

**調查研究**

**研究報告・資料**

## 基質拡張型β-ラクタマーゼ産生菌による院内感染事例について

北橋 智子<sup>1</sup>、吉原 純子<sup>1</sup>、奥島 祥美<sup>2</sup>

静野 健一<sup>3</sup>、花輪 眞弓<sup>3</sup>、阿部 克明<sup>3</sup>

(1 環境保健研究所 健康科学課 2 現 保健所 食品安全課 3 千葉市立海浜病院 ICT)

**要 旨** 千葉市内の病院において、21 名 (22 菌株) からセフトキシム (CTX) 耐性の基質拡張型β-ラクタマーゼ (extended spectrum β-lactamase; ESBL) 産生菌が検出された院内感染事例が発生した。22 菌株中 11 菌株 (同一人物から検出された 2 菌種を含む、*Klebsiella pneumoniae*: 8 株、*K. oxytoca*: 1 株、*Escherichia coli*: 2 株) を検査し、6 株から *bla*<sub>TEM-1</sub> が、8 株から *bla*<sub>SHV-11</sub> が、11 株すべてから *bla*<sub>CTX-M</sub> が検出された。11 株中 8 株は *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 陽性 *K. pneumoniae* で、これらは類似のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) パターンを示した。このことから本件はプラスミドの伝播によるものではなく、当該菌そのものの伝播によるものと考えられた。

*K. oxytoca* 1 株及び *E. coli* 2 株については、上記菌株と異なる *bla*<sub>CTX-M</sub> を保有しており、当該院内感染との関連性は低いと考えられた。同一人物から検出された *K. oxytoca* 1 株及び *E. coli* 1 株については、共に *bla*<sub>CTX-M-2</sub> を保有していたことから、腸内で *bla*<sub>CTX-M-2</sub> が菌種を越えて伝播したと思われる。

**Key Words** : 院内感染, 基質拡張型β-ラクタマーゼ, ESBL, CTX-M, PFGE

### 1. はじめに

β-ラクタム薬は医療で頻繁に使用される抗生物質である。そのβ-ラクタム薬を加水分解する酵素の一種である基質拡張型β-ラクタマーゼ (以下 ESBL とする) 産生菌は、ペニシリン系薬剤、第二世代及び第三世代のセファロsporin系薬剤を分解するため、薬剤耐性菌として世界中の医療現場で問題となっている。更に、特徴的な脅威として、ESBL 遺伝子がプラスミド上にコードされており、薬剤耐性プラスミドが菌種を越えて拡散するということがも問題を大きくしている。

感染症治療のため投与された抗生物質の薬効が低いため調査したところ ESBL 産生菌が原因であったという報告<sup>1)</sup>がある。市中感染の 9% から ESBL 産生菌が検出されたという報告<sup>2)</sup>もある。また、病原菌のみならず、大腸菌等常在の腸内細菌が ESBL 産生菌である場合は、健常人が気づかずに感染を拡大する可能性が考えられる。

千葉市内の病院において、平成 24 年 10 月から平成 25 年 6 月にかけて 21 名から ESBL 産生菌が検出された院内感染事例が発生し、遺伝学的解析を行ったので、その概要を報告する。

### 2. 経緯

当該医療機関では、院内感染対策として新生児科入院患者に対し、薬剤耐性菌の監視培養を行っている。平成 24 年 10 月、平成 25 年 1 月、3 月と ESBL 産生菌が散発的に発生したため感染対策を実施していたが、平成 25 年 5 月に入り連続して 4 名から ESBL 産生性 *K. pneumoniae* が検出され、アクティブサーベイランスを実施したところ更に 10 名から ESBL 産生菌が分離された。その後、様々な感染対策を実施している中で、逆隔離している患者から新規に ESBL 産生を疑う菌が分離され (表 1)、当所へ検査依頼となった。

なお、ESBL 産生菌が検出された入院患者は、いずれも感染症の症状はなかった。

### 3. 材料

当該医療機関にて米国臨床検査標準化協会 (CLSI) 法で ESBL 産生菌と判定された 11 菌株 (*K. pneumoniae* 8 株、*K. oxytoca* 1 株、*E. coli* 2 株) を検体とした。

表 1 ESBL 産生菌の分離状況

菌株No.	菌の分離日	月齢	由来	菌名
1	2012. 10. 26	1 M	気管洗浄液	<i>K. pneumoniae</i>
2	2013. 1. 16	1 M	咽頭拭い液	<i>K. pneumoniae</i>
3	" 3. 6	1 Y	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 15	5 d	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 16	2 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 21	3 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 21	8 d	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 24	25 d	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
4	" 5. 24	1 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 24	1 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 24	2 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
5	" 5. 24	2 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 27	18 d	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
"	" 5. 29	1 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
6	" 5. 29	1 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
7	" 5. 29	1 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
8	" 5. 29	5 d	糞便	<i>E. coli</i>
"	" 6. 14	11 d	糞便	<i>E. cloacae</i>
"	" 6. 18	3 M	糞便	<i>E. cloacae</i>
9	" 6. 21	4 M	糞便	<i>K. pneumoniae</i>
10	" 6. 24	6 d	糞便	<i>E. coli</i>
11	" "	" "	" "	<i>K. oxytoca</i>

※菌株No.10、11 は同一人物から分離された。

#### 4. 方法

##### (1) 菌種の同定

DHL (栄研化学) 及びドルガルスキー改良培地 (ニッスイ) 平板培地で培養後、IMViC 及び Api20E (栄研化学) により確認した。

##### (2) 薬剤感受性試験

CLSI 法に準拠したディスク法を実施した。供試薬剤は、CTX、セフトジジム (CAZ)、セフピロム (CPR)、セフメタゾール (CMZ)、セフミノクス (CMNX)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM) (以上、BD)、ラタモキシセフ (LMOX、栄研化学) のディスクを使用した。

更に CTX または CAZ に耐性を示した場合は、クラブラン酸・アモキシシリン (CVA/AMPC、栄研化学) 及びアンピシリン・スルバクタム (ABPC/SBT、BD) のディスクを用いたディスク拡散法 (Double Disk synergy test : DDST) を実施し、ESBL 産生菌であることを確認した。CTX に関しては Etest (シスメックス・バイオメテック) により最小発育阻止濃度 (MIC 値) を測定した。

##### (3) $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出及び型別

$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出は、David L. Paterson らの方法<sup>3)</sup>に従い PCR 法 (*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub>) を実施した (表 2)。バンドが検出された場合はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。*bla*<sub>TEM</sub> 及び *bla*<sub>SHV</sub> の場合は、アミノ酸に変換し、Lahey Clinic のホームページ<sup>4)</sup>を参照し遺伝子型別を行った。*bla*<sub>CTX-M</sub> の場合は、BLAST 検索し遺伝子型別を行った。

#### (4) PFGE

国立感染症研究所の腸管出血性大腸菌 O157 のプロトコールに従い、制限酵素は *Xba* I を使用した。

表 2  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子型別プライマー

プライマー名	配列 (5'→3')	今事例における増幅断片の長さ	アニーリング温度
TEM-F	AAACGCTGGTGAAAGTA	717 bp	45°C
TEM-R	AGCGATCTGTCTAT		
SHV-F	ATGCCGTATATTCGCCCTGTG	723 bp	60°C
SHV-R	TGCTTTGTTATTCCGGGCCAA		
CTX-M-F	CGCTTTCGGATGTGCAG	551 bp	50°C
CTX-M-R	ACCGCGATATCGTTGGT		

#### 5. 結果

ディスク法の結果、11 株全てが CTX 耐性であった。また、CPR 耐性の傾向がみられた (表 3、図 1)。CVA/AMPC 及び ABPC/SBT に対する CTX 及び CAZ の反応性を確認したところ、CTX 耐性は CVA/AMPC により阻害され (図 2)、11 株全て ESBL 産生菌であることが確認された。Etest による CTX の MIC 値は 11 株全て 16  $\mu$ g/mL 以上であった (表 3、図 3)。

PCR 法及びシーケンスの結果は表 4 のとおりであった。11 株全てから *bla*<sub>CTX-M</sub> が検出され、その遺伝子型は *K. pneumoniae* 8 株が *bla*<sub>CTX-M-15</sub>、*E. coli* 1 株 (No.8) が *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、同一人物から検出された *E. coli* 1 株 (No.10) 及び *K. oxytoca* 1 株と共に *bla*<sub>CTX-M-2</sub> であった。また、*K. pneumoniae* 5 株及び *E. coli* 1 株からは *bla*<sub>TEM</sub> が検出され、その遺伝子型は全て *bla*<sub>TEM-1</sub> であった。また、*K. pneumoniae* 8 株全てから *bla*<sub>SHV</sub> が検出され、遺伝子型は *bla*<sub>SHV-11</sub> であった。

PFGE の結果は *K. pneumoniae* 8 株はほぼ同一パターン、*E. coli* 2 株は別のパターンであった (図 4)。

#### 6. 考察

ESBL 産生菌における *bla* 遺伝子は、TEM 型及び SHV 型が欧米に多く<sup>5)</sup>、CTX-M 型は日本に多いとされていた<sup>6)</sup> が、近年は世界中で CTX-M 型、特に CTX-M-15 型が多く報告<sup>5,7)</sup>されており、今事例も CTX-M 型 ESBL 産生菌であった。

世界に蔓延している CTX-M-15 型は CAZ に耐性を示すことが多いが、今事例の *K. pneumoniae* は中間を示した。また、他の CTX-M 型に関する報告と同様に CTX に対し高度耐性を示したが、*E. coli* (No.8) は比較的 low MIC 値であった。

表 3 薬剤感受性試験結果及び CTX 最小阻止濃度

菌株 No.	菌種	CTX	CAZ	CPR	CMZ	CMNX	MEPM	IPM	LMOX	Etest (CTX)
1	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	R	S	S	S	S	S	64
2	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	R	S	S	S	S	S	128
3	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	96
4	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	192
5	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	128
6	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	256<
7	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	I	S	S	S	S	S	96
8	<i>E. coli</i>	R	S	I	S	S	S	S	S	16
9	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	R	S	S	S	S	S	256<
10	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	S	S	S	192
11	<i>K. oxytoca</i>	R	S	I	S	S	S	S	S	64

注: No.10 と No.11 は同一人から検出された菌株

R: 耐性, I: 中間, S: 感性

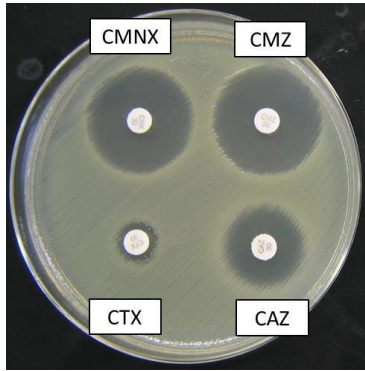


図 1 薬剤感受性試験の結果 (菌株 No.7)

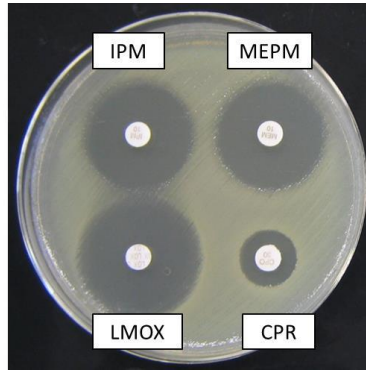


図 2 CVA/AMPC ディスクを用いた DDST 法 (菌株 No.7)

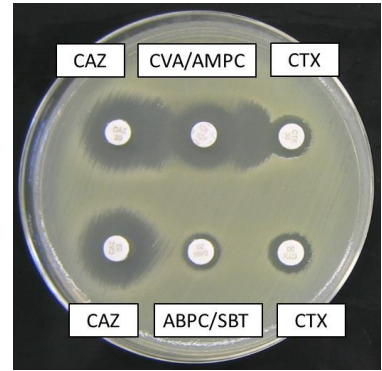


図 3 セフトキサシム (CTX) の Etest (菌株 No.7)

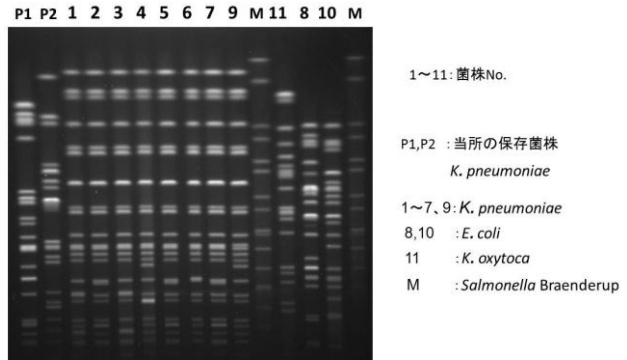


図 4 ESBL 産生菌の *Xba* I による PFGE パターン

表 4 ESBL 産生菌の PCR 法及び遺伝子型別結果

菌株 No.	菌種	β-ラクタマーゼ遺伝子		
		TEM	SHV	CTX-M
1	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-11	CTX-M-15
2	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-11	CTX-M-15
3	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-11	CTX-M-15
4	<i>K. pneumoniae</i>	—	SHV-11	CTX-M-15
5	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-11	CTX-M-15
6	<i>K. pneumoniae</i>	—	SHV-11	CTX-M-15
7	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-11	CTX-M-15
8	<i>E. coli</i>	TEM-1	—	CTX-M-14
9	<i>K. pneumoniae</i>	—	SHV-11	CTX-M-15
10	<i>E. coli</i>	—	—	CTX-M-2
11	<i>K. oxytoca</i>	—	—	CTX-M-2

注: No.10 と No.11 は同一人から検出された菌株

—: PCR で陰性

PCR 法による *bla*<sub>CTX-M-14</sub> の検出については、その配列が GC リッチであったこと、更にプライマーが完全な相補的配列ではなかったことから、アニーリング温度を 50°C に下げることにより検出することができた。*bla*<sub>CTX-M</sub> の遺伝子型全てを検出するには、今後プライマーの検討が必要と思われる。

今回検査した 11 株は全て ESBL 産生菌であり、*bla*<sub>TEM-1</sub> が 6 株 (*K. pneumoniae* 5 株、*E. coli* 1 株) から、*bla*<sub>SHV-11</sub> が 8 株 (全て *K. pneumoniae*) から、*bla*<sub>CTX-M</sub> が 11 株全てから検出された。

*bla*<sub>TEM-1</sub> 及び *bla*<sub>SHV-11</sub> は非 ESBL をコードする<sup>8)</sup>ことから、*bla*<sub>CTX-M</sub> が当該耐性に寄与していると考えられた。

このことはディスク法の結果、つまり CTX 耐性、CPR 耐性傾向、セファマイシン・オキサセフェム系薬剤・カルバペネム系薬剤に感性という CTX-M 型が示唆されたことと一致した。

11 株から検出された *bla*<sub>CTX-M</sub> の型別を見ると、*K. pneumoniae* 8 株は *bla*<sub>CTX-M-15</sub>、*E. coli* 1 株 (No.8) は *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、同一人物から検出された *E. coli* 1 株 (No.10) 及び *K. oxytoca* 1 株は *bla*<sub>CTX-M-2</sub> であった。

*K. pneumoniae* 8 株は全て *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有していたものの、PFGE がほぼ同じパターンであったことから、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> が乗ったプラスミドの伝播ではなく、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する *K. pneumoniae* の菌体が伝播した院内感染の可能性が高いことが示唆された。

*K. pneumoniae* 8 株中 5 株から *bla*<sub>TEM</sub> が検出され、3 株からは検出されなかった。人を介して感染していく間に、*bla*<sub>CTX-M</sub> と異なるプラスミドに乗っていた *bla*<sub>TEM</sub> の乗ったプラスミドが脱落したか、又は同じプラスミド上の *bla*<sub>TEM</sub> が乗った部分が脱落したことが考えられた。

*bla*<sub>CTX-M</sub> 型が違う *E. coli* 2 株 (No.8、No.10) 及び *K. oxytoca* 1 株は院内感染とは関係のない ESBL 産生菌であった。これらの株は感染症状の無い入院乳児からのアクテイクサーベイランスにより検出されたことから、ESBL 産生菌が市中に広がっていることが伺えた。

また、同一人物から検出された *E. coli* 1 株 (No.10) 及び *K. oxytoca* は共に *bla*<sub>CTX-M-2</sub> を保有していたことから、患者の腸内で菌種を越えてプラスミドが移った可能性があると考えられた。

## 文 献

- 1) 土屋祐司, 秦なな, 加藤和子, 他: 腸管凝集性大腸菌 O126:H27 による有症苦情事例について. 浜松市保健環境研究所年報, No22: 34-35, 2011.
- 2) 中村竜也, 清水千裕, 乾佐知子, 他: 糞便中の ESBL 産生腸内細菌スクリーニングの有用性. 日本臨床微生物学雑誌, 19(4): 230-347, 2009.
- 3) David L. Paterson, Kristine M. Hujer, Andrea M. Hujer, et al. : Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries, Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(11): 3554-3560, Nov 2003.
- 4) Lahey Clinic:  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, <http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp> (2014.7.15 最終アクセス)
- 5) Mariagrazia Perilli, Emanuela Dell'Amico, Bernardetta Segatore, et al. : Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Produced by Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from an Italian Nationwide Survey. *J. Clin. Microbiol.*, 40(2): 611-614, 2002.
- 6) Y. Arakawa, Y. Ike, M. Nagasawa, et al. : Trends in antimicrobial-drug resistance in Japan. *Emerg Infect Dis*, 6(6): 572-575, 2000 Nov-Dec.
- 7) Nüesch-Inderbilen MT, Kayser FH, Hächler H: Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(5): 943-949, 1997 May.
- 8) Canton R, Coque TM. : The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5): 466-475, 2006.