[原 著]

市販薬組み合わせによる腸内細菌目細菌を対象とした ESBL, AmpC, MBL 検出法の検討

高山美奈¹⁾·坂梨大輔¹⁾·川本柚香¹⁾·宮﨑成美¹⁾·大野智子¹⁾ 山田敦子¹⁾·中村明子¹⁾·太田浩敏¹⁾·末松寛之¹⁾·千田澄江²⁾ 平井 潤¹⁾²⁾·浅井信博¹⁾²⁾·森 伸晃¹⁾²⁾·三鴨廣繁¹⁾²⁾ ¹⁾ 愛知医科大学病院感染制御部

2) 愛知医科大学病院感染症科

(令和6年3月21日受付,令和6年7月4日受理)

耐性菌の迅速・正確な検出は感染対策と抗菌薬適正使用の両面で重要である。本検討では、AmpC/ESBL鑑別ディスク(MastAE)と Sodium mercaptoacetic acid(SMA)を併用した新しい β-lactamase 産生菌鑑別法(MastAE-SMA)を考案し評価した。PCR にて Extended-spectrum β-lactamase,AmpC β-lactamase および Metallo-β-lactamase(ESBL,AmpC および MBL)産生性が決定された腸内細菌目細菌 70 株を対象に、MastAE、SMA double disk synergy test(SMA-DDST)および MastAE-SMA を実施し、PCR との結果一致率を比較した。ESBL および/または AmpC 産生菌に対する MastAE および MastAE-SMA の PCR との結果一致率は、MBL 非産生の場合でともに 28/28(100%)、MBL 産生の場合で 2/29(7%)および 19/29(66%)であった。MBL 産生菌に対する SMA-DDST および MastAE-SMA の PCR との結果一致率はともに 37/42(88%)であった。MastAE-SMA は MBL かつ ESBL および/または AmpC 産生菌において、より正確に β-lactamase を鑑別することが可能であり、効果的な方法であると考える。

Key words: 表現型検査法, SMA-DDST, AmpC/ESBL 鑑別ディスク, β-lactamase

序 文

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL), AmpC βlactamase (AmpC), Metallo β-lactamase (MBL) 等の酵素 を産生し、第三世代セファロスポリンに耐性を示す腸内細菌 目細菌の増加が世界的問題となっている10。ESBL, AmpC および MBL は、プラスミドを介し菌種を超えて伝播する可 能性がある。また、β-lactamase を複数産生している場合も あり、感染症治療に当たっては有効な抗菌薬が少ない症例も 多い。近年ではこのような症例に対し、tazobactam や relebactam (海外ではavibactamやvaborbactam) などのβlactamase 阻害剤を配合した β-lactam 系抗菌薬が使用可能だ が、MBLに対してこれらの阻害剤は無効である。また、モ ノバクタム系抗菌薬は MBL 産生菌に対し in vitro で感受性 を示すが、ESBL や AmpC の同時産生によって耐性化する 場合がある。従って、これらの耐性菌を迅速かつ正確に検出 することは医療関連感染対策および抗菌薬適正使用の両方の 観点で重要である。

薬剤耐性腸内細菌目細菌のβ-lactamase 検出法としては、PCR などによる遺伝子検査と抗菌薬・阻害剤を用いた表現型検査があるが、遺伝子検査については設備と環境の課題等から全ての臨床微生物検査室において実施できるというわけ

著者連絡先: (〒480-1195) 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 愛知医科大学病院感染制御部

髙山美奈

TEL: 0561-62-3311(内線 35823)

E-mail: takayama.mina.975@mail.aichi-med-u.ac.jp

ではない。表現型検査については、ESBL と AmpC 産生菌の鑑別試薬として AmpC/ESBL 鑑別ディスク(MAST-DISCS Combi AmpC and ES β L ID set ; MastAE)(関東化学)が上市されているが、本試薬は MBL と ESBL および/または AmpC を同時産生する菌で正しく ESBL および/または AmpC を鑑別することはできないとされている 2 。また、MBL 産生菌を検出する Sodium mercaptoacetic acid double disk synergy test(SMA-DDST)用の試薬;メタロ β -ラクタマーゼ SMA '栄研'(SMA ディスク)(栄研化学)も市販されているが、本試薬は当然ながら MBL 以外の酵素を検出し得ない。従って、これらの試薬を各々用いたとしてもMBL を含む β -lactamase 複数産生菌を正確に鑑別することは困難である。

このような課題に対し、本研究では、β-lactamase 複数産 生菌に対する検査法として市販試薬の組み合わせによる βlactamase 検出法(MastAE-SMA)を考案し、各試薬単独で 検査した場合との比較検討を行った。

材料と方法

(1) 使用菌株

愛知医科大学病院および中部地方の医療施設から臨床分離されスキムミルクで−80℃ 凍結保存された Escherichia coli 23 株, Klebsiella pneumoniae 26 株, Klebsiella oxytoca 9 株, Enterobacter cloacae complex 3 株 お よ び Citrobacter amalonaticus 2 株の臨床分離株 63 株, American Type Culture Collection(ATCC)2 株 お よ び National Collection of Type Cultures(NCTC)5 株の標準菌株 7 株, 計 70 株を対

Table 1. Bacterial strains.

		No. of isola	tes		- Tota
C. amalonaticus	E. coli	E. cloacae	K. oxytoca	K. pneumoniae	100
2	23	3	9	26	63
	7				7
	6			2	8
	1				1
	2				2
	2				2
	1			1	2
				2	2
			6	5	11
1			1	1	3
				3	3
	2		2	8	12
	1				1
				1	1
	1				1
		3			3
		· ·		3	3
				o .	0
1					1
1					1
	4	1		2	7
	•	1		2	•
	1				1
					1
	1				1
		1			1
		1			1
	1				1
	1				1
	1				1
	1			1	1
				1	1
				1	1
	2	2 23 7 6 1 2 2 1 1	C. amalonaticus E. coli E. cloacae 2 23 3 7 6 4 1 1 2 2 1 2 1 1 1 1 2 1 1 1 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	2 23 3 9 9 7 6 6 1 2 2 1 1 1 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	C. amalonaticus E. cloi E. cloacae K. oxytoca K. pneumoniae 2 23 3 9 26 7 6 2 2 1 2 2 2 2 1 2 2 1 1 1 2 2 2 8 1 1 1 1 1 2 3 2 8 1 3 3 3 1 4 1 2 2 1 1 2 3 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 3 1 1 1 1 4 1 1 1

(a); NCTC 13351, (b); NCTC 13353, (c); NCTC 13406, (d); ATCC BAA-2355, (e); NCTC 13476, (f); NCTC 13440, (g); ATCC BAA-2146.

象とした (Table 1)。臨床分離株の菌種同定およびβ-lactamase 産生性の確認,ATCC 菌株の情報参照は既報と同様の方法で実施した³。また,NCTC の菌株情報は UK Health Security Agency https://www.culturecollections.org.uk/about-us/nctc/の公開情報を参照した。対象菌株はポアメディア羊血液寒天培地 M58(栄研化学)に塗布し,5%CO₂条件下で35℃,18時間培養し検討に用いた。

(2) MastAE

McFaland No.0.5 に調整した対象菌株の菌液をミューラー ヒントン II 寒天培地(日本ベクトン)に塗布した後、添付 文書に従って、ディスク A:Cefpodoxime (CPDX) 10 µg, ディスク B:CPDX 10 µg+ESBL 阻害剤、ディスク C:CPDX 10 µg+AmpC 阻害剤、ディスク D:CPDX 10 µg+ESBL 阻害剤+AmpC 阻害剤をそれぞれ設置し、35℃、18 時間好気培養した 2 。培養後、ディスク A~D の阻止円直径を計測し、関東化学ホームページ上で配布されているファイル資料「AmpC/ESBL 鑑別ディスク」と「カルバベネマーゼ鑑別ディスク Plus」の簡易判定シート:ファイル名「r_DiscJudgement_2017」に入力し判定を行った。なお、判定アルゴリズムは以下の通り: | A-B | 、 | A-C | および | A-C |

D | がすべて \leq 2 mm の場合:ESBL (-)/AmpC (-), (B-A) および (D-C) \geq 5 mm さらに | B-D | および | A-C | \leq 4 mm の場合:ESBL (+), (D-B) および (C-A) \geq 5 mm さらに | A-B | および | C-D | \leq 4 mm の場合:AmpC (+), (D-C) \geq 5 mm さらに | B-A | \leq 4 mm の場合:ESBL (+)/AmpC (+), その他の場合:判定不能。

(3) SMA-DDST

同試験は MBL 産生の対象菌株のみ実施した。McFaland No.0.5 に調整した対象菌株の菌液をミューラーヒントン II 寒天培地に塗布し、SMA ディスクと KB ディスク '栄研' セフタジジム (Ceftazidime 30 μ g 含有) (CAZ ディスク) (栄研化学) および KB ディスク '栄研' メロペネム (Meropenem 10μ g 含有) (MEPM ディスク) (栄研化学) が中心間距離 16 mm となるように配置した。また、SMA ディスクから 30 mm 以上離れた位置にそれぞれもう 1 枚ずつ CAZ および MEPM ディスクを単独で設置し 35 ℃ 、 $18 \text{ 時間好気 培養した。培養後,添付文書に従って阻止円および阻止帯の形成を観察し、各抗菌薬単独ディスクの阻止円直径より SMA ディスクに隣接した抗菌薬ディスクの阻止帯が、SMA ディスクと抗菌薬ディスクの中心を繋いだ軸方向に対し垂直方向に <math>5 \text{ mm}$ 以上拡大した場合に MBL 産生と判定した。

(4) MastAE-SMA

McFaland No.0.5 に調整した対象菌株の菌液をミューラー ヒントン II 寒天培地に塗布し、MastAE (ディスク A~D) とSMAディスクをFigure 1のように配置した。正確な位 置にディスクを配置するため実寸大配置図を印刷し、培地の 下に敷いて設置した。ディスク設置後、35℃、18時間好気 培養した。培養後、ディスクB~Dの阻止円形状を観察し、 阻止円が全て正円である場合(阻止円未形成の場合も含む) はその直径を計測しMastAEの判定法に従って判定した。 ディスクB~Dのいずれかまたは全てにおいて、阻止円が非 正円で SMA ディスク側に強調された阻止帯形成を認めた場 合,以下の通りに判定した;ディスクB,CおよびDの全 てで阻止帯成を認めた場合: MBL (+), ディスク B および Dのみ阻止帯形成を認めた場合: ESBL (+)/MBL (+), ディスク C および D のみ阻止帯形成を認めた場合: AmpC (+)/MBL(+), ディスク D のみ阻止帯形成を認めた場合: ESBL (+)/AmpC (+)/MBL (+), その他の場合:判定 不能。

(5) 検討項目

MastAE では ESBL および AmpC, SMA-DDST では MBL, MastAE-SMA では ESBL, AmpC および MBL について、それぞれ遺伝子検査の結果をゴールドスタンダードとし、一致、不一致および判定不能の割合を算出した。

(6) MIC 値精査

被検菌株の耐性遺伝子保有状況といずれかの表現型検査の結果に相違が認められた場合、CPDXと MEPM の MIC 値を Etest セフポドキシム PX および Etest メロペネム MP(ビオメリュー・ジャパン)を用い、添付文書に従って測定した。

結 果

MastAE-SMA の典型的な反応例を Figure 2 に示す。ESBL 産生菌, AmpC 産生菌および ESBL/AmpC 産生菌では, Mas-

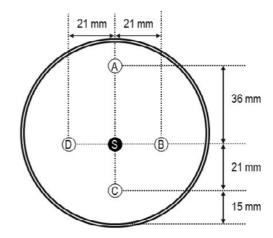


Figure 1. Disk placement position for the MastAE-SMA. (A): mastdisc A (Cefpodoxime 10 μ g), (B): mastdisc B (Cefpodoxime 10 μ g + ESBL inhibitor), (C): mastdisc C (Cefpodoxime 10 μ g + AmpC inhibitor), (D): mastdisc D (Cefpodoxime 10 μ g + ESBL inhibitor + AmpC inhibitor) and (S): metallo- β -lactamase SMA 'Eiken' (sodium mercaptoacetic acid 3 mg).

tAEと同様の阻止円変化が認められた(Figure 2 (a-c))。 MBL 単独産生菌では、SMA の阻害作用によりディスク B, C および D の全てと SMA ディスクの間に阻止帯成を認めた(Figure 2 (d))。 ESBL/MBL 産生菌では、ESBL 阻害剤が存在するディスク B および D と SMA ディスクの間に阻止帯成を認めた(Figure 2 (e))。 AmpC/MBL 産生菌では、AmpC 阻害剤が存在するディスク C および D と SMA ディスクの間に阻止帯成を認めた(Figure 2 (f))。 ESBL/AmpC/MBL 産生菌では、ESBL 阻害剤と AmpC 阻害剤の両方が存在するディスク D と SMA ディスクの間に阻止帯成を認めた(Figure 2 (g))。

MastAE、SMA-DDST および MastAE-SMA の結果を Table 2 に 示 す。MBL 非 産 生 菌 群 で は、MastAE お よ び MastAE-SMA の両法とも PCR との結果一致率は 100% で あ っ た。MBL 産 生 菌 群 に お け る SMA-DDST お よ び MastAE-SMA の両法とも PCR との結果一致率(MBL 陽性率)は 37/42(88%)であった。MBL かつ ESBL および/ま たは AmpC 産生菌群では、ESBL/MBL 産生菌、AmpC/MBL 産生菌、ESBL/AmpC/MBL 産 生菌の すべて に お い て、MastAE-SMA の PCR 一致率は MastAE より高かった。

MastAE、SMA-DDST および MastAE-SMA のいずれかの結果と PCR の結果が不一致または判定不能となった例をTable 3 に示す。MastAE の ESBL/MBL 産生 菌 におけるPCR との結果不一致 16 例の内訳は、ESBL (-)/AmpC (-)が 8 例、AmpC (+)が 4 例および ESBL (+)/AmpC (+)が 4 例であった。また、AmpC/MBL 産生菌における結果不一致 4 例および ESBL/AmpC/MBL 産生菌における結果不一致 2 例の内訳はすべて ESBL (-)/AmpC (-)であった。MBL 産生菌群のうち SMA-DDST 陰性は 5 例あり、IMP型MBL 産生菌と VIM型 MBL 産生菌が 3 例であった。MastAE-SMA と PCRとの結果不一致 6 例および判定不能 5 例は、いずれも SMA-DDST および/または MastAE で PCR との結果が不一致に

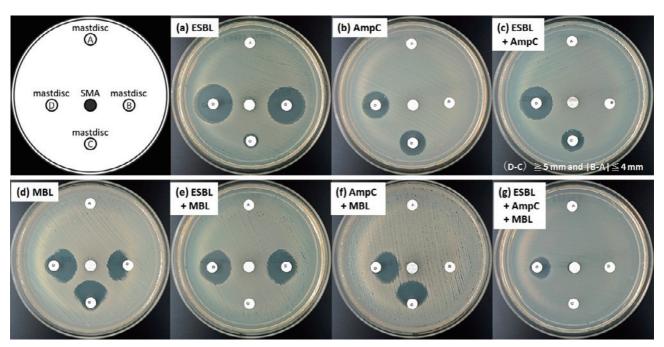


Figure 2. Representative inhibitory effects for the MastAE-SMA.

(a): Escherichia coli producing TEM-3 (NCTC 13351), (b): Enterobacter cloacae (NCTC 13406), (c): E. coli producing CTX-M-9 and CMY-2, (ATCC BAA-2355), (d): E. coli producing IMP-unsequenced (NCTC 13476), (e): Klebsiella pneumoniae producing IMP-1 and CTX-M-1 group (clinical isolated), (f): K. pneumoniae producing IMP-1 and DHA-1 (clinical isolated) and (g): Citrobacter amalonaticus producing IMP-1, CTX-M-1 group and CMY-2 (clinical isolated).

Table 2. Results obtained using the MASTDISCS Combi AmpC and ESβL (MastAE), Sodium mercaptoacetic acid double disk synergy test (SMA-DDST) and MastAE-SMA.

		Number (%	o) of assay r	esult of:		Number	(%) of Mast	AE-SMA r	esult of:
PCR confirmed strain		MastAE		SMA-	DDST	AmpC an	d/or ESBL d	letection	MDI
group (no.)	concordant	discordant	uninter- pretable	positive	negative	concordant	discordant	uninter- pretable	MBL detection
non-CPE (28)	28 (100)	0	0	nt	nt	28 (100)	0	0	na
ESBL (2)	2 (100)	0	0	nt	nt	2 (100)	0	0	na
AmpC (16)	16 (100)	0	0	nt	nt	16 (100)	0	0	na
ESBL/AmpC (10)	10 (100)	0	0	nt	nt	10 (100)	0	0	na
CPE (42)	12 (29)	23 (55)	7 (17)	37 (88)	5 (12)	31 (74)	6 (14)	5 (12)	37 (88)
MBL (13)	10 (77)	0	3 (23)	12 (92)	1 (8)	12 (92)	0	1 (7)	12 (92)
ESBL/MBL (21)	1 (5)	16 (76)	4 (19)	19 (90)	2 (10)	12 (57)	6 (29)	3 (14)	18 (86)
AmpC/MBL (6)	1 (17)	4 (67)	1 (17)	5 (83)	1 (17)	6 (100)	0	0	6 (100)
ESBL/AmpC/MBL (2)	0	2 (100)	0	1 (50)	1 (50)	1 (50)	0	1 (50)	1 (50)
Total (70)	40 (57)	23 (33)	7 (10)	37 (88)	5 (12)	59 (84)	6 (9)	5 (7)	37 (88)

nt, not tasted; na, not applicable.

なっている事例であった。

考 察

今回われわれは、β-lactamase 複数産生菌に対し市販製品 を組み合わせた簡易的かつ迅速な表現型検査法;MastAE-SMA を考案し、遺伝子検査をゴールドスタンダードとして、 市販製品単独で検査を実施した場合との結果一致率を比較検 討した。

MastAE について本来の検出対象菌である MBL 非産生の ESBL および/または AmpC 産生菌に対する有用性の検討は これまでにいくつか報告がされており、いずれも良好な結果 を示している^{4/5)}。本検討においても MastAE は MBL 非産生の ESBL および/または AmpC 産生菌群において PCR との 結果一致率は 100% であった(Table 2)。また、MastAE-SMA

Table 3. List of the strains that showed discordant result with PCR and phenotypic assay.

Strain S										MastAE			SM	SMA-DDST				
Main 1963 K. covyroca M.P. and a 6 6 10 11 12 15 13 13 13 13 14 14 14 14	strain group	Strain No.	Organism	Carba- pen- emase	Other β-lac	tamase	Zon	e dia each (mn	disc disc		ation	Inhib	ition zoi	ne (mm)	Interpre-	Result of MastAE- SMA	MIC b	y Etest /mL)
AWU 19034 K cowyrone NPA1 nd 11 12 15 5 2 2 7 MBL(+) MBL(+) 15 AWU 19134 K cowyrone 1NP1 nd 6 6 10 0 uninerpreached 6 2 2 3 MBL(+) MBL(+) 118 AWU 19305 K covyrone 1NP1 nd 6 6 10					ESBL	AmpC	A				Ű	AZ CA		MEPM-SMA			CPDX	MEPM
AMU 194164 K poeumonine INP1 and 6 10 0 minterpretable 6 23 D 7 MBL (+) MBL(+) 12 AMU 199056 K cyptes IAPE rd 6 6 10 11 12 ABL (-) minterpretable 256 AMU 99072 K pneumonine IAPE TYAPI rd 6 6 ESBL-/AmpC(-) 6 11 12 MBL (-) minterpretable 256 AMU 99073 K pneumonine IAPE CTXAPI rd 6 6 ESBL-/AmpC(-) 6 12 12 MBL (-) minterpretable 256 AMU 99079 K pneumonine IAPE CTXAPI rd 6 6 B.SBL-/AmpC(-) 6 12 2 MBL (-) minterpretable 256 AMU 99079 K pneumonine IAPE CTXAPI rd 6 8 BSBL-/AmpC(-) 6 12 2 MBL (-) minterpretable 256 AML M	MBL	AMU 10534	K. oxytoca	IMP-1	pu	pu	Ξ	13]				21	22	27	MBL (+)	MBL(+)	16	0.25
AUU 199639 K potentronine VINL-1 and 6 6 BSRL-1-AmpCl-1 6 3 2 MBL (+) uninterpretable 2.56 AMU 90630 K preumonine VINL-1 and 6 6 ESRL-1-AmpCl-1 6 1 1 2 MBL (+) uninterpretable 2.56 AMU 90630 K preumonine VINL-1 SINL-1 AmpCl-1 6 1 1 1 MBL (+) uninterpretable 2.56 AMU 90639 K preumonine NDM-5 TRAH-1 6 6 6 S.BSL-1-AmpCl-1 6 1 1 1 MBL (+) uninterpretable 2.56 AMU 90639 K preumonine NDM-5 TRAH-3 6 6 8 SSBL-1-AmpCl-1 6 1 1 MBL (+) MBL (+) MBL (+) MBL (+) MBL (+) SSBL-1-AMBCl-1 SSBL-1-AMBC		AMU 13-1161	K. pneumoniae	IMP-1	pu	pu						23	15	22	MBL (+)	MBL(+)	128	4
$ \begin{tabular}{ l l l l l l l l l l l l l l l l l l l$		AMU 15-9065	K. oxytoca	IMP-1	pu	pu						24	20	27	MBL (+)	MBL(+)	256	4
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		NCTC 13440	K. pneumoniae	VIM-1	pu	pu					<u></u>	9	18	20		uninterpretable	>256	_
AMU 990121 K. preumonie NDM STRY-28, nd 6 6 6 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 6 11 12 MBL(-) uninterpretable > 256 AMU 990696 K. preumonie NDM STRY-19, nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 12 12 12 MBL(-) uninterpretable > 256 AMU 990690 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 15 2 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 16 24 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 16 24 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 19 20 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 190780 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 19 20 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 190780 K. preumonie NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 19 20 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 ESBL(-γ/AmpC(-) 6 19 20 MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 11 uninterpretable 6 19 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 8 11 uninterpretable 6 19 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 15 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 15 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 16 17 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 16 17 20 S MBL(+) ESBL(+γ/MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 6 17 20 S MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 6 17 20 S MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-1 cTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+γ/AmpC(+) 6 17 20 S MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-1 nd CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(-γ/AmpC(+) 6 17 20 S MBL(+) AmpC(+) MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-1 nd CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(-γ/AmpC(+) 6 17 20 S MBL(+) AmpC(+) MBL(+) > 256 AMU 990690 E. coli NP-1 nd CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(-γ/AmpC(+) 6 17 2	ESBL/	AMU 990590	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu					_		9	13	MBL (+)	uninterpretable	>256	>32
	MBL	AMU 990121	K. pneumoniae	NDM-1		pu	9					9	11	12	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
AMU 900650 K pneumoniae INP6 CTX-M2g nd 6 6 B ESBL(-)/Amp(Ct) 8 TSBL(+)/Amp(Ct) 1 5 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 900650 K covroca INP6 CTX-M2g nd 6 6 8 ESBL(-)/Amp(Ct) 6 1 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 900653 K covroca INP6 CTX-M2g nd 6 6 8 ESBL(-)/Amp(Ct) 6 1 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 900653 K covroca INP6 CTX-M2g nd 6 6 8 13 uninterpretable 6 19 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 900656 E coli INP6 CTX-M2g nd 6 6 8 1 1 12 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 900666 E coli INP6 CTX-M2g nd 6 6 8 1 1 2 3 M		AMU 990831	E. coli	NDM-5		pu						9	12	12	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
AMU 99060 K pneumoniae IMP-6 CTXAA2g nd 6 6 8 ESBL(-)/Amp(-) 7 17 15 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 990603 K cayroca IMP-6 CTXAA2g d 6 6 8 ESBL(-)/Amp(-) 6 6 19 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 990603 K cpreumoniae IMP-6 CTXA-42g nd 6 6 8 ESBL(-)/Amp(-) 6 19 26 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 130176 K pneumoniae IMP-1 CTXA-42g nd 6 6 8 12 uninterpretable 6 1 17 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 90076 E coil IMP-6 CTXA-42g nd 6 6 1 1 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) 256 AMU 90069 E coil IMP-6 CTX-42g nd 6 6 1		AMU 990596	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	9	3 8		_	13	18	22	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AMU 990633 K. avytoca NPP CTX.M.2g nd 6 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 16 24 MEL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990637 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 19 23 MEL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 190767 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 8 12 uninterpretable 10 23 17 23 MEL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990752 C. amabanaticus NPP CTX.M.2g nd 6 6 8 11 uninterpretable 6 19 19 28 MEL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990752 C. amabanaticus NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 6 6 13 23 MEL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990753 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 15 20 NB CHY ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990754 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 15 20 NB CHY ESBL(-)/MBL(+) > 256 AMU 990755 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 15 20 NB CHY ESBL(-)/MBL(+) > 256 AMU 990754 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 15 20 NB CHY ESBL(-)/MBL(+) > 256 AMU 990755 K. preumoniae NPP CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(-)/AmpC(+) 15 20 NB CHY ESBL(-)/MBL(+) > 256 AMU 990709 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NB CHY NBL(+) NBL(+) NBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 11 IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 II IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 II IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+) MBL(+) AmpC(+) > 256 AMU 99070 E. coli mpC CTX.M.2g nd 6 6 II IS AmpC(+) 6 10 NBL(+) AmpC(+) AmpC(+) > 25		AMU 990600	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	9	3 8			17	15	22	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AMU 9906635 K coxytoca IMP6 CTX.M.2g nd 6 6 8 ESBL(-1)/AmpC(-1) 6 19 26 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256 AMU 990607 K pneumonize IMP6 CTX.M.2g nd 6 8 ESBL(-1)/AmpC(-1) 6 19 26 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256 AMU 130176 K pneumonize IMP-1 CTX.M.2g nd 6 8 11 uninterpretable 6 7 17 24 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256 AMU 900605 E coli IMP-6 CTX.M.2g nd 6 6 11 uninterpretable 6 7 17 24 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256 AMU 900605 E coli IMP-6 CTX.M.2g nd 6 6 11 uninterpretable 6 7 17 24 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256 AMU 90106 E coli IMP-6 CTX.M.2g nd 6 6 11 ESBL(+1)/AmpC(+1) 2 MBL(+1) ESBL(+1)/MBL(+1) 256		AMU 990603	K. oxytoca	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9				_	9	16	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	32
AMU 990607 K pneumoniae IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 8 ESBL/-/AmpC(-) 6 19 26 MBL (+) MBL(+) MBL(+) MBL(+) MBL(+) MBL(+) MBL(+) S26 AMU 147264 K pneumoniae IMP-1 CTX.M-9g nd 6 8 11 uniterpretable 6 7 17 21 MBL(+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990606 E coii IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 1 17 21 MBL(+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990750 C amalonaticus IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 1 17 21 MBL(+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990700 E coii IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 1 ESBL(+)/AmpC(+) 6 18 2 MBL(+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 90060 K pneumoniae IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6		AMU 990653	K. oxytoca	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	_			_	9	16	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
AMU 13-0176 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 8 9 13 uninterpretable 1 23 IT 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 14-7264 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 8 1 uninterpretable 6 9 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990529 C. amadonaticus IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 9 uninterpretable 6 0 28 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990599 E. coli IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 ESBL(+)/AmpC(+) 6 1 SBL(+)/AmpC(+) 6 18 SBL(+)/AmpC(+) 6 1 SBL(+)/AmpC(+) 8 1 MBL (+) SBL(+)/MBL(+) >256 AMU 99059 K. pneumoni		AMU 990607	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	_			_	9	19	56		MBL(+)	>256	16
AMU 147264 K, pneumoniae IMP-1 CTX.M-9g nd 6 8 12 uninterpretable 6 7 17 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990605 E coli IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 1 uninterpretable 6 7 17 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990752 C amalonaticus IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/Amp(+) 6 28 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990795 E coli IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/Amp(+) 6 18 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990169 E coli IMP-1 CTX.M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/Amp(+) 6 13 33 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 99059 K. pneumoniae IMP-6 CTX.M-2g nd 6 6 11 33 34 14 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+)<		AMU 13-0176	K. pneumoniae	IMP-1	CTX-M-9g	pu	9	8					17	23	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	>32
AMU 990665 E coli IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 24 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990762 C. amalonaticus IMP-6 CTX-M-1g nd 6 6 1 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 99079 E. coii IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 23-0933 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990165 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 2 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990604 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 2 MBL (+) MBL(+) MBL(+) >256 AMU 990690 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 1 1		AMU 14-7264	K. pneumoniae	IMP-1	CTX-M-9g	pu	9	3 9	3 1			19	19	28	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AMU 990752 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-1g nd 6 6 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 6 6 13 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 990759 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 6 6 13 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 99059 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 7 12 ESBL(+)/AmpC(+) 12 20 18 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 6 17 20 18 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 AmpC(+) 6 10 23 MBL (+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 AmpC(+) 6 11 2 14 MBL (+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coil IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 AmpC(+) 6 11 2 14 MBL (+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coil IMP-1 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 AmpC(+) 6 11 2 14 MBL (+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 CTX-M-2g nd 6 6 11 12 AmpC(+) 6 11 2 14 MBL (+) MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 12 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 10 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 10 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 10 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 99050 E. coic IMP-1 nd DHA-1 6 6 6		AMU 990605	E. coli	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	3 9	3 1			_	17	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AMU 990599		AMU 990752	C. amalonaticus	IMP-1	CTX-M-1g	pu	9	9				9	20	78	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
AMU 23-0953 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 7 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 15 20 18 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990105 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 6 17 20 39 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 99013 K. oxytoca IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 ESBL(+)/AmpC(+) 6 16 23 MBL (+) BSBL(+)/MBL(+) >256 AMU 99053 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 12 AmpC(+) 6 11 12 AmpC(+) 8 10 18 23 MBL (+) MBL(+) >256 AMD 90 9 11 12 AmpC(+) 13 AmpC(+) 8 10 18 23 MBL (+) MBL(+) >256 AMD AMD 90		AMU 990599	E. coli	IMP-6	CTX-M-2g, CTX-M-9g	pu	9					9	13	23	MBL (+)	ESBL(+)/AmpC(+)/MBL(+)	>256	32
AMU 990105 K pneumoniae IMP6 CTX-M-2g nd 6 6 1 ESBL(+)/AmpC(+) 1 20 18 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 991153 K. oxytoca IMP-1 CTX-M-1g nd 6 6 11 20 29 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990592 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 1 13 AmpC(+) 6 16 23 MBL (+) MBL(+) >256 AMU 990691 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 1 1 23 ABL (+) MBL (+) MBL(+) >256 AMU 990691 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-2g nd 6 1 1 23 ABL (+) MBL (+) MBL (+) >256 AMU 990690 E. cloacae IMP-1 nd 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 17 25 MBL (+) AmpC(+)		AMU 23-0953	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	2	3 1				18	22	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	0.5
AMU 99153 K. oxytoca IMP-1 CTX-M-1g nd 6 6 11 ESBL(+)/Amp(+) 6 6 16 23 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990592 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 Amp(+) 6 6 16 23 MBL (+) MBL(+) >256 AMU 990601 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 Amp(+) 8 10 18 23 MBL (+) MBL (+) 256 AMU 990640 E. colacae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 6 11 23 Amp(+) 8 23 Amp(+) 256 AMU 990655 K. pneumoniae IMP-1 cTX-M-9g nd 6 6 11 25 14 ABL (+) Amp(+) 256 AMU 990759 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 ESBL(-)/Amp(-) <td< td=""><td></td><td>AMU 990105</td><td>K. pneumoniae</td><td>IMP-6</td><td>CTX-M-2g</td><td>pu</td><td>9</td><td>, 9</td><td>7</td><td></td><td>mpC(+) 15</td><td>3 20</td><td>18</td><td>22</td><td>MBL (+)</td><td>ESBL(+)/MBL(+)</td><td>>256</td><td>2</td></td<>		AMU 990105	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	, 9	7		mpC(+) 15	3 20	18	22	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
AMU 990592 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 1 13 AmpC(+) 6 6 16 23 MBL(+) MBL(+) >256 AMU 990601 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 1 13 4 AmpC(+) 6 11 12 14 MBL(+) MBL(+) 256 AMU 990604 E. coli IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 12 14 MBL(+) MBL(+) 256 AMU 990630 E. colacae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 17 25 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990635 E. cloacae IMP-1 nd 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 16 18 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 ES		AMU 991153	K. oxytoca	IMP-1	CTX-M-1g	pu	9	9			mpC(+) 6	17	20	56	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AMU 990601 K. pneumoniae IMP-6 CTX-M-2g nd 6 7 13 14 AmpC(+) 8 10 18 23 MBL(+) MBL(+) 256 AMU 990604 E. coli IMP-6 CTX-M-2g nd 6 11 12 14 MBL(+) MBL(+) MBL(+) 556 AMU 990651 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 6 11 24 MBL(+) MBL(+) 32 AMU 990650 E. cloacae IMP-1 nd 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 17 25 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) 256 AMU 990659 E. cloacae IMP-1 nd 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) 256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+)/AmpC(-) 6 13 <t< td=""><td></td><td>AMU 990592</td><td>K. pneumoniae</td><td>IMP-6</td><td>CTX-M-2g</td><td>pu</td><td>9</td><td>. 9</td><td></td><td></td><td>9</td><td>9</td><td>16</td><td>23</td><td>MBL (+)</td><td>MBL(+)</td><td>>256</td><td>∞</td></t<>		AMU 990592	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	. 9			9	9	16	23	MBL (+)	MBL(+)	>256	∞
AMU 990604 E. coli IMP-6 CTX-M-2g nd 6 6 11 13 AmpC(+) 6 11 12 14 MBL(+) MBL(+) > 256 AMU 990651 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 6 11 12 AmpC(+) 11 25 14 24 MBL(+) MBL(+) 32 AMU 990169 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 16 18 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 990235 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 15 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 minterpretable 6 20 25 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) > 256 AMU 990733 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-12 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(+) ESBL(-)/MBL(+) = 256 AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-12 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL(+) ESBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-		AMU 990601	K. pneumoniae	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9				∞	10	18	23	MBL (+)	MBL(+)	256	2
AMU 990651 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-9g nd 6 6 11 12 AmpC(+) 11 25 14 24 MBL(+) MBL(+) MBL(+) 32 AMU 990169 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 17 25 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990170 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 16 18 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990235 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 15 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 13 15 27 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >257 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 Uninterpretable 6 20 25 MBL(+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-15 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(+) ESBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC(-)/AmpC(-)/AmpC(-) 6 15 25 MBL(-)/AmpC		AMU 990604	E. coli	IMP-6	CTX-M-2g	pu	9	. 9			9	11	12	14	MBL (+)	MBL(+)	>256	32
AMU 990169 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 17 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990170 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 16 18 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990235 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 13 15 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >257 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 13 15 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >258 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 uninterpretable 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256 AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-18 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/MBL(+) >256		AMU 990651	K. pneumoniae	IMP-1	CTX-M-9g	pu	9	. 9			11	_,	14	24	MBL (+)	MBL(+)	32	~
AMU 990170 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 7 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 16 18 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990235 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 13 15 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >257 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 9 23 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >258 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 uninterpretable 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-12 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ Amu 990540 AmpC(+)/MBL(+) S26 AMU 990550 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-12 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AmpC(+)/MBL(+) S26	AmpC/	AMU 990169	E. cloacae	IMP-1	pu	Chrom	9	, 9	2 8		_	14	17	22	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	2
AMU 990235 E. cloacae IMP-1 nd Chrom 6 6 6 7 ESBL(-)/AmpC(-) 6 14 6 10 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 13 15 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >257 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 9 23 27 MBL (-) AmpC(+)/MBL(+) >258 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 uninterpretable 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-12 CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AmpC(+)/MBL(+) >256	MBL	AMU 990170	E. cloacae	IMP-1	pu	Chrom	9	, 9	7 8		_	16	18	27	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	16
AMU 990595 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 13 15 27 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >257 AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 9 23 27 MBL (-) AmpC(+)/MBL(+) >258 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 uninterpretable 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae IMP-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-1g CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AmpC(+)/MBL(+) >256		AMU 990235	E. cloacae	IMP-1	pu	Chrom	9	9	5 7	$^{\prime}$ ESBL(-)/A _I	_	14	9	10	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	>32
AMU 990645 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 12 12 AmpC(+) 6 9 23 27 MBL (-) AmpC(+)/MBL(+) >258 AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 uninterpretable 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae NDM-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+) = 256 AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-1g CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/AmbL(+) >256		AMU 990595	K. pneumoniae	IMP-1	pu	DHA-1	9	9			_	13	15	27		AmpC(+)/MBL(+)	>257	16
AMU 990743 K. pneumoniae IMP-1 nd DHA-1 6 6 6 6 uninterpretable 6 6 20 25 MBL (+) AmpC(+)/MBL(+) >256 ATCC BAA-2146 K. pneumoniae NDM-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ >256 AMU 990533 C. amalonaticus IMP-1 CTX-M-1g CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AmpC(+)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/ AmpC(+)/MBL(+)		AMU 990645	K. pneumoniae	IMP-1	pu	DHA-1	9				9	6	23	27	MBL(-)	AmpC(+)/MBL(+)	>258	0.25
ATCC BAA-2146 <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 CTX-M-15 CMY-6 6 6 6 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 10 10 MBL (-) uninterpretable >256 AMU 990533 <i>C. amalonaticus</i> IMP-1 CTX-M-1g CMY-2 6 6 8 ESBL(-)/AmpC(-) 6 6 15 25 MBL (+) ESBL(+)/AmpL(+)		AMU 990743	K. pneumoniae	IMP-1	pu	DHA-1	9	9				9	20	22	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	4
$AMU~990533 \qquad \textit{C. amalonaticus} ~~IMP-1 ~~CTX-M-1g ~~CMY-2~~6~~6~~6~~8~~ESBL(-)/AmpC(-)~~6~~6~~15~~25~~MBL~(+)~~ESBL(+)/AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)~~AmpC(+)/MBL(+)~~AmpC(+)~~$	ESBL/	ATCC BAA-214		NDM-1	CTX-M-15	CMY-6	9	9	9 6		_	9	10	10	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
	AmpC/ MBL	AMU 990533		IMP-1		CMY-2	9	9	20		_	9	15	22	MBL (+)	ESBL(+)/AmpC(+)	>256	4

nd, not detected; Chrom, Choromosamal AmpC. See Table 2 for any other abbreviations.

も同様の結果を示したことから、SMA ディスクの追加は MastAEの MBL 非産生菌における ESBL および/または AmpC の鑑別に影響を及ぼさないことが示唆された。MBL は ESBL 阻害剤にも AmpC 阻害剤にも阻害されないため、 MastAE のディスク A~D に含有される CPDX を ESBL お よび/または AmpC の産生性と無関係にすべて分解する。 従って、MastAEでは、理論上、MBL 産生菌は ESBL およ び/または AmpC の産生性に関わらず ESBL (-)/AmpC (-) または判定不能の結果となることが考えられる。この 問題点については MastAE の添付文書の Limitations でも言 及されているが、実際のMBLかつESBLおよび/または AmpC 産生菌株で MastAE を検討した事例は我々が検索し うる限りこれまでに報告されていない²⁾。本研究では、MBL かつ ESBL および/または AmpC 産生菌群の多くが MastAE で上述の通り ESBL (-)/AmpC (-) または判定不能の結 果となり、本菌群における MastAE と PCR の結果一致率は 0~17% に留まった (Table 2)。一方, 本研究の新規の知見 として、ESBL/MBL 産生菌で AmpC(+), ESBL(+)/AmpC (+)となる非特異的事例がそれぞれ4例ずつ認められた(Table 3)。MastAEのディスクCおよび/またはDで阻止帯形 成が認められたことから、両ディスクに共通して含まれる AmpC 阻害剤が被検菌になんらかの影響を及ぼしたことが 示唆される。AmpC 阻害剤が IMP 型 MBL に与える影響に ついては、これまでに、AmpC 阻害剤のひとつである Cloxacillin の添加により IMP型 MBL 産生菌の MEPM の MIC が低下したとの報告がある⁶⁾。MastAE の基剤である CPDX, そして MastAEのディスク C および D に含まれる AmpC 阻害剤においても同様の事象が起きているかどうか、今後さ らなる検証が必要と考える。

MBL 産生菌群に対する SMA-DDST および MastAE-SMA の PCR との結果一致率(MBL 検出性能)はともに 88% と同等であった(Table 2)。

NDM 型および VIM 型は SMA-DDST で陰性と判定され やすいことが報告されており^{7/8},本研究においても NDM 型 MBL 産生菌および VIM 型 MBL 産生菌は、すべての菌株が SMA-DDST, MastAE-SMAの両法で陰性の結果となった (Table 3)。NDM 型および VIM 型 MBL 産生菌に対しては EDTA が有効であるとの報告があるが、IMP型 MBL 産生 菌が大部分を占めるわが国の現在の疫学としては、第一選択 として SMA を用いることが推奨される³⁾⁹⁾。近年, IMP型, NDM 型および VIM 型 MBL 産生菌のすべてに有効な阻害 剤(Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids)が報告されて おり、早期の市販製品化が望まれる¹⁰⁾。SMA-DDST では(そ の抗菌薬に感受性で) 抗菌薬ディスク単独ですでに阻止円直 径が大きい場合、SMA によるそれ以上の阻止帯拡大が認め にくくなる。AmpC/IMP 型 MBL 産生菌で SMA-DDST が 陰性となった菌株 (AMU 990645) では、MEPM の MIC が 0.25 μg/mL と低値であり、SMA-DDST における MEPM ディスク単独の阻止円直径が23 mmと大きく、SMAディ スクによる阻止帯の拡大が5 mm以下となった(Table 3)。 本菌株は AmpC/ESBL 産生菌であったことから、MBL が 阻害されたとしても AmpC により CAZ が分解されるため, CAZ ディスクによる SMA-DDST も陰性化したことが結果 不一致の原因として考えられた。一方、MastAE-SMA では AmpC/ESBL 産生菌として検出されており、PCR の結果と一致した。よって、MEPM の MIC 値が低く、ESBL および/または AmpC の複数産生が考えられる MBL 産生疑い菌に対しては、MastAE-SMA が SMA-DDST より効果的と考えられた。逆に、ESBL/IMP 型 MBL 産生菌(AMU 990590)では SMA-DDST 陽性、MastAE-SMA 陰性となった。その要因については不明だが、MBL および ESBL 産生以外の CPDX 耐性機序を有している可能性が示唆される。ESBL、AmpC、MBL 以外の CPDX 耐性機序として TEM-1 や OXA-30 β-lactamase の産生、ポーリンの変異が報告されている¹¹¹。このような菌株では、CAZ、MEPM など複数の抗菌薬を用いることが可能な従来の SMA-DDST が有用であると考えられた。

本研究における検査法の限界として、対象菌株に ESBL および/または AmpC 産生型(カルバペネマーゼ非産生)のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌が含まれていないため、このような菌株に対して MastAE-SMA が正しく鑑別可能か検討されていないことが挙げられる。MastAE-SMA は ESBL、AmpC、MBL 以外の CPDX 分解酵素 (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase、OXA-2-like、OXA-10-like など)を産生する菌株、ポーリン変異など β -lactamase 以外の CPDX 耐性機序を有する菌株では正しく判定ができないことが考えられる。また、CPDX を分解しない OXA-48-like を検出することはできない。

結語として、MastAE-SMA は MBL かつ ESBL および/または AmpC 産生菌の鑑別において MastAE より優れた結果を示し、MBL の鑑別においては SMA-DDST と同等の結果を示した。従って、わが国の疫学を考慮した場合、MastAE-SMA は臨床微生物検査室における ESBL、AmpC および MBL 産生菌鑑別の第一選択として利用できるものと考える。ただし、上述の検査法の限界については留意する必要があると考える。

利益相反:本研究に関して企業などの利益相反はない。

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.
- 2) MASTDISCS *Combi* AmpC and ESβL Detection Set. D68C 添付文書 IFU179 GB 03/21 v13.
- Sakanashi, D, N Miyazaki, Y Kawamoto, et al. 2019. A novel disk-based detection method with superior sensitivity for βlactamase production in third-generation cephalosporinresistant *Enterobacteriaceae*. J. Infect. Chemother. 25: 330-336
- 4) 後藤雪乃,安藤航平,古川貴誉子,他. 2014. セファロスポリン耐性腸内細菌の検出における AmpC/ESBL 鑑別ディスクの有用性に関する検討. 岐阜県臨床検査技師会誌 147: 30-33.
- 5) 田中友理, 宮本仁志, 村上 忍, 他. 2016. AmpC/ESBL

- 鑑別ディスクの検討. 愛媛県臨床検査技師会誌 35: 15-19.
- Yamamoto, N., R. Kawahara, Y. Akeda, et al. 2017. Development of selective medium for IMP-type carbapenemaseproducing *Enterobacteriaceae* in stool specimens. BMC Infect. Dis. 17: 229.
- 7) 三木寛二. 2010. SMA ダブルディスク法を用いたスクリーニング検査が陰性の VIM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 Pseudomonas aeruginosa によるアウトブレイク. 感染症誌 84: 721-726.
- 8) 石井良和. 2010. 新規カルバベネム系薬耐性因子, ニュー・デリー型メタロβラクタマーゼ (NDM-1) の特徴. 日化療会誌 58 (6): 639-643.
- 9) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant

- Enterobacterales: CRE) 病原体サーベイランス, 2021 年. 国立感染症研究所.
- https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/cre-iasrd/12223-522d0 3.html 2024 年 5 月 31 日現在.
- 10) Norizuki, C., J. Wachino, W. Jin, et al. 2021. Practical Agar-Based Disk Diffusion Tests Using Sulfamoyl Heteroarylcar-boxylic Acids for Identification of Subclass B1 Metallo-β-Lactamase-Producing Enterobacterales. Journal of Clinical Microbiology. 59 (10).
- Oliver, A., LM Weigel, JK Rasheed, et al. 2002. Mechanisms of Decreased Susceptibility to Cefpodoxime in *Escherichia* coli. Antimicrob Agents Chemother. 46 (12): 3829-3836.

Development and evaluation of a new phenotypic method for detection of extended-spectrum-, AmpC- and/or metallo-β-lactamase producing Enterobacterales

Mina Takayama ¹⁾, Daisuke Sakanashi ¹⁾, Yuzuka Kawamoto ¹⁾, Narimi Miyazaki ¹⁾, Tomoko Ohno ¹⁾, Atsuko Yamada ¹⁾, Akiko Nakamura ¹⁾, Hirotoshi Ohta ¹⁾, Hiroyuki Suematsu ¹⁾, Chida Sumie ²⁾, Jun Hirai ¹⁾ ²⁾, Nobuhiro Asai ¹⁾ ²⁾, Nobuaki Mori ¹⁾ ²⁾, Hiroshige Mikamo ¹⁾ ²⁾

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, Aichi Medical University Hospital

²⁾ Department of Clinical Infectious Diseases, Aichi Medical University Hospital

Efficient detection of extended-spectrum β-lactamase (ESBL), AmpC β-lactamase (AmpC), and metallo β-lactamase (MBL) is a challenge in clinical laboratories. In this study, we developed and evaluated MastAE-SMA, a new method for detecting the β -lactamases, by combining MASTDISCS Combi AmpC and EsβL ID set (MastAE) and sodium mercaptoacetic acid double disk synergy test (SMA-DDST). MastAE-SMA, MastAE, and SMA-DDST were used to test 63 phenotypically and genotypically well-characterized Enterobacterales clinical isolates and seven reference strains (including two ESBL, 16 AmpC, 10 ESBL/AmpC, 13 MBL, 21 ESBL/MBL, six AmpC/MBL, and two ESBL/AmpC/MBL), and the results were compared with PCR results. MastAE and MastAE-SMA showed 100% (28/28) agreement with the PCR results for ESBL- and AmpC-producers, and 7% (2/29) and 66% (19/29) agreement, respectively, for MBL and ESBL- and/or AmpC producers. For MBL detection, SMA-DDST and MastAE-SMA showed 88% (37/42) agreement with PCR results. In conclusion, MastAE-SMA is an effective method for more accurately differentiating β -lactamases in MBL and ESBL and/or AmpC-producing bacteria.