

[原 著]

院内伝播事例由来のカルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性  
*Klebsiella pneumoniae* ST37 株の分子疫学的解析

原田崇浩<sup>1)</sup>・外山雅美<sup>2)3)</sup>・長野由紀子<sup>3)4)</sup>・荒川宜親<sup>4)</sup>・長野則之<sup>3)5)</sup>

<sup>1)</sup> 独立行政法人国立病院機構千葉医療センター臨床検査科

<sup>2)</sup> 船橋市立医療センター微生物検査室

<sup>3)</sup> 国立感染症研究所細菌第二部

<sup>4)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学/耐性菌制御学分野

<sup>5)</sup> 信州大学大学院医学系研究科医療生命科学分野

(平成 27 年 3 月 25 日受付, 平成 27 年 6 月 29 日受理)

2012 年 12 月から 2013 年 4 月の間に同一病棟の入院患者 3 名の便よりカルバペネム系薬を含めた β-ラクタム系薬に加え, 他系統の薬剤に耐性を示す多剤耐性 *Klebsiella pneumoniae* Kp1, Kp2 株と, カルバペネム系薬感性を除きこれら 2 株と同じプロファイルを示す *K. pneumoniae* Kp3 株が検出された。3 名の入院期間に重複が認められ, 院内伝播が示唆されたことからこれら 3 株の分子学的解析を行った。全株でプラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼである DHA-1 の遺伝子の保有が確認された。加えてプラスミド性キノロン耐性因子の遺伝子 *qnrB* および 16S rRNA メチレーズの遺伝子 *armA* も保有していた。3 株は全て sequence type 37 と同定され, PFGE プロファイルも同一であった。これらの結果から多剤耐性 *K. pneumoniae* による院内伝播であることが結論づけられた。Kp1, Kp2 株ではカルバペネマーゼ遺伝子が検出されなかったことから, DHA-1 過剰産生に外膜蛋白欠損が加わることでカルバペネム系薬耐性を示すものと推測される。

なお, Kp3 株が検出された時点で病棟のアクティブサーベイランスを実施したが DHA-1 産生株は検出されなかった。その後継続的に, 接触感染予防策を中心とした院内感染対策を徹底しているが, 新規の本菌検出患者は認められていない。

**Key words:** *K. pneumoniae*, ST37, DHA-1, 院内伝播

序 文

カルバペネム系薬は, 腸内細菌科細菌の中でも特に基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase; ESBL) 産生株やプラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ産生株などに起因する重篤感染症治療の“最後の砦”となる抗菌薬である。しか

しながら 1990 年代の後半以降カルバペネム系抗菌薬を分解するカルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* や *Escherichia coli* などのカルバペネム系薬耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CRE) の世界的な広がりが治療並びに公衆衛生上深刻な問題となってきた。特に欧米やアジアを中心に KPC 型, NDM 型, OXA-48 型などのカルバペネマーゼ産生 CRE が高頻度に分離されているのに対し, わが国では IMP-1 や IMP-6 メタロ-β-ラクタマーゼ産生株が中心であるが, 分離頻度は非常に低い。しかしながらここ数年の間に海外からの輸入事例を中心に KPC 型, NDM 型, OXA-48 型カルバペネマーゼ産生 CRE が報告されてきていることから<sup>1)~3)</sup>, これら CRE の国内への流入および拡散が危

著者連絡先: (〒386-0022) 長野県上田市緑が丘 1 丁目 27-21

独立行政法人国立病院機構信州上田医療センター臨床検査科

原田崇浩

TEL: 0268-22-1890

E-mail: takharada0124@gmail.com

惧される状況である。このような背景から2014年9月に感染症法の改正が行われ、CRE感染症が新たに5類全数報告疾患の対象となった。

CREにはカルバペネマーゼ産生株と、カルバペネマーゼ非産生株があり、後者はESBLやAmpC β-ラクタマーゼの過剰産生に外膜蛋白の変化などによる薬剤透過性の低下が加わることでカルバペネム系薬に種々の程度で耐性を示すものである。カルバペネマーゼ産生CREが短期間で急速に世界規模での広がりを見せていることから注目されているが、カルバペネマーゼ非産生CREについても特に *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp. などの臨床分離株で散見されている。国内でもプラスミド性AmpC β-ラクタマーゼと外膜蛋白の欠損によるカルバペネマーゼ非産生CREの医療関連感染が報告されていることから<sup>4)</sup>、カルバペネマーゼ産生CREと同様にその動向を監視する必要があると考えられる。

本報ではカルバペネマーゼ非産生カルバペネム系薬耐性 *K. pneumoniae* の院内伝播を確認し、それらの株の分子生物学的特性について報告する。さらには表現型に基づくKPC型カルバペネマーゼ産生菌との鑑別上の注意点についても併せて報告する。

## 材料と方法

### 1. 対象

2012年12月、当センター外科病棟入院中の食道がんを基礎疾患とした70歳男性について術後管理の目的で実施された便培養から純培養状にカルバペネム系薬を含むβ-ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、フルオロキノロン系薬に加え、fosfomycin (FOM), minocycline (MINO) に耐性を示す *K. pneumoniae* Kp1株が検出された。患者はスペインを拠点に米国、中国、東南アジアへの渡航歴を有していた。その後同一病棟内で2013年3月に急性汎発性腹膜炎の55歳女性の便より、カルバペネム系薬感性である点を除いて同じ薬剤感受性プロファイルを示す *K. pneumoniae* Kp3株が検出された。2013年5月には胃がんの75歳男性の便よりKp1株と同一の薬剤感受性プロファイルを示す *K. pneumoniae* Kp2株が検出された。これら3株を解析の対象とした。

3名の患者はいずれも集中治療室での術後管理後外科病棟へ転棟していた。また、入院重複期間中の抗菌薬投与歴については *K. pneumoniae* Kp1株検出患者がmeropenem (MEPM) 0.5 g×2/dayを22日間、cefoxipran (CZOP) 1.0 g×1/dayを12日間、gentamicin (GM) 60 mg×2/dayを5日間投与されていた。また、

*K. pneumoniae* Kp2株検出患者はcefepime (CFPM) 1.0 g×1/dayを13日間、MINO 100 mg×2/dayを7日間、ceftazidime (CAZ) 1.0 g×2/day、MEPM 0.5 g×2/dayを30日間投与されていた。さらに *K. pneumoniae* Kp3株検出患者はceftriaxone (CTRX) 1.0 g×1/dayを9日間、doripenem (DRPM) 0.25 g×3/dayを9日間、cefazolin (CEZ) 1.0 g×2/dayを8日間、Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) 4.5 g×3/dayを3日間投与されていた。

### 2. 対象菌株の同定および薬剤感受性試験

*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3株の同定およびMIC測定はNeg Combo 6.11Jパネル及びNeg MIC 3.31Eパネルを用いMicroScan WalkAway 96 system (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス)により実施し、CLSI M100-S18の基準に従い判定を行った<sup>5)</sup>。また、colistin (CL)のMIC測定はE-test (シスメックス・ビオメリュー)により実施した。

### 3. 表現型に基づく各種β-ラクタマーゼのスクリーニング試験

#### 3-1. Modified Hodge test (MHT)

MHTはCLSI M100-S21に従い実施した<sup>6)</sup>。McFarland 0.5に調整した *E. coli* ATCC 25922株の菌液を滅菌生理食塩水で10倍希釈し、ミューラーヒントンII寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン)に塗布する。培地中央にertapenem (ETP)ディスクを置き、*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3株および陽性コントロール株(KPC-2産生 *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705)、陰性コントロール株(カルバペネマーゼ遺伝子非保有 *K. pneumoniae* 臨床分離株)を画線塗布し、35℃一夜培養後ETPディスクの阻止帯と被検菌および陽性コントロールの画線部の交点で *E. coli* ATCC 25922株の発育の増強が見られるものを陽性とした。また、ETPディスクにクロキサシリン(シグマアルドリッチ)750 μg/diskを添加したものをいMHTを実施した。

#### 3-2. 各種阻害剤を用いた酵素阻害試験

McFarland 0.5に調整した *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3株の菌液を塗布したミューラーヒントンII寒天培地を用い、以下の阻害試験を行った。

クラブラン酸による阻害試験は、CAZ, cefotaxime (CTX), aztreonam (AZT)の各々のディスク周囲に形成される菌の発育阻止帯(以下、阻止帯)の, amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA)ディスク方向への拡張の有無により判定した。

メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)による阻害試験は、CAZ, imipenem (IPM), MEPMの各々のディ

スクを単独で置いた場合に形成される阻止帯に比較し、SMA ディスク (栄研化学) と隣接させた場合に形成される阻止帯の拡張の有無により判定した。

3-アミノフェニルポロン酸 (ポロン酸; シグマアルドリッチ) による阻害試験は、CAZ, MEPM の各々のディスクを単独で置いた場合に形成される阻止帯に比較し、ポロン酸を 300 µg/disk に添加した場合に形成される阻止帯の 5 mm 以上の拡張の有無により判定した。

クロキサシリンによる阻害試験は、クロキサシリン 750 µg/disk を添加する以外はポロン酸阻害試験と同様に行った。

#### 4. β-ラクタマーゼ遺伝子及びその他の耐性因子の解析

MHT 及び各種酵素阻害試験の結果から推定される β-ラクタマーゼ遺伝子としてプラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼである CIT 型, EBC 型, FOX 型, MOX 型, DHA 型, ACC 型の遺伝子の検索を Perez-Perez らの方法に従い multiplex PCR にて実施した<sup>7)</sup>。さらに検出された遺伝子型について同一の primer を用い singleplex PCR を実施した。検出された遺伝子型の PCR 産物について BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ) 及び ABI 3730x/DNA analyser (アプライドバイオシステムズ) を用い、PCR ダイレクトシーケンシングにより構造遺伝子の塩基配列解析を実施した。

また、ポロン酸阻害試験の結果から保有の否定を目的に Pillai らの universal primers を用い KPC 型カルバペネマーゼ遺伝子の PCR 検索を実施した<sup>8)</sup>。

プラスミド性キノロン耐性因子 *qnrA* 型, *qnrB* 型, *qnrS* 型 及び 16S rRNA メチレーズの遺伝子 *armA*, *rmtB*, *rmtC* を PCR で検索した<sup>9)10)</sup>。

#### 5. Multilocus sequence typing (MLST) 解析

パスツール研究所の方法に従い 7 種のハウスキーピング遺伝子, *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB* の各々について PCR, 次いで塩基配列解析を実施した後、アレール解析と sequence type の決定を行った (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>)。eBURST 解析は eBURST version 3 にて実施した (<http://eburst.mlst.net>)。

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

PFGE 解析は長野らにより既に報告した方法に従い実施した<sup>11)</sup>。アガロースゲルブラグ中で、リゾチーム, 次いでプロテイナーゼ K 含有ドデシル硫酸ナトリウムにて抽出された染色体 DNA を 12.5 U の XbaI (タ

カラバイオ) と 37°C, 一夜インキュベートした。得られた制限酵素消化 DNA フラグメントを PFGE により分離した。分子量のサイズマーカーには Bacteriophage lambda DNA ladders (48.5 kb~1 Mb; タカラバイオ) を用いた。

## 結 果

### 1. 菌株の同定および薬剤感受性試験結果

被検株 3 株共に *K. pneumoniae* と再同定された。*K. pneumoniae* Kp1, Kp2 株に対するカルバペネム系薬の MIC は、IPM で >8 µg/ml, MEPM で 16 µg/ml と上昇していた。*K. pneumoniae* Kp3 株に対する IPM と MEPM の MIC はそれぞれ ≤1 µg/ml, ≤0.5 µg/ml と感性であった。また *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株に対する第 4 世代セファロsporin 系薬の cefpirome (CPR) の MIC はそれぞれ ≤8 µg/ml, >16 µg/ml, 16 µg/ml で CFPM の MIC はそれぞれ 2 µg/ml, 8 µg/ml, ≤1 µg/ml であった。TAZ/PIPC の MIC も全ての株で >64 µg/ml と耐性で、それ以外の β ラクタム系薬にも耐性であった。CTX 及び CAZ の MIC についてはクラブラン酸添加で有意な低下は認められなかった。また、アミノグリコシド系薬、フルオロキノロン系薬、FOM, MINO にも耐性であった。なお、CL の MIC は 3 株共に 0.38~0.125 µg/ml と低値であった (Table 1)。

### 2. MHT

ETP ディスクを用いた MHT の結果、*K. pneumoniae* Kp1 株で陰性、Kp3 株で弱陽性反応が認められたが、*K. pneumoniae* Kp2 株では陽性と判定された (Figure 1A)。ETP ディスクにクロキサシリンを添加し MHT を実施した場合、陽性コントロール株では陽性結果が維持されていたが、*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株では明瞭な陰性反応を示した (Figure 1B)。

### 3. 酵素阻害試験

クラブラン酸及び SMA による酵素阻害試験の結果、いずれの基質を用いた場合も陰性であった (data not shown)。このことから、クラス A の ESBL 及びクラス B のメタロ-β-ラクタマーゼの産生性は確認されなかった。

ポロン酸による酵素阻害試験では、*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株で CAZ を基質とした場合に阻止帯の拡張が認められた。MEPM を基質とした場合、*K. pneumoniae* Kp1, Kp2 株では明瞭な阻止帯の拡張が認められた。*K. pneumoniae* Kp3 株では阻止帯の拡張は認められなかった (Figure 2)。

クロキサシリンによる酵素阻害試験の結果、*K.*

Table 1. MICs of antimicrobials for *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, and Kp3

Antimicrobial agents	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Kp1	Kp2	Kp3
Ampicillin	>16	>16	>16
Amoxicillin/clavulanic acid	>16	>16	>16
Piperacillin	>64	>64	>64
Tazobactam/piperacillin	>64	>64	>64
Cefazolin	>16	>16	>16
Cefotiam	>16	>16	>16
Cefotaxime	128	>128	64
Cefotaxime/clavulanic acid	>32/4	>32/4	32/4
Ceftazidime	>128	>128	>128
Ceftazidime/clavulanic acid	>32/4	>32/4	>32/4
Cefpodoxime	>64	>64	>64
Cefcapene	>1	>1	>1
Ceftriaxone	16	>64	32
Cefozopran	>16	>16	>16
Sulbactam/cefoperazone	>32	32	>32
Cefpirome	$\leq 8$	>16	16
Cefepime	2	8	$\leq 1$
Cefotetan	>32	>32	32
Cefoxitin	>32	>32	>32
Cefmetazole	>32	>32	32
Aztreonam	>64	>64	64
Flomoxef	>32	>32	>32
Imipenem	>8	>8	$\leq 1$
Meropenem	16	16	$\leq 0.5$
Gentamicin	>8	>8	>8
Tobramycin	>8	>8	>8
Amikacin	>32	>32	>32
Levofloxacin	>4	>4	>4
Ciprofloxacin	>2	>2	>2
Minocycline	>8	>8	>8
Fosfomicin	>16	>16	16
Colistin <sup>a</sup>	0.125	0.125	0.38

<sup>a</sup>MIC results of the Etest

*pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株で CAZ の場合阻止帯の拡張が認められた (data not shown)。MEPM を基質とした場合は *K. pneumoniae* Kp1, Kp2 株で明瞭な阻止帯の拡張が認められた。これに対して *K. pneumoniae* Kp3 株ではボロン酸の場合と同様に阻止帯の拡張は認められなかった (Figure 2)。

#### 4. 各種耐性因子の分子学的解析

*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株についてプラスミド性 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検索を行った結果、DHA 型の遺伝子が検出され、構造遺伝子の塩

基配列解析で DHA-1 型セファロスポリナーゼの遺伝子 (*bla<sub>DHA-1</sub>*) と同定された。KPC 型カルバペネマーゼの遺伝子は検出されなかった。

また、全株でプラスミド性キノロン耐性遺伝子 *qnrB* 型、16S rRNA メチレーズの遺伝子 *armA* が検出された。

#### 5. MLST 及び PFGE 解析

*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株の MLST 解析の結果、3 株共に allelic profile 2-9-2-1-13-1-16 が得られ、ST37 型と同定された。eBURST 解析の結果から、ST37 は clonal complex (CC) 23 や CC258 とともに大きなグループに含まれていた (Figure 3)。

*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株は同一の PFGE プロファイルを示していた (Figure 4)。

#### 考 察

本研究ではカルバペネム系薬を含めた  $\beta$ -ラクタム系薬に加え、他系統の薬剤に耐性を示す多剤耐性 *K. pneumoniae* 株の院内伝播を経験し、これらの株の分子学的解析を行った。

最初に *K. pneumoniae* Kp1 株が検出された患者は、スペイン在住で、米国、中国、東南アジアなど諸外国への多数にわたる渡航歴が聴取された。スペインでは 2009 年に KPC-3 がマドリッドの老人介護施設より検出された事例<sup>12)</sup>をはじめ、アウトブレイク事例が散発している状況となっている<sup>13)14)</sup>。このことから、KPC 型カルバペネマーゼ産生菌などの持ち込みを強く疑ったことがカルバペネマーゼ遺伝子検出の動機づけとなった。さらに渡航歴のない 2 名の患者からもそれぞれ *K. pneumoniae* Kp2, Kp3 株が検出されたが、これら 3 株はカルバペネム系薬と第 4 世代セファロスポリン系薬の MIC の違いを除いて、CL を除く試験した全ての系統の薬剤に耐性を示す広範囲高度耐性株であった。

MHT では *K. pneumoniae* Kp2, Kp3 株が弱陽性～陽性で、カルバペネマーゼ産生の可能性が示唆された。しかしながら AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの特異的阻害剤であるクロキサシリンを ETP ディスクに添加し MHT を実施したところ、陰性と判定された。AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株では MHT が偽陽性となる場合があることが知られているが、このような試みが偽陽性反応を回避するのに有効な手段となる可能性も考えられる。

ボロン酸は AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ及び KPC 型カルバペネマーゼの阻害剤であるが、通常 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株では *K. pneumoniae* Kp3 株の結果

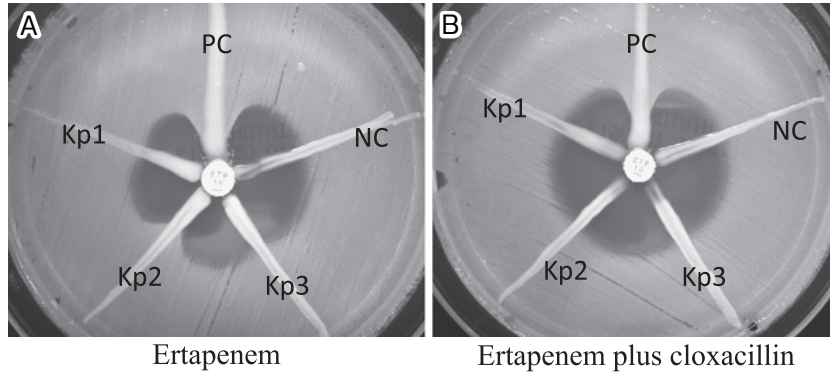


Figure. 1. Results obtained with the modified Hodge test (MHT) using ertapenem (A) and the cloxacillin-based MHT using ertapenem plus cloxacillin, 750  $\mu\text{g}$  per disk (B)

PC, positive control (KPC-2-producing *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705); NC, negative control (Non-carbapenemase-producing *K. pneumoniae*); Kp1, DHA-1 pAmpC-producing *K. pneumoniae*; Kp2, DHA-1 pAmpC-producing *K. pneumoniae*; Kp3, DHA-1 pAmpC-producing *K. pneumoniae*.

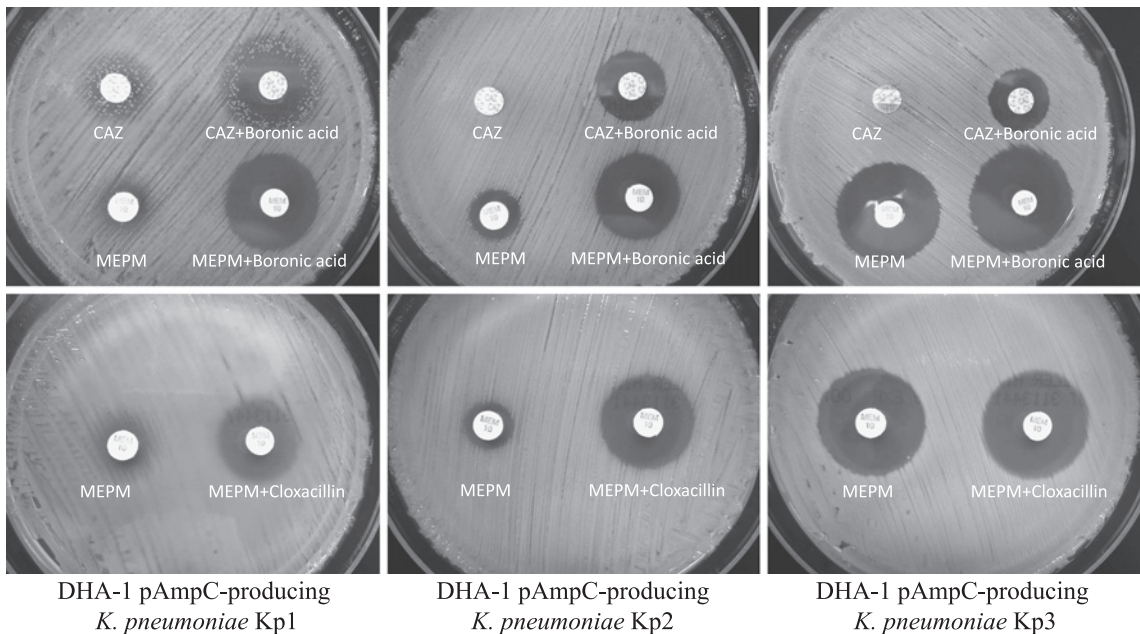


Figure. 2. Inhibitor-based test results for detecting AmpC  $\beta$ -lactamases among *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, and Kp3. Representative results using the boronic acid-based method without or with boronic acid, 300  $\mu\text{g}$ /disk (upper panel), and using the cloxacillin-based method without or with cloxacillin, 750  $\mu\text{g}$ /disk (lower panel) for *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, and Kp3.

CAZ, ceftazidime; MEPM, meropenem.

のように CAZ を基質とした場合阻害効果が認められるが、MEPM では阻害効果が認められない。しかしながら、同じく AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株の *K. pneumoniae* Kp1, Kp2 株では MEPM で阻害効果が

認められたことから、KPC 型カルバペネマーゼ産生株と誤判定される可能性がある。この場合、クロキサシリンを用いた酵素阻害試験でも阻害効果が認められたことから KPC 型カルバペネマーゼを産生していな



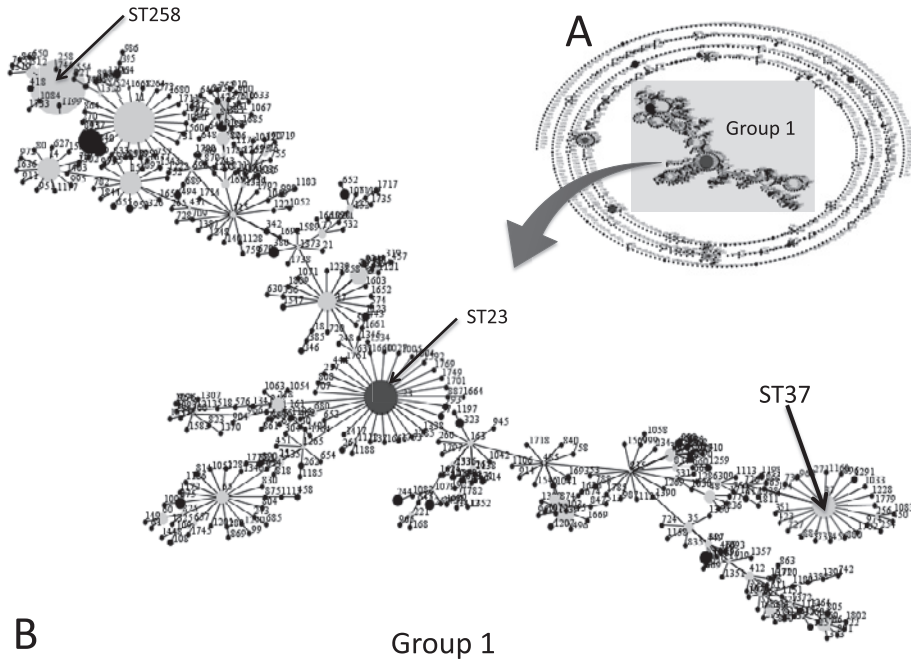


Figure 3. eBURST diagram of *K. pneumoniae* sequence types (STs). (A) Population snapshot of 1,401 STs from 2,429 isolates present in the MLST Pasteur database (last accessed March 13, 2015). (B) Partial snapshot of the largest eBURST group 1 including ST37 comprising 479 STs from 1,237 isolates

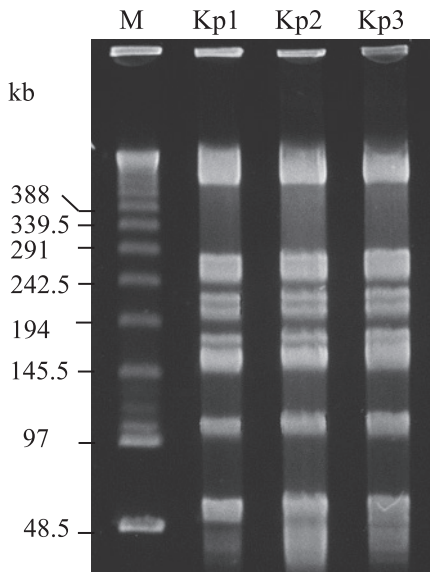


Figure 4. PFGE profiles of genomic DNA of *K. pneumoniae* Kp1, Kp2, and Kp3 digested with XbaI  
M, bacteriophage lambda DNA ladder as molecular size markers.

い可能性が示唆された。PCR 及び塩基配列解析の結果 3 株は誘導性型の DHA-1 型—AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子 *bla*<sub>DHA-1</sub> を保有し、KPC 型カルバペネマーゼ遺伝子を保有していないことが確認された。以上の結果から、*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株は DHA-1 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ過剰産生という点で共通しており、加えて Kp1, Kp2 株については外膜蛋白ポリンの減少あるいは欠損によってカルバペネム系薬耐性となっていることが推測される。CMY-2 や ACT-1, DHA-1 を含め一部のプラスミド性 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼにはごく弱いもののカルバペネム系薬に対する分解活性を示すものがあり、これら酵素の過剰産生と外膜蛋白の変化とが重なることでカルバペネム系薬に対する耐性度が強まることが報告されている<sup>15)</sup>。

*K. pneumoniae* Kp1, Kp2, Kp3 株は全て ST37 と同定されたがこの sequence type は、高病原性クローン ST23 とその類縁株 (CC23) や、KPC 型カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* の世界規模での広がりやアウトブレイクと関連する ST258 とその類縁株 (CC258) とともに大きなグループ (CC37) を形成していた。*K. pneumoniae* ST37 クローンは世界的に広く分布しており、KPC 型カルバペネマーゼ産生株で

も報告されている<sup>16)</sup>。さらにはDHA-1産生 *K. pneumoniae* ST37によるアウトブレイクがフランス、スペインで報告されている<sup>17)~19)</sup>。従って本報の株の遺伝的背景としてアウトブレイクを起こす危険性を有するクローンであったと考えられる。

データには示していないが *K. pneumoniae* Kp2, Kp3株が検出された2名の患者の各々からは、後にこれら便由来株と同一薬剤感受性プロファイルを示す *K. pneumoniae* 株が血液培養からも検出されていた。プラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ産生 *K. pneumoniae* に起因する血流感染症のリスク因子として、痛患者であることに加え、中心静脈カテーテル使用、尿道留置カテーテル使用、集中治療室での治療歴、長期入院歴および広域スペクトラムセファロsporin系薬投与歴などがあげられるが<sup>20)</sup>、本事例においても、広域スペクトラムのセファロsporin系薬、カルバペネム系薬など多系統の抗菌薬を投与されていたことに加え、これらのリスク因子に該当するプロファイルが各々の患者で認められた。*K. pneumoniae* Kp1株が検出された最初の患者では後に腹水及び喀痰から便由来株と同一薬剤感受性プロファイルを示す *K. pneumoniae* 株が検出され、且つ5か月経過後も喀痰より同じプロファイルの菌が認められ、長期にわたり保菌されることが確認された。

本報の3株についてはDHA-1型-AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla<sub>DHA-1</sub>* に加え、*qnrB*、*armA* の保有が確認された。*armA* は2002年に *Citrobacter freundii* より検出され世界中に最も広がりつつある16S rRNAメチレーズであるが、国内での *K. pneumoniae* における本遺伝子保有の報告は極めてまれである<sup>21)</sup>。加えてフルオロキノロン及びホスホマイシン耐性など多系統の薬剤に耐性を示す多剤耐性株であり、カルバペネマーゼを産生しない株であったとはいえ、侵襲性が高く且つ医療環境で拡がりやすい *K. pneumoniae* ST37の流行株 (epidemic strains) であったことから<sup>17)19)</sup>、院内拡散を防止する目的で強力な院内感染対策を講ずる必要があるものと思われる。当センターでは *K. pneumoniae* Kp3株が検出された時点で病棟のアクティブサーベイランスを実施した。環境検査は病室・病棟の廊下・手すり・便所などの拭い液を対象とし、医療従事者および既入院患者は糞便を対象とした。その結果、いずれの材料からもDHA-1産生株は検出されなかったため、初回のサーベイランスのみで終了した。その後継続的に、接触感染予防策を中心とした院内感染対策を徹底しているが、新規の本菌検出患者は認められていない。現在、海外医療機関での治療歴や

渡航歴のある患者に対する入院時の耐性菌スクリーニング実施など、適切な院内感染対策の実施に向けて、インфекションコントロールチームを中心に積極的に取り組んでいる。また、微生物検査の立場からは多剤耐性菌を早期検出するための効率的な検出法やその手順を予め確立しておくことが感染制御の観点から最も重要であると考えられる。

本論文の要旨は第25回日本臨床微生物学会総会(2014年名古屋)にて報告した。

謝辞：本研究は厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症事業「新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究」(H24-新興-一般-010)の支援により実施した。

利益相反：申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) 諸熊由子, 内田勇二郎, 持丸朋美, 他. 2009. KPC-3産生性 *Klebsiella pneumoniae* が分離された一症例. 日臨微誌 19: 136.
- 2) Chihara, S., K. Okuzumi, Y. Yamamoto, et al. 2011. First case of New Delhi metallo-β-lactamase 1-producing *Escherichia coli* infection in Japan. Clin. Infect. Dis. 52: 153-154.
- 3) Nagano, N., Y. Endouh, 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.
- 4) Matsumura, Y., M. Tanaka, M. Yamamoto, et al. 2015. High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. Int. J. Antimicrob. Agents 45: 33-40.
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. M100-S18. CLSI, Wayne, PA.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. M 100-S21. CLSI, Wayne, PA.
- 7) Perez-Perez, F. J., N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 40: 2153-2162.

- 8) Pillai, D.R., R. Melano, P. Rawte, et al. 2009. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 827-829.
- 9) Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, et al. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 394-397.
- 10) Doi, Y., Y. Arakawa. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 45: 88-94.
- 11) Nagano, N., N. Shibata, Y. Saitou, et al. 2003. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2  $\beta$ -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5530-5536.
- 12) Curiao, T., M. I. Morosini, P. Ruiz-Garbajosa, et al. 2010. Emergence of *bla*<sub>KPC-3</sub>-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1608-1614.
- 13) Robustillo Rodela, A., C. Díaz-Agero Pérez, T. Sanchez Sagrado, et al. 2012. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill.* 17 (7): pii=20086.
- 14) López-Cerero, L.P., P. Egea, I. Gracia-Ahufinger, et al. 2014. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST 512) in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44: 538-540.
- 15) Mammeri, H., H. Guillon, F. Eb, et al. 2010. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4556-4560.
- 16) Yang, J., L. Ye, L. Guo, et al. 2013. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin. Microbiol. Infect.* 19: E509-E515.
- 17) Illiaquer, M., N. Caroff, P. Bémer, et al. 2012. Occurrence and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST37 clinical isolates producing plasmid-mediated AmpC recovered over a 3-year period. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74: 95-97.
- 18) Diestra, K., E. Miró, C. Martí, et al. 2011. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 1032-1036.
- 19) López-Camacho, E., R. Gómez-Gil, R. Tobes, et al. 2014. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 632-636.
- 20) Jacoby, J.A.. 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 161-182.
- 21) Yamane, K., J. Wachino, Y. Doi, et al. 2005. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 951-953.



## Molecular characterization of non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 37 clinical isolates from nosocomial infections

Takahiro Harada<sup>1)</sup>, Masami Toyama<sup>2)3)</sup>, Yukiko Nagano<sup>3)4)</sup>, Yoshichika Arakawa<sup>4)</sup>, Noriyuki Nagano<sup>3)5)</sup>

<sup>1)</sup>Clinical Microbiology Laboratory, National Hospital Organization Chiba Medical Center

<sup>2)</sup>Medical Microbiology Laboratory, Funabashi Municipal Medical Center

<sup>3)</sup>Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

<sup>4)</sup>Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>5)</sup>Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine

Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains Kp1 and Kp2, which was resistant to all  $\beta$ -lactams including carbapenems and other classes of antimicrobials, and *K. pneumoniae* strain Kp3 exhibiting similar susceptibility profiles except for carbapenem susceptibility were recovered from three patients on the same hospital unit during the five month December 2012 to April 2013 period. The three patients had overlapping periods of hospitalization, thus suggesting nosocomial transmission of those *K. pneumoniae* strains during hospital stay. PCR and sequencing analysis showed the presence of the DHA-1 plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in all strains. They also harbored plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB* as well as 16S rRNA methylase gene *armA*. *K. pneumoniae* strains Kp1, Kp2, and Kp3 with indistinguishable PFGE profiles belonged to the same MLST sequence type 37.

Our results demonstrated likely transmission of multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains in the unit. Carbapenem resistance in *K. pneumoniae* strains Kp1 and Kp2 may be due to expression of DHA-1 AmpC  $\beta$ -lactamase combined with the loss and/or decrease in outer membrane proteins because any carbapenemase genes including KPC type were not detected from them.

DHA-1-producing *K. pneumoniae* was not detected by active surveillance cultures of patients and healthcare personnel started at the time of the third case. Also, strict contact precautions have been implemented, and the new patients harboring those organisms have not been identified so far.