

[短 報]

Pseudomonas aeruginosa における GES 型 β ラクタマーゼ遺伝子の保有状況

戸田宏文¹⁾・久保修一¹⁾・田中裕滋²⁾・上裕俊法¹⁾²⁾・吉田耕一郎³⁾

¹⁾ 近畿大学病院中央臨床検査部

²⁾ 近畿大学医学部臨床検査医学

³⁾ 近畿大学病院安全管理部感染対策室

(令和3年6月12日受付, 令和3年7月30日受理)

本研究では, *Pseudomonas aeruginosa* における GES 型 β ラクタマーゼ遺伝子の保有状況の調査を行った。2016年から2018年に分離された *P. aeruginosa* 775株の内, CAZのMICが16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示した46株(5.9%)について, カルバペネマーゼ産生の表現型試験とカルバペネマーゼ遺伝子の検索を行った。カルバペネマーゼ産生の表現型試験は, mCIM陽性は0株(0.0%)でCIMTris陽性は3株(0.4%)であった。PCRによるカルバペネマーゼ遺伝子の検索では, $bla_{\text{GES-1}}$ が2株(0.3%), $bla_{\text{GES-5}}$ が1株(0.1%), および $bla_{\text{VIM-2 type}}$ が2株(0.3%)であった。 $bla_{\text{GES-5}}$ 保有 *P. aeruginosa* が検出された症例は, 臨床経過中に $bla_{\text{GES-1}}$ の493番目のグリシンがアデニンに置換され, $bla_{\text{GES-5}}$ に変化していた。 $bla_{\text{GES-1}}$ ならびに $bla_{\text{GES-5}}$ の遺伝子型は, いずれもST235-POT型205-58であった。GES型 β ラクタマーゼ遺伝子はプラスミドを介して様々な菌種に拡散する危険性があり, 簡便で高感度な表現型の確認方法と遺伝子学的な検証ツールを整備して, 様々な菌種におけるGES型 β ラクタマーゼ産生菌の監視を行う必要があると考える。

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, $bla_{\text{GES type}}$, $bla_{\text{GES-5}}$

序 文

Pseudomonas aeruginosa は, 病院感染症の原因菌の一つであり, 臨床材料から分離される主要な病原微生物である¹⁾。*P. aeruginosa* は piperacillin, ceftazidime(CAZ), imipenem/cilastatin, meropenem (MEPM), amikacin, levofloxacin, および ciprofloxacin のような抗 *P. aeruginosa* 活性を有する抗菌薬以外には感受性を示さず, 日常診療で使用できる抗菌薬は限定的である。本邦においては, カルバペネム系抗菌薬耐性, アミカシン非感性, およびニューキノロン系抗菌薬耐性を同時に示した多剤耐性 *P. aeruginosa* (multi-drug resistant *P. aeruginosa*: MDRP) による感染症は, 感染症法の5類定点届出疾患に指定され, 医療関連感染において大きな問題となっている²⁾。

抗 *P. aeruginosa* 活性を有する抗菌薬の中で, カルバペネム系抗菌薬は最も臨床の使用頻度が多い抗菌薬の一つであるが, カルバペネム系抗菌薬耐性 *P. aeruginosa* から検出される主要なカルバペネマーゼはIMP-1型メタロ β ラクタマーゼである³⁾⁴⁾。一方, カルバペネマーゼ活性に関与する $bla_{\text{GES type}}$ は *P. aeruginosa* や腸内細菌目細菌での保有が確認され, 一部の医療機関ではアウトブレイクが報告されている⁵⁾⁶⁾。本邦において *P. aeruginosa* における $bla_{\text{GES type}}$ の保有状況は十分に明らかになっていない。本研究では, 近畿大学病院で分離されたCAZに非感性を示した *P. aeruginosa* について

$bla_{\text{GES type}}$ の保有状況を調査した。

材料と方法

2016年から2018年の3年間に近畿大学病院で各種臨床材料から分離された *P. aeruginosa* 775株(2016年228株, 2017年270株, 2018年277株)を対象とした。薬剤感受性試験は, VITEK2 AST-N309 (バイオメリュー・ジャパン株式会社)を使用した。カルバペネマーゼ産生のスクリーニング基準は, CAZのMICが16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上とし, このスクリーニング基準を満たした *P. aeruginosa* についてカルバペネマーゼ産生の表現型試験とカルバペネマーゼ遺伝子の検索を行った。カルバペネマーゼ産生性の表現型の確認は, modified carbapenem inactivation method (mCIM)⁷⁾および modified carbapenem inactivation method, Tris (CIMTris)を用いた⁸⁾。カルバペネマーゼ遺伝子は $bla_{\text{IMP-1 type}}$, $bla_{\text{IMP-2 type}}$, $bla_{\text{VIM-2 type}}$ ⁹⁾, $bla_{\text{NDM type}}$ ¹⁰⁾, $bla_{\text{KPC type}}$ ¹¹⁾, および $bla_{\text{GES type}}$ ¹²⁾をPCRで検出した。 $bla_{\text{GES type}}$ 保有の *P. aeruginosa* は, シークエンスによる $bla_{\text{GES type}}$ のサブクラス同定¹²⁾, multi-locus sequence typing (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>)による Sequence type (ST), および Cica Geneus Pseudo POT Kit (関東化学株式会社)によるPOT型について検討した。

本研究は, 近畿大学医学部倫理委員会(承認番号:2020-294)の承認を得て行った。

結 果

P. aeruginosa 775株の内, カルバペネマーゼ産生のスクリーニング基準を満たした *P. aeruginosa* は, 46株(5.9%) (2016年:15株6.6%, 2017年:16株5.9%, 2018年:15株

著者連絡先:(〒589-8511)大阪府大阪狭山市大野東377-2
近畿大学病院中央臨床検査部
戸田宏文
E-mail: hirofumi-toda@med.kindai.ac.jp

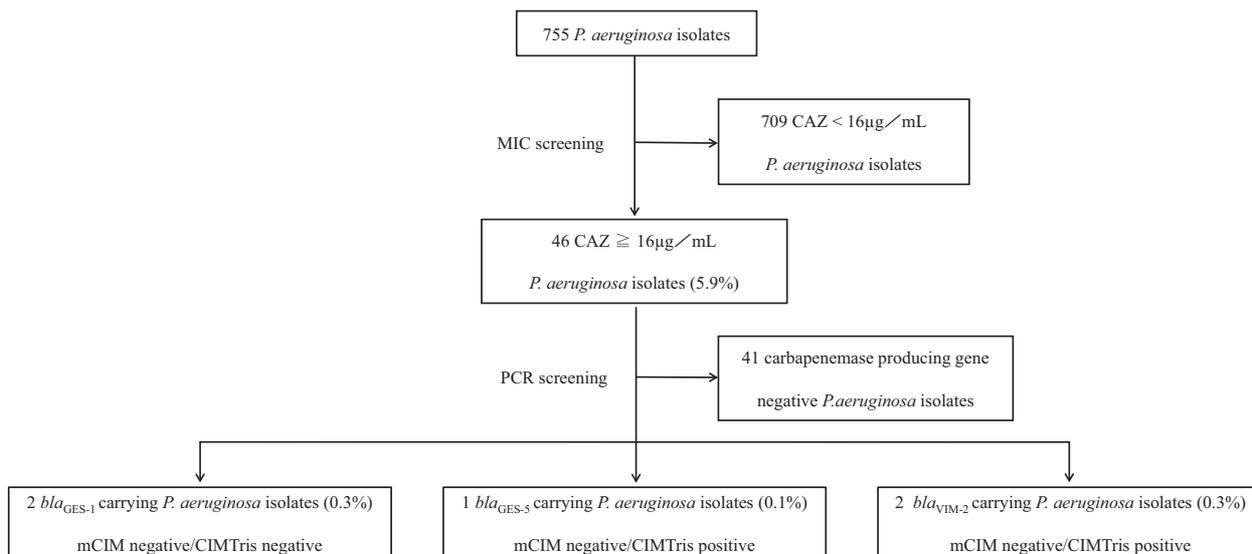


Fig. 1. A flowchart of carbapenemase producing gene screening in this study
CAZ, ceftazidime. mCIM, modified carbapenem inactivation method. CIMTris, modified carbapenem inactivation method, Tris.

Table 1. Clinical microbiological and molecular epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying *bla*_{GES} type

Isolate no.	Year	Specimens	<i>bla</i> _{GES} type sequence	mCIM (mm)	CIMTris (mm)	MLST	POT	MIC (μg/mL)				
								CAZ	MEPM	IPM/CS	AMK	CPFX
16-312 ^a	2016	Bedsore	<i>bla</i> _{GES-1}	Neg. (20)	Neg. (22)	ST235	205-58	≥64	1	≤0.25	16	≥4
16-339	2016	Ascitic fluid	<i>bla</i> _{GES-1}	Neg. (19)	Neg. (21)	ST235	205-58	≥64	1	8	16	≥4
17-003 ^a	2017	Bedsore	<i>bla</i> _{GES-5}	Neg. (21)	Pos. (6)	ST235	205-58	16	≥16	≥16	16	≥4

a, Isolate no.16-312 and 17-003 are same patient.

CAZ: Ceftazidime, MEPM: Meropenem, IPM/CS: Imipenem/Cilastatin, AMK: Amikacin, CPFX: ciprofloxacin.

Neg: Negative, Pos: Positive.

mCIM: modified carbapenem inactivation method.

CIMTris: modified carbapenem inactivation method, Tris.

MLST: multilocus sequence typing.

ST: sequence type.

POT: PCR-based ORF typing.

5.4%)であった。このうち、mCIM陽性は0株(0.0%)でCIMTris陽性は3株(0.4%)であった。PCRによるカルバペネマーゼ遺伝子検索では、*bla*_{GES} type 3株(0.4%) (2016年2株, 2017年1株(2016年と同一症例1株), 2018年0株)と*bla*_{VIM-2} type 2株(0.3%) (2017年2株)が認められた。*bla*_{GES} type 3株のサブクラスは*bla*_{GES-1}が2株で*bla*_{GES-5}が1株であった(Fig. 1)。*bla*_{GES-5}保有*P. aeruginosa*が検出された症例では、臨床経過中に*bla*_{GES-1}の493番目のグリシンがアデニンに置換され、*bla*_{GES-5}に変化していた。遺伝子型では、*bla*_{GES} type 3株はST235-POT型205-58で*bla*_{VIM-2} type 2株はST235-POT型205-98とST303-POT型366-76であった(Table 1)。

考 察

本研究における*P. aeruginosa*の*bla*_{GES} type保有は3株(0.4%)と低率であり、カルバペネマーゼ活性を有する*bla*_{GES-5}の保有は1株(0.1%)であった。本研究で検出された*bla*_{GES-5}保有*P. aeruginosa*は、国際的な薬剤耐性流行クローンであ

るST235であり¹³, Hishinumaらの報告と同様の傾向であった¹⁴。*P. aeruginosa*における*bla*_{GES} typeの保有状況に関する研究は少なく、これまでに中国¹⁵, 日本¹⁴, ブラジル¹⁶, チェコ¹⁷, インド¹⁸, 南アフリカ¹⁹, およびイタリア²⁰などから*bla*_{GES-5}保有*P. aeruginosa*の分離が報告されているが、諸外国を含めてその保有状況の詳細は明らかになっていない。本邦においては、Hishinumaらがカルバペネム耐性*P. aeruginosa*における*bla*_{GES-5}保有率を9.3%と報告している¹⁴。本研究においては、スクリーニング基準のCAZ非感性で、かつカルバペネム系抗菌薬(MEPM)に非感性を示した*P. aeruginosa*に限定すると*bla*_{GES-5}の保有率が6.7%であることより(data not shown), 解析対象に加えていないCAZ感性を示しカルバペネム系抗菌薬のみ耐性を示す*P. aeruginosa*ではさらに高率であると推測された。現在のところ、臨床上問題となっているカルバペネマーゼ活性を有する*bla*_{GES} type (*bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-4}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}など)のスクリーニング基準は定められていないため、スクリーニング基準の違いが*bla*_{GES-5}保有の割合に影響している可能性がある。他方、

Hishinuma らの報告によると大阪府では bla_{GES-5} 保有 *P. aeruginosa* が全国の 42% と高率に検出されている¹⁴⁾。2013 年に大阪府北部の長期療養施設において bla_{GES-5} 保有 MDRP によるアウトブレイクが発生しているが、大阪府南部に位置する我々の施設で bla_{GES-5} 保有 *P. aeruginosa* の割合が低いのは医療圏の地理的な違いが影響しているかも知れない³⁾。

本研究で検出された bla_{GES-5} 保有 *P. aeruginosa* では、近隣医療機関からの転院時には bla_{GES-1} が認められた。この症例で検出された 2 株の *P. aeruginosa* は同じ遺伝子型 (ST235-POT205-58) を示し、入院時に検出された *P. aeruginosa* の bla_{GES-1} がミスセンス変異 [493G>A (Gly162Ser)] を起こし、bla_{GES-5} に変化したと考えられた。今後も近隣の医療機関からカルバペネマーゼ活性を示さない bla_{GES-1} 保有 *P. aeruginosa* が高度医療を提供する中核病院に持ち込まれると抗菌薬の選択圧によってカルバペネマーゼ活性を有する bla_{GES-5} に変異するリスクがあり、地域医療圏で bla_{GES-type} 保有菌の監視をすることは重要である。

本研究は保存菌株を用いたレトロスペクティブな検討であるが、日常業務における当院のカルバペネマーゼ産生性の確認は、2018 年以前には sodium-mercaptoacetate (SMA) ディスクによる発育阻害試験を行い、2018 年以降は mCIM を行っている。これは、本邦でカルバペネマーゼの頻度が多い IMP 型メタロ β ラクタマーゼを想定した検査体系であった⁴⁾。一方、CIMTris は各種カルバペネマーゼ産生性の確認試験として有用性が報告されている⁸⁾。本研究の CIMTris の成績は、カルバペネマーゼ活性を有しない bla_{GES-1} 保有 *P. aeruginosa* では陰性を示し、カルバペネマーゼ活性を有する bla_{GES-5}、ならびに bla_{VIM-2 type} 保有 *P. aeruginosa* では陽性を示した。本研究において例数は少ないものの、CIMTris は様々な遺伝子によるカルバペネマーゼ産生性の確認法としての有用性が示された。一方、bla_{GES-5} の確認には遺伝子学的アプローチが必須であるが、近年、マルチプレックス PCR によるカルバペネマーゼ遺伝子検出キットの上市や LAMP 法を利用した bla_{GES-5} の検出方法²¹⁾が開発されている。これらの高感度なカルバペネマーゼ検出法や遺伝子学的な検証方法が普及することで、bla_{GES-5} 保有 *P. aeruginosa* の広がりが明らかになると考える。

本研究において大阪府南部に位置する当院の *P. aeruginosa* の bla_{GES-5} の保有率は 0.1% と低率であったが、今後、GES 型 β ラクタマーゼ遺伝子はプラスミドを介して様々な菌種に拡散する危険性があり、その動向を注視する必要がある。一般的な臨床微生物検査室では GES 型 β ラクタマーゼ産生の検証は困難であるが、適切なスクリーニング基準を確立し、簡便で高感度な表現型の確認方法と遺伝子学的な検証ツールを整備して、様々な菌種における GES 型 β ラクタマーゼ産生菌の監視を行う必要がある。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 厚生労働省. 院内感染対策サーベイランス事業 JANIS. https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2018/3/1/ken_Open_Report_201800.pdf.

- Tsuji, A, I Kobayashi, T Oguri, et al. 2005. An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan. *J Infect Chemother.* 11: 64-70.
- Miyawaki, K, Y Miwa, M Seki, et al. 2012. Correlation between the consumption of Meropenem or Doripenem and meropenem susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Japan. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 946-949.
- Hirakata, Y, T Yamaguchi, M Nakano, et al. 2003. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 37: 26-32.
- Kanayama, A, R Kawahara, T Yamagishi, et al. 2016. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect.* 93: 35-41.
- Yamasaki, K, M Komatsu, T Ono, et al. 2017. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing bla_{GES-4} carbapenemase at a Japanese hospital. *J Infect Chemother.* 23: 40-44.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th edition, CLSI document M100-S29. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. <http://em100.edaptivedocs.net/Login.aspx>.
- Uechi, K, T Tada, K Shimada, et al. 2017. A modified carbapenem inactivation method, CIMTris, for carbapenemase production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *J Clin Microbiol* 55: 3405-3410.
- Nishio, H, M Komatsu, N Shibata, et al. 2004. Metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol.* 42: 5256-5263.
- Nordmann, P, L Poirel, A Carrère, et al. 2011. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 49: 718-721.
- Moland, ES, JA Black, J Ourada, et al. 2002. Occurrence of newer β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U. S. hospitals. *J Clin Microbiol.* 46: 3837-3842.
- Dallenne, C, AD Costa, D Decré, 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: 490-495.
- Treepong, P, VN Kos, C Guyeux, et al. 2018. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235. *Clin Microbiol Infect.* 24: 258-266.
- Hishinuma, T, T Tada, K Kuwahara-Arai, et al. 2018. Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. *PLoS ONE* 13 (11): e0207134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207134>.
- Wang, C, P Cai, D Chang, et al. 2006. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 14: 1261-1262.
- Polotto, M, T Casella, MG de Lucca Oliveira, et al. 2012. De-

- tection of *P. aeruginosa* harboring *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{SPM-1} causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infectious Diseases. 12: 176 doi: 10.1186/1471-2334-12-176.
- 17) Papagiannitsis, CC, M Medvecky, K Chudejova, et al. 2017. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo-β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 61: e01811-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-17>.
- 18) Maurya, AP, D Choudhury, AD Talukdar, et al. 2014. A report on the presence of GES-5 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with urinary tract infection from north-east India. Indian J Med Res 140: 565-567.
- 19) Labuschagne, CDJ, GF Weldhagen, MM Ehlers, et al. 2008. Emergence of class I integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. Int J Antimicrob Agents 31: 527-530.
- 20) Giani, T, F Arena, S Pollini, et al. 2018. Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. J Antimicrob Chemother 73: 664-671.
- 21) Takano, C, M Seki, DW Kim, et al. 2019. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification method to detect Guiana Extended-Spectrum (GES) β-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Microbiol. 10 (25): 1-7 doi: 10.3389/fmicb.2019.00025.

Investigation of the prevalence of *bla*_{GES} genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Hirofumi Toda¹⁾, Shuichi Kubo¹⁾, Yuji Tanaka²⁾, Toshinori Kamisako^{1) 2)}, Koichiro Yoshida³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kindai University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Kindai University Faculty of Medicine

³⁾Department of Medical Safety Administration, Division of Infection Control and Prevention, Kindai University Hospital

We investigated the prevalence of *bla*_{GES} genes among 775 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. In this study, *P. aeruginosa* isolates resistant to ceftazidime (MIC ≥ 16 μg/mL) were evaluated for the presence of genes encoding *bla*_{GES} by PCR. Overall, 3 of 775 (0.4%) clinical isolates obtained from 2016 to 2018 harbored the *bla*_{GES} gene. These three isolates were found to carry the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} by genome sequencing. In MLST analysis, all of these isolates were of the same sequence type, ST235. In PCR-based open-reading frame (ORF) typing (POT) assay, these isolates showed the same POT number 205-58. This study revealed that the prevalence of *bla*_{GES-5} remains extremely low at 0.1% among *P. aeruginosa* isolates collected at our hospital located in the southern part of Osaka Prefecture. Because the *bla*_{GES} genes may spread by horizontal transmission of plasmids between different bacterial species in clinical setting, monitoring trends for *bla*_{GES} genes in diverse species is considered to be vital.