

[原 著]

*Acinetobacter* 属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法とリアルタイム PCR 法、シカジーニース分子疫学解析 POT キット（アシネトバクター属菌用）を用いたタイピングの検討

海宝まゆ子<sup>1)2)</sup>・中澤武司<sup>2)</sup>・樋口綾子<sup>1)</sup>・大出恭代<sup>1)</sup>・喜納勝成<sup>1)</sup>

三宅一徳<sup>1)</sup>・村田健介<sup>2)4)</sup>・井上貴昭<sup>5)</sup>・佐々木信一<sup>2)3)</sup>

<sup>1)</sup> 順天堂大学医学部附属浦安病院臨床検査医学科

<sup>2)</sup> 順天堂大学医学部附属浦安病院感染対策室

<sup>3)</sup> 順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科

<sup>4)</sup> 順天堂大学医学部附属浦安病院救急診療科

<sup>5)</sup> 筑波大学附属病院救急・集中治療部

(平成 30 年 8 月 9 日受付, 令和元年 10 月 2 日受理)

当院では 2014 年より *Acinetobacter* 属菌の分離件数の増加を認め、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて分子疫学解析を施行した。しかし PFGE は煩雑でコストと時間がかかるため、*Acinetobacter* 属菌のうちアウトブレイクを起こしやすい株の迅速かつ簡便な識別を目的として、リアルタイム PCR 法を用いて世界流行株とされる international clone II 耐性遺伝子の検出を試みた。更にシカジーニース分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) による検討も加えて解析を行い、上記 2 法の有用性を PFGE の結果を基に比較検討した。2014 年 6 月から 2016 年 10 月までに分離され、*Acinetobacter* 属菌と判定された菌株は 92 株であった。92 株の PFGE 解析で、同一クローン (類似性 $\geq$ 90%) と判定された 30 株は、全て、リアルタイム PCR 法において *bla*<sub>OXA-51</sub> に *ISAbal* が挿入されていた。耐性遺伝子のリアルタイム PCR 法は、アウトブレイクを起こしやすい株を簡便に識別できた。シカジーニース分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) では、リアルタイム PCR 法で *bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性の 58 株がすべて *Acinetobacter baumannii* と同定され、さらに *ISAbal-bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性の 30 株は POT 値 1 が全て 122 であった。POT 値 2 と 3 によるクローンの型別では、122-24-55 (33%), 122-26-55 (43%) が多くを占める 5 グループに分かれた。POT 法は、短時間でアウトブレイクを起こしやすい株の識別と同一クローンの鑑別を同時に行うことができるが、一方で耐性遺伝子の検出はできないことが課題として挙げられた。

**Key words:** *Acinetobacter* 属菌, 疫学調査, パルスフィールドゲル電気泳動法, リアルタイム PCR 法, シカジーニース分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用)

序 文

*Acinetobacter* 属菌は好気性グラム陰性短桿菌で、*Acinetobacter baumannii* は院内感染の主要な原因菌である<sup>1)</sup>。*A. baumannii* の中でも、international clone I, international clone II あるいは international clone III と呼ばれる菌による院内感染が報告されている<sup>2)</sup>。このうち international clone II は世界的流行株として知られ<sup>3)</sup>、本邦でも死亡例を含む *A. baumannii* の院内感染事例が散発的に報告されている<sup>4)~6)</sup>。

*A. baumannii* international clone II の多くは、class D に属するカルバペネム分解型  $\beta$ -ラクタマーゼ (CHDL) を産生し、カルバペネム系薬に耐性を示すことが知られているが、一部には class B に属するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) を産生してカルバペネム系薬に耐性を示す菌株も報告されてい

る<sup>7)8)</sup>。

*A. baumannii* が産生する CHDL は、*A. baumannii* が菌種固有の遺伝子として保有する *bla*<sub>OXA-51</sub> や、*bla*<sub>OXA-23</sub>、*bla*<sub>OXA-24</sub>、*bla*<sub>OXA-58</sub> が主要グループである<sup>1)3)</sup>。但し *bla*<sub>OXA-58</sub> 以外の遺伝子が発現されるためには、各 CHDL をコードする遺伝子の上流に *ISAbal* と呼ばれるプロモーター配列を有する可動性遺伝子が挿入されなければならない。

*Acinetobacter* 属菌の院内感染対策において微生物検査が貢献するためには、international clone か否かを含む分離株の遺伝的関連性を識別することが重要である。そのためには、従来からパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が汎用されてきたが、検査が煩雑で時間を要することから、迅速性が求められる院内感染対策の局面ではあまり有用とは言えなかった。

以上の背景から、当院では international clone とカルバペネム耐性遺伝子の識別を目的として、臨床材料から分離された *Acinetobacter* 属菌を対象に、*bla*<sub>OXA-51</sub> 及び *bla*<sub>OXA-23</sub> 上流への *ISAbal* の挿入の確認と、*bla*<sub>OXA-23</sub>、*bla*<sub>OXA-24</sub>、*bla*<sub>OXA-58</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>VIM</sub> をリアルタイム PCR で検出している<sup>9)~11)</sup>。本研究では、

著者連絡先：(〒279-0021) 千葉県浦安市富岡 2-1-1  
順天堂大学医学部附属浦安病院臨床検査医学科  
海宝まゆ子  
TEL: 047-353-3111  
FAX: 047-351-1105

現行の PFGE, 当院で利用しているリアルタイム PCR による international clone 鑑別法, さらに市販のシカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) の遺伝的菌株識別能を比較検討し, その有用性を検証した。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

2014 年 6 月から 2016 年 10 月の間に, 当院に入院中の患者検体から新規に分離された *Acinetobacter* 属菌のうち, PFGE 解析が実施された 92 株を供試菌株とした。菌種同定に用いた自動同定薬剤感受性検査機器は, Micro Scan Walk Away 96 Plus (ベックマン・コールター, 東京), パネルは Neg NF Combo 1J (ベックマン・コールター, 東京) を使用した。

### 2. PFGE による *Acinetobacter* 属菌の遺伝的関連性の解析

35°C で培養した被検菌を BHI Broth に懸濁し 16~20 時間培養したのち, プラグを作製した。アクロモペプチダーゼにて溶菌, 蛋白除去処理し, 制限酵素 *Sma*I (タカラバイオ, 滋賀) により 30°C で 24 時間制限酵素処理した。PFGE は CHEF DR III (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ, USA) を用い, 泳動槽の温度は 12°C, 電圧は 6.0 V/cm, 泳動時間 18.5 時間, 角度は 120 度として行った。クラスター解析は UP-GMA 法 (非加重結合法) により行い, FingerprintingII Software ver. 3.00 (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ) を用いて系統樹を作成し, 解析には Dice 係数 (最適化 0.0%, トランス値 1.0%) を使用した。

### 3. リアルタイム PCR によるカルバペネム耐性関連遺伝子の検出

ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディキンソン, 東京) を用いて, 35°C, 24 時間好気培養したコロニーを 1  $\mu$ l 定量白金耳を用いて採取し, 200  $\mu$ l の精製水に懸濁した。ヒートブロックにて 95°C, 30 分間加熱した後, 15,000 rpm で 5 分間冷却遠心し, 上清を鋳型ゲノムとした。

PCR は, Light Cycler 480 High Resolution Melting Master (ロシュ・ダイアグノスティックス, スイス) を使用し, プライマー配列は Turton ら<sup>12)</sup>, PCR 条件は Woodford らの報告<sup>13)</sup> に準拠した。*bla*<sub>OXA-51</sub> および *bla*<sub>OXA-23</sub> の上流に存在する IS*Aba*I の検出は Segal の報告<sup>14)</sup> に従ったが, PCR 反応は 45 回に増加した。*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> の検出用プライマーは, Light Mix Modular Kit IMP-Carbapenemase R6G および Light Mix Modular Kit VIM-Carbapenemase R0X (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用し, PCR 反応液は TaqMan 法に準拠した Light Cycler Multiplex DNA Master (ロシュ・ダイアグノスティックス, スイス) を使用し, 添付文書に従って PCR を行った。PCR 増幅産物の特異性は, 増幅産物の理論的 T<sub>m</sub> 値と融解曲線から得られた T<sub>m</sub> が一致することを確認した。

この結果より, 供試菌株が持つカルバペネム耐性関連遺伝子が, PFGE の系統樹の類似性とどのように相対するかを比較検討した。

### 4. シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) を用いた遺伝的関連性の解析

ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディキンソン, 東京) を用いて, 35°C, 24 時間好気培養したコロニーを 1  $\mu$ l 定量白金耳を用いて採取し, 200  $\mu$ l の精製水に懸濁した。鋳型ゲノムは, シカジーニウス DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いて調製した。シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用: 関東化学, 東京) を使用して PCR 反応後, 4% に調整した Agarose KANTO HC (関東化学, 東京) を使用して, 電気泳動を行った。電気泳動の結果は添付文書に従って POT 値を決定した。すなわち, POT 値 1 を用いて菌種同定と international clone の識別, POT 値 2 と 3 を用いて菌株間の遺伝的関連性を類推した。

この結果より, 供試菌株の POT 値が, PFGE の系統樹の類似性とどのように相対するかを比較検討した。

## 結 果

### 1. 供試した *Acinetobacter* 属菌の PFGE による遺伝的関連性の検討

*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性 *Acinetobacter* spp. 58 株の PFGE を解析して得られた遺伝的関連性を示す系統樹を, 図 1 と図 2 に示す。

### 2. リアルタイム PCR による *Acinetobacter* 属菌が保有するカルバペネム耐性関連遺伝子の検出

供試菌株のうち *bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株および陰性株は, それぞれ 58 株および 34 株であった。*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株のうち, 30 株において *bla*<sub>OXA-51</sub> の上流に IS*Aba*I が挿入されていたが, 28 株には IS*Aba*I の挿入を認めなかった。IS*Aba*I-*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性を示した 30 株のうち *bla*<sub>IMP</sub> 陽性を示したのは 9 株であった。今回検討した他のカルバペネマーゼをコードする遺伝子を保有する供試菌株は認められなかった。

### 3. シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) を用いた遺伝的関連性の検討

*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性 58 株のシカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) による解析結果は, PFGE の解析結果とともに図 1 と図 2 に示す。*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株は, 本法の結果からすべて *A. baumannii* と同定された。

34 株の *bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性となった *Acinetobacter* 属菌の本法の解析結果は, PFGE の結果とともに図 3 に示した。*bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性株は, 23 株が *Acinetobacter pittii*, 4 株が *Acinetobacter nosocomialis*, 7 株は菌種の同定まで至らず *Acinetobacter* 属菌という結果であった。

## 考 察

PCR 法を用いた耐性遺伝子検出は, アウトブレイクを起こしやすい *A. baumannii* のタイピングに有用と報告されている<sup>1)</sup>。我々はこれを利用して, リアルタイム PCR にて迅速にアウトブレイク株の鑑別を行った。この方法は 2~3 時間程度で実施でき, かつ簡便であるため, アウトブレイク時において迅速な対応を実施するには, 非常に有用なタイピング法と示唆された。

PFGE の類似性は 80% 以上がカットオフ値として用いられているが<sup>15)16)</sup>, 条件や要因で変動がみられるため, 今回の検討では類似性の境界レベルとして 90% 以上を示した株を

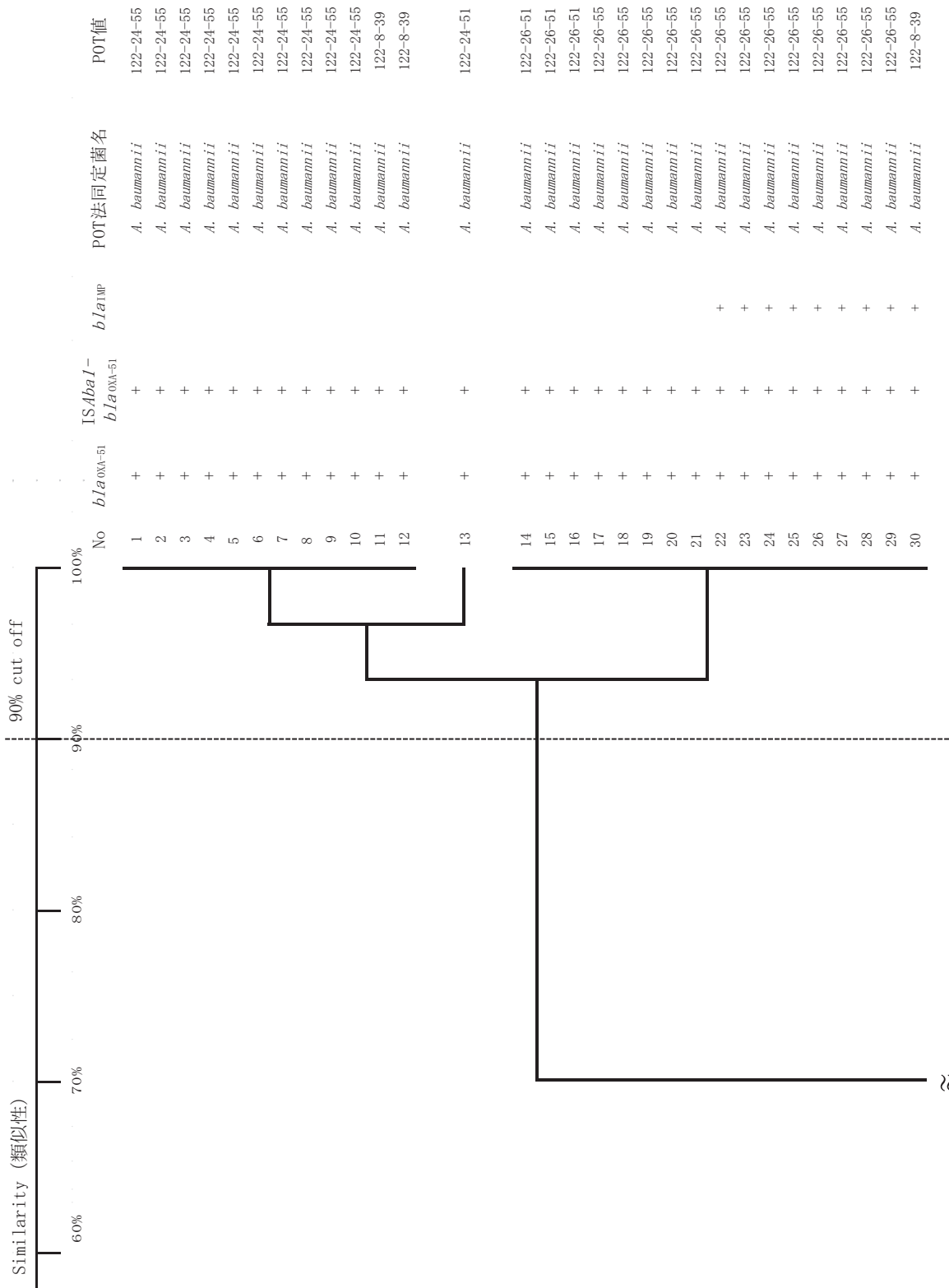


図1. ISAbal-bla<sub>OXA-51</sub> 陽性株の PFGE 系統樹とリアルタイム PCR によるカルバペネム耐性関連遺伝子、及びシカジニアス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター(風菌用) の結果 陽性: +)

同一株として、当院のアウトブレイク株と定義した。アウトブレイク株 30 株 (図 1. No. 1~30) はリアルタイム PCR 法ですべて ISAbal-bla<sub>OXA-51</sub> 陽性であった。このなかでさらに bla<sub>IMP</sub> 陽性であった 9 株 (図 1. No. 22~30) は同じクローンの多剤耐性型 *A. baumannii* (multi drug resistance *Acine-*

*tobacter baumannii*; MDRA) であった。これらは、当初アウトブレイク株とは別クローンであると考えていたが、多剤耐性化していない ISAbal-bla<sub>OXA-51</sub> 陽性株がプラスミド性に IMP 遺伝子を取り込み、多剤耐性化したと考えられた。

一方で、PFGE でも一致することはなかった 28 株 (図 2.

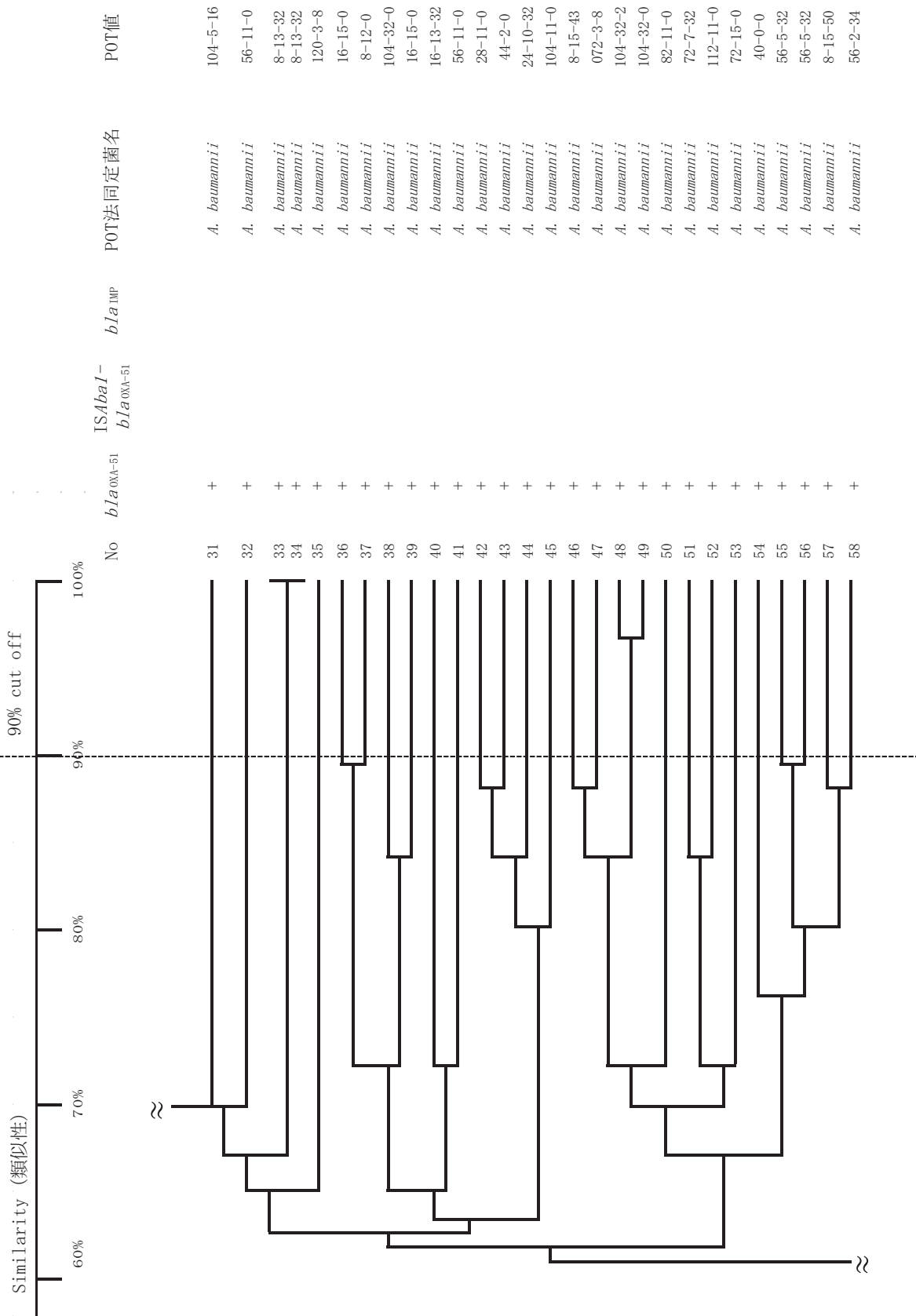


図2. ISAbal-*bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性株の PFGE 系統樹とリアルタイム PCR によるカルバペネム耐性関連遺伝子, 及びシカジーアス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) の結果  
陽性: +

No. 31~58) には, ISAbal の挿入が全く認められなかった。  
No. 33 と 34, No. 48 と 49 は PFGE では同一クローンと判定

されるが, それぞれ 3 株以上の検出は認められていない。また *bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性 34 株の系統樹 (図 3. No. 59~92) において

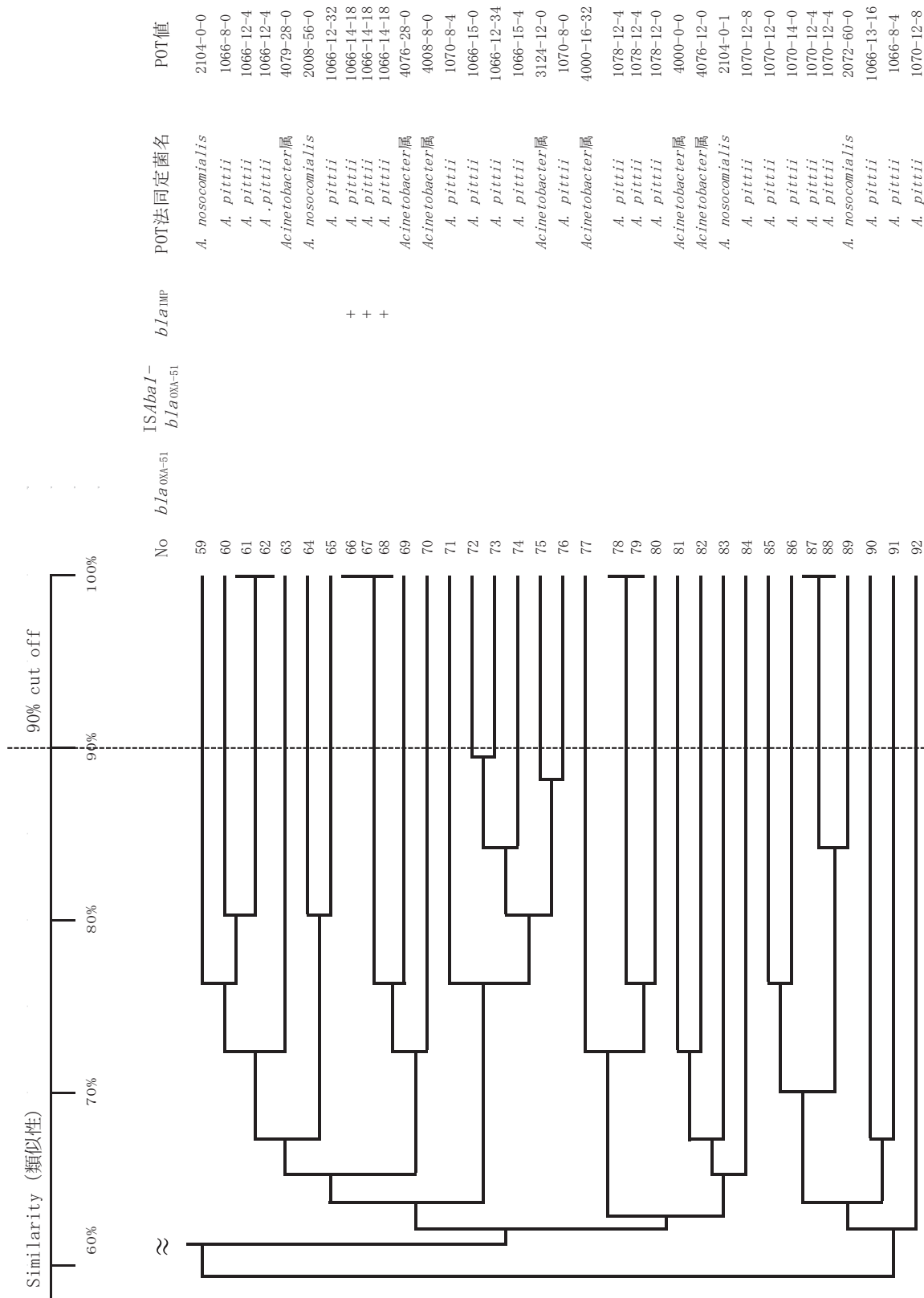


図3. *bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性株の PFGE 系統樹とリアルタイム PCR によるカルバペネム耐性関連遺伝子、及びシカジーニアス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクター属菌用) の結果

陽性：+

も、2~3株で一致が見られるのみであり、*bla*<sub>IMP</sub>以外の耐性遺伝子は認められなかった。これら *ISAbal-bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性株と *bla*<sub>OXA-51</sub> 陰性株は、アウトブレイク株と同様に当院で多数

検出されていたが、院内でアウトブレイクには至っていない。当院で伝播した株は、*ISAbal-bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株のみであった。世界流行株は他にも *ISAbal-bla*<sub>OXA-23</sub> や *bla*<sub>OXA-24</sub> などの耐性遺

伝子が報告されている<sup>17)18)</sup>。これらの株は今回の検討では検出されなかったが、今後検出される可能性があり、これらの耐性遺伝子の確認も継続して行う必要があると考えられた。

リアルタイム PCR 法では、カルバペネム耐性関連遺伝子が検出された株が、同一クローンであるか否かという鑑別はできない。同一クローンかどうかの確認には PFGE 法が必須であるものの、コストと時間がかかるという難点がある。今回検討したシカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクテラ属菌用) は、アウトブレイクを起こしやすい株の識別と同時に、同一クローンの鑑別が可能であることが示唆された。10 日前後の時間を要する PFGE と比較して、5~6 時間という短時間で実施でき、迅速性を必要とする感染対策において有用な方法であると考えられた。この方法は *Acinetobacter* 属菌の中から、①病原性をもつ *A. baumannii* の識別、②IC の推定、③同一クローンの鑑別という 3 つの項目を可能にするとして示されている<sup>19)</sup>。我々が行った検討でも、PFGE で同一クローンであった当院の IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株は、30 株 (図 1. No. 1~30) 全てにおいて POT 値 1 が 122 となった。この値は ICII の株を示し、アウトブレイクを起こしやすい株を識別する重要な指標と考えられた。

一方で、IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51</sub> 陽性株の POT 値 2 と 3 によるクローンの型別では、PFGE の系統樹と完全な一致は認められず、PFGE で同一クローンと判定された株が、5 タイプの POT 値を示すグループに分類されるという乖離が見られた。このグループのうち 122-24-55 が 33%、122-26-55 が 43% を占めた。今回の検討で認めた PFGE の系統樹と POT 値の不一致について、シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクテラ属菌用) はマルチプレックス PCR 法を用いているため、リアルタイム PCR 法に比べ手技は煩雑であり、バンドの読み取りには熟練を要し、判定に誤差を生じた可能性が高い。さらに IC の識別を目的として設計されているため、制限酵素によるゲノム DNA の切断パターンをみる PFGE とは結果が乖離することも示唆される<sup>19)</sup>。同一クローンの判定は POT 値 1~3 がすべて一致するものと、取扱説明書に記載されている。このように数値で決定付けられるため、伝播の可能性を客観的に比較できる方法ではあるが、PFGE のように菌株間で遺伝子レベルでどれだけ近親であるかを知ることは困難である。クローンの同一性の鑑別については POT 値 2 と 3 の数値が異なっても、患者背景より総合的に判断する必要が生じ、慎重な判断を要すると考えられた。

リアルタイム PCR 法とシカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクテラ属菌用) はいずれも、PCR の設備のない施設においては行うことができない検査である。その場合は薬剤感受性検査により、第 3 世代セファロスポリン耐性株や、アミノグリコシド系薬とニューキノロン系薬の 2 剤耐性株の検出に注意する必要がある<sup>3)20)</sup>が、遺伝子による鑑別に比べると判定は難しい。

リアルタイム PCR 法は最も簡便迅速である。また、シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (アシネトバクテラ属菌用) はアウトブレイクを起こしている株の耐性遺伝子や耐性機序は知ることができないが、疫学調査を行う上で迅速性を有していた。病院におけるアウトブレイクを未然に防ぐには、すみやかに患者を隔離することが肝要であるため、各々

の方法を必要に応じて適切に使い分けることが重要であると考えられた。

**利益相反:** 申告すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Peleg, A.Y., H. Seifert, D.L. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev 21: 538-582.
- 2) Runnegar, N., H. Sidjabat, S. Goh, et al. 2010. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Single Institution over a 10-Year Period. J Clin Microbiol 48: 4051-4056.
- 3) Higgins, P.G., C. Dammhayn, M. Hackel, et al. 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 65: 233-238.
- 4) 高田 徹. 2010. 韓国からの持ち込み例を端緒とした多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* によるアウトブレイク事例. IASR 31 (7): 197-198.
- 5) 石井教子, 大嶽浩司, 浅羽穰二, 他. 2012. 多剤耐性アシネトバクテラの水平感染を疑い、感染対策としての病棟閉鎖を行った経験. ICU と CCU 36 (9): 683-686.
- 6) 石井賢二郎, 竹内裕也, 尾原秀明, 他. 2014. 外科病棟における多剤耐性アシネトバクテラの発生とその対策. 日本外科感染症学会雑誌 11 (2): 109-113.
- 7) Potron, A., L. Poirel, P. Nordmann. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrob Agents 45: 568-585.
- 8) 山田友紀, 横山茂樹, 諏訪部章. 2006. 岩手医科大学附属病院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の検出要因に関する検討. 臨床病理 54: 785-791.
- 9) Jeong, S., J.O. Kim, S.H. Jeong, et al. 2015. Evaluation of peptide nucleic acid-mediated multiplex real-time PCR kits for rapid detection of carbapenemase genes in gram-negative clinical isolates. J Microbiol Methods 113: 4-9.
- 10) Mu, X., R. Nakano, A. Nakano, et al. 2016. Loop-mediated isothermal amplification: Rapid and sensitive detection of the antibiotic resistance gene IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51-like</sub> in *Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Methods 121: 36-40.
- 11) Mendes, R.E., J.M. Bell, J.D. Turnidge, et al. 2009. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 63: 55-59.
- 12) Turton, J.F., M.E. Ward, N. Woodford, et al. 2006. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 258: 72-77.
- 13) Woodford, N., M.J. Ellington, J.M. Coelho, et al. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 27: 351-353.
- 14) Segal, H. S. Garny, B.G. Elisha. 2005. Is IS*ABA-I* customized

- for *Acinetobacter*? FEMS Microbiol Lett 243: 425-429.
- 15) Villalon, P., S. Valdezate, M.J. Medina-Pascual, et al. 2011. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol 49: 875-882.
  - 16) 持丸朋美, 内田勇二郎, 諸熊由子, 他. 2010. 1 大学病院で 4 年間に分離された IMP-19 および IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の薬剤感受性と分子疫学的解析. 日臨微誌 20: 28-37.
  - 17) Zarrilli, R., M. Giannouli, F. Tomasone, et al. 2009. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect 3 (5): 335-341.
  - 18) Fu, Y., J. Zhou, H. Zhou, et al. 2010. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. J Antimicrob Chemother 65: 644-650.
  - 19) Fujikura, Y., A. Yuki, T. Hamamoto, et al. 2016. Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for *Acinetobacter baumannii* in an epidemiologic study of a hospital outbreak. Am J Infect Control 44: 275-278.
  - 20) Heinemann, B., H. Wisplinghoff, M. Edmond, et al. 2000. Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother 44: 2211-2213.

### Comparative study using pulse field gel electrophoresis, Real time PCR, and PCR-based open reading framotyping kit for *Acinetobacter* species as typing methods of *Acinetobacter* sp.

Mayuko Kaiho<sup>1) 2)</sup>, Takeshi Nakazawa<sup>2)</sup>, Ayako Higuchi<sup>1)</sup>, Yasuyo Ode<sup>1)</sup>, Katsunari Kina<sup>1)</sup>, Kazunori Miyake<sup>1)</sup>, Kensuke Murata<sup>2) 4)</sup>, Yoshiaki Inoue<sup>5)</sup>, Shinichi Sasaki<sup>2) 3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>2)</sup>Division of Infection Control, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>3)</sup>Department of Pulmonology, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>4)</sup>Department of Emergency Room, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>5)</sup>Department of Emergency Room and Intensive Care Unit, Tsukuba University Hospital

Instance of *Acinetobacter* infection have increased in our institution since 2014. We thus attempted an epidemiological analysis using pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Inspection by PFGE is cumbersome and costly and reporting results is time consuming. We investigated resistance genes of pandemic strains using real-time PCR for rapid differentiation of strains among *Acinetobacter* species, which could easily cause outbreaks. We also examined a PCR-based open reading frame typing (POT) kit for *Acinetobacter* species because it was newly marketed since 2014. We then compared the usefulness of these two methods based on the results of PFGE. We analyzed 92 strains that were determined as *Acinetobacter* species from June 2014 to October 2016. PFGE results revealed 30 strains to be the same clones (similarity  $\geq 90\%$ ) as they all showed the presence of IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51</sub> by real-time PCR. Detecting a resistance gene by real-time PCR can distinguish a potential outbreak-causing strain; thus, it is a useful typing method for screening *Acinetobacter* species when their frequency of detection is increased. In the POT kit for *Acinetobacter* species, all 30 strains harboring IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-51</sub> were 122 by POT 1. According to the type of clones by POT 2 and POT 3, the strains were divided into 5 groups, which accounted for 122-24-55 (33%) and 122-26-55 (43%). Compared to PFGE, this method could identify the potential outbreak strains and simultaneously differentiate the same clones in a short time. However, it is impossible to detect resistance genes using POT kit for *Acinetobacter* species.