

[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⁾・宮崎成美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)}・三嶋廣繁^{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られる。

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 β -lactamase (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¹⁾。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 β -lactamase 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

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 ESBL 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 β -lactamase 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°C 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

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
高山美奈
TEL: 0561-62-3311 (内線 35823)
E-mail: takayama.mina.975@mail.aichi-med-u.ac.jp

Table 1. Bacterial strains.

β -lactamase production	No. of isolates					Total
	<i>C. amalonaticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
Clinical isolates	2	23	3	9	26	63
non-CPE						
AmpC singular						
CMY-2		7				7
DHA-1		6			2	8
ESBL with AmpC						
CTX-M-1-group + CMY-2		1				1
CTX-M-1-group + DHA-1		2				2
CTX-M-9-group + CMY-2		2				2
CTX-M-9-group + DHA-1		1			1	2
SHV-12 + DHA-1					2	2
CPE						
MBL						
IMP-1				6	5	11
MBL with ESBL						
IMP-1 + CTX-M-1-group	1			1	1	3
IMP-1 + CTX-M-9-group					3	3
IMP-6 + CTX-M-2-group		2		2	8	12
IMP-6 + CTX-M-2- and -M-9-group		1				1
NDM-1 + SHV-28 + TEM-104 + CTX-M-1-group					1	1
NDM-5 + TEM-104 + CTX-M-1-group		1				1
MBL with AmpC						
IMP-1 + Chromosomal AmpC			3			3
IMP-1 + DHA-1					3	3
MBL with ESBL and AmpC						
IMP-1 + CTX-M-1-group + CMY-2	1					1
Reference strains		4	1		2	7
ESBL singular						
TEM-3 ^a		1				1
CTX-M-15 ^b		1				1
AmpC singular						
Chromosomal AmpC ^c			1			1
ESBL with AmpC						
CTX-M-9-group + CMY-2 ^d		1				1
MBL						
IMP-unsequenced ^e		1				1
VIM-1 ^f					1	1
MBL with ESBL and AmpC						
NDM-1 + CTX-M-1-15 + CMY-6 ^g					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。対象菌株はボ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 μ g, ディスク B : CPDX 10 μ g + ESBL 阻害剤, ディスク C : CPDX 10 μ g + AmpC 阻害剤, ディスク D : CPDX 10 μ g + 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「カルバペ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-

D | がすべて ≤ 2 mm の場合: ESBL (–)/AmpC (–), (B-A) および (D-C) ≥ 5 mm さらに |B-D| および |A-C| ≤ 4 mm の場合: ESBL (+), (D-B) および (C-A) ≥ 5 mm さらに |A-B| および |C-D| ≤ 4 mm の場合: AmpC (+), (D-C) ≥ 5 mm さらに |B-A| ≤ 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’ セフトジジム (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 (Mero-penem 10 μ 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 $^{\circ}$ C, 18 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 5 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 $^{\circ}$ C, 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 の全てで阻止帯形成を認めた場合: 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 セフトドキシム PX および Etest メロペネム MP (バイオメリュー・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-

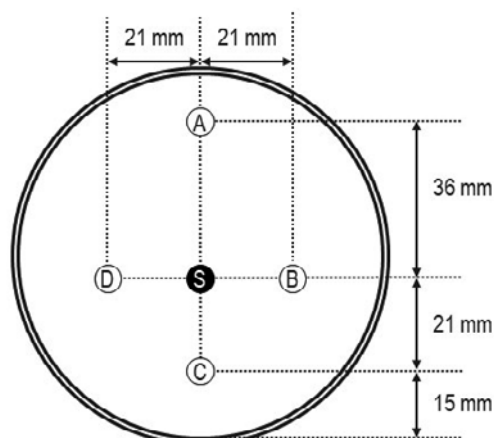


Figure 1. Disk placement position for the MastAE-SMA. (A): mastdisc A (Cefpodoxime 10 μ g), (B): mastdisc B (Cefpodoxime 10 μ g + ESBL inhibitor), (C): mastdisc C (Cefpodoxime 10 μ g + AmpC inhibitor), (D): mastdisc D (Cefpodoxime 10 μ g + ESBL inhibitor + AmpC inhibitor) and (S): metallo- β -lactamase 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形成を認めた (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形成を認めた (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形成を認めた (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形成を認めた (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 産生菌がそれぞれ 1 例および NDM 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

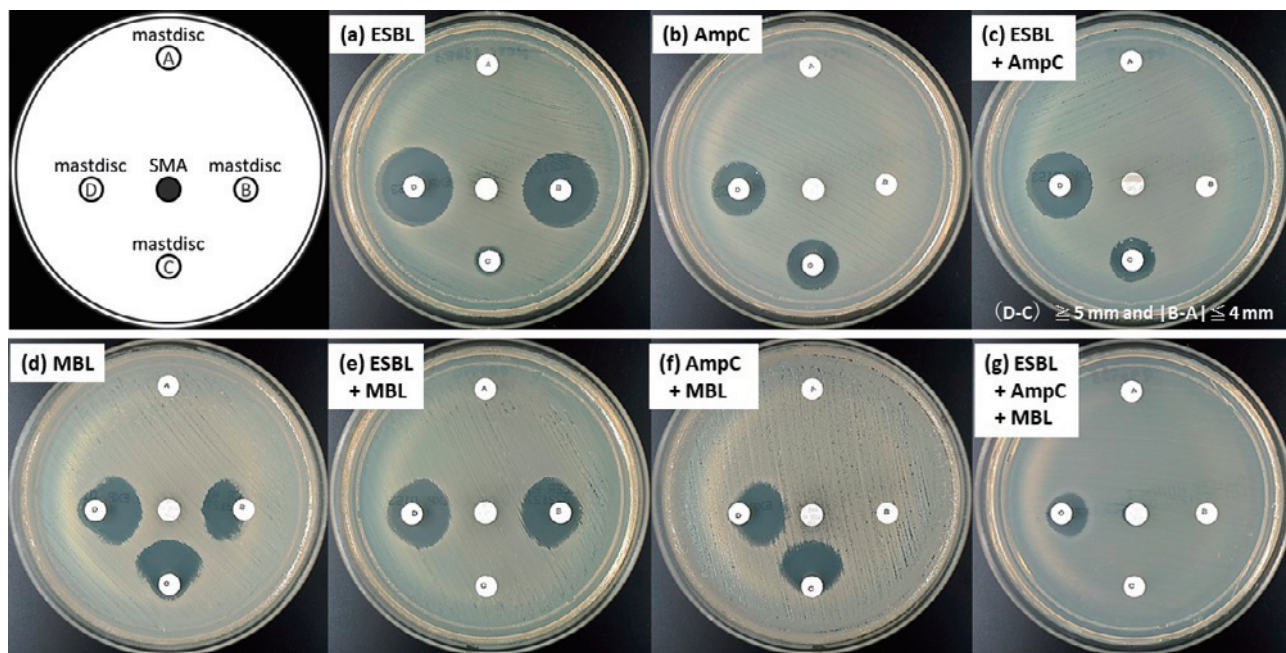


Figure 2. Representative inhibitory effects for the MastAE-SMA.

(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.

PCR confirmed strain group (no.)	Number (%) of assay result of:					Number (%) of MastAE-SMA result of:			
	MastAE			SMA-DDST		AmpC and/or ESBL detection			MBL detection
	concordant	discordant	uninterpretable	positive	negative	concordant	discordant	uninterpretable	
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 group	Strain No.	Organism	Carba-pen-emase	MastAE		SMA-DDST										Result of Mast/AE-SMA	MIC by Etest (μg/mL)					
				Other β-lactamase	Zone diameter of each disc (mm)	Interpretation				Inhibition zone (mm)												
						ESBL	AmpC	A	B	C	D	CAZ-SMA	MEPM-SMA	MEPM-SMA	Interpre-tation							
MBL	AMU 10534	<i>K. oxytoca</i>	IMP-1	nd	nd	11	13	12	15	uninterpretable				6	21	22	27	MBL (+)	MBL(+)	16	0.25	
	AMU 13-1161	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	nd	nd	6	6	10	10	uninterpretable				6	23	15	25	MBL (+)	MBL(+)	128	4	
	AMU 15-9065	<i>K. oxytoca</i>	IMP-1	nd	nd	6	6	10	11	uninterpretable				6	24	20	27	MBL (+)	MBL(+)	256	4	
	NCTC 13440	<i>K. pneumoniae</i>	VIM-1	nd	nd	6	6	6	6	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	18	20	MBL (-)	uninterpretable	>256	1	
	AMU 990590	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	6	ESBL(-)/AmpC(-)				12	17	6	13	MBL (+)	uninterpretable	>256	>32
ESBL/ MBL	AMU 990121	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	SHV-28, TEM-104, CTX-M-1g	nd	nd	6	6	6	6	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	11	12	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
	AMU 990831	<i>E. coli</i>	NDM-5	CTX-M-1g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	12	12	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
	AMU 990596	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				8	13	18	25	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
	AMU 990600	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				7	17	15	25	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
	AMU 990603	<i>K. oxytoca</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	16	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	32
AmpC/ MBL	AMU 990653	<i>K. oxytoca</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	16	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
	AMU 990607	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	19	26	MBL (+)	MBL(+)	>256	16
	AMU 13-0176	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	CTX-M-9g	nd	nd	6	8	9	13	uninterpretable				10	23	17	23	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	>32
	AMU 14-7264	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	CTX-M-9g	nd	nd	6	6	8	12	uninterpretable				6	19	19	28	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
	AMU 990605	<i>E. coli</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	8	11	uninterpretable				6	7	17	24	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
	AMU 990752	<i>C. amalonaticus</i>	IMP-1	CTX-M-1g	nd	nd	6	6	6	9	uninterpretable				6	6	20	28	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
	AMU 990599	<i>E. coli</i>	IMP-6	CTX-M-2g, CTX-M-9g	nd	nd	6	6	6	11	ESBL(+)/AmpC(+)				6	6	13	23	MBL (+)	ESBL(+)/AmpC(+)/MBL(+)	>256	32
	AMU 23-0953	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	7	6	11	ESBL(+)/AmpC(+)				15	20	18	22	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	0.5
	AMU 990105	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	7	12	ESBL(+)/AmpC(+)				12	20	18	25	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	2
	AMU 991153	<i>K. oxytoca</i>	IMP-1	CTX-M-1g	nd	nd	6	6	6	11	ESBL(+)/AmpC(+)				6	17	20	29	MBL (+)	ESBL(+)/MBL(+)	>256	8
AmpC/ MBL	AMU 990592	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	11	13	AmpC(+)				6	6	16	23	MBL (+)	MBL(+)	>256	8
	AMU 990601	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	7	13	14	AmpC(+)				8	10	18	23	MBL (+)	MBL(+)	256	2
	AMU 990604	<i>E. coli</i>	IMP-6	CTX-M-2g	nd	nd	6	6	11	13	AmpC(+)				6	11	12	14	MBL (+)	MBL(+)	>256	32
	AMU 990651	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	CTX-M-9g	nd	nd	6	6	11	12	AmpC(+)				11	25	14	24	MBL (+)	MBL(+)	32	8
	AMU 990169	<i>E. cloacae</i>	IMP-1	nd	Chrom	6	6	7	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	14	17	25	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	2	
	AMU 990170	<i>E. cloacae</i>	IMP-1	nd	Chrom	6	6	7	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	16	18	27	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	16	
	AMU 990235	<i>E. cloacae</i>	IMP-1	nd	Chrom	6	6	6	7	ESBL(-)/AmpC(-)				6	14	6	10	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	>32	
	AMU 990595	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	nd	DHA-1	6	6	6	6	6	ESBL(-)/AmpC(-)				6	13	15	27	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>257	16
	AMU 990645	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	nd	DHA-1	6	6	12	12	AmpC(+)				6	9	23	27	MBL (-)	AmpC(+)/MBL(+)	>258	0.25	
	AMU 990743	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-1	nd	DHA-1	6	6	6	6	6	uninterpretable				6	6	20	25	MBL (+)	AmpC(+)/MBL(+)	>256	4
ESBL/ AmpC/ MBL	ATCC BAA-2146	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTX-M-15	CMY-6	6	6	6	6	6	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	10	10	MBL (-)	uninterpretable	>256	>32
	AMU 990533	<i>C. amalonaticus</i>	IMP-1	CTX-M-1g	CMY-2	6	6	6	6	8	ESBL(-)/AmpC(-)				6	6	15	25	MBL (+)	ESBL(+)/AmpC(+)/MBL(+)	>256	4

nd, not detected; Chrom, Chromosomal 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¹¹⁾。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られる。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.
- MASTDISCS Combi AmpC and ESBL 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 β -lactamase production in third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*. J. Infect. Chemother. 25: 330-336.
- 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.
- 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.
- 6) Yamamoto, N., R. Kawahara, Y. Akeda, et al. 2017. Development of selective medium for IMP-type carbapenemase-producing *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. 新規カルバペネム系薬耐性因子, ニュー・デリー型メタロ β ラクタマーゼ (NDM-1) の特徴. 日治療会誌 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/12223-522d03.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 Heteroarylcarboxylic Acids for Identification of Subclass B1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales*. Journal of Clinical Microbiology. 59 (10).
- 11) 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 Takayama¹⁾, Daisuke Sakanashi¹⁾, Yuzuka Kawamoto¹⁾, Narimi Miyazaki¹⁾, Tomoko Ohno¹⁾,
Atsuko Yamada¹⁾, Akiko Nakamura¹⁾, Hirotoshi Ohta¹⁾, Hiroyuki Suematsu¹⁾, Chida Sumie²⁾, 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 Es β L 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.