

[原 著]

尿路感染症由来基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌における
多剤耐性化傾向と CTX-M-27 の増加服部達也¹⁾・中根邦彦^{1,2)}・川村久美子^{1,3)}¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻²⁾ 岡崎市総合検査センター・衛生検査班³⁾ 名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学専攻

(平成 22 年 7 月 30 日受付, 平成 23 年 1 月 14 日受理)

2007 年 12 月から 2008 年 2 月に愛知県下 7 施設において, 尿路感染症患者から分離された *Escherichia coli* 312 株に対し, Clinical and Laboratory Standards Institute 勧告法に準じた薬剤感受性試験および double-disk synergy test を行った結果, 15 株 (4.8%) が extended-spectrum β-lactamase (ESBL) 産生菌であった。そのうち, 13 株は levofloxacin (LVFX) に対し, 7 株は LVFX および trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) に対しても耐性を獲得しており, ESBL 産生菌の多剤耐性化傾向が確認された。これら ESBL 産生 15 株の遺伝子型別は, 8 株が *bla*_{CTX-M-27}, 4 株が *bla*_{CTX-M-14} であり, *bla*_{CTX-M-27} 保有株のほうが ceftazidime に対し低感受性を示す傾向にあった。また, ESBL 産生菌で LVFX に対し耐性を示す 13 株のうち 7 株が血清型 O25:H4 であり, フルオロキノロン耐性と血清型との関連性が示唆された。*bla*_{CTX-M} を保有したプラスミドは約 3.4×10^{-5} cells/recipient の効率で接合伝達し, その際 TMP/SMX 耐性も同時に伝播していた。本研究により, 尿路感染症由来 *E. coli* では, CTX-M-27 を産生する血清型 O25:H4 が増えつつあることが明らかとなった。これら多剤耐性 ESBL 産生菌の蔓延を食い止めるためには, 耐性菌の分子疫学的な解析および積極的な疫学調査から, その背景を知ることが重要であると考えらる。

Key words: extended-spectrum β-lactamase, uropathogenic *Escherichia coli*, CTX-M-27, 多剤耐性化

序 文

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) は, class A β-ラクタマーゼに属し, 第 3 世代セファロsporin およびモノバクタムを分解する酵素である¹⁻³⁾。ESBL は三つの主要なグループ (TEM-, SHV-, CTX-M 型) に分類されており¹⁻³⁾, 1990 年代末までは, 欧米を中心に TEM- 型および SHV- 型 ESBL を産生する *Escherichia coli* や *Klebsiella* sp. が分離されていたが, 2000 年以降 CTX-M 型がヨーロッパを中心に分離さ

れるようになった^{1,2)}。なかでも, CTX-M-15 を産生し, multilocus sequence typing (MLST) 131, 血清型 O25:H4 という疫学マーカーを有する *E. coli* が, 尿路感染症や血流感染などの市中感染を引き起こしており, 大きな社会問題となっている²⁾。この現象は “CTX-M pandemic” と呼ばれており, 2006 年の Infectious Diseases Society of America の報告では, 新しい治療法の確立が早急に必要とされる薬剤耐性菌の一つに, 本菌がリストアップされている⁴⁾。

現在, ヨーロッパを中心に拡散している CTX-M-15 型 β-lactamase は, CTX-M-1 グループに属する *bla*_{CTX-M-3} の 240 番目のアミノ酸が変異 (Aps→Gly) したことにより生じた β-lactamase で, その遺伝子はレプリコン型 IncFII の巨大プラスミドにより伝播している^{5,6)}。この CTX-M-15 型 β-lactamase を産生する *E. coli* は, そのプラスミド上に TEM-1, OXA-1 の

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸東 1-1-20
名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学専攻
川村久美子
TEL: 052-719-3116
FAX: 052-719-1506
E-mail: kumiko@met.nagoya-u.ac.jp

ような他の β -lactamase やアミノグリコシド修飾酵素をコードする遺伝子、さらには *qnr* などのプラスミド性キノロン耐性遺伝子を保有することもあり^{5,6)}、アミノグリコシド系、トリメトプリム、フルオロキノロン系など複数の薬剤に対して耐性を獲得している。現状では、アジアにおける本菌の分離はヨーロッパに比べ多くはないが、インドの医療施設からは頻りに分離されており⁷⁾、アジア地域へのリザーバーとなりうる可能性は否定できない。

現在のところ、本邦では CTX-M-15 産生 *E. coli* の分離はほとんど報告されていないが、昨年の薬剤感受性サーベイランス研究会による調査報告 (2007~2008 年)⁸⁾ では、ESBL 産生 *E. coli* の多剤耐性化を示唆するデータが示されており、その増加が懸念されている。今後、医療現場における多剤耐性 ESBL 産生菌の増加と拡散を防止するためには、定期的な薬剤感受性動向の調査とともに、検出される菌株の特性についても解析することが重要である。そこで、本研究では ESBL 産生 *E. coli* の分離頻度が高い尿路感染症由来株を対象に、ESBL 産生菌の流行株の検索ならびに ESBL 産生菌とフルオロキノロン耐性との関係を明らかにすることを目的として、ESBL 産生遺伝子およびプラスミド性キノロン耐性遺伝子の保有状況を調査するとともに、各耐性菌については遺伝子型の同定およびそれら耐性遺伝子を保有するプラスミドの伝播についても解析を行った。

材料と方法

1. 使用菌株

菌株は、2007 年 12 月から 2008 年 2 月の 3 か月間に愛知県下 7 施設において尿路感染症患者から分離された *E. coli* 312 株を使用した (入院: 151, 外来: 161, 男性: 99, 女性: 213, 平均年齢 60.4 歳)。菌株は菌量 10^4 CFU/ml 以上を示した尿由来 *E. coli* で、同一患者について同じ感染エピソードでの重複は避けて収集した。薬剤感受性試験の標準菌株としては、*E. coli* ATCC 29522 (エアブラウン社) を使用し、ESBL 産生遺伝子保有株およびプラスミド性キノロン耐性遺伝子保有株の検索における陽性コントロール株は国立感染症研究所から分与されたものを用いた。また、接合伝達実験の受容菌として、*E. coli* CSH-2 を、パルスフィールドゲル電気泳動のコントロール株として *E. coli* MC4100 ならびに *Salmonella* H9812 を使用した。

2. 薬剤感受性試験および ESBL 産生性の確認

薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Stan-

dards Institute (CLSI) 勧告法⁹⁾ に基づいた寒天平板拡散法にて行い、cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX), gentamicin (GM), imipenem (IPM), levofloxacin (LVFX), fosfomycin (FOM) (KB ディスク, 栄研化学) に対する感受性を調べた。また、ESBL 産生性の確認は、CLSI 勧告法⁹⁾ に準じた double-disk synergy test および Etest (ESBL CT/CTL, ESBL TZ/TZL, シスメックス・ビオメリュー) にて行った。

3. ESBL 産生遺伝子の検索および型別

ESBL 産生遺伝子の検索および型別は、Shibata¹⁰⁾ および Yagi ら¹¹⁾ の方法により PCR にて対象部位 (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, SHV- および TEM-) の増幅を行ったのち、増幅産物のシーケンス解析を行った。ESBL 産生遺伝子の検出に使用したプライマーを Table 1 に示す。

鋳型 DNA は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて抽出し、濃度調整後使用した。PCR 反応は鋳型 DNA 1 μ l (20 ng) と PCR 反応液 (1.0 U Taq polymerase, 0.2 mM dNTP mixture, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ (TaKaRa), 0.3 μ M primer set) 24 μ l を混和し、95°C 5 分間加熱後、熱変性 95°C 30 秒、アニーリング反応は各プライマーセットの設定温度で 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒の 30 サイクル、最終伸長反応 72°C 5 分の条件にて行った。反応終了後、EtBr 加 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、増幅産物の有無とサイズを確認した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) にて増幅産物を精製し、シーケンス反応の鋳型とした。

シーケンス反応は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、95°C 5 分間加熱後、95°C 30 秒、50°C 10 秒、60°C 4 分、30 サイクルの条件にて行い、得られた産物を精製後 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて解析した。なお、相同性の解析は、BLAST program (DDBJ, Shizuoka, Japan) を用いて行った。

4. プラスミド性キノロン耐性遺伝子の検索

プラスミド性キノロン耐性遺伝子である *qnrA*, *qnrB* および *qnrS* については、Cattoir らの方法¹²⁾、*aac(6')-Ib-cr* については Park らの方法¹³⁾、*qepA* については Yamane らの方法¹⁴⁾ に基づき、各々 PCR による検出を行った。PCR 反応は、前述の「ESBL 産生遺伝子の検出」と同様に行い、アニーリング反応の温度は Table 1 に示した設定温度で行った。

Table 1. Primers used in this study for PCR and nucleotide sequencing

PCR primers		Annealing temperature (°C)	Size of PCR product (bp)	References
CTX-M-1-F	5'-GCT GTT GTT AGG AAG TGT GC-3'	56.5	516	10)
CTX-M-1-R	5'-CCA TTG CCC GAG GTG AAG-3'			
CTX-M-2-F	5'-ACG CTA CCC CTG CTA TTT-3'	53.5	779	10)
CTX-M-2-R	5'-CCT TTC CGC CTT CTG CTC-3'			
CTX-M-8-F	5'-CGG ATG ATG CTA ATG ACA AC-3'	55.0	569	10)
CTX-M-8-R	5'-GTC AGA TTG CGA AGC GTC-3'			
CTX-M-9-F	5'-GCA GAT AAT ACG CAG GTG-3'	53.5	393	10)
CTX-M-9-R	5'-CGG CGT GGT GGT GTC TCT-3'			
TEM-specific-F (T1) ^a	5'-CCG TGT CGC CCT TAT TCC-3'	56.0	824	11)
TEM-specific-R (T2) ^a	5'-AGG CAC CTA TCT CAG CGA-3'			
SHV-specific-F (S1) ^a	5'-ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC-3'	55.0	1051	11)
SHV-specific-R (S2) ^a	5'-TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC-3'			
QnrA-F	5'-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3'	54.0	580	12)
QnrA-R	5'-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3'			
QnrB-F	5'-GGA ATA GAA ATT CGC CAC TG-3'	54.0	264	12)
QnrB-R	5'-TTT GCT GTT CGC CAG TCG AA-3'			
QnrS-F	5'-GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT-3'	54.0	428	12)
QnrS-R	5'-TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG-3'			
Aac(6')-Ib-cr-F	5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA-3'	55.0	482	13)
Aac(6')-Ib-cr-R	5'-CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT-3'			
QeqA-F	5'-GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG-3'	60.0	199	14)
QepA-R	5'-CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG-3'			
Sequencing primer for TEM and SHV ^b				
T3	5'-CAG TCA CAG AAA AGC AT-3'			11)
T4	5'-CTG GCG AAC TAC TTA CTC-3'			
T5	5'-TAG GCG GAG GTA GGT CAG-3'			
T6	5'-TAC GAA AAG ACA CTG ACC-3'			
S3	5'-GCG GGT GGA TGC CGG TG-3'			11)
S4	5'-CGG CGG GCT GGT TTA TCG-3'			
S5	5'-TAA ATC ACC ACA ATG CCC-3'			
S6	5'-GTC GGC AAG GTG TTT TTC-3'			

^a To determine the genotype of ESBL, PCR was performed using the TEM- and SHV-specific primers (T1 and T2 for TEM, S1 and S2 for SHV).

^b For nucleotide sequencing, the several sequencing primers (T3, T4, T5 and T6 for TEM; S3, S4, S5 and S6 for SHV) were used.

5. 大腸菌の血清型別およびパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝学的背景の解析

大腸菌の血清型別 (O 抗原, H 抗原) は, 定法に従い病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて決定した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は, Barrett らの方法¹⁵⁾ に従い試料を調整した後, *Xba*I にて制限酵素処理し, 6 V/cm, 2.2~54.2 s の条件で 19 時間 (CHEF-DRIII システム, BIO-RAD) 電気泳動を行った。染色後得られた PFGE 像については Finger-printing II (BIO RAD) を用いてクラスター解析を

行った。

6. 接合伝達実験および伝達効率の算出

接合伝達実験は, 供与菌として ESBL 陽性株を, 受容菌として *E. coli* CSH-2 株を用いた Broth Mating 法¹⁶⁾ にて検討した。Luria-Bertani (LB) broth にて一夜培養した菌液を新鮮な LB broth に植え継ぎ, 対数増殖期 (OD₆₆₀: 0.5~0.8) になるまで 37°C にて振とう培養した。対数増殖期に達した供与菌と受容菌を 1.5 ml 滅菌エッペンドルフチューブ内で 1:4 の割合 (100 μl と 400 μl) に混和し, 10,000 rpm 1 分間遠心

した後、37°Cのヒートブロックにて20時間インキュベートした。インキュベート後の菌液を丁寧に混和し、そのうちの100 µlを20 µg/ml CTXおよび50 µg/ml rifampicinを加えたLB寒天培地に接種し、コンラージ棒で一面に塗り広げた後、37°Cで培養した。48時間後、寒天平板上に得られたコロニーを接合伝達体とし、以下の解析を行った。

はじめにPFGEにより、接合伝達体、供与菌と受容菌のバンドパターンを比較し、得られた接合伝達体が受容菌由来*E. coli*であることを確認した。次に、接合伝達体のプラスミドDNAをQIAprep spin plasmid kit (QIAGEN)にて抽出し、巨大プラスミドの伝達性を確認した。ESBL表現型伝達の有無についてはdouble-disk synergy testおよびEtestにて、TMP/SMXとCPFEXの感受性の変化についてはDisk法にて調べた。

なお、接合伝達したプラスミドのサイズは、抽出したプラスミドDNAを制限酵素*Pst*Iで処理した後、得られたバンドのサイズから推察した。また、伝達効率の算出は、上記条件における受容菌のコロニー数を同時に測定し、接合伝達コロニー数/受容菌のコロニー数として算出した。

結 果

尿路感染症由来*E. coli* 312株に対する薬剤感受性試験を実施した結果、7薬剤に対する耐性率は、LVFX (15.7%), TMP/SMX (9.6%), GM (9.3%), CTX (4.8%)の順に高く、CAZやFOMに耐性を示す株は1%以下、また、IPMに対して耐性を示す株は1株も認められなかった。これら耐性率を入院および外来患者由来別と比較すると、LVFXにおいて、外来患者由来株のほうがやや高い傾向が認められたものの、その他の薬剤では両者の間に大きな差は認められなかった (Table 2)。これら312株のうち、CTX diskの阻止円

が27 mm以下もしくはCAZのそれが22 mm以下を示した株 (ESBL疑)は40株あり、そのうちdouble-disk synergy testおよびEtestでESBL産生株と判定された株は15/312株 (4.8%)であった。これら15株の患者背景をTable 3に示す。対象とした312例の平均年齢が60.4歳であるのに対し、15例の平均年齢は72.8歳であり、ESBL産生菌は高齢者から多く分離される傾向が認められた。性別では、男性4/99 (4.04%), 女性11/213 (5.16%)と有意な差は認められなかったが、入院患者由来が8株、外来患者由来が7株とほぼ同数分離されており、市中感染症におけるESBL産生*E. coli*の増加傾向が明らかとなった。

LVFXに対し耐性を示した49株のうち、PCRによる検索でプラスミド性キノロン耐性遺伝子の保有が確認された株は、*qnrS*陽性の1株のみで、この株はESBL非産生菌であった。一方、ESBL産生菌では、15株中13株がLVFXに対し耐性であり、さらに、これらLVFX耐性13株のうち、7株はTMP/SMXに対しても耐性を獲得しており、ESBL産生菌における多剤耐性化傾向が認められた (Table 3)。

ESBL産生15株の遺伝子型別を行った結果、*bla*_{CTX-M-1}および*bla*_{CTX-M-2}保有株が各1株、CTX-M-9グループの*bla*_{CTX-M}保有株が12株 (*bla*_{CTX-M-14}; 4株, *bla*_{CTX-M-27}; 8株), *bla*_{TEM-1}保有株が3株, *bla*_{SHV-12}保有株が1株であり, *bla*_{CTX-M-14}保有株のうち3株が*bla*_{TEM-1}も保有していた。遺伝子型別と薬剤感受性傾向を見ると、CTX-M-9グループの12株はすべてLVFX耐性であり、β-ラクタム系抗菌薬については、*bla*_{CTX-M-14}保有株よりも*bla*_{CTX-M-27}保有株のほうがCAZに対し、より低感受性を示していた (Table 3)。

血清型別では自己凝集を示し判定不能のものが6株あったが、CTX-M-9グループでは血清型O25:H4が多く認められた (Table 3)。PFGEによる遺伝子型別では、施設Aで3株 (No. 41, 45, 79), 施設Cでは4株 (No. 22, 70, 179, 186)で類似性が認められたものの、菌株間に強い関連性は認められなかった。これら7株の血清型と由来を見ると、菌株No. 22と41を除く5株が血清型O25:H4であり、施設Aの3株中2株 (No. 45, 79)と、施設Cの4株中3株 (No. 22, 179, 186)が外来患者由来株であった (Table 3, Fig. 1)。

ESBL産生15株について、Broth Mating法にて接合伝達試験を実施したところ、CTX-M-9グループのうち、4株 (No. 70, 79, 179, 239)において接合伝達性が確認され、それらプラスミドサイズは約40~50 kbp、接合伝達効率は約 3.4×10^{-5} cells/recipientで

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 312 *Escherichia coli* stains

Antimicrobial agents	Number of resistant isolates		
	Total	Inpatient	Outpatient
CTX	15 (4.8%)	8 (2.6%)	7 (2.2%)
CAZ	2 (0.6%)	0 (0.0%)	2 (0.6%)
IPM	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
LVFX	49 (15.7%)	19 (6.1%)	30 (9.6%)
GM	29 (9.3%)	13 (4.2%)	16 (5.1%)
TMP/SMX	30 (9.6%)	12 (3.8%)	18 (5.8%)
FOM	1 (0.3%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)

Table 3. Genetic and phenotypic traits of ESBL-producing *Escherichia coli* strains

Strain number	Age	Sex (M/F) ^a	Inpatient/Outpatient	ESBL genotype ^b	MIC (μg/ml) ^c		Resistance phenotype to non-β-lactam ^d	Serotype ^e	Hospital
					CTX	CAZ			
10	86	F	Inpatient	CTX-M-2	16<	0.75		O125:H4	B
22	90	M	Outpatient	CTX-M-27	16<	4	LVFX, TMP/SMX	OUT:H4	C
23	64	F	Outpatient	CTX-M-27	16<	8	LVFX, TMP/SMX	OUT:H4	C
25	70	F	Inpatient	CTX-M-27	16<	4	LVFX	O25:H4	C
41	85	F	Inpatient	CTX-M14, TEM-1	16<	1	LVFX	OUT:H4	A
45	79	M	Outpatient	CTX-M-1	16<	32<	LVFX	O25:H4	A
70	79	M	Inpatient	CTX-M-27	16<	2	LVFX, TMP/SMX	O25:H4	C
79	94	M	Outpatient	CTX-M-14, TEM-1	16<	0.5>	LVFX	O25:H4	A
81	23	F	Inpatient	CTX-M-14	16<	0.5>	LVFX, TMP/SMX, GM	O169:HUT	E
147	43	F	Outpatient	SHV-12	16<	0.5		OUT:HUT	B
179	70	F	Outpatient	CTX-M-27	16<	1	LVFX, TMP/SMX	O25:H4	C
186	61	F	Outpatient	CTX-M-27	16<	2	LVFX, TMP/SMX	O25:H4	C
211	70	F	Inpatient	CTX-M14, TEM-1	16<	0.5	LVFX	OUT:H4	D
239	84	F	Inpatient	CTX-M-27	16<	2	LVFX, TMP/SMX	OUT:H4	B
242	94	F	Inpatient	CTX-M-27	16<	2	LVFX	O25:H4	B

^a M, male; F, female

^b β-lactamase genes were determined by PCR and by sequencing.

^c MICs were determined using E test “ESBL CT/CTL” and “ESBL TZ/TZL.”

^d LVFX, levofloxacin; TMP/SMX, trimethoprim/sulfamethoxazole; GM, gentamicin

^e OUT, O-antigen untypeable; HUT, H-antigen untypeable

あった (Fig. 2)。得られた接合伝達株 4 株の薬剤感受性を見ると、受容菌 *E. coli* CSH-2 の LVFX および GM 感受性は維持されていたが、CTX に対しては耐性を獲得しており、double-disk synergy test の結果 ESBL 産生菌と判定された。さらに、接合伝達株 3 株は TMP/SMX に対しても供与菌と同程度の耐性を示していた。

考 察

現在、*E. coli* を起因菌とする急性単純性尿路感染症の第一選択薬として、経口セファロスポリン系抗菌薬、フルオロキノロン系抗菌薬、TMP/SMX の使用が推奨されている¹⁷⁾。しかしながら、*E. coli* の約 15～20% が TMP/SMX に対し、約 10～25% がフルオロキノロン系抗菌薬に対し耐性を獲得しているとの報告もあり^{18, 19)}、尿路感染症治療における経口セファロスポリン系抗菌薬の需要が高まりつつある。その一方で、欧米やアジア太平洋地域など世界各国における大規模サーベイランスにより、*E. coli* や *K. pneumoniae* などの腸内細菌科菌種における ESBL 産生菌の急激な増加傾向が明らかとなり^{6, 20)}、臨床現場における抗菌薬使用に大きな問題を投げかけている。今回の調査で使用した 2007～2008 年、愛知県下 7 施設で分離された尿路感染症由来 *E. coli* における ESBL 産生菌の

割合 (4.8%, 15/312 株) は、2006 年の Yamaguchi らの報告 (4.3%, 6/140 株)²¹⁾ や 2009 年の水谷らの報告 (6.3%, 13/205 株)⁸⁾ とほぼ同程度であり、欧米で報告されているほどの急激な増加は認められなかった。しかしながら、ESBL 産生 15 株のうち、86.7% (13/15 株) が LVFX に対し、40.0% (6/15 株) が LVFX および TMP/SMX に対して耐性を獲得しており、欧米と同様、ESBL 産生菌が多剤耐性化していることが明らかとなった。また、今回分離された ESBL 産生大腸菌について患者背景を見ると、高齢者から多く分離される傾向はこれまでの報告²⁾ と同様であったが、外来患者由来株と入院患者由来株がほぼ同数分離されており、ESBL 産生 *E. coli* が市中感染症の起因菌として問題となりつつある現状を裏づける結果となった。この ESBL 産生菌の多剤耐性化傾向と外来患者における増加傾向は、尿路感染症における経口薬治療を困難にする可能性を示唆しており憂慮される。

CTX-M 型 ESBL 産生菌におけるフルオロキノロン耐性、血清型ならびにシークエンスタイプ (特に ST 131) の間には、一定の関連性が認められるとの報告がある^{5, 22)}。これら菌株におけるフルオロキノロン耐性の多くは、キノロン耐性決定領域 (QRDR) の点変異により付与されているが、プラスミド性キノロン耐性遺伝子を保有する株も見つかっている^{5, 22)}。今回解析

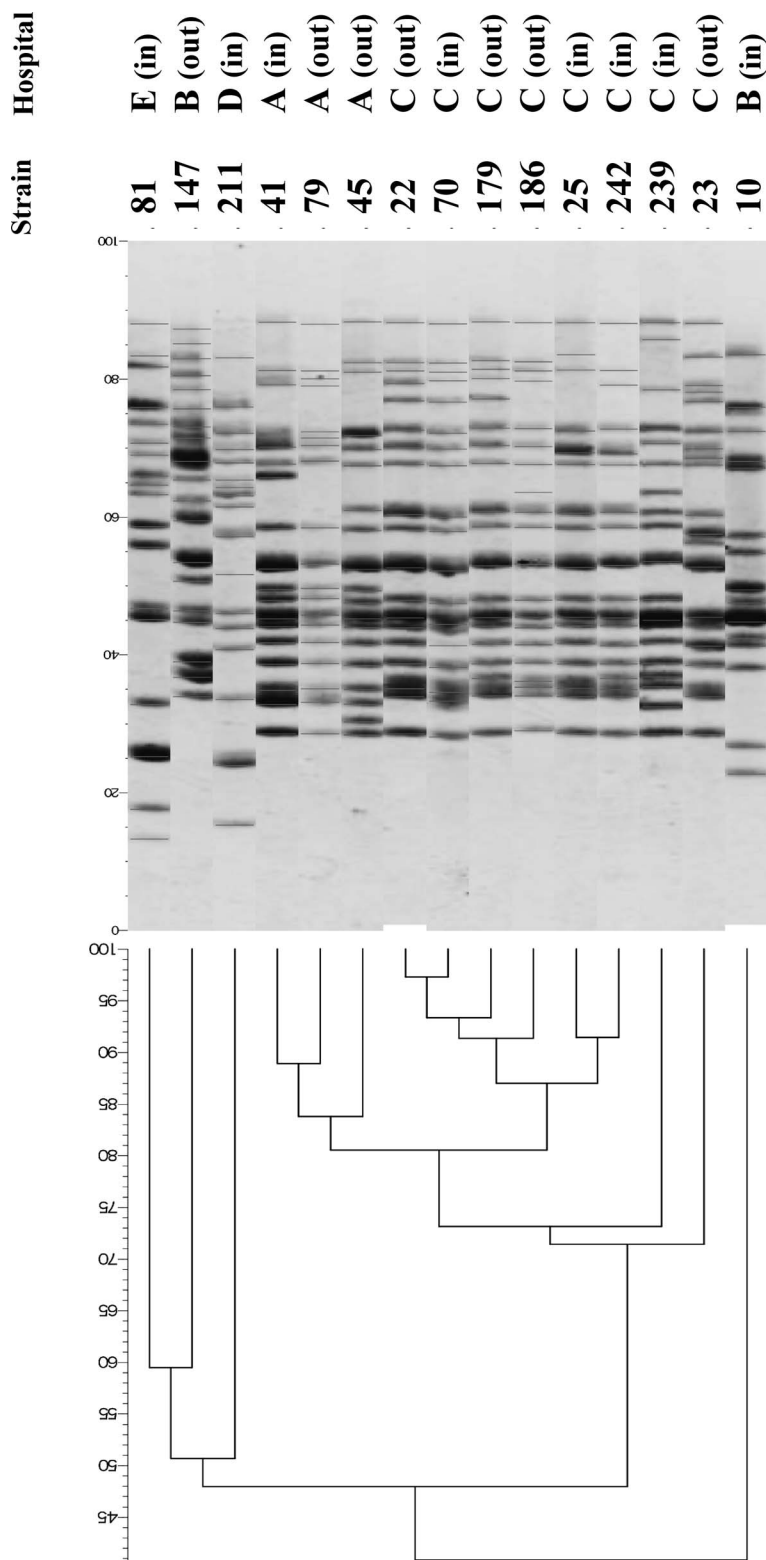


Fig. 1. Conjugation of plasmid and susceptibility profile of resulted transconjugant

Transconjugation analysis was performed with *E. coli* CSH-2 as the recipient by the broth mating method. Transconjugants were selected on LB agar plates supplemented with rifampicin (50 mg/ml) and CTX (20 mg/ml). Plasmid DNA from recipient, donor, and the resulted transconjugant were purified using QIAprep spin plasmid kit (QIAGEN). Figure shows those of No. 179 among four isolates subjected to the transconjugation analysis. The susceptibility profiles of recipient, donor, and the resulted transconjugant were also shown. ESBL phenotypic tests were performed using E test (SYSMEX bioMérieux). The susceptibilities of LVFX and TMP/SMX were determined by agar diffusion method according to CLSI recommendation, and categorized into susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) in accordance with CLSI criteria.

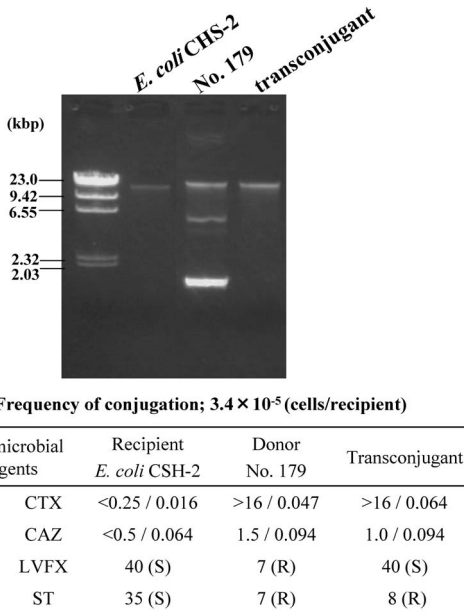


Fig. 2. Dendrogram generated by Pulse-field gel electrophoresis

For molecular typing, the chromosomal DNA of fifteen ESBL-producing isolates was obtained for comparison by Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) using a CHEF-DRIII (BIO-RAD, Tokyo, Japan). The running parameters were as follows: initial pulse 2.2 s, final pulse 54.2 s, at 6 V/cm for 19 h at 14°C. The gel was stained with ethidium bromide and scanned. Both *E. coli* MC4100 and *Salmonella* H9812 were used as a DNA reference standard. The DNA pattern obtained by PFGE was analyzed with Fingerprinting II (BIO RAD). The unweighted pair group method (UPGMA) was used to generate a dendrogram with the position tolerances set at 1.0%, and the Dice coefficients were used for band similarity measurements to determine DNA relatedness. Isolates were considered to be clonally related if the Dice coefficient correlation was over 80%, which corresponds to the “possibly related” category according to the criteria suggested by Tenover et al.²⁶⁾ OUT, outpatient; IN, inpatient.

した CTX-M 型 ESBL 産生菌は全株 LVFX 耐性であったが、それらの中にプラスミド性キノロン耐性遺伝子保有株は認められなかった。一方、ESBL 産生菌の血清型は O25:H4 がうち半数近くを占めており、これらはすべて LVFX 耐性であった。今回は ST 型別を行っていないので、これらが現在ヨーロッパに蔓延している ST131 であるかは不明であるが、今回の結果は血清型 O25:H4 がフルオロキノロン耐性を獲得しやすいという過去との報告^{5, 22)}と一致しており、本邦においても O25:H4 型のフルオロキノロン耐性を獲得した ESBL 産生 *E. coli* が増加しつつあることが示唆された。近年、ESBL 産生菌がプラスミド性キノロン耐性遺伝子を保有しているとの報告もあり²²⁾、今後は保有状況ならびに血清型別についても注意を払いながら、耐性の動向を監視する必要があると思われる。

ESBL の主要なグループのうち、ヨーロッパでは CTX-M-15, ST131 (O25:H4) 系列の *E. coli* が、アジア太平洋地域では CTX-M-9 グループの *E. coli* が優位であると報告されている^{1, 2, 16)}。本邦における ESBL 産生 *E. coli* については、1997~1998 年までは CTX-M-2 グループが主流であったが、2000 年初期から CTX-M-9 グループに入れ代わったことが Suzuki らの研究により明らかにされている²³⁾。今回の筆者らの調査では、CTX-M-9 グループの ESBL 産生株の割合は 73% (11/15 株) で、Suzuki らの報告 (65% (84/142 株))²³⁾ とほぼ一致していたが、そのサブタイプを比較すると Suzuki らが調査対象とした 2002~2003 年では、*bla*_{CTX-M-9} と *bla*_{CTX-M-14} が主流であったのに対し、今回は *bla*_{CTX-M-27} と *bla*_{CTX-M-14} が多く認められ、遺伝子型が変化しつつあることが明らかとなった。*bla*_{CTX-M-27} は *bla*_{CTX-M-14} の 240 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からグリニンに変異したものであり、このアミノ酸変異が CAZ 耐性に寄与することが示されている²⁴⁾。このことは *bla*_{CTX-M-27} 保有株のほうが CAZ に低感受性を示した本結果と一致する。本邦において、CAZ により耐性を示す血清型 O25:H4 の *bla*_{CTX-M-27} 保有株が CTX-M-9 グループの半数以上を占めるようになってきており、よりいっそうの注意が必要である。

ESBL 産生 *E. coli* 15 株のうち、約半数が血清型 O25:H4 であり、それらは施設 A (No. 45, 79), 施設 C (No. 70, 179, 186) に集中していた。PFGE による遺伝子型別では、同一施設内 (A および C) で類似性が認められたものの、施設 A の 3 株中 2 株と施設 C の 4 株中 3 株は外来患者由来株であったことから、これら

は病院感染により広がったものでないと思われる。Suzukiらは、2000年以降、CTX-M-9グループに属する血清型O25-ST131とO86-ST38が本邦のESBL産生*E. coli*の主流であることを報告し、それらの遺伝子型別についても解析している²³⁾。それによると、同じO25:H4-ST131に属していても、PFGEパターンが必ずしも同一でないことが示されている。今回、2施設の入院および外来患者由来株から、遺伝子型別が類似した血清型O25:H4が検出されたことは、ヨーロッパと同様に、特定のクローンの広がりを示唆するものとして興味深い。今後は、他の検査材料から分離されるESBL産生菌も対象とし、ST型別を含めた詳細な分子疫学的な解析を行い、その動向を慎重に観察する必要があると思われる。

ESBL産生遺伝子は接合伝達性をもつ巨大プラスミドで伝播することが、現在の蔓延の原因の一つとなっている。今回調べたESBL産生菌についても、15株中4株で接合伝達性が確認され、得られた接合伝達株3株には、TMP/SMX耐性も伝達されていた。TMP/SMX耐性については、*bla*_{CTX-M}保有プラスミド上のクラス1インテグロン内に*dfrA*が存在することが報告されており²⁵⁾、TMP/SMX耐性が伝達された3株のプラスミド上にもこのインテグロンが存在する可能性が示唆された。尿路感染症は病院感染の引き金になることも多く、その起因菌に接合伝達性を有するプラスミドが高頻度に確認されたことから、医療現場におけるESBL産生菌のさらなる拡散が危惧される。

尿路病原性大腸菌の約5%がESBL産生菌(主にCTX-M型)であった。それらは単純性尿路感染症の第一選択薬であるフルオロキノロン系抗菌薬やTMP/SMXに対しても耐性を獲得しており、多剤耐性化傾向にあることが明らかとなった。今回、ST型別を実施しておらず流行株の存在を特定できなかったものの、O25:H4株のフルオロキノロン耐性化、*bla*_{CTX-M-27}保有株におけるCAZ低感受性化が確認され、またCTX-M産生遺伝子を保有したプラスミドも高頻度で伝播することが明らかとなった。ESBL産生菌は、プラスミド上のインテグロンにさまざまな耐性遺伝子を集積しつつ、さらに耐性の範囲を広げる方向にアミノ酸変異を蓄積して進化し続けている。これら多剤耐性ESBL産生菌の蔓延を食い止めるためには、耐性菌の分子疫学的な解析および積極的な疫学調査から、その背景を知ることが重要であると考えられる。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、菌株の分与を賜りました国立感染症研究所細菌第二部部长 荒川宣

親先生、安城更生病院、一宮市立市民病院、岡崎市民病院、公立陶生病院、国立長寿医療センター、豊橋市民病院、名古屋掖済会病院の微生物検査室の皆様にご心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1-14.
- 2) Pitout, J. J. D., K. B. Laupland. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8: 159-166.
- 3) Harada, S., Y. Ishii, K. Yamaguchi. 2008. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J. Lab. Med.* 28: 401-412.
- 4) Talbot, G. H., J. Bradley, J. E. Edwards, et al. 2006. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42: 657-668.
- 5) Peirano, G., J. D. D. Pitout. 2010. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: The worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35: 316-321.
- 6) Coque, T. M., F. Baquero, R. Canton. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 13: 1-11.
- 7) Ensor, V. M., M. Shahid, J. T. Evans, et al. 2006. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 1260-1263.
- 8) 水谷 哲, 松本哲朗, 中浜 力, 他. 2009. 大腸菌の薬剤感受性サーベイランス成績(2007~2008年). 第57回日本化学療法学会西日本支部総会抄録集 247.
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M7-A7. 26: 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 10) Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, et al. 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.
- 11) Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, et al. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 53-56.

- 12) Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, et al. 2007. Multiplex PCR for detection plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 394–397.
- 13) Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, et al. 2006. Prevalence in the United States of *aac*-(6′)-*Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3953–3955.
- 14) Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, et al. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1564–1566.
- 15) Barrett, T. J., H. Lior, J. H. Green, et al. 1994. Laboratory investigation of a multistate foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 32: 3013–3017.
- 16) Ray, J. L., K. M. Nielsen. 2005. Experimental methods for assaying natural transformation and inferring horizontal gene transfer. *Methods Enzymol.* 395: 491–520.
- 17) David, N., M. D. Gilbert, C. Robert, et al. 2004. 急性単純性尿路感染症, 急性単純性腎盂腎炎. p. 54–55, サンフォード感染症治療ガイド (第 34 版), ライフサイエンス出版, 東京.
- 18) Paterson, D. L., R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamase: A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657–686.
- 19) Nys, S., P. H. Terporten, A. A. Hoogkamp-Korstanje, et al. 2008. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in the Netherlands (1998–2005). *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 126–132.
- 20) Hirakata, Y., J. Matsuda, Y. Miyazaki, et al. 2005. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Panpacific region (SENTRY 1988–2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 52: 323–329.
- 21) Yamaguchi, K., Y. Ishii, M. Iwata, et al. 2007. Nationwide surveillance of parenteral antibiotics containing meropenem activities against clinical isolates strains in 2006. *Jpn. J. Antibiot.* 60: 344–77. (Japanese)
- 22) Lavilla, S., J. J. González-López, M. Sabaté, et al. 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 291–295.
- 23) Suzuki, S. N. Shibata, K. Yamane, et al. 2009. Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 72–79.
- 24) Bonnet, R., C. Recule, R. Baraduc, et al. 2003. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 29–35.
- 25) Vinué, L., M. Lantero, Y. Saénz et al. 2008. Characterization of extended-spectrum- β -lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* 57: 9916–9920.
- 26) Tenover, F.-C., R.-D. Arbeit, R.-V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233–2239.

Multidrug-Resistant Phenotype and Prevalence of CTX-M-27 in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Uropathogenic *Escherichia coli*

Tatsuya Hattori,¹⁾ Kunihiro Nakane,^{1,2)} Kumiko Kawamura^{1,3)}

¹⁾ Department of Pathophysiological Laboratory Science, Nagoya University Graduate School of Medicine

²⁾ City of Okazaki Research Center, Hygiene Testing Group

³⁾ Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Science

The susceptibilities against 312 uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens were investigated, and 15 were extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates. Among the 15 ESBL-producing isolates, 13 were resistant to levofloxacin (LVFX) and 6 were resistant to both LVFX and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX), suggesting that ESBL-producing isolates tend to become multidrug-resistant (MDR) phenotypes. The genotypes of ESBL were determined by PCR and sequencing. Four isolates were CTX-M-14 producers and 8 isolates harbored *bla*_{CTX-M-27}, which harbor the Asp240Gly substitution, have greater catalytic efficiencies against ceftazidime than parental enzymes. None of these isolates harbored plasmid-mediated quinolone resistance genes, but 6 were serotype O25:H4 among 13 ESBL-producing and LVFX-resistant isolates, suggesting fluoroquinolone-resistant phenotypes are associated with serotype O25. The CTX-M encoding plasmid was successfully transferred to recipient *E. coli* CSH-2 at a frequency of 3.4×10^{-5} cells per recipient by conjugation in vitro, suggesting the easy dissemination of *bla*_{CTX-M}-harboring plasmids. Moreover, the transconjugants obtained showed both ESBL-producing and TMP/SMX-resistant phenotypes. Among uropathogenic *E. coli*, the serotype O25:H4 isolates harboring CTX-M-27 *bla*_{CTX-M} have become prevalent strains, so due care should be taken in monitoring the epidemiology of ESBL-producing isolates.