

[原 著]

腸内細菌目細菌におけるコリスチンの薬剤感受性試験法に関する検討

中野安実¹⁾・上地幸平¹⁾・与儀翔平²⁾・當銘高明¹⁾・仲本真里有¹⁾・前田士郎^{1) 3)}

¹⁾ 琉球大学病院検査・輸血部

²⁾ 琉球大学医学部保健学科形態病理学講座

³⁾ 琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座

(令和5年12月15日受付, 令和6年3月18日受理)

抗菌薬選択において迅速かつ正確な薬剤感受性試験は重要であるが, コリスチン (Colistin : CL) の薬剤感受性試験は未だ課題が多い。本検討では CL の薬剤感受性試験の一つである Colistin Broth Disk Elution (CBDE) について評価した。対象は 2016 年 1 月～2019 年 12 月の期間に提出された各種臨床材料から分離・同定した *Enterobacterales* 77 株 (*mcr* 保有菌種 6 株を含む) とした。微量液体希釈法 (Broth microdilution : BMD) を参照法として, CBDE で得られた CL の MIC の ± 1 管差以内の一致率 (Essential agreement : EA) およびカテゴリー一致率 (Category agreement : CA) を求めた。CBDE において 28 株 (36.4%) は中間, 49 株 (63.6%) は耐性と判定され, EA は 100% (77/77 株), CA は 93.5% (72/77 株), Very Major Error は 0% (0/44 株), Major Error は 15.2% (5/33 株) であった。本検討において, CBDE は CL の薬剤感受性を簡便かつ正確に判定可能であり, 抗菌薬選択の一助となり得ることが示唆された。

Key words: 腸内細菌目細菌 (*Enterobacterales*), 薬剤感受性試験, コリスチン (Colistin : CL), Broth microdilution method (BMD), Colistin Broth Disk Elution (CBDE)

序 文

現在, カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacterales* : CRE) などの多剤耐性グラム陰性桿菌の拡散と増加が世界的に懸念されている¹⁾。多剤耐性グラム陰性桿菌感染症の抗菌薬治療としては高用量のカルバペネム系やポリペプチド系, テトラサイクリン系抗菌薬またはその併用療法等が行われている。2012 年, コリスチン (Colistin : CL) は WHO により, 多剤耐性グラム陰性桿菌感染症の増加および薬剤耐性菌に対する抗菌薬の不足を理由に, ヒト臨床における重要な抗菌薬として位置づけられ, 我が国においても 2015 年に再承認された²⁾。

ポリペプチド系抗菌薬の一つである CL は分子量が大きく, 陽性荷電, 疎水性という性質を持つ。CL はグラム陰性菌の細胞外膜に結合することで膜上の Ca^{2+} と Mg^{2+} を置換し, リポ多糖体 (lipopolysaccharide : LPS) の架橋形成を破壊することで抗菌活性を発揮するとされている³⁾。従来, CL の耐性機序としては, 主に PmrAB と PhoPQ から構成される二成分制御系と呼ばれるタンパクをコードする染色体上の遺伝子変異による耐性獲得が主であり, 菌種を超えて伝播する可能性は低いと考えられてきた。しかし, 2015 年に中国で初めてプラスミド性の CL 耐性遺伝子 *mcr-1* が報告されて

以降, *mcr* は現在までに *mcr-1* から *mcr-10* までのバリエーションが報告されており, 菌種を超えたさらなる拡散が懸念されている³⁾。

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) および EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) は CL の薬剤感受性試験における合同勧告として, 微量液体希釈法 (Broth microdilution : BMD) を推奨している⁴⁾。CL の薬剤感受性試験を実施するにあたり, 陽性荷電を示す CL は, 陰性荷電であるプラスチックに付着することで MHB (Mueller-Hinton Broth) 中での真の CL 濃度が下がり, 正確な薬剤感受性結果が得られないことや, CL の分子量が大きいため寒天培地上で拡散しにくいなどの問題が指摘されている⁵⁾。Simmer らによって考案された Colistin Broth Disk Elution (CBDE) は, *Enterobacterales* と *Pseudomonas aeruginosa* における CL の薬剤感受性試験の暫定的な方法として承認され, BMD との EA (essential agreement) は 90% 以上, VME (Very major error) や ME (Major error) が低く, 結果の解釈が容易であることや低コストで材料の入手が容易にできることから日常検査に適した方法とされる^{5)~7)}。

今回, BMD を参照法として, CL の薬剤感受性試験の一つである CBDE について比較検討を行ったので報告する。

著者連絡先 : (〒903-0215) 沖縄県中頭郡西原町字上原 207 番地
琉球大学病院検査・輸血部
中野安実
TEL: 098-895-3331 (内線 3332)
FAX: 098-895-1463
E-mail: a199406@jim.u-ryukyu.ac.jp

対象と方法

1. 対象

2016 年 1 月～2019 年 12 月の期間に当院検査・輸血部に提出された各種臨床検体から CL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有選択分離培地 (in house, ミュラーヒントン培地 : 日本 BD) 上に発育し,

Table 1. Specific primers for the detection of *mcr-1* ~ *-9* genes

Genes	Primer sequences	Product length (base pairs)	References
<i>mcr-1</i>	F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' R: 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	308	8)
<i>mcr-2</i>	F: 5'-TGTTGCTTGTGCCGATTGGA-3' R: 5'-AGATGGTATTGTTGGTTGCTG-3'	566	9)
<i>mcr-3</i>	F: 5'-AAATAAAAAATTGTTCCGCTTATG-3' R: 5'-AATGGAGATCCCCGTTTTT-3'	929	10)
<i>mcr-4</i>	F: 5'-TCACTTTCATCACTGCGTTG-3' R: 5'-TTGGTCCATGACTACCAATG-3'	1,116	10)
<i>mcr-5</i>	F: 5'-ATGCGTTGTCTGCATTTATC-3' R: 5'-TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG-3'	1,644	10)
<i>mcr-6</i>	F: 5'-AGCTATGTCAATCCCGTGAT-3' R: 5'-ATTGGCTAGGTTGTCAATC-3'	252	11)
<i>mcr-7</i>	F: 5'-GCCCTTCTTTTCGTTGTT-3' R: 5'-GGTTGGTCTCTTTCTCGT-3'	551	11)
<i>mcr-8</i>	F: 5'-TCAACAATTCTACAAAGCGTG-3' R: 5'-AATGCTGCGCAATCAAG-3'	856	11)
<i>mcr-9</i>	F: 5'-TTCCCTTTGTTCTGGTTG-3' R: 5'-GCAGGTAATAAGTCGGTC-3'	1,011	11)

F: forward primer, R: reverse primer

質量分析装置 VITEK® MS (bioMérieux) にて *Enterobacteriales* と同定された 73 株 (*Escherichia coli* 17 株, *Klebsiella pneumoniae* 31 株, *Enterobacter cloacae* complex 20 株, *Klebsiella aerogenes* 3 株, *Citrobacter freundii* complex 2 株) と *mcr-1* 保有 *E. coli* 4 株の計 77 株を対象とした。

2. CL 耐性遺伝子 *mcr* の検出

mcr-1 保有 *E. coli* 4 株を除く, *Enterobacteriales* 73 株を対象として, polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた CL 耐性遺伝子 *mcr-1* ~ *mcr-9* の検出を行った。5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD) に継代培養したコロニーから, シカジーニウス® DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いてテンプレート DNA を抽出した。次に, PCR 用検体 5.0 µL, TaKaRa Taq™ Recombinant Taq DNA Polymerase (タカラバイオ) 0.25 µL, 特異的 Forward および Reverse プライマー各 25 pmol (Table 1), 10×PCR buffer 5.0 µL, dNTP Mixture 4.0 µL, 滅菌精製水にて総量 50 µL になるよう調整した。PCR 条件は, 各 *mcr* 遺伝子ごとの至適条件を用いて行った^{8)~11)}。PCR 産物を 2.0% agarose gel 電気泳動法にて CL 耐性遺伝子 *mcr* の増幅を確認した。

3. 薬剤感受性試験

3-1. Broth microdilution (BMD)

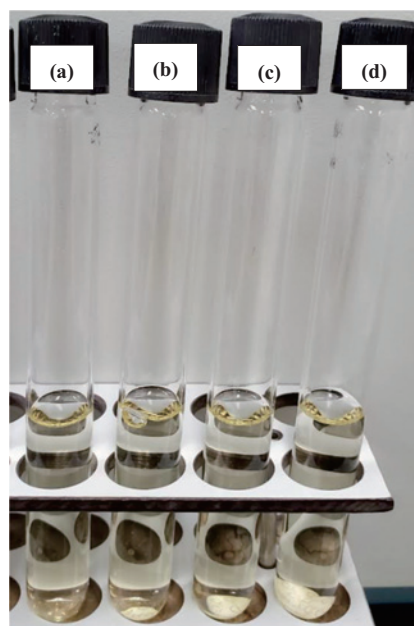
BMD はフローズンプレート (栄研化学, 自施設特注 [培地: Mueller Hinton broth, 添加物: Ca⁺⁺, Mg⁺⁺]) を用い, 添付文書に従い, 以下の通り実施した。①5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD) にて, 大気条件下, 35℃, 18 時間培養後, 被検菌のコロニーを 0.45% 滅菌食塩水に懸濁し, McFarland No. 1 に調整した。②調整した菌液をさらに 10 倍希釈し, 接種用菌液とした。③接種用菌液はフローズンプレートの各ウェルに 0.0025 mL ずつ接種した (最終接種菌量: 約 1×10⁵

CFU/ウェル)。④大気条件下で 35℃, 18 時間培養後, MIC を判定した。

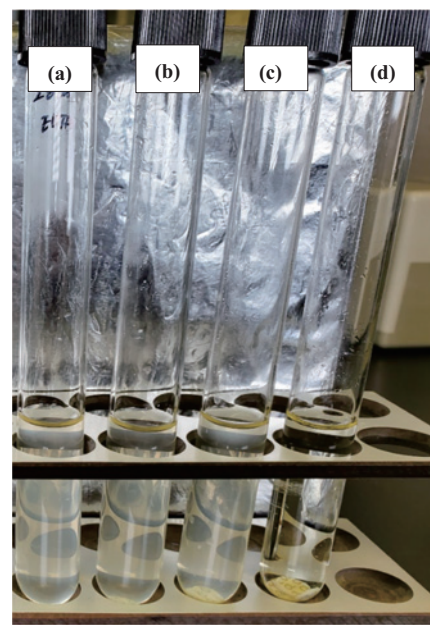
3-2. Colistin broth disk elution (CBDE)

CBDE は CLSI M100-S30 に準拠し, 以下の通り実施した (Figure 1)。①1 検体数あたり 10 mL の MHB を入れたガラス試験管 (25 mL) を 4 本用意した。②それぞれの試験管に CL ディスク (10 µg, 栄研化学) を 0, 1, 2, 4 枚入れ, ボルテックスミキサーで約 10 秒間混和し, 30 分間ディスク中の CL を溶出させた。③5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD) を用いて, 大気条件下, 35℃, 18 時間培養後, 発育した被検菌のコロニーを 0.45% 滅菌食塩水に懸濁し, McFarland 0.5 に調整後, 接種用菌液とした。④②で CL を溶出させた各試験管に接種用菌液を 50 µL 接種し, ボルテックスミキサーにて混和した (最終接種菌量: 7.5×10⁵ CFU/mL)。⑤大気条件下で 35℃, 18 時間培養し, MIC を判定した。カテゴリー判定は CLSI M100-S30 に準拠し, CL MIC≤2 µg/mL を「中間 (Intermediate: I)」, CL MIC≥4 µg/mL を「耐性 (Resistant: R)」と判定した⁸⁾。また, CLSI M100-S30 では CL の判定基準に「感性 (Susceptible: S)」のカテゴリー基準が設定されていないため, 結果の解釈では「I」を「S」と同様とし, BMD が「R」で CBDE が「S」の場合を Very major error (VME), BMD が感性で CBDE が耐性の場合を Major error (ME) として VME rate (%) および ME rate (%) を算出した。また, 国際標準化機構 (International organization for Standardization: ISO) 20776 (2nd edition) において臨床検査における薬剤感受性装置の性能基準の一つとして設定されている Bias を求めた¹²⁾。+1bias は, BMD と CBDE を比較した際の MIC が +1 以上の株数を合計し, +1 管が発生し得ない「>4」となった株を除外した株数で, -1bias は,

(A) Pre-culture



(B) Post-culture




 Culture under
 ambient air at 35°C for
 18 hours

Figure 1. Colistin broth disk elution method

CBDE is performed using four of 10 mL cation-adjusted Mueller-Hinton broth tubes for each isolate. Final concentrations of colistin are (a) 0 $\mu\text{g/mL}$ (growth control), (b) 1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 2 $\mu\text{g/mL}$, and (d) 4 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Representative pictures for (A) Pre-culture, and (B) Post-culture. In this isolate, a colistin MIC is determined as 4 $\mu\text{g/mL}$.

BMD と CBDE を比較した際の MIC が -1 以下の株数を合計し、 -1 管が発生し得ない「 ≤ 1 」となった株を除外した株数で除することで算出し、 $+1$ bias と -1 bias の差を Bias とした。

3-3. 精度管理

内部精度管理は Simner らの論文に準拠して *E. coli* ATCC 25922 および *P. aeruginosa* ATCC 27853 を使用し、試験実施ごとに得られた MIC が基準範囲内 (*E. coli*: CL MIC range 0.25~2.0 $\mu\text{g/mL}$, *P. aeruginosa*: CL MIC range 0.5~4 $\mu\text{g/mL}$) であることを確認した⁵⁾。

結 果

1. CL 耐性遺伝子 *mcr* の検出

mcr 特異プライマーを用いた PCR の結果、*E. cloacae* complex 2 株から *mcr-9* が検出されたが、他の菌株からはいずれの CL 耐性遺伝子も検出されなかった。

2. CL 薬剤感受性試験

BMD を用いて測定した *Enterobacteriales* 77 株における CL の MIC は 33 株 (42.9%) が $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ (I), 44 株 (57.1%) が $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/mL}$ (R) と判定された (Table 2-1)。菌種別では *E. coli* が「I」13 株, 「R」8 株 [*mcr-1* 保有 *E. coli* は 4 株すべてが $\text{MIC} 2 \mu\text{g/mL}$ (I)], *K. pneumoniae* が「I」12 株, 「R」19 株, *E. cloacae* complex が「I」3 株, 「R」17 株 [*mcr-9* 保有 2 株はすべて $>8 \mu\text{g/mL}$ (R)], *K. aerogenes* と *C. freundii* complex は 5 株すべてが「I」と判定された (Table 2-1)。

CBDE を用いて測定した *Enterobacteriales* 77 株における CL の MIC は 28 株が「I」, 49 株 (63.6%) が「R」と判定さ

れた (Table 2-2)。菌種別では *E. coli* は「I」8 株, 「R」13 株 [*mcr-1* 保有 *E. coli* は 4 株すべて 4 $\mu\text{g/mL}$ (R)], *K. pneumoniae* は「I」12 株, 「R」19 株, *E. cloacae* complex は「I」3 株, 「R」17 株 [*mcr-9* 保有株は 2 株とも $>4 \mu\text{g/mL}$ (R)], *K. aerogenes* と *C. freundii* complex は 5 株すべてが「I」と判定された (Table 2-2)。

BMD を参照法とした場合、CBDE の EA は 100%, CA は 93.5% (72/77 株), VME は 0%, ME は 15.2% (5/33 株), Bias は +32.5% であった (Table 3)。また、*mcr* 保有菌株の EA は 100% (6/6 株), CA は 33.3% (2/6 株) であった (Table 3)。

考 察

本論文は CL の薬剤感受性試験の一つである CBDE について、日本国内で検討した最初の報告である。CL 耐性菌の分離は 2000 年前後から *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* などで報告されていたが、これらの報告は耐性機序として染色体上の遺伝子変異を確認しているもので、伝播・拡散する可能性は低いものと考えられていた¹³⁾。しかし、2015 年に中国で初めてブタからプラスミド性 CL 耐性遺伝子 *mcr* が検出、さらにはヒト由来 *E. coli* から発見され、現在までに 5 大陸 54 ヶ国で報告されている⁸⁾¹⁴⁾。また、日本国内では 2017 年に沖縄県で *mcr-1* 遺伝子保有 *E. coli* が初めて分離報告され、以降、様々な地域で *mcr-1* 遺伝子保有 *Enterobacteriales* が報告されている¹⁵⁾。

現在、日本国内の臨床微生物検査室で使用されている自動薬剤感受性装置や Etest 法は CL の薬剤感受性が正確に測定できないことが問題となっている。Chew らの報告によると

Table 2. Results of CL-antimicrobial susceptibility testing

2-1. Broth microdilution (BMD) method						
	n	MIC (μg/mL)				
		≤1	2	4	8	>8
<i>E. coli</i>	17	8	1	4	3	1
<i>mcr-1</i>	4		4			
<i>K. pneumoniae</i>	31	12		3	2	14
<i>E. cloacae</i> complex	18	3				15
<i>mcr-9</i>	2					2
<i>K. aerogenes</i>	3	3				
<i>C. freundii</i> complex	2	2				
Total	77	28	5	7	5	32
2-2. Colistin Broth Disk Elution (CBDE) method						
	n	MIC (μg/mL)				
		≤1	2	4	>4	
<i>E. coli</i>	17	8		1	8	
<i>mcr-1</i>	4			4		
<i>K. pneumoniae</i>	31	12			19	
<i>E. cloacae</i> complex	18	3			15	
<i>mcr-9</i>	2				2	
<i>K. aerogenes</i>	3	2	1			
<i>C. freundii</i> complex	2	2				
Total	77	27	1	5	44	

MIC: minimum inhibitory concentration

Table 3. Comparison of the results of CBDE for *Enterobacteriales* with those of the reference method (BMD)

	n	Agreement with reference MIC					No. (%) of isolates				
		-2	-1	0	+1	+2	±1 EA	CA	VME	ME	Bias (%)
All isolates	77	0	0	64	13	0	100	72 (93.5)	0	5 (15.2)	+32.5
<i>E. coli</i>	21	0	0	16	5	0	100	16 (76.2)	0	5 (38.5)	+52.9
(<i>mcr-1</i> positive)	(4)	0	0	0	4	0	100	0	0	4 (100)	+100
<i>K. pneumoniae</i>	31	0	0	28	3	0	100	100	0	0	+20.0
<i>E. cloacae</i> complex	20	0	0	20	0	0	100	100	0	0	0
(<i>mcr-9</i> positive)	(2)	0	0	2	0	0	100	100	0	0	0
Other <i>Enterobacteriales</i>	5	0	0	4	1	0	100	100	0	0	+20.0

CBDE: Colistin Broth Disk Elution, BMD: Broth microdilution, EA: Essential agreement, CA: Category agreement, VME: Very major error, ME: Major error

BMDを参照法とした際のVITEK[®]2 (bioMérieux)のEAは93.4%, CA 88.2%, VME 36.0%, MicroScan (ベックマン・コールター)のEAはnot applicable, CA 88.2%, VME 4%, ME 15.8%, Etest法のEAは75.0%, CA 92.1%, VME 12.0%, ME 5.9%であり、いずれの検査機器・方法においてもCLSIが推奨する性能基準を満たしていなかった¹⁶⁾。当院においても自動薬剤感受性装置VITEK[®]2を用いてBMDとCL薬剤感受性結果の比較を行ったところ、EAは76.4%(79/104株), CA 79.8%(83/104株), VME 43.8%(21/48株), ME 0%(0/56株)であり、Chewらの報告と同様の結果であった。また、VITEK[®]2との比較検討において、*E. cloacae* complexはEA 27.3%(6/22株), CA 27.3%(6/22株), VME

94.1%(16/17株), ME 0%(0/5株)を示し、その要因は不明であるがVITEK[®]2を用いたCLの薬剤感受性測定には注意を要することが再確認された。以上のことから、CLの薬剤感受性試験には自動機器を用いた微量液体希釈法やEtest法に替わる方法が必要と考えられる。

CBDEは、1973年に嫌気性菌を対象とした薬剤感受性試験法を基に、CLのMIC測定を目的として考案された方法である¹⁷⁾。CLのMICを測定するための薬剤感受性プレートを作成する必要がなく、一般的な臨床微生物検査室で実施可能、かつ簡便な方法である。本検討におけるCBDEのEAは100%, CAは93.5%, VMEは0%, MEは15.2%となり、Routらの研究でもEA 92.5-98.5%, CA 95.7-98.2%, VME 1.1-

2.6%, ME 0.82-2.6%と同様の結果が得られていた¹⁸⁾。また, Simnerらは, CBDEでCA 98%, EA 99%を示しVMEおよびMEはなかったとしている⁶⁾。しかし本研究では, MEは15.2% (5/33株)であり, 国際標準化機構 (International Organization for Standardization: ISO) 20776-2の推奨値である3%を超えた。その要因として以下の可能性が考えられる。本来 *E. coli* におけるCLのMIC分布は0.5 µg/mLをピークとし, MIC 2 µg/mL以上を示す菌株は少数である¹⁹⁾。しかし, 本検討ではCL 2 µg/mL含有スクリーニング培地 (in house) 上に発育した菌株を対象としたため, プレイクポイント付近のMICを示す菌株が多かったこと, また, CBDEのMICがBMDと比べ1管高い値を示した菌株を複数認め, Biasが+32.5%と高値傾向を示したことが考えられた。CBDEのMICがBMDより1管高い値を示す要因は不明であったが, 今回の検討株数が少なかったことや, BMDのプレートの素材はプラスチック, CBDEの試験管の素材はガラスであったことから, 使用する素材の違いが要因の一つとなる可能性が考えられる。Simnerらの報告では110株中2株がCBDEのMICがBMDより1管高く同様の結果が得られていたが, Routらの報告ではBMDのMICがCBDEのMICよりも高く, 報告により傾向は異なっていることから, さらなる検討が必要と考えられる。

本研究の制限事項として, まず, 現在のCLSIが推奨する菌株を用いてCBDEの精度管理を実施できなかったことが挙げられる⁸⁾。*E. coli* ATCC 25922および*P. aeruginosa* ATCC 27853のCL MICはいずれもCBDEにて下限値以下のMICを示すことから, 現在のCLSI M100では精度管理菌株は*E. coli* AR Bank #0349 (2~4 µg/mL)に変更されている。したがって, 今後は*E. coli* AR Bank #0349を使用した精度管理を行う必要がある。次に, 本検討は単施設かつ選択分離上に発育した菌株を用いた検討であるため, 菌株数が少なく菌種に偏りがあり, また, 菌種による検討株数にも差があることが挙げられる。よって, 今後のCBDEの性能評価は菌株数を増やした検討が望まれる。また, 今回 *E. cloacae* complexから検出された *mcr-9* は, 下流にセンサーヒスチジンキナーゼをコードする *qseC* と応答制御因子である *qseB* からなる2成分制御システムの存在を必要とする。しかし本研究ではCBDEとBMDの比較検討であり, 今回は *mcr-9* が検出された菌株に対しての詳細な解析は行っていない。今後 *qseC* および *qseB* の有無を含め, 解析を行う必要があると考えられる。さらに, CBDEは*P. aeruginosa*も対象菌種の一つであるが, 本検討では *Enterobacteriales*のみを対象としており, *P. aeruginosa* に対するCBDEの検討は行っていない。海外では*P. aeruginosa*を対象としたCBDEについて, CA 99.3%, EA 96.6%, VME 0%, ME 0.7%と, CBDEを用いた*P. aeruginosa*のCLの薬剤感受性試験の有用性が報告されている⁷⁾。今回の検討の目的はCBDEの性能評価であったことからBMDでCLに耐性を示し, *mcr*が検出されなかった菌株の耐性機序については精査を行わなかった。今後は, これらの菌株について, 染色体性の耐性機序とされる2成分制御系内のタンパクの遺伝子変異の検索など, より詳細な解析が必要である。

現在, 本邦においてCLを治療薬として使用することは比

較的に少ない²⁰⁾。しかし, 今後はインバウンド, アウトバウンドの増加によって多剤耐性菌が流入・増加し, 感染症の治療薬としてCLを使用するケースが増加することが懸念される。CBDEは迅速, 正確, かつ簡便にCLのMICを測定することが可能であり, 日常検査に適した臨床上有用な検査法であると考えられる。

利益相反: 該当なし

文 献

- 1) Tacconelli, E, Carrara, A, Savoldi, et al. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18 (3): 318-327.
- 2) 二木芳人, 館田一博, 藤村 茂, 他. 2015. CLの適正使用に関する指針—改訂版—. *日治療誌* 63 (5): 289-329.
- 3) Ling, Z, W Yin, Z Shen, et al. 2020. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother* 75 (11): 3087-3095.
- 4) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2016. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. *Recommendations_for_MIC_determinatoin_of_colistin_March_2016.pdf* 2023年9月20日現在.
- 5) Simner, PJ, Y Bergman, M Trejo, et al. 2020. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol* 57 (2): e01163-18.
- 6) Humphries, RM, DA Green, AN Schuetz, et al. 2020. Multi-center Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standard Institute. *J Clin Microbiol* 57 (11): e01269-19.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition.
- 8) Liu, YY, Y Wang, TR Walsh, et al. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16 (2): 161-168.
- 9) Xavier, BB, C Lammens, R Ruhul, et al. 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 21 (27).
- 10) Rebelo, AR, V Bortolaia, JS Kjeldgaard, et al. 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill* 23 (6): 17-00672.
- 11) Borowiak, M, B Baumann, J Fischer, et al. 2020. Development of a novel *mcr-6* to *mcr-9* Multiplex PCR and assessment of *mcr-1* to *mcr-9* occurrence in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates from environment, feed, animals and food (2011-2018) in Germany. *Front Microbiol* 11 (80).
- 12) ISO. 2007. ISO/FDIS 20776-2:2007(E) clinical laboratory test-

- ing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infection agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices-part 2, evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices, ISO, Geneva, Switzerland.
- 13) Cannatelli, A, MM D'Andrea, T Giani, et al. 2013. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. Antimicrob Agents Chemother 57 (11): 5521-5526.
 - 14) Caldes, CB, JH Waard, MS Salgado, et al. 2022. Worldwide Prevalence of mcr-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in isolates of Clinical Sample, Healthy Humans, and Livestock-A Systematic Review and Meta-Analysis. Pathogens 11 (6): 659.
 - 15) Tada, T, K Uechi, I Nakasone, et al. 2017. Emergence of a colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harboring *mcr-1* in Japan. Int J Infect Dis 63: 21-22.
 - 16) Chew, KL, MV La, RT Lin, et al. 2017. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensitizer, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. J Clin Microbiol 55 (9): 2609-2616.
 - 17) Wilkins, TD, T Thiel, et al. 1973. Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 3: 350-356.
 - 18) Rout, B, AK Dash, KK Sahu, et al. 2023. Evaluation of different methods for *in vitro* susceptibility testing of colistin in carbapenem resistant Gram-negative bacilli. Access Microbiol 5 (10): 000595.v3.
 - 19) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Colistin/*Escherichia coli* Internal MIC distribution-Reference database.
<https://mic.eucast.org/search/diagram/33582> 2023年9月20日現在.
 - 20) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会. 2022. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2022.
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001098994.pdf> 2023年9月20日現在.

Evaluation of the clinical usefulness of the colistin broth disk elution as an antimicrobial susceptibility testing for colistin in *Enterobacterales*

Ami Nakano¹⁾, Kohei Uechi¹⁾, Syohei Yogi²⁾, Takaaki Tome¹⁾, Maria Nakamoto¹⁾, Shiro Maeda^{1) 3)}

¹⁾Division of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, University of the Ryukyus Hospital

²⁾Division of Morphological Pathology, Department of Basic Laboratory Science, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

³⁾Department of Advanced Genomic and Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus

A rapid and accurate antimicrobial susceptibility testing (AST) method is required in the antimicrobial stewardship activity to detect antimicrobial resistant bacteria as soon as possible. In this study, to evaluate the clinical usefulness of colistin broth disk elution (CBDE), an AST for colistin (CL), we examined seventy-seven isolates of *Enterobacterales* from various clinical specimens submitted between January 2016 and December 2019, including 4 isolates of *E. coli* harboring *mcr-1* and 2 isolates of *E. cloacae* complex harboring *mcr-9*, with CBDE. Twenty-eight (36.4%) and 49 (63.6%) isolates were determined as intermediate, and resistant, respectively, and by using the broth microdilution (BMD) as a reference method, the category agreement (CA) and essential agreement (EA) of the MIC of CL within ± 1 tube difference are 93.5% (72/77 isolates) and 100% (77/77 isolates), respectively, we also observed 15.2% (5/33 isolates) of major error, but no very major error. Regarding six isolates harboring the *mcr* (4 isolates of *E. coli* harboring *mcr-1* and 2 isolates of *E. cloacae* complex harboring *mcr-9*), four were determined as intermediate and two were resistant in BMD, whereas all six isolates were determined as resistant in CBDE. These results indicate that CBDE is considered as an accurate and rapid method to detect the CL-resistant *Enterobacterales*, and useful to apply antimicrobial stewardship activity for *Enterobacterales*.