

に3つのディスクを1列に配置してある。ストリップ状の基体の形状や寸法には特に制限はない。このキットを使用する固体培地の大きさ等を考慮して適宜決定できる。尚、ストリップ状の基体は、阻止円の判読を容易にするため、透明性の高い素材で形成することもできる。各ディスクの間隔や $\beta$ -ラクタム薬のディスク中の含有量等は、上記本発明の方法において説明したと同様の点を考慮して適宜決定できる。尚、図中に記載してある薬剤名や寸法は例示として記載したものであり、本発明のキットはこれに限定されるものではない。また、本発明のキットを培地上に置いた後に、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクに、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を添加することができるように、ストリップ状の基体のメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクに通じる部分に小孔を設けることもできる。この小孔を介して、ディスクにメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を添加することができる。例えば、この小孔を介して、ディスクに液状のメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を滴下することができる。

#### 【0022】

上記本発明のキットを用いる判別するメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の方法は、このキットのメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクに、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させ、このキットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き（図3の上図参照）、培養を行い、培養後、2箇所ある $\beta$ -ラクタム薬のディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別することからなる。上記キットを用いること以外は、上記本発明の方法をそのまま用いることができる。例えば、図3の左下に示すように、培養後、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させたディスクに隣接する $\beta$ -ラクタム薬のディスクの周囲には阻止円が形成され、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させたディスクと反対側の端にある $\beta$ -ラクタム薬のディスクの周囲には阻止円が形成されないか、形成されても、ディスクに近接した小さな阻止円である場合、検査対象の菌は、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であると判別できる。また、図3の右下に示すように、検査対象の菌がメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でない場合、培養後

いずれのβ-ラクタム薬含有ディスクの周囲にも阻止円が形成されないか、または形成されても、ディスクに近接した小さな阻止円である。

### 【0023】

メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤は、固体培地表面及びその内部での拡散性を考慮すると、比較的分子量かつ低沸点の化合物から選ばれることがある。そのため、本発明のキットでは、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクには、使用直前にメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させることとした。しかし、ディスクに予め不揮発性のメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させ、このディスクを密封しておくことで、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の散逸を防止したキットとすることもできる。

### 【0024】

#### 【実施例】

以下、本発明の試験方法を実施例によりさらに説明する。

検査対象となる菌として、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌として(1) IMP-1(プラスミド性メタローβ-ラクタマーゼ)産生セラチア・マルセセンス(*S. marcescens*)、(2) IMP-1産生クレブシエラ・ニューモニアエ(*K. pneumoniae*)、及び(3) IMP-1産生緑膿菌)、並びにメタローβ-ラクタマーゼ産生菌ではない菌として(4) AmpC過剰産生セラチア・マルセセンス(*S. marcescens*)、(5) SHV-5a産生クレブシエラ・ニューモニアエ(*K. pneumoniae*)、及び(6) AmpC過剰産生緑膿菌を選び、以下の試験を行った。

日本化学療法学会標準法に従い、ミューラーヒントン液体培地でMacFarland 0.5に調整した被検菌の菌液を、感受性試験用の綿棒で取り、試験管の管壁に押し当てて絞った後、2回、薬剤感受性試験用の寒天培地(ミューラーヒントン寒天培地)に塗布し、短時間表面を軽く乾燥させる。

セフトジジム(CAZ)など、市販の第3世代セフェム薬の感受性ディスクと抗菌薬を含まない「ろ紙(厚みが0.5～1.0 mm, 直径が約6.3 mm)」を、約20 mm間隔をあけて置く。その中央より直角方向に40 mm隔てたところに、同様の3世代セフェム薬の感受性ディスクを置く。

寒天培地上に置いた、抗菌薬を含まない「ろ紙」に、阻害薬(メルカプトプロ

ピオン酸、メルカプト酢酸などのチオール化合物や含硫化合物の原液、重金属塩溶液、金属キレート剤等)を、3  $\mu$ l、マイクロピペット等を用いて吸収させる

。

37°Cで一夜、培養し、感受性ディスクの周囲の、発育阻止円の形状の差を観察し、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生する菌か否かを判定する。結果を図1に示す

。

2つの第3世代セフェム薬の感受性ディスクの周囲の阻止円の形状を比較し、

a. 阻止円の形状に差が見られる場合〔(1)～(3)の菌〕は、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生株

b. 阻止円の形状に差が見られない場合〔(4)～(6)の菌〕は、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株と判定される。

【0025】

#### 【発明の効果】

本発明のによれば、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を、PCR法など特殊な方法を用いることなく、病院の検査室においても実施することが可能な程簡便な方法で判別することができる。

さらに本発明によれば、より簡便にメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を実施できるキット及びこのキットを用いたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を提供することがある。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例で得られた固体培地上の阻止円の状態を示す図面に代わる写真

。

【図2】 本発明のキットの説明図。

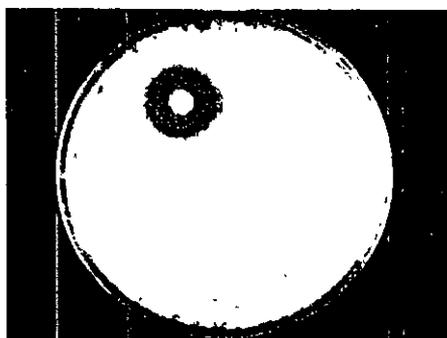
【図3】 本発明のキットを用いた方法の説明図。

【書類名】 図面

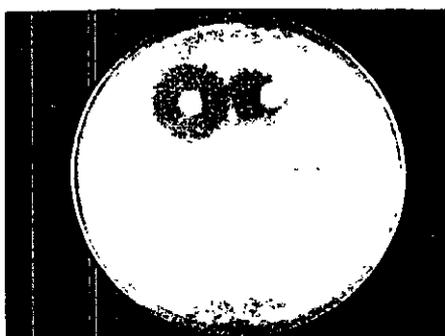
【図1】



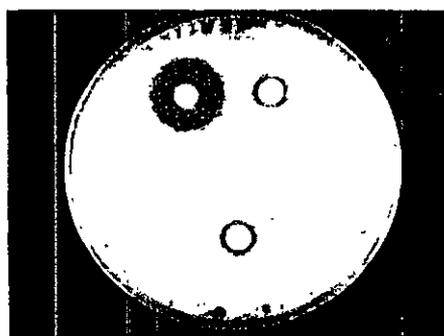
(1)



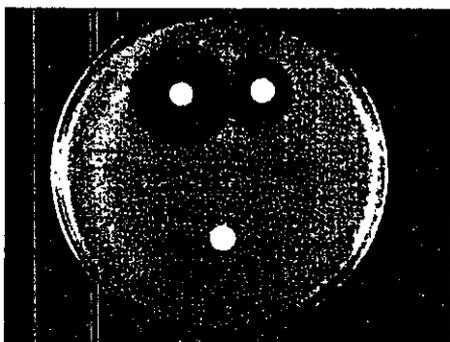
(4)



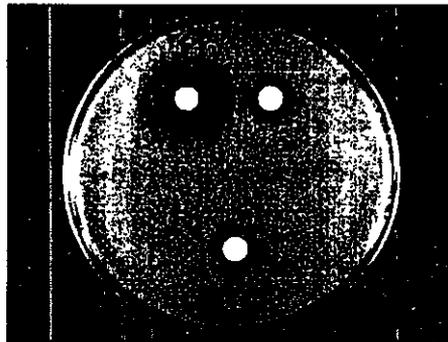
(2)



(5)



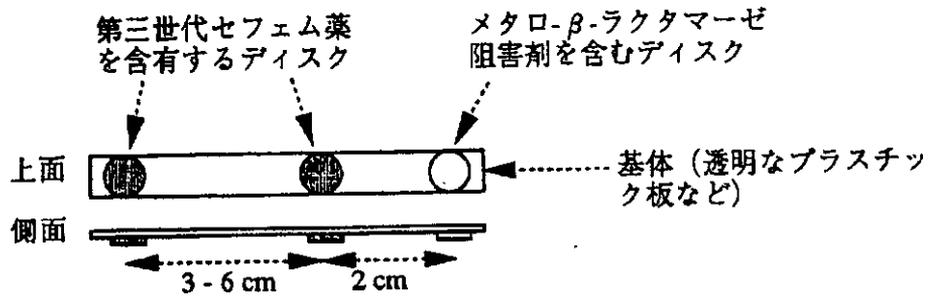
(3)



(6)

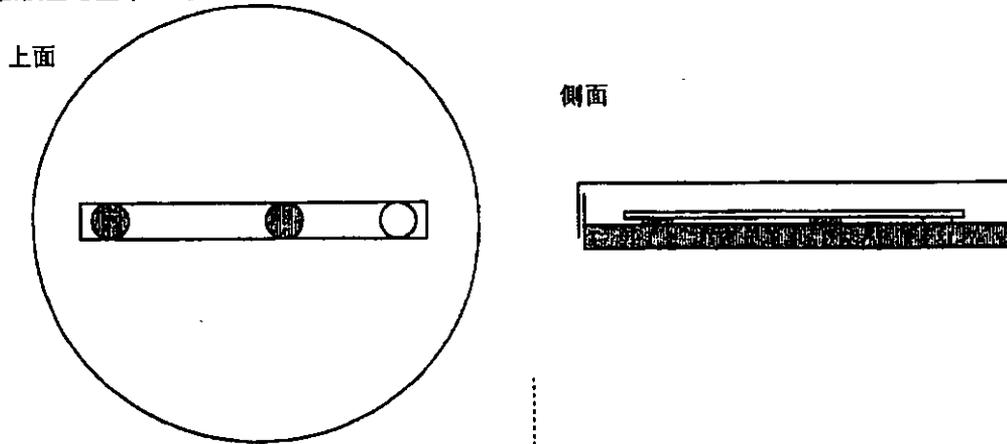
【図2】

試験用ストリップの形状



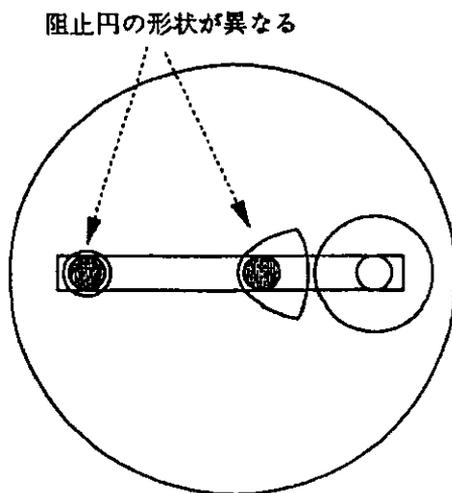
【図3】

被検菌を塗布したミューラーヒントン寒天培地上への、試験用ストリップの置き方

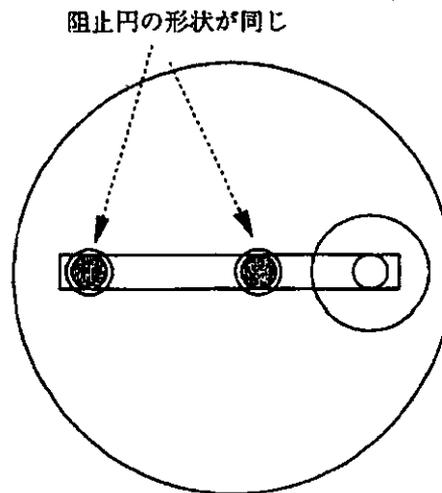


培 養

37℃一夜培養後の結果とその判定



メタロ-β-ラクタマーゼを産生する  
第三世代セフェム耐性菌



メタロ-β-ラクタマーゼを産生しない  
第三世代セフェム耐性菌

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタローβ-ラクタマーゼ産生菌を判別する方法であって、病院の検査室においても実施することが可能な程に簡便な方法及びこの方法を利用するキットの提供。

【解決手段】 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を点在させ、さらに、この阻害剤からの距離が異なる2箇所にβ-ラクタム薬を点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記2箇所のβ-ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。この判別方法に使用するキット。

【選択図】 図3