

病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌

目次

1. 薬剤耐性菌の検査法の留意点	3
1.1. 薬剤耐性菌検査を行う菌株の継代	3
1.2. PCR 法に用いるテンプレート DNA の抽出方法	3
2. 薬剤感受性試験	3
3. 薬剤耐性菌別 検査方法	6

「3.1 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌」は、令和 6 年 3 月改訂 第 3 版として別途掲載されました（下記 URL）。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/MRSA20240318.pdf>

本稿の該当ページを白紙に変更しましたので、Ver2.1 とします（令和 6 年 3 月）。

3.2. ペニシリン耐性肺炎球菌	12
3.2.1. 感染症法上の定義	12
3.2.2. 耐性メカニズムと検査法	12
3.3. バンコマイシン耐性腸球菌	15
3.3.1. 感染症法上の定義	15
3.3.2. 菌種とバンコマイシン耐性遺伝子	15
3.3.3. 菌種の同定	16
3.3.4. ディスク拡散法によるバンコマイシン耐性型の推定	17
3.3.5. Multiplex PCR 法によるバンコマイシン耐性遺伝子の検出	18
3.4. 薬剤耐性緑膿菌	20
3.4.1. 感染症法上の定義	20

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.4.2. 多剤耐性緑膿菌の耐性メカニズムとその検査法.....	20
3.5. 薬剤耐性アシネトバクター.....	24
3.5.1. 感染症法上の定義.....	24
3.5.2. 菌種の同定について.....	24
3.5.3. 薬剤耐性アシネトバクターの耐性メカニズムとその検査法.....	25
3.5.4. パルスフィールド電気泳動法によるタイピング解析.....	28
3.6. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌.....	30
3.6.1. 感染症法上の定義.....	30
3.6.2. 腸内細菌科細菌とは.....	31
3.6.3. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の耐性機序とその検査法.....	31
3.6.4. パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）によるタイピング解析.....	46
主な改訂履歴.....	51
別添資料	

1. 薬剤耐性菌の検査法の留意点

1.1. 薬剤耐性菌検査を行う菌株の継代

薬剤耐性遺伝子の中には、プラスミドにより媒介されているものがあり抗菌薬の含まれていない培地で長期間放置したり、何代にもわたり継代したりすると、プラスミドが脱落し、薬剤耐性を喪失（感性菌化）する事がある。一方で、抗菌薬を含む培地で継代を繰り返すと、変異などにより薬剤に対する耐性を獲得する事もある。これらを防ぐため、薬剤耐性菌の検査を行う菌株を何代にもわたり継代することは避ける。また、保存菌株を起こす場合には、薬剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドの脱落を避けるため、必要に応じて抗菌薬を含む培地を使用するか、抗菌薬含有ディスクを置きディスクの周囲に発育した菌を検査に用いる。

1.2. PCR 法に用いるテンプレート DNA の抽出方法

1. 滅菌水を入れたエッペンドルフチューブに McFarland 0.5 になるように被検菌を懸濁する。薬剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドの脱落を避けるために抗菌薬含有ディスクを置いた場合は、ディスクの周囲に発育した菌を使用する。
2. 100℃で 10 分間加熱する。
3. 13,000rpm, 4℃で 5 分間遠心する。
4. 遠心後の上清を鋳型 DNA とし、PCR を行う。

2. 薬剤感受性試験

日常細菌検査における薬剤感受性測定には、ディスク拡散法、Etest、微量液体希釈法が広く用いられている。本マニュアルではディスク拡散法と Etest を用いた測定法を例にあげる。薬剤感受性測定に使用する培地や培養条件などは菌種によって異なるので注意する必要がある。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

接種用菌液の調整

増菌する場合：液体培地に被検菌を接種し、McFarland 0.5以上の濁度になるまで増菌する。これを希釈してMcFarland 0.5に調整する。

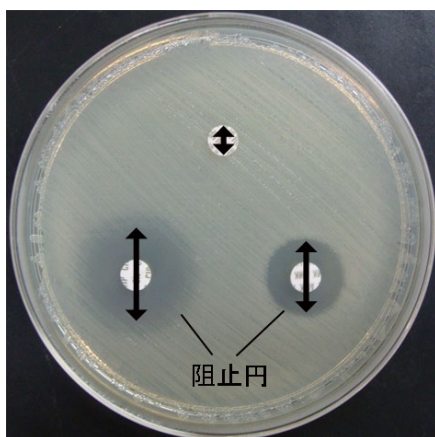
直接接種の場合：寒天培地に発育した菌を滅菌綿棒等のかきとり、Mueller-Hinton broth もしくは生理食塩水にMcFarland 0.5になるように懸濁する。

接種：滅菌綿棒を上記にて調整した菌液に浸す。試験管の管壁に押し余分な水分を取り除く。その後、平板培地に均一に塗布する。

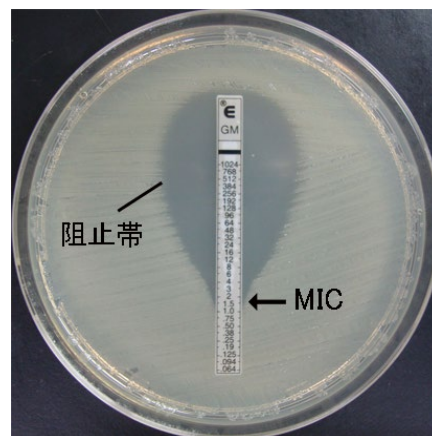
薬剤の配置：抗菌薬含有ディスクやEtest ストリップを平板培地に配置する。

培養：表を参照

判定：抗菌薬含有ディスクについては阻止円径を測定する。Etest については阻止帯が生じはじめた目盛りの部分をMIC値として読み取る。（下図）



抗菌薬含有ディスクを用いた測定例



Etest を用いた測定例

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

表. 抗菌薬含有ディスクおよび Etest を用いた薬剤感受性測定法

菌種	菌液の調整	推奨培地	培養条件
<i>Acinetobacter</i> spp.	増菌または 直接菌液調整	MHA ¹⁾	好気性 35±2℃ 20~24 時間
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	増菌または 直接菌液調整	MHA	好気性 35±2℃ 16~18 時間
<i>Enterococcus</i> spp.	増菌または 直接菌液調整	MHA	好気性 35±2℃ 16~18 時間 バンコマイシンは 24 時間
<i>Staphylococcus aureus</i>	直接菌液調整	MHA	好気性 35±2℃ 16~18 時間 オキサシリン、メチシリン、 バンコマイシンは 24 時間
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	直接菌液調整	5%羊血液 MHA	5%CO ₂ 35±2℃ 20~24 時間

¹⁾ MHA, Mueller-Hinton agar

【参考文献】

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards - Tenth Edition, M02-A10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, M100-S21.
- 小栗豊子. 臨床微生物検査ハンドブック-第2版-

【検査依頼先】

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

メールアドレス : taiseikin@nih.go.jp

【執筆者】

国立感染症研究所 細菌第二部第一室

(現 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学・耐性菌制御学)

和知野 純一

3. 薬剤耐性菌別 検査方法

3.1. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和6年3月 第3版として別途掲載

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和 6 年 3 月 第 3 版として別途掲載

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和 6 年 3 月 第 3 版として別途掲載

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和 6 年 3 月 第 3 版として別途掲載

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和 6 年 3 月 第 3 版として別途掲載

白紙ページ

病原体検出マニュアル「メチリシン耐性黄色ブドウ球菌」

令和 6 年 3 月 第 3 版として別途掲載

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

3.2. ペニシリン耐性肺炎球菌

3.2.1. 感染症法上の定義

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP: penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*) とは、ペニシリン G に対して耐性を示す肺炎球菌を指し、届出に必要な検査所見は下表の通りである。

検査方法	検査材料
菌の分離による病原体の検出 (敗血症・心内膜炎、腹膜炎、胸膜炎、髄膜炎、骨髄炎) 及び以下の検査室での判断基準を満たすもの (検査室での判断基準は、ペニシリンの MIC \geq 0.125 μ g/ml 又は、オキサシリンの感受性ディスク (KB) の阻止円の直径が 19 mm 以下)	血液、腹水、胸水、髄液、その他の通常は無菌的であるべき臨床検体
菌の分離による病原体の検出、かつ、感染症の起原菌と判定された場合 (呼吸器感染症、肝・胆道系感染症、創傷感染症、腎盂腎炎・複雑性尿路感染症、扁桃炎、細菌性中耳炎・副鼻腔炎、皮膚・軟部組織感染症) 及び以下の検査室での判断基準を満たすもの (検査室での判断基準は、ペニシリンの MIC \geq 0.125 μ g/ml 又は、オキサシリンの感受性ディスク (KB) の阻止円の直径が 19 mm 以下)	喀痰、膿、尿、便、無菌的ではない検体

3.2.2. 耐性メカニズムと検査法

3.2.2.1. ペニシリン耐性機序

PRSP は、肺炎球菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの生合成に関与するペニシリン結合蛋白 (PBP1A, PBP2B) の変異や PBP2X と命名された変種の PBP の獲得によるものである¹⁾。耐性度の高い菌株では、複数のペニシリン結合蛋白の変異に集積性が認められ、MIC 値が 1 μ g/ml 以上の PRSP では、ペニシリンの標的である 3 種類の PBP (PBP1A, PBP2B, PBP2X) の全てに何らかの変異が同時に見られる事が多い²⁾。

3.2.2.2. 検査法

3.2.2.2.1. 薬剤感受性測定

平板法、微量液体希釈法、ディスク法、Etest、automated 法がある。製品を用いる測定法に関する QC は製造者によってなされている。製造者の示す手順を守ることが重要である。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

1) 平板法

ミュラーヒントン寒天培地にウマ溶血血液を 5% 混合し、規定の薬剤を含む培地を作成する。平板培地作成の手順は煩雑である。この方法は CLSI では認められていない。

2) 微量液体希釈法

フローズンプレートまたはドライプレート（栄研化学）を用い、測定を行う。ミュラーヒントン培地に溶血ウマ血液を添加し、調製液体培地として使用する。McFarland 0.5 濁度の菌液を調製し、指定菌量を液体培地に接種する。35±2℃で 20-24 時間培養する。判定基準は、髄膜炎由来肺炎球菌は、MIC が $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ の場合 PRSP と判定される。非髄膜炎由来肺炎球菌は、MIC が $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ の場合 PRSP と判定され、MIC が 2-4 $\mu\text{g/mL}$ の場合 PISP（ペニシリン低感受性）と判定される。ただし、感染症法に基づく報告においては、由来に関わらず MIC が $\geq 0.125 \mu\text{g/mL}$ の場合 PRSP として報告することになる。

3) KB ディスク

5%ヒツジ血液添加 MH 寒天培地を用い、1 μg のオキサシリンを含む KB ディスクを使用する。5% CO₂、35±2℃環境下で 20-24 時間培養した後、KB ディスクの周囲に出現する発育阻止円の直径により、ペニシリンGの耐性と、低感受性または感受性の判別を行う。発育阻止円の直径が $\geq 20 \text{ mm}$ の場合はペニシリン感受性肺炎球菌（PSSP）と判定される。直径が $< 20 \text{ mm}$ の場合 PRSP もしくは PISP である。PRSP や PISP を判定するには、あらかじめ微量液体希釈法により MIC を測定し判定することが望ましい。

4) Etest

製造者の指示に従い感受性測定および判定を行う。あらかじめ薬剤ごとに微量液体希釈法との相関を見ておく必要がある。

5) Automated

very major error, major error, minor error の出現頻度は文献 3 と 4 を参照。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

3.2.2.2.2. PCR 法による変異 *pbp* 遺伝子の検出

肺炎球菌の感受性を測定するではなく、ペニシリン耐性をもたらしている *pbp* 遺伝子を増幅し、その変異を見ることにより、耐性度を推定するキットが販売されている（ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）遺伝子検出試薬[湧永製薬]）。

【参考文献】

1. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. FEMS Microbiol Rev 2008, 32:361-8.
2. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48:1488-1494
3. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. de Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea E.J, Pascual A. J Clin Microbiol 2004, 42:3734-3738
4. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria AL, Nibbering PH. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010, 29:89-95

【検査依頼先】

国立感染症研究所 細菌第一部第三室

【執筆者】

常彬、大西真

3.3. バンコマイシン耐性腸球菌

3.3.1. 感染症法上の定義

バンコマイシンに対して耐性を示す腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci ; VRE) である。

届出に必要な検査所見は下表の通りである。

検査方法	検査材料
分離・同定による腸球菌の検出かつ、薬剤耐性の特性の確認 (分離菌のバンコマイシンの MIC 値が <u>16µg/ml</u> 以上)	血液、腹水、胸水、髄液、その他の通常は無菌的であるべき臨床検体

3.3.2. 菌種とバンコマイシン耐性遺伝子

腸球菌 (*Enterococcus* spp.) には約 22 種含まれているが、臨床検体からは *E. faecalis*, *E. faecium* のほか、*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* が分離される事が多い。感染症法上は「分離菌のバンコマイシンの MIC 値が 16µg/ml 以上」を満たせば、VRE と判定されるが、臨床上および、感染対策を実施するための疫学上は菌種の同定とバンコマイシン耐性遺伝子の確認を行うことが望ましい。

バンコマイシン耐性遺伝子の *vanA*, *vanB* は接合等で異なる菌種間に伝播しうるため、全ての菌種が獲得する可能性がある。一方、*vanC* は染色体上に存在しており *vanC1* は *E. gallinarum*, *vanC2/3* は *E. casseliflavus* 特異的である (表)。臨床的、疫学的に問題となる VRE は多くの場合 *vanA*, *vanB* を獲得した *E. faecalis*, *E. faecium* である。一方でバンコマイシン耐性遺伝子のうち *vanB* を保有していても、バンコマイシンの MIC が 16µg/ml 未満の事もある。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

表：菌種の同定とバンコマイシン耐性遺伝子

遺伝子型	<u>vanA</u>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>
MIC (µg/ml)	VCM 64~>1000 TEIC 16~512	VCM 4~>1000 TEIC <0.5~8	VCM 2~32 TEIC 0.5~1
耐性遺伝子 の存在部位	プラスミド (染色体)	染色体 (プラスミド)	染色体
伝達性	あり	(あり)	なし
分離菌種	<u><i>E. faecium</i></u> <u><i>E. faecalis</i></u> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<u><i>E. faecium</i></u> <u><i>E. faecalis</i></u>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>

VCM: バンコマイシン、TEIC: テイコプラニン

3.3.3. 菌種の同定

医療機関の検査室などで実施されている生化学性状を用いた同定法で実施可能である。

ただし、自動検査機器による同定では種レベルの同定が不正確となる可能性がある。

VRE の検出上は臨臨床的、疫学的により重要な *E. faecium*、*E. faecalis* をその他の菌種から区別することが有用であり、簡便な同定方法として EF 培地を用いるものおよび、Multiplex PCR による *ddl* genes 検出によるものがある。

3.3.3.1. EF 培地を用いた同定方法

EF 培地に被験菌を接種し、35°C24 時間培養し、コロニーの色調で判定する。

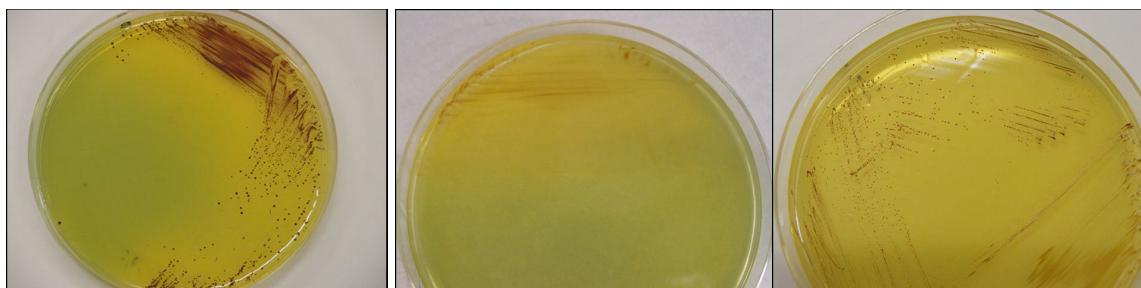
注意：

- ① 培養時間が長くなると色調が変化し、*E. faecium* の黄色が褐色化することがある。
- ② *E. faecalis* の暗赤褐色の色調は比較的判定しやすいが、その他の色調は鑑別に経験が必要となることがある。コントロール株と同時に実施すること、および他の同定方法とあわせて最終判定することが望ましい。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

コロニーの色調	菌種
暗赤褐色	<i>Enterococcus faecalis</i>
黄色	<i>Enterococcus faecium</i>
褐色	その他の菌種



Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Enterococcus gallinarum

3.3.3.2. Multiplex PCR による *ddl* genes 検出

Primers	5'-3'	PCR 産物のサイズ
<i>ddl-E. faecalis-F</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT	941 bp
<i>ddl-E. faecalis-R</i>	ACGATTCAAAGCTAACTG	
<i>ddl-E. faecium-F</i>	TAGAGACATTGAATATGCC	525 bp
<i>ddl-E. faecium-R</i>	CATC GTGTAAGCTAACTTC	

PCR 条件

95°C-20 sec.
55°C-120 sec. } 35 cycles
74°C 5 min.

3.3.4. ディスク拡散法によるバンコマイシン耐性型の推定

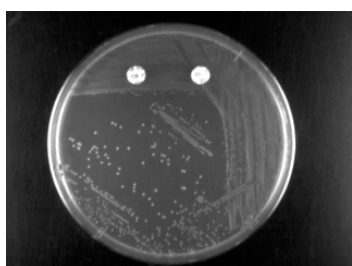
VanA、VanB、および VanC 型はそれぞれバンコマイシンとテイコプラニンに対する耐性パターンが異なるため、ディスク拡散法により推定する事が可能である。

ミューラーヒントン培地 1 枚に被験菌を密に接種した後、バンコマイシン(VCM)とテイコプラニン(TEIC)のディスクを置き、24-48 時間培養し、阻止円径を比較する。

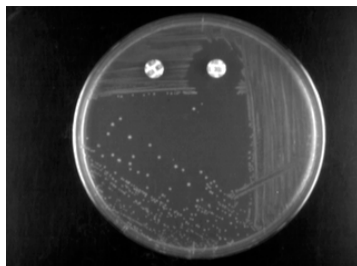
薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

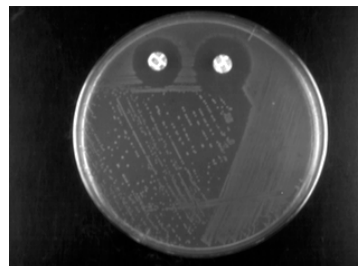
阻止円		判定
バンコマイシン	テイコプラニン	
なし	なし	VanA 型
なし	あり	VanB 型
あり	あり	VanC 型



VanA 型



VanB 型



VanC 型

3.3.5. Multiplex PCR 法によるバンコマイシン耐性遺伝子の検出

	Primers 5'-3'	PCR 産物サイズ
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> -F GGGAAAACGACAATTGC <i>vanA</i> -R GTACAATGCGGCCGTTA	732 bp
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> -F ATGGGAAGCCGATAGTC <i>vanB</i> -R GATTTCGTTCTCGACC	635 bp
<i>vanC1</i>	<i>vanC-1</i> -F GGTATCAAGGAAACCTC <i>vanC-1</i> -R CTTCGCCATCATAGCT	822 bp
<i>vanC2/3</i>	<i>vanC-2/C-3</i> -F CTCCTACGATTCTCTTG <i>vanC-2/C-3</i> -R CGAGCAAGACCTTTAAG	439 bp

PCR 条件

95°C-20 sec
55°C-120 sec } 35 cycles
74°C-5 min

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

注：近年、*vanA* を保有している株で、表現型（ディスク拡散法による耐性パターン）が VanB 型となる株（VanB phenotype-*vanA* genotype）が報告されている。

【参考文献】

1. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. 2008 Nov 20;13(47)
2. Kanchana MV, Deneer H, Blondeau J. Cost-effective algorithm for detection and identification of vancomycin-resistant enterococci in surveillance cultures. J. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 May;19(5):366-9.
3. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol. 1995 Jan;33(1):24-7.
4. Park IJ, Lee WG, Shin JH, *et al.* VanB phenotype-*vanA* genotype *Enterococcus faecium* with heterogeneous expression of teicoplanin resistance. J Clin Microbiol. 2008 Sep;46(9):3091-3.

【検査依頼先】

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

メールアドレス : taiseikin@nih.go.jp

【執筆者】

国立感染症研究所 細菌第二部第一室

（現 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室）

鈴木里和

3.4. 薬剤耐性緑膿菌

3.4.1. 感染症法上の定義

広域β-ラクタム剤、アミノ配糖体、フルオロキノロンの3系統の薬剤に対して耐性を示す緑膿菌である。

届出に必要な検査所見は下記の通りである。

- ア) イミペネムのMIC $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 又は、イミペネムの感受性ディスクの阻止円の直径が13mm以下
- イ) アミカシンのMIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 又は、アミカシンの感受性ディスクの阻止円の直径が14mm以下
- ウ) シプロフロキサシンのMIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 又は、シプロフロキサシンの感受性ディスクの阻止円の直径が15mm以下

ただし、イミペネム以外のカルバペネム系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性の結果が得られた場合も判断基準のアを満たすものとする。イミペネムによる検査と、その他のカルバペネム系薬剤による検査を実施した場合には、いずれかの薬剤の検査で耐性の結果が得られた場合にも基準を満たすものとする。

また、シプロフロキサシン以外のフルオロキノロン系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性が得られた場合も判断基準のウを満たすものとする。シプロフロキサシンによる検査と、その他のフルオロキノロン系薬剤による検査を実施した場合には、いずれかの薬剤の検査で耐性の結果が得られた場合にも基準を満たすものとする。

なお、我が国の臨床現場では、カルバペネム、アミノグリコシド、フルオロキノロンの3系統の抗菌薬に対し耐性を示す緑膿菌を、薬剤耐性緑膿菌のほか、多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP) と称することもある。本項では、「多剤耐性緑膿菌」の語を用いる。

3.4.2. 多剤耐性緑膿菌の耐性メカニズムとその検査法

3.4.2.1. カルバペネム耐性機構

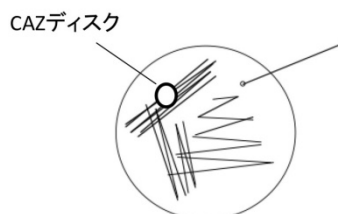
メタロ-β-ラクタマーゼ産生株と非産生株に大別される。IMP-1 や VIM-2 といったメタロ-β-ラクタマーゼを産生する場合、イミペネムなどのカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す。メタロ-β-ラクタマーゼ産生株は、SMA ディスク (栄研化学) を用いて識別することができる。

薬剤耐性菌

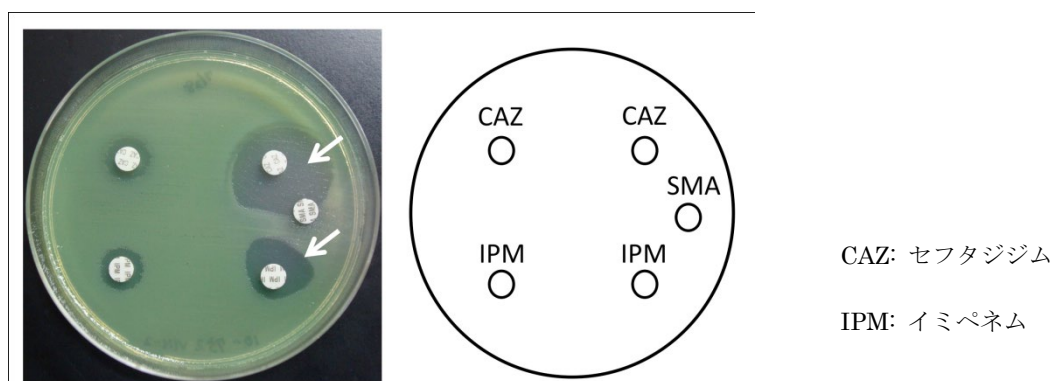
令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.4.2.1.1. SMA ディスクを用いたメタロ-β-ラクタマーゼ産生のスクリーニング検査

1. 被検菌をミューラーヒントン寒天培地等に塗布する。
2. 下図のように濃厚に塗布した部分に CAZ（セフトジジム）のディスクを置く（薬剤耐性遺伝子に関連するプラスミドの脱落を防ぐ為）



3. 35°C, 16~18 時間（あるいは over night）培養する。
4. 培養後、CAZ ディスク周囲の菌を滅菌綿棒でかき採り、滅菌水を入れたエッペンドルフチューブに McFarland 0.5 になるように懸濁する。
5. 4.で調整した菌液に滅菌綿棒を浸した後、ミューラーヒントン寒天培地全面に塗布する。
6. SMA ディスク、CAZ ディスク、IPM ディスクを下図のように配置する。



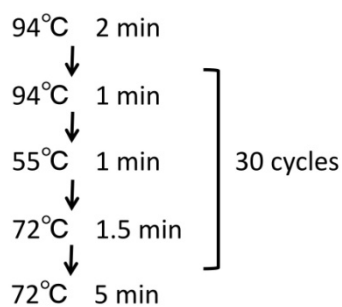
SMA ディスクの作用により、発育阻止帯の拡張（→）が認められた場合、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株と判定する。

3.4.2.1.2. PCR によるメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

以下に PCR プライマーセットと反応条件の例を示す。

耐性遺伝子の種類	プライマー配列	増幅サイズ
<i>bla_{IMP-1}</i>	5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3'	587 bp
	5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'	
<i>bla_{IMP-2}</i>	5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3'	678 bp
	5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3'	
<i>bla_{VIM-2}</i>	5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3'	801 bp
	5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'	
<i>bla_{NDM-1}</i>	5'-TTG CCC AAT ATT ATG CAC CC-3'	420 bp
	5'-ATT GGC ATA AGT CGC AAT CC-3'	

PCR反応



3.4.2.2. アミカシン耐性機構

アミノグリコシドアセチル化酵素：アミカシン耐性には AAC(6['])-Ib といったアミノグリコシドアセチル化酵素が関与している。アミノグリコシドアセチル化酵素には亜型が多数存在するため、全てを PCR により検査するのは現実的には難しい。

3.4.2.3. フルオロキノロン耐性機構

DNA ジャイレース・トポイソメラーゼ IV の変異：フルオロキノロンの標的部位である DNA ジャイレース・トポイソメラーゼ IV の QRDR(Quinolone Resistance Determinant Region) 領域に変異が入ることで、フルオロキノロン耐性が生じる。したがって、QRDR 領域を PCR で増幅し、その増幅産物の配列を決定することで、耐性に関与する変異を検出することができる。詳細は文献を参照いただきたい。

【参考文献】

1. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamase and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5407-5413.
2. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):40-43.
3. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug;45(8):2263-2268.

【検査依頼先】

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

メールアドレス : taiseikin@nih.go.jp

【執筆者】

国立感染症研究所 細菌第二部第一室

(現 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学・耐性菌制御学)

和知野純一

3.5. 薬剤耐性アシネトバクター

3.5.1. 感染症法上の定義

広域β-ラクタム剤、アミノ配糖体、フルオロキノロンの3系統の薬剤に対して耐性を示すアシネトバクター属菌である。

届出に必要な検査所見は下記の通りである。

抗菌薬	耐性(R)の判定基準	
	微量液体希釈法	ディスク拡散法
イミペネム*	≥ 16 µg/mL	阻止円直径 ≤ 13 mm
アミカシン	≥ 32 µg/mL	阻止円直径 ≤ 14 mm
シプロフロキサシン**	≥ 4 µg/mL	阻止円直径 ≤ 15 mm

* イミペネム以外のカルバペネム系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性の結果が得られた場合も基準を満たすものとする。イミペネムによる検査と、その他のカルバペネム系薬剤による検査を実施した場合には、いずれかの薬剤の検査により耐性の結果が得られた場合にも基準を満たすものとする。

**シプロフロキサシン以外のフルオロキノロン系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性が得られた場合も基準を満たすものとする。シプロフロキサシンによる検査と、その他のフルオロキノロン系薬剤による検査を実施した場合には、いずれかの薬剤の検査で耐性の結果が得られた場合にも基準を満たすものとする。

3.5.2. 菌種の同定について

アシネトバクター属は、30以上の種が報告されている。そのうち、ヒト臨床検体では *Acinetobacter baumannii*、*Acinetobacter pittii*（旧名称；*Acinetobacter genomic species 3*）、*Acinetobacter nosocomialis*（旧名称；*Acinetobacter genomic species 13TU*）が主に分離される。アシネトバクター属は、生化学性状による同定方法で属レベルの同定は可能であるが、種レベルの正確な分類は困難である。従って、生化学的性状をもとに菌種を同定するキットや自動検査機器等で *A. baumannii* と判定された菌種には、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌が含まれるため、タイピングなどの検査結果の解釈には注意が必要である。

なお、感染症法に基づく届出対象はアシネトバクター属菌であり、種レベルの正確な分類は必ずしも求められていない。アシネトバクター属の菌種分類方法については、いくつか提唱されているが、しばしば用いられる *rpoB* 遺伝子配列を基にした手法を参考文献に示した。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.5.3. 薬剤耐性アシネトバクターの耐性メカニズムとその検査法

3.5.3.1. カルバペネム耐性

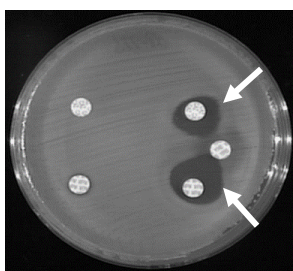
主な耐性機構は、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP 型、VIM 型、NDM 型等) あるいは OXA 型 β-ラクタマーゼ (OXA-51-like、OXA-23-like、OXA-40/24-like、OXA-58-like) 産生による。ただし、OXA 型 β-ラクタマーゼ産生株であってもイミペネム等のカルバペネム系薬剤に対する MIC が比較的低い株 (1~8 μg/mL) も報告されている。

3.5.3.1.1. SMA disk を用いたメタロ-β-ラクタマーゼ産生のスクリーニング検査

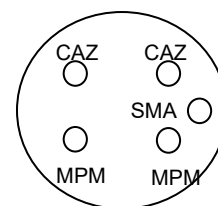
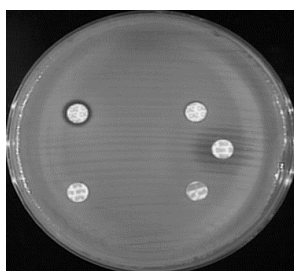
メタロ-β-ラクタマーゼ産生の有無を推定する方法のひとつに、メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) を用いる方法がある。

1. 滅菌水あるいは滅菌生理食塩水にコロニーを懸濁し、McFarland 0.5 程度の菌液を調製する。
2. 調製した菌液を綿棒でミュラーヒントン (MH) 平板寒天培地の全面に塗布する。120 度ずつ角度を変えて塗布することを 4 回行う。(参考: CLSI M02-13th では、全面に塗布したのち、60 度ずつ角度を変え、さらに 2 回同様に塗布する旨の記載がある)
3. KB ディスクを下図のように置き、35°C で一晚 (16-18 時間) 培養後、判定する。

メタロ-β-ラクタマーゼ産生株



メタロ-β-ラクタマーゼ非産生株



CAZ; セフトジジム

MPM; メロペネム

SMA; メルカプト酢酸ナトリウム

メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の場合は、SMA の作用によりセフトジジム及びメロペネムの阻止円拡大が観察される (上図→)。(図のメロペネムの代わりにイミペネムを用いた場合も、多くの場合、同様の結果が得られる)

一方、OXA 型 β-ラクタマーゼの効果的な阻害剤は見出されておらず、OXA 型 β-ラクタマーゼ産生株の推定は PCR 法での検出が必要である。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.5.3.1.2. PCR 法によるメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

わが国で分離されるアシネトバクター属の産生するメタロ-β-ラクタマーゼとして IMP 型、VIM 型、NDM 型等が報告されている。PCR 検出用のプライマーセットを以下に示す。

遺伝子型	プライマー配列 (5'→3')	増幅サイズ
IMP-1 型*	F; 5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3'	587 bp
	R; 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'	
IMP-2 型*	F; 5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3'	678 bp
	R; 5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3'	
VIM-2 型	F; 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3'	801 bp
	R; 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'	
NDM 型	F; 5'-TTG CCC AAT ATT ATG CAC CC-3'	420 bp
	R; 5'-ATT GGC ATA AGT CGC AAT CC-3'	

* IMP-1 型、IMP-2 型の代わりに IMP gen プライマー (IMP 型検出汎用プライマー、配列等は 34 ページ参照) を使用することも可能

PCR 反応サイクル例

94℃	2分	} 30 サイクル
94℃	1分	
55℃	1分	
72℃	1分30秒	
72℃	5分	

3.5.3.1.3. PCR 法による OXA 型 β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

アシネトバクター属の産生する OXA 型 β-ラクタマーゼとして OXA-51-like、OXA-23-like、OXA-40/24-like、OXA-58-like の 4 種類がある。

アシネトバクター属のうち、*A. baumannii* は、通常染色体上に OXA-51-like β-ラクタマーゼをコードする遺伝子を持つが、多くの場合は発現量が少なく、プロモーター配列を含む *ISAbal* を上流に獲得した場合に OXA-51-like β-ラクタマーゼの発現量が上昇しカルバペネムに低感受性化する。そのため、OXA-51-like 産生株の推定は、*ISAbal* F プライマーと OXA-51-like R プライマーを組み合わせ、増幅するか否かを確認する。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

遺伝子型	プライマー配列 (5'→3')	増幅サイズ
OXA-51-like	F; 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353 bp
	R; 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	
OXA-23-like	F; 5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	501 bp
	R; 5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	
OXA-40/24-like	F; 5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246 bp
	R; 5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	
OXA-58-like	F; 5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599 bp
	R; 5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	
IS <i>Aba1</i>	F; 5'-CAC GAA TGC AGA AGT TG-3'	559 bp*
	R; 5'-CGA CGA ATA CTA TGA CAC-3'	

* IS*Aba1* F と OXA-51-like R プライマーを組み合わせた場合の増幅サイズ： 1,222 bp

PCR サイクル例

<u>OXA 型 β-ラクタマーゼ</u>			<u>IS<i>Aba1</i> F・OXA-51-like R</u>	
94°C	5 分		95°C	5 分
94°C	25 秒	} 30 サイクル	95°C	45 秒
58°C	40 秒		58°C	45 秒
72°C	50 秒		72°C	3 分
72°C	6 分		72°C	5 分
				} 35 サイクル

3.5.3.2. アミノグリコシド耐性機構

アミノグリコシド系薬剤に対する耐性は、アミノグリコシド修飾酵素 (*aacC1*、*aadA1*、*aadB*、*aphA6* など) や、16S rRNA メチラーゼ (*armA*) などが報告されている。種類も多く、通常の検査で全てを調べるのは困難なため、ここでは省略する。

3.5.3.3. フルオロキノロン耐性機構

アシネトバクター属のキノロン耐性には、主にキノロンの標的部位である DNA ジャイレース (GyrA) およびトポイソメラーゼ IV (ParC) の変異が関与する。変異によってキノロン耐性を付与する領域は QRDR (Quinolone Resistance Determinant Region) と呼ばれる。変異の有無は QRDR 領域を PCR によって増幅し、増幅産物の

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

シーケンス解析を行うことで検出可能である。PCR およびシーケンス用のプライマー等の詳細は文献 4, 5 を参考にさせていただきたい。

3.5.4. パルスフィールド電気泳動法によるタイピング解析

制限酵素：SmaI あるいは ApaI

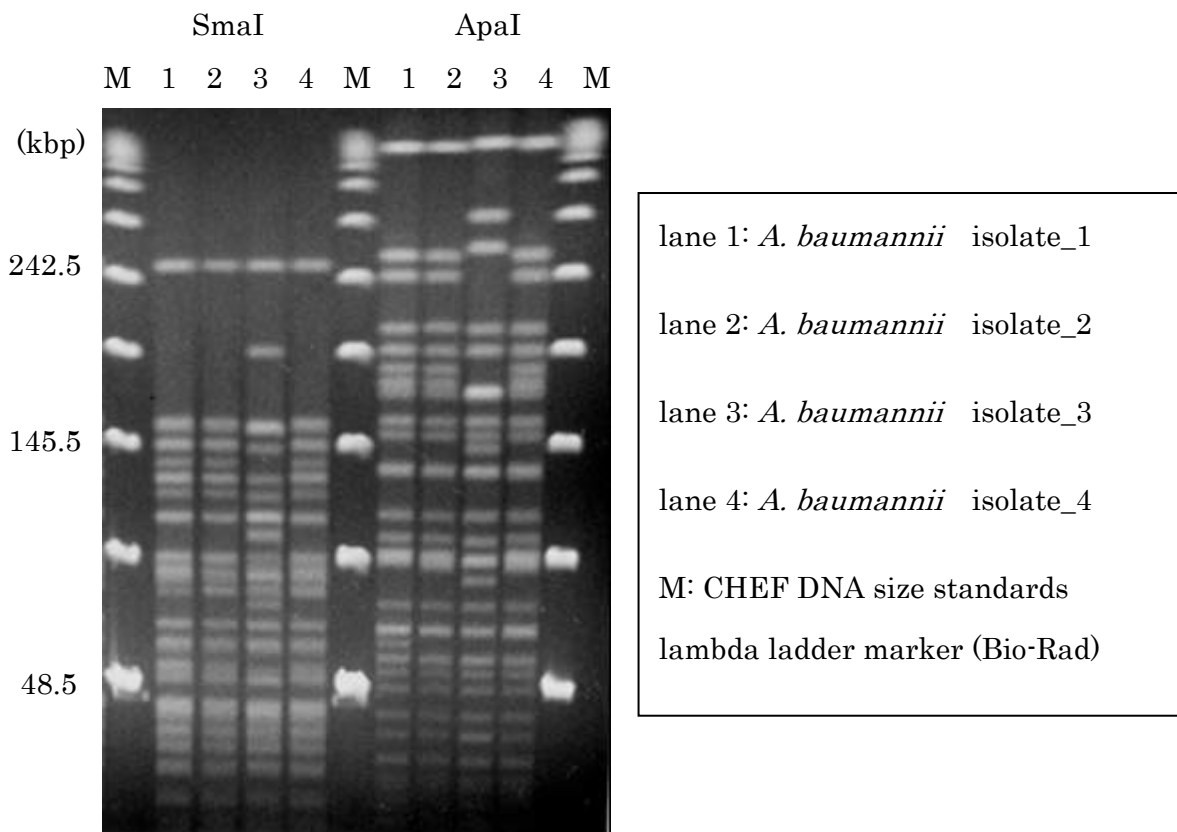
泳動条件(CHEF Mapper (Bio-Rad)の場合)

：スイッチングタイム 2.98s～21.79s

電圧 6V / 温度 14℃ / 泳動時間 27時間

*プラグの作製は、*E. coli*等と同様の方法で行う。

泳動パターンの例を以下に示す（菌株はいずれも *A. baumannii*）



【参考文献】

菌種の同定

Scola B, Gundi V, Khamis A, Raoult D. Sequencing of *rpoB* gene flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 2006, 44:827-832 (*rpoB* 遺伝子シーケンスによって分類する方法)

耐性遺伝子の検出

1. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi H, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol. 2003, 41:5407-5413
2. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006, 27:351-353
3. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TM. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 2006, 258:72-77
4. Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents Chemother. 1995, 39:1201-1203
5. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. 1997, 39:7557-762

【検査依頼先】

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

メールアドレス : taiseikin@nih.go.jp

【執筆者】

国立感染症研究所 細菌第二部第一室 松井真理

(現 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室)

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.6. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

3.6.1. 感染症法上の定義

メロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌による感染症である。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE）の感染症法上の定義及び届出に必要な検査所見は以下のとおりである。

検査方法	検査材料
分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認 ア メロペネムのMIC値が2 μg/ml 以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22 mm以下であること イ 次のいずれにも該当することの確認 （ア）イミペネムのMIC値が2 μg/ml 以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22 mm以下であること （イ）セフメタゾールのMIC値が64 μg/ml 以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12 mm以下であること	血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体
次のいずれにも該当することの確認 ア 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出 イ 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認 （ア）メロペネムのMIC値が2 μg/ml 以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22 mm以下であること （イ）次のいずれにも該当することの確認 a イミペネムのMIC値が2 μg/ml 以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22 mm以下であること b セフメタゾールのMIC値が64 μg/ml 以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12 mm以下であること ウ 分離菌が感染症の起原菌と判定されること	喀痰、膿、尿その他の通常無菌的ではない検体

3.6.2. 腸内細菌科細菌とは

2016 年に、腸内細菌科細菌 (Enterobacteriaceae) に分類されていた菌種の一部が他の科 (family) に変更されたことから、これまでの腸内細菌科細菌 (Enterobacteriaceae) と同義の用語として、より上位レベル (目、order) である腸内細菌目細菌 (Enterobacterales) を使用することが提唱された (参考文献 1)。薬剤感受性試験の判定基準として国内で広く用いられている CLSI M100 においても 2020 年版 (30th Edition) より、Enterobacteriaceae が Enterobacterales に変更され、今後は腸内細菌目細菌 (Enterobacterales) の記載がより普及すると思われる。腸内細菌目細菌 (Enterobacterales) には、Enterobacteriaceae、Erwiniaceae、Pectobacteriaceae、Yersiniaceae、Hafniaceae、Morganellaceae、Budviciaceae の 7 科が属し、通性嫌気性、ブドウ糖発酵のグラム陰性桿菌であるサルモネラ属や赤痢菌、大腸菌、*Klebsiella* 属等の病原細菌から *Serratia* 属のような日和見病原体まで多くの菌種が含まれる。腸内細菌目細菌 (Enterobacterales) のうち腸内細菌科細菌 (Enterobacteriaceae) 以外の科に属する菌種として、*Morganella* 科 (Morganellaceae) に *Morganella* 属、*Proteus* 属、*Providencia* 属が、*Yersinia* 科 (Yersiniaceae) に *Serratia* 属などが含まれる (LPSN-List of Prokaryotic names with Standing Nomenclature, <https://lpsn.dsmz.de/> 2020 年 5 月現在情報より)。

2018 年の CRE 感染症届出の分離菌種は、*Klebsiella aerogenes* (旧 *Enterobacter aerogenes*)、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Escherichia coli* の順に多く、これら上位 4 菌種で届出の 80%以上を占めた。一方、腸内細菌目細菌以外の細菌であるが、これまでに誤って届出された菌種として緑膿菌、腸球菌のほか、*Aeromonas hydrophila*、*Stenotrophomonas maltophilia* があった (参考文献 2)。*A. hydrophila* は、食中毒の原因菌として知られており、腸内細菌科細菌と誤解されることの多い菌種である。

なお、本マニュアルでは、混乱を避けるためにこれまで使用されてきた腸内細菌科細菌 (Enterobacteriaceae) の表記を以下使用する。

3.6.3. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の耐性機序とその検査法

3.6.3.1. 腸内細菌科細菌におけるカルバペネム耐性機序

腸内細菌科細菌におけるカルバペネム耐性機序は、カルバペネマーゼ産生の有無により大きく二つに分けられる。カルバペネマーゼを産生している場合は、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae) と呼び、カルバペネマーゼ産生によらない CRE と区別することが多い。カルバペネマーゼ非産生腸内細菌科細菌のカルバペネム耐性は、膜の透過性低下に加え、カルバペネム分解活性が弱いことによる。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

ペネマーゼには分類されない AmpC や基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase, ESBL) などの β -ラクタマーゼの産生によるものが多いとされる (参考文献 3)。

カルバペネマーゼは一般的にカルバペネム系も含むほとんどの β -ラクタム剤を加水分解するため、CPE は β -ラクタム剤に汎耐性となることが多い。また、カルバペネマーゼ遺伝子はアミノグリコシド耐性遺伝子などその他の系統の薬剤耐性遺伝子とともにプラスミド上に存在することが多く、このプラスミドが菌種間を水平伝達しうる。そのため、CPE はカルバペネマーゼ非産生菌にくらべ多剤耐性傾向が強く、かつ、拡散伝播経路も複雑になりやすい。

CRE の基準を満たすかどうかの確認は菌種の同定と薬剤感受性試験の結果のみで可能であるが、それに加えて、CPE なのか、カルバペネマーゼ非産生菌であるのか確認することが望ましい。CPE の検査方法として一般的にはカルバペネマーゼ遺伝子の検出を試みることが多い。

3.6.3.2. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の検査

平成 29 年 3 月 28 日 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (健感発 0328 第 4 号) により、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」の届出があった際には、地方衛生研究所等で分離菌株の検査を行い、結果を感染症サーベイランスシステム (NESID) の病原体検出情報を通じて報告することとされた。検査項目は、通知別添「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 検査法」に示された項目 1~3 であり、原則として実施する検査項目と推奨される検査項目に大別される。腸内細菌科細菌には多くの菌種が含まれ、かつ薬剤耐性遺伝子の種類は多岐にわたるため、検査対象となる菌株の特徴は様々である。検査は PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出が中心となるが、非特異バンドの出現、現行の PCR プライマーでは検出しづらい遺伝子型株などによる判定の誤りを防ぎ高い検査精度を保つため、CRE 検査を実施するにあたっては遺伝子検査 (項目 1) と表現型検査 (項目 2 及び 3) の結果に明らかな矛盾がないことを確認して報告することが求められる。検査結果に明らかな矛盾のないことの確認は、本マニュアル 48 ページ資料 2 を参考にするとよい。

なお、通知別添は本マニュアルの【別添資料 1】に示す。

次ページに抜粋した項目の検査結果については、2020 年 4 月現在、NESID への報告対象としている。(Ver2.1 改訂時に【別添資料 2】を削除)

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

NESID への報告対象とされている検査項目：通知別添より抜粋

医療機関から分離され、届出基準を満たすことが確認された菌株について、下記の 1～3 までを地方衛生研究所において実施すること。このうち、●については原則として実施する検査項目とし、○については推奨される検査項目とする。

1 で検出された遺伝子型と 2（及び 3 を実施した場合は 3）の産生性の結果が一致することを確認する。（中略）

1 耐性遺伝子の検出

●PCR 法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子の検出

IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型

⇒本マニュアル 3.6.3.2.1.① 33～36 ページ及び 3.6.3.2.1.③④ 38 ページ参照

○いずれも不検出の場合、以下のカルバペネマーゼ遺伝子の PCR 法による検出

VIM 型、GES 型、IMI 型、KHM 型、SMB 型

⇒本マニュアル 3.6.3.2.1.② 37 ページ及び 3.6.3.2.1.③④ 38 ページ参照

2 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

●メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) /EDTA 阻害有：メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL)

●ボロン酸 阻害有：KPC 型

⇒本マニュアル 3.6.3.2.2. 39～42 ページ参照

3 カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法

○Carba NP テスト

○Carbapenem Inactivation Method(CIM)

⇒本マニュアル 3.6.3.2.3. 42～45 ページ参照

3.6.3.2.1. PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出

①主要なカルバペネマーゼ遺伝子の検出（●原則として実施する検査項目）

腸内細菌科細菌で報告のある主なカルバペネマーゼ遺伝子は、IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型の 4 種である。PCR 検出用プライマーを表 1 に示す。

カルバペネマーゼ遺伝子型の分布は、国や地域によって異なる。日本国内では、IMP 型の報告が最も多い。（IMP 型については 35～36 ページの参考情報を参照）

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

一方、海外では NDM 型、KPC 型、OXA-48 型の報告が多い。日本国内では、海外滞在歴のある患者からの分離が主とされてきたが、近年では国内例の報告が増加している（参考文献 4）。海外滞在歴のない患者から検出された場合は、周辺に別の保菌者が存在する（参考文献 5）可能性も考えられる。

表 1：主要なカルバペネマーゼ遺伝子

	Ambler の分類	遺伝子 型	PCR 検出用プライマー配列 (5'→3')	増幅サイズ 参考文献	阻害剤
メタロ β ラク タマー ゼ	class B	IMP 型	IMP gen プライマー F: GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC R: CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	188 bp 文献 6	メルカプ ト酢酸ナ トリウム (SMA)、 EDTA
		NDM 型	F: TTGCCCAATATTATGCACCC R: ATTGGCATAAGTCGCAATCC	420 bp 文献 7, 8	
セリン β ラク タマー ゼ	class A	KPC 型	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893 bp 文献 9	ボロン酸
	class D	OXA-48 型	F: TTGGTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	744 bp 文献 10	なし

PCR 反応サイクル例

94°C	2 分	} 30 サイクル
94°C	1 分	
55°C	1 分	
72°C	1 分 30 秒	
72°C	5 分	

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

参考情報：IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) について

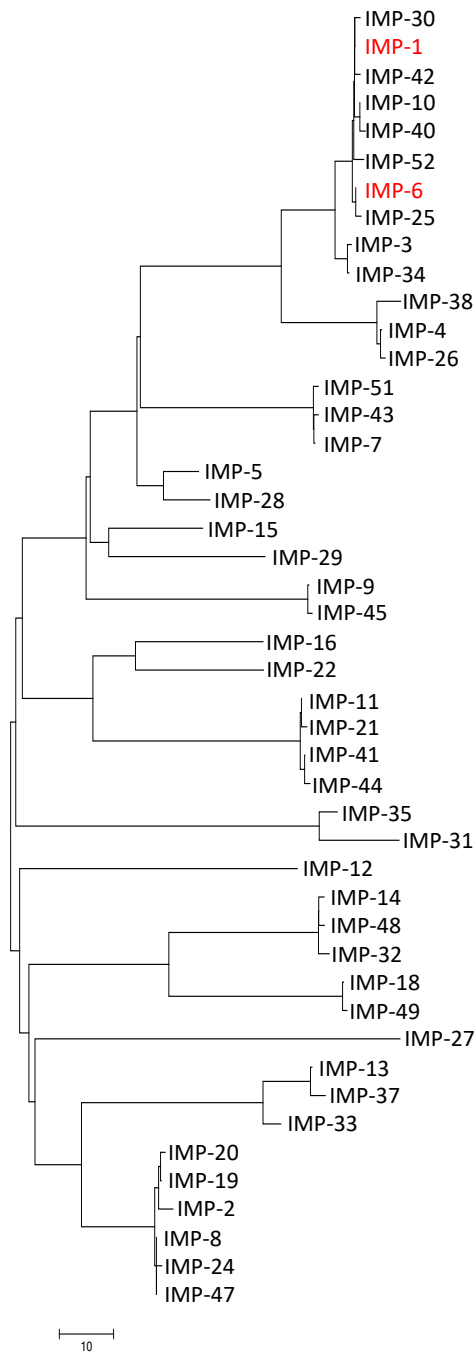
IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 遺伝子は、最初に報告されたIMP-1 MBL 遺伝子のほか、配列が異なる50種以上(2020年3月9日現在：85種)の遺伝子型が報告されている。これらは、IMP-1型とIMP-2型などに大別され、PCRでおおよそ型別可能である(表2、次ページ図)。ただし、一部の遺伝子型はIMP-1型、IMP-2型いずれのプライマーでも検出できないため、検出の際は表1のIMP gen プライマー等、共通配列に設計された汎用プライマーを使用するとよい。

日本国内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌で検出されるIMP型の多くが、IMP-1 MBLもしくはIMP-6 MBLであり、IMP gen プライマー(34ページ表1)やIMP-1型プライマー(表2)で検出可能である。IMP-1 MBL 遺伝子とIMP-6 MBL 遺伝子は1塩基(全長741bpのうち640番目の塩基:IMP-1はA、IMP-6はG)のみの違いであるため、IMP-1あるいはIMP-6の判定は、IMP-1 all プライマー(表2)などを用いたシーケンス解析が必要となる。なお、IMP-1とIMP-6をPCRで判別する方法も報告されている(参考文献11)。

IMP-1型、IMP-2型プライマー、IMP-1 all プライマーの配列は表2に示す。

表2

Primer	Sequence (5'→3')	増幅サイズ	文献	目的
IMP-1 型	F: ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	587 bp	12	IMP-1 型検出
	R: ACAACCAGTTTTGCCTTACC			
IMP-2 型	F: GTTTTATGTGTATGCTTCC	678 bp	12	IMP-2 型検出
	R: AGCCTGTTCCCATGTAC			
IMP-1 all	F: ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741 bp	—	IMP-1 型 シーケンス
	R: TTAGTTGCTTGGTTTTGATG			



IMP-1型プライマーで検出 (プライマー配列一致)

図.

IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子配列による系統樹

(IMP-1～IMP-52)

* IMP gen プライマー (34 ページ表 1) は、その配列から、図中の遺伝子型のうち IMP-27 を除く全ての IMP 型を検出可能と推定される。

* IMP-1 型、IMP-2 型プライマーで検出される遺伝子型として、プライマー配列と一致する塩基配列を有する型のみ記載した。プライマー配列と数塩基のみ異なる一部の遺伝子型も検出可能であるが、使用する機器や酵素による影響も考えられるためここでは表記していない。

IMP-2型プライマーで検出 (プライマー配列一致)

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

②比較的稀なカルバペネマーゼ遺伝子型（○推奨される検査項目）

カルバペネマーゼ遺伝子は前述の 4 種の他にも多くの型が報告されている。SMB 型、KHM 型、GES 型、IMI 型は、国内で報告例がある。VIM 型は緑膿菌での報告は多いが、腸内細菌科細菌ではヨーロッパの一部や台湾など限られた地域からの報告にとどまっている。SMB 型、KHM 型、VIM 型、GES 型、IMI 型のカルバペネマーゼ遺伝子の PCR 検出用プライマーを表 3 に示す。

表 3：比較的稀なカルバペネマーゼ遺伝子*

	Ambler の分類	遺伝子型	PCR 検出用プライマー配列 (5'→3')	増幅産物サイズ PCR 参考文献	阻害剤
			国内検出情報・検査における注意など		
メタロ-β-ラクタマーゼ	class B	SMB 型	F: CAGCAGCCATTCACCATCTA R: GAAGACCACGTCCTTGCACT	492 bp 参考文献 13	メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)、EDTA
			2010 年 <i>Serratia marcescens</i> で報告 (参考文献 13)		
		KHM 型	F: ATACGCCCATTTTCAGCCACA R: GTCGCCAACTTTTCCGTGAC	465 bp —	
		VIM 型	VIM-2 型 F: ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R: CTACTIONAACGACTGAGCG	801 bp 参考文献 12	
			緑膿菌では報告が多いが、腸内細菌科細菌ではヨーロッパなど限られた地域からのみ報告		
セリン-β-ラクタマーゼ	class A	GES 型	F: CTTTCATTCACGCACTATTAC R: TAACTTGACCGACAGAGG	827 bp 参考文献 15	—**
			一部の亜型のみカルバペネマーゼであるため、カルバペネマーゼか否かの判定にはシークエンスが必要 (参考文献 16、17)		
		IMI 型	F: TGCGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTTGAAGCTTCTGCG	399 bp 参考文献 18	—**
			主に <i>Enterobacter</i> 属で報告あり		

*いずれも 34 ページの主要なカルバペネマーゼ遺伝子と同様の PCR 条件で増幅可能

**検討株数は限られているが、GES 型、IMI 型等のクラス A カルバペネマーゼ産生性を、KPC 型と同様にボロン酸を用いてスクリーニングする方法が提唱されている (参考文献 19)。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

③マルチプレックス PCR によるカルバペネマーゼ遺伝子検出

上述の項目①②に示したカルバペネマーゼ遺伝子のうち、IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、GES 型の 6 種類を検出するためのマルチプレックス PCR 方法が報告されている（参考文献 20）。プライマー配列及び反応条件等の詳細は、文献を参考にしていきたい。

④シーケンスによるカルバペネマーゼ遺伝子の型別

カルバペネマーゼ遺伝子の型別を行う場合は、PCR 増幅産物等の塩基配列をサンガーシーケンス等で決定し、参照配列と比較する。原則、アミノ酸配列が一致することを確認すればよい。

2020 年 3 月現在、カルバペネマーゼ遺伝子等の薬剤耐性遺伝子の参照配列情報は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Reference Gene Catalog サイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/>) で確認できる。

PCR 増幅及びシーケンスに使用可能なプライマーの例を表 4 に示す。

遺伝子型別のためには、厳密にはカルバペネマーゼ遺伝子の周辺配列に設計したプライマーで増幅し、目的遺伝子全長の配列決定が必要である。しかし、カルバペネマーゼ遺伝子の周辺配列は、同じ遺伝子型であっても株によって多様性があるため、共通プライマーの設計が困難なことも多い。カルバペネマーゼ遺伝子の 5' 末端、3' 末端に重なるように設計されたプライマー（表 4 目的遺伝子とプライマー配列の重なり ありのプライマー）を使用する場合は、シーケンスで決定した配列のうちプライマー配列を除いた部分を参照配列と比較することで遺伝子型を推定可能であるが、厳密には遺伝子全長の配列決定はできないことを留意いただきたい。

表 4：プライマー配列の例

遺伝子型 (遺伝子長)	プライマー配列 (5'→3')	増幅サイズ 参考文献	目的遺伝子と プライマー配列の 重なり
IMP-1 型 (741 bp)	IMP-1 all プライマー配列を参照 (35 ページ) 注：IMP-1 型のみ対象、全ての IMP 型を増幅できるわけではない	741 bp —	<u>あり</u>
NDM 型 (813 bp)	Pre-NDM-A : 5'-CACCTCATGTTTGAATTCGCC-3' Pre-NDM-B : 5'-CTCTGTCACATCGAAATCGC-3'	984 bp 文献 21	なし
KPC 型 (882 bp)	KPC 型検出用プライマー配列を参照 (34 ページ)	893 bp 文献 9	<u>あり</u>
OXA-48 型 (798 bp)	OXA-48 型検出用プライマー配列を参照 (34 ページ)	744 bp 文献 10	<u>あり</u>
GES 型 (864 bp)	GES 型検出用プライマー配列を参照 (37 ページ)	827 bp 文献 15	<u>あり</u>

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

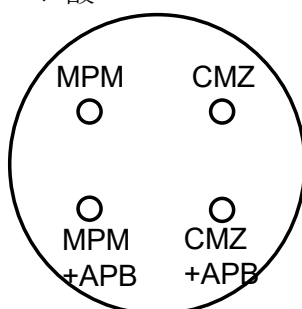
3.6.3.2.2. 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

各種カルバペネマーゼの阻害剤（34 ページ表 1、37 ページ表 3 参照）を用いて、その産生性の有無をディスク法で確認する方法である。

ここでは、●原則として実施する検査項目であるボロン酸とメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）を用いた試験方法を示す。ボロン酸は KPC 型カルバペネマーゼ阻害剤、メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）は、IMP 型や NDM 型などのメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤である。OXA-48 型の明確な阻害剤は報告されていない。

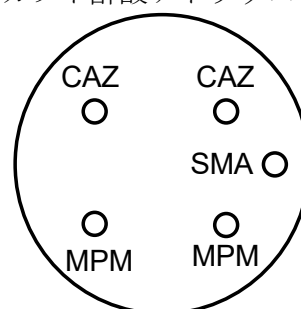
1. 滅菌水あるいは滅菌生理食塩水に純培養したコロニーを懸濁し、McFarland 0.5 の菌液を調製する。
2. 調製した菌液を、ミューラーヒントン（MH）寒天平板培地に綿棒で均一に塗抹する。120 度ずつ角度を変えて塗抹することを 3～4 回行う。（参考：CLSI M02-13th では、培地全面に塗布したのち、60 度ずつ角度を変え、さらに 2 回同様に塗布する旨の記載がある）
3. ディスクを下図（A, B の 2 枚）のように置き、35℃で一晩（16～18 時間）培養後、判定する。ディスク間の距離を一定に保つため、テンプレート（47 ページ 資料 1 など）を使用するとよい。

A. ボロン酸



MPM：メロペネムディスク
CMZ：セフメタゾールディスク
+APB：3-アミノフェニルボロン酸添加（10 μL）

B. メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）



CAZ：セフトジジムディスク
MPM：メロペネムディスク
SMA：メルカプト酢酸ナトリウムディスク

3-アミノフェニルボロン酸溶液の調製

3-アミノフェニルボロン酸をジメチルスルホキシドにて 50 mg/mL になるよう溶解する。溶解液は-20℃で保存する。

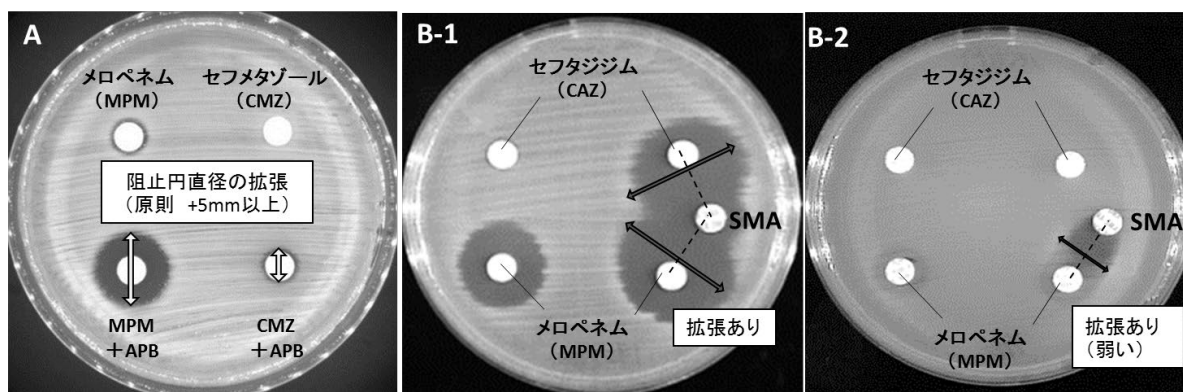
3-アミノフェニルボロン酸溶液の添加

菌液を塗抹した培地に KB ディスクを配置したのち、ディスク 1 枚あたり 10 μL を添加する。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

陽性例



陰性例

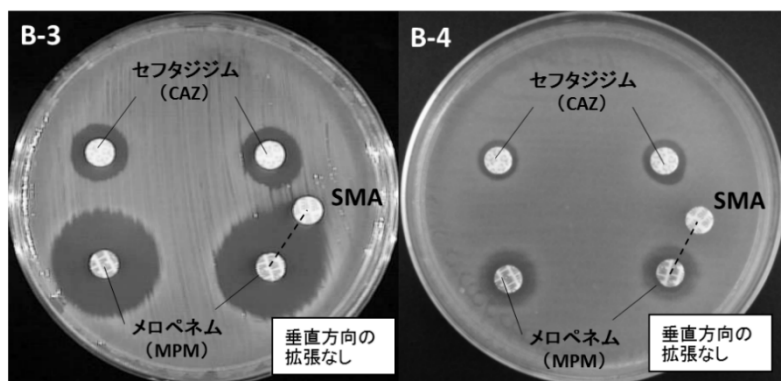


図 A. KPC 型カルバペネマーゼ産生株

図 B-1. IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株 (IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ)

図 B-2. NDM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株 (NDM-5 メタロ-β-ラクタマーゼ)

図 B-3 及び図 B-4. メタロ-β-ラクタマーゼ非産生株 (SMA 陰性例)

判定方法

図 A. ボロン酸

陽性例として、図 A に KPC 型カルバペネマーゼ産生株の結果を示す。3-アミノフェニルボロン酸添加により、カルバペネム系抗菌薬であるメロペネムの阻止円直径の拡張 (原則 5 mm 以上) を認めた場合、陽性と判定する。阻止円が全く形成されない場合の阻止円直径は、ディスクの直径である 6 mm とする。

留意点として 3-アミノフェニルボロン酸は、カルバペネマーゼには分類されない AmpC β-ラクタマーゼも阻害することから、AmpC β-ラクタマーゼ産生株の場合もボロン酸陽性 (メロペネムの阻止円直径の 5 mm 以上拡張あり) となることがある。したがって、ボロン酸陽性と判定された株のうち、KPC 型カルバペネマーゼ産生株は一部である。なお、セフメタゾール (CMZ) ディスクは、AmpC β-ラクタマーゼ産生菌検出の感度を上げる目的

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

で配置しており、AmpC 産生性との鑑別は、セフメタゾールディスクを用いたボロン酸試験の結果と、推奨される検査項目であるクロキサシリンを用いた方法の結果とを併せて判定するとよい。AmpC 産生性の判定は、後述の「参考情報：クロキサシリンを用いた AmpC β -ラクタマーゼ産生性の確認」及び次ページ表 5 を参照する。

図 B-1～図 B-4. メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)

図 B-1 は IMP 型メタロ- β -ラクタマーゼ検出例を示す。図 B-1 のように、抗菌薬ディスクと SMA ディスクの中心を結ぶ線 (図 B 点線) に対して垂直方向 (図 B 矢印方向) の阻止円形拡張が認められた場合に陽性と判定する。IMP 型は図 B-1 のような明確な拡張が認められるが、NDM 型の場合は拡張がやや弱い (図 B-2)。拡張が弱くメタロ- β -ラクタマーゼ産生株か否かの判定が困難な場合は、PCR 法の結果のみならず、CarbaNP テストや mCIM などのカルバペネマーゼ産生性の確認試験 (42～45 ページ、3.6.3.2.3) の結果と併せて確認するとよい。

一方で、点線に対して平行方向のみの拡張の場合はメタロ- β -ラクタマーゼ非産生株の場合が多いため、判定の際は拡張方向に留意する。図 B-3 は垂直方向の拡張を認めないため陰性と判定する。判定に慣れないうちは誤って陽性と判定してしまうことがあるため、注意が必要である。図 B-4 も、SMA の影響を受けていないので陰性と判定する。

参考情報：クロキサシリンを用いた AmpC β -ラクタマーゼ産生性の確認

クロキサシリンを用いた方法は、図 A の 3-アミノフェニルボロン酸溶液の代わりに、AmpC β -ラクタマーゼ阻害剤であるクロキサシリンの溶液 (20 mg/mL) を 10 μ L 添加し、阻止円直径の拡張 (原則 5 mm 以上) を認めた場合を陽性と判定する。

AmpC 産生性は、原則としてセフメタゾール (CMZ) の阻止円直径の 5 mm 以上の拡張がボロン酸、クロキサシリンの両方で認められることを確認する。

ただし、同時に他の β -ラクタマーゼを産生する株など、必ずしもこの通りにならない場合もある。株によっては、セフメタゾールよりもメロペネムのほうが阻害効果を確認しやすいことがあるので、メロペネムの結果を参考にしてもよい。その場合も、ボロン酸、クロキサシリン両方でメロペネム阻止円直径の原則 5 mm 以上の拡張を認めることを確認する。ボロン酸、クロキサシリンを用いたディスク法の結果に基づく、KPC 型カルバペネマーゼ産生性と AmpC β -ラクタマーゼ産生性の鑑別方法を次ページ表 5 にまとめた。原則として、KPC 型産生性の判定はメロペネム、AmpC 型産生性の判定はセフメタゾールで行い、もう一方の薬剤は判定の参考とする。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

表 5: ボロン酸、クロキサシリンを用いたディスク法による KPC 型カルバペネマーゼ産生性と AmpC β-ラクタマーゼ産生性の鑑別

	メロペネム (MPM)		セフメタゾール (CMZ)	
	ボロン酸	クロキサシリン	ボロン酸	クロキサシリン
KPC 型カルバペネマーゼ産生性	陽性	陰性		
AmpC β-ラクタマーゼ産生性			陽性	陽性

3.6.3.2.3. カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法

CarbaNP テスト、Carbapenem Inactivation Method (CIM) について、以下に示す。原則実施する検査項目には含まれていないが、カルバペネマーゼ産生性の確認法として有用である。

① CarbaNP テスト (参考文献 8, 22, 23)

CarbaNP テストは、以下の原理を利用したカルバペネマーゼ産生菌のスクリーニング方法である。溶菌させた被検菌の菌液をイミペネム・フェノールレッド溶液 (赤色) と混合するとき、被検菌がカルバペネマーゼ産生菌であればイミペネムが分解される。分解産物として生じたイミペネム酸はイミペネム・フェノールレッド溶液の pH を低下させ、その色が黄変する。

国内で多い IMP 型は良好に検出されるが、一部のカルバペネマーゼ (OXA-48 型、GES 型など) 産生菌は陽性となりにくいので注意が必要である。参考文献 8 で報告された方法 (参考文献 23 の CLSI 法とは一部異なる) を下記に示す。

準備するもの

- 菌プレート (被検菌、陽性コントロール、陰性コントロール)
- Lysis buffer (B-PERII, Bacterial Protein Extraction Reagent; Thermo)
- フェノールレッド溶液*
- 0.1M ZnSO₄ 溶液**
- イミペネム

* フェノールレッド溶液の調製方法

1. フェノールレッド 50 mg に 1N NaOH を一滴加え、1 mL の dH₂O で溶解し、9 mL dH₂O を加える。(0.5% フェノールレッド溶液)
2. 1.で調製した 0.5%フェノールレッド溶液 2 mL を、16.6 mL の dH₂O と混ぜて、1N NaOH で pH7.8 に調整する。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

** 0.1M ZnSO₄ 溶液の調製方法

(ZnSO₄ · 7H₂O (Molecular weight: 287.53) を用いる場合)

ZnSO₄ · 7H₂O 288 mg を 10 mL の dH₂O で溶解させる(最終濃度 0.1M)。

手順

1. イミペネム・フェノールレッド溶液を必要量調製する
フェノールレッド溶液 1mL あたり、0.1M ZnSO₄ 溶液 1 μL を混和し、イミペネム 3mg を溶解させる。(用時調製、1 株につき 100μL 使用)
2. Lysis buffer 100 μL を、1.5 mL チューブに分注する。
(検体数+陽性コントロール、陰性コントロール)
3. コロニーを 10 μL の白金耳で 2 白金耳分採取し、Lysis buffer に懸濁しボルテックスで十分に混和する。
4. 30 分間、室温で静置し、溶菌させる。
5. 別の 1.5 mL チューブにイミペネム・フェノールレッド溶液を 100 μL ずつ分注する。(1.5 mL チューブは透明度の高いものを使用すると判定しやすい)
6. 5. で分注したイミペネム・フェノールレッド溶液に、4. で溶菌させた菌液 30 μL を加えてピペッティング等でよく混和する。
7. 37°C でインキュベーションし、色の変化を目視で確認する (図)。120 分以内に黄変したものを陽性と判定する。(早ければ懸濁直後に黄変する。長時間インキュベーションすると一度黄変したのものでも全て赤色になるため注意する)

図. CarbaNP テスト結果



左から

- ・ 検体 1 (陰性)
- ・ 検体 2 (陽性)
- ・ 陽性コントロール
- ・ 陰性コントロール

②modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)

通知では Carbapenem Inactivation Method (CIM) (参考文献 24) が記載されているが、現在は改良法 (modified Carbapenem Inactivation Method; mCIM) が主流である。ここでは CLSI M100 に記載された mCIM (参考文献 23, 25) を示す。

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

CarbaNP と同様、カルバペネマーゼ産生菌をスクリーニングする方法である。メロペネムディスクを被検菌懸濁液と反応させたのち、メロペネム感性菌 (*E. coli* ATCC25922) を塗布した培地に置き形成される阻止円直径を測定する。カルバペネマーゼ産生菌の場合、メロペネムが分解されるため、形成される阻止円直径が小さくなることを利用した方法である。CarbaNP テストに比べ判定までに要する時間は長くなるものの、より安価に実施可能であり臨床現場に普及している。

準備するもの

- ・ TSB (Trypticase Soy Broth) 1 株あたり 2 mL
- ・ メロペネムディスク (10 µg/disk) 1 株あたり 1 枚
- ・ 1 µL 及び 10 µL 白金耳 1 株あたり各 1 本ずつ
- ・ Nutrient broth (Mueller-Hinton, TSB など) あるいは滅菌生理食塩水 3.0 mL~5.0 mL
- ・ ミューラーヒントン (MH) 寒天平板培地
- ・ 使用菌株 (寒天平板培地に一晚培養したもの)

被検菌

Escherichia coli ATCC25922 (メロペネム感性指標菌)

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1705 (陽性コントロール: *bla*_{KPC} 保有株)

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1706 (陰性コントロール)

操作手順

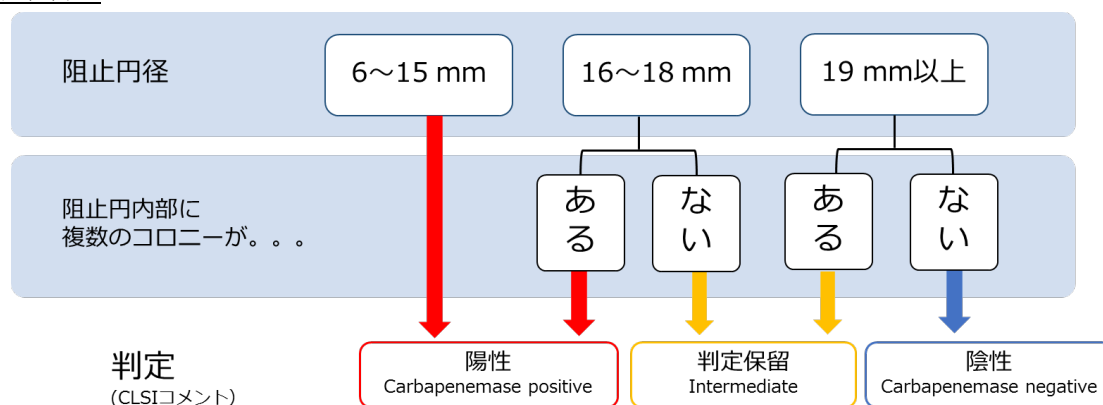
1. 被検菌のコロニーを 1 µL ループ一杯分かきとり、2 mL TSB に懸濁する。同様に、陽性コントロール株及び陰性コントロール株も、それぞれ 2 mL TSB に懸濁する。
参考：被検菌が緑膿菌の場合、10 µL ループ一杯分のコロニーを、2 mL TSB に懸濁
2. 10-15 秒ボルテックス等で十分攪拌する。
3. 2. にメロペネムディスクを 1 枚入れる。ディスク全体が菌懸濁液に浸っていることを確認する。
4. 35°C (±2°C) のインキュベーターで、4 時間 (±15 分) 培養する。
5. (4. の培養時間が終了する直前) *E. coli* ATCC25922 のコロニーを Nutrient broth もしくは滅菌生理食塩水に懸濁し、McFarland 0.5 に調製する。
6. 5. で調製した菌液を滅菌綿棒に浸し、ミューラーヒントン (MH) 寒天平板培地に全面に塗布する。(塗布の方法はディスク拡散法と同様に実施する)。菌液調製後、15 分以内に培地に塗布することが望ましい。塗布後、培地表面を 3-10 分乾かす。

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

7. 4.の培養時間が終了したら、10 μL ループを用いてメロペネムディスクを取り出す。その際、ディスクをチューブ内壁に押し付けて、余分な菌液をできるだけ除く。
8. 7.で取り出したメロペネムディスクを6.で準備した培地上に置く。
(CLSIには、シャーレ1枚当たりのメロペネムディスクの最大数として100 mm シャーレは4ディスク、150 mm シャーレは8ディスクまでと記載されている。90 mm シャーレの場合も、最大4ディスクまでが望ましい)
9. シャーレのふたを下にして、35°C (±2°C) のインキュベーターで、18~24 時間培養後、阻止円直径 (整数 mm) を計測する。下記の結果判定スキームを参考に、判定する。

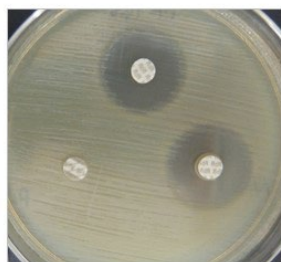
結果判定



- * 阻止円内部のコロニーが被検菌由来の場合は、「阻止円内部のコロニーなし」とみなす
- * 判定保留の場合や、他の試験法の結果と矛盾がみられる場合などは、再検査を実施するとともに、下記についても確認するとよい。

- ・被検菌や *E. coli* ATCC25922 にコンタミネーションがないか
- ・メロペネムディスクの力価低下はないか (陽性コントロール・陰性コントロールの結果を確認)

被検菌 (24 mm) →陰性



陽性
コントロール
(6 mm)

陰性
コントロール
(24 mm)

()は、阻止円直径を示す

実施例

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

3.6.4. パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）によるタイピング解析

同一菌株の伝播が疑われる場合には、パルスフィールドゲル電気泳動法によるタイピング解析を行う。各菌種で使用する制限酵素を下表に示す。（参考文献 26）

泳動条件は、いずれの菌種も 6V、14℃、スイッチングタイム 12.6～40.1 秒、泳動時間 24 時間で実施可能である。

菌種	制限酵素
<i>Escherichia coli</i>	XbaI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	XbaI
<i>Enterobacter cloacae</i>	SpeI
<i>Klebsiella aerogenes</i> (旧 <i>Enterobacter aerogenes</i>)	SpeI
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter koseri</i>	XbaI
<i>Serratia marcescens</i>	SpeI

薬剤耐性菌

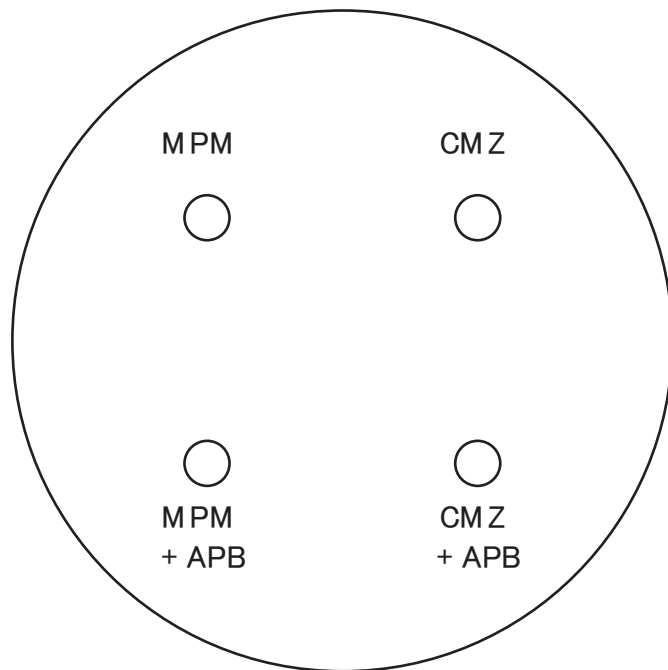
令和2年6月改訂版 Ver2.1

【資料1】

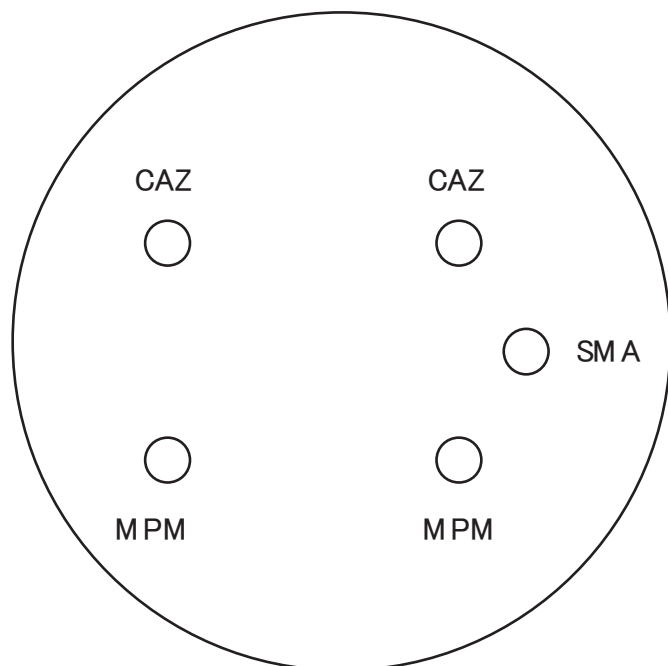
阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認（ディスク法）テンプレート

このページを印刷し、シャーレの下に置いてディスクを配置するとよい（39-42 ページ参照）

A.



B.



【資料2】CRE検査（カルバペネマーゼ遺伝子検出）の流れ

CRE検査（カルバペネマーゼ遺伝子検出）の流れ

感染症法基準を満たす株であるか、医療機関からの情報を確認する（CREかどうか）

1. 腸内細菌科細菌か？【31ページ参照】
2. 薬剤感受性の判定基準を満たすか？【30ページ参照】

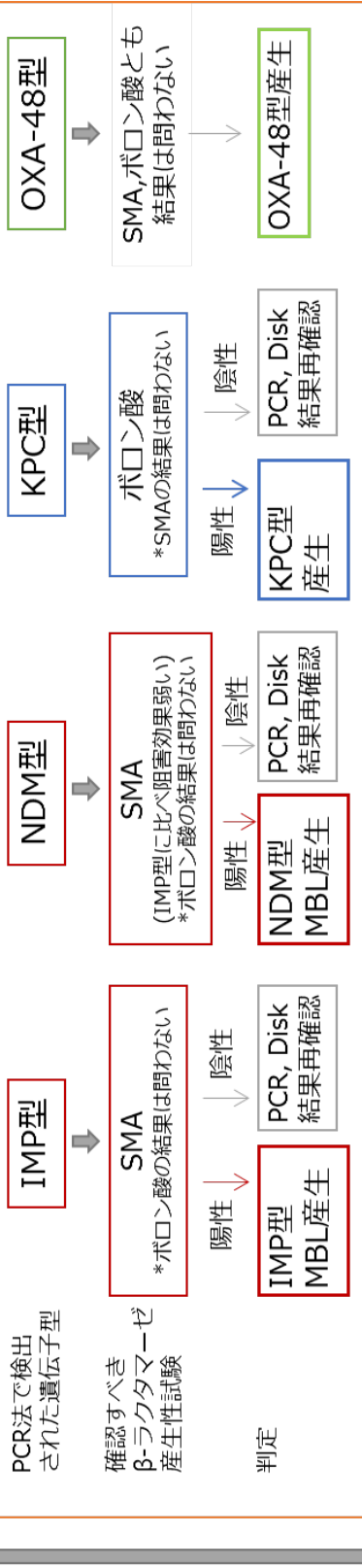
基準を満たさない → CREではない

基準を満たす

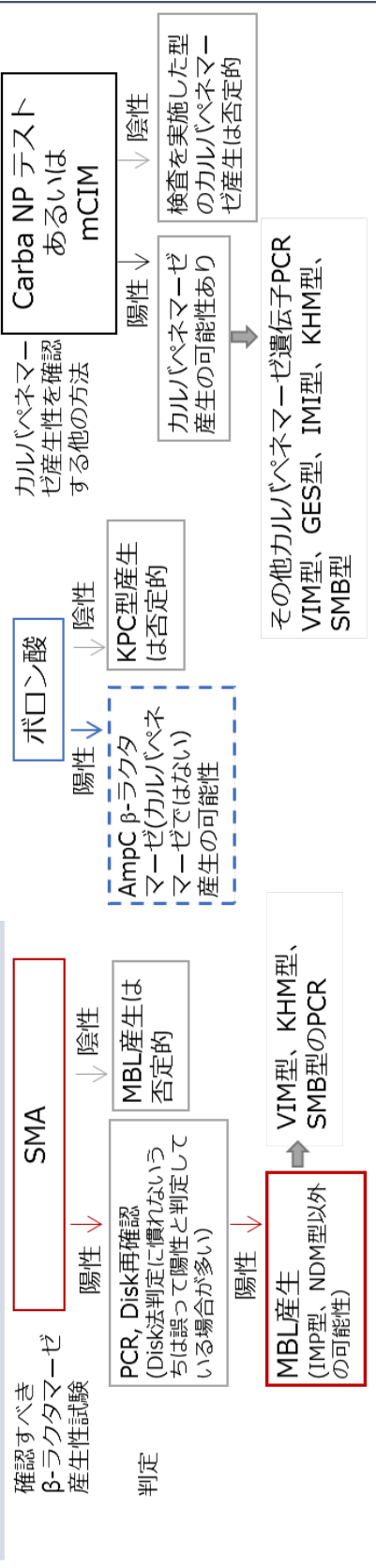
検査実施

3.6.3.2.1 PCR法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出（遺伝子検査）と3.6.3.2.2 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認（表現型検査）を実施する。可能であれば3.6.3.2.3. カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法も実施するとより判定しやすい。下図を参考に、遺伝子検査と表現型検査の結果に明らかな矛盾がないことを確認する。

主要なカルバペネマーゼ遺伝子（原則実施項目）陽性の場合



主要なカルバペネマーゼ遺伝子すべて陰性の場合



薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

【参考文献】

1. Adeolu M. *et al.* 2016, *Int J Syst Evol Microb.* 66, 5575–5599
2. 病原微生物検出情報 IASR 37: 15-16, 2016
3. Nordmann P. *et al.* 2012, *Clin Microb Infect.* 18(5): 432-438
4. 病原微生物検出情報 IASR 40: 158-159, 2019
5. 病原微生物検出情報 IASR 40: 27, 2019
6. Mendes RE *et al.* 2007. *J Clin Microbiol* 45(2):544-547
7. 厚生労働科学研究費補助金「新型薬剤耐性菌等に関する研究」平成 22 年度研究報告書 p22-27
8. Segawa T. *et al.* 2017. *J Microbiol Methods.* 133:35-39
9. Bradford PA. *et al.* 2004. *Clin Infect Dis.* 39(1):55-60
10. Poirel L. *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1):15-22
11. Kayama S. *et al.* 2012. *J Microbiol Methods.* 88(1):182-184.
12. Shibata N. *et al.* 2003. *J Clin Microbiol.* 41(12):5407-5413.
13. Wachino J. *et al.* 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11):5143-5149.
14. Sekiguchi J. *et al.* 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(11):4194-4197.
15. Wachino J. *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6):1960-1967.
16. Wachino J. *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(8):2905-2910.
17. Bontron S. *et al.* 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(3):1664-1670.
18. Hong SS. *et al.* 2012. *Ann Lab Med.* 32:359-361.
19. Pasteran F. *et al.* 2009. *J Clin Microbiol.* 47(6):1631-1639.
20. Watahiki M. *et al.* 2020. *Jpn J Infect Dis.* 73(2):166-172.
21. Kaase M. *et al.* 2011. *J Antimicrob Chemother.* 66:1260-1262.
22. Nordmann P. *et al.* 2012. *Emerg Infect Dis.* 18:1503-7
23. CLSI 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S28.
24. van der Zwaluw K. *et al.* 2015. *PLoS One* 23;10(3):e0123690
25. CLSI 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S27
26. Tenover FC *et al.* 1995. *J Clin Microbiol,* 33(9):2233-2239.

参考情報：CLSI ドキュメントは有償で販売されているが、CLSI のホームページ

(<https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>) では閲覧のみ可能

薬剤耐性菌

令和2年6月改訂版 Ver2.1

【検査相談先】

各ブロックの薬剤耐性菌レファレンスセンター

もしくは

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

メールアドレス taiseikin@nih.go.jp (Ver2.1にてメールアドレス修正)

【執筆者】

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室

松井真理、鈴木里和

薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.1

主な改訂履歴

改訂版	改訂項目	改訂内容
H24.12 月	薬剤耐性菌マニュアル全体	全面改訂
	3.5. 薬剤耐性アシネトバクター	新規追加
H28.12 月	3.1.2. メチシリン耐性機構と検査法	文章追加、参考文献追加
	3.3.1. 感染症法上の定義	文章修正（薬剤耐性遺伝子に関する記述削除）
	3.5.3.1.3. PCR 法による OXA 型 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出	文章修正
	3.6. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌	新規追加
H28 年 12 月 Ver1.1	3.6.3.2.1. PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出	表 3 VIM-2 型 PCR 増幅産物サイズ修正（587 bp→801bp）
R2 年 6 月 Ver2.0	検査相談先（薬剤耐性菌マニュアル全体）	細菌第二部第一室→ 薬剤耐性研究センターに変更
	3.5.2 菌種の同定について	文章追加変更
	3.5.3 薬剤耐性アシネトバクターの耐性メカニズムとその検査法	NDM 型に関する記述（PCR プライマー等）追加
	3.6.2. 腸内細菌科細菌とは	文章全面改訂
	3.6.3.2. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の検査	通知（健感発 0328 第 4 号）の記載にあわせて全面改訂
	3.6.3.2.1. PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出	文章改訂 項目③及び④を新規追加
	3.6.3.2.2. 阻害剤を用いたカルバペネマーゼ産生性の確認	文章改訂 特に、ボロン酸試験の方法及び判定を大幅改訂・クロキサシリン試験に関する記述（参考情報）を新規追加
	3.6.3.2.3. カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法	項目②を新規追加 項目①の文章一部改訂
	参考資料、文献、別添資料等	上記改訂に伴い追加、変更
R6 年 3 月 Ver2.1	3.1 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	改訂により別ファイルに分割、 本稿の該当ページは白紙に変更
	別添資料 2	差替え

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)検査法

医療機関から分与され、届出基準を満たすことが確認された菌株について、下記の1～3までを地方衛生研究所において実施すること。このうち、●については原則として実施する検査項目とし、○については推奨される検査項目とする。

1で検出された遺伝子型と2（及び3を実施した場合は3）の産生性の結果が一致することを確認する。4又は5については、必要に応じて、地域における特定のCREの伝播が疑われる場合など地域における流行を把握するため実施する。

検査法は、国立感染症研究所（以下「感染研」という。）ホームページで公開している病原体検出マニュアルのCRE検査法に準ずる。

<http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/ResistantBacteria201612V1.1.pdf>

1 耐性遺伝子の検出

●PCR法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子の検出

IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型

○いずれも不検出の場合、以下のカルバペネマーゼ遺伝子のPCR法による検出

VIM型、GES型、IMI型、KHM型、SMB型

β-ラクタム耐性機序の確認のためPCR法による耐性遺伝子の検出

○基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)遺伝子

CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group

○AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子

MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型の6種

2 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認

●メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)/EDTA 阻害有：メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)

●ボロン酸 阻害有：KPC型

○ボロン酸及びクロキサシリン 阻害有：AmpC型

○クラブラン酸 阻害有：基質特性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)

3 カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法

○Carba NPテスト

○Carbapenem Inactivation Method (CIM)

4 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析（同一菌種による伝播が疑われる場合に実施）

5 プラスミドゲノムおよび染色体ゲノム解析（次世代シーケンス(NGS)技術が導入されていない地方自治体では感染研に依頼し、感染研においてS1-PFGEにより染色体DNAとプラスミドDNAを分離後精製、NGS解析を実施）

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の病原体個票入力について、2023年3月13日～

1. 「検出病原体」は、「検出病原体選択」>【カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症】より該当する菌種名を選択する

病原体検出情報システム

病原体個票 新規登録/編集

登録機関 地衛研 保健所 検疫所

検査実施機関 地衛研 報告方式

検査実施機関名 機関名選択

報告種別 1～5類全数報告 定点の種類

病原体種別 細菌 検体提供者番号 20230001 登録年月日 2023年03月13日

検出病原体有無 有 無 検体採取年月日

検出病原体 検出病原体選択

検体提供者 型別結果 材料の種類 臨床症状・徴候等 検出方法 疫学的事項 備考 [インフルエンザウイルス](#) [カルバペネム耐性腸内細菌科細菌\(CRE\)](#)

登録 連続登録 一時保存 削除 戻る

検出病原体選択> 【カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症】

細菌

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症

Enterobacteriaceae

【カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症】

Citrobacter braakii Citrobacter freundii Citrobacter koseri

Enterobacter asburiae Enterobacter cloacae Enterobacter cloacae complex

Escherichia coli Klebsiella oxytoca Klebsiella pneumoniae

Morganella morganii Serratia marcescens Klebsiella aerogenes (旧 Enterobacter aerogenes)

Proteus mirabilis Providencia stuartii その他の細菌(CRE)

【結核菌, その他の病原菌】

Mycobacterium tuberculosis Mycobacterium bovis Mycobacterium avium

Mycoplasma pneumoniae Haemophilus influenzae Klebsiella pneumoniae

Neisseria meningitidis Escherichia coli K1 Enterococcus faecalis

【カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症】の菌種（図に示す14菌種）から該当する菌種を選択する

選択可能な14菌種以外の菌種の場合、「その他の細菌（CRE）」を選択する

報告種別 1～5類全数報告 定点の種類

病原体種別 細菌 検体提供者番号 20230001 登録年月日 2023年03月13日

検出病原体有無 有 無 検体採取年月日

検出病原体 検出病原体選択

その他の細菌(CRE)

Enterobacter sp.

検体提供者 型別結果 材料の種類 臨床症状・徴候等 検出方法

登録 連続登録 一時保存 削除

「その他の細菌（CRE）」を選択した場合は、菌種名をフルスペルでテキスト入力（英字半角のみ）

2. 試験検査結果は、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の欄に入力する

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)				
PCR法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子の検出				
IMP型	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	<input type="text"/>
NDM型	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	<input type="text"/>
KPC型	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	<input type="text"/>
OXA-48型	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	<input type="text"/>
VIM型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
GES型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
IMI型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
KHM型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
SMB型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
FRI型	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:
β-ラクタマーゼ産生性の確認				
メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)/EDTA	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	<input type="radio"/> 判定困難	
ボロン酸	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	<input type="radio"/> 判定困難	
Carba NP テスト	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	<input type="radio"/> 判定困難
Carbapenem Inactivation Method	<input checked="" type="radio"/> 未実施	<input type="radio"/> 陽性	<input type="radio"/> 陰性	<input type="radio"/> 判定困難

① 平成 29 年 3 月 28 日発出の通知（健感発 0328 第 4 号）別添 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）検査法に記載された以下の「原則として実施する検査項目」の結果は、入力必須。

● PCR 法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子の検出

IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型

● 阻害剤を用いた β-ラクタマーゼ産生性の確認

メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）/EDTA

ボロン酸

注：阻害剤を用いた検査は、病原体検出マニュアルに記載の下記抗菌薬を使用した場合の判定を記載する。SMA：セフトジジム・メロペネム、ボロン酸：メロペネム

② 推奨される検査項目は、カルバペネマーゼ産生に関する以下項目のみ入力対象とする。

入力開始時は上図のように「未実施」が選択されており、検査を実施した項目のみ結果を入力する。

○ カルバペネマーゼ遺伝子の PCR 法による検出

VIM 型、GES 型、IMI 型、KHM 型、SMB 型

○ カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法

Carba NP テスト

Carbapenem Inactivation Method (CIM)

③ 通知（健感発 0328 第 4 号）別添に記載された検査項目以外の遺伝子型として、PCR 法による FRI 型の検出を実施した場合は、結果を入力する。入力開始時は「未実施」が選択されている。

④ 入力項目以外の検査結果（例：基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子）を入力する場合は、備考欄を使用する。

CRE 検査結果入力例

PCR で IMP 型陽性を確認後、シーケンスを実施して IMP-1 参照配列と一致することを確認した

注：PCR で IMP 型陽性を確認し、シーケンスは実施しない場合は、遺伝子型は空欄のままとする

カルバペナーゼ遺伝子について、PCR 陽性を確認後、シーケンスにより遺伝子型を決定した場合のみ、遺伝子型の数字を入力する（半角数字）

カルバペナム耐性腸内細菌科細菌 (

PCR法による主要なカルバペナーゼ遺伝子の検出			
IMP型	<input checked="" type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	1
NDM型	<input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
KPC型	<input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
OXA-48型	<input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
VIM型	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
GES型	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
IMI型	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
KHM型	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
SMB型	<input checked="" type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	
FRI型	<input checked="" type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性	遺伝子型:	

β-ラクタマーゼ産生性の確認			
メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)/EDTA	<input checked="" type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性 <input type="radio"/> 判定困難		
ボロン酸	<input type="radio"/> 陽性 <input checked="" type="radio"/> 陰性 <input type="radio"/> 判定困難		
Carba NP テスト	<input checked="" type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性 <input type="radio"/> 判定困難		
Carbapenem Inactivation Method	<input type="radio"/> 未実施 <input checked="" type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性 <input type="radio"/> 判定困難		

通知別添「原則として実施する検査項目」以外は、
入力開始時には「未実施」が選択されている。
検査を実施した項目のみ結果を入力する。

β-ラクタマーゼ産生性の確認（表現型
検査）は、「判定困難」を選択可能

3. 検出方法は「遺伝子検出」「PCR」をチェックする（PCR 検査結果に関わらず共通）

検出病原体

検体提供者 型別結果 材料の種類 臨床症状・徴候等 **検出方法** 疫学的事項 備考 [インフルエンザウイルス](#) [カルバペナム耐性腸内細菌科細菌\(CRE\)](#)

登録 連続登録 一時保存 削除 戻る

検出方法

分離培養 培養細胞 人工培地 発育鶏卵 (継代数 代) 動物 その他*

細胞名 継代数 代

抗原検出 蛍光 ELISA RPHA LA PA IC その他*

遺伝子検出 非増幅 ハイブリ PAGE その他*]

増幅 PCR リアルタイムPCR(ハイブリ法) PCR+シーケンス LAMP その他*]

電顕 顕検 *その他の内訳

抗体検出 蛍光 IP ELISA CF HI PA 中和

イムノブロット ゲル内沈降 凝集反応 その他

4. 「検体提供者」「材料の種類」「臨床症状・兆候等」「疫学的事項」は届出内容をもとに入力する

CSV一括登録について（暫定版）

CSV一括登録を使うと、CSVファイルを取り込むことでCREの検査結果などをまとめて入力することが可能です。

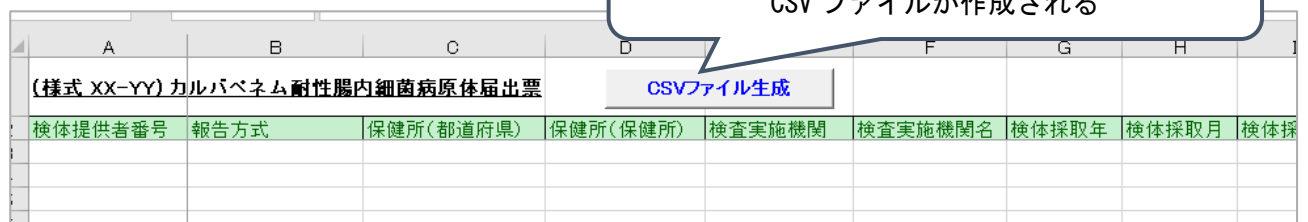
注：一括登録した検体は、病原体個票 検索画面から検索し、「編集/参照」ボタンを押して、登録内容確認及び必要項目を追加で入力してから、「感染研へ報告」を押してください。

1. CRE一括登録 CSV テンプレート（Excel形式）は、感染症サーベイランスシステムのヘルプガイドよりダウンロードしてください。

ヘルプガイド→ その他のマニュアル等→ 病原体検出情報サブシステム

「別紙 一括登録 CSV テンプレート（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症）」

2. 1でダウンロードした「一括登録 CSV テンプレート」に各項目を入力後、「CSVファイル作成」ボタンを押して CSV ファイルを作成します。



各項目を入力後、「CSVファイル作成」を押すと CSVファイルが作成される

A	B	C	D	F	G	H		
(様式 XX-YY) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌体届出票				CSVファイル生成				
検体提供者番号	報告方式	保健所(都道府県)	保健所(保健所)	検査実施機関	検査実施機関名	検体採取年	検体採取月	検体採

3. 病原体個票 CSV 一括登録画面で、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症」を選び、2.で作成した CSV ファイルを選択後、「CSV データ登録」を押します。



病原体検出情報システム

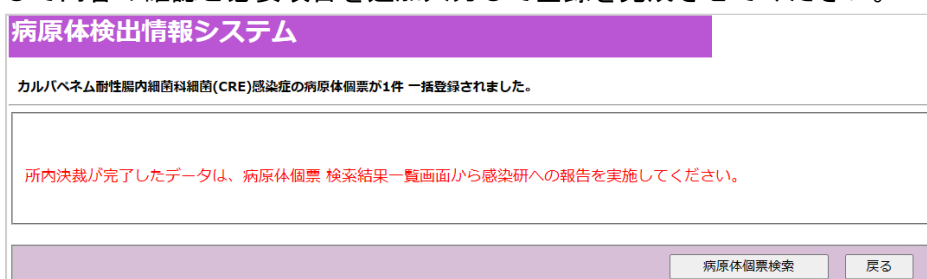
病原体個票一括登録

診断名選択

ファイルの選択 CSVデータ登録

CSVファイルを選択し、登録

4. CSV ファイルのデータが取り込まれます。病原体個票 検索画面から検索し、「編集/参照」ボタンを押して内容の確認と必要項目を追加入力して登録を完成させてください。



病原体検出情報システム

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症の病原体個票が1件一括登録されました。

所内決裁が完了したデータは、病原体個票 検索結果一覧画面から感染研への報告を実施してください。

病原体個票検索 戻る