Table 1. Origins and antimicrobial susceptibilities of GBS isolates[a]

Strain	Date of isolation	Out/in	Ward.	Age (yr) Sex	Specimens	Serotype	CTB inhibition zone[b] (mm)	MIC (μg/ml)																
								CEC	PEN	AMP	CTM	CTX	CRO	CDN	FEP	CFM	ZOX[c]	MEM	ERY	CLR	CLI	LVX	TET	VAN
2603V/R ATCC BAA-611						V	19.0	1	0.06	0.12	≤0.5	≤0.06	≤0.12	≤0.06	≤0.5	0.5	0.064	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	0.5	>4	0.5
NEM316 ATCC 12403						III	18.7	1	0.06	0.12	≤0.5	≤0.06	≤0.12	≤0.06	≤0.5	0.5	0.094	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	0.5	>4	0.5
PRGBS																								
A1	2011/12/5	Out	EM	99 M	TTA	Ib	No zone	16	0.5	0.25	>4	1	0.5	0.5	1	1	>32	0.5	>1[d]	>1[d]	>1[d]	>8	≤0.5	0.5
A2	2012/1/12	In	IM 2C	77 M	TTA	Ib	No zone	16	0.5	0.25	4	1	1	0.5	1	>1	>32	0.25	1[d]	1[d]	>1[d]	>8	≤0.5	0.5
CTB[R]PSGBS																								
B1	2012/1/8	In	IM 2C	77 M	TTA	Ib	No zone	8	0.12	0.12	2	0.25	0.25	0.12	≤0.5	1	1.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	>8	≤0.5	0.5
B2	2011/5/16	In	S 4C	80 M	Pus (oral cavity)	Ib	No zone	16	0.06	0.12	1	0.12	≤0.12	≤0.06	≤0.5	1	0.75	≤0.12	>1[e]	>1[e]	>1[e]	>8	>4	0.5
B3	2011/9/12	In	IM 2C	68 M	TTA	Ib	No zone	16	0.06	0.12	1	0.12	≤0.12	≤0.06	≤0.5	1	0.75	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	>8	≤0.5	0.5
B4	2011/9/14	In	NS 3B	92 F	Urine	Ib	No zone	8	0.06	0.12	0.5	0.12	≤0.12	≤0.06	≤0.5	0.5	0.75	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	>8	≤0.5	0.5
B5	2011/10/18	In	IM 2C	64 M	TTA	Ib	No zone	8	0.06	0.12	2	0.25	≤0.12	0.12	≤0.5	1	1.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	>8	≤0.5	0.5
B6	2012/1/18	In	IM 4W	94 M	TTA	Ib	No zone	8	0.06	0.12	1	0.12	≤0.12	≤0.06	≤0.5	0.5	1	≤0.12	>1[f]	>1[f]	>1[f]	>8	>4	0.5
PSGBS B7	2011/10/17	Out	EM	73 M	Urine	Ib	17.6	2	0.06	0.12	1	0.12	≤0.12	≤0.06	≤0.5	1	0.19	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	>8	≤0.5	0.5

[a]Out, outpatient; In, inpatient; S, surgery; IM, internal medicine; NS, neurosurgery; EM, emergency; M, male; F, female; TTA, transtracheal aspirate; CTB, ceftibuten; CEC, cefaclor; PEN, penicillin; AMP, ampicillin; CTM, cefotiam; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; CDN, cefditoren; FEP, cefepime; CFM, cefixime; ZOX, ceftizoxime; MEM, meropenem; ERY, erythromycin; CLR, clarithromycin; CLI, clindamycin; LVX, levofloxacin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin.

[b]Determined by standard disk diffusion test

[c]MIC results of the Etest.

[d]Positive by PCR[10] for *ermT/R*

[e]Positive by PCR[10] for *ermB*, *ermT/R*, and *mefA/E*.

[f]Positive by PCR[10] for *ermB*.

Table 2. MLST and PBP substitutions of serotype Ib GBS clinical strains

Strain	Category[a]	MLST sequence type	Amino acid substitutions in PBPs[b]						
			PBP2X					PBP2B	PBP1A
A1	PRGBS	1	–[c]	A400V	V405A	–	Q557E	T567I	–
A2		1	–	A400V	V405A	–	Q557E	T567I	–
B1	CTB^{R}PSGBS	1	T394A	–	–	G429S	–	T567I	–
B2		1	T394A	–	–	–	–	T567I	T145A
B3		1	T394A	–	–	G429S	–	T567I	–
B4		1	T394A	–	–	–	–	T567I	T145A
B5		1	T394A	–	–	G429S	–	T567I	–
B6		1	T394A	–	–	–	–	T567I	T145A
B7	PSGBS	10	–[c]	–	–	–	–	–	–

[a]PRGBS, GBS isolates with reduced penicillin susceptibility; CTB^{R}PSGBS, PSGBS with no inhibition zones with ceftibuten disk; PSGBS, penicillin-susceptible GBS.

[b]Substitutions compared to the sequences of *S. agalactiae* 2603V/R and NEM316.

[c]No detected substitution.

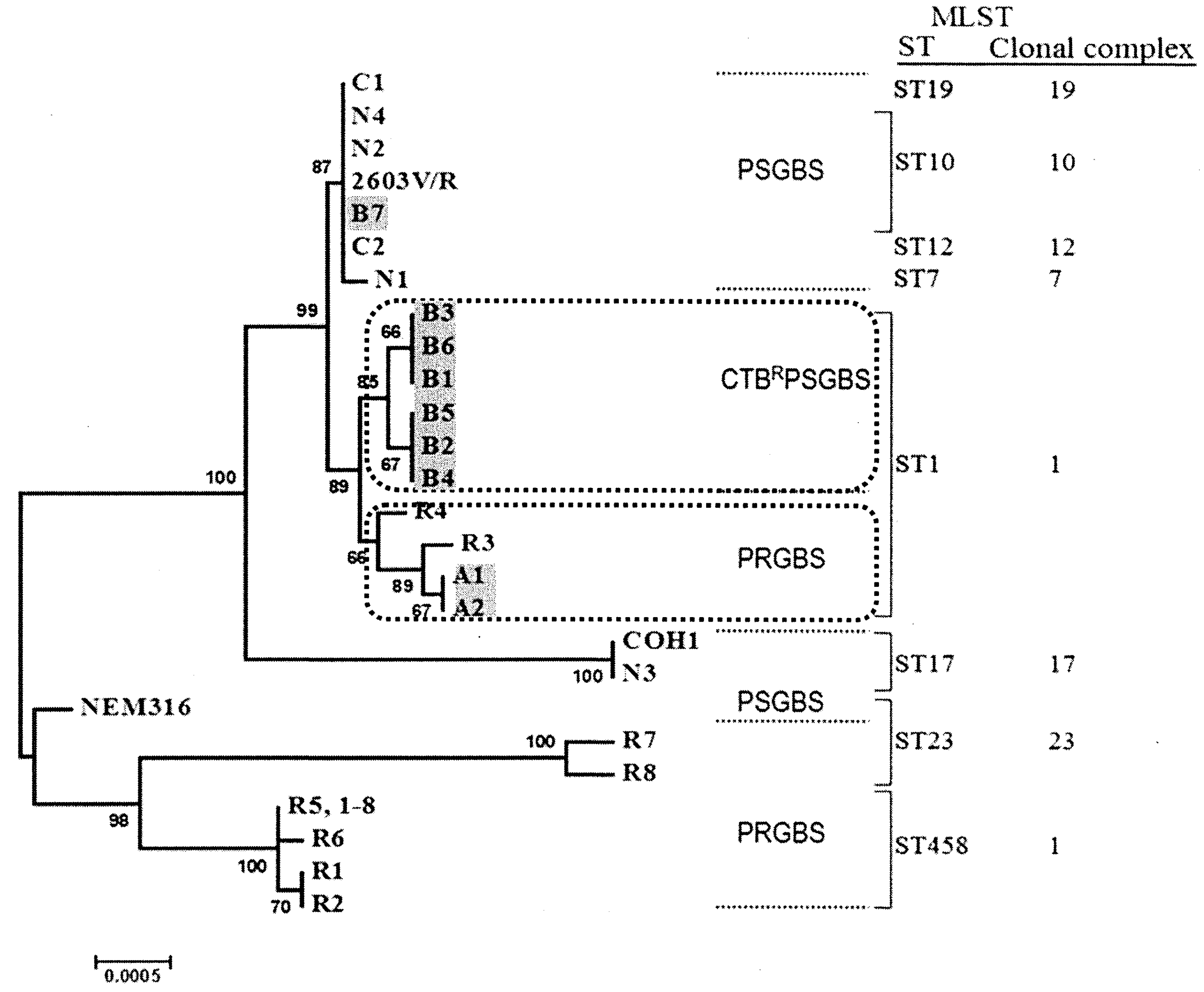


Figure 1. Correlation between phylogenetic analysis of GBS isolates based on concatenated alignment of sequenced *pbp2x*, *pbp2b*, and *pbp1a* genes and MLST sequence types.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業）
平成26年度　分担研究報告書

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者　荒川 宜親（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・教授）
研究協力者　山田 景子（同上・助教）

研究要旨:国内の医療機関で2013年11月までに分離された黄色ブドウ球菌計2329株について抗MRSA薬を中心に薬剤感受性を調査した。バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)、リネゾリド(LZD)については全株、感性と判定された。ダプトマイシン(DAP)に対して低感受性(MIC ≥2μg/ml)を示す5株について、低感受性化に関して関連が指摘されている遺伝子をいくつか調査した結果、*mprF*遺伝子に未報告の変異が見つかった。アルベカシンABKに高度耐性(MIC 256 μg/ml)を示すN1006株については*aac(6')/aph(2")*の発現量解析を行い、高度耐性株では遺伝子発現量が増加していることが明らかとなり、そのメカニズムについてはさらに解析を進めている。抗MRSA薬に関して今後も動向を注視し、得られた知見について周知する必要があると考えられた。

A. 研究目的
臨床分離された黄色ブドウ球菌の中に臨床的に問題となるような薬剤耐性菌が出現あるいは拡散していないか調査を行う。特に抗MRSA薬ダプトマイシン(DAP)は国内では2011年に販売された比較的新しい抗MRSA薬であり、耐性菌の存在は国内では報告されていないが、国内での大規模な感受性データが乏しく、国内分離の臨床株について広く調査が必要と考えられた。解析結果について学会などで報告・周知し、耐性機序や疫学についての理解を深め耐性菌対策を促すことを目的とした。

B. 研究方法
昨年度より引き続き*S. aureus*臨床分離株の感受性調査を行った。計2329株の中から抗MRSA薬に対して低感受性あるいは耐性を示す菌株についてその疫学や耐性機序を調査した。具体的にはDAP低感受性株5株についてはDAPのMIC上昇に関わると報告されている*rpoB*、*rpoC*、*yycFG*、*mprF*、*MW2528*遺伝子の変異について調査し、ABKに高度耐性(MIC 256 μg/ml)を示すN1006株については*aac(6')/aph(2")*のゲノム上での挿入位置の探索を行い周辺遺伝子を含めた発現量解析を行った。

倫理面への配慮
患者の個人情報などは取り扱わず、菌株は連結不可能匿名化された番号により管理されており、倫理審査対象外の研究である。

C. 研究結果
VCM、TEIC、LZDについては全株、感性と判定された。ABK耐性を示す株はこれまでの報告同様に散見された。DAPに対する感受性はCLSI判定基準(S: ≤1 μg/ml, IおよびRは基準なし)により感性と判定されない株(低感受性株; MIC 2 μg/m)が認められた。関連が指摘されている*rpoB*、*rpoC*、*yycFG*、*mprF*、*MW2528*遺伝子の変異を解析しゲノム解析株であるN315株、COL株、MW2株と比較したところ、*mprF*遺伝子配列についてのみ5株中2株にそれぞれ別の1か所のアミノ酸置換が見られ、うち1つは既報での変異個所とは異なった。また、遺伝子上流に変異がある株が1株あったものの、リアルタイムRT-PCRによる相対的遺伝子発現量解析では明らかな発現量の減少などは認められなかった。新しく認められた*mprF*遺伝子変異による影響については現在検討を継続している。

ABK高度耐性株に関しては、リアルタイムRT-PCRにより*aac(6')/aph(2")*のmRNAが亢進していることが明らかとなった（図1）。ゲノム上での*aac(6')/aph(2")*の挿入位置の探索を終え、*aac(6')/aph(2")*発現量に与えるメカニズムについて解析中である。

D. 考察
DAP低感受性株は潜在的に低感受性化が起こ

る可能性が考えられた。今後も低感受性株の動向に注意が必要である。ABK 耐性をもたらす *aac(6')/aph(2")*の発現量は菌株ごとに変動があり、その調整メカニズムについては今後詳細に検討する必要がある。

E. 結論
調査した 2329 株の中には抗 MRSA 薬 VCM、TEIC、LZD に対し耐性を示す菌株はなかった。DAP 低感受性の株が認められたが、低感受性化には様々な遺伝子が関わることが指摘されており国内での発生動向も注意が必要である。

F. 健康危険情報
無し。

G. 研究発表
1.論文発表　無し。
2. 学会発表
1) 山田景子、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親「ニワトリＩｇＹ抗体を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌ＭＲＳＡの検出」第 51 回日本細菌学会中部支部会、金沢、平成 26 年
2) 畑中公基、山田景子、武田 明、木戸裕勝 佐川美恵、吉川誠一、小野伸高、荒川宜親「骨髄炎患者から検出された Daptomycin 非感受性 Staphylococcus capitis subspecies urealytics 株の検討」第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会、東京、平成 27 年
3) 川辺佳苗、山田景子、金万春、和知野純一、木村幸司、荒川宜親「Development of a rapid detection system of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci」第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、平成 27 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきもの無し

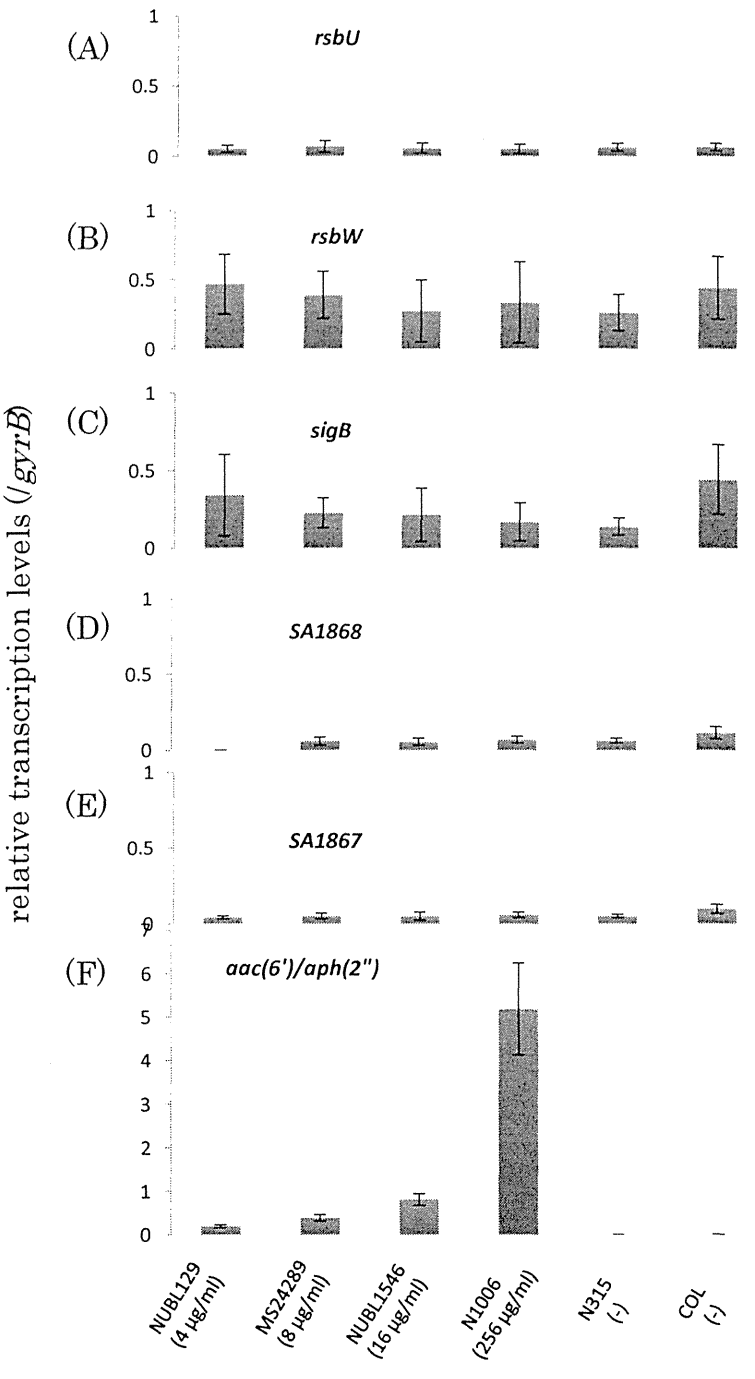


図1. *aac(6')/aph(2")*および上流遺伝子の発現量の比較
()内はABK MICを表す。N315株は日本国内における標準株、COL株は世界的な標準株として比較に用いた。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業）
平成 26 年度　分担研究報告書

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究

研究分担者　荒川　宜親（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・教授）
研究協力者　木村　幸司（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・講師）

研究要旨

B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一様に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS)の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。今回は、羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する多剤耐性 PRGBS 株の解析(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)、MLST による PRGBS とペニシリン感性 GBS(PSGBS)の比較解析(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)、臨床分離 A 群連鎖球菌(GAS)にもペニシリン低感受性株が出現しているのかの検討(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)、PRGBS を含むベータラクタム低感受性 GBS の分類法の提案(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)を行った。

A. 研究目的

B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、新生児の敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であるとともに、高齢者や糖尿病患者等に侵襲的な感染症を引き起こす。GBS は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一様に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) の出現を報告した (Kimura K., et al. AAC 2008)。これまでに、PRGBS の検出には、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテンの各ディスクを用いたディスク拡散法が有効であること (Kimura K., et al. JCM 2009) 、数週間の間隔をあけて遺伝的に同一と考えられる PRGBS 二株が分離された症例 (Nagano N., Kimura K., et al. JAC 2009)、PRGBS の PBP 遺伝子の変異箇所の解析から、PRGBS が多源的に出現していること (Nagano N., Nagano Y., Kimura K., et al. AAC 2008; ASM Microbe 誌の Journal Highlight に取り上げられる)、 Multilocus sequence typing (MLST) により、国内の PRGBS は、ST458 と ST1 を含む CC から多く出現しているが、その他遺伝的に関連性の薄い菌株群からも多源的に出現していること (Kimura K., et al. JAC 2011)、2007-2008 年に分離された妊婦膣スワブ由来 141 株の GBS の中からは PRGBS は検出できず、妊婦膣スワブ由来 GBS では PRGBS は稀であること (Kimura K., et al. JJID 2013) 、PRGBS は 1990 年代に

出現したと推定されること(Kimura K., et al. JJID 2013)、PRGBSは多剤耐性化傾向があること (Kimura K., et al. JAC 2013)、広く国内で使用されている、A 社の自動感受性測定機器では、PRGBS の半数程度(13/28, 46.4%)がペニシリンに対する感受性を正しく判定できないこと (Kimura K., et al. JAC 2013)、PRGBS の検出を促進するために、GBS 検出用 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を開発 (Kimura K., et al. JJID 2013)、また、GBSはPBP2Xのみならず PBP1A にも変異を獲得するとセフチゾキシム高度耐性を獲得すること (Kimura K., et al. JAC 2013)などを明らかにしてきた。

今回は、羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する PRGBS 疑い株の解析(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)、MLST による PRGBS とペニシリン感性 GBS(PSGBS)の比較解析(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)、臨床分離A群連鎖球菌(GAS)にもペニシリン低感受性株が出現しているのかの検討(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)、PRGBS を含むベータラクタム低感受性GBSの分類法の提案(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)を行った。

B. 研究方法

通常、GBSはβ溶血を示すが、ごく稀にβ溶血しないGBSが分離されることがある。これまで PRGBS はすべてβ溶血を示してきたが、今回、β溶血しない臨床分離 PRGBS 疑い株を入手した。この株は、血液検体からも分離されており、高い病原性を有していると考えられる。また、同一医療施設より、類似の株が1年ほどの間隔をあけて分離されており、医療環境に長期間にわたり定着しやすい株である可能性がある。今回、このβ溶血しないPRGBS株のペニシリン低感受性機構及びβ溶血しない理由を解析した。これらβ溶血しないPRGBS疑い株ついて、申請者らが開発したPRGBSを検出できるディスク拡散法(Kimura K., et al JCM 2009)も実施した。また、平板希釈法により、正確な薬剤感受性試験を行い、PRGBS であることを確認した。これらの株の PBP2X 遺伝子配列を決定し、変異の有無を確認した。β溶血は、ヘモリジンにより担われていることが知られている。ヘモリジンの発現低下、機能欠損を念頭に、ヘモリジン遺伝子の配列及びヘモリジン遺伝子を調節する転写因子群の配列を検討した。類似の株群が、同一の遺伝的背景をもつかを MLST 法及び Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)法により検討した (Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

これまで、PRGBSは、主に高齢者の呼吸器系検体から分離されており、MLST 解析により、国内分離 PRGBS 株の多くは Sequence type 1 group に属していることが明らかになっている(Kimura K., et al., JAC 2011)。しかしながら、成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性GBSのMLST解析の報告が少なく、PRGBSが成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性 GBS と同じような遺伝的背景をもっているのか、それとも異なる遺伝的背景であるのかは不明である。今回、38株の成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性GBSのMLST解析を行った。成人呼吸器系検体由来のペニシリン感受性GBS株のMLST解析を行い、既に解析が終わっている PRGBS との遺伝的背景について比較検討した(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

臨床分離GASは、一様にベータラクタムに感性であると考えられているが、日本からベータラクタム低感受性 GAS の存在を示唆する論文が発表された(Ogawa T., et al. FEMS Microbiol Lett 2011; 318:143-51.)。我々は、その真偽を明らかにするために、国内の256株のGASを集め、PRGBSが高いMIC値を示すことが明らかになっている5つのベータラムタム系薬(ペニシリン、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテン、セファクロル)について、平板希釈法により、MIC 値を決定した。また、比較的MIC値の高い株については、PBPsの遺伝子配列を決定した(Suzuki T., Kimura K., et al JAC 2015)。

PRGBS を含め、ベータラクタム低感受

性 GBS(Group B Streptococcus with reduced beta-lactam susceptibility, GBS-RBS)の報告が増加傾向にある。我々は、これらの PBPs の変異箇所を比較し、GBS-RBS の分類を考案した(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

倫理面への配慮

今回の研究は、主に菌株を対象とした研究であり、倫理審査を必要とする研究計画は含まれていない。

C. 研究結果

羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する PRGBS 疑い株は、PBP2X に変異を持ち、かつマクロライド系及びフルオロキノロン系耐性である多剤耐性 PRGBS であることが明らかになった。MLST 解析、PFGE 解析により、類似の 3 株は、遺伝的に近縁な菌株群であることが明らかになった。これらの株は、チョコレート寒天培地上では、通常の GBS と同等の大きさのコロニーを形成すること、PRGBS を検出できるディスク拡散法(Kimura K., et al JCM 2009)では、正しく PRGBS と判定可能であることを明らかにした。また、ヘモリジン遺伝子を含む *cyl* operon のうち、*cylK* 遺伝子に部分欠損があることを見いだし、この部分欠損が非溶血性のコロニーを形成する一因である可能性を見いだした(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

PRGBS 中でもっと頻度の高い ST458 (10/19, 53%)は、PSGBS 中では認められなかった。36 株の PSGBS は、6 つの異なる ST で ST1/19/10 の group に属し、残りの 2 株は異なる group である ST23 であった。このことから、PRGBS の ST の分布は、単に PSGBS の ST 分布をそのまま反映しているのではないことが示唆された(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

256 株の GAS の薬剤感受性試験により、明らかなベータラクタム低感受性 GAS は検出されなかった。我々は、念のため、比較的MIC値の高い8株について解析を行ったが、3 株が *Streptococcus pyogenes*, 5 株が A 群抗原を持つ *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)であった。これらの株の PBPs を解析したが、ベータラクタム低感受性を付与すると考えられる変異は認められなかった(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)。

我々は、十分に解析がなされている GBS-RBS に関する論文を熟読し、PBPs の変異の箇所によって、GBS-RBS を Class I-IV に分類し、更に PBP2X での変異の種類により、Subclass "a", "b", "c", "z"に分類する分類法を考案した(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

D. 考察

羊血液寒天培地上で非溶血かつ小型のコロニーを形成する多剤耐性 PRGBS 株については、医療現場の細菌検査室で誤同定を引き起こす可能性があるので、このような特殊な多剤耐性 PRGBS 株の存在を留意する必要がある(Banno H., Kimura K., et al. JCM 2014)。

今回の PSGBS の MLST 解析では、PRGBS 中でもっと頻度の高い ST458 は、検出されず、ST458 の由来は依然、不明であり、その由来を明らかにすることは今後の課題である(Yamada R., Kimura K., et al. JJID 2015)。

今回の我々の GAS256 株の解析の結果からは、日本において、ベータラクタム低感受性 GAS は、存在しない、もしくは、存在するとしても極めて稀であるということが示唆される。GAS についても、正確な薬剤感受性試験を基にした調査が引き続き行われることが望まれる(Suzuki T., Kimura K., et al. JAC 2015)。

我々の考案した GBS-RBS の分類法により、今後、情報が蓄積され、分類から薬剤感受性試験の結果が推定できるようになるかも知れない。今後、広く世界で我々の分類法が使用され、情報が蓄積されていくことが望まれる(Kimura K., Nagano N., Arakawa Y. JAC 2015)。

E. 結論

我々が世界に先駆けて報告した新規耐性菌である PRGBS に関しては、我々のグループが一連の研究により知見を重ねてきたが、不明な点が未だ多々あり、十分に研究され尽くしたとは言いがたい。今後、PRGBS に関する研究をさらに拡充し、十分な解析が行われることが望まれる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) **K. Kimura**, N. Nagano, **Y. Arakawa** (2015)
"Classification of Group B Streptococci with Reduced β-Lactam Susceptibility (GBS-RBS) Based on the Amino Acid Substitutions in Penicillin-binding Proteins (PBPs)"
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy in press

2) T. Suzuki, **K. Kimura**, H. Suzuki, H. Banno, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, **Y. Arakawa** (2015)
"Have Group A Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility Emerged?"
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy in press

3) R. Yamada, **K. Kimura**, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2015)
"Comparative Analysis of Penicillin-Susceptible and Non-Susceptible Isolates in Group B Streptococci by Multilocus Sequence Typing"
Japanese Journal of Infectious Diseases in press.

4) H. Banno, **K. Kimura**, Y. Tanaka, H. Kitanaka, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2014)
"Characterization of Multi-drug-Resistant Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS) Forming Small Non-β-hemolytic Colonies on Sheep Blood Agar Plates"
Journal Clinical Microbiology 52(6): p2169-71.

2. 学会発表

1) 長野則之、長野由紀子、外山雅美、木村幸司、柴山恵吾、荒川宜親(2015)
"ペニシリン低感受性B群レンサ球菌株の血清型の変遷とその分子生物学的特性"
第26回日本臨床微生物学会総会学術集会（口頭発表） 東京 1月31日、2月1日 O-005

2) 和知野純一、木村幸司、山田景子、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、荒川宜親 (2015)
"ESBL産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易識別法の開発"
第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会 （口頭発表） 東京 1 月 31 日、2 月 1 日 O-162

3) 鈴木健史、木村幸司、鈴木寛、坂野弘嗣、金万春、和知野純一、山田景子、荒川宜親(2014)
"β-ラクタム系抗菌薬低感受性A群β溶血性レンサ球菌は国内で出現したのか？"
第43回薬剤耐性菌研究会（口頭発表） 加賀市 10月31日-11月1日

4) 中村元気、和知野純一、佐藤夏巳、木村幸司、山田景子、金万春、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、荒川宜親(2014)
"ESBL産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発"
第43回薬剤耐性菌研究会（口頭発表） 加賀市 10月31日-11月1日

5) 山田景子、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 (2014)
"ニワトリIgY抗体を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌MRSAの検出"
第51回日本細菌学会中部支部会（口頭発表） 金沢 10月17日18日

６）伊藤亮太、進藤有一郎、小林大介、安藤昌彦、金万春、和知野純一、山田景子、木村幸司、八木哲也、長谷川好規、荒川宜親(2014)
“肺炎患者より検出された*Klebsiella pneumoniae*の分子疫学的解析”
第51回日本細菌学会中部支部会（口頭発表）
金沢　10月17日18日

７）金万春、和知野純一、山田景子、木村幸司、荒川宜親(2014)
“*Serratia marcescens*より発見された新規プラスミド媒介性アミノ配糖体アセチル化酵素の解析”
第51回日本細菌学会中部支部会（口頭発表）
金沢　10月17日18日

H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業）
平成26年度　分担研究報告書

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

健常人より分離されたCTX-M産生大腸菌のホスホマイシン耐性に関する研究

研究分担者　荒川 宜親　（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・教授）
研究協力者　川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）
佐藤 夏巳　（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）
和知野 純一（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・助教）
中根 邦彦　（同上、大学院博士過程3年、岡崎市保健所）

研究要旨：基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の増加と多剤耐性化により薬剤の選択が困難となりつつある中、ホスホマイシンが見直されつつある。ホスホマイシンは、40年以上前から尿路感染症などの治療に使用されてきた薬剤であり、他の薬剤との交差耐性がないこと、幅広い抗菌スペクトルを有することから、多剤耐性グラム陰性桿菌による感染症の治療薬として、その効果が期待されている。一方で、プラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子(*fosA3*, *fosC2*)がヒトや動物から検出されており、多用による耐性菌の増加が懸念されている。これまでの調査で、我々は健常人の約数%が腸管内にCTX-M産生大腸菌を保菌していることを確認している。CTX-M産生大腸菌についての最近の研究で、*fosA3*とbla_{CTX-M}が同一プラスミド上に存在することが証明されており、今後bla_{CTX-M}保有プラスミドの広まりとともにホスホマイシン耐性遺伝子の拡散が危惧されている。そこで本研究では、健常人由来CTX-M産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性率およびプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子の保有について調査を実施した。2010年1月～8月の間に健常人の糞便より分離されたCTX-M産生大腸菌138株(重複を除く)を対象に調査を行った結果、8株(5.8%)がホスホマイシン耐性であり、このうち5株が*fosA3*を保有していた。これら5株は接合伝達試験にいずれも*fosA3*の伝達性が確認され、得られた接合伝達株は全て親株と同型のbla_{CTX-M}を保有していた。Inc typeはIncN type 1株, IncFII type 2株, IncI1 type 2株であった。*fosA3*の周辺構造には、上流にbla_{CTX-M}が存在し、これら2つの遺伝子はIS*26*に挟まれた構造であった。この構造はアジアでヒトや鶏から検出されたものと類似しており、IS*26*を介して両遺伝子が様々なInc typeをもつプラスミドに伝播している可能性が示唆された。

A. 研究目的

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌をはじめとする多剤耐性グラム陰性桿菌の治療薬としてホスホマイシンが見直されつつある。しかし、すでにプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子(*fosA3*, *fosC2*)がヒトや動物から分離されており、また、CTX-M産生大腸菌においては、*fosA3*とbla_{CTX-M}が同一プラスミド上に存在することも証明されている。これまでの調査で、我々は健常人の約数%が腸管内にCTX-M産生大腸菌を保菌していることを確認しており、今後bla_{CTX-M}保有プラスミドの広まりとともにホスホマイシン耐性遺伝子が市中環境に拡散することを危惧している。本研究では、これらCTX-M産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性率およびプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子の保有率について調査を実施した。

B. 研究方法

菌株は2010年1月～8月の間に収集した健常人糞便由来CTX-M産生大腸菌138株を対象とした。ホスホマイシンの最小発育阻止濃度(minimal inhibitory concentration; MIC)はCLSIに準拠した寒天平板希釈法にて測定した。ホスホマイシンに耐性を示した株(MIC ≥ 256μg/ml)については、PCR法にてプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子*fosA*, *fosA3*, *fosC2*の検索を行った。その

他、接合伝達試験、multilocus sequence typing (MLST)解析、OおよびH血清型別、plasmid multilocus sequence typing (pMLST)解析、Inc typeの決定、および*fosA3*の周辺構造の解析を実施した。

C. 研究結果

138株中129株(93.5%)がホスホマイシンに感性(MIC ≤ 64μg/ml)を示し、1株(0.7%)が中間(MIC 128μg/ml)、8株(5.8%)が耐性(MIC ≥ 256μg/ml)を示した(Figure 1)。このうち、ホスホマイシンに耐性を示した8株のうち5株が*fosA3*を保有していたが、*fosA*および*fosC2*保有株は認められなかった。接合伝達試験の結果、これら5株全てにおいて*fosA3*の伝達性が確認され、得られた接合伝達株は親株と同型のbla_{CTX-M}を保有していた。MLST解析の結果、ST155, ST224, ST3502, ST3503, ST3504と多様性があり、血清型についても偏りは認められなかった(Table 1)。Inc typeはIncN type 1株, IncI1 type 2株, IncFII type 2株であり、pMLST解析の結果、IncI1typeのプラスミドはST71およびST97、IncFII typeはFII:2およびFII:33であった(Table 1)。

*fosA3*の周辺構造解析は、Inc typeの異なる3株(No. 48, No. 558, No. 559)について実施した(Figure 2)。IncN typeのプラスミド(No. 48)およびIncI1 typeのプラスミド(No. 559)は*fosA3*の上流にΔIS*903*, $bla_{CTX-M-14}$, ΔIS*Ecp1*が存在し、この構造はECO021TFのプラスミド(Accession nos. JQ343849)と99%一致していた。一方、*fosA3*の下流は*Klebsiella pneumoniae* 342の染色体と78%一致していた。これらの構造はその両端をIS*26*によって挟まれていた。IncFII typeのプラスミド(No. 558)は*fosA3*の上流にΔbla_{TEM-1}, *orf477*, $bla_{CTX-M-55}$, ΔIS*Ecp1*が存在し、これらはIS*26*に挟まれた構造であった。この構造はECO141TFのプラスミド(Accession nos. JQ343851)と100%一致していた。一方、*fosA3*とその下流はIS*26*に挟まれており、*fosA3*の下流は*K. pneumoniae* 342の染色体と79%一致していた。これら*fosA3*の周辺構造はヒトや家畜より分離された*fosA3*保有CTX-M産生大腸菌の周辺構造と98-100%一致していた。

D. 考察

健常人由来CTX-M産生大腸菌を対象に、ホスホマイシン耐性率を調査したところ、5.8%がホスホマイシンに耐性であった。これは日本(3.6%)、スペイン(9.1%)および韓国(4.2%)の臨床報告(Antimicrob Agents Chemother 2010; J Antimicrob Chemother 2009, J Antimicrob Chemother 2012)と類似している。この結果から、ホスホマイシンや第三世代セファロスポリン系抗菌薬などの抗菌薬投与歴が無い健常人の腸管内においてもホスホマイシン耐性CTX-M産生大腸菌が保菌されていることが確認された。

ホスホマイシン耐性CTX-M産生大腸菌の*fosA3*保有率は62.5%(5/8)と高く、さらに様々なグループのCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子と*fosA3*が同時に存在していたことから、今後、腸内細菌科菌種におけるbla_{CTX-M}遺伝子の広まりとともに*fosA3*が拡散する可能性が示唆された。しかし、*fosA3*保有CTX-M産生菌の調査報告は韓国や中国など東アジア諸国に限られているため、今後はヨーロッパやアメリカなど世界規模での調査が必要となると考える。

*fosA3*保有株の血清型、STは多様性があり、韓国の報告とは異なっていた。また、Inc typeについても偏りは認められなかったことから、*fosA3*は様々なInc typeのプラスミドに伝播し、遺伝的背景の異なる菌株間に伝播することが示唆された。

*fosA3*の周辺構造は、3株とも共通して、*fosA3*の上流にbla_{CTX-M}が存在し、これら2つの遺伝子がIS*26*に挟まれる構造であった。この構造はヒト、家畜およびペットより分離された*fosA3*保有CTX-M産生大腸菌の周辺構造と類似していたことから、*fosA3*がIS*26*を介して様々なプラスミドに伝播し、臨床、市中、家畜やペットなど様々な環境下に生息している菌の間で、すでに広まっていることが明らかになった。

E. 結論

我々は健常人糞便由来CTX-M産生大腸菌に*fosA3*遺伝子が広まりつつあることを証明した。ホスホマイシンはCTX-M産生大腸菌感染症の治療薬として再評価されつつあるが、健常人の腸管内に保菌される大腸菌がすでにプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子を獲得していたことから、今後、ホスホマイシンの使用増加に伴う*fosA3*の広まりが危惧される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Sato N., Kawamura K., Nakane K., Wachino J. and Arakawa Y. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. Microb. Drug Resist. 2013. 19(6): 477-482.

2. 学会発表

1) 佐藤夏巳, 川村久美子, 後藤謙介, 和知野純一, 中根邦彦, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 86 回 日本細菌学会総会. 日本細菌学会雑誌. 2013. 第 68 巻, 188 頁

2) 佐藤夏巳, 川村久美子, 中根邦彦, 和知野純一, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 87 回 日本感染症学会学術講演会／第 61 回 日本化学療法学会総会 合同学会. 感染症学雑誌. 2013. 第 87 巻, 238 頁

3) Sato N., Kawamura K., Nakane K., Wachino J. and Arakawa Y. First detection of acquired fosfomycin resistance gene *fosA3* among CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy Japanese people. 第 28 回 国際化学療法学会. 予稿集 52 頁

4) 佐藤夏巳, 川村久美子, 中根邦彦, 和知野純一, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 25 回 日本臨床微生物学会総会. 日本臨床微生物学雑誌. 2013. 第 23 巻, 297 頁

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

TABLE 1. Characteristics of *fosA3*-positive *E. coli* isolates and their transconjugants

	ESBL type (parental)	Serotype [a] (parental)		FOM	CTX	Resistance [b] (parental)	Inc type (parental)	ESBL type (conjugant)	Inc type (conjugant)		FOM	CTX
48	CTX-M-14	O128: H-	3502	>256	128		N	CTX-M-14	N	ND[d]	>256	16
84	CTX-M-14	O29: HUT	224	>256	>256	MINO,CPFX	I1,FII,FIB	CTX-M-14	I1	ST71	>256	256
558	CTX-M-55	OUT:H-	155	>256	256	CP,FLO,MINO,ST,CPFX	FII,FIB	CTX-M-55	FII	FII:33	>256	256
559	CTX-M-14	OUT:HUT	3503	>256	128	<u>CP</u>[c], <u>FLO</u>[c],MINO,ST,CPFX	I1,FII,FIB	CTX-M-14	I1	ST97	>256	16

[a]OUT indicates O-antigen untypable and HUT indicates H-antigen untypable
[b]Abbreviation: MINO, minocycline; CPFX, ciprofloxacin; CP, chloramphenicol; FLO, florfenicol; ST, trimethoprim/sulfamethoxazole; GM, gentamicin.
[c]Resistance phenotype transferred to recipient cells by conjugation is underlined.
[d]ND, not determined. The *korA* gene of the IncN plasmid was not amplified.

Figure 1.
Distribution of fosfomycin MICs in 138 CTX-M–producing *E. coli* isolates. The white bars indicate the strains that are assigned to be susceptible on the basis of the CLSI guidelines. The gray and black bars indicate the strains that are assigned to be intermediate-resistant and resistant, respectively.

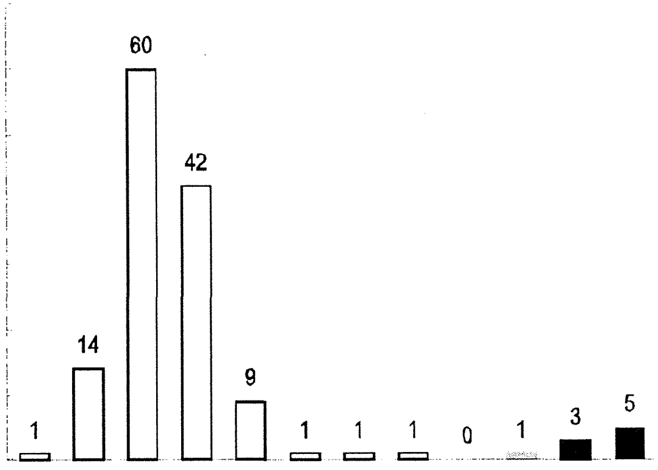
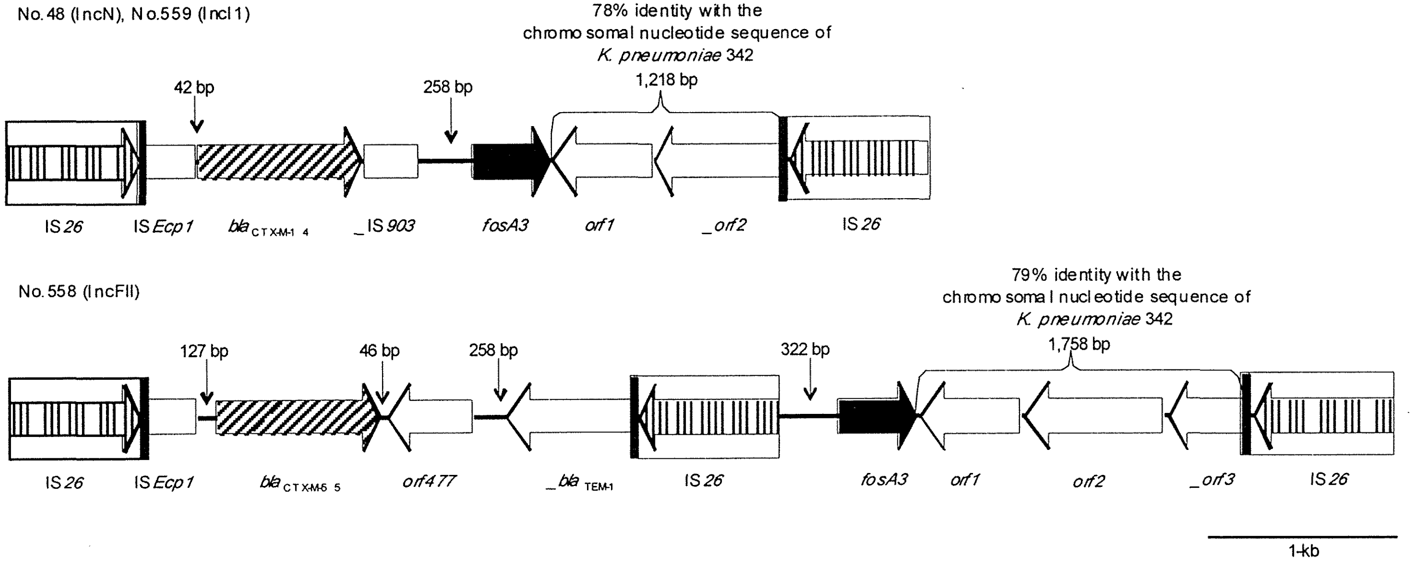


Figure 2.
Schematic representation of the genetic environment of the *fosA3* gene.



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業）
平成26年度　分担研究報告書

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

メタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出法に関する研究

研究分担者　荒川　宜親（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・教授）
研究協力者　川村　久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）
　　　　　　服部　達也（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）

研究要旨：これまで、Metallo-β-lactamase (MBL)産生グラム陰性桿菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)やEtestが常用されてきたが、CTX-Mタイプの基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL) やCMY-型β-ラクタマーゼなどの複数酵素を同時に産生する菌の出現と増加により、現行法のみでは対応できなくなりつつある。本研究の目的は、MBL単独産生菌のみならず複数酵素同時産生菌をも高率に検出しうる検出法ならびにその条件を見いだすことである。MBL産生菌24株と非MBL産生菌32株の計56株を使用した。MBL産生菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)、Etset MBL IP/IPI (BbioMerieux)、Cica-Beta test MBL (Kanto Chemical)、Dry-plate DPD1 test (Eiken Chemical)、Modified Hodge testの5種類を比較検討した。尚、DDSTについては、抗菌薬として ceftazidime (CAZ)、meropenem (MEPM)、imipenem (IPM)の3種類を、阻害剤として sodium mercaptoacetic acid (SMA)および EDTAを用い、disk間距離を5、10、15、20mmの4種類で比較検討した。結果、単独産生株では、抗菌薬CAZ、阻害剤SMA、disk間距離5mmのDDST法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 testが最も高精度なMBL検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 testに比し、DDST法の方が遥かに安価で、操作法も簡便であることから、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

A. 研究目的

Metallo-β-lactamase (MBL) は oxyimino cephalosporinやcarbapenemを含むほとんど全てのβ-lactam系抗菌薬を加水分解する酵素であり、本酵素を産生する病原細菌の増加が治療上大きな問題となっている。これまで、MBL産生グラム陰性桿菌の検出法として、微生物検査室では double-disk synergy test (DDST)やEtestが常用されてきたが、CTX-Mタイプの基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL) やCMY-型 β-ラクタマーゼなどの複数酵素を同時に産生する菌が増加しつつあり、現行法のみでは正確な検出ができなくなりつつある。本研究の目的は、MBL単独産生菌のみならず複数酵素同時産生菌をも高率に検出しうる検出法ならびにその条件を見いだすことである。

B. 研究方法

MBL産生菌24株と非MBL産生菌32株の計56株を使用した。MBL産生菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)、Etset MBL IP/IPI (BbioMerieux)、Cica-Beta test MBL (Kanto Chemical)、Dry-plate DPD1 test (Eiken Chemical)、Modified Hodge testの5種類を比較検討した。尚、DDSTについては、抗菌薬として ceftazidime (CAZ)、meropenem (MEPM)、imipenem (IPM)の3種類を、阻害剤として sodium mercaptoacetic acid (SMA)および EDTAを用い、disk間距離を 5、10、15、20mmの4種類で比較検討した。

C. 研究結果

1. 単独酵素産生株/DDST法：SMA diskを用いたDDST法においては、抗菌薬CAZを用いた場合が最も感度が高く、disk間距離は5mmで感度100%、10、15mmでは感度95.2%であった。特異度はいずれの条件でもすべて100%であった。一方、EDTA disk を用いたDDST法においては、抗菌薬 IPM を用いた

disk 間距離 5mm の場合が感度 81.0%、特異度 87.5%と最も良好であったが、少なからず偽陰性例および偽陽性例が認められる結果となった (Table 1)。この EDTA disk を用いた DDST 法における偽陰性例の多くは *Acinetobacter* 属菌であり (Figure 1)、偽陽性例は CMY-型 β-ラクタマーゼ産生菌あった (Figure 2)。

2. 複数酵素産生株/DDST 法: 複数酵素産生株として、NDM-1 産生株 2 株と IMP-型 MBL と CTX-M-2 型 ESBL 同時産生株 1 株を用いた。これら 3 株の複数酵素同時産生株すべてを正確に検出できた条件は、抗菌薬に MEPM を使用した disk 間距離 5mm の時のみであった。

3. 5 種類の検出法の比較: 56 株全てを対象とした場合、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の条件の DDST 法と Dry-plate DPD1 test が感度 87.5%で最も良い結果を示した。特異度は DDST 法が 100%、Dry-plate DPD1 test が 96.6%と DDST 法がやや高い値になった (Table 2)。この 2 つの検出法における複数酵素産生株の検出率は DDST 法が 3 株中 0 株、Dry-plate DPD1 test が 3 株中 2 株となり、Dry-plate DPD1 test の方が正確に検出することができた。

D. 考察

DDST 法においては、阻害剤に SMA を用いた方が感度、特異度ともに高い値が得られ、これは SMA が特異的にメタロ-β-ラクタマーゼを阻害しているためと考えられた。この SMA の特異的な阻害については、和知野らの結晶解析の結果(2013. Antimicrob Agents Chemother)がすでに裏付けている。EDTA disk を用いた DDST 法において、*Acinetobacter* 属菌で偽陰性例が多く生じた理由としては、*Acinetobacter* 属菌は EDTA それ自身に発育阻害をうけ、EDTA disk 周りに大きな阻止円が形成されたためである(Figure 1)。おそらく、*Acinetobacter* 属菌の増殖には培地中の 2 価イオンが必要であるが、EDTA がそれらをキレートしてしまうため、増殖阻害が生じたものと考える。CMY-型 β-ラクタマーゼ産生菌においては、EDTA disk 周りに大きな阻止円が形成され (Figure 2)、抗菌薬との間に生じる阻止円の変化を判定し難くなったことが原因と考えられる 。

複数酵素同時産生株においては、単独産生株のそれとは異なり、抗菌薬は MEPM の時が最も正確に検出できた。これは MEPM が SHV-型や CTX-M 型、CMY-型 β-ラクタマーゼによってほとんど加水分解されないためと考えられる。最終的に、単独産生株では、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 test が最も高精度な MBL 検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 test に比し、DDST 法の方が遥かに安価で、操作法も簡便であることから、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

E. 結論

単独産生株では、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 test が最も高精度な MBL 検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 test に比し、DDST 法の納が遥かに安価であり、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hattori T., Kawamura K., and Y. Arakawa. Comparison of test methods for detecting metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria. Jpn. J. Infect. Dis. 2013. 66. 512-518.

2. 学会発表

1) Kawamura K., Hattori T., Arakawa Y. Evaluation of screening methods to detect metallo β-lactamase-producing Gram-negative bacteria. 第85回 日本細菌学会. 日本細菌学会誌. 2012. 67,125頁

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

Table 1. Summary of sensitivities and specificities of the double-disk synergy tests (DDSTs) using of SMA and EDTA disk in the phenotypic detection of IMP- or VIM-producing strains

Agents	Distance between disks (mm)	DDSTs using SMA disk[a)]						DDSTs using EDTA disk[a)]					
		MBL-producing strains (n=21)		non-MBL-producing strains (n=32)		Se (%)	Sp (%)	MBL-producing strains (n=21)		non-MBL-producing strains (n=32)		Se (%)	Sp (%)
		Positive	Negative	Positive	Negative			Positive	Negative	Positive	Negative		
CAZ	5	21	0	0	32	100	100	16	5	7	25	76.2	78.1
	10	20	1	0	32	95.2	100	11	10	0	32	52.4	100
	15	20	1	0	32	95.2	100	1	20	0	32	4.8	100
	20	5	16	0	32	23.8	100	0	21	0	32	0	100
MEPM	5	16	5	0	32	76.2	100	15	6	5	27	71.4	84.4
	10	16	5	0	32	76.2	100	3	18	1	31	14.3	96.9
	15	14	7	0	32	66.7	100	0	21	2	30	0	93.8
	20	3	18	0	32	14.3	100	0	21	2	30	0	93.8
IPM	5	18	3	0	32	85.7	100	17	4	4	28	81.0	87.5
	10	18	3	0	32	85.7	100	8	13	0	32	38.1	100
	15	17	4	0	32	81.0	100	1	20	0	32	4.8	100
	20	1	20	0	32	4.8	100	0	21	0	32	0	100

Table 2. Comparison of sensitivities and specificities of six screening test methods to detect MBL producers

Screening test methods		All strains (n=56)				IMP- or VIM-producers (n=21)	Plural classes of β-lactamases producers (n=3)	non-MBL-producers (n=32)
		Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)	TP/FN[c)]	TP/FN	FP/TN[c)]
DDSTs (5 mm)[a)]	SMA-CAZ	87.5	100	100	91.4	21/0	0/3	0/32
	SMA-MEPM	79.1	100	100	100	16/5	3/0	0/32
	SMA-IPM	79.1	100	100	94.1	18/3	1/2	0/32
DDSTs (5 mm)[a,b)]	EDTA-CAZ	70.8	78.1	70.8	92.5	16/5	1/2	7/25
	EDTA-MEPM	70.8	84.4	77.2	96.4	15/6	2/1	5/27
	EDTA-IPM	79.1	87.5	82.6	96.6	17/4	2/1	4/28
Dry-plate DPD1 test		87.5	96.9	95.4	91.2	19/2	2/1	1/31
Etest MBL IP/IPI		58.3	96.9	93.3	75.6	14/7	0/3	1/31
Cica-Beta test MBL		66.7	100	100	80.0	14/7	2/1	0/32
Modified Hodge test		70.8	100	100	82.1	16/5	1/2	0/32

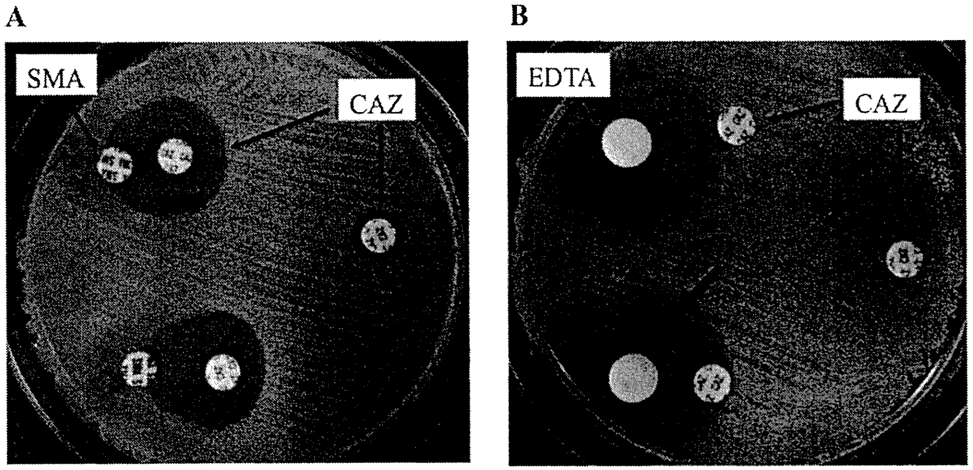


Figure 1. Appearance of growth-inhibitory zone in IMP-1-producing *Acinetobacter* sp.

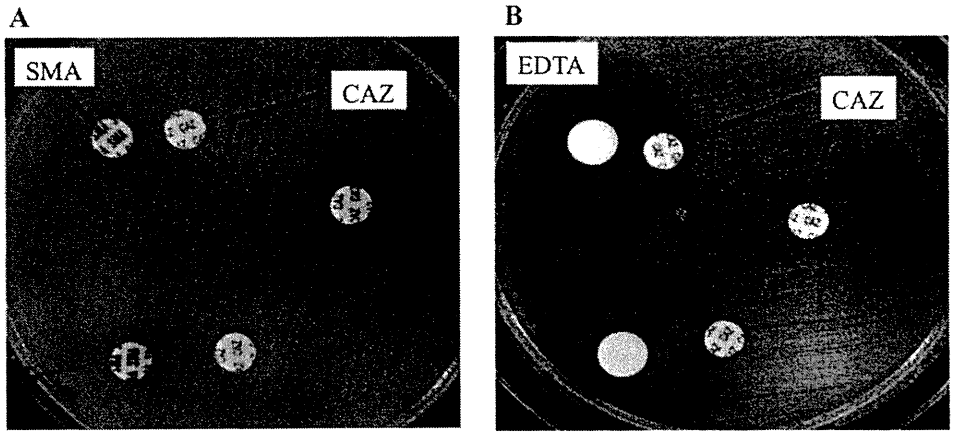


Fig. 2. Appearance of growth-inhibitory zone in CMY-producing strains.