

[短 報]

Polymyxin B nonapeptide を用いたカルバペネム低感受性腸内細菌目細菌における
抗菌薬膜透過性低下の検出

相原正宗¹⁾²⁾・柳澤由佳子¹⁾・西凜佳子³⁾・山下有加¹⁾

木部泰志¹⁾・清祐麻紀子¹⁾・堀田多恵子¹⁾

¹⁾九州大学病院検査部

²⁾九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野

³⁾産業医科大学病院臨床検査・輸血部

(令和5年4月6日受付, 令和5年6月9日受理)

本邦のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales, CRE) の多くは抗菌薬の流入低下が原因となりカルバペネム耐性を獲得していると推測される。しかし, 抗菌薬膜透過性の低下を調べる検査法は確立されておらず, その実態は不明である。私たちは膜透過性亢進作用のある polymyxin B nonapeptide (PMBN) に着目し, 128 µg/mL PMBN の存在下で CRE のメロペネム MIC が最大 32 倍低下することを確認した。本条件を当院で分離されたメロペネム低感受性腸内細菌目細菌に適応したところ, modified carbapenem inactivation method (mCIM) 陽性群に比べ mCIM 陰性群で抗菌薬流入低下を示唆する株が有意に多いことが示された。本法は CRE の抗菌薬膜透過性低下を簡便に検出する検査法となる可能性がある。

Key words: CRE, CPE, polymyxin B nonapeptide, 抗菌薬膜透過性

序 文

薬剤耐性微生物の発生防止および拡散抑制は感染管理における重要課題のひとつである。カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (carbapenem-resistant Enterobacterales, CRE) は 2016 年より感染症法 5 類全数把握疾患の病原菌に位置付けられ, 発生動向調査が強化されている。CRE の主なカルバペネム耐性機構は i) カルバペネム系抗菌薬を分解基質とする加水分解酵素カルバペナーゼの産生, ii) 外膜局在タンパク質ポーリン等の発現変化や変異による抗菌薬の流入低下と考えられている¹⁾。2020 年の発生動向調査で集められた CRE を解析した報告によると, カルバペネナーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing Enterobacterales, CPE) の割合は届け出された CRE 全体の 17.4% であることが示されている²⁾。従って, 本邦における CRE の大多数は抗菌薬の膜透過性低下によるものと推測されるが, 抗菌薬膜透過性を評価する簡便な方法が確立されていないため, その疫学的な実態は不明である。

Polymyxin B nonapeptide (PMBN) は Polymyxin B (PB) のアミノシル基を除去することで抗菌活性を著しく減弱させた化合物である³⁾⁴⁾。PMBN は PB と同様にアンモニウム

基を介して Lipid A のリン酸基にイオン結合することで膜透過性を亢進させることが知られており, これを抗菌薬膜透過性低下の検出に応用した例が報告されている⁵⁾。本研究では PMBN を用いて抗菌薬膜透過性低下を検出する実験条件を確立し, 同条件を本院で検出されたメロペネム (Meropenem, MEPM) 低感受性腸内細菌目細菌に適応して抗菌薬膜透過性低下の検出を試みたため報告する。

材料と方法

菌株

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M-100 29th edition⁶⁾に従いカルバペネム耐性と判定され, modified carbapenem inactivation method (mCIM) 陰性腸内細菌目細菌 3 菌種の臨床分離株 (*Escherichia coli* (EsC), *Klebsiella aerogenes* (KaC), *Klebsiella pneumoniae* (KpC)) をそれぞれ 1 株ずつ選び, PMBN を用いたスクリーニング条件の検討に使用した。外膜タンパク質発現プロファイリングのコントロール株として, OmpF および OmpC のホモログである OmpK35 および OmpK36 の発現が既知の *K. pneumoniae* ATCC13883 を用いた⁷⁾。2016 年 4 月 1 日から 2021 年 3 月 31 日の間に当院検査部で分離され, かつ凍結保存されていた腸内細菌目細菌のうち, 四学会連携提案「カルバペネムに耐性化傾向を示す腸内細菌目細菌の問題 (2017)」⁸⁾を参照し, MEPM MIC ≥ 0.25 µg/mL を示したカルバペネム低感受性腸内細菌目細菌の初回分離株 (55 株) をスクリーニングの対象とし, カルバペネナーゼ産生の有無を mCIM により判定した。菌種の詳細は以下の通り; *E. coli*, 7 株 (うち mCIM 陽性 1 株); *K. pneumoniae*, 16 株 (うち mCIM 陽性 7 株);

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学
分野
相原正宗
TEL: 092-642-6716
FAX: 092-642-5772
E-mail: aihara.masamune.402@m.kyushu-u.ac.jp

Table 1. Verification of optimal additive concentration of polymyxin B nonapeptide.

PMBN ($\mu\text{g/mL}$)	EsC		KaC		KpC	
	MEPM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Fold	MEPM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Fold	MEPM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Fold
256	≤ 0.06	≥ 256	0.125	32	0.25	16
128	0.5	32	0.125	32	0.25	16
64	0.5	32	0.25	16	0.25	16
32	1	16	0.25	16	0.5	8
16	2	8	0.5	8	1	4
0	16	-	4	-	4	-

The chemical and antibiotic are abbreviated as follows; PMBN, polymyxin B nonapeptide; MEPM, meropenem.

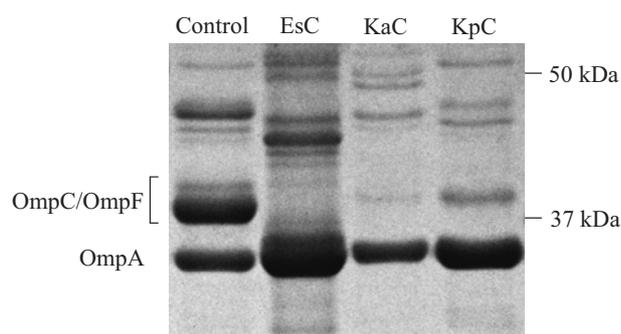


Figure 1. CBB staining of outer membrane proteins isolated from *K. pneumoniae* ATCC13883 (Control), EsC, KaC and KpC. OmpC, OmpF and OmpA are labelled in the panel.

K. aerogenes, 5株 (うち mCIM 陽性 1 株); *Klebsiella oxytoca*, 3株 (うち mCIM 陽性 2 株); *Enterobacter cloacae* complex, 19株 (うち mCIM 陽性 12 株); *Serratia marcescens*, 3株 (うち mCIM 陽性 3 株); *Citrobacter freundii* complex, 1株 (うち mCIM 陽性 1 株); *Raoultella planticola*, 1株 (うち mCIM 陽性 0 株)。全 55 株のうち mCIM 陽性は 27 株, mCIM 陰性は 28 株であった。

外膜タンパク質発現プロファイリング

Lysogeny broth を用いて 37°C で培養した EsC, KaC, KpC を 10 mM Tris-Mg²⁺バッファーで懸濁し, 菌体を超音波破碎した。超遠心 (100,000 g, 1 時間, 25°C) で得たペレットを 2% N-lauroylsarcosine (ナカライテスク) 含有 10 mM Tris-Mg²⁺バッファーで洗浄後, 再度同条件の超遠心を行うことで外膜を回収した。外膜タンパク質は 11% ポリアクリルアミドゲルで分離後, ペレット CBB ステインワン (ナカライテスク) で染色し, iBright imaging system (Thermo Fisher Scientific) を用いて撮像した。

薬剤感受性試験

MEPM (住友ファーマ) および PMBN (polymyxin B nonapeptide hydrochloride, Sigma-Aldrich) はミューラーヒントンプイオン (栄研化学) を用いて 2 倍希釈系列を作製し, CLSI M-100 29th edition⁶⁾ に準拠した微量液体希釈法 (35°C, 好気条件, 18±2 時間) により EsC, KaC, KpC の各 MIC を測定した。Table 1 に示す一定濃度の PMBN を MEPM 希釈系列に添加し, EsC, KaC, KpC を対象に MEPM MIC

を測定した後, PMBN 未添加条件における MEPM MIC との差を算出した。55 株を対象としたスクリーニングでは, MEPM の希釈系列に対し最終濃度 128 $\mu\text{g/mL}$ の PMBN を添加し, PMBN 添加/未添加条件における MEPM MIC の差を算出した。PMBN 添加/未添加による MEPM MIC の差が 2 倍 (± 1 管差) 以内を essential agreement (EA), 4 倍 (± 2 管差) を technical uncertainty (TU), ≥ 8 倍 (≥ 3 管差) を disagreement (D) とし, D の場合のみ抗菌薬膜透過性低下と判定した。PMBN の作用を間接的に評価するため, Etest (バイオメリュール・ジャパン) を用いて各株の PB の MIC を添付文書に従い測定した。mCIM 陽性群と同陰性群における EA と D の菌株数を用いて χ^2 乗検定により両群の独立性を検定した。

倫理的配慮

本研究の実施は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会で承認を得ている (承認番号: 21013-00)。

結 果

PMBN の至適添加濃度の検討

まず, EsC, KaC, KpC が抗菌薬膜透過性低下に起因する CRE か確認するため, 外膜タンパク質の発現プロファイリングを行った。抗菌薬流入に関わる主要ポーリンである OmpC ホモログおよび OmpF ホモログの発現が既に確認されているコントロール株に比べ, EsC, KaC, KpC の 3 株では同じ分子量帯のタンパク質発現が著しく減少していた (Figure 1)。したがって, この 3 株は外膜ポーリンの発現量減少により抗菌薬膜透過性が低下した CRE と推測され, PMBN の至適添加濃度の検討に適した株であると判断した。

つぎに, PMBN 添加の上限濃度を確認するため, EsC, KaC, KpC の PMBN MIC を測定した。各株の PMBN MIC はそれぞれ 512 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$ と判定され (Figure 2), いずれの菌種においても PMBN に対し高い MIC を示すことが確認された。

膜透過性を亢進させる PMBN の至適添加濃度を明らかにするため, EsC, KaC, KpC の 3 株で発育が確認された 256 $\mu\text{g/mL}$ 以下の PMBN を添加し, MEPM MIC を測定した (Table 1)。EsC では 256 $\mu\text{g/mL}$ PMBN を添加した MEPM 希釈系列において菌の発育を認めなかった (Table 1)。Figure 1 に示すように, 256 $\mu\text{g/mL}$ PMBN 存在下において EsC の発育は微弱であり, MEPM との併用により更なる発育阻害

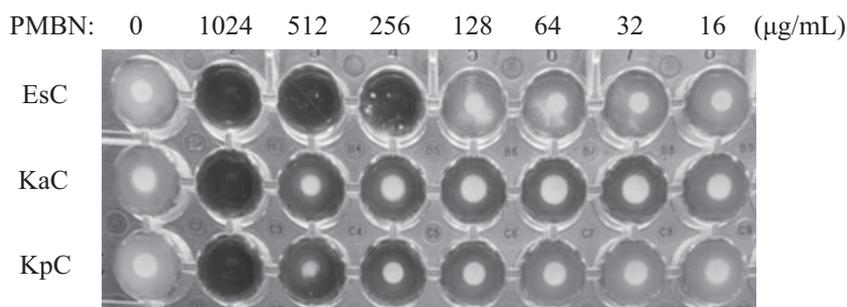


Figure 2. Susceptibilities of EsC, KaC and KpC to polymyxin B nonapeptide (PMBN). The panel shows the visible growth of each isolate at the time of determining PMBN MIC.

が引き起こされた可能性がある。256 µg/mLを除くと、128 µg/mLおよび64 µg/mL PMBN存在下においてMEPM MICが0.5 µg/mLと最も低い値を示し、PMBN未添加に比べMEPM MICが32倍低下していた (Table 1)。KaCでは128 µg/mLおよび256 µg/mL PMBN存在下において、MEPM MICが32倍低下していた (Table 1)。KpCでは64 µg/mLから256 µg/mLのPMBN存在下において、MEPM MICが16倍低下していた (Table 1)。3菌種すべてにおいてPMBNの添加濃度が高くなるにつれてMEPM MICは低下する傾向にあった。PMBNによる発育阻害を考慮し、抗菌薬膜透過性低下を検出するPMBNの至適添加濃度は128 µg/mLと判断した。

カルバペネム低感受性腸内細菌目細菌を対象とした抗菌薬膜透過性低下の検出

カルバペネム低感受性腸内細菌目細菌55株は全てPMBN 128 µg/mL存在下で発育コントロールウェルと同等の菌の発育を認めており (data not shown)、同濃度のPMBNによる発育阻害は確認されなかった。

PMBNの結合が阻害されている場合、被検菌の抗菌薬膜透過性が低下していたとしてもPMBN添加/未添加条件におけるMEPM MICに差が認められず、EAと誤判定される可能性がある。この誤判定を回避するため、Etestを用いてPBのMICを測定し、PMBNによる膜透過性亢進作用の可否を間接的に評価した。PBに自然耐性を示す*S. marcescens* 3株 (SmP1, SmP2, SmP3)に加え、*K. pneumoniae* 2株 (KpP1, KpN3)、*E. cloacae* complex 1株 (EnN1)の計6株でPB MICが8 µg/mL以上を示した (Table 2)。CLSIで推奨されている測定法とは異なるが、この6株はPB耐性のブレイクポイントである4 µg/mLを上回っていたため、本スクリーニングでは評価の対象外とした。

残り49株のPMBN添加/未添加条件におけるMEPM MICおよびその差をTable 2に示した。49株のうちTUと判定されたのは*E. cloacae* complexの1株 (EnP6)のみであった。この1株を除いたmCIM陽性22株のうちEAと判定された株は19株、Dと判定された株は3株であり、抗菌薬膜透過性低下を示唆する株の割合は14% (3株/22株)と低い傾向にあった (Table 3)。一方、mCIM陰性26株のうちEAと判定された株は6株、Dと判定された株は20株であり、抗菌薬膜透過性低下を示唆する株の割合は77% (20株/26株)と高い傾向にあった (Table 3)。また、mCIM陽

性群とmCIM陰性群で χ^2 二乗検定を行ったところ有意な差を認めため ($p < 0.01$)、mCIM陰性群ではmCIM陽性群に比べ抗菌薬膜透過性低下を示唆する株が有意に多いことが確認された。

考 察

CPEを除いたCREにおけるカルバペネム耐性の多くは基質拡張型 β ラクタマーゼやAmpC型 β ラクタマーゼの産生に抗菌薬膜透過性低下が組み合わさることで獲得されている⁹⁾。抗菌薬の流入低下は、菌体から外膜タンパク質を精製し、それらの発現量をプロファイリングする方法、あるいは各外膜ポーリン遺伝子およびそれらの発現を制御する遺伝子の配列解析を行うことで推測することは可能である⁷⁾¹⁰⁾。しかし、これらの解析法は煩雑であり汎用性に乏しく、検査室での実施は困難である。私たちはPMBNを用いることで抗菌薬膜透過性低下を簡便に検出する方法を確立し、カルバペネム低感受性腸内細菌目細菌を対象にスクリーニングを行った。腸内細菌目細菌の中で臨床分離頻度の高い*E. coli*に加え、sequence type 258に代表されるようにカルバペネマーゼ産生株が世界的に蔓延している*K. pneumoniae*と本邦でCREとして最も届出されている*K. aerogenes*²⁾の3菌種を対象に最適化したPMBNの濃度条件を用いてスクリーニングを行ったところ、検討を行った3菌種以外の菌種においてもDと判定される株が存在し、また、最終的に解析対象となった49株のうちTUと判定された株は1株のみであった。これらの結果より、本条件は腸内細菌目細菌における多くの菌種の抗菌薬膜透過性低下の検出に適応可能であることが示唆された。ポリミキシン系抗菌薬に自然耐性を示す菌種は本法の解析対象とはならないが、CREとして届け出された上位菌種はそれに該当せず²⁾、従って、検査室で分離された大多数のCREが本法の解析対象になると考えられる。近年、コリスチン耐性を含む多剤耐性菌が世界各地で検出されており¹¹⁾、本スクリーニングの対象株の中にもポリミキシン系抗菌薬に自然耐性ではないもののPBに高いMICを示す3株が含まれていた。これらは*mcr*遺伝子の獲得やPhoP-PhoQなどのtwo-component regulatory systemの活性化によりLipid Aのリン酸基に4-amino-4-deoxy-L-arabinoseやphosphoethanolamineの修飾を受けていると推測される¹²⁾。本法を実施する際には、PBの薬剤感受性検査を同時に実施しPMBNの結合性を間接的に評価することで結果の誤判定を

Table 2. Results of screening for detecting decreased drug permeability using polymyxin B nonapeptide.

mCIM	Taxonomy	Name	PB MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MEPM MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Fold	Definition		
				without PMBN	with PMBN				
positive	<i>E. coli</i>	EsP1	0.5	32	16	2	EA		
		<i>K. pneumoniae</i>	KpP1	8	>64	>64	1	-	
	KpP2		1	0.5	0.25	2	EA		
	KpP3		0.5	4	4	1	EA		
	KpP4		0.5	2	1	2	EA		
	KpP5		1	1	2	2	EA		
	KpP6		0.5	4	0.25	16	D		
	KpP7		0.5	1	0.5	2	EA		
	<i>K. aerogenes</i>	KaP1	0.5	32	4	8	D		
	<i>K. oxytoca</i>	KoP1	0.5	2	1	2	EA		
		KoP2	0.5	0.5	1	2	EA		
	<i>E. cloacae</i> complex	EnP1-EnP12	EnP1	0.25	2	0.12	16	D	
			EnP2	0.5	0.5	0.5	1	EA	
			EnP3	0.5	2	1	2	EA	
			EnP4	0.5	2	1	2	EA	
			EnP5	0.5	2	2	1	EA	
			EnP6	0.5	2	0.5	4	TU	
			EnP7	0.5	2	2	1	EA	
			EnP8	0.25	0.5	0.5	1	EA	
			EnP9	0.5	4	4	1	EA	
			EnP10	0.5	0.5	0.25	2	EA	
			EnP11	0.5	0.5	0.5	1	EA	
			EnP12	0.5	1	1	1	EA	
	<i>S. marcescens</i>	SmP1-SmP3	SmP1	>64	4	4	1	-	
			SmP2	>64	4	8	2	-	
			SmP3	>64	8	8	1	-	
	<i>C. freundii</i> complex	CfP1	1	0.25	0.12	2	EA		
	negative	<i>E. coli</i>	EsN1	0.5	4	0.06	64	D	
			EsN2	1	0.25	≤ 0.01	≥ 16	D	
			EsN3	1	2	0.06	32	D	
			EsN4	0.5	0.25	≤ 0.01	≥ 16	D	
			EsN5	0.5	0.5	0.06	8	D	
			EsN6	1	8	0.5	16	D	
		<i>K. pneumoniae</i>	KpN1-KpN9	KpN1	0.5	8	4	2	EA
				KpN2	0.5	2	0.25	8	D
				KpN3	8	8	8	1	-
				KpN4	0.5	0.5	1	2	EA
				KpN5	0.5	0.5	0.03	16	D
				KpN6	1	2	0.25	8	D
				KpN7	0.5	8	1	8	D
				KpN8	0.5	32	1	32	D
				KpN9	0.5	2	1	2	EA
		<i>K. aerogenes</i>	KaN1-KaN4	KaN1	0.5	8	0.5	16	D
				KaN2	0.25	8	0.12	64	D
				KaN3	1	1	≤ 0.01	≥ 64	D
				KaN4	0.5	2	0.12	16	D
		<i>K. oxytoca</i>	KoN1	1	1	0.12	8	D	
<i>E. cloacae</i> complex		EnN1-EnN7	EnN1	64	2	2	1	-	
			EnN2	0.12	1	2	2	EA	
			EnN3	0.5	1	1	1	EA	
			EnN4	0.5	0.5	≤ 0.01	≥ 32	D	
			EnN5	0.5	1	0.06	16	D	
			EnN6	0.5	1	0.12	8	D	
			EnN7	0.5	0.25	0.12	2	EA	
<i>R. planticola</i>		RpN1	0.5	64	4	16	D		

The test, antibiotics, chemical and definitions are abbreviated as follows; mCIM, modified carbapenem inactivation method; PB, polymyxin B; PMBN, polymyxin B nonapeptide; MEPM, meropenem; EA, essential agreement; TU, technical uncertainty; D, disagreement.

Table 3. Summary of numbers of isolates defined as essential agreement (EA) or disagreement (D).

	Number	
	EA	D
mCIM positive (n=22)	19	3
mCIM negative (n=26)	6	20

防ぐことが可能になる。

最終的に解析対象となった mCIM 陽性 22 株のうち 3 株 (KpP6, KaP1, EnP1) は抗菌薬膜透過性の低下が示唆された (Table 3)。これら 3 株は全てメルカプト酢酸ナトリウムを用いた double disk synergy test により阻止円の拡張を認めためメタロ β ラクターマーゼを産生していたと推測されるが、更に抗菌薬膜透過性低下を付与することでより高度な耐性を獲得していたと考えられる。mCIM 陰性 26 株のうち本法で D と判定されたのは 20 株であり、本スクリーニングにおける mCIM 陰性株では抗菌薬膜透過性低下が主なカルバペネム低感受性の原因になっていることが推測された。一方、残りの 6 株は PB MIC が低いにも関わらず EA と判定され、これらは抗菌薬膜透過性低下とは異なる機序でカルバペネム低感受性を獲得した可能性がある。近年、薬剤耐性に炭素源の代謝変化や菌形態の変化など新たな因子が関与していることが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。これら 6 株がカルバペネム低感受性を獲得した機構を明らかにするためには更なる解析が必要である。

本法は PMBN 添加の有無による MEPM MIC の差を算出する表現型検査であり、スクリーニング対象株が抗菌薬膜透過性低下に至った原因は追求できていない。本スクリーニングの結果に外膜タンパク質の発現プロファイリングやゲノム解析等を補完することでより強固な疫学調査になると考えられる。

本法は腸内細菌目細菌における抗菌薬膜透過性低下を簡便に検出する新たな検査法であり、検査室における詳細な薬剤耐性機序解明の一助となる可能性がある。

謝辞：本研究に協力いただいた九州大学病院検査部の皆様に深謝します。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) 原田壮平. 2021. 薬剤耐性腸内細菌目細菌の基礎と疫学 Update. 日臨微誌 31: 229-238.
- 2) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2020 年.

国立感染症研究所.

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-iasrd/11520-511d01.html> 2023 年 3 月 1 日現在.

- 3) Chihara, S., T. Tobita, M. Yahata, et al. 1973. Enzymatic Degradation of Colistin Isolation and Identification of α-N-acetyl α,γ-Diaminobutyric Acid and Colistin Nonapeptide. Agric. Biol. Chem. 37: 2455-2463.
- 4) Duwe, A. K., C. A. Rupar, G. B. Horsman, et al. 1986. In Vitro Cytotoxicity and Antibiotic Activity of Polymyxin B Nonapeptide. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 340-341.
- 5) Pinet, E., C. Franceschi, V. Collin, et al. 2020. A simple phenotypic test for detecting the contribution of outer membrane permeability to carbapenem resistance. J Med Microbiol. 69: 63-71.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: CLSI M100 edition 29. 2019. Clinical and Laboratory Standards Institute. https://www.kansensho.or.jp/modules/guidelines/index.php?content_id=16 2023 年 3 月 1 日現在.
- 7) Aihara, M., R. Nishida, M. Akimoto, et al. 2021. Within-host evolution of a *Klebsiella pneumoniae* clone : Selected mutations associated with the alteration of outer membrane protein expression conferred multidrug resistance. J. Antimicrob. Chemother. 76: 362-369.
- 8) 日本感染症学会. 2017. 四学会連携提案 カルバペネムに耐性化傾向を示す腸内細菌科細菌の問題 (2017) —カルバペネマーゼ産生菌を対象とした感染対策の重要性—.
- 9) Nordmann, P., M. Gniadkowski, C.G. Giske, et al. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin. Microbiol. Infect. 18: 432-438.
- 10) Yoshino, M., M. Aihara, Y. Gotoh, et al. 2021. Stepwise Evolution of a *Klebsiella pneumoniae* Clone within a Host Leading to Increased Multidrug Resistance. mSphere 6: e0073421.
- 11) El-Sayed Ahmed, M.A.E., L.L. Zhong, C. Shen, et al. 2020. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). Emerg. Microbes Infect. 868-885.
- 12) Aghapour, Z., P. Gholizadeh, K. Ganbarov, et al. 2019. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. Infect. Drug Resist. 12: 965-975.
- 13) Lopatkin, A.J., S.C. Bening, A.L. Manson, et al. 2021. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance. Science 371 (6531): eaba0862.
- 14) Ojckic, N., D. Serbanescu, S. Banerjee. 2022. Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting. mBio 13: e0065922.

Detection of decreased permeability in Enterobacterales with reduced susceptibility to carbapenem using polymyxin B nonapeptide

Masamune Aihara^{1) 2)}, Yukako Yanagisawa¹⁾, Rikako Nishi³⁾, Yuka Yamashita¹⁾, Yasushi Kibe¹⁾,
Makiko Kiyosuke¹⁾, Taeko Hotta¹⁾

¹⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

²⁾Department of Health Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

³⁾Department of Laboratory Medicine, Hospital of The University of Occupational and Environmental Health

Most carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) in Japan would acquire resistance to carbapenems through decreased permeation of antimicrobials. However, since there are no clinical tests available to detect drug permeabilities, the mechanisms of decreased susceptibility to carbapenem in clinical isolates remain fully unexplored. We focused on polymyxin B nonapeptide (PMBN), which is known to increase in membrane permeability, and found that the meropenem MICs of CRE were reduced by up to 32-fold in the presence of 128 µg/mL PMBN. By using this condition, we demonstrated that significantly more isolates in the modified carbapenem inactivation method (mCIM)-negative CRE group had decreased meropenem MIC in the presence of PMBN than in the mCIM-positive CRE group. This method could potentially facilitate the detection of decreased permeabilities in Enterobacterales with reduced susceptibility to carbapenem.