

[原 著]

Modified Hodge Test におけるエルタペネムディスクの有用性の評価および
検査精度向上の試み

村 竜輝¹⁾・川村久美子¹⁾・荒川宜親²⁾

¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・病態解析学

²⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科・総合医学専攻・分子病原細菌学/耐性菌制御学

(平成 26 年 7 月 1 日受付, 平成 26 年 9 月 16 日受理)

カルバペネマーゼ産生菌 100 株および非産生菌 45 株を用いて, modified Hodge test (MHT) におけるエルタペネム (ertapenem, ERT) ディスクの有用性を評価した。ERT, イミペネム, メロペメム (meropenem, MEPM) ディスクの感度は 93%, 82%, 83% であり, 3 剤のなかで ERT ディスクの感度が最も優れていた。ERT ディスクは, *Pseudomonas* 属菌 27 株中 3 株および *Acinetobacter* 属菌 19 株中 2 株を, カルバペネマーゼ別では OXA-23 型 4 株中 1 株および VIM-1 型の 1 株を検出することができなかったが, NDM-1 産生菌のように複数の β -ラクタマーゼを同時産生する株については, 他の 2 薬剤よりも正確に検出することができた。一方, extended-spectrum β -lactamase 産生菌や *Pseudomonas* 属菌を対象とした特異度の検討では, MEPM ディスク (43/45 株, 95.6%) よりも ERT ディスク (40/45 株, 88.9%) の方が低くなる傾向が認められたが, β -ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸もしくはクロキサシリンの添加により偽陽性株が 5 株から 1 株に減り特異度が向上した。MHT のような表現型試験の判定には経験を要し, また, 明確な数値設定がないため測定者間で差異が生じる場合があるが, ERT ディスクは阻止円が明瞭であるため判定が容易で, 他の 2 薬剤よりも測定者間の差が生じ難い利点もあった。適切な治療薬の選択および感染制御の面から, カルバペネマーゼ産生菌の正確な検出は今後益々重要になるとと思われる。MHT における ERT ディスクの使用は日常検査におけるカルバペネマーゼ産生菌の検出に有用であると思われる。

Key words: modified Hodge test, エルタペネムディスク, カルバペネマーゼ産生菌

1. 序文

カルバペネマーゼとは, カルバペネム系抗菌薬を含む多くの β -ラクタム系抗菌薬を加水分解する一群の酵素の総称であり, その遺伝子型から IMP-型, VIM-型, NDM-型などのメタロ- β -ラクタマーゼ, および KPC-型, OXA-型, GES-型などのセリン型 β -ラクタマーゼに分類されている^{1)~3)}。本酵素をコードする遺

伝子の多くは伝達性 plasmid 上に存在しており, 菌種・菌株間を越えて遺伝子が伝播しやすい傾向にある³⁾⁴⁾。さらに, 本遺伝子保有菌は, フルオロキノロンやアミノグリコシドなど他の系統の薬剤にも耐性を獲得した多剤耐性菌であることが多い⁴⁾。したがって, カルバペネマーゼ産生菌による感染症では, カルバペネム系抗菌薬による治療が困難であるばかりでなく, 他系統の抗菌薬の効果も期待できないことが多く, 血流感染症では最大半数が死亡するとの報告⁵⁾もある。現在, 日本で分離されるカルバペネマーゼ産生菌の割合は諸外国に比べ低いものの⁶⁾, 海外からの輸入事例も報告されており⁷⁾, 臨床現場におけるカルバペネマーゼ産生菌の正確な検出が重要になりつつある。

現在, 微生物検査室で行われているカルバペネマーゼ産生菌の検査法としては, PCR 法, double disk syn-

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸南 1-1-20
名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学
専攻・病態解析学
川村久美子
TEL: 052-719-3116
FAX: 052-719-1506
E-mail: kumiko@met.nagoya-u.ac.jp

ergy test (DDST), modified Hodge test (MHT) などがある²⁸⁾。しかし、阻害剤に対する特異性が低い²⁾などの理由から、一部のカルバペネマーゼ産生菌については、DDSTによる検出が困難な場合がある。一方、MHTについては特異性の問題が指摘されているものの⁹⁾、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のドキュメント²¹⁰⁾に記載されていること、安価で簡便な方法であることから、現在多くの施設で実施されている。

MHT は表現型試験の一つで、画線塗抹した被検菌がカルバペネマーゼ産生菌ならば、それによって中心に置いたディスクから拡散されるカルバペネム系抗菌薬が不活化され、培地一面に塗抹された指標菌が被検菌に沿って発育するという原理に基づいている。現在、イミペネム(imipenem, IPM)、メロペネム(meropenem, MEPM)、エルタペネム(ertapenem, ERT)など各種カルバペネム系抗菌薬ディスクが使用されているが、ディスクの種類によって検出精度が異なることが指摘されており¹¹⁾、CLSIはMEPMおよびERTディスクの使用を推奨している¹²⁾。本研究では、ERTディスクの試用機会を得、臨床分離株145株を用いてMHTにおけるERTディスクの有用性を評価するとともにMHTの検査精度の向上を試みたので報告する。

II. 材料および方法

使用菌株

複数のβ-ラクタマーゼ同時産生菌23株を含むカルバペネマーゼ産生臨床分離株100株(IMP型76株、VIM型9株、KPC型2株、NDM型2株、OXA型10株、SMB型1株、IPMもしくはMEPMのMICが0.5 μg/mL以上の株)を用いた。陰性対照としては、カルバペネム耐性を示すがPCR法にてカルバペネマーゼ関連遺伝子を保有していないことを確認した *Pseudomonas aeruginosa* 20株(IPMもしくはMEPMのMICが16 μg/mL以上の株)および *Enterobacter cloacae* 5株(IPMもしくはMEPMのMICが0.5 μg/mL以上の株)、さらにカルバペネム感性のCTX-M型基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(extended spectrum β-lactamase, ESBL)産生腸内細菌科菌種20株(*Escherichia coli* 17株、*Klebsiella pneumoniae* 3株)(IPMおよびMEPMのMICが0.5 μg/mL未満の株)を使用した。なお、カルバペネマーゼ産生菌の分類については、IMP型、VIM型、SMB型およびNDM型はMEPMおよびメルカプト酢酸ナトリウム(sodium mercaptoacetic acid, SMA)を用いたDDSTにて陽性を確認するとともに、PCRおよびシーケンスにて遺伝子型を決定、KPC型およびOXA型については、シーケンスにて遺伝子型を確認した。ESBL産生菌はcefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) およびクラブラン酸を用いたDDSTにて陽性を確認するとともに、PCRおよびシーケンスにて遺伝子型を決定、プラスミド性AmpC型β-ラクタマーゼ産生菌についてはCTX, CAZおよびボロン酸を用いたDDSTにて陽性を確認するとともに、PCRおよびシーケンスにて遺伝子型を確認した。

また、MHTの指標菌として、*Escherichia coli* ATCC 25922 (エアブラウン社)を、陽性コントロール株として *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (エアブラウン社)、陰性コントロール株として *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (エアブラウン社)をそれぞれ使用した。

Modified Hodge test (MHT)

MHTはCLSI勧告法¹⁰⁾に準拠し以下のように実施した。はじめにMcFarland No. 0.5に調整した *E. coli* ATCC 25922を、Mueller Hinton (M-H) broth (Becton Dickinson)にて10倍に希釈した。この希釈菌液を滅菌綿棒(栄研化学株式会社)でM-H agar (Becton Dickinson)一面に塗布し、表面の乾燥を確認した後、寒天平板の中心部に薬剤ディスクを置いた。次に白金耳で被検菌、陽性コントロール株(*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705)および陰性コントロール株(*K. pneumoniae* ATCC BAA-1706)をそれぞれディスクの端から培地の外側へ画線塗抹し、35±2°Cで18±2時間培養した。なお、薬剤ディスクは、イミペネムディスク“KBディスク栄研IPM”(10 μg/disk, 栄研化学)、メロペネムディスク“KBディスク栄研MEPM”(10 μg/disk, 栄研化学)、エルタペネム試作ディスク(10 μg/disk, 栄研化学)の3種類を用い、それらの検出精度を比較した。

Modified Hodge test (MHT)

判定はFig. 1に示すごとく、阻止円と画線した菌が交差する部分の形態の変化から陽性および陰性を含む4つに分類した。指標菌が被検菌に沿ってディスク方向に発育している場合を「陽性」(Fig. 1-A. positive)、指標菌が被検菌の塗布に関係なく、円形阻止円を形成した場合を「陰性」(Fig. 1-B. negative)、指標菌が被検菌に沿って弱い発育を示した場合を弱陽性を疑う「不確かな結果」(Fig. 1-C. equivocal result)、被検菌沿いに指標菌が2 mm以上発育阻害されている場合を「判定不能」(Fig. 1-D. not-determinate result)とした。本測定は異なる実験日に3回行ない、2回以上同様な結果が得られた場合にはその結果を採用し、3回

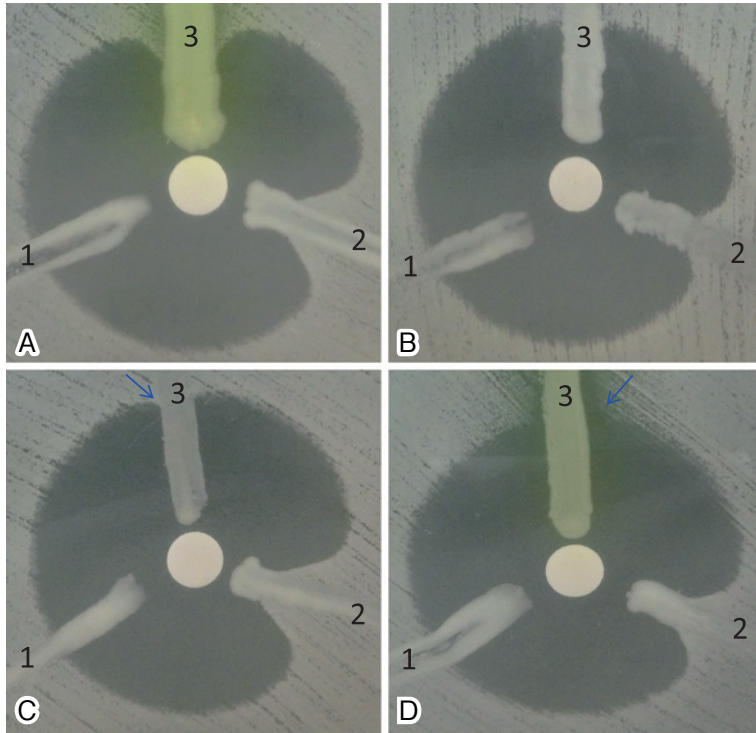


Fig. 1. Interpretive criteria of modified Hodge test for detecting carbapenemase-producers. The modified Hodge test was performed according to the recommendation of the CLSI (9). *E. coli* ATCC 25922 was used as an indicator strain, and IMP, MEPM or ERT disk was used as the substrate (10 µg/disk, Eiken Co. Ltd.) disk, respectively. 1. Positive control strain (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705), 2. Negative control strain (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1706), 3. Test organism. (A) Positive result, (B) Negative result, (C) equivocal result. The inhibition pattern could be interpreted as weak positive result by the presence of minor distortion of the growth inhibition zone (arrow). (D) Not-determinate result due to inhibition of growth of the indicator strain. The production of carbapenemase could be interpreted as equivocal result (not-determinate result) due to inhibition of growth of the *E. coli* ATCC 25922 strain alongside the streak of bacterial isolate tested (arrow).

とも異なる結果を得た場合には「判定保留」とした。また、弱陽性を疑う「不確かな結果」については、2名の判定結果が一致した場合のみ結果を採用し、2名が異なる判定をした場合には、その菌株は「判定保留」とした。なお、感度と特異度は以下のように算出した。感度 = 陽性と判定された株数/カルバペネマーゼ産生株 (100株) × 100 (%), 特異度 = 陰性と判定された株数/カルバペネマーゼ非産生株 (45株) × 100 (%).

硫酸亜鉛添加による改善の試み

メタロ-β-ラクタマーゼ (metallo-β-lactamase, MBL) は活性中心に亜鉛が存在するため¹³⁾, 培地中への硫酸亜鉛の添加は MBL の活性を強め, 結果として検出感度が向上することが報告されている¹¹⁾。そこで, 本研究では, IMP, MEPM, ERT ディスクのいずれかで「陰性」, 「不確かな結果」もしくは「判定不

能」と判定された MBL 産生株を対象に, 硫酸亜鉛添加による結果改善を試みた。方法は, 硫酸亜鉛 (和光純薬株式会社) を最終濃度 100 µg/mL となるように M-H agar に添加し, その寒天平板を用いて MHT を行なった¹¹⁾。なお, 薬剤ディスクは IMP, MEPM, ERT ディスクの3種類を用いた。

クロキサシリンおよびクラブラン酸添加による改善の試み

カルバペネマーゼ非産生株 45 株のうち, IMP, MEPM, ERT ディスクのいずれかで「陽性」, 「不確かな結果」もしくは「判定不能」と判定された株を対象に, β-ラクタマーゼ阻害剤添加による結果改善を試みた。*P. aeruginosa* については, 染色体性 AmpC 型 β-ラクタマーゼ阻害剤であるクロキサシリン (cloxacillin, 東京化成工業株式会社) を 750 µg/disk¹⁴⁾ とな

るように、また CTX-M 型 ESBL 産生株については、ESBL の阻害剤であるクラバン酸 (clavulanic acid, 和光純薬) を 10 µg/disk となるように、各々 ERT ディスクに添加し MHT を実施した。

統計解析学的検定

統計学的検定には χ^2 検定を行ない、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

III. 結果

1. 感度

カルバペネマーゼ産生株 100 株を対象に MHT の感度を検討した。結果、ERT ディスクの感度は 93% (93/100 株)、IPM ディスクは 82% (82/100 株)、MEPM ディスクは 83% (83/100 株) となり、ERT ディスクの感度が最も優れていた。また、ERT ディスクは CTX-M 型 ESBL や CMY-型 β -ラクタマーゼなどカルバペネマーゼ以外の β -ラクタマーゼを同時に産生する菌株においても、他の 2 剤よりも正確にカルバペネマーゼ産生性を検出することができた (Table 1)。

1-1. 菌種別の検出感度

菌種別に感度を比較した結果を Table 2 に示す。腸内細菌科菌種においては、複数の β -ラクタマーゼを同時産生する *E. coli* で 3 薬剤間に感度の差が認められたものの、他の菌種では大きな差は認められなかった。一方、*Pseudomonas* 属菌および *Acinetobacter* 属菌においては、腸内細菌科菌種よりも感度が低くなる傾向が認められた。3 剤の中では、ERT ディスクが最も良好な感度を示し、以下 *Pseudomonas* 属菌では、MEPM ディスク > IPM ディスク、*Acinetobacter* 属菌では IPM ディスク > MEPM ディスクとなった。

1-2. カルバペネマーゼ別の検出感度

カルバペネマーゼ別に感度を比較した結果を Table 1 に示す。ERT ディスクは、NDM-型カルバペネマーゼ産生株も含め、全てのタイプのカルバペネマーゼ産生株を、88% を越える感度で検出することができた。詳細に見ると、IMP-型カルバペネマーゼ産生株では一部の IMP-1 産生株を検出できなかったものの、その感度 (93.4%, 71/76) は IPM ディスク (80.3%, 61/76) (ERT vs. IPM, $p = 0.016$) や MEPM ディスク (85.5%, 65/76) (ERT vs. MEPM, $p = 0.186$) よりも高い値となった。OXA-型カルバペネマーゼ産生株の中では OXA-23 の検出で、VIM-型カルバペネマーゼ産生株の中では VIM-1 の検出で、ERT ディスクの感度が低くなる傾向が認められた。他の 2 薬剤についてみると、IPM ディスクは、IPM に感受性、MEPM に耐性という逆転現象が認められる IMP-6 産生株

で、MEPM ディスクは OXA-23 産生 *Acinetobacter* 属菌で感度が低くなる傾向が認められたが、その他の菌種では両者はほぼ同等の感度を示していた。

2. 特異度

カルバペネマーゼ非産生株 45 株を対象に MHT を試みた結果、ERT ディスクの特異度は、88.9% (40/45 株)、IPM ディスクは 86.7% (39/45 株)、MEPM ディスクは 95.6% (43/45 株) と、3 剤の中で MEPM ディスクが最も優れていた。詳細にみると、*P. aeruginosa* 20 株中 18 株を「陰性」、2 株を「判定不能」とした結果は 3 薬剤とも同じであったが、CTX-M 型 ESBL 産生株では MEPM ディスクが全例「陰性」であったのに対し、IPM ディスクと ERT ディスクは 3-4 株で弱陽性を疑う「不確かな結果」となった。なお、*E. cloacae* 5 株については 3 薬剤とも「陰性」の結果を得た。

3. 硫酸亜鉛および各種阻害剤添加による検査精度改善の試み

カルバペネマーゼ産生株 100 株のうち、IPM、MEPM、ERT ディスクのいずれかで「陰性」、「不確かな結果」もしくは「判定不能」と判定された株は 21 株であった。このうち、活性中心に亜鉛をもつ MBL 産生株 17 株を対象に硫酸亜鉛添加試験を行った (Table 3)。ERT ディスクは「陰性」、「不確かな結果」もしくは「判定不能」となった株が 17 株中 5 株と 3 薬剤の中で最も少なく、このうち VIM-1 産生 *P. aeruginosa* 1 株が硫酸亜鉛の添加で陽性になった。一方、IPM ディスクでは 14 株、MEPM ディスクでは 11 株が「陰性」、「不確かな結果」もしくは「判定不能」と判定された。それらのうち、IPM ディスクで弱陽性を疑う「不確かな結果」と判定された 10 株中 6 株、MEPM ディスクの 6 株中 5 株が、硫酸亜鉛の添加により明らかな陽性となった (Table 3)。

CTX-M 型 ESBL 産生株において弱陽性を疑う「不確かな結果」と判定された株に対しては ESBL の阻害剤であるクラバン酸を、染色体性 AmpC 型 β -ラクタマーゼの過剰発現および透過性の低下によるカルバペネム耐性が考えられる *P. aeruginosa* 2 株に対しては cloxacillin を、各々 ERT ディスクに添加し再検査した。その結果、各阻害剤の添加により、4 株 (*P. aeruginosa* 2 株、CTX-M 型 ESBL 産生株 2 株) は陰性となり特異度の改善が認められた。また、IMP-型カルバペネマーゼと CTX-M 型 ESBL の両方を同時産生する株に対して同様に阻害剤の添加試験を行なったが、これら試薬が被検菌のカルバペネム系抗菌薬の不活化作用を阻害することはなかった。

Table 1. Sensitivity of three kinds of disks in various carbapenemase producers

Species (no. of isolates)	Genotype (s) (no. of isolates)	Positive results of MHT			Range of MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a	
		ERT	IPM	MEPM	IPM	MEPM
<i>E. coli</i> (11)	IMP-1 (5)	4/5	4/5	4/5	0.5 - 4	≤ 0.25 - 4
	IMP-1 + CTX-M-15 (1), IMP-1 + CTX-M-27 (1), IMP-1 + SHV-38 (1), IMP-1 + TEM-52 (1) IMP + CMY-2 (1), IMP-1 + CMY-9 (1)	4/4	3/4	3/4	1 - 8	0.5 - 8
<i>K. pneumonia</i> (9)	IMP-1 (6)	2/2	1/2	1/2	2 - 32	≤ 0.25 - 16
	IMP-1 + CTX-M-2 (1)	6/6	6/6	6/6	1 - 64	2 - 32
	IMP-1 + CTX-M-14 + DHA-1 (1)	1/1	1/1	1/1	0.5	2
	IMP-1 + CTX-M-3 + CMY-8 (1)	0/1	0/1	0/1	8	16
<i>S. marcescens</i> (12)	IMP-1 (12)	1/1	1/1	1/1	0.5	1
		12/12	12/12	12/12	32 - 256<	16 - 256<
<i>E. aerogenes</i> (1)	IMP-1 (1)	1/1	1/1	1/1	16	16
<i>E. cloacae</i> (2)	IMP-1 (1)	1/1	1/1	1/1	1	1
	IMP-1 + CTX-2 (1)	1/1	1/1	1/1	2	4
<i>C. freundii</i> (2)	IMP-1 (1)	1/1	1/1	1/1	4	8
	IMP-1 + CTX-M-2 (1)	1/1	1/1	1/1	2	1
<i>P. aeruginosa</i> (16)	IMP-1 (13)	11/13	7/13	9/13	128 - 256<	64 - 256<
	IMP-1 + TEM-7 (1), IMP-1 + TEM-10 (2)	3/3	3/3	2/3	256	256<
<i>P. putida</i> (3)	IMP-1 (3)	3/3	1/3	2/3	32 - 256<	256 - 256<
<i>Acinetobacter</i> sp. (9)	IMP-1 (9)	8/9	8/9	8/9	32 - 256<	0.5 - 64
<i>Acinetobacter</i> sp. (3)	IMP-2 (3)	3/3	3/3	3/3	32	8
<i>P. aeruginosa</i> (2)	IMP-11 (2)	2/2	1/2	2/2	256<	256<
<i>E. coli</i> (2)	IMP-6 + CTX-M-2 (2)	2/2	1/2	2/2	≤ 0.25	0.5 - 4
<i>K. pneumonia</i> (2)	IMP-6 + CTX-M-2 (2)	2/2	2/2	2/2	≤ 0.25 - 0.5	4 - 8
<i>C. freundii</i> (1)	IMP-6 + CTX-M-2 (1)	1/1	1/1	1/1	0.5	8
<i>E. cloacae</i> (1)	IMP-6 (1)	1/1	1/1	1/1	2	64
Sensitivity of IMP-type carbapenemase (n = 76)		71/76	61/76	65/76		
<i>P. aeruginosa</i> (1)	VIM-1 (1)	0/1	1/1	1/1	256	256<
<i>P. aeruginosa</i> (8)	VIM-2 (8)	8/8	7/8	7/8	128 - 256<	32 - 256<
Sensitivity of VIM-type carbapenemase (n = 9)		8/9	8/9	8/9		
<i>K. pneumoniae</i> (2)	KPC-3 (1)	1/1	1/1	1/1	256<	256<
	KPC-3 + SHV-11 (1)	1/1	1/1	1/1	256	256
Sensitivity of KPC-type carbapenemase (n = 2)		2/2	2/2	2/2		
<i>E. coli</i> (1)	NDM-1 + CTX-M-1 + CMY-4 (1)	1/1	1/1	0/1	32	16
<i>K. pneumoniae</i> (1)	NDM-1 (1)	1/1	0/1	1/1	4	16
Sensitivity of NDM-type carbapenemase (n = 2)		2/2	1/2	1/2		
<i>Acinetobacter</i> sp. (2)	OXA-40 (2)	2/2	2/2	2/2	256	256
<i>Acinetobacter</i> sp. (4)	OXA-23 (4)	3/4	3/4	1/4	32 - 64	32 - 64
<i>Acinetobacter</i> sp. (1)	OXA-58 (1)	1/1	1/1	0/1	32	16
<i>E. coli</i> (1)	OXA-48 + CTX-M-15 (1)	1/1	1/1	1/1	2	1
<i>K. pneumoniae</i> (2)	OXA-48 (1)	1/1	1/1	1/1	2	1
	OXA-48 + CTX-M-15 (1)	1/1	1/1	1/1	1	1
Sensitivity of OXA-type carbapenemase (n = 10)		9/10	9/10	6/10		
<i>S. marcescens</i> (1)	SMB-1 (1)	1/1	1/1	1/1	128	256<
Sensitivity of SMB-type carbapenemase (n = 1)		1/1	1/1	1/1		

^aMIC was determined by the agar dilution method according to the protocol recommended by the CLSI in document M100-A22. ERT, ertapenem; IPM, imipenem; MEPM, meropenem

Table 2. Sensitivity of three kinds of disks in various species

Species (no. of isolates)	Number of β -lactamases produced by each isolate	Positive results of MHT (Sensitivity %)		
		ERT	IPM	MEPM
<i>E. coli</i> (15)	one	4/5 (80)	4/5 (80)	4/5 (80)
	$2 \leq$	10/10 (100)	7/10 (70)	7/10 (70)
<i>K. pneumoniae</i> (16)	one	9/9 (100)	8/9 (88.9)	9/9 (100)
	$2 \leq$	6/7 (85.7)	6/7 (85.7)	6/7 (85.7)
<i>S. marcescens</i> (13)	one	11/11 (100)	11/11 (100)	11/11 (100)
	$2 \leq$	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
<i>E. aerogenes</i> (1)	one	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
	$2 \leq$	- ^a	-	-
<i>E. cloacae</i> (3)	one	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
	$2 \leq$	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
<i>C. freundii</i> (3)	one	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
	$2 \leq$	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
<i>P. aeruginosa</i> (27)	one	21/24 (87.5)	16/24 (66.7)	19/24 (79.2)
	$2 \leq$	3/3 (100)	3/3 (100)	2/3 (66.7)
<i>P. putida</i> (3)	one	3/3 (100)	1/3 (33.3)	2/3 (66.7)
	$2 \leq$	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. (19)	one	17/19 (89.5)	17/19 (89.5)	14/19 (73.7)
	$2 \leq$	-	-	-

ERT, ertapenem; IPM, imipenem; MEPM, meropenem

^a -, There was no isolates which co-produced plural classes of β -lactamases.

IV. 考察

カルバペネム耐性菌の増加，特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科菌種の世界的な広まりが深刻な問題となっており，適切な治療薬の選択および感染制御の観点から，カルバペネマーゼ産生菌の正確な検出が求められている。カルバペネマーゼ産生菌であることは，該当する耐性遺伝子をPCR法で確認するのが一般的であるが，国内の検査室では未だ実施困難な施設もあり，安価で簡便なMHTが多用されている。近年，Nordmannらは，コロニーから簡便にカルバペネマーゼを検出するCarba NP testの有用性を報告し¹⁵⁾，本年のCLSI Antimicrobial Susceptibility Testing ミーティング（2014年6月29日-7月1日開催）では，カルバペネマーゼ産生菌の検出法としてMHTからの移行が承認された。このように次年度のCLSIドキュメントではスクリーニング方法が変更されるなど，耐性菌とその発見方法を取り巻く状況は日々変化しており，我々はその変遷を踏まえながら，現状ででき得る最も正確な検出方法を常に模索し，実施していく必要があるものと考え。そこで，本研究では国内の臨床分離株を用いてMHTにおけるERTディスクの有用性と検査精度向上について検討した。

本研究では，ERTディスクで最も高い感度（93%）

を得た。この結果は，諸外国の報告¹⁶⁾¹⁷⁾と一致しており，ERTディスクが優れた検出感度を有していることが確認された。一方，カルバペネマーゼ産生ブドウ糖非発酵菌における感度の低下傾向は過去にも報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾が，本研究でも3薬剤共にこの傾向が認められており，特に，*Pseudomonas* 属菌におけるIPMディスクの感度（66.7%）に顕著に現れていた。この感度の低下は，ピオシアニンやピオベルジンなどの色素が指標菌の発育を阻害したことも一因であると考えられた。Girichらは，腸内細菌科菌種が産生するコリシンによる指標菌の発育阻害を報告しており¹¹⁾，被検菌による発育阻害はMHTでは避けられない問題であると思われる。今回の使用経験では，ERTディスクはこれら発育阻害の影響を受け難く，「判定不能」と判定される株は3剤中最も少なかった。その意味でもERTディスクはMHTに適したディスクであると考えられる。

近年，国内でもNDM-型，KPC-型およびOXA-型カルバペネマーゼ産生株が輸入事例として報告されつつある⁷⁾が，本研究でERTディスクは，これらカルバペネマーゼ産生株を正確に検出することができた。特にNDM-1産生株は，SMAにより阻害されないCMY型やCTX-M型の β -ラクタマーゼを同時に産生

Table 3. Influence of zinc sulfate in Mueller-Hinton agar for 17 carbapenemase-producing isolates

Species	Genotype (s)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a for:		MHT results for ERT ^b		MHT results for IPM ^b		MHT results for MEPM ^b	
		IPM	MEPM	MHA	MHA + ZnSO ₄ ^c	MHA	MHA + ZnSO ₄ ^c	MHA	MHA + ZnSO ₄ ^c
<i>E. coli</i>	IMP-1 + CMY-2	2	0.25 \geq	+	+	w ^c	+	w	-
<i>E. coli</i>	NDM-1 + CTX-M-1 + CMY-9	32	16	+	+	+	+	w	+
<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1 + CTX-M-14 + DHA-1	8	16	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	4	16	+	+	w	w	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	128	128	+	+	w	+	w	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	128	128	+	+	w	w	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	256	256<	-	ND	ND	ND	-	ND
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	256	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	256<	256<	+	+	ND	+	w	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	256	256<	+	+	+	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-1	256	256	+	+	w	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	IMP-11	256<	256<	+	+	w	+	+	+
<i>P. putida</i>	IMP-1	32	256<	+	+	w	w	w	+
<i>P. putida</i>	IMP-1	256<	256<	+	+	w	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> sp.	IMP-1	128	0.5	-	-	w	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-1	256<	256	w	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	256<	256	+	+	w	+	w	+

^a MIC was determined by the agar dilution method according to the protocol recommended by the CLSI in document M100-A22.

^b Results were indicated by positive (+), negative (-), and equivocal cases like weak positive (W), and not-determinable cases due to inhibition of growth of the *E. coli* ATCC 25922 along the tested isolate as shown Fig. 1 D (ND).

^c MHT was performed using M-H agar incorporating with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ZnSO₄.

ERT, ertapenem; IPM, imipenem; MEPM, meropenem; MHA, Mueller-Hinton agar

していることが多く、SMA ディスクと CAZ ディスクを用いた DDST の原法では偽陰性と判定されやすいことが報告されている²⁰⁾。使用できる菌株数が未だ少ないため、多くの知見は海外の報告に頼らざるを得ないが、今回の検討で ERT ディスクは IPM や MEPM ディスクよりも NDM-1 産生菌のような複数酵素同時産生菌を正確に検出できる可能性が示唆された。一方、OXA 型カルバペネマーゼ産生菌についてはテモシリンの有用性が報告されているもの²¹⁾、国内の検査室には未だ普及しておらず、多くの施設では MHT を実施している。今回の検討では、3 薬剤とも OXA-23 産生株に対し検出感度が低くなる傾向が見受けられた。本菌の IPM および MEPM の MIC はいずれも 32-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、MHT で正確に検出できた OXA-48 産生株のそれよりも高値であったことから、この偽陰性は MIC 値に起因するものではないと思われる。

MHT は、阻止円の歪みからカルバペネマーゼ産生を推測する方法であり、ESBL や AmpC といったカ

ルバペネマーゼとは性質の違う β -ラクタマーゼによる偽陽性例がしばしば問題になることが指摘されている^{22)~24)}。Vasoo らは、CMY-2 型 β -ラクタマーゼ産生 *E. coli* の 4 株中 2 株で、また CTX-M 型 ESBL 産生 *E. coli* の 7 株中 1 株で偽陽性になることを報告しており²⁴⁾、本研究においても、CTX-M 型 ESBL 産生菌 20 株中 3 株が ERT ディスク使用時に弱陽性を疑う「不確かな結果」になることを確認している。国内の臨床分離腸内細菌科菌種における plasmid 性 AmpC 型 β -lactamase 関連遺伝子の保有率は約 2% と未だ低いものの、ESBL 関連遺伝子の保有率は約 10% と高値であり²⁵⁾、MHT 実施の際には、その影響を考慮する必要がある。今回の検討で、ESBL 産生菌についてはクラバン酸の添加により弱陽性を疑う「不確かな結果」から「陰性」に、また、染色体性 AmpC 型 β -ラクタマーゼの過剰産生が疑われる *P. aeruginosa* については cloxacillin 添加で「判定不能」から「陰性」へと、それぞれ阻害剤の添加による結果の改善が確認できた。幸いにもこれら薬剤が被検菌によるカルバペネム

系抗菌薬の不活化作用を阻害することはなく、実際の検査にこれら薬剤を添加することは可能であると考えられる。例えば、腸内細菌科菌種を検査対象とする場合には、ESBL産生菌であることを前提にクラブラン酸を、また、*P. aeruginosa* など染色体性 AmpC 型 β -ラクタマーゼの過剰発現および透過性の低下が予想される菌株に対しては、cloxacillin を予め ERT ディスクに添加することで、偽陽性を減らすことが可能かもしれない。なお、今回、腸内細菌科菌種については *E. cloacae* 5 株を検討したに留まっており、引き続き、AmpC 型 β -ラクタマーゼを過剰産生する腸内細菌科菌種について検討したいと考えている。

MHT における感度の改善方法として、Girlich らが M-H agar に硫酸亜鉛を添加する方法を報告している¹¹⁾。本研究においても、硫酸亜鉛の添加によって IPM ディスクや MEPM ディスクの陽性数が顕著に増加した。これらの結果は、MHT 実施の際、硫酸亜鉛の添加は必須であることを示唆している。一方、ERT ディスクでは、「陰性」、「不確かな結果」もしくは「判定不能」と判定された株は 3 剤の中で最も少なく、このことは ERT ディスク使用の大きなメリットといえる。CLSI の判定基準では「指標菌の発育の増強がみられれば陽性、増強がみられなければ陰性とする」と記載されているが、この判定には明確な数値基準が存在しないため、判定が主観的になることは避け難い。実際に、今回の検討でも複数の測定者で同時判定を行なったところ、測定者間で判定に差異が生じる場合が多々あった。ERT ディスクは阻止円と画線した菌が交差する部分が明瞭であるため、判定差異は 3 薬剤のなかで最も少なくなった。偽陰性が少ないこととともに判定がしやすいことは、MHT のような表現型試験においては大きなメリットであり、先の改善策とともに検査精度向上に寄与するものであると考える。

本研究で MHT における ERT ディスクの有用性を確認した。ERT ディスクは高い感度を有しており、測定者間の差異も少ない利点がある。特異度は MEPM ディスクよりもやや低い傾向にあるが、cloxacillin やクラブラン酸を添加することで、特異度を向上させることが可能である。幸い日本で分離されるカルバペネマーゼ産生菌の割合は諸外国に比べ低い水準を維持しているが、諸外国からの輸入事例が増加する可能性もあり、カルバペネマーゼ産生菌の正確な検出は今後益々重要になると思われる。ERT ディスクの早期導入による検査精度の向上が期待される。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、エルタペネム

(ERT) 試作ディスクのご提供を頂きました栄研化学株式会社様、統計解析にご指導賜りました名古屋大学大学院医学系研究科 近藤高明教授に心より御礼申し上げます。また、NDM-1 型 MBL 産生株を分与頂きました、獨協医科大学 菱沼昭教授ならびに(株)ミロクメディカルラボラトリー 柳澤英二社長、KPC 型 β -ラクタマーゼ産生 *K. pneumoniae* を分与頂きました、九州大学医学部附属病院検査部 江藤ふじ子先生、IMP-6 産生腸内細菌科菌種を分与頂きました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 菅井基行教授に厚く御礼申し上げます。

利益相反：申告すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) Bush, K., G. A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 969-976.
- 2) Nordmann, P., T. Naas, L. Poirel. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1791-1798.
- 3) Bush, K., J. F. Fisher. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 455-478.
- 4) Nordmann, P., L. Doetel, L. Poirel. 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol. Med.* 18: 263-272.
- 5) Francisco, C. N., M. Mora-Rillo, M. P. Romero-Gómez, et al. 2012. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. *Clin. Microbiol. Infect.* 19: E72-79.
- 6) Suzuki, S., K. Yamane, J. Wachino, et al. 2012. Three months survey of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. *Nihon Rinsho* 70: 187-191.
- 7) Nagano, N., Y. Endoh, Y. Nagano, et al. 2013. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 79-81.
- 8) Nordmann, P., M. Gniadkowski, C. G. Giske, et al. 2012. European Network on carbapenemase. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 432-438.
- 9) Vasoo, S., S.A. Cunningham, P.C. Kohner, et al. 2013. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified

- Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3097-3101.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth informational supplement. Document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 - 11) Girlich, D., L. Poirel, P. Nordmann. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 50: 477-479.
 - 12) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
 - 13) Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, et al. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 71-78.
 - 14) Giske, C. G., L. Gezelius, Ø. Samuelsen, et al. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 552-556.
 - 15) Nordmann, P., L. Poirel, L. Dortet. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1503-1507.
 - 16) Pasteran, F., T. Mendez, L. Guerriero, et al. 2009. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 47: 1631-1639.
 - 17) Miriagou, V., G. Cornaglia, M. Edelstein, et al. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 112-122.
 - 18) Bonnín, R.A., T. Naas, L. Poirel, et al. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1419-1421.
 - 19) Lee, K., Y.S. Lim, D. Yong, et al. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4623-4629.
 - 20) Hattori, T., K. Kawamura, Y. Arakawa. 2013. Comparison of test methods for detecting metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 512-518.
 - 21) van Dijk, K., G.M. Voets, J. Scharringa, et al. 2014. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: 345-349.
 - 22) Carvalhaes, C. G., R. C. Picão, A. G. Nicoletti, et al. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 249-251.
 - 23) Pasteran, F., T. Mendez, M. Rapoport, et al. 2010. Controlling false-positive obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1323-1332.
 - 24) Vasoo, S., S. A. Cunningham, P. C. Kohner, et al. 2013. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3097-3101.
 - 25) Matsumura, Y., M. Yamamoto, T. Higuchi, et al. 2012. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 40: 159-162.

Evaluation of ertapenem disks in modified Hodge test for detection of carbapenemases in Gram-negative bacteria

Tatsuki Mura¹⁾, Kumiko Kawamura¹⁾, Yoshichika Arakawa²⁾

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

²⁾Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

The aim of this study was to evaluate the performance of ertapenem (ERT) disk in modified Hodge test (MHT) for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. A total of 100 genotypically well-characterized carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and forty non-carbapenemase-producers were used in this study. Sensitivity rates for ERT disks, imipenem disks, and meropenem (MEPM) disks were 93%, 82% and 83%, respectively. Although ERT disks partially failed to detect carbapenemase-producers in *Pseudomonas* sp. (3 of 27 isolates), *Acinetobacter* sp. (2 of 19 isolates), OXA-23 type β -lactamase producers (1 of 4 isolates) and VIM-1 type β -lactamase producers (1 of 1 isolates), ERT disks showed the best sensitivity for detecting carbapenemase-producers co-producing other classes of β -lactamases, such as NDM-1 type β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. The specificity rate (88.9%) of ERT disks was slightly lower than that (95.6%) of MEPM disks, since false detection of carbapenemase production was observed in some non-carbapenemase-producing isolates, such as CTX-M-type ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa* overexpressing AmpC-type β -lactamase. However, incorporation of inhibitors such as clavulanic acid and cloxacillin to ERT disks increased the specificity of ERT disks. These techniques seem to be effective for the detection of carbapenemase even in bacterial isolates co-producing ESBL and/or AmpC-type β -lactamases. As in all phenotypic tests, interpretation is subjective and requires some experience, but ERT disks have the advantage of being easy to interpret compared to other disks. Rapid and accurate phenotypic detection of carbapenemase-producers is important for epidemiological purposes and for inhibiting the spread of resistant strains by implementing specific infection control measures. In conclusion, MHT using ERT disks would be useful for detecting carbapenemase-producers in the daily clinical laboratory workflow.