

[短 報]

Klebsiella pneumoniae と *Klebsiella variicola* のアドニット分解能と薬剤感受性の比較

黒沢未希¹⁾・大野達也²⁾・大柳忠智¹⁾・高橋儀行¹⁾・田中洋輔²⁾

安西桃子²⁾・高野知憲³⁾・國島広之³⁾・竹村 弘⁴⁾

¹⁾ 聖マリアンナ医科大学病院臨床検査技術部

²⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部

³⁾ 聖マリアンナ医科大学感染症学講座

⁴⁾ 聖マリアンナ医科大学微生物学教室

(令和5年6月25日受付, 令和5年12月7日受理)

Klebsiella pneumoniae complex には, *K. pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella africanensis* の4菌種が含まれている。今回, 血液培養陽性検体から検出された *K. pneumoniae* complex について質量分析装置で再同定を行い, *K. pneumoniae* と *K. variicola* の2菌種について, アドニット分解能と薬剤感受性試験の2法を用いることにより菌種同定が可能かどうか検討を行った。アドニット分解能陰性かつ ampicillin ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$ を示した 42/43 株 (97.8%) が *K. variicola* であり, 推測可能と考えるが, 17/59 株 (28.8%) が鑑別できず有用な鑑別基準とならなかった。*K. variicola* の正確な同定には, PCR や *Klebsiella* MALDI TypeR などの Web ツールと同様に質量分析装置が有用である。

Key words: *Klebsiella pneumoniae* complex, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, アドニット分解能, 薬剤感受性

序 文

Klebsiella variicola は2004年にRosenbluethらによって新種の*Klebsiella*属菌として*rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *inhB*, *phoE*, *nifH*の各遺伝子配列から得られた系統解析, 表現型に基づいて報告された¹⁾。現在, *Klebsiella pneumoniae* complex には, *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola*, *K. variicola* subsp. *tropicalensis*, *K. africanensis*が含まれている。この中で, *K. variicola* と *K. quasipneumoniae* は *K. pneumoniae* と同様に尿路感染, 腹腔内感染, 敗血症を引き起こすことが報告されている^{2)~4)}。特に, *K. variicola* 感染症は *K. pneumoniae* 感染症と比較し高い30日死亡率を認めた報告²⁾や重症感染症の報告⁵⁾があり注目されている。これらの菌種は従来の生化学的性状による同定では, *K. pneumoniae* と誤同定されるため, 過去の*K. pneumoniae*に関する報告にはこれらの類縁菌が一定数含まれていたと考えられる。既報により, アドニット分解能は *K. pneumoniae* は陽性(黄色呈色), *K. variicola* は陰性(紫色)を示す鑑別方法が報告されている⁶⁾⁷⁾。今回我々は, *K. pneumoniae* と *K. variicola* の2菌種について, アドニット分解能と薬剤感受性試験の2法を用いることにより菌

種同定が可能かどうか検討を行った。

対象及び方法

1. 対象

2018年1月から2021年6月に聖マリアンナ医科大学病院および聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院で, 血液培養陽性検体から*K. pneumoniae*および*K. variicola*を検出した245症例247株を対象とした。期間中重複した患者から検出した株は1株目を対象とし, 2株目以降は検討から除外した。期間中に異なる菌種を検出した2症例, 4株は検討対象とした。

2. 方法

1) 同定

質量分析装置MALDI Biotyper (ブルカー・ジャパン株式会社)を用いてMALDI Biotyper リファレンスライブラリ (Ver. 9.0) で同定検査を実施した。セルスマ法で実施し, score 2.0未満の株に関してはオンプレートギ酸抽出法で再検査を実施した。最も上位に挙げられた菌種を同定菌とした。ただし, MALDI Biotyperでは*K. quasipneumoniae*は現在のライブラリに菌種搭載されていないため表示されない。

2) アドニット分解能

ペプトン (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) 1.5 g, プロモクレゾールパープル (0.08%, シグマアルドリッチ ジャパン合同会社) 2.5 mL, アドニトール (10%, 東京化成工業株式会社) 5.0 mL に蒸留水を加えて100 mLとし, 高圧蒸気滅菌後に滅菌チューブに2 mLずつ分注した。被検菌を接種後, 37°C で一夜培養し, 紫色から黄色へ色調変化を認めれば陽性と判定した。陰性の場合是最長15日間観察

著者連絡先: (〒216-8511) 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
聖マリアンナ医科大学病院臨床検査技術部
黒沢未希
TEL: 044-977-8111
FAX: 044-975-9509
E-mail: m-kuro@marianna-u.ac.jp

Table 1. Results of antimicrobial susceptibility test against *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola*.

antimicrobial agents	number of susceptible strain (%)		P-value
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. variicola</i>	
ampicillin*	8/188 (4.3)	15/59 (25.4)	<0.01
piperacillin	99/187 (52.9)	52/59 (88.1)	<0.01
sulbactam/ampicillin	161/188 (85.6)	59/59 (100)	<0.01
clavulanic acid/amoxicillin	166/177 (93.8)	58/58 (100)	0.06
tazobactam/piperacillin	182/188 (96.8)	59/59 (100)	0.34
cefazolin	150/171 (87.7)	49/50 (98.0)	0.03
cefaclor	176/188 (93.6)	59/59 (100)	0.07
cefmetazole	187/188 (99.5)	59/59 (100)	1
cefotaxime	179/188 (95.2)	59/59 (100)	0.11
ceftriaxone	178/188 (94.7)	59/59 (100)	0.12
ceftazidime	181/188 (96.3)	59/59 (100)	0.2
cefpodoxime proxetil	167/177 (94.4)	58/58 (100)	0.07
cefepime	180/188 (95.7)	59/59 (100)	0.2
imipenem	186/188 (98.9)	59/59 (100)	1
meropenem	187/188 (99.5)	59/59 (100)	1
aztreonam	181/188 (96.3)	59/59 (100)	0.2
amikacin	188/188 (100)	59/59 (100)	1
gentamicin	181/188 (96.3)	59/59 (100)	0.2
minocycline	168/188 (89.4)	55/59 (93.2)	0.45
ciprofloxacin	170/177 (96.0)	57/58 (98.3)	0.68
levofloxacin	185/188 (98.4)	59/59 (100)	1
sulfamethoxazole-trimethoprim	161/188 (85.6)	58/59 (98.3)	<0.01
β -lactamase production			
Extended-spectrum β -lactamase-producing strains	8/188 (4.3)	0/59 (0.0)	0.2
AmpC β -lactamase-producing strains	2/188 (1.1)	0/59 (0.0)	1
Carbapenemase-producing strains	0/188 (0.0)	0/59 (0.0)	1

According to CLSI document: M100-Ed31, P-value: results of Fisher's exact test.

* Intrinsic resistance

を継続した。Neg Combo EN3J パネルで測定を実施した 12 株において、同法と結果が一致するか事前検討を行った。

3) 薬剤感受性

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-Ed31[®]の方法に準拠し、微量液体希釈法(MIC 法)およびディスク拡散法(Disk 法)を実施した。MIC 法は、MicroScan WalkAway Neg ComboEN3J パネル, Neg MIC 1J パネル, Neg MIC EN2J パネル(ベックマン・コールター株式会社), Disk 法は KB ディスク(栄研化学株式会社)およびセンシ・ディスク(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を使用した。ESBL 産生および AmpC 産生確認試験は AmpC/ESBL 鑑別ディスク(関東化学株式会社), メタロ- β -ラクタマーゼ産生確認試験は SMA disk(栄研化学株式会社)を用いて実施した。

4) 統計手法

K. pneumoniae 群と *K. variicola* 群の 2 群間でアドニット分解能および MIC 法による各薬剤の薬剤感受性を Fisher の正確検定で比較した。*K. pneumoniae* 群と *K. variicola* 群の 2 群間で Disk 法による阻止円径を Wilcoxon の順位和検定で比較した。なお、有意水準は 1% とし、データの入力と解析には JMP Pro Ver. 15.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

を用いた。

結 果

1. 菌種同定の評価

K. pneumoniae は 188/247 株 (76.1%), *K. variicola* は 59/247 株 (23.9%) であった。検出状況は 2018 年 (*K. pneumoniae* 55 株, *K. variicola* 18 株), 2019 年 (*K. pneumoniae* 53 株, *K. variicola* 13 株), 2020 年 (*K. pneumoniae* 51 株, *K. variicola* 20 株), 2021 年 1-6 月 (*K. pneumoniae* 29 株, *K. variicola* 8 株) であった。

2. アドニット分解能

陽性は *K. pneumoniae* 178/188 株 (94.7%), *K. variicola* 7/59 株 (11.9%) であった ($p < 0.01$)。 *K. pneumoniae* では培養 2 日目に 8 株, 3 日目に 3 株, 5 日目に 1 株, 8 日目に 1 株が陽性となった。なお、事前検討として実施した 12 株では、Neg Combo EN3J パネルで測定した結果と 100% の一致率であった。

3. MIC 法を用いた薬剤感受性の評価 (Table 1, 2)

ampicillin (ABPC) [*K. pneumoniae* 8/188 株 (4.3%), *K. variicola* 15/59 株 (25.4%), $p < 0.01$], piperacillin (PIPC) [*K. pneumoniae* 99/188 株 (52.9%), *K. variicola* 52/59 株

(88.1%), $p < 0.01$], sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC) [*K. pneumoniae* 161/188 株 (85.6%), *K. variicola* 59/59 株 (100%), $p < 0.01$], sulfamethoxazole/trimethoprim (ST 合剤) [*K. pneumoniae* 161/188 株 (85.6%), *K. variicola* 58/59 株 (98.3%), $p < 0.01$] で, *K. pneumoniae* の感性率が有意に低かった。

4. Disk 法を用いた薬剤感受性の評価 (Fig. 1, 2)

ABPC, PIPC, AMPC, SBT/ABPC で阻止円径に有意差を認めた。また, AMPC ディスクでは阻止円径の違いが明瞭に鑑別でき, *K. pneumoniae* では阻止円を形成しない株が約 96% 存在した。*K. pneumoniae* では ESBL 産生菌 8 株, AmpC 産生菌 2 株が検出されたが, カルバペネマーゼ産生菌は検出されなかった。また, *K. variicola* ではこれらの多剤耐性菌は検出されなかった。

考 察

今回の検討では, 血液培養陽性検体 247 株中に *K. pneumo-*

niae 188 株 (76.1%), *K. variicola* 59 株 (23.9%) が検出された。これは国内外で行われた過去の報告と同様の分離率であった^{2)~4)}。生化学的性状に基づく同定試薬を使用している施設においても, *K. variicola* が日常的に分離される菌として認識する必要がある。*K. variicola* の検出状況に経年の変化はなく, 質量分析装置で同定が可能となる以前から一定数検出されていたと考える。

アドニット分解能は *K. pneumoniae* の 94.7% が陽性, *K. variicola* の 88.1% が陰性という結果であった。*K. variicola* が菌種登録された当初, アドニット分解能の違いが *K. pneumoniae* と *K. variicola* の鑑別点として報告されたが⁶⁾⁷⁾, その後の報告で必ずしもそうならないことが報告された⁹⁾¹⁰⁾。我々の検討においても *K. variicola* のうち 11.9% は陽性であり, アドニット分解能は菌種同定の鑑別法として用いることはできなかった。

薬剤感受性では, 過去の報告¹¹⁾¹²⁾と同様にペニシリン系薬と ST 合剤で有意に *K. variicola* の感性率が高かった。また, Disk 法において AMPC で有意に阻止円径の差を認めたが, CVA/AMPC で有意差がなくなったのに対して, ABPC, SBT/ABPC ではどちらも有意差を認めた。*K. pneumoniae* は SHV 型, *K. variicola* は LEN 型の β -ラクタマーゼ遺伝子を染色体に保有する¹³⁾。この β -ラクタマーゼ遺伝子の違いがペニシリン系薬の MIC 値や Disk 法の阻止円径に有意差を与えた原因と考える。酵素学的活性を比較した報告は過去にないが, *K. variicola* の保有する LEN 型 β -ラクタマーゼは SHV 型に比べてペニシリン系薬の分解能が低い可能性や産生量が少ない可能性が考えられる。同様に β -ラクタマーゼ遺伝子によって, β -ラクタマーゼ阻害薬による阻害能に違いがあることが示唆された。この薬剤感受性の違いは, *K.*

Table 2. Results of ampicillin susceptibility test and Adonitol hydrolysis test against *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola*.

		number of strains (%)			
		<i>K. pneumoniae</i> (n = 188)		<i>K. variicola</i> (n = 59)	
		adonitol hydrolysis			
		+	-	+	-
ampicillin MIC ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 16	20	1	4	42
	≥ 32	158	9	3	10

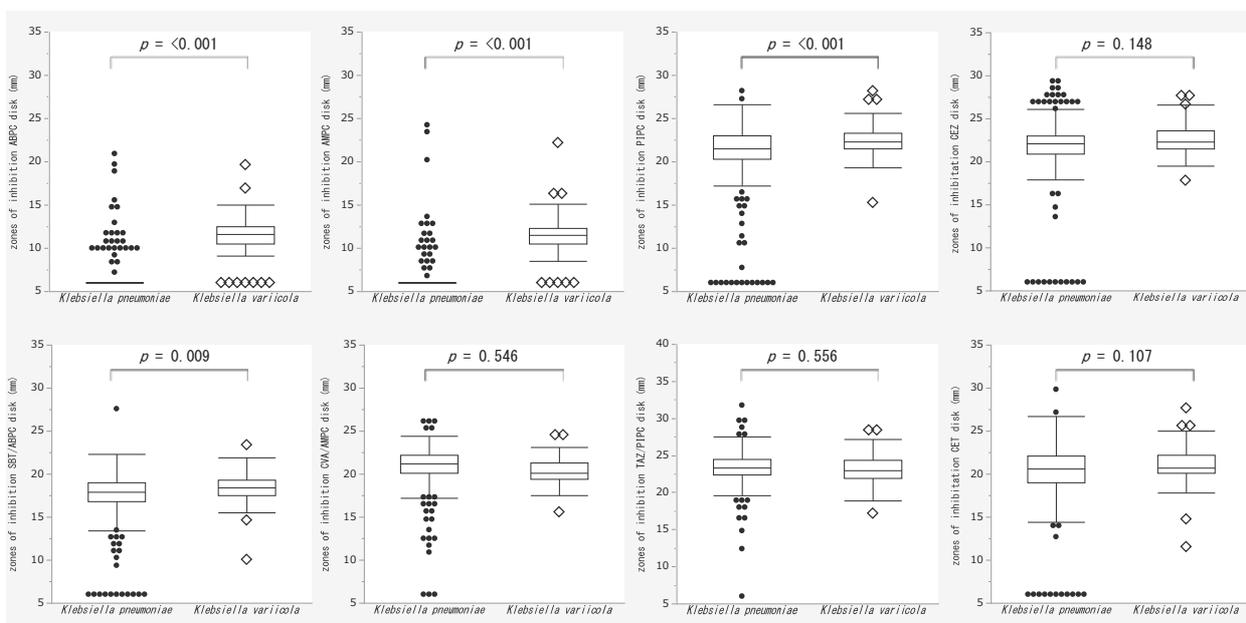


Figure 1. Comparison of zone diameters between *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* using the disk diffusion method. p -value; Wilcoxon rank-sum test

ABPC: ampicillin, AMPC: amoxicillin, PIPC: piperacillin, CEZ: cefazolin, SBT/ABPC: sulbactam/ampicillin, CVA/AMPC: clavulanic acid/amoxicillin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, CET: cefalotin.

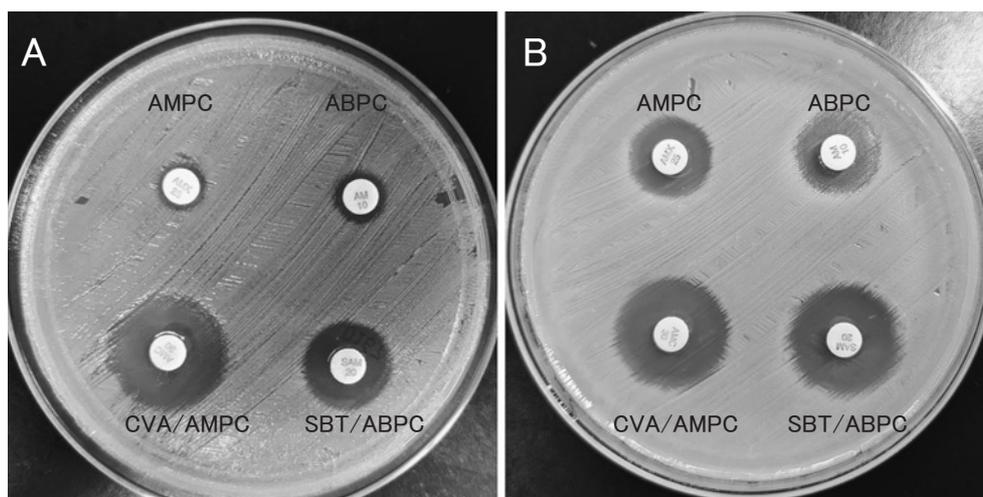


Figure 2. Zone diameter difference of penicillins between *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola*.

A. *Klebsiella pneumoniae*.

B. *Klebsiella variicola*.

ABPC: ampicillin, AMPC: amoxicillin, SBT/ABPC: sulbactam/ampicillin, CVA/AMPC: clavulanic acid/amoxicillin.

variicola を鑑別していない施設において *K. pneumoniae* complex の耐性率を過小評価することに繋がる可能性がある。今回の検討において、*K. variicola* の ESBL および AmpC 産生株は検出されなかった。しかし、検討期間中に尿由来の *K. variicola* で ESBL 産生株を検出している。過去にはバングラディッシュの新生児病棟で高病原性多剤耐性 *K. variicola* による致死的外出ブレイクが報告されており、薬剤耐性株の動向には注意が必要である¹⁴⁾。

そこで我々は、アドニット分解能と ABPC の MIC 値を併せて評価することにより *K. variicola* の鑑別ができるのではないかと考えた。Table 2 の結果からアドニット分解能陰性かつ ABPC ≤ 16 μg/mL を示した 42/43 株 (97.8%) が *K. variicola* であり、推測可能と考える。しかし、*K. variicola* の 42/59 株 (71.2%) で認められた性状であり感度が低いことに留意が必要である。国内の臨床検査室における質量分析装置の普及率は 20% 未満とされ、菌種同定の方法は自動分析装置を用いた生化学的性状による方法が主に行われている¹⁵⁾。質量分析装置による *K. variicola* の同定は PCR などの遺伝学的同定検査と同等の精度と報告されており¹¹⁾¹²⁾、検査室における同定には質量分析装置の導入が有用である。本検討の限界として、質量分析装置による同定に基づく検討のため *K. quasipneumoniae* の解析は実施できていない。*K. quasipneumoniae* は血液由来 *K. pneumoniae* complex の 6.5~10% で分離されることが報告^{2)~4)}されている。執筆時点の MALDI Biotyper リファレンスライブラリ (Ver.11.0) においても *K. quasipneumoniae* は含まれていないため、*K. pneumoniae* complex の正確な鑑別には β-ラクタマーゼ遺伝子を用いたマルチプレックス PCR¹³⁾ や、*Klebsiella* MALDI TypeR¹⁶⁾ などの Web ツールを用いる必要がある。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Rosenblueth, M, L Martinez, J Silva, et al. 2001. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. Syst Appl Microbiol 27 (1): 27-35.
- 2) Maatallah, M, M Vading, MH Kabir, et al. 2014. *Klebsiella variicola* Is a Frequent Cause of BSI in the Stockholm Area, and Associated with Higher Mortality Compared to *K. pneumoniae*. PLOS ONE 9: e113539.
- 3) Harada, S, K Aoki, S Yamamoto, et al. 2019. Clinical and Molecular Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing BSI in Japan: Occurrence of Hypervirulent Infections in Health Care. Journal of Clinical Microbiology 57.
- 4) Imai, K, N Ishibashi, M Kodana, et al. 2019. Clinical characteristics in BSI caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. BMC Infect Dis 19: 946.
- 5) Tani, R, S Harada, H Saito, et al. 2023. A case report of fatal COVID-19 complicated by rapidly progressive sepsis caused by *Klebsiella variicola*. BMC Infect Dis 23: 184.
- 6) Brisse, S, J Verhoef. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 915-924.
- 7) Rosenblueth, M, L Martinez, J Silva, et al. 2004. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. Systematic and Applied Microbiology 27: 27-35.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-Ed31, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 9) Brisse, S, V Passet, PAD Grimont. 2014. Description of

- Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. Int J Syst Evol Microbiol 64: 3146-3152.
- 10) de Melo, ME, AB Cabral, MA Maciel, et al. 2011. Phylogenetic groups among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: relationship with antimicrobial resistance and origin. Curr Microbiol 62 (5): 1596-1601.
- 11) Ohama, Y, Y Nomura, M Mizoguchi, et al. 2022. Accurate Identification of *Klebsiella variicola* by MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. Microbiol Spectr e0284422.
- 12) Watanabe, N, T Watari, Y Otsuka, et al. 2022. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from human urine in Japan. J Med Microbiol 71 (6).
- 13) Fonseca, EL, N da V Ramos, BGN Andrade, et al. 2017. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. Diagn Microbiol Infect Dis 87: 315-317.
- 14) Farzana, R, LS Jones, MA Rahman, et al. 2019. Outbreak of Hypervirulent Multidrug-resistant *Klebsiella variicola* Causing High Mortality in Neonates in Bangladesh. Clinical Infectious Diseases 68: 1225-1227.
- 15) 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会精度管理事業/2022年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書.
- 16) Bridel, S, SC Watts, LM Judd, et al. 2021. *Klebsiella* MALDI TypeR: a web-based tool for *Klebsiella* identification based on MALDI-TOF mass spectrometry. Res Microbiol 172: 103835.

Comparison of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* on adonitol hydrolysis ability and antimicrobial susceptibility

Miki Kurosawa¹⁾, Tatsuya Ohno²⁾, Tadatomo Ohyanagi¹⁾, Yoshiyuki Takahashi¹⁾, Yosuke Tanaka²⁾, Momoko Anzai²⁾, Tomonori Takano³⁾, Hiroyuki Kunishima³⁾, Hiromu Takemura⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine

²⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University Yokohama Seibu Hospital

³⁾Department of Infectious Diseases, St. Marianna University School of Medicine

⁴⁾Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine

Klebsiella pneumoniae complex includes four species, *K. pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*, and *Klebsiella africanensis*. In this study, *K. pneumoniae* complex detected in blood culture-positive specimens were re-identified by MALDI-TOF MASS, and the possibility of identification of two species, *K. pneumoniae* and *K. variicola*, by using two methods, adonitol hydrolysis and antimicrobial susceptibility testing, was investigated. Our findings revealed that 42 out of 43 isolates (97.8%) exhibiting negative adonitol hydrolysis and ampicillin susceptibility of $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ were identified as *K. variicola*. However, 17 out of 59 isolates (28.8%) could not be reliably differentiated from *K. variicola*, suggesting that this criterion alone may not be a dependable means of identification.