

[総 説]

表現型からみる carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* の網羅的スクリーニング法

山田景土¹⁾・長野則之²⁾・齋藤良一³⁾

¹⁾ 公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科

²⁾ 信州大学大学院医学系研究科医療生命科学分野

³⁾ 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科生体防御検査学分野

(平成 29 年 7 月 18 日受付)

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) は「治療の切り札」であるカルバペネム系抗菌薬を分解する最も注意すべき耐性菌の一つとして認識されており、臨床における CPE 検出は極めて重要な位置づけとなっている。これまでカルバペネム系抗菌薬の最小発育阻止濃度が低値を示す CPE も報告されており、それらを正確に鑑別する検査体制の構築が求められている。また、耐性菌の確認を行う上で、酵素型の決定に用いる分子生物学的手法を用いた検査は、全ての医療機関で実施できるものではない。本稿では、分子生物学的手法を用いない表現型からみる CPE 検出法として Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S27 に掲載されている modified Hodge test, carba NP test および carbapenem inactivation method を中心に概説する。

Key words: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, modified Hodge test, carba NP test, carbapenem inactivation method

1. はじめに

カルバペネム系の抗菌薬は「last resort」と称され、広域抗菌スペクトルを有することから、基質特異性拡張型 β -lactamase (extended spectrum β -lactamase : ESBL) 産生菌等の耐性菌感染症治療の最終手段として使用されている。カルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した細菌の蔓延は世界的な脅威であり、近年カルバペネム系抗菌薬耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* : CRE) の増加が世界的に深刻な問題となっている¹⁾²⁾。その中でも、カルバペネム系抗菌薬を加水分解する酵素「carbapenemase」を産生する carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) が世界中で増加傾向である。

多様化する β -lactamase 産生菌、特に carbapene-

mase 産生菌を検出することは臨床において極めて重要な課題の一つであろう。近年報告された CPE の中には、カルバペネム系抗菌薬の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) が必ずしも高くないものも存在しており、それらを見落とさないような検査体制の構築が必要である。CPE のスクリーニング方法は検体からの直接スクリーニング法と CPE を疑う菌株に対して実施するスクリーニング法 (確認試験) とがある。前者はスクリーニング培地などを使用する方法である。本稿では、後者に該当し、なおかつ PCR をはじめとする分子生物学的手法の実践が困難な施設においても実施可能な、表現型からみる CPE の検出法、特に Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S27³⁾ に掲載されている modified Hodge test (MHT), Carba NP test および modified carbapenem inactivation method (mCIM) 等を中心に、我々の検討データと報告されている文献を交えて概説したい。

著者連絡先：(〒173-0015) 東京都板橋区栄町 33-1
公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科
山田景土
TEL: 03-5375-1234
E-mail: kageto_yamada@tokyo-hmt.jp

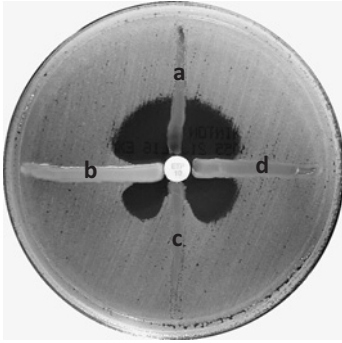


図1. Ertapenem ディスクを用いた modified Hodge test 結果

- a : *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1706 (陰性コントロール)
 b : *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 (陽性コントロール)
 c : *Citrobacter freundii* (IMP-1 and IMP-19 producer)
 d : *Enterobacter cloacae* (non-CPE : 偽陽性)

2. CPE スクリーニング法

2-1. Modified Hodge test (MHT)

MHT は 1978 年に Hodge ら⁴⁾によって *Neisseria gonorrhoeae* の penicillinase 検出法として考案された手法を、2001 年に Lee ら⁵⁾が carbapenemase 検出法として一部修正を加えたものを基にしている。2009 年に CLSI document M100-S19 において carbapenemase 産生菌のスクリーニング法として掲載されている。以下に CLSI が推奨している手順を示す。

① *Escherichia coli* ATCC 25922 をプロスもしくは滅菌生理食塩液に McFarland no. 0.5 に調整し、その菌液を滅菌生理食塩液もしくはプロスを用いて 10 倍に希釈する。

② 調整菌液を Mueller-Hinton agar (MHA) に三重塗布後、MHA 中央に meropenem ディスク (10 µg) もしくは ertapenem ディスク (10 µg) を配置する。

③ 10 µ ループの白金耳等を用いて被検菌を数コロニー採取し、ディスクの端から培地の外側に向かって 20-25 mm 画線する。陽性コントロールとして *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705、陰性コントロールとして *K. pneumoniae* ATCC BAA1706 を使用する。

④ 35°C ± 2°C、好気条件下で 16-20 時間培養し、画線部分において *E. coli* ATCC 25922 株の発育が増強していれば陽性と判定する (図 1)。

本検出法は操作が非常に簡便であり、特殊な試薬を必要としないことから世界中の微生物検査室において普及している。しかしながら、本方法は ESBL 産生菌や AmpC 産生菌において偽陽性が認められる他、New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) 産生菌の検出感度が低いことが問題視されている^{6)~8)}。本法の感度は過去の報告によると概ね 71.0%-90.9% であり、特異度は 38.9%-94.0% である^{7)~10)}。感度・特異度のバラつきが本検査法の判定が難しい事を示している。AmpC 過剰産生菌による偽陽性を回避する目的で、MHT を行う際、培地もしくは薬剤ディスクに AmpC 阻害薬である cloxacillin を添加する方法も報告されている¹¹⁾¹²⁾。また、近年では、MHT に使用する MHA に Triton を添加することで、検出感度が低いとされる NDM 産生菌の検出感度を上昇させた Triton Hodge test (THT) も考案されている¹³⁾。しかしながら、本方法は、後述する CIM 法の考案に伴い、CLSI M100-S28 から記載されなくなる予定である。

2-2. Carba NP test

本検査法は 2012 年に Nordmann ら¹⁴⁾によって報告された方法である。本検査法は細菌の産生する carbapenemase が imipenem を分解することで、液相中の pH が酸性に変化することを利用して。反応液が酸性に傾くことで、添加してある pH 指示薬のフェノールレッドが黄変する。その色調変化を観察することで、目視によって carbapenemase 産生性を確認することが出来る。本稿では CLSI に掲載されているプロトコールを紹介する。

① 表 1 に示した試薬を調整する。

② (被検菌 + コントロール 2 株) × 2 本の 1.5 mL チューブを用意し、それぞれ A、B とラベルする。陽性コントロールとして *K. pneumoniae* ATCC BAA1705、陰性コントロールとして *K. pneumoniae* ATCC BAA1706 を使用する。

③ それぞれのチューブに 100 µL のタンパク抽出液を分注する。

④ 抗菌薬未添加の分離培地 (血液寒天培地等) に発育させた被検菌を 1 µL ループ分採取し、タンパク抽出液に懸濁し、しっかり攪拌する。

⑤ A とラベルしたチューブに Carba NP solution A を 100 µL 添加し、B とラベルしたチューブに Carba NP solution B を 100 µL 添加する。

⑥ チューブ内の溶液を混和し、35°C ± 2°C で 2 時間までインキュベーションし、その間に A と比較し B で溶液が黄変した場合に陽性と判定する (図 2)。

表 1. Carba NP test (CLSI 記載法) 試薬調整法

細菌タンパク質抽出液 (Tris-HCl buffer pH 7.4)
Carba NP solution A (4-8°C, 遮光, 2 週間保存可能)
・ 10 mM 硫酸亜鉛溶液 (硫酸亜鉛七水和物: 1.4 g + 滅菌精製水: 500 mL)
・ 0.5% フェノールレッド溶液 (フェノールレッド: 1.25 g + 滅菌精製水: 250 mL)
・ 0.1 N NaOH 溶液
① 16.6 mL の滅菌精製水に 2 mL の 0.5% フェノールレッド溶液を加える。
② 180 μ L の 10 mM 硫酸亜鉛溶液を加える。
③ 0.1 N NaOH 溶液を用いて pH 7.8 \pm 0.1 に調整する。
Carba NP solution B (4-8°C, 3 日まで保存可能)
・ Carba NP solution A + imipenem (終濃度 6 mg/mL に調整)

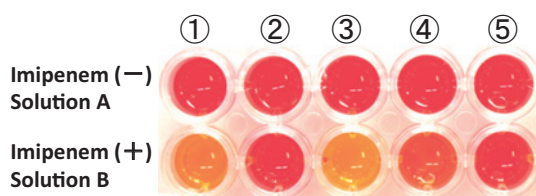


図 2. Carba NP test 結果

上段に imipenem 未添加群 (solution A), 下段に imipenem 添加群 (solution B) を示している。

- ① *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 (陽性コントロール)
- ② *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1706 (陰性コントロール)
- ③ *Klebsiella pneumoniae* (KPC-3 producer)
- ④ *Escherichia coli* (NDM-1 producer) mucoid
- ⑤ *Klebsiella pneumoniae* (OXA-48 producer)

本検査法の最大の特徴は、迅速かつ高特異度なことであり、より早い段階での臨床報告が可能である。本法の日常検査適用は、より早い段階での感染対策強化の実践を可能にする。過去の報告では感度 87.9%~100%、特異度 100% とされているが、GES 型、OXA-48 型およびムコイド株等において一部偽陰性が確認されている^{8)10)14)~17)}。既に製品化されている RAPIDEC Carba NP も同様な試験成績であり¹⁸⁾¹⁹⁾、試薬調整の手間が必要ないことから検査現場での活躍が期待される。しかしながら、2017 年 7 月現在で、本邦ではキット化された製品は未発売であることから、別途試薬を購入し自家調整しなければならない。その為、現状では、調整自体はさほど難しくはないが、精度管理上の問題が存在する。また、キット化された試薬の導入は、新たにコストが発生することにも留意したい。

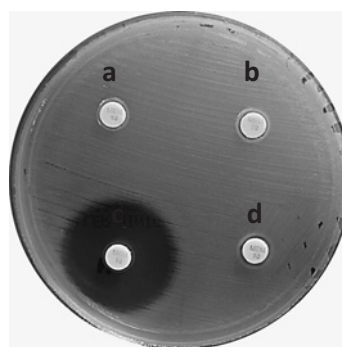


図 3. Carbapenem inactivation method (CIM) 結果

- a: *Klebsiella pneumoniae* (KPC-3 producer)
- b: *Escherichia coli* (NDM-1 producer)
- c: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1706 (陰性コントロール)
- d: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 (陽性コントロール)

2-3. Carbapenem inactivation method (CIM), modified CIM (mCIM)

CIM は 2015 年に Zwaluw らによって考案された carbapenemase 産生菌のスクリーニング法である²⁰⁾。本検査法は、菌液中に meropenem ディスクを添加、インキュベーションし、その後の菌液中の抗菌薬活性を検出する方法である。原法では、滅菌水 400 μ L に 10 μ L ループ分の菌を濃厚に浮遊させ、その菌液の中に meropenem ディスク (10 μ g) を 1 枚添加する。その後 35°C で 2 時間インキュベーション後、*E. coli* ATCC25922 株を塗布した MHA に菌液から取り出したディスクを設置し、6 時間から一昼夜培養し、阻止円の有無を判定する。結果判定例を図 3 に示す。本方法も MHT と同様特別な試薬を必要としない為、一般的な検査室においても普及している。原法の *Entero-*



図4. Modified carbapenem inactivation method 結果
阻止円形成を認めるが、阻止円内に *Escherichia coli*
ATCC25922 の発育を認め、carbapenemase 産生性を疑う
所見である。

bacteriaceae に対する感度および特異度はそれぞれ 85.7%-100% および 95.7%-100% と報告されている⁸⁾¹⁰⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²²⁾²³⁾。Aktaşらは 35℃ のインキュベーション時間を 2 時間から 4 時間に延長することで感度が上昇すること (78% → 90%) を報告している²¹⁾。また、我々は meropenem 以外に imipenem および ertapenem を使用して検討を行い、imipenem では特異度が著しく低下することを示した⁸⁾。このことから日常のスクリーニングで meropenem ディスクの変わりに imipenem ディスクを使用することは避けた方が良いと言える。本方法は *Acinetobacter baumannii* における OXA 型カルバペネマーゼ産生株や *Enterobacteriaceae* における GES 型 carbapenemase 産生株での陽性率が低い事も報告されている¹⁰⁾²¹⁾²³⁾。また、1 症例ではあるが、*Bacteroides fragilis* の carbapenemase 産生性を本検査法で検出できたという報告もあり、本法の嫌気性菌への応用も示唆されている²⁴⁾。本稿では CLSI M100-S27 から新たに掲載された mCIM を詳細に紹介したい。

①2 mL の trypticase soy broth (TSB) もしくは MHB に被検菌の 1 μL ループ分を懸濁する。陽性コントロールとして *K. pneumoniae* ATCC BAA1705、陰性コントロールとして *K. pneumoniae* ATCC BAA1706 を使用する。

②10-15 秒ミキサーで攪拌する。

③菌懸濁液に 10 μg meropenem ディスクを 1 枚添加し、35℃ ± 2℃ 好気条件で 4 時間 ± 15 分インキュベーションする。

④McFarland no. 0.5 に調整した *E. coli* ATCC25922 を MHA に三重塗布し、インキュベーションしたプロ

スから meropenem ディスクを取り出し、MHA に配置する。100 mm の MHA プレートで 4 株まで検査可能である。

⑤35℃ ± 2℃ で 18-24 時間培養し、阻止円径を計測する。阻止円径 6-15 mm を陽性、16-18 mm を中間、≥ 19 mm を陰性と判定する。

*阻止円径が 16-18 mm の場合は、meropenem ディスクの抗菌活性をディスク拡散法で確認する他、*E. coli* ATCC25922 に汚染がないか確認する。再検査後も阻止円径が 16-18 mm を示す場合は、遺伝子検査の実施等を検討する。

*阻止円が形成されていても、阻止円内に *E. coli* ATCC25922 の発育が確認される場合は carbapenemase の産生性を疑う必要がある (図 4)。

mCIM の評価に関する文献は未だ少ない為、CIM で検出が苦手とされる CPE (GES 型等) の検出能に関しては、今後の検討結果を待つ他ないのが現状である。著者らの検討結果では、CPE 34 株 (IMP : 16 株, NDM : 9 株, OXA-48 like : 6 株, KPC : 2 株, NDM + OXA-181 : 1 株) と non-CPE 23 株 (ESBL + AmpC) を調査したところ、感度および特異度はそれぞれ共に 100% であった²⁵⁾。本法の特徴は高感度・高特異度であること、更に特別な試薬を必要としないことから、一般的な検査室に適した検査法といえる。また、阻止円を計測することで、数値として結果を捉えられる点が MHT や Carba NP test と異なる点である。その為、結果解釈が容易な点も特徴であると言える。mCIM の考案者である Pierce らは、複数の検査機関において同一の菌株を mCIM でスクリーニングした場合にも高い感度と特異度が得られる事を報告している²⁶⁾。このことから本検査法は検査者による誤判定が起きにくいことがわかる。

2-4. Sodium-mercaptoacetate combination mCIM (SMA-mCIM)

現在、CLSI では mCIM に metallo-β-lactamase (MBL) 阻害効果のある EDTA を添加した MBL 産生菌の検出法を検討している (Inhibitor-enhanced modified carbapenem inactivation method : imCIM)。これらに関しては今後詳細なデータが示されるであろう。我々は、本邦で流通している MBL 阻害作用のある sodium-mercaptoacetate (SMA, 栄研化学) を mCIM と組み合わせた方法 (SMA-mCIM) を考案している²⁵⁾。本手法は mCIM と同時に実施することで carbapenemase 産生性をスクリーニングすると同時に MBL の検出も可能にした方法である。操

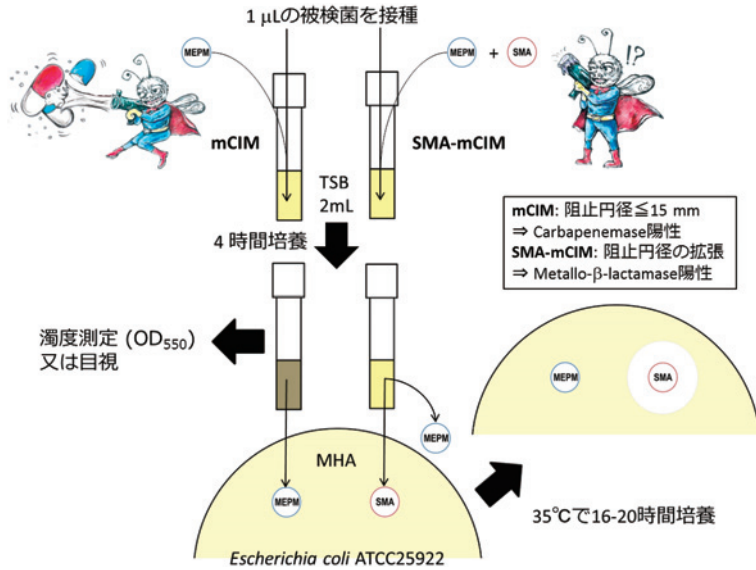


図5. mCIM および SMA-mCIM の実施フロー

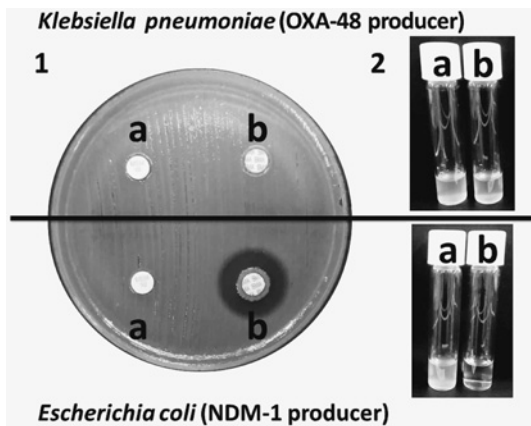


図6. mCIM および SMA-mCIM の結果

上段に *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 産生株、下段に *Escherichia coli* NDM-1 産生株を示している。*K. pneumoniae* OXA-48 産生株では、mCIM において carbapenemase 産生性が示唆され、SMA-mCIM では阻止円が拡張しておらず、濁度も mCIM と SMA-mCIM で差が認められないことから MBL 以外の carbapenemase 産生性を示唆する結果となっている。*E. coli* NDM-1 産生株では、mCIM において carbapenemase 産生性が示唆され、SMA-mCIM では阻止円が拡張しており、プロスの吸光度は mCIM と比較し SMA-mCIM で低下していることから MBL 産生性を示唆する結果と判定される。

- 1 : 16 時間培養後の阻止円
- 2 : 4 時間インキュベート後の濁度
- a : mCIM
- b : SMA-mCIM

作方法は mCIM に準ずるが、meropenem を添加する際に、同時にチューブ内に SMA ディスク (栄研化学) を添加し、4 時間インキュベーション後に SMA ディスクを配置するところが mCIM と異なっている (図 5)。SMA ディスクを配置するのは mCIM と判別しやすくする為である。培養後の阻止円径が SMA-mCIM で拡大した場合に MBL 陽性と判定する (図 6)。著者らの検討では、CPE 34 株 (IMP : 16 株, NDM : 9 株, OXA-48 like : 6 株, KPC : 2 株, NDM+OXA-181 : 1 株) と non-CPE 23 株 (ESBL+ AmpC) を対象にし、5 mm 以上の阻止円拡大 (阻止円を認めない場合を 0 mm としている) を MBL 陽性とした場合、MBL 検出の感度および特異度は共に 100% であった (図 7)。もう一つ SMA-mCIM のユニークな点は、4 時間インキュベーションしたプロスの濁度を mCIM と SMA-mCIM で比較するところにある。mCIM の濁度と SMA-mCIM の濁度を比較し、SMA-mCIM の濁度が著しく低下している場合は、overnight の培養を待たずに 4 時間インキュベーションの段階で MBL 産生性を強く疑う所見となる (図 7)。550 nm における吸光度差が 0.20 以上を MBL 陽性とした場合の感度・特異度はそれぞれ 92.3%・100% であった。ただし、本方法では 1 µL ループを用いて菌液を調整していることから、最初に接種する菌量が多くなり過ぎてしまった場合は、濁度判定が困難となる可能性がある。また、著者らの検討では対象株数が少ないことから、SMA

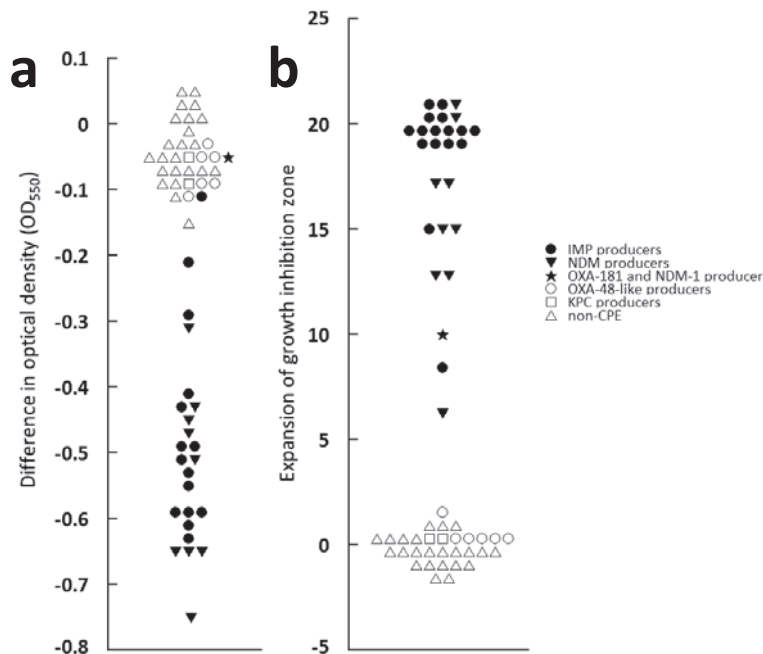


図7. Metallo- β -lactamase 産生性確認を目的としたSMA-mCIM および mCIM の結果
 黒の塗りつぶしは metallo- β -lactamase 産生株を示している (文献 25 を改変して掲載)。
 a : 550 nm における吸光度の差 (SMA-mCIM から mCIM の値を差し引いた値をプロット)
 b : 阻止円径の拡張 (SMA-mCIM から mCIM の値を差し引いた値をプロット)

の適正な濃度値などを含めた本方法の有用性に関しては、今後更なる評価と検証が必要となるであろう。また、SMA 以外の β -lactamase 阻害薬としては、cloxacillin の添加によって AmpC 過剰産生株での偽陽性が回避出来る場合がある (データ示さず)。

3. おわりに

2015年5月 World Health Organization (WHO) 総会において、薬剤耐性 (Antimicrobial resistance ; AMR) に関するグローバル・アクション・プランが採択され、加盟国は2年以内の薬剤耐性に関する国家行動計画の策定が求められた。これを受け、本邦においても、2016年4月にAMR対策アクションプランが決定された。このように、薬剤耐性に関する問題は臨床現場のみならず、社会的に重要な問題として位置づけられている。それゆえ、薬剤耐性菌をいち早く検出する微生物検査室の役割も重要性を増している。

情報という観点から見た場合、国内外問わず、どのような耐性菌がどのような地域で流行しているのか、そのような情報も検査現場において極めて重要な要因である。本邦における耐性菌の疫学情報は必ずしも十

分であるとは言えないのが現状であろう。各医療機関における耐性菌検査法の運用が構築され、本邦の耐性菌疫学情報がより充実することも望まれる。

また、日常検査の範囲を逸脱してしまうが、表現型からは識別できない耐性因子に関しては、菌株の遺伝子情報を得なければ、耐性因子の詳細な決定は困難である。耐性因子の検出に関わる分子生物学的な解析手法は多く存在するが、まだ自施設で解析できるケースは少ない。追加検査が発生した場合や困ったときに相談できる機関・検査技師の広範な協力体制も必要であろう。

本稿では、数あるCPE検査法の中から、CLSI M100-S27に掲載されているスクリーニング方法を中心に述べた。全てのcarbapenemase産生菌を完璧に検出する検査法は存在しないが、網羅的スクリーニング方法がかなり確立されつつあると言ってもよいであろう。どのような場面でどのようなスクリーニング方法を用いるのか判断することが肝要である。我々微生物検査技師は、検査法を知っているだけでなく、日常検査業務の中で、薬剤感受性パターン等をもとにcarbapenemase産生性を疑う、即ち「スクリーニング検査に進

むまでの過程」が最も重要であるということはいまでもない。現在, faropenem や latamoxef といった様々な抗菌薬が carbapenemase 産生菌のスクリーニングに検討されている^{27)~29)}。そのため, 情報感度を高め, 新しい検査技術を取り込む意識も必要であると考え

る。最後に, 本稿で示した内容が今後の微生物検査の現場において少しでも役立つことを願う。

謝辞: 本報告には, 複数の医療機関の協力を得て実施した共同研究の内容が含まれます。信州大学大学院 長野則之先生, 東京医科歯科大学大学院 齋藤良一先生を始め, 菌株使用許可をいただきました医療施設の皆様, ここに深謝申し上げます。また, 研究費用として, 豊島病院臨床研究費が使用されています。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- Nordmann, P., T. Naas, L. Poirel. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1791-1798.
- Patel, G., R.A. Bonomo. 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front. Microbiol.* 4: 48.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. CLSI document M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Hodge, W., J. Ciak, E.C. Tramont, et al. 1978. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 7: 102-103.
- Lee, K., Y. Chong, H.B. Shin, et al. 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 88-91.
- Carvalhoes, 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.
- Girlich, D., L. Poirel, P. Nordmann. 2011. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 50: 477-479.
- Yamada, K., M. Kashiwa, K. Arai, et al. 2016. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol. Methods.* 128: 48-51.
- Doyle, D., G. Peirano, C. Lascos, et al. 2012. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J. Clin. Microbiol.* 50: 3877-3880.
- Sun, K., X. Xu, J. Yan, et al. 2017. Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Ann. Lab. Med.* 37: 305-312.
- Takayama, Y., Y. Adachi, S. Nihonyanagi, et al. 2015. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Microbiol.* 64: 774-777.
- 原田崇浩, 外山雅美, 長野由紀子, 他. 2015. 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. *日臨微誌* 25: 56-64.
- Pasteran, F., L.J. Gonzalez, E. Albornoz, et al. 2015. Triton Hodge test: Improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *J. Clin. Microbiol.* 54: 640-649.
- Nordmann, P., L. Poirel, L. Dortet. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1503-1507.
- Tijet, N., D. Boyd, S.N. Patel, et al. 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57: 4578-4580.
- Tijet, N., S.N. Patel, R.G. Melano. 2015. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J. Antimicrob. Chemother.* 71: 274-276.
- Gauthier, L., R.A. Bonnin, L. Dortet, et al. 2017. Retrospective and prospective evaluation of the carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLoS. One.* 12 (2): e0170769.
- Hombach, M., B. von Gunten, C. Castelberg, et al. 2015. Evaluation of the rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 53: 3828-3833.
- Poirel, L., P. Nordmann. 2015. Rapidec Carba NP Test

- for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J. Clin. Microbiol.* 53: 3003-3008.
- 20) van der Zwaluw, K., A. de Haan, G.N. Pluister, et al. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS. One.* 10 (3): e0123690.
 - 21) Aktaş, E., G. Malkoçoğlu, B. Otlu, et al. 2017. Evaluation of the carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in comparison with the RAPIDEC CARBA NP. *Microb. Drug. Resist.* 23: 457-461.
 - 22) Saito, K., R. Nakano, Y. Suzuki, et al. 2017. Suitability of carbapenem inactivation method (CIM) for detection of IMP metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 55: 1220-1222.
 - 23) Aguirre-Quiñonero, A., M.E. Cano, D. Gamal, et al. 2017. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88: 214-218.
 - 24) Nakamura, I., K. Aoki, Y. Miura, et al. 2017. Fatal sepsis caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*, harboring a *cfiA* gene and an upstream insertion sequence element, in Japan. *Anaerobe.* 44: 36-39.
 - 25) Yamada, K., M. Kashiwa, K. Arai, et al. 2017. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo- β -lactamase production by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol. Methods.* 132: 112-115.
 - 26) Pierce, V.M., P.J. Simner, D.R. Lonsway, et al. 2017. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* doi: 10.1128/JCM.00193-17. [Epub ahead of print].
 - 27) 中村竜也, 小林沙織, 大沼健一郎, 他. 2016. カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) のディスク拡散法を用いたスクリーニング検査に関する検討. *感染症学雑誌* 91: 14-19.
 - 28) Day, K.M., R. Pike, T.G. Winstanley, et al. 2013. Use of faropenem as an indicator of carbapenemase activity in the *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 51: 1881-1886.
 - 29) Imai, W., M. Sasaki, K. Aoki, et al. 2017. Simple screening for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by moxalactam susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 55: 2276-2279.

Phenotypic screening methods for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Kageto Yamada¹⁾, Noriyuki Nagano²⁾, Ryoichi Saito³⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Health and Medical Treatment Corporation Toshima Hospital

²⁾ Department of Health and Medical Science, Graduate School of Medicine, ShinShu University

³⁾ Department of Microbiology and Immunology, Graduate of Health Care Science, Tokyo Medical and Dental University

Carbapenems are used as last resort treatment of antimicrobial-resistant pathogens. Nevertheless, the increase of plasmid-mediated β -lactam-resistant pathogens, including carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), is a major concern worldwide. Therefore, highly sensitive and specific methods for CPE detection in clinical laboratory setting are critical. In this review, we provide an overview of the currently available screening methods without molecular methods for the detection of CPE.