

[原 著]

DPS192iX 用プレート EPG1 の薬剤感受性測定精度およびジピコリン酸を用いた metallo-β-lactamase 検出精度の評価

松本紗也加<sup>1)</sup>・大沼健一郎<sup>1)2)</sup>・西田全子<sup>1)</sup>・楠木まり<sup>1)2)</sup>・石田奈美<sup>1)</sup>・小林沙織<sup>1)</sup>

西川佳佑<sup>1)</sup>・大路 剛<sup>1)2)3)</sup>・宮良高維<sup>2)</sup>・今西孝充<sup>1)</sup>・矢野嘉彦<sup>1)4)</sup>

<sup>1)</sup> 神戸大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 神戸大学医学部附属病院感染制御部

<sup>3)</sup> 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

<sup>4)</sup> 神戸大学大学院医学研究科消化器内科学

(令和4年3月29日受付, 令和4年6月8日受理)

薬剤感受性分析装置 DPS192iX (栄研化学) 用プレート EPG1 (以下 EPG1, 栄研化学) は, ジピコリン酸 (dipicolinic acid : DPA) 添加薬剤を搭載し, metallo-β-lactamase (MBL) 産生菌の検出が可能である。今回, カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacterales* : CPE) 54 株, non-CPE 56 株を用いて, EPG1 の薬剤感受性検査の測定精度および MBL 検出精度を評価した。ドライプレートを対照法とした本法の MIC ± 1 管差一致率は 86.4%~100% を示し, major error, very major error とともに 3% 以下であった。また, ceftazidime, imipenem, meropenem (MEPM) 単剤に対し, DPA 添加薬剤の MIC が 4 倍以上低下した株を陽性とした場合の MBL 検出率は 95.3% を示し, MBL 産生菌以外の CPE および non-CPE は陰性であった。偽陰性となった MBL 産生菌 2 株は, MEPM の MIC が 0.25 μg/mL 以上であり, 他の確認検査と組み合わせることにより MBL の検出が可能であった。以上より, EPG1 を用いた薬剤感受性測定精度および MBL 検出精度は良好であり, 日常検査に有用であることが示唆された。

**Key words:** metallo-β-lactamase, ジピコリン酸, 薬剤感受性検査, DPS192iX

序 文

近年,世界的に腸内細菌目の薬剤耐性化が深刻化している<sup>1)</sup>。特に,カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacterales* : CPE) は,カルバペネマーゼ遺伝子がプラスミド上に存在し菌種を超えて伝播するため,公衆衛生上の観点からも問題となっている<sup>2)3)</sup>。耐性菌の検出には正確な薬剤感受性の測定が有用であるが,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に耐性を示さない株が存在し,感染症治療に大きな影響を与える<sup>4)</sup>。国内においては IMP 型の metallo-β-lactamase (MBL) の分離頻度が高く,特に IMP-6 産生菌は imipenem (IPM) の MIC が低い傾向にあり,その多くは extended spectrum β-lactamase (ESBL) を同時に産生するため,薬剤感受性検査のみではカルバペネマーゼ産生を予測することが困難である<sup>5)</sup>。MBL は Ambler 分類においてクラス B に属するカルバペネマーゼであり,酵素の活性部位に亜鉛イオンを有し,メルカプト酢酸ナトリウム (sodium mercaptoacetate : SMA), EDTA, ジピコリン酸 (dipicolinic acid : DPA) に

よって阻害される特徴がある<sup>6)7)</sup>。そのため,日本臨床微生物学会が発行している耐性菌検査法ガイドでは,MBL 産生が疑われた場合,阻害剤を使用した Double Disk Synergy Test (DDST) などの表現型検査を実施し,MBL 産生の有無を確認することが推奨されている<sup>8)</sup>。

また,meropenem (MEPM) の MIC が 0.25 μg/mL~1 μg/mL と低く,感性和判定される株の中には,カルバペネマーゼ産生菌が存在することが報告されており,European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) では,CPE のスクリーニング基準として MEPM の疫学的カットオフ値を 0.125 μg/mL に設定している<sup>9)10)</sup>。このカットオフ値を用いる場合,MEPM の低濃度領域を含む MIC の測定が必要であるが,測定可能な自動機器に限られていることが課題となっている。

微生物感受性分析装置 DPS192iX (以下 DPS192iX, 栄研化学) は,192 ウェル・30 種類以上の薬剤を搭載した専用のドライプレートをを用い,1 時間毎にウェルの画像を撮影し解析することで,多種類かつ広範囲な濃度の抗菌薬の測定が可能な機器である。近年上市された DPS192iX 用プレート EPG1 (以下 EPG1, 栄研化学) は,MEPM については 0.12 μg/mL~16 μg/mL の 8 濃度を搭載しており,EUCAST の疫学的カットオフ値 0.125 μg/mL を測定することが可能である。さらに本プレートは,ceftazidime (CAZ), MEPM, IPM の 3 薬剤それぞれに MBL 阻害剤である DPA を添加したウェルが搭載されており,これにより薬剤感受性の測定と同

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  
大沼健一郎  
TEL: 078-382-6327  
FAX: 078-382-6348  
E-mail: onumak@med.kobe-u.ac.jp

Table 1. Summary of 110 isolates of *Enterobacteriales* used in this study

$\beta$ -lactamase types (no. of isolates)	Species	no. of isolates	$\beta$ -lactamase types (no. of isolates)	Species	no. of isolates
carbapenemase-producing <i>Enterobacteriales</i> (CPE)			non carbapenemase-producing <i>Enterobacteriales</i> (non-CPE)		
Ambler class A			AmpC (24)		
KPC (4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	ESBL (32)	<i>Escherichia coli</i>	11
GES (4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	CTX-M-type (28)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
	<i>Serratia marcescens</i>	1		<i>Enterobacter cloacae</i>	7
Ambler class B				<i>Klebsiella aerogenes</i>	1
IMP-1 (20)	<i>Serratia marcescens</i>	6		<i>Serratia marcescens</i>	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	4			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3		<i>Escherichia coli</i>	14
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
	<i>Providencia rettgeri</i>	2		<i>Enterobacter cloacae</i>	3
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	TEM-type (2)	<i>Providencia stuartii</i>	1
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	1	SHV-type (1)	<i>Escherichia coli</i>	1
IMP-6 (1)	<i>Serratia marcescens</i>	1	TEM-type + SHV-type (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
IMP-6 + ESBL (14)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10		<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	4			
NDM-1 (4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3			
	<i>Escherichia coli</i>	1			
VIM-1 (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2			
VIM-2 (1)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1			
SMB-1 (1)	<i>Serratia marcescens</i>	1			
Ambler class D					
OXA-48 (2)	<i>Escherichia coli</i>	1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1			
OXA-181 (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1			

Table 2. Evaluation of agreement rates of MICs compared to dry plate

antibiotics	number of isolates with the stated differences in MICs							agreement rate (%) (within $\pm 1$ dilution)
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	
ampicillin	0	0	0	110	0	0	0	100.0
pipelacillin	0	0	5	103	2	0	0	100.0
amoxicillin/clavulanate	0	0	10	99	1	0	0	100.0
sulbactam/ampicillin	0	0	8	102	0	0	0	100.0
sulbactam/cefoperazone	0	0	14	88	6	2	0	98.2
tazobactam/piperacillin	0	2	6	86	11	4	1	93.6
cefazolin	0	0	0	110	0	0	0	100.0
cefotiam	0	0	0	109	1	0	0	100.0
cefdinir	0	0	1	108	1	0	0	100.0
cefpodoxime	0	1	1	105	3	0	0	99.1
cefotaxime	0	0	4	88	13	5	0	95.5
ceftazidime	0	1	17	85	6	1	0	98.2
ceftriaxone	0	0	1	84	13	10	2	89.1
cefepime	0	0	5	95	8	2	0	98.2
cefprome	0	0	3	89	15	3	0	97.3
cefmetazole	0	0	6	98	4	2	0	98.2
flomoxef	0	0	5	98	7	0	0	100.0
latamoxef	0	1	2	101	5	1	0	98.2
faropenem	0	0	4	99	7	0	0	100.0
meropenem	0	0	17	87	6	0	0	100.0
imipenem	1	0	8	94	7	0	0	99.1
aztreonam	0	0	15	82	11	1	0	98.2
ciprofloxacin	0	0	4	98	8	0	0	100.0
levofloxacin	0	1	10	98	1	0	0	99.1
amikacin	0	0	7	99	4	0	0	100.0
gentamicin	0	1	7	95	6	1	0	98.2
colistin	0	2	4	103	0	1	0	97.3
fosfomycin	3	8	21	63	11	4	0	86.4
minocyclin	0	7	34	66	3	0	0	93.6
sulfamethoxazole-trimethoprim	0	1	5	93	10	1	0	98.2

時に、MBL 産生菌の検出が可能となった。

そこで今回、EPG1 の薬剤感受性検査の測定精度および DPA を用いた MBL 産生菌の検出精度を評価したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 使用菌株

神戸大学医学部附属病院および近畿地区の医療施設にて検出され、遺伝子検査にて各種耐性遺伝子が確認できた  $\beta$ -ラクタマーゼ産生性の腸内細菌目細菌 110 株 (CPE: 54 株, non-CPE: 56 株) を用いた (Table 1)。測定菌株は、スキムミルク (日本ベクトンディッキンソン社) ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) で保存した菌株を、5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトンディッキンソン社) を用いて  $35^{\circ}\text{C}$ 、18 時間以上で 2 回以上継代培養した株を用いた。

### 2. DPS192iX による MIC 測定

上記菌株をマックファーランド濁度 1.0 に調整し、その 25  $\mu\text{L}$  をミューラーヒントンブロス (栄研化学) に混合し接種菌液とした。薬剤感受性測定用プレートは EPG1 を使用した。接種菌液をよく混和後、自動菌液分注装置イノキュレーター スマート 192 (栄研化学) を用いてプレートの各ウェルに 50

$\mu\text{L}$  ずつ菌液を分注し、DPS192iX に搭載した。18 時間後に機器によって読み取られた MIC を評価に用いた。測定薬剤は ampicillin (ABPC), pipelacillin (PIPC), amoxicillin/clavulanate (ACV), sulbactam/ampicillin (S/A), sulbactam/cefoperazone (S/C), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefdinir (CFDN), cefpodoxime (CPDX), cefotaxime (CTX), CAZ, ceftriaxone (CTRX), cefepime (CFPM), cefprome (CPR), cefmetazole (CMZ), flomoxef (FMOX), latamoxef (LMOX), faropenem (FRPM), MEPM, IPM, aztreonam (AZT), ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin (LVFX), amikacin (AMK), gentamicin (GM), colistin (CL), fosfomycin (FOM), minocyclin (MINO), sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) の 30 薬剤とした。また、自動撮影されたウェルの画像を目視で確認し、気泡などの混入により自動判定と目視判定による MIC が乖離したものは再検の対象とし、最終的には自動判定値を採用した。

### 3. 微量液体希釈法による MIC 測定

対照法として、ドライプレート (以下 DP, 栄研化学) を用いた。2. と同じ菌液を使用して接種菌液を調整し、100  $\mu\text{L}$  ずつウェルへ分注した。 $35^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養後、目視により

Table 3. Evaluation of agreement and error rates compared to dry plate

antibiotics	rate (%)			
	category agreement	minor error	major error	very major error
ampicillin	100.0	0.0	0.0	0.0
pipelacillin	96.4	3.6	0.0	0.0
amoxicillin/clavulanate	92.7	7.3	0.0	0.0
sulbactam/ampicillin	94.5	5.5	0.0	0.0
tazobactam/piperacillin	91.8	8.2	0.0	0.0
cefazolin	100.0	0.0	0.0	0.0
cefepodoxime	98.2	0.9	0.0	0.9
cefotaxime	98.2	0.9	0.9	0.0
ceftazidime	91.8	8.2	0.0	0.0
ceftriaxone	96.4	2.7	0.9	0.0
cefpirome	94.5	5.5	0.0	0.0
cefmetazole	93.6	6.4	0.0	0.0
meropenem	96.4	3.6	0.0	0.0
imipenem	96.4	3.6	0.0	0.0
aztreonam	82.7	17.3	0.0	0.0
ciprofloxacin	98.2	1.8	0.0	0.0
levofloxacin	94.5	5.5	0.0	0.0
amikacin	96.4	3.6	0.0	0.0
gentamicin	95.5	3.6	0.0	0.9
fosfomycin	83.6	15.5	0.0	0.9
minocyclin	85.5	13.6	0.0	0.9
sulfamethoxazole-trimethoprim	96.4	0.0	2.7	0.9

MIC を測定した。目視判定は添付文書に従って行い、明らかなスキップウェルが生じているものは再検の対象とした。

#### 4. EPG1 と対照法との一致性の評価

DP を対照法として EPG1 との MIC $\pm$ 1 管差一致率およびカテゴリー一致率を算出した。カテゴリー一致率は、それぞれの MIC 測定方法において各抗菌薬に対し感性 (S)、中等度耐性 (I) および耐性 (R) と判定された菌株を比較し、EPG1 と対照法とでカテゴリーが一致した場合を category agreement (CA)、一方が I で他法が S または R の場合を minor error (MIE)、EPG1 が R かつ対照法が S の場合を major error (ME)、EPG1 が S かつ対照法が R の場合を very major error (VME) とし、CA、MIE、ME、VME の割合を求めた。MIC 一致率の評価薬剤は 2. に示した 30 薬剤とし、カテゴリー一致率の評価薬剤は 2. に示した 30 薬剤のうち S/C、CTM、CFDN、CPR、FMOX、LMOX、FRPM、CL を除く 22 薬剤とした。カテゴリーは Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S26 のブレイクポイントに基づき判定した。

#### 5. DPA による MBL 産生菌検出率の算出

3 薬剤 (CAZ、IPM、MEPM) の単剤での MIC に対して、DPA が添加された各薬剤における MIC が 1 薬剤でも 4 倍もしくは 8 倍以上低下した株を MBL 産生陽性と判定し、測定開始 18 時間後の検出率を算出した。陰性対照は、MBL 産生菌以外の CPE および non-CPE とした。

## 結 果

### 1. 対照法との一致性の評価

各薬剤の対照法に対する MIC の一致率を Table 2 に示す。

MIC $\pm$ 1 管差一致率は 86.4%~100% であり、CTR (89.1%)、FOM (86.4%) を除くすべての薬剤で 93% 以上を示した。CA は 82.7%~100% であり、FOM (83.6%)、MINO (85.5%)、AZT (82.7%) を除く薬剤で 91% 以上を示した。さらに、VME は 0%~0.9%、ME は 0%~2.7%、さらに MIE は 0%~17.3% であった (Table 3)。

### 2. DPA を用いた MBL 検出精度の評価

DPA による MBL 検出率を Table 4 に示す。MBL 産生菌 43 株のうち、単剤の MIC と比較して DPA 添加薬剤の MIC が 8 倍以上低下した株は CAZ で 53.5% (23/43)、IPM で 37.2% (16/43)、MEPM で 81.4% (35/43) であり、MBL 検出率は 90.7% (39/43) であった。MBL と判定されなかった株は、*bla*<sub>VIM2</sub> 保有 *Enterobacter cloacae* 1 株、*bla*<sub>IMP1</sub> 保有 *E. cloacae* 1 株、*bla*<sub>IMP1</sub> 保有 *Klebsiella aerogenes* 1 株、*bla*<sub>VIM1</sub> 保有 *Klebsiella pneumoniae* 1 株であった。また、MIC が 4 倍以上低下した株は、CAZ で 67.4% (29/43)、IPM で 55.8% (24/43)、MEPM で 90.7% (39/43) であり、MBL 検出率は 95.3% (41/43) であった。MBL と判定されなかった株は、*bla*<sub>VIM2</sub> 保有 *E. cloacae* 1 株、*bla*<sub>IMP1</sub> 保有 *K. aerogenes* 1 株であった。MBL 産生菌以外の CPE および non-CPE は、いずれの定義においても MBL 産生陰性と判定された。

## 考 察

DPA を用いて MBL 産生菌を検出する薬剤感受性測定装置の精度については、我々が調べた限りでは未だ報告はない。今回我々は、DPS192iX を用いた EPG1 の薬剤感受性測定精度および MBL 検出精度を評価した。

薬剤感受性検査の性能評価を行う際、米国食品医薬品局

Table 4. Detection rates of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) by dipicolinic acid

genotype	number (n)	detection rate (n) of MBL											
		CAZ		IPM		MEPM							
		$\geq 4$ -fold*	$\geq 8$ -fold**	$\geq 4$ -fold*	$\geq 8$ -fold**	$\geq 4$ -fold*	$\geq 8$ -fold**						
MBL-producers													
<i>blaIMP-1</i>	20	75.0% (15)	75.0% (15)	75.0% (15)	0.0% (11)	95.0% (19)	75.0% (15)	95.0% (19)	90.0% (18)				
<i>blaIMP-6</i>	15	86.7% (13)	46.7% (7)	13.3% (2)	6.7% (1)	100.0% (15)	100.0% (15)	100.0% (15)	100.0% (15)				
<i>blaVIM***</i>	3	0.0% (0)	0.0% (0)	66.7% (2)	33.3% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)	66.7% (2)	33.3% (1)				
<i>blaNDM-1</i>	4	25.0% (1)	25.0% (1)	100.0% (4)	50.0% (2)	100.0% (4)	100.0% (4)	100.0% (4)	100.0% (4)				
<i>blaSMB-1</i>	1	0.0% (0)	0.0% (0)	100.0% (1)	100.0% (1)	100.0% (1)	100.0% (1)	100.0% (1)	100.0% (1)				
total	43	67.4% (29)	53.5% (23)	55.8% (24)	37.2% (16)	90.7% (39)	81.4% (35)	95.3% (41)	90.7% (39)				
CPEs except MBL producers	11	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)				
non-CPEs	56	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)				

\*Detection rates of MBL defined as positive when MICs of ceftazidime, imipenem and meropenem containing DPA decreases by 4 times or more compared to those of without DPA.

\*\*Detection rates of MBL defined as positive when MICs of ceftazidime, imipenem and meropenem containing DPA decreases by 8 times or more compared to those of without DPA.

\*\*\*2 isolates harboring *blaVIM-1* and one isolate harboring *blaVIM-2*.

(FDA) においては、MIC $\pm$ 1 管差一致率 90% 以上、VME および ME は 3% 以下が望ましいとされている<sup>11)</sup>。本検討では、対照法に対する EPG1 での MIC $\pm$ 1 管差一致率は 86.4%~100% であり、90% 未満を示した薬剤は CTRX および FOM であった。CTRX の MIC $\pm$ 1 管差一致率は 89.1% であったが、CA は 96.4% と良好であり、また VME および ME となった株は存在しなかった。一方、FOM については、MIC $\pm$ 1 管差一致率は 86.4%、CA は 83.6% といずれも低値を示したが、ME となった株は存在せず VME も 1 株のみ (0.9%) であった。しかし、MIE が 17 株存在し、そのうち 14 株は対照法である DP と比較して EPG1 で MIC が低値となる傾向が認められた。以前我々が DPS192iX を用いて行った検討においても、特定の薬剤で MIC が低値となり、通常のプレートとの形状の違いがウェル内の反応に影響を与えた可能性を報告している<sup>12)</sup>。詳細な原因については不明であるが、今回も同様の現象が生じたと考えられた。他、AZT および MINO の CA はそれぞれ 82.7%、85.5% であり、いずれもブレイクポイント付近の MIC を示す株が多かったことにより CA が低くなったと考えられるが、MIC $\pm$ 1 管差一致率は 98.2%、93.6% と良好であり、ME となった株は存在せず、VME は MINO で 1 株 (0.9%) であった。以上より、EPG1 と DP の一致性については、一部の薬剤で一致率が低値を示したが、30 薬剤のうち 28 薬剤が FDA の推奨する指標を満たしており、臨床現場で使用する十分な性能を有していると考えられた。

また、EPG1 には CAZ、IPM および MEPM の 3 薬剤に DPA が添加されたウェルが搭載されており、単剤の MIC と比較して DPA 添加薬剤の MIC の低下を検出することで MBL の検出が可能である。今回我々は MIC の低下倍数のカットオフ値についても検討する目的で、MIC が 4 倍以上低下した場合、8 倍以上低下した場合の MBL 検出率を算出した。結果、MIC が 4 倍以上低下した株を MBL 産生陽性と定義した場合の MBL 検出率は、8 倍以上低下した場合と比較して CAZ で 13.9%、IPM で 18.6%、MEPM で 9.3% 向上した。一方、MBL 産生菌以外の CPE および non-CPE は、いずれの定義においても MBL 産生陽性と判定された株は存在しなかった。Kimura らは、MBL 産生緑膿菌 13 株および MBL 非産生緑膿菌 8 株を用いて、DPA を用いた微量液体希釈法の MBL 検出精度を評価し、単剤の MIC と比較して DPA 添加薬剤の MIC が 8 倍以上低下した株数は、MBL 産生株では CAZ および MEPM で 13 株 (100%)、IPM で 12 株 (92%) であり、MBL 非産生株はいずれの薬剤においても 8 倍以上の MIC 低下を認めず、そのうち 4 倍の MIC 低下を示したのは 1 株のみであったことを報告している<sup>7)</sup>。本検討においても、4 倍以上の MIC 低下を MBL 産生陽性とした場合も高い特異度を有していたことから、4 倍以上の MIC 低下をカットオフ値とした場合も高い精度で MBL を検出できると考えられる。

各 3 薬剤の MBL 検出率 (4 倍以上の MIC 低下をカットオフ値とした場合) のうち、IPM は 55.8% と低値であった。これは、本検討で用いた MBL 産生菌 43 株のうち 15 株 (34.9%) が IPM に感性を示す IMP-6 産生株であることが原因と考えられる。一方、MEPM の MBL 検出率は 90.7% と良好であり、MEPM では全ての IMP-6 産生株が MBL 産生陽性と判

定可能であった。ただし、IPM 単独で検出された MBL 産生菌も 2 株 (いずれも VIM 型) 存在し、MEPM 単独の検出率よりも 3 薬剤中いずれか 1 薬剤以上での検出率 (95.3%) の方が高いことから、複数の薬剤を用いることでより精度良く MBL を検出できると考えられる。また、いずれの薬剤においても 4 倍以上の MIC 低下を示さず偽陰性となった MBL 産生菌は 2 株存在した (*bla<sub>VIM-2</sub>* 保有 *E. cloacae* 1 株, *bla<sub>IMP-1</sub>* 保有 *K. aerogenes* 1 株)。今回検討した EPG1 において、MEPM, IPM の各 DPA 添加ウェルの最小濃度は 1 µg/mL であり、4 倍以上の MIC 低下をカットオフ値とした場合は 4 µg/mL 以上の MIC を示す株において MBL の検出が可能となる。偽陰性となった 2 株は、MEPM の MIC はそれぞれ 0.25 µg/mL, 2 µg/mL, IPM の MIC はいずれも 1 µg/mL であり、カルバペネム系抗菌薬の MIC が低値であったことが第一の要因と考えられる。他の要因としては、MBL 以外の β-ラクタマーゼや外膜蛋白の変異・欠損の影響が挙げられる。今回、外膜蛋白については検討できておらずその影響は不明であるが、SMA を用いた DDST および CLSI 推奨の CPE 検出法である modified carbapenemase inactivation method (mCIM) にて 2 株とも陽性を示し (結果未記載)、MBL 型のカルバペネマーゼ産生株であることを確認できた。また、この 2 株は DPA 存在下で CAZ に高度耐性を示していた。いずれも AmpC 型 β-ラクタマーゼを産生する株であることから、MBL と同時に染色体性 AmpC 型 β-ラクタマーゼを産生していたことにより CAZ において DPA の阻害効果が得られなかったことが第二の要因として考えられる。今回の偽陰性株のように、DPA による MBL 産生性の判定が陰性であっても、MEPM の MIC が 0.25 µg/mL 以上を示した場合は mCIM などの他の確認検査と組み合わせることで MBL の検出が可能と考えられる。

以上より、DPS192iX 用薬剤感受性プレート EPG1 は、MIC 測定精度が良好で、薬剤感受性検査終了と同時に MBL 産生菌の確定が可能であり、日常検査に有用であることが示唆された。

## 文 献

- Mathers, A. J., G. Peirano, J. D. D. Pitout. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 28: 565-591.
- Van Duin, D., D. L. Paterson. 2016. Multidrug resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 30: 377-390.
- Patrice, N., T. Naas, L. Poirel. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1791-1798.
- Codjoe, F. S., E. S. Donkor. 2018. Carbapenem resistance: a review. *Med. Sci. (Basel)*. 6: 1.
- 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.
- Hattori, T., K. Kawamura, Y. Arakawa. 2013. Comparison of test methods for detecting metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 512-518.
- Kimura, S., Y. Ishii, K. Yamaguchi. 2005. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53: 241-244.
- 日本臨床微生物学会検査法ガイド等作成委員会・耐性菌検査法ガイド作成作業部会編. 2017. 耐性菌検査法ガイド, 日本臨床微生物学会, 東京.
- Fattouh, R., N. Tijet, A. McGeer, et al. 2015. What is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in low-prevalence settings? *Antimicrob. Agents. Chemother.* 60: 1556-1559.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0.
- US FDA: Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidelines for industry and FDA. Rockville, MD: US FDA, 2007. <https://www.fda.gov/medical-devices/guidance-documents-medical-devices-and-radiation-emitting-products/antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems-class-ii-special-controls-guidance-industry-and-fda> 2021 年 12 月 15 日現在.
- 小林沙織, 中村竜也, 楠木まり, 他. 2017. DPS192iX を使用した Extended Spectrum β-lactamase 産生菌の迅速検出に関する検討. *医学検査* 66: 649-655.

## Evaluation of DPS192iX EPG1 panel for antimicrobial susceptibility testing of $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriales* and diagnostic accuracy of metallo- $\beta$ -lactamase producers

Sayaka Matsumoto<sup>1)</sup>, Kenichiro Ohnuma<sup>1) 2)</sup>, Masako Nishida<sup>1)</sup>, Mari Kusuki<sup>1) 2)</sup>, Nami Ishida<sup>1)</sup>, Saori Kobayashi<sup>1)</sup>, Keisuke Nishikawa<sup>1)</sup>, Goh Ohji<sup>1) 2) 3)</sup>, Takayuki Miyara<sup>2)</sup>, Takamitsu Imanishi<sup>1)</sup>, Yoshihiko Yano<sup>1) 4)</sup>

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

<sup>2)</sup>Department of Infection Prevention and Control, Kobe University Hospital

<sup>3)</sup>Division of Infectious Diseases Therapeutics, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine

<sup>4)</sup>Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

The spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) is a global threat to public health. Antimicrobial susceptibility testing (AST) results are necessary for optimal antibiotic management and infection control. In addition, because IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) is a dominant type of carbapenemase in Japan, a simple and accurate method for detecting MBL producers is required. In this study, using 110 strains of  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriales* (including 54 CPEs), we evaluated the performance of a DPS192iX EPG1 panel containing wells in which dipicolinic acid (DPA) was added and its accuracy in detecting MBL producers. The antimicrobial susceptibility of 54 CPEs and 56 non-CPEs was measured using EPG1 and compared with that of dry plate 'Eiken' (DP) as the reference method. The MIC essential agreements were 86.4%-100%, and the categorical agreements were 82.7%-100%. Furthermore, the detection rate of MBL producers defined as positive when the MICs of ceftazidime, imipenem, and meropenem containing DPA decreased by four times or more compared with that without DPA was 95.3%. Eleven CPEs except for MBL producers and 56 non-CPEs were determined as negative. Thus, AST using the DPS192iX system EPG1 panel may be useful for detecting MBL producers in clinical microbiology laboratories.