

[原 著]

ESBLs 迅速検出法 modified ESBL NDP test の有用性に関する検討

上地幸平¹⁾²⁾・仲宗根勇³⁾・野中実可子¹⁾・新垣桃子¹⁾

當銘高明¹⁾・藤田次郎²⁾・前田士郎¹⁾

¹⁾ 琉球大学医学部附属病院検査・輸血部

²⁾ 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学講座

³⁾ 琉球大学医学部附属病院感染対策室

(平成 29 年 6 月 30 日受付, 平成 29 年 12 月 4 日受理)

基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamases : ESBLs) 産生菌の確認は培養に依存した方法を採用している施設が多い。しかし、培養に依存した表現型確認試験は時間を要するだけでなく AmpC β-ラクタマーゼなど、他の β-ラクタマーゼを共産する株では ESBLs 産生の有無を明確に判定できないことがある。また、PCR や質量分析計による検出法は高価な機器を要し、手技が煩雑であるといった問題もある。今回、ESBLs 迅速検出法である ESBL NDP test の改良法 (modified ESBL NDP test) についてその有用性を検討した。

各種臨床材料より分離された第 3 世代セファロsporin 系抗菌薬に耐性を示した腸内細菌科細菌 152 株 (ESBLs 産生群 127 株, non-ESBL 産生群 25 株) を対象とした。さらに血液培養陽性ボトルからグラム染色にてグラム陰性桿菌が確認された検体 102 件を試験対象として、血液培養陽性ボトルからの ESBLs 直接検出法の有用性についても検討した。Double Disk Synergy Test (DDST) を参照法とした際の modified ESBL NDP test の感度は 94.5% (120/127 株)、特異度は 88.0% (22/25 株) であり、ESBLs 産生群 120 株のうち、81.7% (98 株) が 30 分以内に modified ESBL NDP test 陽性と判定された。血液培養陽性ボトルからの直接検出法では 102 件の血液培養陽性検体中 21 件から ESBLs 産生菌 (CTX-M 型) が検出され、そのすべてで modified ESBL NDP test が陽性と判定された。また、前処理時間を含め判定までに要した時間はすべて 1 時間以内であった。

modified ESBL NDP test は迅速かつ簡便に ESBLs 産生を判定可能であり、発育した菌株のみならず血液培養陽性ボトルからの ESBLs 直接検出法として有用であると考えられた。

Key words: 腸内細菌科細菌, Extended-Spectrum β-lactamases (ESBLs), 迅速検出, modified ESBL NDP test, 血液培養

序 文

近年、広域抗菌薬の使用量の増加とともに、世界中でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-

resistant *Enterobacteriaceae* : CRE) をはじめとする薬剤耐性菌が問題となっており、我が国においてもその拡散と増加が懸念されている¹⁾。しかし、現在の我が国の臨床現場における薬剤耐性グラム陰性桿菌の問題の中心は広域セファロsporin 系薬剤に耐性を示す腸内細菌科細菌、特に、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamases : ESBLs) 産生腸内細菌科細菌の蔓延である。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の公開情報によると第 3 世代セファロsporin 系抗菌薬、特に、セフォ

著者連絡先 : (〒903-0215) 沖縄県中頭郡西原町字上原 207
琉球大学医学部附属病院検査・輸血部
上地幸平
TEL: 098-895-3331 (内線 3332)
FAX: 098-895-1463
E-mail: uechi21@med.u-ryukyu.ac.jp

タキシム (Cefotaxime : CTX) に耐性を獲得した *Escherichia coli* の割合は 2008 年に 11% であったのに対し、2015 年には 24.5% と増加しており²⁾、主に ESBLs 産生が疑われる菌株の増加が推測される。

ESBLs 産生腸内細菌科細菌は 1980 年代半ばに初めてヨーロッパで報告され³⁾、国内においては 1995 年に Ishii らによって Toho-1 型 (CTX-M 型) ESBL 産生 *E. coli* が初めて報告された⁴⁾。ESBLs は Ambler の分類でクラス A⁵⁾、Bush & Jacoby らの分類ではサブグループ 2be に分類され⁶⁾、セファマイシン系やカルバペネム系を除くすべての β -ラクタム系抗菌薬を分解し、その薬剤耐性遺伝子が主にプラスミド上に存在しているため菌種を超えて伝達されることが知られている⁵⁾⁶⁾。ESBLs は CTX-M 型や SHV、TEM 型など様々な遺伝子型が知られているが、現在 CTX-M 型が主流となっている。CTX-M 型は CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、CTX-M-8/25 型などのグループに大別され、さらに 100 種以上のバリエーションに分類されている⁷⁾。2000 年頃から増加の一途を辿る ESBLs 産生腸内細菌科細菌であるが、その多くを *E. coli* が占め、近年では市中の健康成人における尿路感染症や敗血症の起原菌として分離されるケースも増加している⁸⁾。当院における血液培養検体における ESBLs 産生 *E. coli* の割合は入院患者で 2012 年 27.8%、2016 年 29.7% であったのに対し、外来患者では 2012 年 18.2%、2016 年 28.6% とわずか 4 年で 10 ポイントも増加していた。また、ESBLs 産生 *E. coli* においては抗原型 O25 : H4、Multilocus sequence typing (MLST) が Sequence type (ST) 131 に分類され、CTX-M 型 ESBLs を産生する単一クローン株の拡散と増加が世界的に問題となっており⁹⁾¹⁰⁾、本邦においても Matsumura らによってその増加が報告されている¹¹⁾。これらのことから ESBLs 産生菌を迅速かつ正確に検出することは患者個々の感染症治療のみならず、その拡がりを制御・抑制するうえで非常に重要である。

ESBLs 産生菌の検出は選択培地上における細菌の発育、または薬剤感受性プロファイルからその存在を疑い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の推奨する combined-disk test (CLSI 法) や Double Disk Synergy Test (DDST) などを用いて表現型を確認する方法を多くの施設が採用している¹²⁾¹³⁾。しかし、いずれの方法においても培養法を基に試験が行われるため、表現型の確認には時間を要する。また、PCR を用いて検体中からその耐性遺伝子を数時間で直接検出する方法や分離菌と抗菌薬溶液を反応させ ESBLs を間接的に質量分析計 (Matrix-

assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry : MALDI-TOF MS、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析) で検出する方法¹⁴⁾も報告されているが、いずれの方法も高価な機器を要し、手技が煩雑であるため日常検査から分離されるすべての薬剤耐性腸内細菌科細菌に用いることは現実的ではない。

2012 年に Nordmann らによって報告された ESBL NDP (Nordmann/Dortet/Poirel) test は反応チューブ内において ESBLs が CTX の β -ラクタム環を開環し、加水分解する際に生じる H^+ をフェノール赤にて生化学的に捉えるのに加え、ESBLs がタゾバクタム (Tazobactam : TAZ) やクラヴラン酸 (Clavulanate : CVA) にてその活性が阻害されるという原理を利用した方法である¹⁵⁾。本法は迅速かつ正確に ESBLs 産生を検出できる方法であり、感度・特異度がともに優れていることが報告されている¹⁵⁾。さらに、Nordmann らは ESBL NDP test を用いて血液培養陽性ボトルからの ESBLs 直接検出を検討しており、その感度・特異度がともに 100%、検査所要時間も 1 時間以内と非常に有用な方法であることが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。ESBL NDP test では ESBLs の阻害に TAZ (4 mg/mL) を 10 μ L 用いているが、今回我々は TAZ に比し日常検査において入手および調整がより簡便な CTX/CVA ディスク (CVA 10 μ g 含有) を阻害剤として使用し、modified ESBL NDP test の有用性について検討した。

対象と方法

1. 材料

2015 年に琉球大学医学部附属病院にて血液、尿、糞便などの臨床検体から分離・同定され、薬剤感受性試験の結果、第 3 世代セファロsporin 系抗菌薬である CTX やセフポドキシム (Cefpodoxime : CPDX)、セフトジジム (Ceftazidime : CAZ) のいずれかに耐性を示した腸内細菌科細菌 152 株 (ESBLs 産生菌 127 株、non-ESBL 産生菌 25 株) を対象とした。対象菌株における ESBLs 産生の有無は表現型確認試験 DDST を参照法とし、SHV や TEM 型遺伝子保有株であっても DDST 陰性株は non-ESBL 産生菌とした。また、血液培養ボトルからの ESBLs 直接検出法の検討は、培養陽性となった血液培養ボトルの培養液のグラム染色結果からグラム陰性桿菌が確認された 102 件 147 本 (好気ボトル 76 本、嫌気ボトル 62 本、小児ボトル 9 本) を対象とした。

2. 同定・薬剤感受性試験

対象菌株の同定は VITEK MS Myla System (bioMeriux) を用い、薬剤感受性試験は VITEK2 N 268 カード (bioMeriux) を用い、CLSI M100-S22¹²⁾ に従って判定した。

3. ESBLs 表現型確認試験 (DDST) および AmpC β-ラクタマーゼ確認試験

DDST による ESBLs 表現型確認試験は CLSI の基準に従い、アズトレオナム (Aztreonam: AZT, 栄研化学) と CTX, CPDX, CAZ (栄研化学) とアモキシシリン/クラバン酸 (Amoxicillin/Clavulanate: AMPC/CVA, 栄研化学) ディスクを用いて行った。AMPC/CVA ディスクに対して、AZT や CTX, CPDX, CAZ ディスクのうちいずれかの薬剤に対して阻害帯が形成された場合、ESBLs 陽性と判定した¹³⁾。また、AmpC β-ラクタマーゼ産生の有無は CLSI の ESBLs スクリーニング基準に加え、セフメタゾール (Cefmetazole: CMZ) の MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示した菌株を対象とした。これらの菌種については m-Aminophenylboronic Acid Hydrochloride (BA, 和光純薬) 50 mg/mL と Cloxacillin sodium salt monohydrate (CX, Sigma Aldrich) 75 mg/mL をその阻害薬 (各 6 $\mu\text{L}/\text{disk}$ 滴下) として、CMZ と CPDX ディスクもしくはメロペネム (Meropenem: MEPM, 栄研化学) ディスクを用いて確認試験を実施した。BA もしくは CX 未添加のディスク周囲の阻止円径と比して、BA もしくは CX を滴下したディスクの阻止円径が 5 mm 以上拡張した場合、AmpC β-ラクタマーゼ産生と判定した。

4. 菌株を用いた modified ESBL NDP test および ESBL NDP test

4.1. 試薬調整

modified ESBL NDP test および ESBL NDP test に用いた細菌酵素抽出用試薬は 20mM Tris-HCl lysis buffer (pH7.4) (B-PERII Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) を用いた。CTX 3 mg/mL フェノール赤溶液は以下の方法で作成した。滅菌蒸留水 16.6 mL に 0.5% フェノール赤溶液 2 mL と最終濃度が 3 mg/mL になるよう Cefotaxime sodium salt (和光純薬, Cat. 030-16113) を加え、1N NaOH を用いて pH7.8 に調整した。modified ESBL NDP test には ESBLs 阻害薬として、ESBLs 確認用 ESBLs-CTX/CVA ‘栄研’ (栄研化学) を用いた。また、ESBL NDP test は Nordmann らの報告に従い、Tazobactam sodium salt (Sigma Aldrich, Cat. T2820) を滅菌蒸留水にて 4 mg/mL の濃度になるよう用時調整し、さ

らに pH7.8 に追加調整を行い、試験に用いた。

4.2. modified ESBL NDP test および ESBL NDP test

5% ヒツジ血液寒天培地に 18~20 時間純培養した菌株を 10 μL 白金耳を用いて 20 mM Tris-HCl lysis buffer 100 μL に懸濁し、濃厚菌液を作成した。菌の懸濁液を 10~15 秒間ボルテックスミキサーにて混和後、室温 (25°C) で 30 分間インキュベートし、10,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。1 株につき 3 本のチューブを試験に用いた。チューブ A は 0.5% フェノール赤溶液 200 $\mu\text{L}/\text{tube}$ 、チューブ B と C は CTX 3 mg/mL 含有 0.5% フェノール赤溶液 200 $\mu\text{L}/\text{tube}$ を加えた。さらに、modified ESBL NDP test では ESBLs の阻害薬としてチューブ C に CTX/CVA ディスクを 1 枚加えたのに対し、ESBL NDP test は TAZ 溶液 (4 mg/mL) 10 μL を加えた。各チューブに菌懸濁液の遠心上清 30 μL を混和し、37°C で最大 2 時間まで観察し、最終判定とした。本検討はすべて 2 重測定を行った。また、参照法とした DDST や PCR 法による遺伝子型の結果と不一致が確認された菌株については β-ラクタマーゼの産生を誘導する目的で CPDX ディスク周辺の菌体を用いて再試験を実施した。

4.3. 結果判定

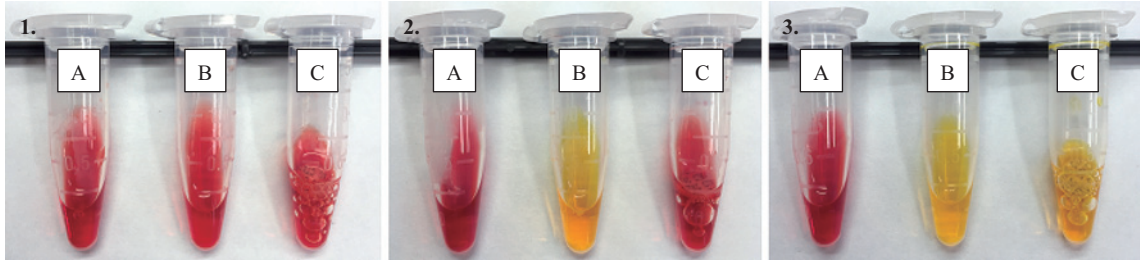
チューブ B と C の色調がコントロール (チューブ A) と比較して黄変した場合、CTX が分解されたと判断した。即ち、チューブ A/B/C (赤/赤/赤) の反応は ESBLs 陰性、チューブ A/B/C (赤/黄/赤) の反応は ESBLs 陽性、チューブ A/B/C (赤/黄/黄) の反応は判定不能とした。また、チューブ A が黄変した場合は判定不可とした (Fig. 1)。

5. PCR 法による β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

ESBL NDP test 対象菌株は Cica genius DNA Extraction Kit (関東化学) を用いて DNA を抽出し、Dallenne らの方法¹⁷⁾に従って PCR を実施した。ESBLs は CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8/25 型と SHV, TEM 型を対象遺伝子とした¹⁷⁾。また、AmpC β-ラクタマーゼは ACC, MOX, CIT, FOX, DHA 型と EBC 型を対象遺伝子とした¹⁷⁾。さらに、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示した菌株は carbapenemase 遺伝子検索のため GES, IMP, KPC, NDM, VIM 型と OXA-48 型について PCR 法を行った¹⁷⁾。

6. 血液培養陽性ボトルからの modified ESBL NDP test

血液培養陽性ボトルからの ESBLs 産生菌の直接検出法は BacT/ALERT 3D 自動血液培養装置 (bioMeriux) にて菌の発育が陽性と判定された好気



Tube A	Tube B	Tube C	Result
Red	Red	Red	→ Non ESBLs producer
Red	Yellow	Red	→ ESBLs producer
Red	Yellow	Yellow	→ Undeterminable* ^a

Fig. 1. Representative results of the modified ESBL NDP test

Enzyme solutions extracted from bacterial cultures for 1. *E. coli* ATCC25922 inoculated (negative control), 2. CTX-M9-type ESBL producing *E. coli* clinically isolated (positive control), 3. Chromosomal AmpC β -lactamase producing *E. cloacae* complex clinically isolated (undeterminable).

Tube A: no antibiotic, B: CTX 3 mg/mL, C: CTX 3 mg/mL and CTX/CVA disk (30 μ g/10 μ g). If the ESBLs producing *Enterobacteriaceae* hydrolyzes CTX, the phenol-red color turns to yellow in tube B, but not in tube C.

*^a Overproduced AmpC β -lactamases or carbapenemases hydrolyze CTX also in Tube C.

ボトル (FA Plus), 嫌気ボトル (FN Plus) と小児ボトル (PF Plus) を用いた。陽性と判定された血液培養ボトルから培養液 1 mL を 1.5 mL チューブに採取し、10,000 \times g で 3 分間遠心分離した。次に、上清を捨て、滅菌蒸留水を 1 mL 加え、ボルテックスミキサーにて十分混和後 10,000 \times g で 3 分間遠心分離した。この操作を 2 度繰り返す、ペレットをボルテックスミキサーにて十分混和し、20 mM Tris-HCl lysis buffer を 100 μ L 加え、1 分間ボルテックスミキサーにて十分混和した。室温 (25 $^{\circ}$ C) にて 10 分間インキュベートし、再度 10,000 \times g で 3 分間遠心分離し、その上清を ESBL NDP test の試験菌液として用いた。

結 果

対象菌株の耐性遺伝子型および各試験結果を Table 1 に示す。対象菌株のうち ESBLs 産生群は 127 株であり、その内訳は ESBLs 単独産生株 (DDST 陽性) 95 株 (*Citrobacter koseri* 5 株, *Enterobacter cloacae* complex 2 株, *E. coli* 76 株, *Klebsiella pneumoniae* 10 株, *Proteus mirabilis* 2 株), ESBLs と AmpC β -ラクタマーゼ共産生株 (DDST 陽性かつ AmpC 確認試験陽性) 32 株 (*C. koseri* 7 株, *E. cloacae* complex 15 株, *E. coli* 4 株, *Klebsiella oxytoca* 3 株, *K. pneumoniae* 1 株, *Morganella morganii* 1 株, *Pantoea agglomerans* 1 株) であった。ESBLs 非産生群 (DDST 陰性)

は 25 株 (*Citrobacter braakii* 1 株, *Citrobacter freundii* 2 株, *C. koseri* 1 株, *E. cloacae* complex 4 株, *E. coli* 16 株, *K. oxytoca* 1 株) であった。

1. 菌集落を用いた検討

ESBLs 産生群 (DDST 陽性) 127 株のうち、ESBL NDP test 陽性は 119 株、modified ESBL NDP test 陽性は 120 株であった。ESBLs 産生群のうち modified ESBL NDP test 陰性を示した菌株が 5 株 (SHV 型遺伝子保有株 5 株) 認められ、これらはすべて ESBL NDP test でも陰性であった。また ESBLs 産生群のうち ESBL NDP test において判定不能 (チューブ B/C : 黄/黄) と判定された 3 株のうち 2 株は CTX-M-1 型 ESBLs 遺伝子を保有する *K. pneumoniae* 1 株と *E. cloacae* complex 1 株であり、1 株は SHV 型遺伝子および DHA 型 AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子を保有し、またカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す *K. pneumoniae* (CRE) であった。modified ESBL NDP test にて判定不能となった 2 株は CTX-M-1 型もしくは CTX-M-9 型 ESBLs 遺伝子を保有する *K. pneumoniae* であり、そのうち 1 株 (CTX-M-1 型 ESBLs 遺伝子保有株) は ESBL NDP test でも同様に判定不能であった。ESBLs 非産生群 (DDST 陰性) 25 株は ESBL NDP test, modified ESBL NDP test いずれも *E. cloacae* complex 3 株を除き陰性と判定された。ESBLs 産生群 127 株のうち、CTX-M 型 ESBLs 遺伝子保有株は 109

Table 1. Detection of clinical isolates for β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* using the modified ESBL NDP test

Species (No. of isolates)	Genotype (n)	Range of MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Comparison of phenotypic check test* ^a (Positive/isolates)		
		CTX	CAZ	mNDP	NDP	AmpC
ESBLs producer (DDST positive) (95)						
<i>C. koseri</i> (5)	CTX-M-9-type (4)	16 - ≥ 64	4 - 8	4/4	4/4	NT
	SHV (1)	8	≥ 64	1/1	1/1	NT
<i>E. cloacae</i> complex (2)	CTX-M-1-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	0/1
	SHV, TEM-type (1)	2	16	1/1	1/1	0/1
<i>E. coli</i> (76)	CTX-M-1-type (9)	≥ 64	16 - ≥ 64	9/9	9/9	NT
	CTX-M-2-type (2)	≥ 64	$\leq 1 - 4$	2/2	2/2	NT
	CTX-M-9-type (32)	8 - ≥ 64	$\leq 1 - \geq 64$	32/32	32/32	NT
	CTX-M-1, TEM-type (14)	≥ 64	4 - ≥ 64	14/14	14/14	NT
	CTX-M-9, TEM-type (18)	4 - ≥ 64	$\leq 1 - 16$	18/18	18/18	NT
<i>K. pneumoniae</i> (10)	CTX-M-8/25, TEM-type (1)	4	≤ 1	1/1	1/1	NT
	CTX-M-9, SHV-type (4)	4 - ≥ 64	≤ 1	3/4* ^c	4/4	NT
	CTX-M-1, SHV, TEM-type (3)	≥ 64	4 - ≥ 64	2/3* ^c	2/3* ^c	NT
	SHV-type (3)	$\leq 1 - 8$	8 - ≥ 64	2/3	2/3	NT
<i>P. mirabilis</i> (2)	CTX-M2-type (2)	≥ 64	≤ 1	2/2	2/2	NT
ESBLs and AmpC β -lactamases co-producer (DDST and AmpC confirmation test positive) (32)						
<i>C. koseri</i> (7)	CTX-M-9, DHA-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	1/1
	CTX-M-2, SHV, DHA-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	1/1
	CTX-M-9, SHV, DHA-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	1/1
	SHV, DHA-type (4)	8 - ≥ 64	≥ 64	1/4	1/4	4/4
<i>E. cloacae</i> complex (15)	CTX-M-1-type (6)	8 - ≥ 64	4 - ≥ 64	6/6	5/6* ^c	6/6
	CTX-M-2, SHV-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	1/1
	CTX-M-9-type (7)	≥ 64	16 - ≥ 64	7/7	7/7	7/7
	CTX-M-1, FOX-type (1)	≥ 64	4	1/1	1/1	1/1
<i>E. coli</i> (4)	TEM-type (1)	16	4	1/1	1/1	1/1
	SHV, CIT-type (1)	≥ 64	16	1/1	1/1	1/1
	SHV, DHA-type (2)	≥ 64	4 - 16	2/2	2/2	2/2
<i>K. oxytoca</i> (3)	SHV, DHA-type (3)	2 - 4	16	2/3	2/3	3/3
<i>K. pneumoniae</i> (1)	SHV, DHA-type (1)	4	≥ 64	1/1	0/1* ^c	1/1
<i>M. organii</i> (1)	CTX-M-9-type (1)	≥ 64	≤ 1	1/1	1/1	1/1
<i>P. agglomerans</i> (1)	SHV, ACC-type (1)	≥ 64	≥ 64	1/1	1/1	1/1
ESBLs non-producer (DDST negative) (25)						
<i>C. braakii</i> (1)	None (1)	8	≥ 64	0/1	0/1	1/1
<i>C. freundii</i> (2)	SHV-type (1)	8	≥ 64	0/1	0/1	1/1
	None (1)	≥ 64	≥ 64	0/1	0/1	1/1
<i>C. koseri</i> (1)	DHA-type (1)	8	≥ 64	0/1	0/1	1/1
<i>E. cloacae</i> complex (4)	None (4)	2 - ≥ 64	$\leq 1 - \geq 64$	0/4* ^b	0/4* ^b	4/4
<i>E. coli</i> (16)	TEM-type (1)	≤ 1	≤ 1	0/1	0/1	0/1
	CIT-type (8)	4 - 8	4 - 32	0/8	0/8	8/8
	TEM, CIT-type (2)	8	16	0/2	0/2	2/2
	None (5)	$\leq 1 - 4$	$\leq 1 - 4$	0/5	0/5	5/5
<i>K. oxytoca</i> (1)	TEM-type (1)	≤ 1	≤ 1	0/1	0/1	NT

^a mNDP: modified ESBL NDP test, NDP: ESBL NDP test, DDST: double disk synergy test, AmpC: AmpC test^b three of the four isolates were undeterminable (Tube B/TubeC: Yellow/Yellow), and the remaining one was negative.*^c one isolate was undeterminable (Tube B/TubeC: Yellow/Yellow).

Table 2-1. Comparison between the modified ESBL NDP test and DDST

		DDST		Total
		Positive	Negative	
mNDP	Positive (Yellow/Red)	120 ^{*a, c}	0	120
	Negative (Red/Red)	5	22 ^{*b, c}	29
	Undeterminable (Yellow/Yellow)	2	3	3
Total		127 ^{*a}	25 ^{*b}	152 ^{*c}

*a Sensitivity: 94.5% (120/127)

*b Specificity: 88.0% (22/25)

*c Agreement: 94.7% (144/152)

Table 2-2. Comparison between the ESBL NDP test and DDST

		DDST		Total
		Positive	Negative	
NDP	Positive (Yellow/Red)	119 ^{*a}	0	119
	Negative (Red/Red)	5	22 ^{*b, c}	29
	Undeterminable (Yellow/Yellow)	3	3	4
Total		127 ^{*a}	25 ^{*b}	152 ^{*c}

*a Sensitivity: 93.7% (119/127)

*b Specificity: 88.0% (22/25)

*c Agreement: 94.1% (143/152)

Table 2-3. Comparison between the modified ESBL NDP test and the ESBL NDP test

		NDP			Total
		Positive	Negative	Undeterminable	
mNDP	Positive (Yellow/Red)	118 [*]	0	2	120
	Negative (Red/Red)	0	27 [*]	0	27
	Undeterminable (Yellow/Yellow)	1	0	4 [*]	5
Total		119	27	6	152 ^{*a}

*a Agreement: 98.0% (149/152)

株 (85.8%) を占め, modified ESBL NDP test 陽性株は 107 株 (98.2%) であったのに対し, SHV や TEM 型遺伝子保有株は 18 株, そのうち modified ESBL NDP test 陽性株は 13 株 (72.2%) であった。本検討における modified ESBL NDP test と ESBL NDP test の感度それぞれ 94.5% (120/127 株), 93.7% (119/127) であり, 特異度はともに 88.0% (22/25 株) であった (Table 2-1, -2)。また, 今回の検討菌株における modified ESBL NDP test と ESBL NDP test の判定一致率は 98.0% (149/152) であった (Table 2-3)。さらに, modified ESBL NDP test 陽性と判定された ESBLs 産生群 120 株のうち, 81.7% (98 株) が 30 分以内に陽

性と判定された。

2. 血液培養陽性ボトルからの ESBLs 直接検出法の検討

Table 3 に血液培養分離菌の内訳と各試験結果を示す。グラム染色所見にてグラム陰性桿菌が確認された 102 件のうち 21 件から ESBLs (DDST 陽性) 腸内細菌科細菌 (*E. coli* 18 株, *K. pneumoniae* 2 株, *P. mirabilis* 1 株) が検出され, そのすべてで modified ESBL NDP test が陽性と判定された。また, これらの腸内細菌科細菌はすべて CTX-M 型 ESBLs 遺伝子を保有していた。modified ESBL NDP test 陰性を示した 81 件の菌種の内訳は腸内細菌科細菌 66 株, ブド

Table 3. Detection of ESBLs- and non ESBLs-producing *Enterobacteriaceae* and glucose nonfermentative gram-negative rods in blood cultures using the modified ESBL NDP test

Species (no. of isolates)	Comparison of phenotypic test* ^a Positive ratios		Range of MIC (μg/mL)	
	mNDP	Direct DDST	CTX	CAZ
ESBLs-producing <i>Enterobacteriaceae</i> * ^b (21)				
<i>E. coli</i> (18)	18/18	18/18	8 - ≥64	≤1 - ≥64
<i>K. pneumoniae</i> (2)	2/2	2/2	8 - 16	≤1 - 2
<i>P. mirabilis</i> (1)	1/1	1/1	≥64	≤1
Non ESBLs-producing <i>Enterobacteriaceae</i> (66)				
<i>C. braakii</i> (1)	0/1	0/1	≤1	≤1
<i>C. freundii</i> (1)	0/1	0/1	≤1	≤1
<i>E. aerogenes</i> (2)	0/2	0/2	≤1	≤1
<i>E. cloacae</i> complex (4)	0/4	0/4	≤1 - ≥64	≤1 - ≥64
<i>E. coli</i> (44)	0/44	0/44	≤1	≤1
<i>K. pneumoniae</i> (8)	0/8	0/8	≤1	≤1
<i>P. agglomerans</i> (1)	0/1	0/1	≤1	≤1
<i>P. mirabilis</i> (2)	0/2	0/2	≤1	≤1
<i>S. marcescens</i> (3)	0/3	0/3	≤1	≤1
Nonfermentative gram-negative rods (15)				
<i>P. aeruginosa</i> (11)	0/11	0/11	NT	≤1 - 8
<i>S. maltophilia</i> (3)	0/3	0/3	NT	NT
<i>S. paucimobilis</i> (1)	0/1	0/1	NT	4

^a mNDP: modified ESBL NDP test^b ESBLs-producing *Enterobacteriaceae*: Of 18 *E. coli* isolates, four harbored a CTX-M-1-type ESBL encoding gene and 14 harbored a CTX-M-9-type. Of two *K. pneumoniae* isolates, one harbored a SHV-type and harbored a CTX-M-9-type. One *P. mirabilis* isolate harbored a CTX-M-2-type.

ウ糖非発酵菌群 15 株であった。PCR にて ESBLs 等の遺伝子が陰性であったことから染色体性 AmpC β-ラクタマーゼの過剰産生株と判定した *E. cloacae* complex 1 株は CTX や CAZ など複数の第三世代セファロスポリン系抗菌薬に耐性を示したが、modified ESBL NDP test 陰性であった。また、ブドウ糖非発酵菌群ではカルバペネム系薬剤に耐性を示す *Pseudomonas aeruginosa* が 1 株、染色体性メタロ β-ラクタマーゼ産生菌である *Stenotorophomonas maltophilia* が 3 株検出されたが、いずれもすべて modified ESBL NDP test 陰性であった。血液培養陽性ボトルからの ESBLs 直接検出の検討では Nordmann らの報告と同様に感度・特異度がともに 100% であり、培養ボトルが陽性となった後 modified ESBL NDP test を実施し、判定までに要した時間は 1 時間以内と迅速報告が可能であった。

考 察

近年、ESBLs 産生菌は院内感染のみならず、市中

感染症の起原菌として健常人の尿や血液検体から分離されることも多いため日常検査で迅速かつ正確に本耐性機構を有する菌種を分離・同定することは適切な抗菌薬選択および感染対策の観点からも非常に重要である。

ESBL NDP test は 2012 年に ESBLs 産生を迅速かつ正確に検出可能な方法として Nordmann らによって報告された¹⁵⁾。現在、ESBLs 遺伝子の多くは CTX-M 型が占め、CTX-M 型 ESBLs は第 3 世代セファロスポリン系抗菌薬の中でも CTX に対する分解活性が高いことが知られている。今回、我々は ESBL NDP test をより簡便に実施する目的で ESBLs の阻害に TAZ 溶液 (4 mg/mL) ではなく、市販の CTX/CVA ディスクを用いて検討を行った。β-ラクタマーゼ阻害薬との合剤ディスクとしてアンピシリン/スルバクタム (Ampicillin/Sulbactam: ABPC/SBT) やピペラシリン/タゾバクタム (Piperacillin/Tazobactam: PIPC/TAZ) 等も販売されているが、これらのディスクは 0.5% フェノール赤溶液を黄変させるのに対し

て、CVA 含有ディスク (CTX/CVA) は 0.5% フェノール赤溶液を黄変させないため、より日常検査で利用しやすいと判断し、本ディスクを採用した。我々の検討において、modified ESBL NDP test の感度：94.5% (120/127 株)、特異度：88.0% (22/25 株)、ESBL NDP test の感度：93.7% (119/127 株)、特異度：88.0% (22/25 株) であり (Table 2-1, -2)、両方法の判定一致率も 98.0% (149/152 株) と良好な結果を示した (Table 2-3)。CTX-M 型 ESBLs 遺伝子保有株における modified ESBL NDP test の感度は 98.2% (107/109 株) であり、2 株が判定不能 (チューブ B/C：黄/黄) であった。判定不能となった菌株は CTX-M-1 型および SHV、TEM 型遺伝子を保有する *K. pneumoniae* 1 株と CTX-M-9 型および SHV 型遺伝子を保有する *K. pneumoniae* 1 株であった。判定不能となった原因として、CTX/CVA ディスクに含まれる CVA (10 µg) で阻害可能な酵素量以上の ESBLs をこれらの菌株が産生することで、チューブ B のみならずチューブ C が黄変した、即ち、これらの菌株が ESBLs の過剰産生株であったことが考えられた。追加検討として、判定保留となった 2 株について CVA ディスクの代わりに 10 mg/mL の CVA 溶液を作成後、10 µL をチューブ C に滴加して実施した modified ESBL NDP test ではこれら 2 株は CVA による ESBLs の阻害がみられ、陽性と判定された。Nordmann らも当初の報告では ESBLs の阻害薬として 4 mg/mL の TAZ 溶液を用いていたが、その後の報告では 10 倍量の 40 mg/mL の TAZ 溶液を ESBLs の阻害薬として用いている¹⁹⁾。ESBLs 産生群 (DDST 陽性) の中でも CTX-M 型 ESBLs 遺伝子非保有、即ち SHV や TEM 型遺伝子を保有する菌株における modified ESBL NDP test の検出感度は 72.2% (13/18 株) と Nordmann らの報告と同様に低い結果であった¹⁵⁾。また、ESBLs 非産生群 (DDST 陰性) においては AmpC β-ラクタマーゼを産生する菌株が 23 株含まれており 3 株を除き modified ESBL NDP test 陰性を示した。これらの要因として Nordmann らは SHV や TEM 型 ESBLs や AmpC β-ラクタマーゼの CTX に対する分解活性が低いことや酵素産生量の低さを挙げており¹⁵⁾、β-ラクタマーゼ産生を誘導する目的で CPDX ディスク周辺の菌体を用いた再試験においても陰性を示した。ESBLs 非産生群 25 株のうち判定保留となった *E. cloacae* complex 3 株は PCR 法にて対象とした遺伝子すべてに陰性を示したことに加え、薬剤感受性プロファイルから染色体性 AmpC β-ラクタマーゼの過剰産生株と考えられ、AmpC β-ラクタマーゼを過剰産生したこ

とで判定保留となったと判断した。Nordmann らの報告においても染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ過剰産生 *E. cloacae* 5 株中 3 株が判定不能となっており、プラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼ産生株においても同様の現象がみられている¹⁵⁾。さらに、当院で保有するカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 26 株を用いて modified ESBL NDP test を実施したところ、26 株中 22 株が判定不能となったが、4 株は陽性 (チューブ B/C：黄/赤) となり ESBLs と判定された。modified ESBL NDP test 陽性となった 4 株はすべて GES-5 遺伝子保有株であった (data not shown)。以上のことから、modified ESBL NDP test の結果が判定保留となった場合のみならず、陽性と判定された場合においても薬剤感受性プロファイルや DDST など他の確認試験を併用する必要があると考える。

血液培養陽性ボトルからの直接検出法の検討では ESBLs 産生菌が検出された 21 件すべてにおいて modified ESBL NDP test が陽性となり、血液培養陽性ボトルの培養液から直接行った DDST の結果とも 100% 一致し、その感度・特異度は 100% であった。また、検査に要した時間はすべて 1 時間以内と迅速に結果を得ることができた。日本においては検体からの分離培養に選択培地を用いる施設は少ないと思われる。そのため薬剤感受性プロファイルから ESBLs 産生菌のスクリーニングを行い、その後、CLSI 法などの確認試験を行うのが一般的である。このような検査手順は細菌の増殖速度に依存して検査が進められるため、検体受付から結果報告までに時間を要する。細菌検査結果の遅延は適切な抗菌薬投与の遅延に繋がる恐れもあり、感染症患者における予後不良因子とされている。特に、敗血症性ショックなど重症感染症を発症した患者では適切な抗菌薬治療が 1 時間遅れるごとに患者生存率が 7.6% 減少するとの報告もあり¹⁸⁾、重症感染症患者において迅速かつ適切な抗菌薬治療が必要となる。近年では大学病院を中心に MALDI-TOF MS を用いた菌種同定法が少しずつ普及し始め、血液培養陽性ボトルから菌種を 1 時間以内に直接同定することが可能となっている。さらに MALDI TOF MS を用いて ESBLs やカルバペネマーゼ産生を検出する方法も報告されており¹⁴⁾、今後は菌種同定に加え、薬剤耐性に関してもより迅速かつ正確な結果報告が求められる。このことから血液培養陽性ボトルから迅速かつ正確に ESBLs 産生の有無を判定できる本試験は患者治療における抗菌薬適正使用に有用と考える。また、ESBL NDP test については血液培養陽性検体以外にも尿路感染症を疑う際の尿検体を用いた検討も行われ

ており、検査所要時間 15 分以内と尿検体においても迅速かつ正確に ESBLs 産生腸内細菌科細菌を検出可能と報告されている¹⁹⁾。今回報告した modified ESBL NDP test も同様と考えるが、今後の追加検討が必要である。

今回、迅速かつ正確に ESBLs 産生腸内細菌科細菌を検出することができる ESBL NDP test に若干の改良を加え、検討を行った。本検討の制限事項として、(1) 本検討で用いた菌株はすべて ESBLs および AmpC β -ラクタマーゼの遺伝子型をシーケンス等で決定していない菌株であるということ、(2) 菌株はすべて当院で分離された菌株であり、CTX-M 型遺伝子など特定の遺伝子型のみを PCR で検出する方法を用いたため GES や PER 型など他の ESBL 遺伝子の保有状況が不明であり、遺伝子型に限られることが挙げられる。以上のことから、modified ESBL NDP test の真の感度・特異度を算出するためには今後さらなる検討が必要であると考えられる。しかし、modified ESBL NDP test は陽性となった血液培養検体から迅速かつ正確に ESBLs 産生を検出可能であることが我々の検討でも示された。また市販の CTX/CVA ディスクを用いるため ESBL NDP test に比べ、より簡便かつ安価な方法である。通常、ESBLs 産生菌の検出は薬剤感受性試験を実施した後に確認試験を実施するため結果報告までに 2~3 日を要する。modified ESBL NDP test を実施することで被検菌が ESBLs 産生菌の可能性があるという情報を細菌検査室からいち早く臨床現場に情報提供することができ、適切な感染症治療・感染対策の実施に貢献できるものと考えられる。

本論文の要旨は、第 27 回日本臨床微生物学会総会(仙台)において発表した。

利益相反: 申告すべき利益相反なし。

文 献

- Schwaber, M.J., Y. Carmeli. 2008. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. A potential threat. *JAMA* 300 (24): 2911-2913.
- 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) 検査部門公開情報 <http://www.nih-janis.jp/report/kensa.html>. 2017 年 9 月 14 日現在.
- Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, et al. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11 (6): 315-317.
- Ishii, Y., A. Ohno, H. Taguchi, et al. 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (10): 2269-2275.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289 (1036): 321-331.
- Bush, K., G.A. Jacoby, A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (6): 1211-1233.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (1): 1-14.
- Doi, Y., Y.S. Park, J.I. Rivera, et al. 2013. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis* 56 (5): 641-648.
- Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, D.L. Paterson. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 66 (1): 1-14.
- Price, L.B., J.R. Johnson, M. Aziz, et al. 2013. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone. *H30-Rx. mBio* 4 (6): 1-10.
- Matsumura, Y., M. Yamamoto, M. Nagao, et al. 2012. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 67 (11): 2612-2620.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22th informational supplement. CLSI document M100-S22. (Clinical and Laboratory Standards Institute ed.), Wayne, PA.
- Tzelepi, E., P. Giakkoupi, D. Sofianou, et al. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 38 (2): 542-546.
- Oviano, M., B. Fernandez, A. Fernandez, et al. 2014. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 20 (11): 1146-1157.
- Nordmann, P., L. Dortet, L. Poirel. 2012. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *En-*

- terobacteriaceae*. J Clin Microbiol 50 (9): 3016-3022.
- 16) Dortet, L., L. Poirel, P. Nordmann. 2015. Rapid detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. Emerg Infect Dis 21 (3): 504-507.
- 17) Dallenne, C., A.D. Costa, D. Decre, et al. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 65 (3): 490-495.
- 18) Kumar, A., D. Roberts, K.E. Wood, et al. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 34 (6): 1589-1596.
- 19) Dortet, L., L. Poirel, P. Nordmann. 2014. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* from urine samples by use of the ESBL NDP test. J Clin Microbiol 52 (10): 3701-3706.

Evaluation of the modified ESBL NDP test for a rapid detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) produced by *Enterobacteriaceae*

Kohei Uechi^{1) 2)}, Isamu Nakasone³⁾, Mikako Nonaka¹⁾, Momoko Arakaki¹⁾,
Takaaki Tome¹⁾, Jiro Fujita²⁾, Shiro Maeda¹⁾

¹⁾Division of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, University of the Ryukyus Hospital, Okinawa, Japan

²⁾Department of Infectious, Respiratory, and Digestive Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

³⁾Control and Prevention of Infectious Disease, University of the Ryukyus Hospital, Okinawa, Japan

Available conventional methods for clinical microbiology laboratories to detect Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Enterobacteriaceae* isolates are time consuming because of the period required for bacterial culture. Additionally, the methods possibly fail to detect the production of ESBLs, especially when other β -lactamases, such as AmpC β -lactamases, are simultaneously produced. The ESBL NDP test is a rapid method for detection of ESBLs in *Enterobacteriaceae*. In this study, we developed a modified ESBL NDP test and evaluated it using a commercially available CTX/CVA disk instead of tazobactam. The modified ESBL NDP test was applied to cultured clinical isolates from various specimens, 127 ESBLs producing and 25 non-producing *Enterobacteriaceae* isolates, that were resistant to at least one of third generation cephalosporin. The sensitivity and specificity of this test for the cultured isolates were 92.1% and 88.0%, respectively. Moreover, 81.7% (98/117 isolates) of ESBLs positive isolates were detected within 30 minutes. We also evaluated the usefulness of the test using 102 positive blood culture samples for Gram-negative bacteria. Among the samples examined, 21 isolates were identified as CTX-M-type ESBLs producing *Enterobacteriaceae*, and were positive on the modified ESBL NDP test. The complete cycle of the modified ESBL NDP test finished within one hour. From these observations, we conclude that the modified ESBL NDP test is a useful and rapid detection method for ESBLs producing *Enterobacteriaceae* isolates from both bacterial colonies and positive blood culture samples.