

[原 著]

カルバペネマーゼ鑑別ディスク MASTDISCS combi Carba plus の
有用性に関する検討

西田全子¹⁾・楠木まり¹⁾²⁾・大沼健一郎¹⁾³⁾・石田奈美¹⁾・小林沙織¹⁾
安藤 愛¹⁾・中村竜也⁴⁾・大路 剛¹⁾²⁾⁵⁾・中町祐司¹⁾・三枝 淳¹⁾³⁾

¹⁾ 神戸大学医学部附属病院検査部

²⁾ 神戸大学医学部附属病院感染制御部

³⁾ 神戸大学大学院医学研究科臨床検査医学

⁴⁾ 京都橘大学健康科学部臨床検査学科

⁵⁾ 神戸大学大学院医学研究科微生物感染症学講座感染治療学分野

(令和元年12月14日受付, 令和2年3月25日受理)

MASTDISCS combi Carba plus (MD) は, metallo-beta-lactamase (MBL) 型, KPC 型および OXA-48 型のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriales*; CPE) の鑑別が可能な試薬である。今回, 腸内細菌目細菌 98 株 (CPE: 46 株, non-CPE: 52 株) を用いて, PCR 法で決定した遺伝子型と MD の一致率を評価した。結果, MBL 型 39 株中 26 株, OXA-48 型 2 株中 2 株, KPC 型 2 株中 1 株, non-CPE 52 株中 51 株で一致し, 一致率は 84.2% (80/95) であった。また, *bla*_{IMP6} 保有株は 15 株中 11 株が, MBL 型に判定可能であった。一方, MBL 遺伝子保有の *Serratia marcescens* 4 株が OXA-48 型, *bla*_{MOX} 保有の *Klebsiella pneumoniae* 1 株が KPC 型に誤判定され, *bla*_{GES4} 保有の 3 株は判定不能であった。MD はカルバペネマーゼの遺伝子型の鑑別が簡便に実施できるが, 一部の株で誤判定を示すため注意が必要である。

Key words: カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌, カルバペネム耐性腸内細菌目細菌, カルバペネマーゼ鑑別ディスク, MASTDISCS combi Carba plus, faropenem

序 文

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriales*; CPE) が世界的に増加し, 日本においてもアウトブレイク事例や輸入感染事例が報告されており問題となっている¹⁾²⁾。カルバペネマーゼは, Ambler 分類においてクラス A, B および D で確認されており, 国内ではクラス B に属する IMP 型の metallo-beta-lactamase (MBL) の検出頻度が高い。国内で多く検出される IMP-6 産生菌をはじめとして, カルバペネマーゼ産生菌の中には, カルバペネム系抗菌薬の MIC が低い株が存在することが報告されており³⁾⁴⁾, カルバペネム系以外の薬剤を指標にするなど, 見逃さないように注意する必要がある。さらに, CPE はカルバペネマーゼ遺伝子をプラスミド上に保有するため, 菌種を超えて伝播する危険性がある¹⁾。また, 治療においては近年, KPC 型のカルバペネマーゼ産生菌に抗菌活性のある meropenem-vaborbactam などの抗菌薬が新たに開発され, カルバペネマーゼの遺伝子型が抗菌薬の選択につながるよう

になった⁵⁾。このような背景から, 水平伝播の監視や抗菌薬の選択においてカルバペネマーゼの遺伝子型を鑑別することは重要である。

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) では, カルバペネマーゼ産生の有無を簡便かつ精度よく検出する方法として, Carba NP Test や modified carbapenem inactivation method (mCIM) が推奨されている⁶⁾。これらの方法は, 日常検査で普及しつつあるが, 遺伝子型まで鑑別することはできない。また, PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出は迅速性と精度の面で優れているが, PCR の設備が必要である上, 使用するプライマーによっては検出できない遺伝子型も存在することが課題である。

近年, 主要なカルバペネマーゼの遺伝子型を簡便に鑑別できる MASTDISCS combi Carba plus (MD, Mast Group, UK) が開発された。本試薬は, 各種 β -ラクタマーゼ阻害剤を含有した faropenem (FRPM) ディスクがセットになっており, 各ディスクの阻止円径を測定することによって, MBL 型および海外流行型である KPC 型, OXA-48 型の鑑別が可能である。我々はこれまでに, FRPM が国内で分離された IMP-6 産生菌をはじめとした CPE のスクリーニング薬剤として有用であることを報告している⁷⁾。

そこで今回, MD で FRPM が使用されている点に着目し, CPE の検出とカルバペネマーゼ遺伝子型鑑別の精度について検討を行い, MD の有用性を評価した。

著者連絡先: (〒650-0017) 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2
神戸大学医学部附属病院検査部
西田全子
TEL: 078-382-6327
FAX: 078-382-6348
E-mail: n11msk25@med.kobe-u.ac.jp

材料と方法

1. 使用菌株

当院にて保存され耐性機序が確定した臨床分離株および標準菌株を含む、腸内細菌目細菌 98 株 (CPE46 株, non-CPE 52 株) を使用した。各種耐性菌の β -ラクタマーゼ遺伝子型は、PCR 法により決定した^{8)~14)}。

CPE46 株の内訳は、Ambler 分類でクラス A に属する株 5 株 (bla_{KPC} 保有 2 株, bla_{GES-4} 保有 3 株), クラス B に属する株 39 株 (bla_{IMP-1} 保有 19 株, bla_{IMP-6} 保有 15 株, bla_{NDM-1} 保有 1 株, bla_{VIM-1} 保有 2 株, bla_{VIM-2} 保有 1 株, bla_{SMB-1} 保有 1 株), クラス D に属する株 2 株 (bla_{OXA-48} 保有 2 株) である。 bla_{VIM-1} 保有 2 株については標準菌株 *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13439 および *K. pneumoniae* NCTC13440 を使用し, bla_{KPC} 保有 1 株については標準菌株 *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 を使用した。

non-CPE52 株には, Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生株 25 株 (うち 1 株は bla_{CTX-M} 保有 *Escherichia coli* NCTC13463), AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株 18 株, ESBL および AmpC 型 β -ラクタマーゼ同時産生株 1 株, その他 8 株を使用した。

2. 薬剤感受性検査

meropenem (MEPM) の MIC は Etest (バイオメリュー・ジャパン) を使用し, 測定および判定方法は添付文書に従った。

3. mCIM によるカルバペネマーゼ産生の確認試験

腸内細菌目細菌 96 株のカルバペネマーゼ産生を mCIM によって確認した。本法は CLSI M100-S27 に準拠した方法で行い, 阻止円径が 6~15 mm の場合を陽性 (Positive), 16~18 mm の場合を判定保留 (Intermediate), 19 mm 以上を陰性 (Negative) と判定した⁹⁾。

4. MD の検査方法と判定方法

5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) で一昼夜培養したコロニーを使用し, McFarland No.0.5 濁度の菌液を調整し, 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) に塗布した。

塗布した平板上にディスク A (FRPM10 μ g), ディスク B (FRPM10 μ g+MBL 阻害剤), ディスク C (FRPM10 μ g+KPC 阻害剤), ディスク D (FRPM10 μ g+AmpC 阻害剤), およびディスク E (temocillin30 μ g+MBL 阻害剤) を設置した。

35°C で 18~24 時間培養後, 各ディスクの阻止円径を測定し, ディスク B とディスク A の阻止円径差 (以下, B-A), ディスク C とディスク A の阻止円径差 (以下, C-A), およびディスク D とディスク A の阻止円径差 (以下, D-A) を算出し, 添付文書の判定基準 1)~4) に従い判定した。阻止円が認められない場合, 阻止円径は 6 mm とした。

1) MBL 型: B-A \geq 5 mm さらに |C-A| < 5 mm および |D-A| < 5 mm

2) KPC 型: C-A \geq 5 mm さらに |B-A| < 5 mm および |D-A| < 5 mm

3) AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生+外膜透過性変異: |B-A| < 4 mm さらに C-A \geq 5 mm および D-A \geq 5 mm

4) OXA-48 型: A・B・C・D に阻止円径差がみられずか

つ $E \leq 10$ mm, ただし添付文書において A・B・C・D の阻止円径差に明確な数値は存在しないため, 本検討では European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) における temocillin ディスクを用いた OXA-48 型のスクリーニング基準に基づきディスク E の阻止円径が $E \leq 10$ mm を満たした場合は全て OXA-48 型と判定した¹⁵⁾。

1)~4) のいずれにも該当しない場合は, カルバペネマーゼ非産生または 1)~4) 以外の耐性機序の可能性が否定できないため, 判定不能 (N/A, Not Applicable) とした。

結 果

1. MEPM の MIC およびカルバペネマーゼ産生の結果

使用菌株の MEPM の MIC, および mCIM の結果を Table 1 に示す。MEPM の MIC は CPE で 1~>32 μ g/mL, non-CPE で ≤ 0.125 ~>32 μ g/mL に分布した。non-CPE の内, AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株 2 株は MEPM の MIC が ≥ 2 μ g/mL を示し CRE に該当した¹⁶⁾。CPE46 株はすべて mCIM が陽性であり, カルバペネマーゼ産生が確認された。一方, non-CPE52 株はすべて mCIM が陰性であった。

2. CPE と non-CPE における各種ディスク阻止円径の分布

CPE46 株と non-CPE52 株におけるディスク A の値の分布を Fig. 1 に示す。CPE46 株におけるディスク A の阻止円径は 6~14 mm (平均 7.2 mm), non-CPE52 株では 6~26 mm (平均 18.2 mm) であった。CPE 46 株中 34 株で阻止円径が 6 mm を示し, 内訳は bla_{IMP-1} 保有 19 株, bla_{IMP-6} 保有 5 株, bla_{NDM-1} 保有 1 株, bla_{VIM} 保有 3 株, bla_{SMB-1} 保有 1 株, bla_{KPC} 保有 2 株, bla_{GES-4} 保有 3 株であった。non-CPE52 株中 2 株においても阻止円径が 6 mm を示し, いずれも AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株であった。ディスク A の阻止円径 6 mm をカットオフ値とすると, CPE の検出感度は 73% (34/46), 特異度は 96% (50/52) であった。また, 14 mm をカットオフ値とすると CPE の検出感度は 100% (46/46), 特異度は 75% (39/52) であった。

次に, CPE (クラス A, B, D) と non-CPE における B-A の値の分布を Fig. 2a, C-A の値の分布を Fig. 2b, ディスク E の値の分布を Fig. 2c に示す。クラス B に属する 39 株のうち MD で MBL 型と判定された 26 株の B-A の値は 5~15 mm に分布し, クラス B 以外の CPE はすべて B-A の値は 5 mm 未満を示した。また, クラス A に属する bla_{KPC} 保有 2 株のうち 1 株が C-A の値は 5 mm 以下を示し, bla_{KPC} 保有株以外の CPE で C-A の値は 5 mm 以上を示した株は認められなかった。クラス D に属する bla_{OXA-48} 保有の 2 株はいずれもディスク E の阻止円径が 6 mm を示した。

3. MD によるカルバペネマーゼ遺伝子型の鑑別精度

腸内細菌目細菌全 98 株における, PCR 法で決定した各種耐性菌の β -ラクタマーゼ遺伝子型と MD の判定結果を Table 2 に示す。 bla_{GES-4} 保有株を除く腸内細菌目細菌 95 株のうち, MBL 型 39 株中 26 株 (内訳: bla_{IMP-1} 保有 11/19 株, bla_{IMP-6} 保有 11/15 株, bla_{NDM-1} 保有 1/1 株, bla_{VIM} 保有 3/3 株, bla_{SMB-1} 保有 0/1 株), OXA-48 型 2 株中 2 株, KPC 型 2 株中 1 株, non-CPE52 株中 51 株で PCR 法と MD の結果が一致し, 一致率は CPE で 67.4% (29/43), non-CPE で 98.1% (51/52),

Table 1. Summary of 98 isolates of *Enterobacterales* used in this study

β-lactamase types (no. of isolates)	Species	no. of isolates	Range of MEPM MIC (μg/mL)	mCIM *	
				Result (no. of isolates)	Range of zone diameter (mm)
carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i> (CPE)					
Ambler classA					
KPC (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 ⁺	>32	Positive (2)	6
GES-4 (3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1 to >32	Positive (3)	6 to 15
Ambler classB					
IMP-1 (19)	<i>Serratia marcescens</i>	6	2 to >32	Positive (6)	6
	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	4 to >32	Positive (4)	6
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2 to 8	Positive (3)	6
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2 to >32	Positive (2)	6
	<i>Providencia rettgeri</i>	2	>32	Positive (2)	6
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	>32	Positive (1)	6
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	1	Positive (1)	6
IMP-6 (1)	<i>Serratia marcescens</i>	1	>32	Positive (1)	6
IMP-6 + ESBL (14)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	4 to >32	Positive (10)	6
	<i>Escherichia coli</i>	4	4 to >32	Positive (4)	6
NDM-1 (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	>32	Positive (1)	6
VIM-1 (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 ⁺⁺	2	Positive (2)	6
VIM-2 (1)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	Positive (1)	6
SMB-1 (1)	<i>Serratia marcescens</i>	1	>32	Positive (1)	10
Ambler classD					
OXA-48 (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	Positive (1)	6
	<i>Escherichia coli</i>	1	2	Positive (1)	6
non carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i> (non-CPE)					
carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i> (CRE)					
AmpC (2)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	2	Negative (1)	21
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	>32	Negative (1)	20
non carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i> (non-CRE)					
AmpC (16)	<i>Escherichia coli</i>	13	≤0.125 to 0.25	Negative (13)	22 to 27
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	≤0.125	Negative (3)	19 to 23
ESBL (25)					
CTX-M-type (22)	<i>Escherichia coli</i>	12 ⁺⁺⁺	≤0.125	Negative (12)	22 to 26
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	≤0.125	Negative (7)	22 to 24
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.25	Negative (1)	24
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	≤0.125	Negative (1)	21
	<i>Providencia stuartii</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22
	<i>Escherichia coli</i>	1	≤0.125	Negative (1)	24
TEM-type (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22
SHV-type (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22
ESBL + AmpC (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	23
Others (8)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	≤0.125	Negative (2)	20 to 23
	<i>Escherichia coli</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22
	<i>Serratia marcescens</i>	1	≤0.125	Negative (1)	23
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	23
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤0.125	Negative (1)	21
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	≤0.125	Negative (1)	23
	<i>Providencia stuartii</i>	1	≤0.125	Negative (1)	22

* modified carbapenem inactivation method (mCIM) zone diameters were interpreted as follows: 6 to 15 mm, positive; 16 to 18 mm, intermediate; ≥ 19 mm, negative.

⁺A reference strain *K. pneumoniae* BAA-1705 was used.

⁺⁺2 isolates were reference strains of *bla*_{VIM-2}-harboring *K. pneumoniae* NCTC13439 and NCTC13440.

⁺⁺⁺1 out of 12 isolates was reference strain of *bla*_{CTX-M}-harboring *E. coli* NCTC13463.

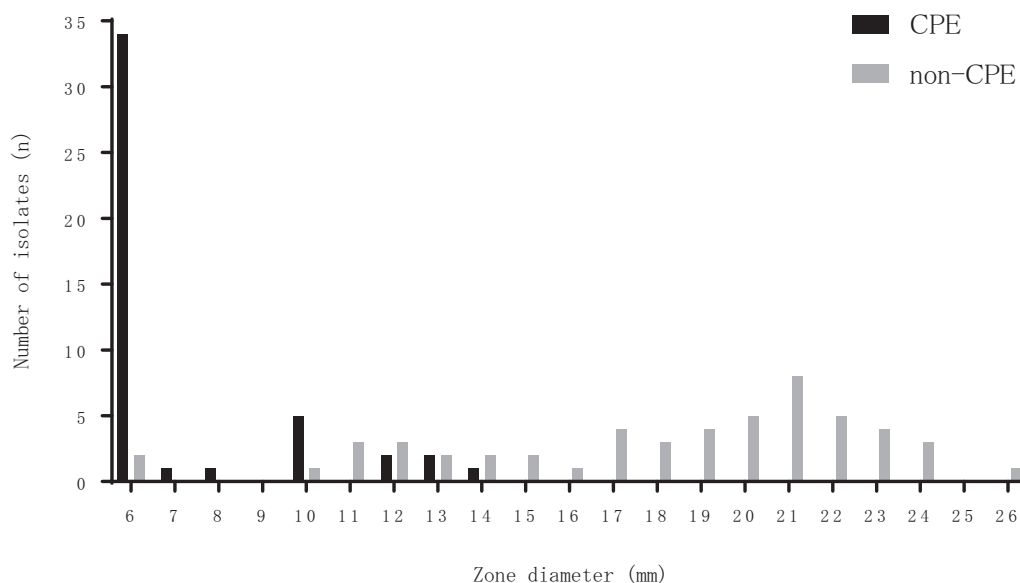


Figure 1. Distribution of disk A zone diameters in carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) and non carbapenemase-producing *Enterobacterales* (non-CPE).

全体で84.2% (80/95)であった。*bla*_{GES-4}保有の3株はMDで判定不能となった。

4. 不一致例の解析

1) CPEでの不一致例

MBL遺伝子を保有しているが、MDでOXA-48型と判定された *S. marcescens* 4株、判定不能となった *S. marcescens* 1株、*Enterobacter cloacae* 1株、*Providencia rettgeri* 1株の結果を Table 3a に示す。これら7株はB-A<5 mmを示し、MBL型に判定されなかった。

次に、IMP型のMBL遺伝子を保有し、MDでB-A≥5 mmを示したが判定不能となった6株の結果を Table 3b に示す。これらの株は|C-A|と|D-A|のいずれか一方が5 mm以上であったために、判定基準に該当せず判定不能となった。

*bla*_{KPC}保有の *K. pneumoniae* が、MDでC-A<5 mmを示したため判定不能となった (Table 3c)。

2) non-CPEでの不一致例

*bla*_{MOX}保有の *K. pneumoniae* が、MDでC-A≥5 mmさらに|B-A|<5 mmおよび|D-A|<5 mmを示したためKPC型と判定された (Table 3d)。

考 察

カルバペネマーゼ鑑別ディスクであるMDは、特別な試薬や機器を必要とせず、簡便な方法でカルバペネマーゼの遺伝子型の鑑別を行うための試薬である。従来品ではOXA-48型は鑑別できないことに加え、基質となる抗菌薬としてMEPMを使用していたため、MEPMのMICが低い株では鑑別精度が低いことがSaitoら¹⁷⁾やSakanashiら¹⁸⁾によって示されている。今回検討したMDでは、改良点として基質にFRPMを使用し、さらにtemocillin含有ディスクの追加によってOXA-48型の鑑別が可能となった。

本検討では、ヨーロッパで多く検出される *bla*_{NDM-1} および *bla*_{VIM} 保有株では株数は少ないものの全て一致した。一方で、

国内で分離頻度が多く問題となる *bla*_{IMP-6} 保有株は15株中11株 (73.3%) がMDでMBL型に判定され、4株は判定不能となった。また、MEPMのMICが低値を示した *bla*_{OXA-48} 保有の2株については、ディスクEに耐性を示しMDでOXA-48型に判定可能であった。しかし、MDでOXA-48型に誤判定された株が4株存在し、菌種はすべて *S. marcescens* であった。temocillinは *Serratia* spp.で耐性を示すことが報告されていることから¹⁹⁾、本検討でも菌種によりディスクEの判定が困難であることが確認された。OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌は国内での分離頻度は低いがスクリーニング法が確立しておらず検出が困難であり、国内において海外渡航歴のない患者から検出され問題となっている²⁰⁾。そのため、MDを使用したOXA-48型の鑑別は対象となる菌種に注意する必要があるが、日常検査で簡便に実施できると考えられOXA-48型の早期検出が期待できる。

MDを使用して同様の検討を行ったOhsakiらの報告では²¹⁾、CPEの検出感度は100% (23/23)、特異度は91.1% (41/45) であるとし、カルバペネム系抗菌薬のMICが低いIMP-6あるいはOXA-48型のカルバペネマーゼ産生菌でも良好な鑑別結果が得られている。しかし、本検討ではCPEにおけるPCR法の結果とMDの判定結果の一致率が67.4%と低い値を示した。要因の一つとして、誤判定を示したCPEの多くが *S. marcescens*、*Enterobacter cloacae* および *Providencia rettgeri* といった染色体性 AmpC 型 β-ラクタマーゼ産生が認められる菌種であったことから、検討に使用した菌種の違いによるものと考えられた。DayらはFRPMディスクを用いたCPEのスクリーニング検査において、AmpC型β-ラクタマーゼ産生株ではFRPMディスクの阻止円径が縮小する傾向にあり、その結果偽陽性となることを報告している²²⁾。今回の我々の検討でも、Fig. 2a および Table 3a に示したようにクラスBに属する株のうちB-Aが5 mm未満を示した3菌種7株は全て染色体性 AmpC 型 β-ラクタマーゼ産

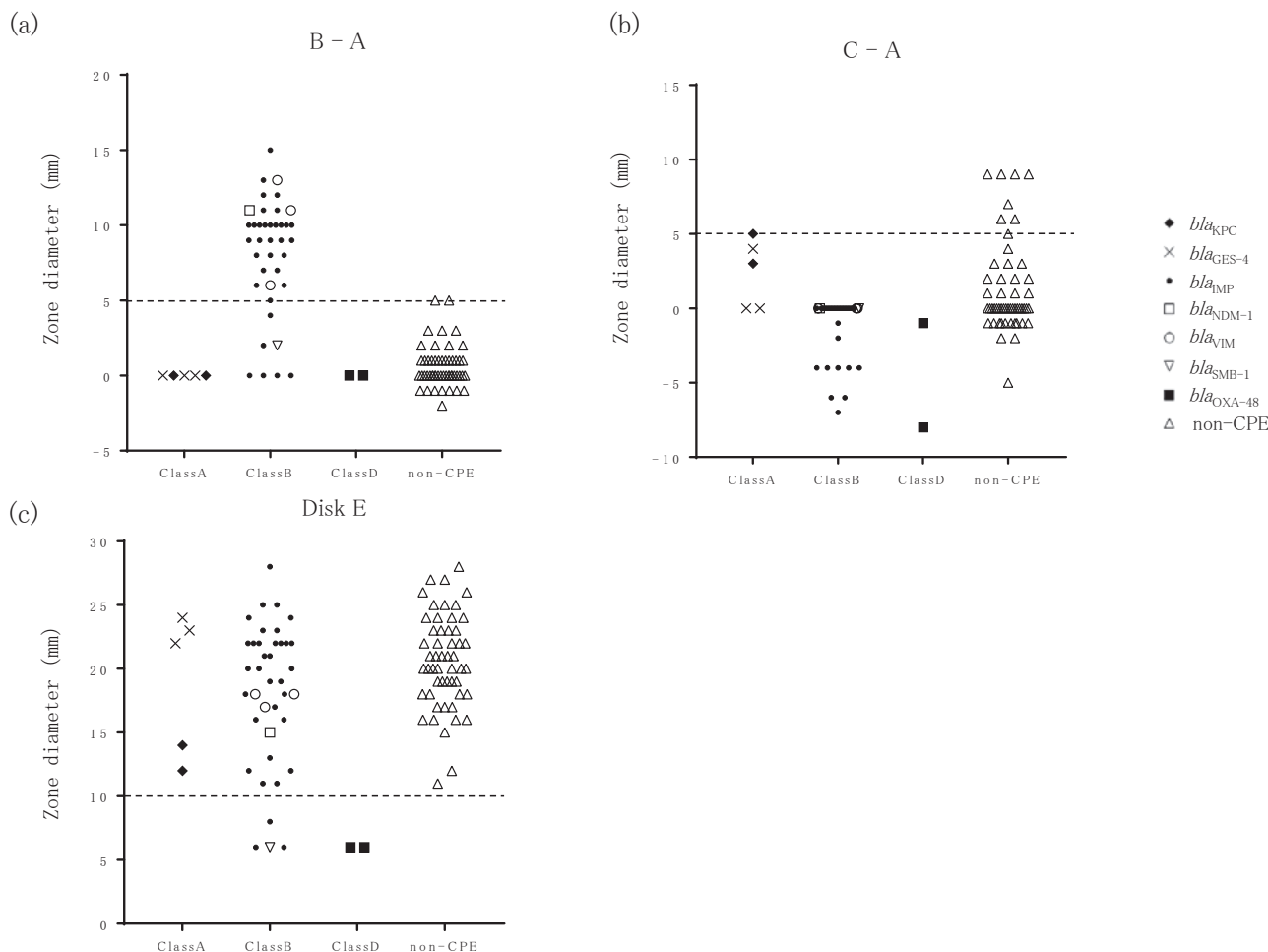


Figure 2. Zone diameters in carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE*) and non carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (non-CPE).

* Ambler class A, *bla*_{KPC} and *bla*_{GES-4}; class B, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM} and *bla*_{SMB-1}; class D, *bla*_{OXA-48}

(a) Differences in zone diameter between disk A and disk B.

(b) Differences in zone diameter between disk A and disk C.

(c) Zone diameters of disk E.

Table 2. Comparison of MASTDISCS combi Carba plus (MD) and Carbapenemase genotype

	CPE										non-CPE	Total
	Carbapenemase genotype											
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{GES-4}	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{IMP-6}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>bla</i> _{SMB-1}	<i>bla</i> _{OXA-48}			
MD	KPC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	MBL	0	0	11	11	1	2	1	0	0	0	26
	OXA-48	0	0	3	0	0	0	0	1	2	0	6
	N/A	1	3	5	4	0	0	0	0	0	51	64
	Total	2	3	19	15	1	2	1	1	2	52	98

* N/A: Not Applicable

生株であり、染色体性 AmpC 型 βラクタマーゼ非産生株では、全て B-A は 5 mm 以上を示した。したがって、FRPM が AmpC 型 βラクタマーゼなどのカルバペネマーゼ以外の耐性機序により影響を受けた場合、ディスク B に含有する MBL 阻害剤による阻止円の拡大が十分に得られない可能性

があり、誤判定となることが示唆された。また、プラスミド性 AmpC 型 βラクタマーゼ産生遺伝子である *bla*_{MOX} を保有した non-CPE1 株が KPC 型と誤判定された。この株が AmpC 阻害剤を含有したディスク D ではなく、KPC 阻害剤を含有したディスク C のみで阻止円径が拡大した原因につ

Table 3. Discordant cases using MASTDISCS combi Carba plus (MD)

(a)

Species	Genotype	mCIM	Result of MD					Carbapenemase types
			Zone diameter (mm)					
			A	B-A	C-A	D-A	E	
<i>S. marcescens</i>	<i>bla_{SMB-1}</i>	Positive	6	2	0	0	6	OXA-48
<i>S. marcescens</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	4	0	0	6	OXA-48
<i>S. marcescens</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	0	0	0	8	OXA-48
<i>S. marcescens</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	0	0	0	6	OXA-48
<i>S. marcescens</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	2	0	0	11	N/A*
<i>E. cloacae</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	0	0	0	12	N/A*
<i>P. rettgeri</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>	Positive	6	0	0	10	19	N/A*

(b)

Species	Genotype		mCIM	Result of MD					Carbapenemase types
	Carbapenemase	Other β -lactamase		Zone diameter (mm)					
				A	B-A	C-A	D-A	E	
<i>E. cloacae</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>		Positive	6	9	0	11	22	N/A*
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{IMP-1}</i>		Positive	6	12	0	7	18	N/A*
<i>E. coli</i>	<i>bla_{IMP-6}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	Positive	6	10	0	6	22	N/A*
<i>E. coli</i>	<i>bla_{IMP-6}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	Positive	13	6	-7	1	25	N/A*
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{IMP-6}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	Positive	12	7	-6	-1	22	N/A*
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{IMP-6}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	Positive	12	6	-6	1	23	N/A*

(c)

Species	Genotype	mCIM	Result of MD					Carbapenemase types
			Zone diameter (mm)					
			A	B-A	C-A	D-A	E	
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{KPC}</i>	Positive	6	0	3	0	12	N/A*

(d)

Species	Genotype	mCIM	Result of MD					Carbapenemase types
			Zone diameter (mm)					
			A	B-A	C-A	D-A	E	
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla_{MOX}</i>	Negative	13	-1	9	4	24	KPC

* N/A: Not Applicable

いては不明である。以上のことから、MDによるカルバペネマーゼの遺伝子型の鑑別において、AmpC型 β -ラクタマーゼの存在は誤判定の原因になることが推測された。

MDは酵素阻害試験を基本原理¹⁵⁾としているため、阻害剤やスクリーニングに利用できる薬剤が存在しないGES型のようなカルバペネマーゼの鑑別はできない。しかし、ディスクAの値の分布 (Fig. 1) の結果からディスクAの阻止円径の有無に着目することで、このような株を検出することが可能であると考えられた。Dayらは、FRPMディスク (10 μ g) の阻止円径6 mmをカットオフ値とすると、CPEの検出感度は98%、特異度は87%を示すことを報告している²²⁾。本検討で使用したディスクA (FRPM10 μ g) の阻止円径6 mmをカットオフ値とすると、CPEの検出感度は73% (34/46)、特異度は96% (50/52) であり検出感度は高いとはいえないが、ディスクAが6 mmを示した株の中には、GES

型のカルバペネマーゼ産生菌に加え、不一致例の株 (Table 3) のうち判定不能 (N/A) となったCPE10株中7株が含まれている。また、今回使用したCPEではディスクAの阻止円径は6~14 mmに分布しており、MDで判定不能となった場合でも、ディスクAが14 mm以下の株についてはCPEの可能性を考慮し、遺伝子検査あるいはmCIMなどの他のカルバペネマーゼ検出法と組み合わせて確認を行う必要があると考えた。

本検討では、IMP型以外のCPEについては検討株数が少なく、遺伝子型の鑑別精度を十分に評価しているとはいえないため、今後さらに株数を増やした検討が必要であると考えられた。また、MDに使用されている阻害剤の種類と濃度は明らかにされていないため、不一致例を示した株についてその原因を詳細に解析することはできなかった。

以上より、MDは特別な試薬と手順を必要としないため、

日常検査に導入し易く、多くの検査室でカルバペネマーゼの遺伝子型の鑑別に有用な試薬であると考えた。一方で、一部の菌種や AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株で誤判定を示す可能性があるため注意が必要であり、判定不能となった場合にはディスク A の阻止円径を考慮し、他のカルバペネマーゼ検出法と組み合わせて判断する必要があると考えられた。

利益相反： 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Fukigai, S., J. Alba, S. Kimura, et al. 2007. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 29: 306-310.
- 2) Nagano, N., Y. Endoh, 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.
- 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) Patrice, N., T. Naas, L. Poirel. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1791-1798.
- 5) Patel, T. S., J. M. Pogue, J. P. Mills, et al. 2018. Meropenem-vaborbactam: a new weapon in the war against infections due to resistant gram-negative bacteria. *Future Microbiol* 13: 971-983.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. In: CLSI document M100-S27. (Clinical and Laboratory Standards Institute ed.), Wayne, PA.
- 7) 中村竜也, 小林沙織, 大沼健一郎, 他. 2017. 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. *感染症誌* 91: 7-13.
- 8) Arlet, G., A. Philippon. 1991. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Lett.* 82: 19-25.
- 9) Pitout, J. D., K. B. Laupland. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8: 159-166.
- 10) Queenan, A. M., K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 440-458.
- 11) Pfeifer, Y., G. Wilharm, E. Zander, et al. 2011. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1998-2001.
- 12) Wachino, J., H. Yoshida, K. Yamane, et al. 2011. SMB-1, a novel subclass B3 metallo- β -lactamase, associated with *ISCR1* and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 5143-5149.
- 13) Kayama, S., N. Shigemoto, R. Kuwahara, et al. 2012. Rapid detection of *bla*_{IMP6} by amplification refractory mutation system. *J. Microbiol. Methods.* 88: 182-184.
- 14) Yamasaki, K., M. Komatsu, O. Tamotsu, et al. 2017. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing *bla*_{GES-4} carbapenemase at a Japanese hospital. *J. Infect. Chemother.* 23: 40-44.
- 15) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0.
- 16) 厚生労働省ホームページ.
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansensho/u11/01-05-140912-1.html> 2019年6月24日現在
- 17) Saito, R., S. Koyano, M. Dorin, et al. 2015. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol. Methods.* 108: 45-48.
- 18) Sakanashi, D., M. Kawachi, Y. Uozumi, et al. 2017. Evaluation of commercial phenotypic assays for the detection of IMP- or New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Japan. *J. infect. Chemother.* 23: 474-480.
- 19) Livermore, D. M., P. M. Tulkens. 2009. Temocillin revived. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 243-245.
- 20) 板垣沙紀, 田澤庸子, 菊池勇治, 他. 2017. 海外渡航歴のない患者から分離された OXA-48 型カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae*. *日本臨床微生物学雑誌* 27: 41-47.
- 21) Ohsaki, Y., R. Kudo, J. Hobson, et al. 2018. MASTDISCS *combi Carba plus*, a simple method for discriminating carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, including OXA-48-type producers. *Microbiol. Immunol.* 62: 60-65.
- 22) 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.

Evaluation of the MASTDISCS combi Carba plus for the detection and classification of Carbapenemases in *Enterobacterales*.

Masako Nishida¹⁾, Mari Kusuki^{1) 2)}, Kenichiro Ohnuma^{1) 3)}, Nami Ishida¹⁾, Saori Kobayashi¹⁾, Ai Ando¹⁾,
Tatsuya Nakamura⁴⁾, Goh Ohji^{1) 2) 5)}, Yuji Nakamachi¹⁾, Jun Saegusa^{1) 3)}

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kobe University Hospital

²⁾Department of Infection Prevention and Control, Kobe University Hospital

³⁾Division of Laboratory Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

⁴⁾Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana University

⁵⁾Division of Infectious Diseases Therapeutics, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan Department of Infection

The rapid spread of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) has been one of the greatest concerns worldwide. Rapid and precise detection of the carbapenemase genotype may be useful for controlling nosocomial infections and selection of appropriate antibiotics. The purpose of this study was to evaluate the performance of the MASTDISCS combi Carba plus disc system (MD) in classifying the types of carbapenemases using 98 strains of *Enterobacterales*, including 46 strains of CPE. Except for GES-producers, the results of MD of 26 out of 39 isolates of MBL-producers, 2 isolates of OXA-48, and 1 out of 2 isolates of KPC were consistent with carbapenemase genotype. In particular, 11 out of 15 (73.3%) isolates harboring *bla*_{IMP6} gene, a dominant carbapenemase genotype in Japan that tends to show low MICs to carbapenems, were correctly classified as MBL-producers. However, 4 isolates of MBL-producing *Serratia marcescens* and 1 isolate of *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*_{MOX} gene were misidentified as OXA-48-producers and KPC-producer, respectively. Overall, concordance rates between MD and PCR was 84.2% (80/95). This study suggests that MD is a simple and inexpensive phenotypic testing system for the detection and differentiation of CPE as MBL-, KPC-, and OXA-48-producers in clinical microbiological laboratories.