

## 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。

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

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
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

## 薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.2

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目細菌 (CRE)」は、令和 7 年 4 月改訂 第 3 版として別途掲載されました。

本稿の該当ページを白紙に変更しましたので、Ver2.2 とします (令和 7 年 4 月)。

主な改訂履歴 .....	31
--------------	----

## 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 Ver2.2

### 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。

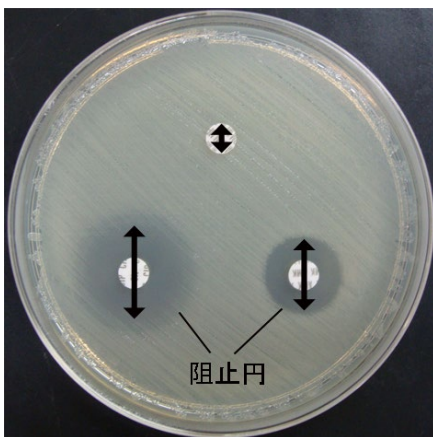
直接接種の場合：寒天培地に発育した菌を滅菌綿棒等をかきとり、Mueller-Hinton broth もしくは生理食塩水に McFarland 0.5 になるように懸濁する。

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。

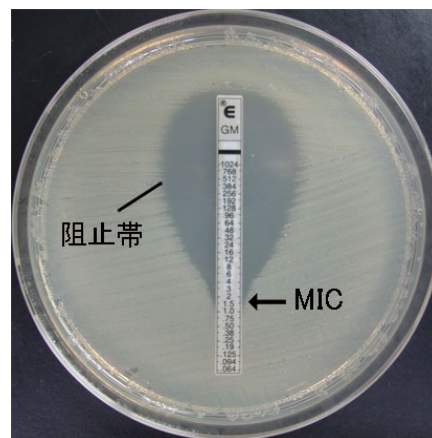
薬剤の配置：抗菌薬含有ディスクや Etest ストリップを平板培地に配置する。

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 Ver2.2

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 <sup>1)</sup>	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 <sub>2</sub> 35±2℃ 20~24 時間

<sup>1)</sup> 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 Ver2.2

### 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 $\mu$ 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、感染症の起因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 $\mu$ 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<sup>1)</sup>。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  $\mu$ 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<sup>2)</sup>。

##### 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 Ver2.2

### 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  $\mu\text{g}$  のオキサシリンを含む KB ディスクを使用する。5% CO<sub>2</sub>、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。

### 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のではなく、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 Ver2.2

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 ( $\mu\text{g/ml}$ )	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°C 24 時間培養し、コロニーの色調で判定する。

注意：

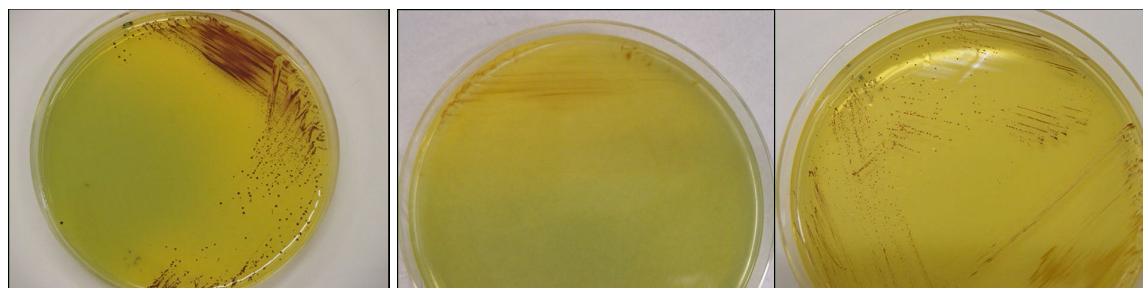
- ① 培養時間が長くなると色調が変化し、*E. faecium* の黄色が褐色化することがある。
- ② *E. faecalis* の暗赤褐色の色調は比較的判定しやすいが、その他の色調は鑑別に経験が必要となることがある。コントロール株と同時に実施すること、および他の同定方法とあわせて最終判定することが望ましい。



## 薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.2

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

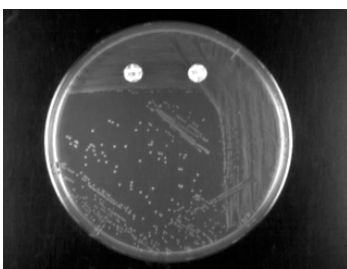
VanA、VanB、および VanC 型はそれぞれバンコマイシンとテイコプラニンに対する耐性パターンが異なるため、ディスク拡散法により推定する事が可能である。

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。

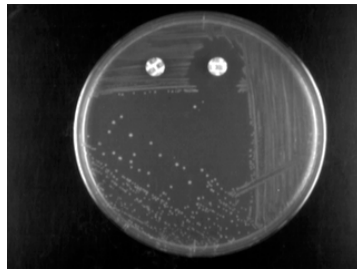
## 薬剤耐性菌

令和 2 年 6 月改訂版 Ver2.2

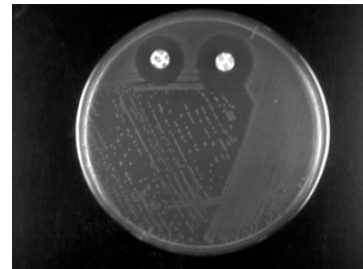
阻止円		判定
バンコマイシン	テイコプラニン	
なし	なし	VanA 型
なし	あり	VanB 型
あり	あり	VanC 型



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 GATTTCGTTCCCTCGACC	635 bp
<i>vanC1</i>	<i>vanC-1</i> -F GGTATCAAGGAAACCTC <i>vanC-1</i> -R CTTCGCGCCATCATAGCT	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 Ver2.2

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 13 mm 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 14 mm 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 15 mm 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

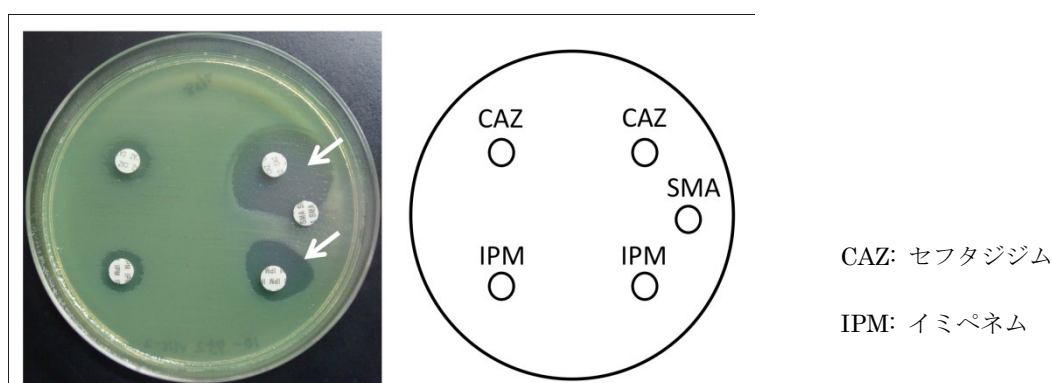
令和2年6月改訂版 Ver2.2

### 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。



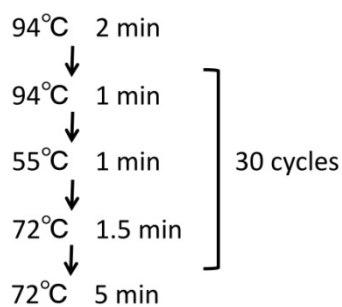
SMA ディスクの作用により、発育阻止帯の拡張（→）が認められた場合、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株と判定する。

### 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<sub>IMP-1</sub></i>	5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3'	587 bp
	5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'	
<i>bla<sub>IMP-2</sub></i>	5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3'	678 bp
	5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3'	
<i>bla<sub>VIM-2</sub></i>	5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3'	801 bp
	5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'	
<i>bla<sub>NDM-1</sub></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- $\beta$ -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- $\beta$ -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 Ver2.2

### 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

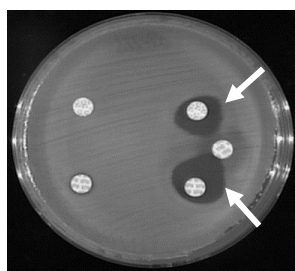
主な耐性機構は、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP 型、VIM 型、NDM 型等) あるいは OXA 型 β-ラクタマーゼ (OXA-51-like、OXA-23-like、OXA-40/24-like、OXA-58-like) 産生による。ただし、OXA 型 β-ラクタマーゼ産生株であってもイミペネム等のカルバペネム系薬剤に対する MIC が比較的低い株 (1~8 μg/mL) も報告されている。

##### 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

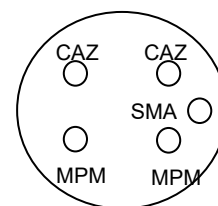
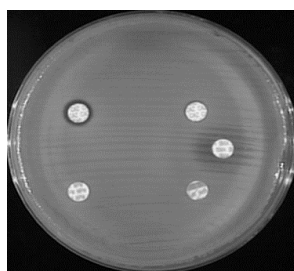
メタロ-β-ラクタマーゼ産生の有無を推定する方法のひとつに、メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) を用いる方法がある。

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; セフトアジジム

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ア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 Ver2.2

### 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°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	

### 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 Ver2.2

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 Ver2.2

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

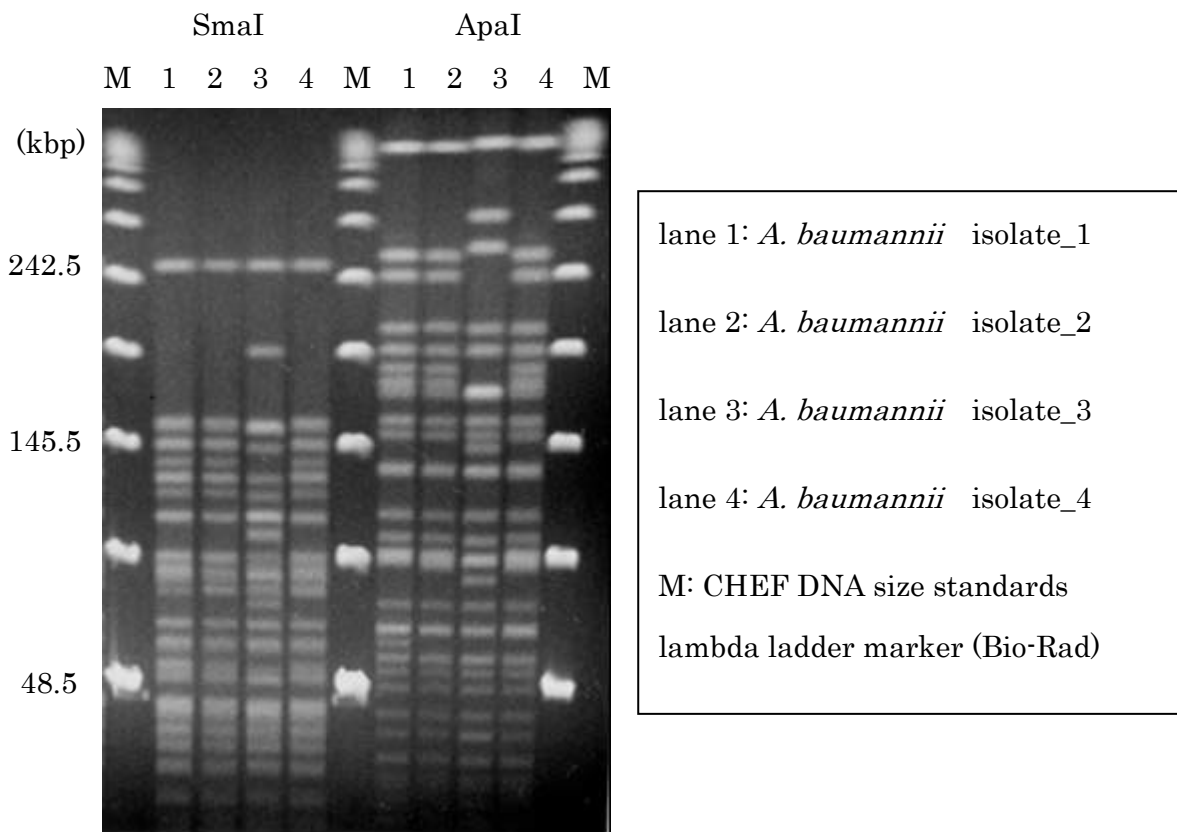
泳動条件(CHEF Mapper (Bio-Rad)の場合)

: スイッチングタイム 2.98s~21.79s

電圧 6V / 温度 14°C / 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)

3.6. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

白紙ページ

病原体検出マニュアル「カルバペネム耐性腸内細菌目細菌」

令和 7 年 4 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 Ver2.2

### 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 $\beta$ -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、ポ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
R7 年 4 月 Ver2.2	3.6 カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 別添資料 1, 別添資料 2	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