

[原 著]

1 大学病院で4年間に分離されたIMP-19およびIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の薬剤感受性と分子疫学的解析

持丸朋美¹⁾・内田勇二郎²⁾・諸熊由子¹⁾・与賀田聡子¹⁾・清祐麻紀子¹⁾・藤瀬雅子¹⁾
筒井俊治¹⁾・江藤ふじ子¹⁾・下野信行³⁾・栢森裕三¹⁾・康 東天^{1, 2)}

¹⁾ 九州大学病院検査部

²⁾ 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学

³⁾ 九州大学大学院病態修復内科学

(平成21年7月28日受付, 平成21年11月20日受理)

当院では2004~2007年に分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生菌の67.6%を *Acinetobacter baumannii* が占めていた。そこで、当院における MBL 産生 *A. baumannii* の分子疫学的調査および、臨床背景などを調査した。その結果、当院で検出された49株の MBL 産生 *A. baumannii* のうち、43株 (87.8%) がIMP-19型、6株 (12.2%) がIMP-1型であった。薬剤感受性試験より、IMP-19型ではIPMのMIC₅₀がMEPMより高く、IMP-1型ではMEPMのMIC₅₀がIPMよりも高くなっていった。β-ラクタマーゼ阻害剤配合剤に関して、ABPC/SBTのMIC₅₀はIMP-19型では4μg/ml、IMP-1型では8μg/ml、CPZ/SBTのMIC₅₀はIMP-19型では2μg/ml、IMP-1型では4μg/mlとどちらのタイプも低いMIC値を示した。また、MBL産生 *A. baumannii* が感染する要因として、ステロイド使用中、抗真菌剤投与中、固形臓器移植、ICU入室のように重症疾患や免疫抑制状態の患者が多い傾向が認められた。遺伝子解析では19グループに分類され、院内感染も十分に考慮する必要があった。発生時の報告・管理の改善にて分離率が減少したことにより、耐性菌のコントロールには検査部と感染制御部との密な連携が重要であると考えられた。

Key words: メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生菌, *Acinetobacter baumannii*, IMP-1, IMP-19

序 文

Acinetobacter baumannii は環境中や病院内に生息しており、院内感染の原因菌としても重要視されており、なかには多くの抗菌薬に耐性を示し、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生菌などの耐性遺伝子をもつ株などが報告されている¹⁾。一般的に、MBLはAmblerの分類のクラスBに属し、従来、β-ラクタマーゼに比較的安定とされてきた第三・第四世代セフェム系抗菌薬やカルバペネム系抗菌薬も分解し、既存のβ-ラクタマーゼ阻害剤 (Sulbactam, Clavulanic acid) で活性が阻害されることはなく、ほとんどのβ-ラクタム系抗菌薬に対して耐性を示すため、確実に有効な抗菌薬は存

在しない。また、MBL遺伝子はプラスミド上に存在していることが多く、プラスミドを介して耐性遺伝子の菌種間の伝播も起こりうるため院内感染対策上、注意が必要である。MBL産生株は *A. baumannii* のほか、*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* などのさまざまな菌種で報告されているが、*P. aeruginosa* が最も多く報告されている^{2~4)}。ところが、当院では2004年からの約4年間において、MBL産生菌の67.6%を *A. baumannii* が占めていた。

そこで、当院における MBL 産生 *A. baumannii* の遺伝子疫学的調査および分離された患者の臨床背景を調査し、分離が増加している原因を検討した。

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡市東区馬出3-1-1

持丸朋美

TEL: 092-642-5757

FAX: 092-642-5755

E-mail: to-mochi@med.kyushu-u.ac.jp

対象と方法

1. 対象菌株

当院において 2004 年から 2007 年に検出された *A. baumannii* 935 株について、VITEK2 (シスメックス (株)) またはドライプレート '栄研' (栄研化学 (株)) による薬剤感受性試験を実施し、Ceftazidime (CAZ) 耐性 (MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$) または Imipenem (IPM) 耐性 (MIC $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) を示した菌株について Sodium mercaptoacetic acid (SMA) 法により、MBL 産生株と判定された 49 株を対象とした。

2. SMA 法を用いた MBL 産生性の確認

MacFarland 0.5 に調整した菌液をミューラーヒントン寒天培地に塗布し、CAZ ディスク (日本ベクトンデキソン) を 3 cm 以上離して 2 枚置いた。次に、一方の CAZ ディスクの中心から 1.5~2 cm 離して SMA ディスクを置いた。35°C 16~18 時間培養後、判定を行った。判定は CAZ 単剤の阻止円より、SMA に隣接した CAZ の阻止円が SMA と CAZ のディスクの中心をつないだ軸方向に対して垂直方向に 5 mm 以上の拡大を認めた場合を、MBL 産生菌と判定した。ただし、CAZ 単剤で阻止円が認められないときは 12 mm 以上の阻止円を形成した場合に MBL 産生菌と判定した⁵⁾。

3. PCR 法を用いた MBL 遺伝子の検出

PCR 法による MBL 遺伝子 (IMP-1 群, IMP-2 群, VIM-1 群, VIM-2 群) の検出は、柴田らのプライマーデザインおよび PCR 条件を用いて行った⁶⁾。遺伝子構造の決定のための PCR は Neuwirth らのプライマーデザインを用いて行った⁷⁾。

4. ダイレクトシーケンス法による MBL 遺伝子の解析

MBL 遺伝子の解析は、PCR 法で得られた MBL 遺伝子産物に対して ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンス法の操作マニュアルに従って行った。遺伝子の同定は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を使用した。

5. 薬剤感受性試験

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠した寒天平板希釈法を用いて薬剤感受性試験を実施した⁸⁾。使用薬剤の種類は次の 24 薬剤を用いた。Ampicillin (ABPC), Ampicillin/Sulbactam (ABPC/SBT), Piperacillin (PIPC), Piperacillin/Tazobactam fixed ratio (PIPC/TAZ-r), Piperacillin/Tazobactam fixed concentration (PIPC/TAZ-c),

Cefmetazole (CMZ), Cefoperazone (CPZ), Cefoperazone/Sulbactam (CPZ/SBT), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFPM), Imipenem (IPM), Panipenem (PAPM), Meropenem (MEPM), Biapenem (BIPM), Doripenem (DRPM), Aztreonam (AZT), Flomoxef (FMOX), Minocycline (MINO), Amikacin (AMK), Arbekacin (ABK), Ciprofloxacin (CPFX), Sulbactam (SBT), Tazobactam (TAZ), Clavulanic acid (CVA)。希釈系列の範囲は 0.125~512 $\mu\text{g/ml}$ で施行した。PIPC/TAZ に関しては CLSI に基づいて TAZ の濃度を 4 $\mu\text{g/ml}$ で一定にした方法 (PIPC/TAZ-c) と他の β -ラクタマーゼ阻害剤配合薬と同様に、 β -ラクタム剤と阻害剤の比率を一定にした段階希釈法 (PIPC/TAZ-r) の 2 通りの方法で行った。カテゴリー判定は CLSI に従い、感受性 (susceptible), 中等度耐性 (intermediate), 耐性 (resistant) に分類した。PAPM, BIPM, DRPM の判定は IPM, MEPM の基準に従った。

6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) の解析

PFGE はジーンパスグループ 1 試薬キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて取扱説明書に従い実施した。制限酵素 *Sma*I で処理後、パルスタイム 1.0~17.0 秒、泳動時間 18.5 時間、電圧 6.0 V/cm、泳動バッファー温度 14°C の泳動条件で行った。PFGE 装置はジーンパスシステム (Bio-Rad Laboratories) を用い、解析には Molecular Analyst software Fingerprinting DST (Bio-Rad Laboratories) を使用した。類似係数 90 以上を同一株と判定した。

7. MBL 産生菌分離患者の臨床背景

菌分離患者の年齢、性別、診療科、基礎疾患、移植歴、入院中の外科的処置の有無、菌分離までの入院日数、ICU 入室の有無、中心静脈カテーテル (CVC) や尿道カテーテルなどのデバイスの有無、菌分離前 14 日以内の投薬歴などについて調査した。なお、ここでの外科的処置の定義は手術施行の有無とした。*A. baumannii* による感染の有無の定義は文献 9 に従った。原則として感染の定義は、無菌材料から分離され、感染徴候を伴う場合とし、保菌の定義は感染徴候の認められない状態で分離された場合とした。無菌材料以外 (尿も含む) についても、無症候性のもは保菌とみなした。感染の危険因子の判定は χ^2 検定 (Yates の補正) を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

Table 1. Distribution of antibiotic susceptibilities for 43 metallo- β -lactamase IMP-19 producing *A. baumannii* isolates

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													No. (%) resistant
	≤ 0.125	0.3	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	$512 \leq$	
ABPC										3	<u>33</u>	4	3	
ABPC/SBT (2:1)					1	<u>24</u>	13		1	4				12%
PIPC								1	1	14	<u>13</u>	4	10	63%
PIPC/TAZ-r (4:1)							4	<u>30</u>	3	5	<u>1</u>			2%
PIPC/TAZ-c	7	1		2	1	4	<u>11</u>	4	5	1	<u>1</u>		6	16%
CMZ												<u>43</u>		
CPZ												2	<u>41</u>	
CPZ/SBT (1:1)				2	<u>22</u>	18	1							
CAZ												1	<u>42</u>	100%
CFPM									2	<u>31</u>	9	<u>1</u>		100%
IPM								<u>40</u>	3					100%
PAPM								<u>23</u>	18	2				100%
MEPM							<u>38</u>	<u>5</u>						12%
BIPM							<u>34</u>	9						21%
DRPM							<u>41</u>	2						5%
AZT							7	<u>32</u>	2	1			1	
FMOX												1	<u>42</u>	
MINO	<u>43</u>													0%
AMK				<u>28</u>	13		2							0%
ABK		14	<u>27</u>		2									0%
CPFX				<u>34</u>	5	4								9%
SBT					9	<u>32</u>	1				1			
TAZ						7	<u>29</u>	2	4	1				
CVA									<u>43</u>					

Gray bar, isolates resistant to individual antibiotics according to CLSI criteria, when available. The resistance breakpoints for panipenem, biapenem and doripenem were defined as an MIC $\geq 8\mu\text{g/ml}$. Under bar, MIC $_{50}$ values for the antibiotics of the isolates.

結 果

1. PCR法を用いたMBL遺伝子の検出結果

49株中43株(87.8%)でIMP-2群, 49株中6株(12.2%)でIMP-1群の遺伝子が検出された。VIM型は検出されなかった。ダイレクトシーケンスの結果, IMP-2群はすべて*A. baumannii* IMP-19 gene (AB184977)と100%一致した。IMP-1群はすべてIMP-1と同定された。

2. 薬剤感受性試験

MBL産生*A. baumannii* 49株のうちIMP-19型43株の各抗菌剤に対するMIC値の分布をTable 1に, IMP-1型6株のMIC値の分布をTable 2に示した。

IMP-19型ではIPMがMEPMやDRPMのMIC $_{50}$ より高く, IPMは $16\mu\text{g/ml}$ (耐性率100%), MEPMは $8\mu\text{g/ml}$ (耐性率12%), DRPMは $8\mu\text{g/ml}$ (耐性率5%)であるのに対し, IMP-1型ではIPMは $8\mu\text{g/ml}$ (耐性率50%), MEPMは $64\mu\text{g/ml}$ (耐性率100%), DRPMは $32\mu\text{g/ml}$ (耐性率100%)とIPMのMIC $_{50}$ が低くなり, 対照的な結果が得られた。

PAPMもMEPM, DRPMと同様にIMP-1でMIC $_{50}$ が高くなる傾向が認められた。一方, BIPMはIMP-19型では $8\mu\text{g/ml}$ (耐性率21%)であるのに対し, IMP-1型では $8\mu\text{g/ml}$ (耐性率0%)と他のカルバペネム系薬と異なり, MBLの型の違いによるMIC $_{50}$ の差が認められなかった。

カルバペネム系抗菌薬以外の薬剤については, CPFX MIC $_{50}$ に関しても, IMP-19型の株は $1\mu\text{g/ml}$ (耐性率9%), IMP-1型の株は $32\mu\text{g/ml}$ (耐性率83%)と差が認められた。

β -ラクタマーゼ阻害剤合剤に関しては, IMP-19のMIC $_{50}$ はABPC/SBTで $4\mu\text{g/ml}$ (耐性率12%), PIPC/TAZ-rは $16\mu\text{g/ml}$ (耐性率2%), CPZ/SBTは $2\mu\text{g/ml}$ であり, IMP-1のMIC $_{50}$ ではABPC/

Table 2. Distribution of antibiotic susceptibilities for 6 metallo- β -lactamase IMP-1 producing *A. baumannii* isolates

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													No. (%) resistant
	≤ 0.125	0.3	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	$512 \leq$	
ABPC											6			
ABPC/SBT (2:1)						2	4							
PIPC										2	2	1	1	
PIPC/TAZ-r (4:1)							1	2	2	1				
PIPC/TAZ-c		1			1			1	1	1			1	
CMZ													6	
CPZ													6	
CPZ/SBT (1:1)					2	3	1							
CAZ													6	
CFPM											5	1		
IPM							3	3						
PAPM								1	5					
MEPM								1	1	4				
BIPM						1	5							
DRPM								1	5					
AZT								1	5					
FMOX													6	
MINO	6													
AMK					1		1		4					
ABK			3	3										
CPFX				1					5					
SBT						2	4							
TAZ						1	2	3						
CVA										6				

Gray bar, isolates resistant to individual antibiotics according to CLSI criteria, when available. The resistance breakpoints for panipenem, biapenem and doripenem were defined as an MIC $\geq 8 \mu\text{g/ml}$. Under bar, MIC₅₀ values for the antibiotics of the isolates.

SBT は $8 \mu\text{g/ml}$ (耐性率 0%), PIPC/TAZ-r は $16 \mu\text{g/ml}$ (耐性率 0%), CPZ/SBT は $4 \mu\text{g/ml}$ と IMP-19, -1 とともに耐性率の低い傾向が認められた。また, β -ラクタマーゼ阻害剤単剤に関しても, IMP-19 では SBT の MIC₅₀ が $4 \mu\text{g/ml}$, TAZ は $8 \mu\text{g/ml}$, CVA は $32 \mu\text{g/ml}$, IMP-1 では SBT の MIC₅₀ が $8 \mu\text{g/ml}$, TAZ は $8 \mu\text{g/ml}$, CVA は $32 \mu\text{g/ml}$ と MBL の違いによる MIC₅₀ の明らかな差は認められず, SBT, TAZ, CVA の順に MIC₅₀ が低い傾向が認められた。一方, CLSI に準拠した PIPC/TAZ-c に関しては MIC 値の分布が ≤ 0.125 から $512 \leq \mu\text{g/ml}$ まで広く分散した結果が得られた。

3. PFGE の解析結果

19 グループ (A~S) に分類された (Fig. 1)。同じグループ内の分離株数の最大はグループ I の 9 株, 診療科の数は最大 7 診療科であった。同一グループ内の菌株が分離された期間はグループ O が最短で 17 日, グ

ループ I が最長で 832 日という結果が得られ, 2 年以上の間内科系, 外科系問わず多数の診療科において分離された株が存在していたことがわかった。

PFGE pattern 別の診療科別分離状況を Fig. 2 に示す。診療科は異なるが, 2005 年 8 月には group I が 3 株, 2005 年 11 月から 2006 年 1 月の間に group F が 5 株, 2006 年 5 月から 2006 年 7 月の間に group C が 4 株検出された。しかし, PFGE pattern は同じであるが, 検出時期が 2 年以上離れているものも認められた。IMP-1 型に関しては, 6 株中 3 株が外科 A, 2 株が救急系, 1 株が内科 C で検出されているが, 同時期の同一グループの検出はなかった。

4. MBL 産生菌分離患者の臨床背景

MBL 産生 *A. baumannii* が分離される材料で最も多かったのは呼吸器系材料 (40.8%), 次いで尿路系材料 (24.5%), 便 (24.5%), 胆汁 (16.3%), 膿 (14.3%) などであった (同一患者の複数部位からの検出菌を含

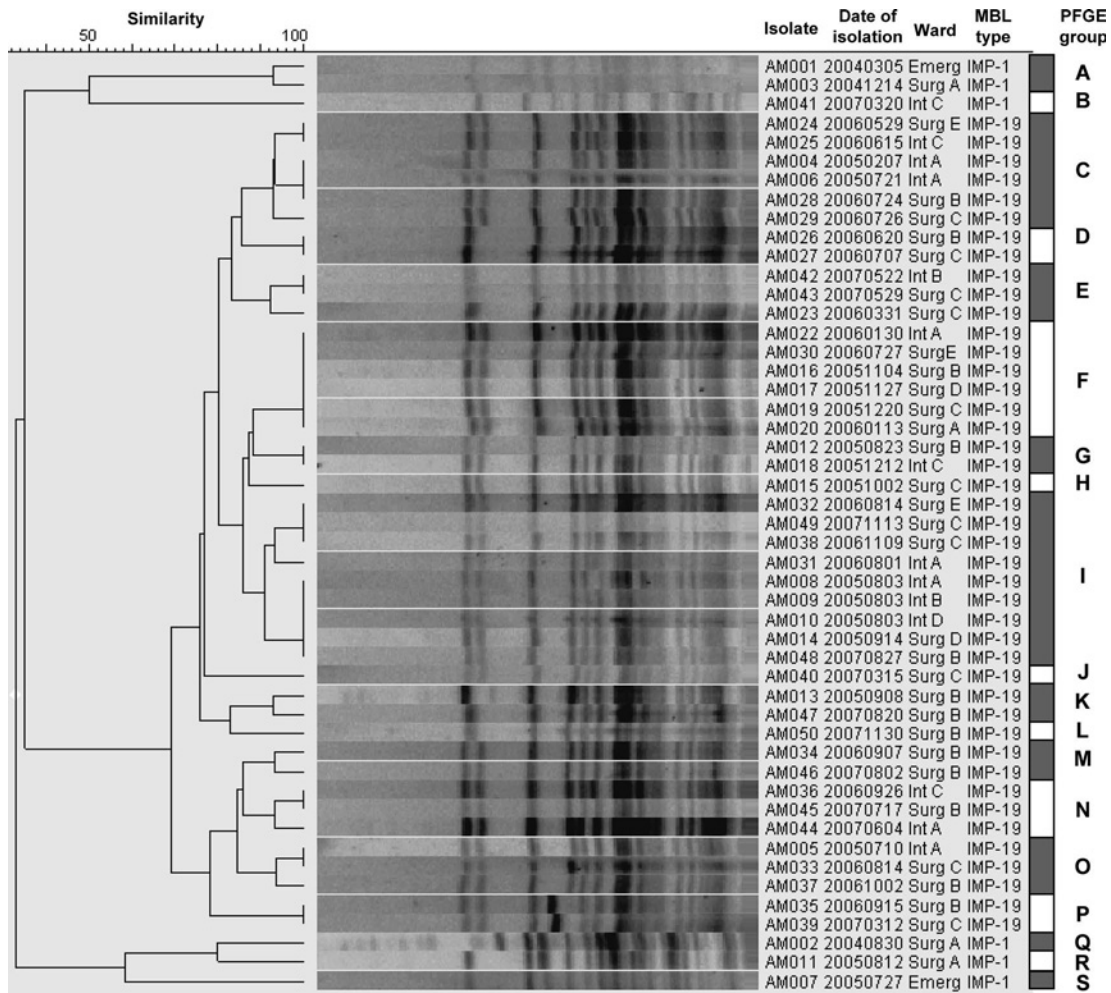


Fig. 1. PFGE analysis of 49 *A. baumannii* isolates (43 of IMP-19 and 6 of IMP-1) and 19 PFGE groups. Emerg, emergency medicine; Surg, surgery including pediatric surgery, orthopedics and dermatology; Int, internal medicine including pediatrics and radiology.

む)。臨床背景として男性 (69.4%)、外科系 (44.9%)、小児 (30.6%) などが分離率の高い傾向にあった (Table 3)。また、MBL 産生 *A. baumannii* 分離される因子として基礎疾患に消化管疾患 (肝臓以外) があること (44.9%)、入院中の外科的処置 (61.2%)、CVC 挿入 (42.9%)、菌分離前 14 日以内のカルバペネム系抗菌薬の投与 (59.2%)、グリコペプチド系抗菌薬の投与 (34.7%)、抗真菌薬使用中 (34.7%)、ステロイド使用中 (46.9%)、免疫抑制剤使用中 (30.6%) などがあった (Table 4)。この中で、MBL 産生 *A. baumannii* が感染症の起炎菌であったものは、49 症例中 8 例 (16.3%) であった。感染症の内訳は腹膜炎 4 例、敗血症 1 例、肺炎 2 例、皮膚感染 1 例であった。感染の因子として

有意差が認められたものは固形臓器の移植歴、ICU 入室歴、抗真菌剤投与中、ステロイド使用中が挙げられた (Table 4)。また、有意差は認められなかったが、感染の因子として保菌より割合が大きかったものに、基礎疾患に肝臓疾患があること、免疫抑制剤投与中、菌分離前 14 日以内にカルバペネム系抗菌薬の投与歴が認められた。

考 察

現在、MBL 産生グラム陰性桿菌の増加は世界的な問題である。その中で MBL 産生 *A. baumannii* が感染管理上、最も重要な菌の一つとして挙げられる¹⁰⁾。*A. baumannii* の MBL には IMP 型、VIM 型、SIM 型

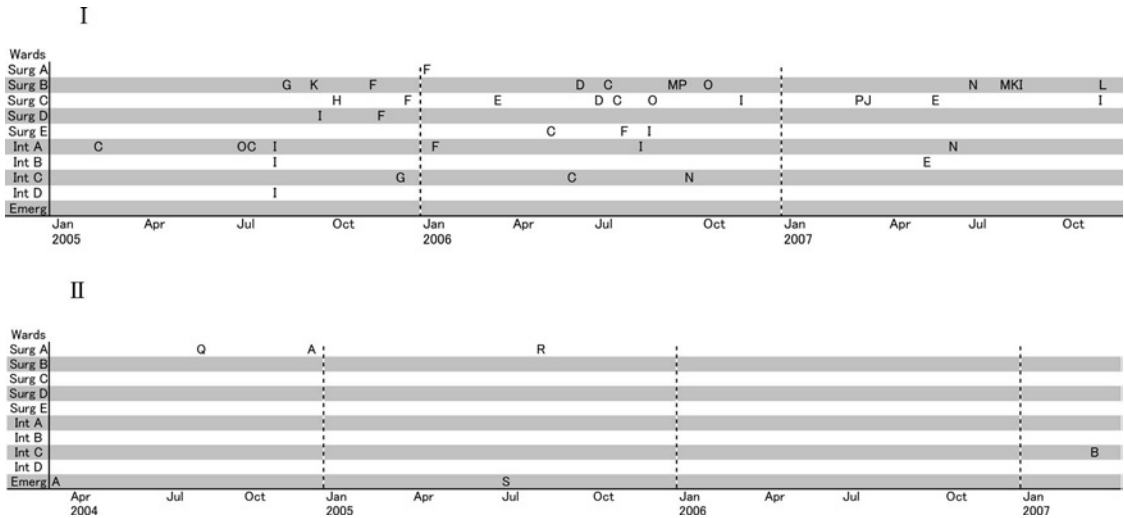


Fig. 2. Progression of metallo-β-lactamase producing *A. baumannii* (I, IMP-19; II, IMP-1) in the hospital. Letters (A to S) indicate pulsed-field gel electrophoresis groups of the isolates shown in Fig. 1.

Table 3. Background of 49 patients infected/colonized with MBL *A. baumannii*

Factors	Total (%)		Infected (%)		Colonized (%)	
No. of patients	49		8		41	
Age (mean) ±SD	42.5±32.51		40.4±33.0		42.9±32.8	
No. of males (%)	34	(69.4)	5	(62.5)	29	(70.7)
Wards						
surgery	22	(44.9)	4	(50.0)	18	(43.9)
internal medicine	10	(20.4)	2	(25.0)	8	(19.5)
pediatrics	15	(30.6)	2	(25.0)	13	(31.7)
emergency	2	(4.1)	0	0	2	(4.9)

などがあり¹¹⁾, その中の IMP 型は大別して IMP-1 群 (IMP-1, 6, 10 など) と IMP-2 群 (IMP-2, 8, 15 など) があるが日本では IMP-1 群の報告例が最も多い^{2, 4, 6, 11, 12)}。国内において IMP-2 群は IMP-1 群に比べ報告例は少ないが, 他の菌種に比べ *A. baumannii* における IMP-2 群の比率は比較的高い^{2, 6)}。IMP-19 産生菌の報告は非常に少なく分離率は不明であるが, 柴田らは *A. baumannii* IMP-2 群の株から IMP-19 の株をデータベース上に最初に報告している (Gen Bank AB184977)⁶⁾。国内の IMP-2 型の報告のほとんどは PCR までで, シークエンス解析まで行っていないため, 国内における *A. baumannii* の IMP-2 群の一部もしくは多くが IMP-19 である可能性がある。また, 今回報告した当院分離の IMP-19 産生 *A. baumannii* は PFGE 解析上, IMP-1 の群とは別の一つの大きな群を形成しているため, 同一起源の可能性が高い (類似係

数 69.3)。

PFGE による解析の結果, MBL 産生 *A. baumannii* 49 株は 19 グループに分類された (類似係数 90 以上)。同一のグループ内でも診療科が多岐にわたっており, 分離日が 2 年以上離れているものも認められた。また, 他の報告で, MBL の型は不明であるが国内における MBL 産生 *A. baumannii* 増加も指摘されているため, 地域の病院も含めた市中で IMP-19 産生 *A. baumannii* が広がっていることも考慮しなければならない¹³⁾。しかし, 分離日が数年にわたっている院内感染例の報告もあり^{14, 15)}, 本研究においても PFGE で同一グループの株が 2 年以上にわたっているものや, 短期間に複数の病棟で検出されたことから, 院内に存在する菌, または市中に存在している菌の持ち込みによる院内感染が起きていたことを十分考慮する必要がある。

Table 4. Risk factors for MBL *A. baumannii* infection

Risk factors	Total (%)		Infected (%)		Colonized (%)	
Underlying disease						
hematological	11	(22.4)	2	(25.0)	9	(22.0)
cardiovascular	9	(18.4)	1	(12.5)	8	(19.5)
respiratory	4	(8.2)	0	(0)	4	(9.8)
gastrointestinal without liver	22	(44.9)	2	(25.0)	20	(48.8)
liver	14	(28.6)	5	(62.5)	9	(22.0)
renal	5	(10.2)	1	(12.5)	4	(9.8)
urologic	2	(4.1)	0	(0)	2	(4.9)
cerebrovascular	2	(4.1)	0	(0)	2	(4.9)
malignancy	13	(26.5)	2	(25.0)	11	(26.8)
solid organ transplantation	10	(20.4)	5	(62.5)*	5	(12.2)
bone marrow transplantation	6	(12.2)	1	(12.5)	5	(12.2)
diabetes	8	(16.3)	1	(12.5)	7	(17.1)
Experience of						
surgical procedure	30	(61.2)	5	(62.5)	25	(61.0)
ICU	5	(10.2)	4	(50.0)*	1	(2.4)
bronchoscope	2	(4.1)	0	(0)	2	(4.9)
hemodialysis	1	(2.0)	1	(12.5)	0	(0)
Hospital stay until isolation (days)	63		41		67	
Use of						
mechanically ventilation	7	(14.3)	2	(25.0)	5	(12.2)
central venous catheter	21	(42.9)	5	(62.5)	16	(39.0)
urinary catheter	11	(22.4)	3	(37.5)	8	(19.5)
Administration of						
carbapenems	29	(59.2)	7	(87.5)	22	(53.7)
third-generation cephalosporins	5	(10.2)	1	(12.5)	4	(9.8)
fourth-generation cephalosporins	14	(28.6)	4	(50.0)	10	(24.4)
oxacephems	3	(6.1)	0	(0)	3	(7.3)
aminoglycosides	4	(8.2)	0	(0)	4	(9.8)
glycopeptides	17	(34.7)	4	(50.0)	13	(31.7)
ampicillin-sulbactam	1	(2.0)	1	(12.5)	0	(0)
cefoperazone-sulbactam	4	(8.2)	1	(12.5)	3	(7.3)
piperacillin-tazobactam	2	(4.1)	0	(0)	2	(4.9)
quinolones	12	(24.5)	3	(37.5)	9	(22.0)
trimethoprim-sulfamethoxazole	9	(18.4)	2	(25.0)	7	(17.1)
antifungal agent	17	(34.7)	6	(75.0)*	11	(26.8)
steroid	23	(46.9)	7	(87.5)*	16	(39.0)
immunosuppressant	15	(30.6)	5	(62.5)	10	(24.4)
WBC < 1,000 or <i>N</i> < 500	6	(12.2)	2	(25.0)	4	(9.8)

* $p < 0.05$ for the infected versus colonized patients

Table 5. Occurrence of patients infected or colonized with metallo- β -lactamase producing organisms in the hospital between 2004 and 2008

	No. (%) of isolates											
	2004		2005		2006		2007		2008		Total	
<i>A. baumannii</i>	3	(38)	16	(70)	19	(76)	11	(65)	2	(13)	51	(58)
<i>P. aeruginosa</i>	2	(25)	4	(17)	2	(8)	2	(12)	4	(27)	14	(16)
<i>P. putida</i>	2	(25)	3	(13)	4	(16)	3	(18)			12	(14)
<i>A. xylosoxidans</i>	1	(13)					1	(6)			2	(2)
<i>Acinetobacter</i> sp.									1	(7)	1	(1)
<i>K. oxytoca</i>									5	(33)	5	(6)
<i>K. pneumoniae</i>									1	(7)	1	(1)
<i>E. cloacae</i>									2	(13)	2	(2)
	8	(100)	23	(100)	25	(100)	17	(100)	15	(100)	88	(100)

MBL 産生 *A. baumannii* が分離される臨床背景として、外科系であること、呼吸器系材料、入院中の外科的処置、CVC 挿入患者、菌分離前 14 日以内にカルバペネム系抗菌薬またはグリコペプチド系抗菌薬の投与歴があること、抗真菌薬使用中、ステロイド使用中、免疫抑制剤使用中であることなど重症疾患や免疫抑制状態の患者が多かった。報告でも、カルバペネム耐性の *A. baumannii* が分離される要因として、菌分離前のカルバペネム系抗菌薬投与、ICU 入室、尿道カテーテル挿入、CVC 挿入、菌分離までの入院期間、経鼻胃チューブの装着、緊急外科的処置、気管内チューブの装着、など同様の因子が指摘されている¹⁶⁾。ICU 入室歴と気管内チューブの装着は、本研究ではそれぞれ 10.2%、14.3%と文献で指摘されているほど高くはなかった。

さらに、感染を引き起こす要因として固形臓器の移植歴、ICU 入室歴、抗真菌剤投薬中、ステロイド使用中などが有意差を認め、臓器移植も含めた重症疾患ではより嚴重な感染対策が必要と考えられた。MBL 陰性も含めた *A. baumannii* のリスク因子としては、菌分離時の ICU 入室、人工呼吸器の装着、外科的処置、分離 30 日以内に広域セファロスポリン系抗菌薬やフルオロキノロン系抗菌薬の投薬などが報告されている⁹⁾。本研究では、カルバペネム系抗菌薬の使用が MBL 産生 *A. baumannii* の分離には重要と考えられたが感染因子として有意差は認められなかった。

IMP-19 の薬剤感受性結果に関して IMP-1 とはカルバペネム系の薬剤に差が認められた。IMP 型と MIC 値との関連の報告は少ないが、IMP-19 産生 *Aeromonas* についても IPM よりも MEPM で低い MIC 値を示し^{7, 17)}、IMP-1 産生 *A. baumannii* では IPM よりも MEPM で高い MIC 値を示しているため、IMP-19 は

IPM の MIC 値が他のカルバペネム系抗菌薬の MIC 値より高くなる可能性も示唆された^{7, 17)}。

治療においてフルオロキノロン系薬剤は IMP-1、IMP-19 にかかわらず、感受性結果次第では使用可能と考えられるが、今回分離された IMP-1 産生菌では CPF_X が耐性率 83%と高く、 β -ラクタム系とフルオロキノロン系の 2 系統耐性となっていた。また、MBL 産生菌に使用する可能性のある AZT の MIC₅₀ は IMP-19 株で 16 μ g/ml、IMP-1 株で 32 μ g/ml と高かったため、治療に用いにくいことが考えられた。一方、 β -ラクタマーゼ阻害剤合剤は耐性率が低いため、治療への使用が期待できた。また、 β -ラクタマーゼ阻害剤単剤の MIC 値も低値であった。 β -ラクタマーゼ阻害剤 (特に SBT) が *A. baumannii* に抗菌活性があることは知られており、その作用機序の一つに penicillin binding protein との関与も指摘されている^{2, 18~20)}。したがって、CLSI 法に基づく TAZ の濃度を 4 μ g/ml と一定にした PIPC/TAZ の測定方法では TAZ の MIC₅₀ 付近に濃度が固定されているため、MIC 値の分布が ≤ 0.125 から $512 \leq \mu$ g/ml と広範囲になり、MIC 値のばらつきが大きくなる可能性があるため測定上問題があると考えられた。したがって、*A. baumannii* に対して測定する場合は PIPC と TAZ の比率を一定にするか、測定結果を出さないほうがよいと考えられた。

当院では 2004 年から 2007 年において検出された MBL 産生菌の半数以上を *A. baumannii* が占めていた。*P. aeruginosa*、*P. putida*、*A. xylosoxidans* に関しては年間 0~4 例と変動は認められなかった。また、2008 年には *Acinetobacter* sp. 1 例、*Klebsiella oxytoca* 5 例、*K. pneumoniae* 1 例、*Enterobacter cloacae* 2 例が検出された (Table 5)。2007 年以降、MBL 産生

菌の発生時の感染制御部への報告や分離部位に応じた感染対策を強化した。MBL産生 *A. baumannii* の分離株数および *A. baumannii* 全体に占める割合は2004年3株(1.4%)、2005年16株(8.1%)、2006年19株(7.5%)であったが、2007年11株(4.2%)、2008年2株(1.1%)と減少した。院内感染対策において、院内の実態を把握し医療従事者の感染に対する意識を高めることが必要であるが、そのためにも検査部と感染制御部との密な連携が重要と考えられた。

文 献

- 1) Dijkshoorn, L., A. Nemeč, H. Seifert. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939-951.
- 2) Nishio, H., M. Komatsu, N. Shibata, et al. 2004. Metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5256-5263.
- 3) Franklin, C., L. Liolios, A. Y. Peleg. 2006. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3139-3144.
- 4) Picao, R. C., S. S. Andrade, A. G. Nicoletti, et al. 2008. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2028-2037.
- 5) Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, et al. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38: 40-43.
- 6) Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5407-5413.
- 7) Neuwirth, C., E. Siebor, F. Robin, et al. 2007. First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 4486-4488.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard eighth edition. CLSI document M7-A8, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 9) Shelburne, S. A., 3rd, K. V. Singh, A. C. White, Jr., et al. 2008. Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. *J. Clin. Microbiol.* 46: 198-205.
- 10) Maltezou, H. C. 2009. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33: 405 e1-e7.
- 11) Poirel, L., P. Nordmann. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 826-836.
- 12) Lee, M. F., C. F. Peng, H. J. Hsu, et al. 2008. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32: 475-480.
- 13) 平瀧洋一, 柳原克紀, 松田淳一, 他. 2008. 長崎大学医学部・歯学部附属病院検査部におけるメタロ- β -ラクタマーゼの検出法と1991年から2005年の15年間におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の分離状況. *感染症学雑誌* 82: 285-291.
- 14) Corbella, X., A. Montero, M. Pujol, et al. 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4086-4095.
- 15) Wang, H., P. Guo, H. Sun, et al. 2007. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 4022-4028.
- 16) Baran, G., A. Erbay, H. Bodur, et al. 2008. Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Infect. Dis.* 12: 16-21.
- 17) Mushtaq, S., Y. Ge, D. M. Livermore. 2004. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with characterized β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 1313-1319.
- 18) Brauers, J., U. Frank, M. Kresken, et al. 2005. Activities of various β -lactams and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 24-30.
- 19) Corbella, X., J. Ariza, C. Ardanuy, et al. 1998. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 793-802.

- 20) Higgins, P. G., H. Wisplinghoff, D. Stefanik, et al. 2004. In vitro activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β -lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob. Agents. Chemother. 48: 1586–1592.

Susceptibility and Molecular Epidemiology of IMP-19 and IMP-1 Metallo- β -lactamase Producing *Acinetobacter baumannii* Isolated in a University Hospital during 4 Years

Tomomi Mochimaru,¹⁾ Yujiro Uchida,²⁾ Yuiko Morokuma,¹⁾ Satoko Yogata,¹⁾ Makiko Kiyosuke,¹⁾ Masako Fujise,¹⁾ Toshiharu Tsutsui,¹⁾ Fujiko Eto,¹⁾ Nobuyuki Shimono,³⁾ Yuzo Kayamori,¹⁾ Dongchon Kang^{1), 2)}

¹⁾ Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

²⁾ Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

³⁾ Faculty of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

The isolation ratio of MBL producing *Acinetobacter baumannii* was 67.6% among all MBL producing bacteria isolated in our hospital from 2004 to 2007, although the most popular MBL producing bacteria were *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. Therefore we studied on molecular epidemiology for the MBL producing *A. baumannii* and clinical characteristics of patients with the isolates. In 49 MBL producing *A. baumannii*, 43 (87.8%) of IMP-19 and 6 (12.2%) of IMP-1 were detected by PCR and DNA sequence analysis. Antimicrobial tests showed a MIC₅₀ value of Imipenem (IPM) for IMP-19 isolates was higher than Meropenem (MEPM), while the value of MEPM for IMP-1 isolates was higher than IPM. MIC₅₀ values of Ampicillin/Sulbactam for IMP-19 and IMP-1 were 4 μ g/ml and 8 μ g/ml, respectively, and the values of Cefoperazone/Sulbactam (CPZ/SBT) for IMP-19 and IMP-1 were 2 μ g/ml and 4 μ g/ml, respectively. Statistical analyses revealed that the risk factors for infections with MBL producing *A. baumannii* were associated with severe underlying diseases or immunosuppressive state with the administration of steroids or antifungals, the history of solid organ transplantation and the stay in ICU. Pulsed-field gel electrophoresis analysis demonstrated 19 groups among 49 isolates, which supposed to exist nosocomial infections in our hospital. The ratio of the MBL producing *A. baumannii* reduced after improvement of infection controls for patients with the isolates, which indicated that the coordination between a hospital laboratory and an infection control team were the most important for infection controls in a hospital.