

[原 著]

医療関連感染による伝播が疑われた TEM-132 型 ESBL 産生
Klebsiella pneumoniae について高橋真帆¹⁾・柴田尚宏²⁾・大屋貴美子¹⁾
堀水みさ子¹⁾・長井一彦³⁾・荒川宜親²⁾¹⁾ 勤労者医療協会下越病院 検査室²⁾ 国立感染症研究所細菌第二部³⁾ 勤労者医療協会下越病院 薬剤部

(平成 19 年 6 月 27 日受付, 平成 22 年 10 月 20 日受理)

2003 年 4 月から 2004 年 11 月に, 当院入院中の患者 95 名から ceftazidime (CAZ) 耐性 *Klebsiella pneumoniae* が検出され, このうち 21 株について耐性機序を確認するため PCR 法により基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子の確認と PCR 産物のシーケンス解析, パルスフィールド電気泳動 (PFGE) によるタイピング解析を行った。PCR 法およびシーケンス解析の結果, すべての菌株は *bla*_{TEM-132} を保有することが確認された。PFGE によるタイピングにより, 19 株が同じバンドパターンを示し, TEM-132 型 β -ラクタマーゼ産生 *K. pneumoniae* のアウトブレイクが疑われた。アウトブレイクに対して, 標準予防策に加えて接触感染予防策の強化と病院環境の衛生管理の改善を行うことにより, 新規保菌患者の発生が減少した。CAZ-耐性の *K. pneumoniae* が産生する ESBL の多くは SHV 型 β -ラクタマーゼであるが, 今回の事例ではこれまでに本邦では報告がない, TEM-132 型 β -ラクタマーゼであった。

Key words: TEM-132 型 ESBL 産生菌, *Klebsiella pneumoniae*, 院内感染, 陰部洗浄, 吸引痰

I. 序 文

Klebsiella pneumoniae や *Escherichia coli* 感染症に対して臨床しばしば用いられる抗菌薬の一つに, 第三世代セファロスポリンがある。近年, 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase: ESBL) を産生し, 第三世代セファロスポリンに対して耐性を示す *K. pneumoniae* や *E. coli* が臨床で蔓延しつつあり, アウトブレイク事例も報告されている^{1), 2)}。また ESBL 遺伝子は多くの場合, 伝達性プラスミド上に存在コードされており, 接合により同種の菌株のみならず菌種を超え伝播することが知られている³⁾。

セフォタキシムなどに耐性を獲得した *K. pneumoniae* は, 1983 年にヨーロッパで最初に報告されたが⁴⁾, これは, 後にいわゆる ESBL 産生菌であることが確認され, それ以降, 世界各地で, 同様な耐性株による院内感染の事例も報告されるようになった^{5), 6)}。

2003 年 4 月, 当院の入院患者から ceftazidime (CAZ) に耐性を示す *K. pneumoniae* が初めて分離され, その後, 同様の耐性パターンを示す *K. pneumoniae* が多数の患者から分離された。CAZ-耐性 *K. pneumoniae* の施設内伝播 (院内感染) が強く疑われたため, 保管されていた 25 株の CAZ-耐性 *K. pneumoniae* について, 耐性機序の解明とパルスフィールド電気泳動 (PFGE) によるタイピングを行い, その情報に基づいて, 院内感染対策を適正に実施し, 本耐性菌のさらなる蔓延防止に成功したので報告する。

II. 材料と方法

1. 対象菌株と薬剤感受性試験

2003 年 4 月から 2009 年 11 月に, 勤労者医療協下越病院 (全病床数 293 床, 内神経内科病棟, 療養型病

著者連絡先: (〒956-0831) 新潟県新潟市秋葉区中沢町 1-23

勤労者医療協会下越病院 検査室

高橋真帆

TEL: 0250-22-4711 (内線 306)

FAX: 0250-21-1032

E-mail: kaetsu_saikin@niigata-min.or.jp

表1. ESBL 産生株の薬剤感受性結果

薬剤名	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC 90
Ampicillin	>32	>32
Piperacillin	>128	>128
Cefazolin	4	8
Cefotiam	≤ 1	≤ 1
Ceftazidime	>64	>64
Aztreonam	>32	>32
Latamoxef	≤ 8	≤ 8
Imipenem	≤ 0.12	0.25
Gentamicin	≤ 2	≤ 2
Minocycline	≤ 4	4
Fosfomycin	>64	64
Tosufloxacin	≤ 0.25	0.5

棟 92 床含む) に入院患者から分離された *K. pneumoniae*, 計 378 株 (同一患者から分離された複数の菌株を含む) を対象とした。これらの菌種の同定には, BBL CRYSTAL E/NF 同定検査試薬 (日本ベクトンディッキンソン) を使用した。対象菌株は血液寒天培地 (5% Sheep Blood Agar, 日本ベクトンディッキンソン) で一晩培養し, 培地上のコロニーを 1 ml のハートインフュージョン (HI) プロスにマックファランド (McFarland) No. 0.5 になるように調整した菌液を作製し, セプターシステム Gram-negative プロス (日本ベクトンディッキンソン) に 10 μl 接種した。接種プロスをセプターテストパネルグラム陰性菌 MICS5-4 (日本ベクトンディッキンソン) の各ウエルに 10 μl ずつ接種し, 35°C にて 18 時間培養を行った。薬剤感受性試験で使用した抗菌薬は, ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), latamoxef (LMOX), CAZ, aztreonam (AZT), imipenem (IPM), gentamicin (GM), minocycline (MINO), fosfomycin (FOM), tosufloxacin (TFLX) の 12 薬剤であり, 測定結果は (CLSI) の基準に準じて判定した (表 1)。

2. ESBL 産生株のスクリーニング

ESBL 産生株のスクリーニングには ESBL Confirmation Panel (シーメンスヘルスケア, ダイアグノステイクス) を使用し, CLSI の基準である「CAZ および CTX 抗菌薬単独で測定した場合と比べ, 抗菌薬とクラブラン酸 (CVA) との併用で測定した場合いずれも MIC が 3 管差以上減少した場合 ESBL とする」に準じ, さらに Double disk diffusion test, 「ダブルディスク拡散法」を用いて最終判定を行った。

3. ESBL 遺伝子の PCR およびシーケンス解析

2003 年 4 月から 2004 年 11 月の間に 5 階病棟に

入院中の患者から分離された菌株のうち細菌検査室に保存されていた合計 25 株 (重複例含む 21 名, 尿 14 株, 喀痰 9 株, 膿 2 株) について PCR 法によって ESBL 遺伝子保有の有無を調べた。PCR プライマーおよび反応条件は Shibata らの方法⁷⁾などにより行った。さらに TEM-型 β -ラクタマーゼ遺伝子のシーケンス解析には, TEM-型 β -ラクタマーゼ遺伝子の上流と, TEM-型 β -ラクタマーゼ遺伝子の末端の配列を用いたシーケンス解析用プライマー (TEM-SQ-F: 5'-ATAAAAATTCTTGAAGACGAAA-3', TEM-SQ-R: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3') を用いて PCR 増幅し, この遺伝子産物を鋳型として, PCR およびシーケンス用プライマーを用いて, ダイレクトシーケンス解析を行った。

4. パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 解析

菌から抽出した DNA を制限酵素 *Xba*I を用いて切断し, それぞれ PFGE 装置 (Gene Pulser: 日本バイオラッド社) で, 泳動を行った。泳動条件はパルスタイム 12.6~40.1 秒, 電圧 6 V/cm, 14°C, 泳動時間 24 時間で行った⁵⁾。PFGE の泳動パターンの分析と判定は Tenover らの基準を参考にした⁸⁾。

5. 患者背景調査

ESBL 産生株と判定され, PCR, PFGE 解析を行った 25 菌株 (重複例含む 21 名) について, 初回分離病棟, 検出患者の病棟間の移動の有無, 分離の時期, 分離された検査材料, 患者の基礎疾患の有無, 抗菌薬使用の有無, 尿道カテーテル留置の有無, 喀痰の吸引行為の有無などの臨床的背景を調査した。

III. 結 果

1. 菌株の同定結果

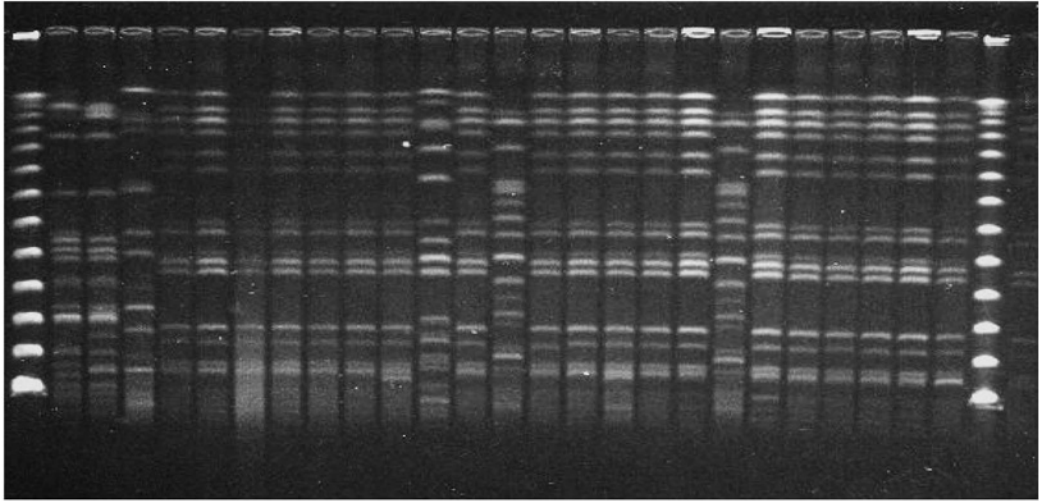
BBL CRYSTAL E/NF 同定検査試薬 (日本ベクトンディッキンソン) の同定結果は, すべて *K. pneumoniae* と判定された。

2. 薬剤感受性試験および ESBL 産生株のスクリーニング

ESBL 産生が疑われる *K. pneumoniae* に対する各薬剤の MIC は, CAZ 64 $\mu\text{g/ml}$ 以上, および AZT 32 $\mu\text{g/ml}$ 以上, PIPC 128 $\mu\text{g/ml}$ 以上, IPM 0.12 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった (表 1)。この薬剤感受性パターンを示す *K. pneumoniae* は 2003 年 4 月から 2004 年 12 月までに分離された *K. pneumoniae* 378 株中, 98 株であった。5 階病棟入院中の患者から分離され保存されていた 25 株は, 上記の薬剤感受性パターンを示し, CLSI の基準を満たしていた。ダブルディスク法の結果, cefotaxime と比較して CAZ により高い耐性を

<菌株 NO>

マーカー 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 ⑬ 14 15 16 17 18 ⑱ 20 21 22 23 24 25 マーカー



パターン別

P1 → P2, P3 → → → → → → → → P4, P3, P5, P3 → → → → → → → → P5, P3 → → → → → → → →

図1. *K. pneumoniae* パルスフィールドゲル解析結果

示し、かつクラブラン酸による阻止円の拡大が認められたことから、CTX-M-型ではなく、TEM-型またはSHV-型β-ラクタマーゼの産生が示唆された。

3. PCR およびシーケンス解析による ESBL 遺伝子検索結果

25 株について PCR 法により ESBL 遺伝子の検出を行った結果、すべての株において TEM-型遺伝子が陽性であった。さらにシーケンス解析を行った結果、すべて *bla*_{TEM-132} 保有株であることが確認された。

4. PFGE 解析結果

PFGE は 25 株について行った。図 1 に示したように、泳動パターンから遺伝子型は P1~P5 に分類された。

2003 年 4 月~9 月にかけて、5 階病棟で検出された #1 から #3 の 3 株は、3 株とも異なった DNA パターンを示した。しかし、翌年の 2004 年 2 月に同じ 5 階病棟から検出された #4 の菌株が初発とし、#4 から #10、#12、#14 から #18、#20 から #25 まで、合計 19 菌株が同一の DNA パターン (P3) であることが明らかにされた。

これら P3 パターンの菌株が検出された病棟を追跡すると、表 2 に示すように、5 階病棟に始まり、その

後、2 階病棟と 6 階病棟からも検出されていた。

なお、6 階病棟で検出された図 1 中の #13、と #19 の 2 株は同一の P5 パターンを示していたが、このタイプは 5 階病棟、あるいは 2 階病棟由来株中には認めなかった。

5. 患者背景調査結果

TEM-132 産生株の初回検出時病棟は 5 階病棟 15 名 (71.4%)、2 階病棟 4 名 (19.1%)、6 階病棟 2 名 (9.5%) であり、5 階病棟が全体の約 70% を占めた。材料は尿からの検出が 14 株 (56%)、喀痰からの検出が 9 株 (36%) であった。

年齢は平均 80.6 歳、基礎疾患を見ると脳梗塞をはじめとする神経内科疾患が 15 名で約 70% を占めた。入院期間は 12 年から 2 カ月で、1 年以上入院していたのは 21 名中 9 名 (42.9%)、6 カ月から 1 年が 10 名 (47.6%)、6 カ月未満は 2 名であり、6 カ月以上の長期入院が 90% を占めた。抗菌薬投与歴は院内で使用順位の高い CTM 使用者が 4 名、CAZ 使用者が 8 名、CTM、CAZ 両方の使用者が 4 名に見られた。

尿道カテーテル留置の有無を調査した結果、使用がなかったのは 21 名中 1 名だけであった。また 5 階病棟、2 階病棟での尿からの TEM-132 産生株の検出が

表 2

レーン	検出病棟	由来	検体提出日	PFGE 型
1	5 階病棟	患者 A 尿	2003 年 4 月 11 日	P1
2	5 階病棟	患者 B 尿	2003 年 5 月 22 日	P2
3	5 階病棟	患者 C 尿	2003 年 9 月 18 日	P3
4	5 階病棟	患者 D 尿	2004 年 2 月 4 日	P3
5	5 階病棟	患者 E 喀痰	2004 年 4 月 2 日	P3
6	5 階病棟	患者 F 喀痰	2004 年 5 月 7 日	P3
7	5 階病棟	患者 G 尿	2004 年 6 月 28 日	P3
8	5 階病棟	患者 H 喀痰	2004 年 7 月 12 日	P3
9	5 階病棟	患者 H 尿	2004 年 7 月 12 日	P3
10	5 階病棟	患者 I 喀痰	2004 年 5 月 17 日	P3
11	2 階病棟	患者 J 尿	2004 年 7 月 5 日	P4
12	5 階病棟	患者 K 喀痰	2004 年 7 月 17 日	P3
13	6 階病棟	患者 L 喀痰	2007 年 7 月 27 日	P5
14	5 階病棟	患者 K 尿	2004 年 8 月 4 日	P3
15	5 階病棟	患者 M 喀痰	2004 年 8 月 9 日	P3
16	5 階病棟	患者 N 喀痰	2004 年 8 月 26 日	P3
17	5 階病棟	患者 O 尿	2004 年 8 月 27 日	P3
18	2 階病棟	患者 P 膿	2004 年 9 月 14 日	P3
19	6 階病棟	患者 Q 尿	2004 年 10 月 4 日	P5
20	5 階病棟	患者 R 尿	2004 年 10 月 4 日	P3
21	5 階病棟	患者 S 尿	2004 年 9 月 16 日	P3
22	5 階病棟	患者 S 喀痰	2004 年 9 月 16 日	P3
23	5 階病棟	患者 M 膿	2004 年 9 月 21 日	P3
24	6 階病棟	患者 T 尿	2004 年 10 月 12 日	P3
25	2 階病棟	患者 U 尿	2004 年 11 月 8 日	P3

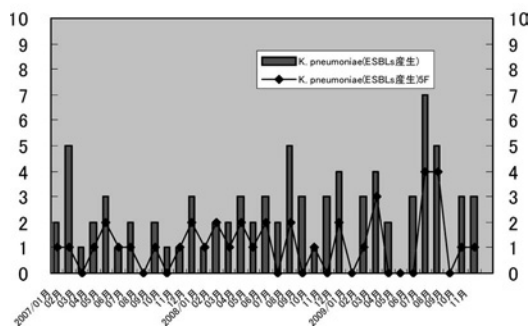
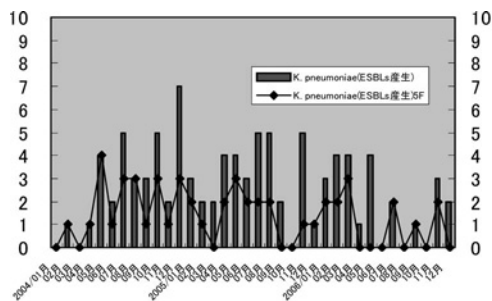


図 2. 5 階病棟と全病棟の ESBL 産生菌の新規検出者数の推移

21 名中 12 名に見られたため、陰部洗浄方法と回数を調査した。5 階病棟では陰部洗浄を毎日実施している、2 階病棟では必要に応じ毎日実施、他の病棟では定期的には実施していなかった。共有ボトルは全部の病棟で使用していた。

一方、喀痰からの検出症例では喀痰の吸引行為を行っていたのが、9 名中 8 名であった。吸引チューブは個人別で使用していたものの、吸引した痰を貯めるビンが共有使用であった。

III. 考 察

K. pneumoniae は、腸内細菌科に属し、ヒトの常在菌として腸管内などに存在するが、肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染、肝・胆道系の感染、敗血症、髄膜炎などの原因菌となることが知られている。また、慢性感染症などの基礎疾患があり、抗菌薬長期使用した症例においては、菌交代現象が起きやすく、耐性菌の出現の割合も高いとされている。元来 *K. pneumoniae* は、第三世代セファロスポリンに感性である。しかし、近年我が国でも第三世代セファロスポリンに耐性を示す、ESBL 産生菌が報告されるようになり、医療現場

で問題となっている。現在までに SHV-12 や SHV-24 型、さらに TEM-91 型 ESBL 産生 *K. pneumoniae* が報告されている^{9), 10)}。今回、当院で検出された 25 株はすべてが、まだわが国で報告されていない TEM-132 型であった。この TEM-132 型 ESBL 産生菌は、TEM-1 型 β -ラクタマーゼのアミノ酸配列と比較すると、3 カ所に変異 (R164H, I173V, E240 K) が存在し、2005 年にスロバキアで同一の医療機関から 4 株の *K. pneumoniae* が検出されたのが最初である¹¹⁾。

PFGE 解析を行った 25 株中、19 株が同じパターンを示したため、患者背景調査結果と比較検討した。その結果、5 階病棟の尿から検出された ESBL 産生菌が初発として、同じ病棟内で患者間に伝播した可能性が考えられた。その後、さらに耐性菌の保菌患者が 2 階病棟、6 階病棟へ移動したことにより、他病棟にも拡散した可能性が示唆された。

ESBL 産生菌による感染のリスクファクターとして長期入院、カテーテル留置および第三世代セファロスポリンの投与歴が挙げられている¹²⁾。今回の事例では、多くの患者が長期入院しており、病棟の観察調査および聞き取り調査の結果、看護に用いる器具が個人使用になっていなかった。また、患者への接触前後の手指衛生の不徹底など接触感染予防策が十分行われていなかったことが、院内での長期の蔓延につながったと考えられる。これを受けて 2004 年 12 月に最初の介入を行い、器具の共用の廃止と接触感染予防策の強化をおこなったところ、新規分離患者が 2004 年 12 月には 7 名であったがその後の数か月は 2~3 名に減少した。しかし、新規の CAZ-耐性 *K. pneumoniae* の分離患者がまた増加したため 2005 年 8 月に再度介入を行ったところ、新規分離患者が減少し、院内感染をおおむね終息させることができた。しかし、CAZ-耐性 *K. pneumoniae* の散発的な検出はその後も続いており、この種の薬剤耐性菌の院内環境からの完全な駆逐は容易ではないことから、引き続き、蔓延防止のための監視と対策の継続が不可欠であることを、職員の共通の認識として持つ必要がある。

細菌検査室として把握が可能な、特定の耐性菌が院内のどの部門で蔓延しているかなどについて、日常的にサーベイランスを行い、結果を現場の医師や看護師に理解しやすい形で情報提供し、現場での対策強化を促す助言をしておれば、今回のような蔓延の長期化は予防できたかもしれない。本事例をきっかけとして ICT (感染対策チーム) が院内に組織され、細菌検査室を含めた関係部門が協力して、情報の共有化を行い院内感染対策に当たる体制が構築され院内感染に対して

迅速な対応が取れるようになった。当病院は高齢者の長期入院が多く、入院患者は ESBL 産生菌をはじめとする各種の薬剤耐性菌の感染リスクの高い患者層となっている。耐性菌の新たな検出に注意しながら、今後も ICT を中心に、院内感染対策の徹底を図ることが重要である。

本論文の要旨は第 17 回日本臨床微生物学会総会 (2006 年 1 月、横浜) において発表した。

文 献

- 1) de Oliveira Garcia, D., Y. Doi, D. Szabo, J. M. Adams-Haduch, T. M. Vaz, D. Leite, M. C. Padoveze, M. P. Freire, F. P. Silveira, D. L. Paterson. 2008. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1790-1793.
- 2) Fang, H., C. Lundberg, B. Olsson-Liljequist, G. Hedin, E. Lindbäck, A. Rosenberg, J. Struwe. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum β -lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5917-5920.
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth information supplement (M100-S18). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 4) Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, S. Mitsuhashi. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11: 315-317.
- 5) Green, M., K. Barbadora. 1998. Recovery of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* from pediatric liver and intestinal transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* 2: 224-230.
- 6) Hibbert-Rogers, L. C., J. Heritage, D. M. Gascoyne-binzi, P. M. Hawkey, N. Todd, I. J. Lewis, C. Bailey. 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant Enterobacteriaceae from patients on a paediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother.* 36: 65-82.
- 7) Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, T. Yagi, K. Yamane, J. Wachino, S. Satowa, K. Kimura, S. Ishikawa, H. Kato, Y. Ozawa, K. Shibayama, K. Kai, F. Konda, Y. Arakawa. 2006. PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated Gram-negative bacilli

- in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 791–795.
- 8) Duck, W. M., C. D. Steward, S. N. Banerjee, J. E. McGowan, Jr., F. C. Tenover. 2003. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3035–3042.
 - 9) Kurokawa H., T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama, K. Kamachi, Y. Arakawa. 2000. A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamase (SHV-24) that hydrolyzes ceftazidime through a single-amino-acid substitution (D179G) in the Ω -loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1725–1727.
 - 10) Kurokawa, H., N. Shibata, Y. Doi, K. Shibayama, K. Kamachi, T. Yagi, Y. Arakawa. 2003. A new TEM-derived extended-spectrum β -lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the Ω -loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2981–2983.
 - 11) Zarnayova, M., E. Siebor, A. Pechinot, J. M. Duez, H. Bujdakova, R. Labia, C. Neuwirth. 2005 Survey of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases in a Slovak hospital: Dominance of SHV-2a and characterization of TEM-132. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3066–3069.
 - 12) Paterson, D. L., R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamase: A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657–686.

TEM-132-producing Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* That Cause a Probable Healthcare Associated Transmission

Maho Takahashi¹⁾, Naohiro Shibata²⁾, Kimiko Ooya¹⁾,
Misako Horimizu¹⁾, Kazuhiko Nagai³⁾, Yoshichika Arakawa²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Kaetsu Hospital, Niigata, Japan

²⁾ Department of Bacterial Pathogenic and Infection Control, National Institute of Infection Diseases

³⁾ Department of Pharmacy, Kaetsu Hospital, Niigata, Japan

Ceftazidime (CAZ)-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated from 95 inpatients during April, 2003 and November, 2004. To characterize the molecular mechanisms of the CAZ-resistance, PCR detection of *bla* genes, nucleotide sequencing of the PCR products were performed for the 21 isolates, as well as pulsed-field electrophoresis (PFGE). All isolates were found to harbor *bla*_{TEM-132} by PCR amplification and nucleotide sequence analyses. By PFGE analysis, 19 isolates demonstrated the same PFGE profile suggesting a probable healthcare associated transmission of TEM-132-producing *K. pneumoniae*. To cope with this outbreak, the contact precaution, together with the standard precaution and enhanced sanitation of hospital environment, was performed, and we finally succeeded in the prevention of further transmission of the CAZ-resistant *K. pneumoniae*. Most ESBLs found in CAZ-resistant *K. pneumoniae* have been SHV-derived ESBLs, but the enzyme identified in the CAZ-resistant *K. pneumoniae* was TEM-132 that has never been reported in Japan.