

[原 著]

救命救急センターで分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生
Enterobacter hormaechei/*Enterobacter xiangfangensis* 4 株の分子疫学のおよび
患者背景の解析

香川成人¹⁾・森 伸晃²⁾・青木弘太郎³⁾・樋口晶子¹⁾・須江 萌¹⁾
勝田桃子¹⁾・吉住あゆみ³⁾・石井良和³⁾・館田一博³⁾・青木泰子²⁾

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床検査科

²⁾ 独立行政法人国立病院機構東京医療センター総合内科

³⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(平成 28 年 9 月 14 日受付, 平成 29 年 1 月 19 日受理)

2013 年 8 月から 10 月までの 3 ヶ月間に当院の救命救急センターにおいて 4 名の患者からカルバペネム耐性の *Enterobacter cloacae* complex が 7 株分離され, 本研究では, これらの株の細菌学のおよび遺伝学的特徴, 患者背景の調査を行った。供試菌株は, 生化学的性状および 16S rDNA のシーケンス解析によって *Enterobacter hormaechei* および *Enterobacter xiangfangensis* と同定されたが, これらの菌種を区別することは困難であった。Pulsed-field gel electrophoresis の泳動パターンの解析により, 同一株である可能性が示唆された。すべての供試菌株は IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) を産生し, インテグロン構造中の耐性遺伝子カセットとして “*intI1-bla_{IMP-1}-aac (6)-IIc-qacEΔ1-sul1*” が確認されたが, キノロン耐性決定領域に変異は認められなかった。これらの患者では, 尿道カテーテルなどの医療デバイスおよびカルバペネム系薬などの広域抗菌薬の使用が共通して認められた。本菌が喀痰から分離された患者のうち 1 名は, 培養された菌量も少なく, 臨床経過から保菌状態と判断されたが, 残る 3 名の患者においては, 血流感染および肺炎の起原菌と考えられた。感染症を発症した 3 名の患者は, levofloxacin 単剤にて治療されたが, 原疾患の悪化により死亡退院した。以上のことは, IMP-1 型 MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* 株による感染症の本邦における初めての報告であり, 今後の動向調査が必要であると考えられた。

Key words: メタロ-β-ラクタマーゼ, *Enterobacter cloacae* complex, *Enterobacter hormaechei*/*Enterobacter xiangfangensis*, 分子疫学的解析, 患者背景の解析

序 文

Enterobacter cloacae complex (ECC) は, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* および *Enterobacter nimipressuralis* の 6 菌種

が属しており, *Enterobacter xiangfangensis* は 2014 年に新菌種として報告された¹⁾。これらの *Enterobacter* 属は, 土壌や食品などの環境中およびヒトや動物などの腸管内に生息し, 染色体性に AmpC β-ラクタマーゼを産生する薬剤耐性の腸内細菌科細菌として認識されている。近年は, この AmpC β-ラクタマーゼ産生に加えカルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生の ECC による感染事例が報告されている²⁾。臨床におけるカルバペネマーゼ産生株の問題点は, カルバペネマーゼをコードする遺伝子がプラスミド上に存在し, 同一菌種間あるいは菌種を超えて伝播する可能性があること, すべての β-ラクタム系抗菌

著者連絡先: (〒152-8902) 東京都目黒区東が丘 2-5-1
国立病院機構東京医療センター臨床検査科
香川成人
TEL: 03-3411-0111
FAX: 03-3411-0438
E-mail: nkagawa@ntmc.hosp.go.jp

薬に耐性を示すことから、その感染症の治療に難渋することである。本邦ではメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) である IMP 型 MBL 産生の腸内細菌科細菌によるアウトブレイクが散見されるが³⁾、細菌学的特徴および感染症の臨床像については十分に解明されていない。

本研究では、同時期に救命救急センター (ER) に入院していた4名の患者からカルバペネム系薬耐性 ECC を7株分離し、病棟内伝播が疑われた事例を経験した。これらの菌株の細菌学および遺伝学的特徴、患者背景の調査を行い、検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. 供試菌株

2013年8月から10月までの3ヶ月間に当院のERにおいて4名の患者の喀痰、血液および腹水から分離され、自動同定薬剤感受性検査機器の MicroScan WalkAway plus System (Beckman Coulter) により ECC と同定された7株のうち、菌株の重複を避けるため、患者から初回に検出された4株を供試菌株とした。以降4人の患者から分離された ECC 株は TUM13743, TUM13744, TUM13745, TUM13746 とした。

2. 同定および薬剤感受性検査

同定および薬剤感受性検査は、自動機器およびその専用パネル Neg Combo NENC1J を用いた。ブレイクポイントの判定は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S22 に準拠し、感性、中間および耐性の判定を行った⁴⁾。

3. MBL 産生性の確認

MBL 産生の確認検査は、メタロ-β-ラクタマーゼ SMA ‘栄研’ (栄研化学) を用い、添付文書に従って行い判定した。

4. イムノクロマト法を用いた IMP 型 MBL の検出

IMP 型 MBL の検出は、クイックチェイサー IMP (ミズホメディー) を用いた。製品の添付文書に従って実施し、判定ライン及びコントロールラインの両方にラインが確認された菌株を陽性と判定した。

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による菌株間の分子疫学解析

PFGE は、定法にしたがって実施した。すなわち、作成した PFGE 用プラグは、SpeI (タカラバイオ) を用いてゲノム DNA を断片化し、電圧 6 V/cm、スイッチタイム 1-17 秒、温度 14℃ の条件で 16.5 時間、CHEF Mapper (BIO-RAD) を用いて泳動した。バンドパターンは Fingerprinting II Software (BIO-RAD) を用い、

パラメータは Dice (Opt : 1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) で解析した。

6. 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer : NGS) を用いた 16S rDNA および薬剤耐性遺伝子の網羅的解析

16S rDNA および薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を目的として、MiSeq (Illumina) を用いて4株のうち1株 (TUM13743) のドラフトゲノム配列を得た。DNA ライブラリの調整には Nextera XT (Illumina)、シーケンス試薬 MiSeq Reagent Kit v3 600cycle (Illumina) を用いて 300 bp×2 のペアエンドリードシーケンスを行った。得られたリードデータのアセンブルには CLC Genomics Workbench (CLC bio)、16S rDNA の相同性検索には EzTaxon-e および leBIBI、薬剤耐性遺伝子カセットの解析には Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) および ResFinder をそれぞれ用いた^{5)~7)}。

7. MBL 産生菌検出患者の臨床的背景

MBL 産生 ECC が分離された4名の臨床情報について電子カルテを利用し、性別、年齢、基礎疾患、手術既往の有無、carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) が検出された検査材料、入院期間、使用抗菌薬、予後を後方視的に調査した。

8. 倫理的配慮

本研究は、国立病院機構東京医療センターの倫理委員会から承認を得て実施した (承認番号 : R14-092)。

結 果

1. 菌種同定と薬剤感受性検査結果

供試菌株4株は生化学的性状から *E. cloacae* (98.76%) と同定された。TUM13743 の 16S rDNA 塩基配列は *E. hormaechei* (ATCC 49162, アクセション番号 : AFHR01000079) および *E. xiangfangensis* (10-17, アクセション番号 : HF679035) のものとそれぞれ 99.02% (1415/1429 bp) および 99.58% (1423/1429 bp) の相同性を有していた。しかし、いずれの菌種に対しても菌種識別の類似性閾値 (99.0%)⁸⁾ を上回ったため、16S rDNA シーケンス解析では *E. hormaechei* および *E. xiangfangensis* との識別は不可能であった。従って、4株は *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* と同定した。4菌株の15薬剤に対する MIC 値は Table 1 に示した。imipenem (IPM) および tazobactam/piperacillin を除く β-ラクタム系薬および minocycline に耐性を示し、アミノグリコシド系薬の gentamicin (GM) および amikacin, フルオロキノロン系薬の levofloxacin (LVFX) には感性を示した。

Table 1. Antimicrobial susceptibility of MBL-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates

Isolates	MIC (μg/ml)														
	CTM	CTX	CAZ	CFPN	CTRX	T.AZ/PPIC	CMZ	FMOX	AZT	IPM	MEPM	GM	AMK	MINO	LVFX
TUM13743	>16 R	>2 R	>8 R	>16 R	>2 R	64 I	>32 R	>32 R	>8 R	2 I	>2 R	≦2 S	≦4 S	>8 R	1 S
TUM13744	>16 R	>2 R	>8 R	>16 R	>2 R	64 I	>32 R	>32 R	>8 R	2 I	>2 R	≦2 S	≦4 S	>8 R	1 S
TUM13745	>16 R	>2 R	>8 R	>16 R	>2 R	64 I	>32 R	>32 R	>8 R	>2 R	>2 R	≦2 S	≦4 S	>8 R	1 S
TUM13746	>16 R	>2 R	>8 R	>16 R	>2 R	>64 R	>32 R	>32 R	>8 R	2 I	>2 R	≦2 S	≦4 S	>8 R	1 S

Abbreviation: CTM, Cefotiam; CTX, Cefotaxime; CAZ, Ceftazidime; CFPN, Cefcapene; CTRX, Ceftriaxone; TAZ/PPIC, Tazobactam/Piperacillin; CMZ, Cefmetazole; FMOX, Flomoxef; AZT, Aztreonam; IPM, Imipenem; MEPM, Meropenem; GM, Gentamicin; AMK, Amikacin; MINO, Minocycline; LVFX, Levofloxacin.

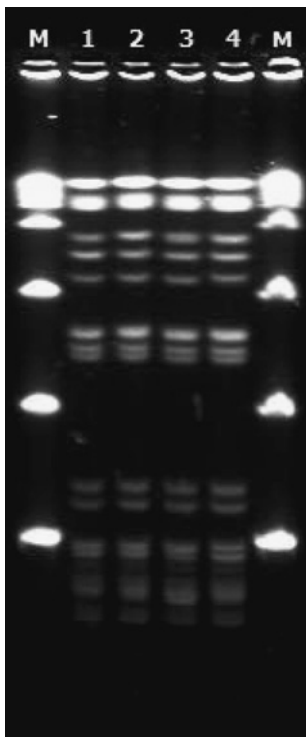


Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis pattern of metallo-β-lactamase producing *Enterobacter hormaechei/xiangfangensis* isolated from four patients: M: lambda ladder pulsed-field gel marker, 1: TUM13743, 2: TUM13744, 3: TUM13745, 4: TUM13746.

2. SMA ディスク拡散法を用いた MBL 産生性の確認検査

すべての供試菌株は、IPM ディスク単独の阻止帯と比較して SMA ディスクに隣接した IPM ディスクの阻止帯に 5-6 mm の拡張がみられた。また同様に ceftazidime (CAZ) ディスク周囲には阻止帯を認めなかったが、SMA ディスク側の CAZ ディスクに 13-15 mm の阻止帯の拡張を認めたため、MBL 産生株と確認された。

3. イムノクロマト法による IMP 型 MBL の確認検査

すべての供試菌株はクイックチェイサー IMP で陽性ラインが認められ、IMP 型であることを確認した。

4. PFGE の解析結果

PFGE の結果を Fig. 1 に示す。供試菌株 4 株は、100% の類似性を示し、同一の菌株である可能性が示唆された。

5. NGS による薬剤耐性遺伝子の網羅的解析

供試菌株 4 株のうち、代表菌株として TUM13743 を対象として NGS によりドラフトゲノム配列を得た。*bla_{IMP-1}* は、クラス 1 インテグロン中に存在し、その耐性遺伝子カセットとして “*intI1-bla_{IMP-1}-aac (6)-IIc-qacEΔ1-sulI*” の順で存在することが確認された (Fig. 2)。フルオロキノロン系薬に感性の *E. cloacae* ATCC 13047 株の *GyrA*, *GyrB*, *ParC* および *ParE* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) と比較したところ、TUM13743 の QRDR に変異は認められなかった。

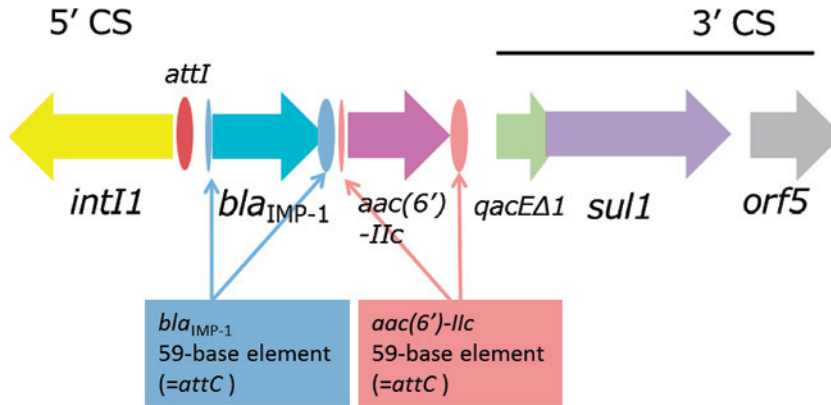


Fig. 2. A schematic representation of TUM13743 class 1 integron

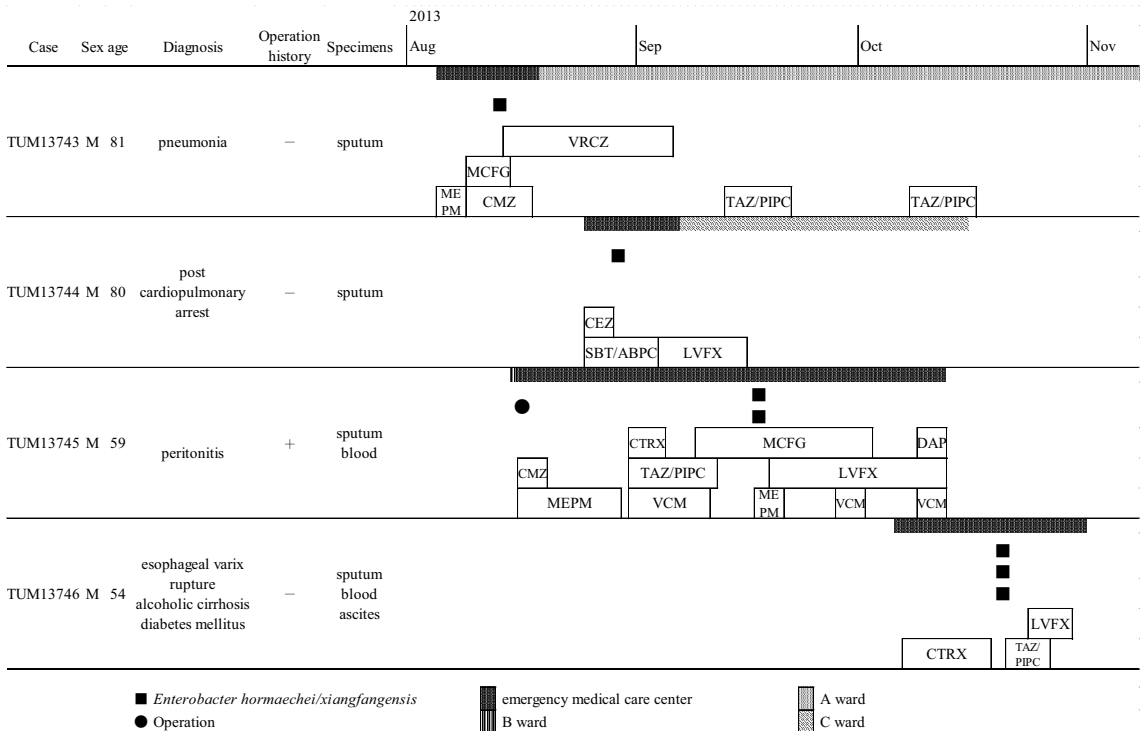


Fig. 3. Clinical course of 4 patients with metallo- β -lactamase producing *Enterobacter hormaechei/xiangfangensis*. Abbreviation: VRCZ, Voriconazole; MCFG, Micafungin; MEPM, Meropenem; CMZ, Cefmetazole; TAZ/PIPC, Tazobactam/Piperacillin; CEZ, Cefazolin; SBT/ABPC, Ampicillin/Sulbactam; LVFX, Levofloxacin; CTRX, Ceftriaxone; DAP, Daptomycin; VCM, Vancomycin.

6. MBL 産生菌検出患者の臨床的背景

MBL 産生 *E. hormaechei/E. xiangfangensis* が分離された患者の基礎疾患を含む臨床的背景を Fig. 3 に示す。全例男性であり、年齢中央値は 69.5 歳 (54-81 歳)

であった。すべての患者の喀痰から MBL 産生 *E. hormaechei/E. xiangfangensis* が分離された。また、過去の培養検査において MBL 産生 *E. hormaechei/E. xiangfangensis* は分離されていなかった。複数の検

体から MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* が検出された 3 名は感染症と判断され、敗血症 (2 名) および肺炎 (1 名) であった。これらの 3 名は薬剤感受性結果に基づいて経静脈的投与により LVFX が投与された。MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* の分離時期は、ER に入室後 4-30 日とばらつきが認められた。予後は、経静脈的投与をうけた 3 名の患者が死亡退院し、1 名は転院した。死亡した 3 例において、入院中に LVFX 使用後に採取された各培養検体 (血液および喀痰) の培養から MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* が分離されず、臨床経過からも MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* 感染症が死亡の直接原因ではなく、原疾患の悪化によって死亡したと判断された。転院となった 1 名は、喀痰培養から MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* が分離されたが菌量も少なく臨床的に保菌と判断されたので治療は行わなかった。4 名の患者は MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* が分離される前に、カルバペネム系薬およびセファロスポリン系薬の投与、中心静脈カテーテルおよび膀胱留置カテーテルなどの医療デバイスの使用、人工呼吸器の装着が行われていたが、本菌の汚染源を明らかにすることはできなかった。

考 察

ECC に属する菌種において臨床材料から主に検出されるのは *E. cloacae* および *E. hormaechei* である。*E. hormaechei* は 1989 年に、*E. xiangfangensis* は 2014 年に初めて報告され⁹⁾、それぞれ中国の伝統的なサワードウ (パンの一種) からの分離や敗血症および気管支炎の感染症例が報告された。また、新生児集中治療室において *E. hormaechei* による医療関連感染が報告され¹⁰⁾、さらに NDM-1 型 MBL を産生する薬剤耐性株の報告¹¹⁾ もあることから院内感染対策が必要な菌種のひとつである。

本症例の 4 名は、いずれも介助が必要な activities of daily living であったが、過去に本菌が分離されたことはなかった。病棟内伝播が疑われたため、infection control team が介入し、環境整備、医療スタッフへの標準予防策および接触感染予防策の周知・徹底、広域抗菌薬の適正使用の周知を行った。その後、PFGE を行った結果では、遺伝的類似性が 100% であったことから、ER 内で伝播した可能性が高いと考えられた。また、MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* が分離された患者のうち ER に長期入院をしていた患者が 1 名いたため、ER 内の機器、救急カート、洗面台、

汚物処理室および点滴作製台周囲 (計 17 か所) の環境培養調査を実施した。その結果、点滴作製台周囲の 1 か所より MBL 産生 ECC が分離された。この株の MBL は IMP 型であったが、PFGE による同一性の確認は行わなかった (データ未提示)。その後、同病棟においてさらに広範囲にわたる環境整備や医療スタッフへの標準予防策および接触感染予防策の周知・徹底を再度行った結果、その後本菌による新たな感染症患者は認めなかった。

CPE の保菌ならびに感染に関するリスクファクターは、intensive care unit (ICU) への入院、広域抗菌薬の使用および侵襲的医療行為などがある¹²⁾¹³⁾。今回の供試菌株は、IMP 型 MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* であり、一般的に CPE に分類される。本菌の感染症と判断された患者 3 名では、ER に入院し、カルバペネム系薬およびセファロスポリン系薬の投与、中心静脈カテーテルおよび膀胱留置カテーテルなどの医療デバイスの使用などを有しており、今回の症例においても共通するリスクファクターが認められた。また、ICU における CPE の保菌患者は、入院期間が長期化することにより在院中に死亡するハザード比が 1.79 高くなることも報告されている¹⁴⁾。これらのことから、CPE の感染対策は、標準予防策に加えて、保菌患者の隔離や使用する医療器具のディスポーザブル化などの接触感染予防策および環境管理の徹底を行うことが重要である。

今回、分離された MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* は *bla_{IMP}* の下流にアミノグリコシド修飾酵素産生に関わる *aac* (6')-IIc を保有していた。*aac* (6')-II は、アミノグリコシド系薬である GM, sisomicin, kanamycin, tobramycin および dibekacin の耐性に関与することが知られている¹⁵⁾。しかしながら、本邦における多くの MBL 産生腸内細菌科細菌の分離株は、*bla_{IMP}* の下流に *aac* (6')-IIc が存在し、GM に感性を示すことが報告され²⁾、今回供試した MBL 産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* の分離株も同様の性状を示した。このことは *aac* (6')-IIc を保有する菌株は GM に感性を示す特徴の一つではないかと考えられた。また、感染症を発症した 3 症例は薬剤感受性検査成績をもとにフルオロキノロン系薬が単剤で投与された。本菌株は、QRDR に変異を認めておらず、フルオロキノロン系薬に感性であった。その後、患者の喀痰および血液からの培養結果では本菌の分離は認められなかった。抗菌薬選択方法のひとつとして、薬剤感受性検査に基づき抗菌薬を選択することの重要性が示唆された。

以上のことから今回の研究では、症例数が十分ではなく、かつ単施設のデータであるため、わが国のCPEの特徴として一般化できないものの、IMP-1型MBL産生 *E. hormaechei*/*E. xiangfangensis* 株による感染症の本邦における初めての報告であり、MBL産生ECCの詳細な菌種同定を行うことによる今後の動向調査が必要であると考えられた。

文 献

- 1) Gu, CT., CY Li, LJ Yang, et al. 2014. *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 2650-2656.
- 2) Hayakawa, K., T. Miyoshi-Akiyama, T. Kirikae, et al. 2014. Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3441-3450.
- 3) Yano, H., M. Ogawa, S. Endo, et al. 2012. High Frequency of IMP-6 among Clinical Isolates of Metallo- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4554-4555.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd Informational Supplement, M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 5) Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, et al. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2259-2261.
- 6) Devulder, G., G. Perriere, F. Baty, et al. 2003. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1785-1787.
- 7) Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, et al. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
- 8) Meier-Kolthoff, JP., M. Göker, C. Spröer, et al. 2013. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol* 195: 413-418.
- 9) O'Hara, CM., AG Steigerwalt, BC Hill, et al. 1989. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as enteric group 75. *J Clin Microbiol* 27 (9): 2046-2049.
- 10) Wenger, PN., JI. Tokars, P. Brennan, et al. 1997. An outbreak of *Enterobacter hormaechei* infection and colonization in an intensive care nursery. *Clin Infect Dis* 24 (6): 1243-1244.
- 11) Pereira, PS., M. Borghi, RM. Albano, et al. 2015. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist* 21 (2): 234-236.
- 12) Tzouveleki, LS., A. Markogiannakis, E. Piperaki, et al. 2014. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 20: 862-872.
- 13) Qureshi, ZA., DL. Paterson, BA. Potoski, et al. 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 2108-2113.
- 14) Dautzenberg, MJ., AN. Wekesa, M. Gniadkowski, et al. 2015. The Association Between Colonization With Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and Overall ICU Mortality: An Observational Cohort Study. *Crit Care Med* 43: 1170-1177.
- 15) Shaw, KJ., PN. Rather, RS. Hare, et al. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57: 138-163.

Molecular epidemiology and clinical characteristics of metallo-β-lactamase producing *Enterobacter hormaechei*/*xiangfangensis* isolated from four patients at an intensive care unit in Japan

Narito Kagawa¹⁾, Nobuaki Mori²⁾, Kotaro Aoki³⁾, Akiko Higuchi¹⁾, Moe Sue¹⁾, Momoko Katsuta¹⁾,
Ayumi Yoshizumi³⁾, Yoshikazu Ishii³⁾, Kazuhiro Tateda³⁾, Yasuko Aoki²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization, Tokyo Medical Center

²⁾Department of General Internal Medicine, National Hospital Organization, Tokyo Medical Center

³⁾Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

IMP-type metallo-β-lactamase (MBL) producing *Enterobacteriaceae* have been reported to be spread in Japan; however, the molecular epidemiology and clinical characteristics were unknown. We herein present four cases of IMP-1 type MBL producing *Enterobacter cloacae* complex isolated from an intensive care unit in a Japanese hospital between August and October 2013. To identify the molecular and clinical characteristics, we performed 16Sr RNA gene sequencing, antimicrobial susceptibility testing, detection as MBL and IMP-type, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), antimicrobial resistance profiling using a next-generation sequencer, and investigated medical records. The sequence of the isolates' 16Sr RNA genes exhibited the greatest similarity to *E. hormaechei* (99.02%) and *E. xiangfangensis* (99.58%). Isolates produced IMP-1 type MBL and were resistant to minocycline. PFGE analysis showed that all the isolates were clonal. The MBL gene *bla*_{IMP-1} was found to be present in a class 1 integron. The MBL gene cassette was located upstream of an array gene cassette containing *aac* (6) *I*ic, *qacEΔ1*, and *sulI*. Compared to the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* of *E. cloacae* ATCC13047, the isolates had no change in the quinolone resistance-determining regions. All patients had been exposed to at least one medical device and a broad-spectrum antimicrobial. Patients in three cases were considered to have an infection. They received levofloxacin based on *in vitro* susceptibility and overcame infection. However, three patients died of the underlying disease during hospitalization. Our report suggests the possibility of nosocomial spread because PEGE showed clonality and the MBL producing *Enterobacteriaceae* had not been isolated in these patients in the past.