

## 「2013年度緑膿菌・アシネトバクター総合報告書」

### 【調査目的】

昨年度、滋賀県感染制御ネットワークでは大腸菌およびクレブシエラに関する調査を行い、ある特定の耐性菌が医療機関を越えて拡散していたことを確認した。平成25年度は緑膿菌とアシネトバクターを対象として調査した。緑膿菌は平成19年度にも同様の調査を行っており、その成績と比較検討した。

### 【調査方法】

1) 調査対象耐性菌：緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) とアシネトバクター (*Acinetobacter baumannii*)

- ①多剤耐性菌 (MDRP、MDRA) の調査
- ②メタローβ-ラクタマーゼ産生菌 (MBL：IMP型、VIM型、NDM型)
- ③その他のカルバペネマーゼ産生菌 (KPC型、OXA型など)

2) 調査期間：平成25年10月1日から12月31日までの3ヶ月間。

3) 対象菌株：薬剤感受性検査を実施した緑膿菌またはアシネトバクターについて、下記の①から④の抗菌薬のいずれかに耐性または中間の成績が得られた菌株を収集対象菌株とした。原則として1患者について同一部位から複数回分離された場合は1菌種につき1株を収集するが、2回目以降の薬剤感受性成績が1回目と異なった場合は新たに菌株を収集し、集計対象に加えた。

- ①セフトジジム (CAZ) ②イミペネム (IPM) またはメロペネム (MEPM)
- ③アミカシン (AMK) ④シプロフロキサシン (CPFX) またはレボフロキサシン (LVFX)

調査期間終了後、菌株を社会保険滋賀病院 検査部 微生物検査室へ送付願った。

4) 試験・検査の内容：

- ① MIC (最少発育阻止濃度) の測定：CLSI Document M100-S19 に従い MIC を測定した。測定パネルは栄研化学株式会社製ドライプレート (オーダーパネル) を使用した。検査対象抗菌薬はピペラシリン (PIPC)、ピペラシリン/タゾバクタム (PIPC/TAZ)、CAZ、IPM、MEPM、ドリペネム (DRPM)、AMK、LVFX および CPFX とした。
- ② 多剤耐性菌の確認：①の MIC の成績からカルバペネム系、アミノグリコシド系およびフルオロキノロン系の3つの系統の中から、1剤耐性菌、2剤耐性菌および3剤耐性菌 (MDRP) に分類した。耐性菌の定義は I (中間) または耐性 (R) の範疇に入るものとした。また、同一系統の抗菌薬は、いずれかの抗菌薬が I (中間) または耐性 (R) の範疇に入るものを耐性菌と定義した。
- ③ メタローβ-ラクタマーゼ産生菌 (MBL：IMP型、VIM型、NDM型) の検出

今回測定した CAZ の MIC が 16  $\mu$ g/ml 以上の株を対象に、メルカプト酢酸ナトリウムを利用した SMA ディスク（栄研化学）を用いディスク拡散法により阻害試験を実施した。CAZ、MEPM のいずれかの薬剤に阻害帯が形成された場合を陽性とした。SMA ディスク陽性の株について MBL 耐性遺伝子の検出を PCR 法で行った。耐性遺伝子は IMP-1、IMP-2、VIM および NDM について確認した。

④ その他のカルバペネマーゼ産生菌（KPC 型、OXA 型）

今回測定した MEPM の MIC が 2  $\mu$ g/ml 以上の株を対象に、Modified Hodge Test（MHT）を実施した。MHT が陽性の株について、KPC 型と OXA 型の耐性遺伝子を PCR 法で行った。

⑤ 分子疫学的解析

緑膿菌の 2 剤耐性菌および MDRP について、POT 法（関東化学）と Random amplification of polymorphic DNA(RAPD)によって菌種間の遺伝子レベルの相同性を比較検討した。RAPD の使用プライマーは 272（5-AGCGGGCCAA-3）を用いた。

**【成績】**

1) 参加医療施設

滋賀県の医療施設 58 施設のうち、サーベイランスに参加したのは 38 施設（65.5%）であり、昨年度の調査より 4 施設多かった。病床別の参加施設数は 199 床以下が 21 施設、200～499 床が 10 施設、500 床以上が 7 施設であった。（表 1）

表 1. 参加状況

病床数	1～199	200～499	500～	全体
該当施設数	34	17	7	58
参加施設数	21	10	7	38

2) 緑膿菌・アシネトバクターの耐性に関する成績

緑膿菌およびアシネトバクターの耐性に関する成績を表 2 に示した。緑膿菌の対象株 779 株のうち、各施設で収集された株数は 133 株であった。133 株のうち、1 剤耐性は 76 株（9.8%）、2 剤耐性は 38 株（4.9%）、多剤耐性（MDRP）は 2 株（0.3%）、MBL 産生株は 0 株であった。1 剤耐性は CPFY 耐性が最も多く 40 株（5.1%）、次いで IPM 耐性 35 株（4.5%）、AMK 耐性 1 株（0.1%）、2 剤耐性は IPM+CPFY 耐性が最も多く 36 株（4.6%）、次いで AMK+CPFY 耐性 2 株（0.3%）であった。

アシネトバクターは対象株 88 株のうち、各施設で収集された株は 10 株であった。10 株はすべて 1 剤耐性（11.4%）であり、2 剤耐性、MDRA および MBL は検出されなかった。1 剤耐性はすべて CPFY 耐性であった。なお、*A. baumannii* 以外の菌株が送付され、そのうち 1 株は TMB 型の MBL であった。

表2. 緑膿菌・アシネトバクターに関する成績

項目		緑膿菌	アシネトバクター	
収集株	対象株総数	779	88	
	CAZ耐性株数	31	0	
	IPM耐性株数	78	0	
	AMK耐性株数	8	0	
	CPFX耐性株数	73	10	
	収集株総数	133	10	
解析結果	1剤耐性	IPM*耐性株数(%)	35 (4.5)	0 (0)
		AMK耐性株数(%)	1 (0.1)	0 (0)
		CPFX**耐性株数(%)	40 (5.1)	10 (11.4)
		1剤耐性総数(%)	76 (9.8)	10 (11.4)
	2剤耐性	IPM+AMK耐性株数(%)	0 (0)	0 (0)
		IPM+CPFX耐性株数(%)	36 (4.6)	0 (0)
		AMK+CPFX耐性株数(%)	2 (0.3)	0 (0)
		2剤耐性総数(%)	38 (4.9)	0 (0)
	MDR	IPM+AMK+CPFX耐性株数(%)	2 (0.3)	0 (0)
	MBL	陽性株数(%)	0 (0)	0 (0)

\*IPM：カルバペネム系， \*\*CPFX：フルオロキノロン系

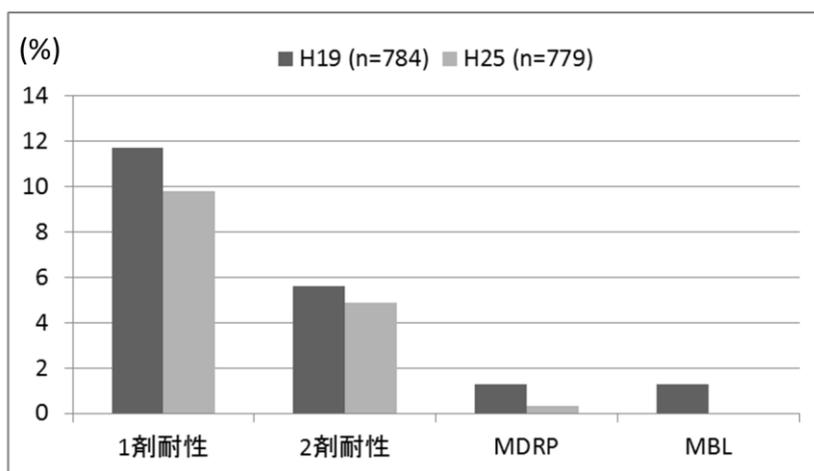


図1. 平成19年度と今回（平成25年度）の耐性率（緑膿菌）

平成19年度と今回の耐性菌の成績を比較し、その成績を図1に示した。1剤、2剤、MDRPおよびMBLのいずれの耐性菌も平成19年度より平成25年度の方が低い成績であった。特に、MDRPおよびMBLで顕著であった。

表 3. 病床別成績（緑膿菌）

		<199	200-499	>500	全体
施設数		21	10	7	38
検体数		3,154	12,034	18,482	33,670
対象株数		172	265	342	779
1剤耐性	株数	10	23	43	76
	(%)	(5.8)	(8.6)	(12.6)	(9.8)
2剤耐性	株数	7	11	20	38
	(%)	(4.1)	(4.2)	(5.8)	(4.9)
MDRP	株数	0	1	1	2
	(%)	(0)	(0.4)	(0.3)	(0.3)
MBL陽性	株数	0	0	0	0
	(%)	(0)	(0)	(0)	(0)

表 4. 病床別成績（アシネトバクター）

		<199	200-499	>500	全体
施設数		21	10	7	38
検体数		3,154	12,034	18,482	33,670
対象株数		20	34	34	88
1剤耐性	株数	3	5	2	10
	(%)	(15.0)	(14.7)	(5.9)	(11.4)
2剤耐性	株数	0	0	0	0
	(%)	(0)	(0)	(0)	(0)
MDRP	株数	0	0	0	0
	(%)	(0)	(0)	(0)	(0)
MBL陽性	株数	0	0	0	0
	(%)	(0)	(0)	(0)	(0)

### 3) 病床別成績

病床別成績を表3および表4に示した。緑膿菌の1剤耐性は199床以下が10株(4.1%)、200~499床が23株(8.6%)、500床以上が43株(12.6%)、2剤耐性はそれぞれ7株(4.1%)、11株(4.2%)、20株(5.8%)で、1剤耐性および2剤耐性ともに500床以上の施設で高い成績となった。MDRPは200~499床および500床以上でそれぞれ1株であった。

アシネトバクターの1剤耐性は199床以下が3株(15%)、200~499床が5株(14.7%)、500床以上が2株(5.9%)であり、199床以下および200~499床の施設で高い成績であった。

### 4) 入院・外来別成績

入院・外来別の成績を表5および表6に示した。緑膿菌について、外来は1剤耐性16株、2剤耐性4株、MDRP0株、入院はそれぞれ59株、34株、2株と入院で多く検出された。1剤耐性のアシネトバクターについては外来2株、入院6株、不明2株であった。

表5. 入院・外来別の成績(緑膿菌)

	外来	入院	不明	合計
1剤耐性	16	59	1	76
2剤耐性	4	34	0	38
MDRP	0	2	0	2
合計	20	95	1	116

表6. 入院・外来別の成績(アシネトバクター)

	外来	入院	不明	合計
1剤耐性	2	6	2	10
2剤耐性	0	0	0	0
MDRA	0	0	0	0
合計	2	6	2	10

### 5) 検査材料別成績

検査材料別の成績を表7および表8に示した。緑膿菌について、116株のうち呼吸器系材料が最も多く61株(52.6%)、次いで泌尿器系材料30株(25.9%)、消化器系材料7株(6%)、血液2株(1.7%)、その他16株(13.8%)の順であった。血液由来の2株は2剤耐性菌であった。MDRPは呼吸器系と泌尿器系でそれぞれ1株検出された。アシネトバクターについて、10株のうち呼吸器系材料が最も多く6株(60%)であった。

表 7. 検査材料別の成績（緑膿菌）

	呼吸器	消化器	泌尿器	血液	その他	合計
1剤耐性	40	4	19	0	13	76
2剤耐性	20	3	10	2	3	38
MDRP	1	0	1	0	0	2
合計	61	7	30	2	16	116

表 8. 検査材料別の成績（アシネトバクター）

	呼吸器	消化器	泌尿器	血液	その他	合計
1剤耐性	6	1	1	0	2	10
2剤耐性	0	0	0	0	0	0
MDRA	0	0	0	0	0	0
合計	6	1	1	0	2	10

#### 6) 薬剤感受性結果（参考）

収集された 133 株について MIC を測定し、CLSI M100-S19 の基準で非感性率の成績を図 2 に示した。最も低い非感性率であったのは、AMK の 0.6%、次いで DRPM の 4.9%であった。今回の収集株は CAZ、カルバペネム系薬、AMK およびフルオロキノロン系薬の中間または耐性の株を対象にしているため、PIPC、PIPC/TAZ、SBT/CPZ、CFPM および AZT については参考データとして考えておく必要がある。

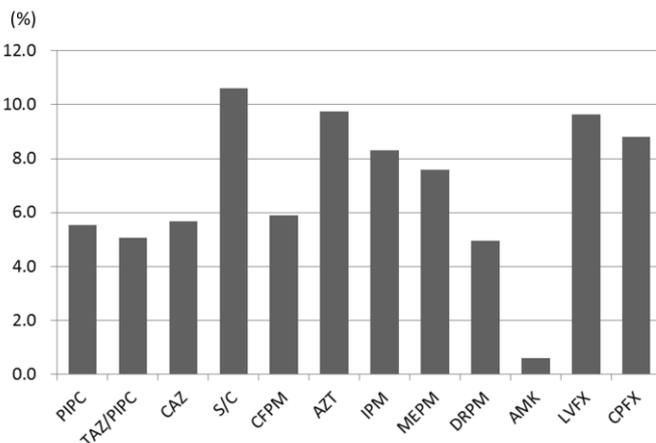


図 2. 薬剤感受性結果 (n=133)

#### 7) 耐性遺伝子の結果

アシネトバクターについて、SMA 法陽性を 1 株認め、MBL の耐性遺伝子の確認を行ったところ、すべて陰性であった。国立感染症研究所に精査依頼したところ、TMB 型の MBL が検出された。菌種は *Acinetobacter nosocomialis* (中間報告) であった。

## 8) 分子疫学的解析結果

緑膿菌に関して、2 剤耐性および 3 剤耐性の 40 株を対象に RAPD 法と POT 法を実施した。RAPD 型は 31 パターン、POT 型は 29 パターンに分類された。RAPD 型または POT 型が同一パターンを示した成績を表 9 に示した。POT 型 (987-0) は 3 施設からそれぞれ 1 株検出されたが、RAPD 型が異なる成績であった。POT 型 (1076-0) は 3 施設からそれぞれ 1 株検出され、2 株は RAPD 型も同一であった。POT 型 (1076-56) は 2 施設からそれぞれ 1 株検出され、RAPD も同一であったが、薬剤耐性パターンが異なる成績となった。POT 型 (1560-150) は 3 施設から 4 株検出され、RAPD も同一であった。POT 型 (1668-16) は施設 No.30 から 3 株検出され、RAPD、薬剤耐性パターンも同一であった。POT 型 (1752-16) は 2 施設からそれぞれ 1 株検出され、RAPD も同一であった。

表 9. RAPD 型または POT 型が同一パターンを示した 2 剤耐性または MDRP の施設別成績

RAPD 型	POT 型	耐性パターン	耐性遺伝子	施設 No.	所属*(株数)
1	987-0	IPM, CPFY	-	16	A (1)
2	987-0	IPM, CPFY	-	24	B (1)
3	987-0	IPM, CPFY	-	26	C (1)
4	1076-0	IPM, CPFY	-	10	D (1)
4	1076-0	IPM, CPFY	-	26	E (1)
5	1076-0	IPM, CPFY	-	25	F (1)
6	1076-56	IPM, CPFY	-	4	G (1)
6	1076-56	AMK, CPFY	-	9	H (1)
7	1560-150	IPM, CPFY	-	15	I (2)
7	1560-150	IPM, AMK, CPFY	-	21	J (1)
7	1560-150	IPM, CPFY	-	33	K (1)
8	1668-16	IPM, CPFY	-	30	L (1), M (2)
9	1752-16	IPM, CPFY	-	10	外来
9	1752-16	AMK, CPFY	-	33	N (1)

\*所属；実際の所属名ではなく、記号で示した。

【まとめ】平成 25 年度の耐性菌サーベイランスは緑膿菌とアシネトバクターを対象として実施した。58 施設中 38 施設の参加があり、緑膿菌は 779 株、アシネトバクターは 88 株を対象に調査を行った。緑膿菌については平成 19 年度にも調査を行っており、MBL および MDRP とともに 784 株中 10 株 (1.3%) に検出され、MBL 産生型 MDRP は 10 株中 7 株に認めた。一方、今回の調査では MDRP は 2 株 (0.3%)、MBL は検出されなかった。同時に 1 剤耐性率も 9.8%、2 剤耐性率も 4.9%と平成 19 年度の調査と比較して低下していた。耐性菌検出率が低下した要因は、抗菌薬適正使用の推進、アウトブレイクの未然防止、ICT をはじめとする感染制御組

織の院内および地域での充実などがあげられる。特に、前回の調査ではそれぞれの RAPD 型が 3 株以上同一であった施設は 5 施設あったが、今回は 1 施設のみであったことから、各施設がアウトブレイクを未然に防止したことが一番の要因であると考えられる。

今回の分子疫学的解析には RAPD の他に POT 法を用いた。POT 法は MLST 法と同程度の菌株識別能力を有し、IMP 型や VIM 型の MBL 遺伝子も検出可能であることが特徴である。今回の検討では RAPD 型は 31 パターン、POT 型は 29 パターンに分類され、ほぼ同程度の識別能力を有していた。特に、RAPD は目視による識別であるのに対して、POT 法は数値化されているため、客観的なデータが得られる。特に、一部の菌株は医療施設が異なるにもかかわらず、POT 型および RAPD 型が同じであった株を認め、施設から施設への拡散の可能性を示唆する成績となった。一方、POT 型が同一であるにもかかわらず、RAPD 型が異なっていた株も認めたことから、POT 型の評価はさらなる検討が必要であると思われた。

アシネトバクターの調査は今回が初めてであった。2008～10 年に複数の大学病院で多剤耐性アシネトバクター (MDRA) のアウトブレイクが問題となったため、滋賀県における動向を把握する目的で調査を行った。対象株数 88 株に対して菌株収集株数は 10 株であり、MDRA は検出されなかった。2012 の厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の全入院部門の成績においても MDRA は 0 件となっており、わが国における MDRA の頻度はほとんどないものと考えられる。しかし、海外における MDRA は近隣の韓国や中国でも検出されており、アウトブレイク事例もほとんどが輸入例であることから、海外で入院歴のある患者は他の耐性菌も含めて特に注意する必要がある。

また、*A. nosocomialis* から TMB 型 (染色体性) の MBL が検出された。今回の対象は *A. baumannii* のみとしているが、各施設における菌種同定の限界とまれに IMP 型、VIM 型以外の MBL が検出される可能性もあり、SMA 法で陽性となってもすべてがプラスミド性の MBL ではないことを理解しておく必要がある。

今回の調査において各施設の細菌または微生物検査室は薬剤感受性検査を実施した菌株のうち、CAZ、カルバペネム系薬、AMK、フルオロキノロン系薬のいずれかが耐性の菌株を送付いただいた。しかし、いくつかの検査室はこの 4 系統の薬剤感受性検査をすべておこなっておらず、多剤耐性菌の把握が検査室でできない状況であることが判明した。少なくとも CAZ を除く 3 系統の感受性検査は実施していただく必要があり、さらには MBL 産生菌の確認には CAZ の感受性検査が必要である。特に依頼医からの薬剤感受性検査の依頼方法が偏った場合には、検査室から提言していただく必要がある。

平成 26 年の診療報酬改定でも、引き続き感染防止対策加算 1, 2 および感染防止対策地域連携加算が掲載され、サーベイランスおよび抗菌薬の適正使用の重要性が述べられている。特に、地域または全国のサーベイランス (JANIS など) への参加がより強く述べられている。滋賀県感染制御ネットワークにおける耐性菌サーベイランスでの活動が各施設の院内感染防止への一助になれば幸いである。

調査担当者	西尾 久明 (滋賀県立成人病センター 臨床検査部 微生物検査室)
	末吉 範行 (社会保険滋賀病院 検査部 微生物検査室)
報告責任者	浅越 康助 (滋賀県立成人病センター 感染管理室)

## MDRP（多剤耐性緑膿菌）および MDRA（多剤耐性アシネトバクター）についての基礎知識

### 1) MDRP とは

多剤耐性緑膿菌（multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP）とは、カルバペネム系、アミノグリコシド系およびフルオロキノロン系の3系統の抗菌薬に耐性の緑膿菌で、具体的には IPM の MIC :  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、AMK の MIC :  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  および CPFY の MIC :  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  の条件を満たす緑膿菌と定義される。また、IPM の同系統の抗菌薬（MEPM、DRPM など）や CPFY の同系統の抗菌薬（LVFX、MFLX など）が耐性でも同様に扱うことになっている。MDRP 感染症は感染症法 5 類定点把握として届出が必要になる。

MDRP の耐性獲得機構は染色体性とプラスミド性に大別される。染色体性は IPM 耐性でみられる D2 ポーリンの減少などによる細菌外膜の変化やフルオロキノロン耐性でみられる DNA ジャイレース、トポイソメラーゼなどの標的蛋白の変異、広域セファロスポリン系薬耐性にみられる AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼなどの分解酵素の過剰産生などがある。プラスミド性はメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ（MBL）やアミノグリコシドアセチル化酵素などの薬剤修飾不活化酵素などがある。染色体性は抗菌薬の使用を中止すると耐性から感性に変化することもあるが、プラスミド性は変化しない。また、プラスミド性は耐性遺伝子が菌から菌（または菌種）へ伝達されることがあるため、院内感染対策上は特に重要である。

検出材料は泌尿器検体が最も多く、次いで呼吸器検体で血液などからも検出されることがある。保菌例として検出されることが多いが、発症した場合はほとんどの抗菌薬に耐性であるため治療に難渋することが多い。このため、2 剤または 3 剤による併用療法や認可されていない colistin を使用せざるをえない場合もある。近年、ブレイクポイントチェッカーボード法が開発され、抗菌薬の相乗効果の確認できる試薬が発売されている。

### 2) MDRA とは

多剤耐性アシネトバクター（multi-drug resistant *Acinetobacter* : MDRA）とは、MDRP と同様に、カルバペネム系、アミノグリコシド系およびフルオロキノロン系の3系統の抗菌薬に耐性のアシネトバクターで、判定基準や感染症法 5 類定点把握として届出が必要になることも MDRP と同じである。

アシネトバクター属は通常、湿潤な環境や土壌、食物など自然界に広く生息し、医療施設のみならず家庭の洗面台や排水溝などから検出される。ヒトでは、皮膚、創、呼吸器、消化管などに定着するが、器質的・機能的障害を伴う場合に保菌または感染症を発症しやすい。今日まで、30 種類以上のアシネトバクターが報告されているが、*Acinetobacter baumannii* が最も重要である。

MDRA の耐性獲得機構は MDRP と同様に染色体性とプラスミド性に大別される。染色体性は MDRP と同様であるが、プラスミド性は MBL とオキサシリン分解酵素のカルバペネマーゼ（OXA 型）が重要である。MBL はわが国では散発的に分離されているが、OXA 型は一部のアウトブレイクを除きほとんど報告がない。この OXA 型はヨーロッパやアジア（特に中国と韓国）で多く検出されている。

検出材料は呼吸器検体が最も多いが、血液などからも検出され、カテーテル関連血流感染症になることがある。MDRA による感染症を発症した場合には治療に難渋することが多く、*A. baumannii* に対する抗菌薬治療の有効性と安全性を評価した無作為化対照比較試験はほとんどないのが現状である。

## POT 法の基礎知識

### (1) POT 法とは

Phage Open Reading Frame Typing 法の略で、愛知県衛生研究所の鈴木匡弘博士により開発された方法である。

### (2) POT 法の原理

菌株ごとに保有状態が異なる Open Reading Frame (ORF) を事前に選んでおき、それらの保有パターンを Multiplex PCR 法によって検出することで菌株の遺伝子型を決定する方法である。(表 1)

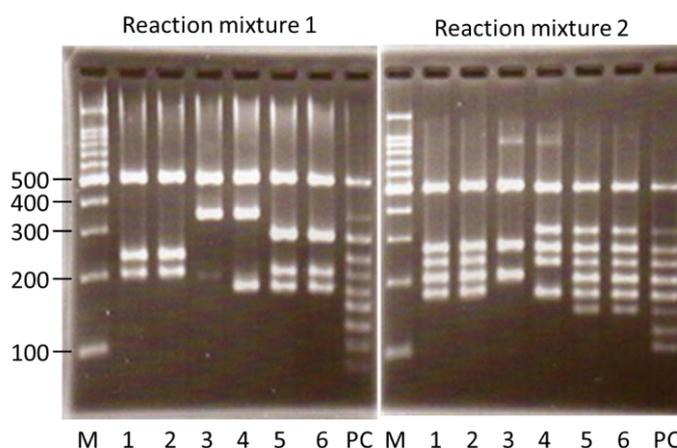
※Open Reading Frame：遺伝子の塩基配列のうちアミノ酸に翻訳される部分

※プロファージ：寄主細菌の染色体に組み込まれた状態のバクテリオファージ DNA

表 1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POTナンバー	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	506	<i>P. aeruginosa</i> a positive control
	POT1-1	336	Islet-1
	POT1-2	281	Islet-2
	POT1-3	235	Islet-3
	POT1-4	201	Islet-4
	POT1-5	175	Islet-5
	POT2-1	151	VIM
	POT2-2	126	Prophage-1
	POT2-3	103	Prophage-2
	POT2-4	85	Prophage-3
Reaction mixture 2	PCR PC	506	<i>P. aeruginosa</i> a positive control
	POT1-6	324	Islet-6
	POT1-7	271	Islet-7
	POT1-8	238	Islet-8
	POT1-9	204	Islet-9
	POT1-10	176	Islet-10
	POT2-5	150	Prophage-4
	POT2-6	124	Prophage-5
	POT2-7	105	IMP

図 1 POT 法の電気泳動像



### (3) 特徴

- 1) 菌株識別能力：従来から行われている最も一般的なパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) と同等の菌株識別能力を実現している。
- 2) 解析時間：半日～1 日程度で実施可能 (PFGE は数日)
- 3) 必要機器：遺伝子増幅装置など一般的な機器で実施可能。(PFGE は特別な装置が必要)

### (4) 実施手順

- 1) 遺伝子の抽出：簡易キットで菌株の DNA を抽出。
- 2) 遺伝子増幅反応：キット内の試薬 (プライマー、Taq DNA polymerase、緩衝液など) と菌株 DNA を混和後、増幅装置にかける。
- 3) 増幅産物の検出：増幅産物を電気泳動・染色後、泳動パターンを撮影する。

### (5) 判定(図 1)

- 1) POT 型への変換：増幅バンドの有無を 1、0 に置き換え、さらに十進法に変換し、POT 型とする。
- 2) 判定：POT 型は POT1 および POT2 の 2 つに数値化される。同一株ではこの 2 つの数値すべてが一致する。POT2 の値が 64 以上または奇数の場合は MBL 産生菌でその多くは MDRP の可能性がある。