

B. SMA-mCIM  
TSB2mL  
MEPM10μgディスク  
+SMAディスク  
35°C, 4h  
インキュベート

35°C, 18h

A. MEPM  
B. MEPM+SMA  
IMP-6

◆ mCIMにクラスB阻害薬であるSMAディスクを添加することで阻害反応によるメタロ型とセリン型のカルバペネマーゼ鑑別が可能  
◆ 5mm以上の阻止円拡大にて陽性と判定

## 結果の解釈方法 (CLSI M100-S29)

mCIM result	eCIM (SMA-mCIM) result	Report
陰性	判定不可	カルバペネマーゼ非産生株
陽性	陽性 (5mm以上の阻止円拡大)	メタロβラクタマーゼ産生株 (IMP, VIM, NDM etc.)
陽性	陰性	セリン型カルバペネマーゼ産生株 (KPC, GES, OXA-48 etc.)
判定保留	判定不可	他法による確認試験実施 またはディスクカッションで対応を検討

# 質量分析計を利用した薬剤耐性菌検査法について

奈良県立病院機構奈良県総合医療センター 臨床検査部 北川大輔  
公益財団法人天理よろづ相談所病院 臨床検査部 阿部教行

## Check Point!

1 : 「ESBL検出は抗菌薬インキュベーション法で捉える！」

2 : 「CPE検出も抗菌薬インキュベーション法で捉える！」

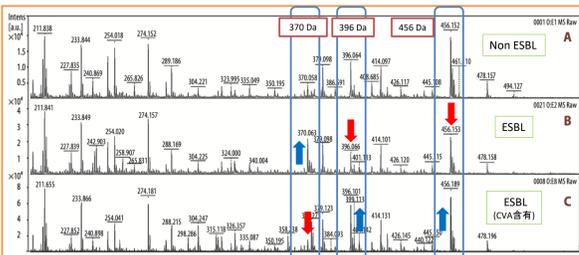
3 : 「質量分析計によるCPE検出キットは腸内細菌目細菌で高感度！」

### ESBLを抗菌薬インキュベーションによるスペクトルの変化で捉える手法

#### BiotyperによるESBLの鑑別

Bo Li et al. Medical Science Monitor Basic Research. 20;176-183, 2014

1μLループの細菌を0.5mg/mLのCTX溶液10μLに懸濁、15秒間ボルテックスし37°Cで3時間インキュベート後、12,000gで2分間遠心分離後の上清スペクトルを比較。ESBLの存在を確認するため、0.05mg/mLのCVAを別の並行試験で抗菌薬溶液に加え比較。

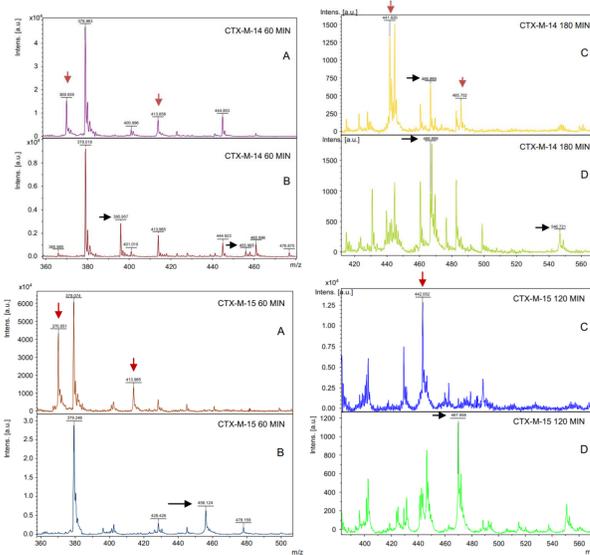


上から非ESBL産生株とのインキュベーション後のCTX、ESBL産生株とのインキュベーション後のCTXおよびESBL産生株とのインキュベーション後のCTXとCVAの質量スペクトル。質量範囲200~1500Daの正の線形イオンモードで質量スペクトルを取得。CTXのピーク(370±0.2m/z)、(396±0.2m/z)、(456±0.2m/z)を比較に使用。ESBLに由来するすべてのスペクトルは、CTXの分子ピーク減少(456Daおよび396Da)およびCTXの加水分解形態のピーク増加(370Da)からESBLを予測。検出精度：95%

#### BiotyperによるESBLの鑑別

M Oviaño et al. Clin Microbiol Infect.20 (11); 1146-57, 2014

CTX[456.5,396.5 Da]は加水分解により(414.5, 370.5 Da)のピークが産生される。CAZ (547.5, 468.5 Da)は加水分解により(486.5, 442.5 Da)のピークが産生される。菌液にCTXないしCTX+CVA、またはCAZないしCAZ+CVAを添加し、それぞれの特異ピークの出現からESBLを予測。



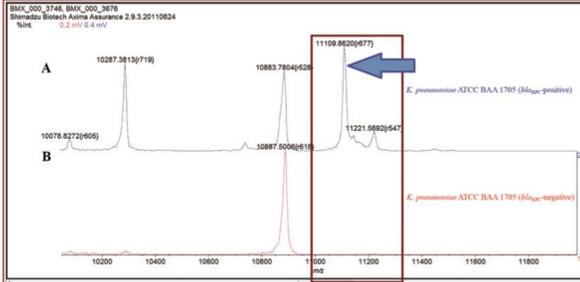
CTX (A), CTX+CVA(B), CAZ (C), CAZ+CVA(D)

### CPEを抗菌薬インキュベーションによるスペクトルの変化で捉える手法

#### VITEK MS PlusによるCPEの鑑別

Vanessa Gaia Rocco et al. Eurasian Journal of Medicine. 51(3); 209-213, 2019

(A) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (*bla*<sub>KPC</sub>陽性)  
(B) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 (*bla*<sub>KPC</sub>陰性)  
Vitek® MSターゲットスライドに塗布。ギ酸、マトリックス試薬を各1μL塗布、乾燥後測定。



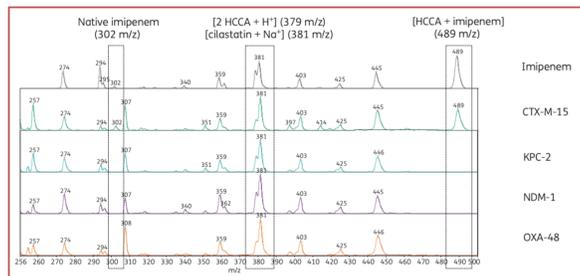
Vitek® MS RUOシステムを使用して、11,109 m/zを比較に使用。特異的ピークの出現からKPCを予測。矢印は、*K. pneumoniae* KPC陽性分離株で検出された11,109 m/zを示す。

Method	KPC isolates (n)	Presence of 11,109-Da peak (n)	Absence of 11,109-Da peak (n)	Mean relative peak intensity [Arb. unit (±SD)]	Sensitivity	Specificity
Direct deposition	210	201	9	0.20 ±0.10	95.7	100

#### VITEK MS PlusによるCPEの鑑別

Laurent Dortet et al. J Antimicrob Chemother. 73(9);2352-2359, 2018

10μLループの被験菌を0.5mg/mLのIPM溶液1mlに懸濁し15秒間ボルテックスし、35°Cで1~2時間インキュベートした後、12,000gで2分間遠心分離後の上清の測定スペクトルを比較。

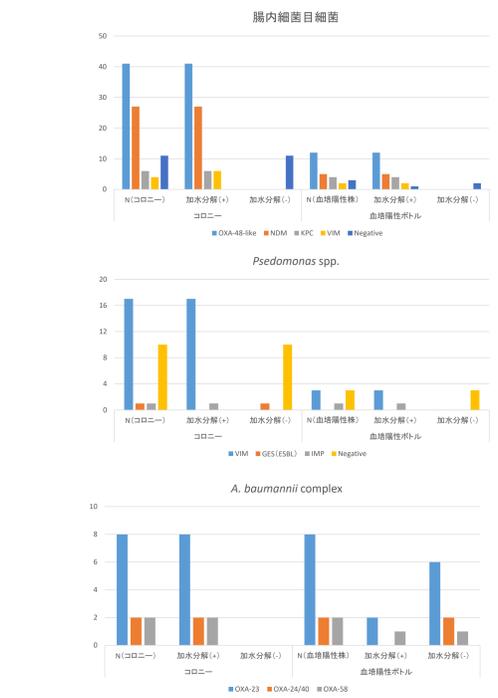


上からIPM溶液単独、CTX-M-15産生*E. coli*、KPC-2産生*E. coli*、NDM-1産生*E. coli*、OXA-48産生*E. coli*。150~650μm/zの正の線形イオンモードで実行、400μm/zでの最適なパルス抽出。マトリックス379μm/zの[2HCCA + H+]ピークを校正に使用。それぞれの特異ピークの出現の有無からCPEを予測。1時間のインキュベーション後にカルバペネマーゼを産生すると判断。感度：95%、特異度：100%

#### キットを利用したBiotyperによるCPEの鑑別

Anantharajah A, et al. Front Microbiol. 10; 1413, 2019

MBT STAR®-Carba IVD assayを利用したカルバペネマーゼ産生菌と非産生菌の鑑別

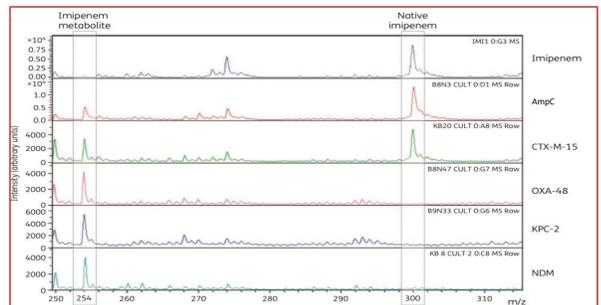


コロニーによる試験では、CPEは感度、特異度100%。

#### BiotyperによるCPEの鑑別

Laurent Dortet et al. J Antimicrob Chemother. 73(9);2352-2359, 2018

1μLループの被験菌を0.5mg/mLのIPM溶液20μLに懸濁後、37°Cで20分間インキュベートし、14,000gで1分間遠心分離後の上清の測定スペクトルを比較。



上からIPM単独、*E. cloacae*の染色体AmpC、CTX-M-15(ESBL)産生*E. coli*の過剰発現、OXA-48産生*E. coli*、KPC-2産生*E. coli*、NDM-1産生*E. coli*。100~1000 μDaの正の線形イオンモードで質量スペクトルを取得。IPMC12H17N3O4Sのピーク(300±0.2m/z)およびその代謝物C11H17N3O2S(254±0.1m/z)を手動でラベルし、その強度を記録。強度のMS比、代謝産物/(代謝産物+IPM) [M / (M + I)]を計算。0.8228でカットオフが確立され、この比率がカットオフ以上の場合、カルバペネマーゼ産生者として分類。感度：100%、特異度：100%

# シカジーニラス 遺伝子型検出キット ～キットの特徴～

京都府立医科大学附属病院 医療技術部臨床検査技術課 山田 幸司

谷野 洋子

京都第一赤十字病院 検査部 岩本 久美

## Check Point!

1: 「一度に様々なβ-ラクタマーゼ遺伝子型の検出ができる！」

2: 「結果はMIC値や表現型検査との組み合わせで総合的に判断しよう！」

3: 「菌名やMIC値から推測し、適切なキットを選択しよう！」

### 1. ここがおススメ！シカジーニラス遺伝子型検出キットを利用するメリット

- 数種類の遺伝子型を一度に検索することができるマルチプレックスPCR（表1）。  
→MIC値や表現型検査で推定できなかった遺伝子型も検出可能！
- 一般的な遺伝子検査機器で実施でき、PCRに必要な試薬、プライマー、ポジティブコントロールがキットになっている（図1）。  
→特別な装置を必要とせず、PCR初心者でも取り組みやすい！
- ESBL、AmpC、カルバペネマーゼはプロトコールが同じ！しかも、同一のPCR条件で実施可能！  
→複数の耐性遺伝子を保有している場合でも、主な遺伝子型が一度のPCRで検出できる！

図1 シカジーニラス遺伝子型検出キット

〈キット外観〉



左から  
ESBL遺伝子型検出キット2  
AmpC遺伝子型検出キット  
カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット2

〈キット内容〉



左から  
試薬A (Apta Taq DNA Master)  
試薬B (PCRサブメント)  
試薬C (プライマーミックスα)  
試薬D (プライマーミックスβ)  
試薬E (ポジティブコントロール)  
試薬F (ローディングバッファー)

〈キット以外の主な必要物品・試薬〉

電気泳動装置、サーマルサイクラー、ピペット、ピペットチップ、PCRチューブ、アガロースゲル、TAE緩衝液、100bp Ladder、染色液

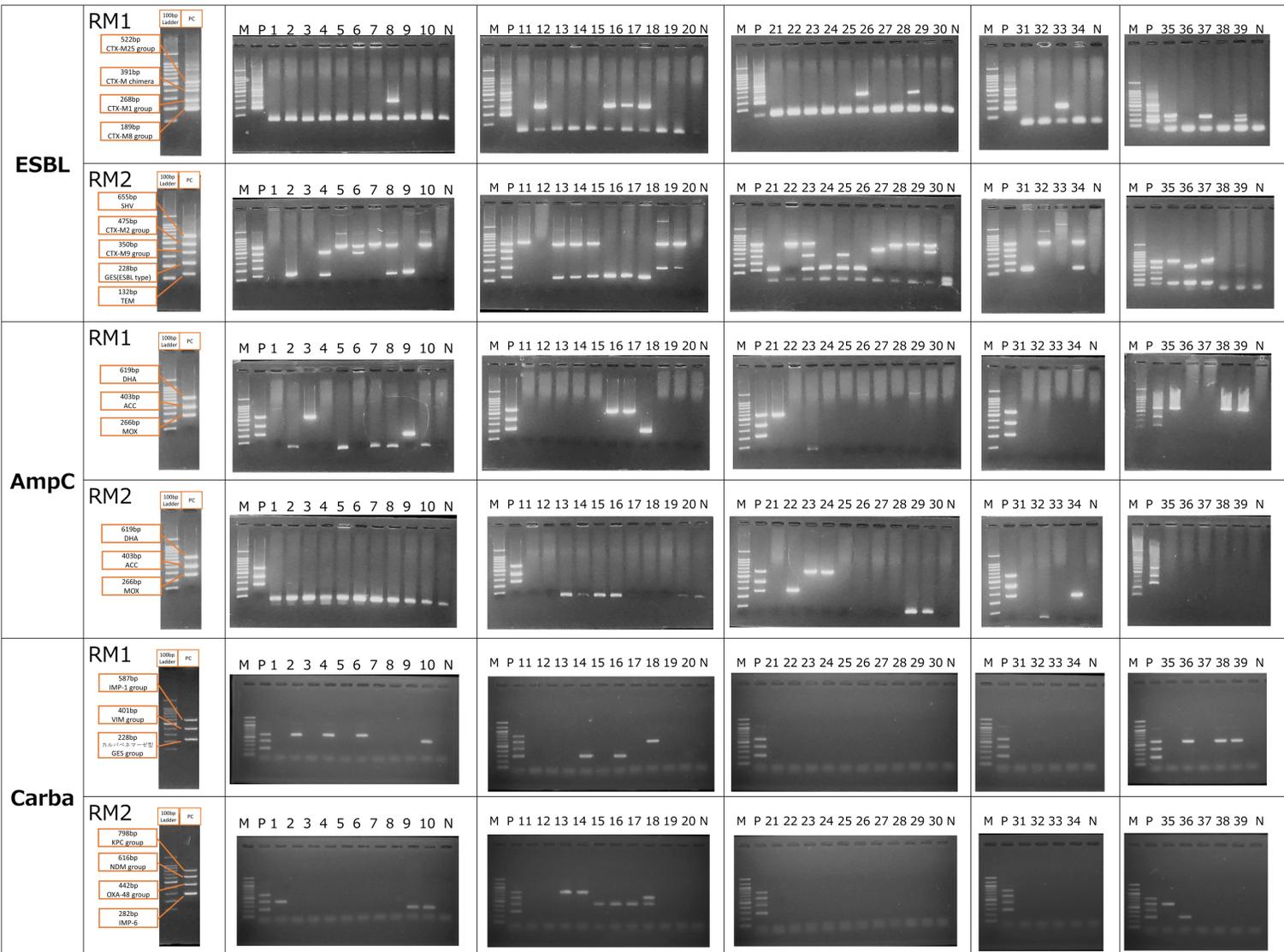
表1 遺伝子型一覧

	検出できる遺伝子型									
ESBL	CTX-M-1 group	CTX-M-2 group	CTX-M-8 group	CTX-M-9 group	CTX-M-25 group	CTX-M-1 chimera	ESBL型GES	TEM	SHV	
AmpC	CIT	FOX	ACT	DHA	ACC	MOX				
Carba	IMP-1 group	VIM group	KPC group	NDM group	OXA-48 group	カルバペネマーゼ型 GES group	IMP-6			

### 2. いろんな株をやってみよう！検査手順と電気泳動パターン

- 使用菌株 グラム陰性腸内細菌目細菌 39株（菌種および薬剤感受性検査結果は表3参照）

表2 電気泳動パターン



#### 複数の遺伝子型が検出された場合のポイント

- 今回の検査で、*K. pneumoniae*からSHVが高頻度で検出され（20/21株）、*C. freundii*のCITなど染色体性の遺伝子も検出された。
- SHVやTEMなど遺伝子型だけではESBL産生菌か否か判断できないものや、染色体性のAmpCなどもともと保有している遺伝子型も検出されることを理解しておく必要がある。  
→MIC値や表現型検査などの結果と合わせて総合的に判断しなくてはならない。  
→同定検査で菌種名を確実にし、遺伝子型を検査しなくてはならない。

#### 遺伝子型が検出されない場合のポイント

- キットで検出できない遺伝子型も存在する。  
→MIC値や表現型検査でβラクタマーゼ産生遺伝子の存在が疑われる場合はシーケンス解析も視野に入れる。
- 継代培養を繰り返すと耐性遺伝子が抜け落ちることがあり、正しい解析ができなくなる。  
→適切な方法で保存された菌株を使用しなくてはならない。

#### ① DNAの調整

※シカジーニラス DNA抽出試薬(関東化学)で抽出した場合

平板培養コロニーを滅菌水でMcF1~3程度になるよう懸濁したものを試料とする。

##### ➢ 試料の調整は正しく行えているか？

試料の調整法には、①ごく少量のコロニーを直接試薬に懸濁する方法や、②液体培養を菌液として用いる方法も存在するが、キットによっては調整法が指定されている場合がある。説明書に準拠して試料を調整する。  
ex)ESBL遺伝子型検出キット2およびカルバペネマーゼ遺伝子型検出キット2では①・②は推奨されていない。

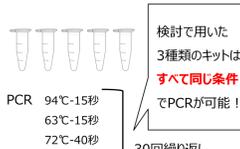


※抽出試薬のキットによってインキュベーションの条件が異なるため注意。  
この反応液の遠心後の上清をテンプレートDNAとする。  
※使用までは冷蔵保存！直ちに使用しない場合は冷凍する

##### ➢ 菌の保存状況は？

プラスミド上に存在する遺伝子は菌株の保存状況によっては、脱落してしまう可能性がある。そのため、保存菌株を用いる場合は、培養時に選択培地を用いることや菌側に抗菌薬による圧力をかけるなどのワンステップを加えることが必要であると考えられる。

#### ② PCR・電気泳動



##### ➢ DNAの濃度は適切か？

テンプレートDNAの濃度が高い場合は、正しい結果が得られない場合があるため、前述した試料濃度を含めて説明書に従って行わなければならない。  
ex)カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットでは、DNA高濃度によりESBL型GES遺伝子がカルバペネマーゼ型GES遺伝子、IMP-1がIMP-6として検出される可能性。

- 試薬は室温で融解後、穏やかに混和する。
- 調整したPCR産物は室温に放置しないように注意する。
- 凍結融解の繰り返しによる試薬劣化を防ぐため、小分けして保存しておくのもよい。

##### ➢ 泳動の緩衝液は適切か？

電気泳動像が乱れることから、泳動の際の緩衝液はTBEではなくTAEが本キットでは推奨されている。  
TBE : Tris-borate(ホウ酸) buffer  
TAE : Tris-acetate buffer

##### ➢ PCR産物のアプライは？

ゲルのウェルに空気が入っていないが、ウェルは完全に緩衝液に浸っているか確認する。これらが適切でなければ、泳動後のバンドが不鮮明になるため、注意が必要である。

##### ➢ 泳動距離(時間)は適切か？

泳動条件は、ミニゲル電気泳動装置の場合100V 30分間程度となっている。泳動時間が長くなると、サンプルを変性させ、わずかに非特異的なバンドが検出される可能性があるため注意が必要である。

# シカジーニース 遺伝子検出キット ～遺伝子型とMIC値～

## 3. 遺伝子型の結果とMIC値の関係を確認しよう！解析のポイント

表3 シカジーニース遺伝子検出キットによる遺伝子型とMIC値

NO.	菌種	シカジーニース 遺伝子型 キット 結果			微量液体希釈法によるMIC値 (栄研ドライブプレート使用)									
		ESBL	AmpC	Carba	CTX	CAZ	CPDX	CFPM	CMZ	AZT	MEPM	IPM	PIPC/TAZ	
1	<i>K. aerogenes</i>	-	-	-	1	2	>8	≤1	>64	≤1	≤0.06	0.5	8	
2	<i>P. rettgeri</i>	TEM	-	IMP-1	16	8	>8	8	>64	≤1	>4	>4	≤4	
3	<i>C. freundii</i>	-	CIT	-	2	2	8	≤1	>64	≤1	≤0.06	0.5	8	
4	<i>E. coli</i>	CTX-M-2 group+TEM	-	IMP-1+IMP-6	>16	>8	>8	>32	>64	32	>4	0.5	≤4	
5	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	-	-	≤0.5	>8	2	≤1	1	>32	≤0.06	0.25	≤4	
6	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+CTX-M-2 group	-	IMP-1+IMP-6	>16	8	>8	8	64	≤1	>4	0.5	≤4	
7	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	-	-	≤0.5	≤1	≤1	≤1	8	≤1	≤0.06	0.12	≤4	
8	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1 group+SHV+TEM	-	NDM	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
9	<i>E. cloacae</i>	TEM	ACT	-	1	≤1	8	≤1	32	≤1	≤0.06	≤0.06	16	
10	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	-	VIM	>16	>8	>8	8	16	>32	0.25	2	32	
11	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	VIM	>16	>8	>8	8	4	≤1	1	4	>128	
12	<i>S. maecescens</i>	CTX-M-1 group	-	-	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
13	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+TEM	-	KPC	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
14	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+TEM	-	KPC	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
15	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+TEM	-	OXA-48	≤0.5	≤1	≤1	≤1	2	≤1	2	4	>128	
16	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 group+TEM	CIT	OXA-48	>16	>8	>8	>32	32	>32	≤0.06	≤0.06	>128	
17	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 group+TEM	CIT	OXA-48	>16	>8	>8	>32	64	>32	0.12	1	>128	
18	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-1 group+TEM	ACT	NDM+OXA-48	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
19	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+GES	-	GES	>16	>8	4	≤1	>64	≤1	1	2	>128	
20	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+GES	-	GES	>16	4	≤1	≤1	32	≤1	0.5	1	128	
21	<i>K. pneumoniae</i>	TEM	CIT	-	16	>8	>8	≤1	64	16	≤0.06	0.5	>128	
22	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	MOX	-	16	8	>8	≤1	>64	4	≤0.06	0.5	≤4	
23	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+CTX-M-9 group+TEM	DHA	-	>16	>8	>8	8	32	32	≤0.06	0.25	16	
24	<i>E. coli</i>	TEM	DHA	-	1	4	>8	≤1	32	≤1	≤0.06	0.5	≤4	
25	<i>E. coli</i>	CTX-M-9 group+TEM	-	-	16	2	>8	8	1	4	≤0.06	0.12	≤4	
26	<i>E. coli</i>	CTX-M-1 group+TEM	-	-	>16	>8	>8	>32	1	32	≤0.06	0.25	≤4	
27	<i>E. coli</i>	CTX-M-2 group	-	-	>16	4	>8	32	8	32	≤0.06	0.12	≤4	
28	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	-	-	4	>8	8	≤1	1	32	≤0.06	0.12	≤4	
29	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1 group+SHV	-	-	>16	>8	>8	>32	2	>32	≤0.06	0.12	≤4	
30	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+CTX-M-2 group	-	-	16	≤1	>8	8	1	2	≤0.06	0.25	≤4	
31	<i>E. coli</i>	TEM	-	-	≤0.5	>8	≤1	≤1	≤0.5	≤1	≤0.06	0.12	≤4	
32	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	-	-	≤0.5	>8	2	≤1	1	32	≤0.06	0.25	≤4	
33	<i>E. coli</i>	CTX-M-8 group	-	-	16	≤1	>8	16	2	4	≤0.06	0.12	≤4	
34	<i>K. pneumoniae</i>	SHV+TEM	MOX	-	>16	>8	>8	≤1	>64	4	2	2	>128	
35	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1 group+CTX-M-8 group+SHV	CIT	NDM	>16	>8	>8	>32	>64	>32	>4	>4	>128	
36	<i>E. coli</i>	CTX-M-2 group	-	IMP-1+IMP-6	>16	>8	>8	>32	>64	32	>4	0.25	32	
37	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1 group+SHV	-	-	>16	>8	>8	>32	>64	>32	2	0.25	>128	
38	<i>C. freundii</i>	-	CIT	IMP-1	>16	>8	>8	32	>64	≤1	4	2	16	
39	<i>C. freundii</i>	CTX-M-1 group+CTX-M-8 group	CIT	IMP-1	>16	>8	>8	16	>64	≤1	4	2	8	

### ③検出・判定

▶ 染色性は均一か？  
1) あらかじめゲルに色素(ex:エチジウムブロマイド)を加える場合は、作成時にしっかりと混合しておく。  
2) 後染色の場合は、ゲルが十分に浸っているか確認し、緩やかに30分程度振とうさせる。

▶ 判定しているバンドの位置は適切か？  
菌株によっては複数の耐性遺伝子を保有している場合がある。ポジティブコントロールのバンド位置を確認し、判定を行うこと。  
▶ キットの特性は？  
検出できない型(亜型など)はあるか、非特異的なバンドが検出される可能性など、キットの特性を十分に理解したうえで使用する必要がある。また、遺伝子が検出されても、必ずしも抗菌薬に耐性を示さない場合があることを理解する。

▶ バンドは適切に泳動されているか？  
1) バンドが弓状になっている場合は、高電圧による影響が考えられる。高電圧化では、ゲル全体の温度が不均一になり、ゲルの端部と中央で泳動度が異なる場合がある。  
2) 泳動が不規則になっている場合は、ゲルと泳動バッファーが同じ緩衝液で調整されているか、ゲル作成の際の混和が不十分でなかったか(ゲル濃度不均一)、などを確認する。  
3) アプライ量が多すぎるまたは少なすぎる場合も不規則な泳動結果を招く可能性があるため注意する。

メモ 複数の遺伝子を保有する株に対して、キットの使用が有用であった例を示す。

ケース1: ESBL産生菌を検出  
表5: 薬剤感受性検査結果  
CAZ CPDX CTX MEPM  
>8 >8 >16 ≤0.06  
※栄研ドライブプレート使用(μg/mL)  
ESBL...  
CTX-M-1およびTEM1にバンド  
図3: 電気泳動結果

ケース2: カルバペナーゼ産生菌を検出  
表6: 薬剤感受性検査結果  
CAZ CPDX CTX MEPM  
>8 >8 >16 4  
※栄研ドライブプレート使用(μg/mL)  
カルバペナーゼ出している?  
IMP-1 CTX-M-1 CTX-M-8 CIT  
複数の遺伝子を保有していることが分かった!

### 番外編: アガロースゲルの作成

• 緩やかに混合して透明になるまで溶かす。  
• バンド確認だけなら細いコームでOK!  
• 平らな場所で静置する。  
• 気泡の混入は禁物! チップなどで取り除くこと。  
• ゲルが分厚くなるとバンドがぼやけたりバックグラウンドが高くなる可能性があるため注意!  
• ゲル濃度は分離能に影響を与えるため、推奨濃度を確認して作成する。(使用キットは2%)

### 「シカジーニース遺伝子検出キット」を上手く利用するためのポイント

キット化されている試薬を使用するデメリットとして、自施設で試薬やプライマーをそろえるよりもコストがかかることがあげられる(表4)。検査する菌株が多いとコストは割安となるが、日常業務で使用する状況では1~3株程度の検査がほとんどである。コストを抑えるためには、やみくもに検査するのではなくMIC値や表現型検査、菌種などから推測し、適切なキットを選択することも大切である。

## Take Home Message !

遺伝子型はあくまで補助的な役割であるが、薬剤感受性検査や表現型の検査と組み合わせることにより、より確実な検査結果報告ができるツールとなる。

上手く利用して、一歩先の検査結果報告を目指そう!

表4 1キットあたりの検体処理数別コスト

処理検体数	コスト
1検体	約4,000円
3検体	約6,700円
6検体	約10,700円
10検体	約16,000円
14検体	約18,700円

PC、NC分を含む

京都府立医科大学附属病院 医療技術部臨床検査技術課 山田 幸司  
谷野 洋子  
京都第一赤十字病院 検査部 岩本 久美

# 遺伝子検査は日常検査でこう活かせ！～in house PCRを中心に～

天理医療大学 医療学部 臨床検査学科 中村 彰宏

## Check Point!

1: 「PCR機器および試薬は常備必須！時代はゲノム時代！」

2: 「PCRは重症感染症例やアウトブレイク時に最大限に活用せよ！」

3: 「in house PCRも精度保証を意識せよ！」

### Point 1) PCR機器および試薬は常備必須！

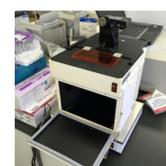
近年、臨床微生物検査においても遺伝子技術の進化が著しい。もはやPCR設備なしでは様々な入り組んだ薬剤耐性菌事情に対応できないものと思われる。しかし、現在国内の検査室では保険収載されている遺伝子機器（LAMP機器やGeneXpertなど）は設置されているものの、汎用性の高いconventional PCR機器はまだ導入されていない施設が多く見られる。現在ではPCR機器は低価格なもので20万円前後であり、1検体当たりのランニングコストも約50円とリーズナブルな検査になりつつある（図1）。適正な抗菌薬治療が実現できたときの費用対効果を考えると、本設備の導入は必須であろう。

【装置】

[ PCR装置 ] 18-100万円

[ 電気泳動装置 ] 4万円

[ ゲル撮影装置 ] 5-30万円

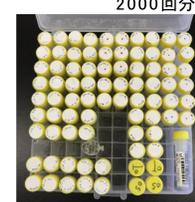


【試薬】・・・1 検体あたりの試薬代約50円

[ PCR酵素 ] 5000円 250回分

[ プライマー ] 1対 2500円 2000回分

[ DNA抽出 ] 30000円 1200回分



GoTaq Green Master

シカジーニアSDNA抽出試薬

図1. PCR検査実施に必要な装置と試薬

### Point 2) PCRは重症感染症例やアウトブレイク時に最大限に活用せよ！

感染症診療において迅速に薬剤感受性試験結果を報告することが、抗菌薬適正使用により貢献できることは既に周知のとおりである。しかし、薬剤感受性試験や表現型確認試験による薬剤耐性検出法はその検査結果が得られるのに1日を要するため、迅速性に欠けているのが現状である。一方、PCR法を用いた遺伝子検査は1-2時間で薬剤耐性遺伝子を検出することが可能であり、特に重症感染症例ではその威力を最大限に発揮することが可能である。図2および表1にグラム陰性桿菌が保有する主なプラスミド性βラクタマーゼ産生遺伝子検出のためのプライマー塩基配列、表2および3にその反応条件を示した。AmpCは表現型確認試験では染色体性かプラスミド性かの鑑別ができないため、アウトブレイク時は遺伝子検査が有用である。カルバペネマーゼは現行の表現型確認試験では検出感度の低いGES型やOXA型で特に有用である。また、無菌材料では検体から直接DNA抽出を実施し、これらmultiplex PCRを実施することで初期治療薬の選択に貢献可能である。しかし、後述するが血液混入検体など阻害物質が存在する場合は各種既存キットを用いたDNA抽出が必要となる。

また、遺伝子検査は、薬剤耐性遺伝子を検出するのみでなく、分子疫学的タイピング法を実施することも有用な情報を提供することが可能である。CLSI MM11-Aでは、菌株タイピング法は「アウトブレイク」や「サーベイランス調査」の時以外に「個々の患者内での感染エピソードの解明」のためにも実施すべきと記載されている。図3に発表者自身が経験した菌株タイピングが有用であった症例を掲載しているので、参照されたい。

①IMP-1 group : 587bp  
IMP1L 5'-CTACCGCAGCAGTCTTTG-3'  
IMP1R 5'-AACCAAGTTTTCCTTACAAT-3'

②IMP-2 group : 174bp  
IMP2L 5'-GTGTATGCTTCTTTAGC-3'  
IMP2R 5'-GAATCAGATGCGCTCAGTGT-3'

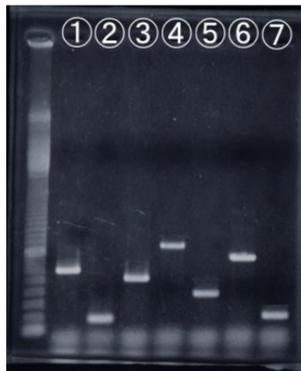
③VIM group : 510bp  
VIMB 5'-ATGGTGTGGTCCGATATC-3'  
VIMF 5'-TGGCCATTTCAGCCAGATC-3'

④KPC group : 893bp  
KPCF 5'-ATGTCACGTATCGCCGCTCT-3'  
KPCR 5'-TTTTTCAGAGCCTTACTGCC-3'

⑤GES group : 371bp  
GES-C 5'-GTTTTGCAATGTCTCAACG-3'  
GES-D 5'-TGCCATAGCAATAGGCGTAG-3'

⑥NDM group : 754bp  
NDM-1F 5'-CTGAGCAGCCGATTAGCC-3'  
NDM-1R 5'-GGGCCGTATGAGTGATG-3'

⑦OXA-48 : 177bp  
OXA-48F 5'-TGTTTTGGTGGCATCGAT-3'  
OXA-48R 5'-GTAAMRATGCTTGGTTCGC-3'



中村彰宏：臨床と微生物。39: 591-599. 2012. 改変

図2. プラスミド性カルバペネマーゼ産生遺伝子multiplex PCRに使用するプライマー

表2. 各種βラクタマーゼ産生遺伝子検出のためのPCR試薬組成 (共通)

試薬	17ツセイあたりの容量 (μL)	最終濃度
10×PCR buffer	2.5	1×
2mM dNTPs	2.5	0.2mM
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5mM
50μM 各種Forward プライマー	0.4	0.8μM
50μM 各種Reversed プライマー	0.4	0.8μM
※		
Taq polymerase (5U/μL)	0.2	1U/25μL
滅菌精製水	16.5 (※)	
反応液量	7.5	
+Template DNA	+1	
合計	25	

※プライマーの量によって滅菌精製水の量を増減させる

表1. グラム陰性桿菌が保有する主なプラスミド性βラクタマーゼ産生遺伝子検出のためのプライマー塩基配列

βラクタマーゼの種類	遺伝子	増幅産物 (bp)	プライマー名:塩基配列
[SHV+TEM Multiplex PCR]	ESBL	626	OS-1: 5'-TCGGGCGCGTAGGCATGAT-3' OS-2: 5'-AGCAGGGCGACATCCCGCG-3'
	TEM	504	OT-1: 5'-TTGGTGCAGAGTGGGTTA-3' OT-2: 5'-TAATTGTCGCGGAAGCTA-3'
	CTX-M1	706	MEN1A: 5'-AACCTGCCAATTAGAGCGGC-3' MEN1B: 5'-GGTTGAGGCTGGTGAAGTA-3'
[CTX-M Multiplex PCR]	CTX-M2	780	Toho1A: 5'-ACGCTACCCCTGCTATT-3' Toho1B: 5'-CCTTCCGCTTCTGCTC-3'
	CTX-M9	857	Toho2B: 5'-ATGATCTCGCCGCTGAAGCC-3' MOXMF: 5'-GCTGCTCAAGGACACAGGAT-3'
	CMY/MOX	520	MOXMR: 5'-CACATGACATAGGTGGTGC-3' CITMF: 5'-TGGCCAGAACTACAGCCAAA-3'
AmpC型βラクタマーゼ [6種類Multiplex PCR]	CMY/LAT	462	DHAMR: 5'-TTCCTGCAAGCTGGCTTTC-3' DHAMF: 5'-AACTTTCAGAGGTGGTGGGT-3'
	DHA	405	ACCMB: 5'-AACAGCTCAGCAGCGGTTA-3' ACCMB: 5'-TTGCGCCAATCATCCATGC-3'
	ACC	346	EBCMR: 5'-TCGGTAAAGCGATGTTGCGG-3' EBCMR: 5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'
ACT-1/MIR-1	ACT-1	302	FOXMR: 5'-AACATGGCGGATGAGGATG-3' FOXMR: 5'-CAAAGCCGCTAACCGGATTGG-3'
	FOX	190	

Anne HQ et al. Clinical Microbiology Reviews 2007; 20: 440-58.  
Nishio H et al. J Clin Microbiol 2004; 42: 5256-63.  
Pfeifer Y et al. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1998-2001.

表3. 各種βラクタマーゼ産生遺伝子検出のためのPCR増幅条件 (共通)

反応	温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
初期熱変性	96	420	1
熱変性	94	45	
アニーリング	58	45	30
伸長反応	72	45	
最終伸長反応	72	300	1

### Point 3) in house PCRも精度保証を意識せよ！

2017年の医療法改正において、臨床検査の精度保証 (quality assurance) が注目され、遺伝子検査においても、より高い品質が求められている。「精度保証」には、分析装置を含めた測定系の妥当性確認や試薬の管理、要員の教育や人材育成など、検査の品質に影響を及ぼす可能性がある全ての事柄が含まれる。したがって、操作が煩雑なin house PCRは特にそれを実施するにあたり、これらのことを常に意識しながら実施する必要がある。CLSI MM03 3rd editionおよびMM06-A2にはPCRを実施する際は常に干渉阻害物質 (血液成分や抗凝固剤など)、DNA汚染および交差反応を考慮するように記載されている。したがって、in house PCR実施時はヒトゲノムDNAや常在菌叢に交差反応を示さないことが証明されたプライマー (論文ベースで証明されたプライマーを使用するのが最も望ましい) を用い、陽性コントロール (カットオフ値付近のDNA量)、陰性コントロールを同時測定することが最低限求められる。

### ちょっとトピック) ナノポアシーケンサーへの期待！

近年、Nanopore社が開発した超小型次世代シーケンサーMinIONが臨床現場で臨床検体から直接起炎菌とその薬剤耐性因子を検出する事例が多く報告されている (補足資料)。MinIONは現在の次世代シーケンサーの中ではミスリードが多いのがデメリットであるが、その簡便性や経済性から今後、臨床現場で広く用いられる可能性の高いシーケンサーである。

【症例】70代、男性  
2007年、2008年、2009年の毎年秋頃に血液培養からE. coliが検出され、主治医からその由来が同一か問い合わせを受けた。⇒即日rep-PCRを実施し、2時間後に報告

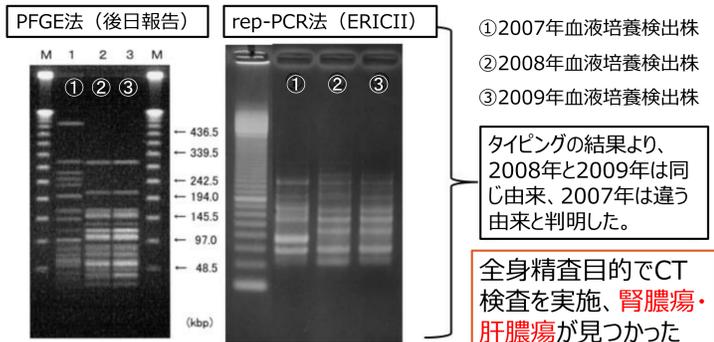
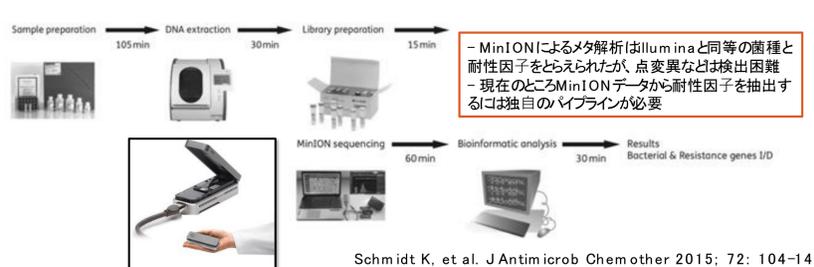


図3. 個々の患者において検出された菌株に対するタイピングが有用であった症例



補足資料) ナノポアシーケンサーを用いたメタ解析による臨床材料からの直接耐性因子同定

# 薬剤耐性菌コラム ～たっつんの独り言・・・～

京都橋大学 健康科学部 臨床検査学科 中村竜也

## 1 : 「ESBLって、プラスミド性だけなんかな・・・」

*E. coli*や*K. pneumoniae*のESBL産生はプラスミド性で、比較的わかりやすいですよ。第3世代セファロスポリン系薬が耐性でセファマイシン系薬が感性であればほぼ決まりではないでしょうか。これ以外の菌種でESBL産生かな？って思ったことはないですか？  
**ESBLとはBushの分類で“2be”に属するβラクタマーゼとされています。**表1に示しましたが、実は染色体に2beを持つ菌種があり、それらはプラスミド性ESBLと同様の薬剤感受性パターンを示します。それぞれに特徴があるので、文献等でチェックしてみてください！

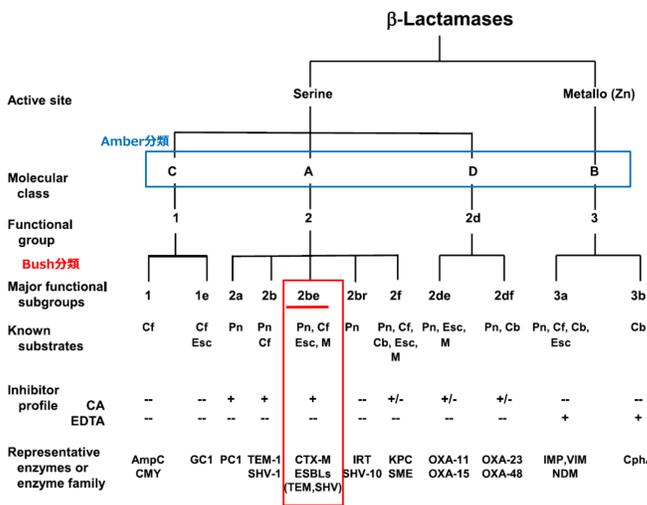


図1 β-ラクタマーゼの分類  
 Bushの分類で2beがESBLと考えられている

表1 ESBL (2be) に分類される染色体性classAβラクタマーゼ

Class A β-lactamase	Organism	Reference
FONA-1	<i>Serratia fonticola</i>	Biochim Biophys Acta 1341:58-70.
GRI-1	<i>Leminorella grimontii</i>	none
HugA	<i>Proteus penneri</i>	Antimicrob Agents Chemother 46:216-219.
K1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Antimicrob Agents Chemother 39:1211-1133.
KLUA-1	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Antimicrob Agents Chemother 46:3045-3049.
KLUC-1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Antimicrob Agents Chemother 45:3595-3598.
KLUG-1	<i>Kluyvera georgiana</i>	Antimicrob Agents Chemother 46:4038-4040.
OXY-1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Antimicrob Agents Chemother 40:454-459.
RAHN-1	<i>Rahnella aquatilis</i>	Antimicrob Agents Chemother 45:2965-2968.
RIC-1	<i>Leminorella richardii</i>	none
SED-1	<i>Citrobacter sedlakii</i>	Antimicrob Agents Chemother 45:2287-2298.
SFC-1	<i>Serratia fonticola</i>	Antimicrob Agents Chemother 48:2321-2324.
SMO-1	<i>Ewingella sp.</i>	J Antimicrob Chemother 68:1733-1736.

注意！) HugAとSED-1はCMZで誘導される

Antibiotics	MIC	判定
ABPC	>16	R
AMPC/CVA	>16	R
PIPC	>64	R
PIPC/TAZ	>64	R
CEZ	>16	R
CTM	>16	R
CTX	>4	R
CTRX	>4	R
CAZ	>4	S
CPR	>16	R
CMZ	<=4	S
FMOX	<=2	S
SBT/CPZ	>32	R
AZT	>8	R
IPM	<=0.5	S
MEPM	<=0.5	S

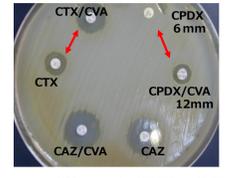


図2 Klebsiella pneumoniaeの薬剤感受性とESBL確認試験の結果

Antibiotics	MIC	判定
ABPC	>16	R
AMPC/CVA	>16	R
PIPC	>64	R
PIPC/TAZ	<=8	S
CEZ	>16	R
CTM	>16	R
CTX	>4	R
CTRX	>4	R
CAZ	8	I
CPR	>16	R
CMZ	<=4	S
FMOX	<=2	S
SBT/CPZ	>32	R
AZT	>8	R
IPM	<=0.5	S
MEPM	<=0.5	S

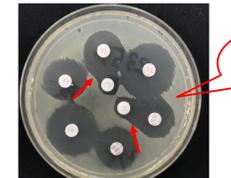


図3 Citrobacter sedlakiiの薬剤感受性とDDSTの結果

## 2 : 「ステルス型って、カルバペネム系薬は耐性化するんやろうか・・・」

ステルス型といわれるカルバペネマーゼ産生菌は、MICが低値であるため検出することが困難とされていますよね！現在、日本で分離される多くの株がIMP-6であり、このタイプはカルバペネム系薬に対して感性“S”と判定される株が存在します。

しかし、In vitroではありますが抗菌薬のプレッシャーにより耐性化する現象が確認されています。図1～3はステルス型 (MEPM 0.25μg/mL) IMP-6産生*E. coli*に対して、FRPMおよびMEPMのディスク阻止円内に発育した株を継代したのですが、徐々に耐性化しているのが確認できます。

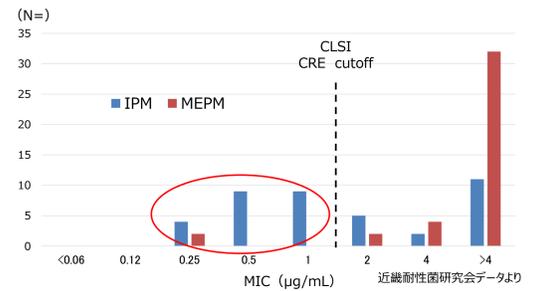


図4 近畿地区で検出されたCPEのIMPおよびMEPMのMIC分布

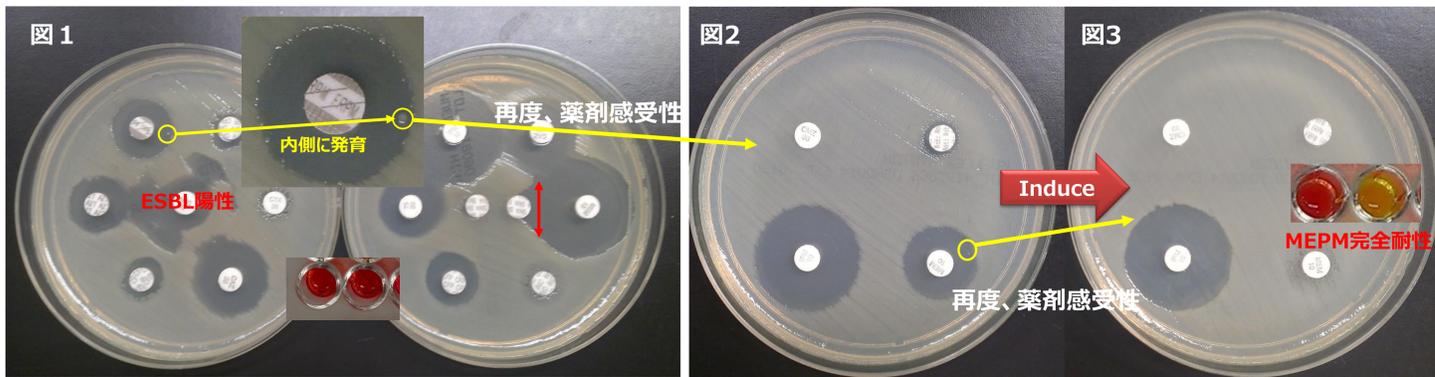


図1のFRPMの阻止円内に発育したコロニーを再度薬剤感受性を実施すると、MEPM ディスク阻止円の内側に微小コロニーが発育 (図2)。そのコロニーを再度薬剤感受性を実施、MEPMが耐性化しているのが確認できる。(図3) CarbaNP試験においても誘導前は陰性であったが誘導後は陽性となり、酵素の産生量が増加した。In vitroの現象ではあるが、MEPM使用によりIn vivoでもこのような現象が起こる可能性がある。

## 3 : 「OXA型って、うまくスクリーニングできるんやろうか・・・」

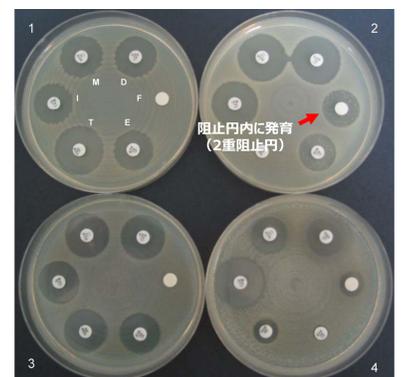
現在、問題となっているカルバペネマーゼは、Amber分類でClass A、B、Dが報告されていますが、検査室において検出が困難なタイプにOXA型がありますよね。OXAの遺伝子型は200以上報告されており、薬剤感受性もそれぞれで異なります。

**OXA型の特徴は、TAZ/PIPCが耐性化しますが、セファロスポリン系薬やカルバペネム系薬のMICは上昇しにくいとされています。**一方で、ESBL、AmpCの産生や外膜蛋白変異が加わることでカルバペネム系薬のMICが上昇します。

以下の5枚の写真はFRPMディスクによるCPEスクリーニングの結果を示しています。OXA型のカルバペネマーゼ産生では、阻止円の内側にコロニーが発育してくるのが特徴とされています。論文等でも同じ現象が報告されています。OXA型カルバペネマーゼ産生菌もFRPMで十分にスクリーニングすることが可能です！



図：OXA型βラクタマーゼ産生菌におけるFRPMディスクの阻止円  
 上段：遺伝子型 下段：MEPMのMIC



Susceptibility testing of Enterobacteriaceae against 10 μg meropenem (M), 10 μg doripenem (D), 10 μg faropenem (F), 10 μg ertapenem (E), 30 μg doripenem (T), and 10 μg imipenem (I). Plate 1, *E. coli* with NDM-1; plate 2, *E. coli* with OXA-48 (note colonies growing up to the faropenem disc); plate 3, *K. pneumoniae* with KPC-2; and plate 4, *K. pneumoniae* with CTX-M-15.

Kathryn M. Day et al. J. Clin. Microbiol. 2013; doi:10.1128/JCM.00720-13