

FIG 1 Distributions of small genomic islets and species-specific markers on genomes of representative strains. Open circles indicate SGIs, and closed circles indicate species-specific genetic markers. Locations of *atpA* selected as the universal marker of *Acinetobacter* species are not provided. The genome sequence data of *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* are still draft data at present. The positions of each marker were decided by mapping the contigs containing markers on the basis of the genome of *A. baumannii* ACICU. Genome comparison maps illustrated by Artemis Comparison Tool (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/act/>) are arranged outside the circles, indicating genomes. The outer, second outer, and third outer rings indicate the genomes of *A. baumannii* AB0057, ACICU, and ATCC 17978, respectively. The dark-gray drawings in genome comparison maps indicate matches between the sequences, and the silver drawing in ACICU_02966 indicates an inversion match. The calibration bar indicates 4 kbp on all seven genome comparison maps. A large color version of this figure with high resolution is available in Fig. S1 in the supplemental material.

other *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains, although the sequence similarities ranged from 80% to 97%.

Strains belonging to the same CC showed very similar distribution patterns in 16 of the 24 SGI ORFs (Table 1). The CC identities of strains belonging to the major CC were identified based on the distribution patterns of those 16 SGI ORFs. However, the distribution patterns of the 16 SGI ORFs in strains of Pasteur ST145 could not be distinguished from those of a novel ST (allele numbers 27-2v-2v-1-9-2-5).

SGI ORFs adopted for multiplex PCR amplification (Table 1) were selected according to the following principles. First, ORFs that were found exclusively in international clones I or II but were absent among most clones other than the epidemic ones were selected. The ORFs specific to international clone I were AB57_0815 and AB57_3308, and those specific to international clone II were ACICU_02966 and ACICU_03137. Thus, the international clones can be identified and distinguished by detecting the four ORFs AB57_0815, AB57_3308, ACICU_02966, and ACICU_03137. Second, three ORFs (AB57_2484, ACICU_02042, and ACICU_01870) were selected, because their distribution patterns in the epidemic clones were divergent in at least two alleles compared with those found in other non-epidemic lineages. These 3 ORFs were finally adopted to improve the discriminatory power of the test. The distribution patterns of the 7 SGI ORFs among the

A. baumannii clones and *Acinetobacter* species are shown in Fig. 1 and Table 4; see also Fig. S1 in the supplemental material.

Two ORFs (*atpA* and *sucD*) were selected as the candidates for universal markers of *Acinetobacter* species by comparing whole-genome sequences. These alleles were found among all *Acinetobacter* species in the BLAST databases (whole-genome sequencing [WGS] database as of 8 May 2013) showing higher percent sequence similarities (>80%) than other orthologs. *atpA* was finally chosen as the marker specific to *Acinetobacter* species and the marker for the internal control of PCR amplification.

Genetic markers specific to *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis* were also searched for their whole-genome data. ORFs designated pittii-6, nosocomialis-3, and Asp-1 (Table 2) were finally chosen as markers specific to *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis*, respectively (Table 2). The pittii-6 marker was chosen from nine candidate markers, and its specificity and sensitivity were 100% and 95%, respectively (Table 2). As pittii-6 was also found in *A. calcoaceticus* genome sequences, with an 83% sequence similarity in its nucleotide sequence level, primers were designed for the specific detection of *A. pittii*. The nosocomialis-3 marker was chosen from 3 candidates, and its specificity and sensitivity were 100% and 99%, respectively. The Asp-1 marker was chosen from

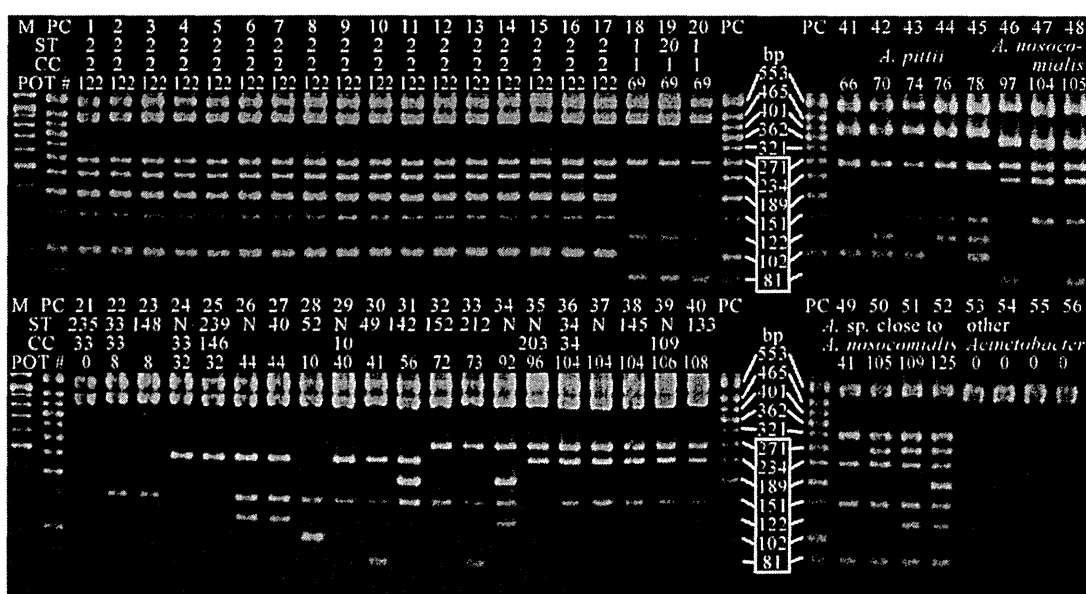


FIG 2 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR-based ORF typing using 12-plex PCR. Lane M, 50-bp ladder marker; lane PC, positive control; lanes 1 to 40, *A. baumannii*; lanes 41 to 45, *A. pittii*; lanes 46 to 48, *A. nosocomialis*; lanes 49 to 52, *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis*; lane 53, *A. radioresistens*; lane 54, *A. ursingii*; lane 55, *A. bereziniae*; lane 56, *A. soli*. International clones II (lanes 1 to 17) and I (lanes 18 to 20) showed unique patterns and can be distinguished from other *A. baumannii* clones (lanes 21 to 40) and other *Acinetobacter* species (lanes 41 to 56). The POT numbers of both *A. baumannii* ST49 (lane 30) and an *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* (lane 49) become 41, but these isolates can apparently be discriminated from each other by the ladder patterns of the upper 5 fragments from bp 321 to bp 553. ST, sequence type; CC, clonal complex. "N" in ST lines indicates a novel ST. The ladder used for the binary digitization of the genotype of each isolate is shown in the white box. The binary numbers corresponding to each band were 1 for 81 bp, 2 for 102 bp, 4 for 122 bp, 8 for 151 bp, 16 for 189 bp, 32 for 234 bp, and 64 for 271 bp, from the bottom of the ladder in the box. The remaining 5 bands from 321 bp to 553 bp were used for the identification of *Acinetobacter* spp.

5 candidates, and its specificity and sensitivity were 100% and 100%, respectively.

The ladder patterns of the PCR amplicons described above were clearly distinguishable by the 12-plex PCR established as the POT in the present study (Fig. 2). The same results were obtained by all four thermal cyclers we evaluated. To substantiate the 12-plex PCR, 44 *A. baumannii* strains used for SGI ORF screening were tested by both monoplex PCR and POT, and complete data agreement was observed between the two methods.

A total of 81 *A. baumannii* strains, which have been classified into 18 CCs by MLST, were analyzed by the POT method. International clones I and II were distinguished from other genetic lineages with more than two differences in the bands of their ladder patterns. According to the ladder patterns of seven ORFs, *A. baumannii* strains were classified into 17 POT types, 11 of which exhibited one-to-one correspondence to the CCs. Moreover, clinically isolated *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* can be classified into three to five POT types at present (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, we first showed that the newly established POT is capable of rapidly identifying *A. baumannii* international clones in ordinary clinical laboratories without performing nucleotide sequencing analyses of multiple genes as with MLST. To increase the feasibility of the test, the number of SGI ORFs adopted for POT was optimized. International clones I and II were fully distinguished by this method from other clones or lineages of *Acinetobacter* species. Moreover, the CCs of *A. baumannii* can be estimated by POT. The discriminatory power of POT can be con-

trolled by optimizing the number of ORFs and loci selected for analysis. Such a newly developed POT method that compares the distribution patterns of ORFs and/or SGIs in each clinical isolate may well promise to be an easy and rapid genotyping method for identifying bacterial genetic lineages and molecular epidemiology, which is feasible in ordinary clinical microbiology laboratories.

Indeed, several methods to identify international clones using PCR have been reported (10, 11). However, they cannot identify newly emerging multidrug-resistant epidemic clones that might spread in the future. In fact, multidrug-resistant isolates other than the *A. baumannii* international clones have been reported (12–18). The POT method constructed in the present study is applicable to the identification of new CCs of *A. baumannii* or *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex species, including *A. nosocomialis* and *A. pittii*, in the future.

Although SGIs were first reported from *Salmonella enterica* in 2001 by whole-genome analysis (6), little attention has been paid to them so far. Using genomic comparisons of *S. aureus* strains, we found that the distribution patterns of SGI ORFs correlate with the clonal complex in *S. aureus* (5). In the present study, it was also proven that the distribution patterns of ORFs in SGIs correlated well with the CCs in *A. baumannii*. This finding indicates that a very similar concept can be applicable even to various bacterial genera, and that close correlations between the distribution patterns of SGIs and CCs may be a general phenomenon in the microbial world. In fact, the CCs of *P. aeruginosa* were successfully predicted with a strategy and protocol similar to those of the POT constructed in the present study (M. Suzuki and Y. Inuma, unpublished data).

To obtain the genetic information of clinical isolates from antimicrobial resistance surveillance data, digitized numeric data provided by new genotyping methods, like the POT, contribute to easy and feasible genotyping. Since the POT is very simple and requires equipment only for PCR and agarose gel electrophoresis, this can become a routine performance method in many ordinary clinical microbiology laboratories in various countries and regions, including developing countries around the world. If many clinical microbiologists and researchers would employ the POT for genotyping of clinical isolates, they could report the genotype of each clinical isolate as a digitized numeric number, and this would make it very easy to quickly compare the genotypes of clinical isolates with those of other clinical isolates recovered in different continents or areas. Therefore, the POT would enable us to identify newly emerging genetic lineages in the very early stage of their outbreak. Present weak antimicrobial resistance surveillance and monitoring systems depending mainly on the antimicrobial resistance phenotypes of clinical isolates can be reinforced from the genetic viewpoint by using the POT instead of MLST.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tetsuya Yagi of Nagoya University, Jun Yatsuyanagi of the Akita Prefectural Research Center for Public Health and Environment, and Keigo Shibayama of the National Institute of Infectious Diseases, Japan, for their kind provision of clinical isolates.

This study was supported by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (grants H21-Shinko-Ippan-008, H24-Shinko-Ippan-010, and H25-Shinko-Ippan-003).

REFERENCES

- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18: pii=20380. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20380>.
- Kempf M, Rolain JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:105–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41:11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>.
- Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, Hata M, Matsumoto M, Takahashi M, Sakae K. 2006. Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. *J. Appl. Microbiol.* 101: 938–947. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02932.x>.
- Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Hayakawa Y, Minagawa H. 2009. Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. *J. Appl. Microbiol.* 107:1367–1374. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04321.x>.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MT, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connerton P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413:848–852. <http://dx.doi.org/10.1038/35101607>.
- La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44:827–832. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.3.827-832.2006>.
- Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, Parkhill J, Rajandream MA. 2008. Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* 24: 2672–2676. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn529>.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44:2974–2976. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01021-06>.
- Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 807–815. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x>.
- Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. 2013. Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of *bla*(OXA-51-like) genes. *J. Microbiol. Methods* 94:121–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.014>.
- Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, Merle JC, Poirel L. 2013. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill* 18:31. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20547>.
- Tena D, Martínez NM, Oteo J, Sáez D, Vindel A, Azañedo ML, Sánchez L, Espinosa A, Cobos J, Sánchez R, Otero I, Bisquert J. 2013. Outbreak of multidrug-resistant OXA-24- and OXA-51-producing *Acinetobacter baumannii* in an internal medicine ward. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:323–326. <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.323>.
- Ahmed-Bentley J, Chandran AU, Joffe AM, French D, Peirano G, Pitout JD. 2013. Gram-negative bacteria that produce carbapenemases causing death attributed to recent foreign hospitalization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3085–3091. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00297-13>.
- Kempf M, Rolain JM, Azza S, Diene S, Joly-Guillou ML, Dubourg G, Colson P, Papazian L, Richet H, Fournier PE, Ribeiro A, Raoult D. 2013. Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. *APMIS* 121:64–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02935.x>.
- Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, Massire C, Della-Latta P, Wu F, Jenkins SG. 2012. Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/electrospray-ionization mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72:14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.012>.
- Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1064–1067. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1706.091866>.
- Zhong Q, Xu W, Wu Y, Xu H. 2012. Clonal spread of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a teaching hospital in China. *Ann. Lab. Med.* 32:413–419. <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.6.413>.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4382–4390. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005>.

Novel Integron-Mediated Fosfomycin Resistance Gene *fosK*

Hiromitsu Kitanaka,^a Jun-ichi Wachino,^a Wanchun Jin,^a Satoru Yokoyama,^a Masa-aki Sasano,^b Mitsuhiro Hori,^b Keiko Yamada,^a Kouji Kimura,^a Yoshichika Arakawa^a

Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan^a; Clinical Microbiology Laboratory, Okazaki City Hospital, Okazaki, Japan^b

Fosfomycin (FOM) is an antibiotic produced by *Streptomyces fradiae* (1) and was approved for clinical use in Japan in 1980. FOM blocks MurA, which mediates bacterial peptidoglycan biosynthesis in its early step, showing a broad-spectrum antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. FOM penetrates into bacterial cells via sugar transporters, such as GlpT and UhpT, located at the cytoplasmic membrane, and spontaneous FOM-resistant mutants appear due to a reduction or lack of these transporters. Moreover, several enzymes, such as FosA, FosB, FosC, FosD, FomX, FomA, and FomB, have been reported, and FosA was first characterized as a glutathione S-transferase of FOM (2) (Fig. 1). After our first report about FosA3 and FosC2 in 2010 (3), FosA3-producing *Escherichia coli* isolates were recovered from humans, livestock, and/or pets (4–7), and the *fosA3* gene has already transferred to *Klebsiella pneu-*

moniae (6) by a probable IS26 composite transposon carrying *fosA3*.

Acinetobacter soli HK001 was isolated from a blood culture of an infected human, and it showed very high resistance to FOM (MIC, >8,000 µg/ml) according to the agar dilution method recommended by the CLSI (8) in the presence of glucose-6-phosphate (G6P) (25 µg/ml), which induces UhpT. Four amplicons of class 1 integrons were found by PCR using 2 primers, 5'CS-

Published ahead of print 19 May 2014

Address correspondence to Yoshichika Arakawa, yarakawa@med.nagoya-u.ac.jp.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.03131-14

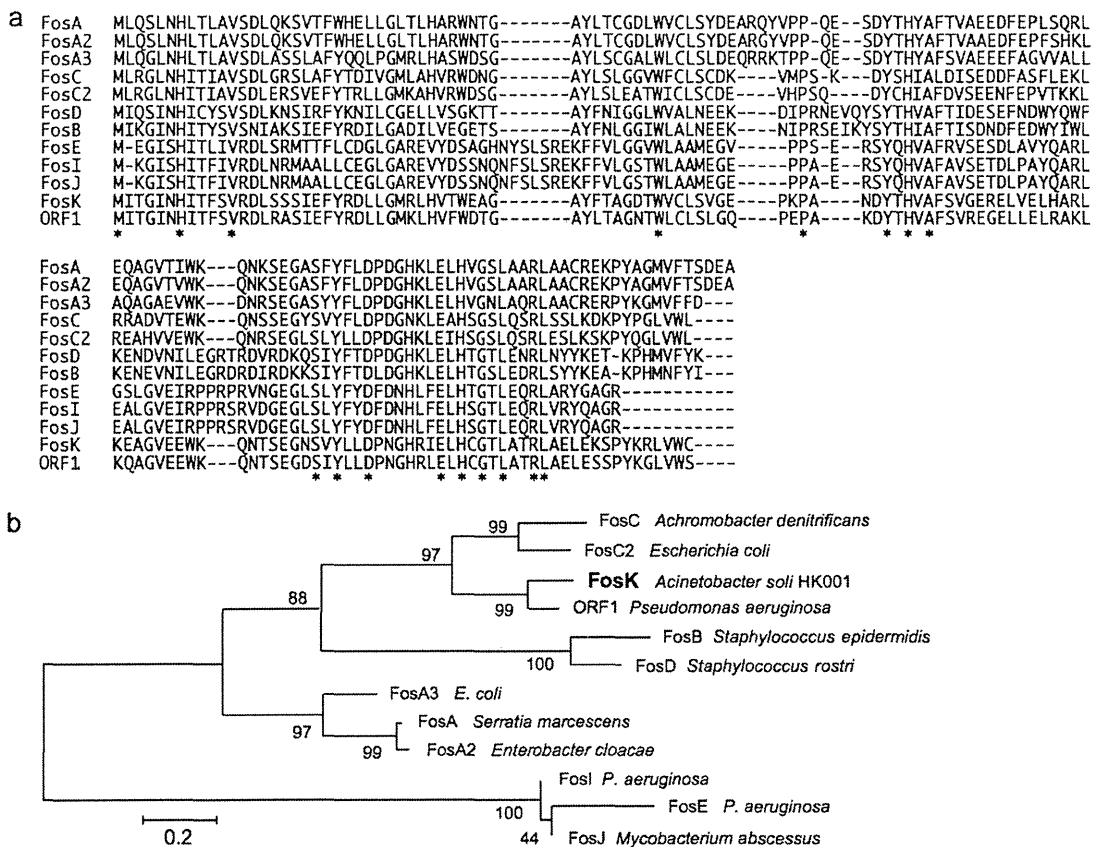


FIG 1 (a) Predicted amino acid sequences of FosK and other fosfomycin-modifying enzymes. *, amino acid residue conserved among the 12 fosfomycin resistance determinants. (b) Phylogenetic relationships among the 12 glutathione S-transferases, including probable ones calculated by MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>). GenBank or Protein Data Bank accession numbers are indicated for the following proteins: FosA (AAA98399), FosA2 (ACC85616), FosA3 (AB522970), FosB (CAA38136), FosC (AAZ14834), FosC2 (AB522969), FosD (AHB87392), FosE (BAO48025), FosI (BAO47999), FosJ (YP_006316014), FosK (AB917040), and ORF1 (AAP50248).

TABLE 1 MICs of fosfomycin for *A. soli* HK001 and *E. coli* DH10B transformed with the *fosK* gene

Strain	FOM MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a
<i>Acinetobacter soli</i> HK001	>8,192
<i>E. coli</i> DH10B	1
<i>E. coli</i> DH10B(pBCSK+)	2
<i>E. coli</i> DH10B(pBCSK+:: <i>fosK</i>)	>2,048
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2

^a FOM, fosfomycin. MICs were measured by the agar dilution method recommended by the CLSI.

Class1-integron (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3') and 3'-CS-Class1-integron (5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'). An amplicon of 1.2 kb was excised and purified. Its nucleotide sequence was directly determined and revealed an *aacA4* gene and a new gene cassette located between *intI1* and the 3'-CS (conserved sequence). The new cassette encoded a protein with significant similarity to other Fos proteins (Fig. 1) and was named FosK. The deduced amino acid sequence of FosK showed 81% identity in its amino acid sequence to open reading frame 1 (ORF1) of *Pseudomonas aeruginosa* (9). Moreover, 52%, 52%, 51%, 50%, 48%, and 47% amino acid identities were observed between FosK and FosC2, FosD, FosA3, FosA, FosA2, and FosC, respectively, suggesting their close phylogenetic relationship (Fig. 1). The *fosK* gene was again amplified by PCR using total bacterial DNA and a high-fidelity DNA polymerase, PrimeSTAR HS (TaKaRa Bio Inc., Ohtsu, Japan), together with primers F2-BamHI (5'-CGGGATCCCAGCATGGTTCAAACACGCCAGGC-3') and R2-HindIII (5'-TACCCAAGCTTGGGTTTTGGGGCGGACTTGTA GC-3'). The amplicon was ligated with pBCSK+ and cleaved by BamHI and HindIII, and *E. coli* DH10B was transformed with the recombinant plasmids. Then FOM-resistant transformants were selected. After nucleotide sequencing of the insert on both strands, a clone carrying no mutation in the *fosK* gene was finally chosen. The FOM MIC for the transformant harboring intact *fosK* was augmented to >2,048 $\mu\text{g/ml}$ from 1 $\mu\text{g/ml}$ for the recipient with G6P (25 $\mu\text{g/ml}$) (Table 1).

FOM was recently considered to be a potent agent for treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria, such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* (10). FOM has also been approved for veterinary use in various countries (11). The *fosK* gene, together with *aacA4*, is mediated by a class 1 integron, and thus this genetic element will be further transmitted into various *Enterobacteriaceae*. Since *fosK* confers on bacteria a very high level of resistance to fosfomycin, we should diligently monitor the prevalence and trend of *fosK* as well as of *fosA3* in both human and animals going forward.

Nucleotide sequence accession number. The *fosK* gene has been assigned accession number AB917040.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by grant no. H24-Shinko-Ippan-010.

REFERENCES

- Rogers TO, Birnbaum J. 1974. Biosynthesis of fosfomycin by *Streptomyces fradiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:121–132. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.5.2.121>.
- Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN. 1997. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry* 36:3050–3055. <http://dx.doi.org/10.1021/bi963172a>.
- Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. 2010. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3061–3064. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01834-09>.
- Hou J, Yang X, Zeng Z, Lv L, Yang T, Lin D, Liu JH. 2013. Detection of the plasmid-encoded fosfomycin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:766–770. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks465>.
- Pan YS, Yuan L, Zong ZY, Liu JH, Wang LF, Hu GZ. 2014. A multidrug-resistance region containing *bla*_{CTX-M-65}, *fosA3* and *rmtB* on conjugative IncFII plasmids in *Escherichia coli* ST117 isolates from chicken. *J. Med. Microbiol.* 63:485–488. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.070664-0>.
- Lee SY, Park YJ, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, Arakawa Y. 2012. Prevalence of acquired fosfomycin resistance among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding *fosA3*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2843–2847. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks319>.
- Sato N, Kawamura K, Nakane K, Wachino J, Arakawa Y. 2013. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb. Drug Resist.* 19:477–482. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2013.0061>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically. Approved standard, 8th ed. Document M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Konno T, Harata S, Suzuki N, Amano K. 2005. The ORF1 gene located on the class-1-integron-associated gene cassette actually represents a novel fosfomycin resistance determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2573. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.6.2573.2005>.
- Neuner EA, Sekeres J, Hall GS, van Duin D. 2012. Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5744–5748. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00402-12>.
- Soraci AL, Perez DS, Martinez G, Dieguez S, Tapia MO, Amanto F, Harkes R, Romano O. 2011. Disodium-fosfomycin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Res. Vet. Sci.* 90:498–502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.011>.

Characterization of Multidrug-Resistant Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility Forming Small Non-Beta-Hemolytic Colonies on Sheep Blood Agar Plates

Hirotsugu Banno,^a Kouji Kimura,^{a,b} Yosuke Tanaka,^c Hiromitsu Kitanaka,^a Wanchun Jin,^a Jun-ichi Wachino,^{a,b} Keiko Yamada,^a Keigo Shibayama,^b Yoshichika Arakawa^{a,b}

Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan^a; Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan^b; Department of Microbiology Laboratory, Yokohama City Seibu Hospital, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan^c

We isolated and characterized three multidrug-resistant clinical isolates of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) that formed small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates but grew well on chocolate agar plates. They can be overlooked in the bacterial identification step, leading to clinical misdiagnosis and treatment failure.

β-Lactams are the first-line antibiotics used for the prevention and treatment of group B *Streptococcus* (GBS) (*Streptococcus agalactiae*) infections because all GBS clinical isolates are considered to be susceptible to them (1, 2). However, GBS clinical isolates with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) have emerged through the acquisition of amino acid substitutions, including V405A and/or Q557E, in penicillin-binding protein 2X (PBP2X) (3). Similar PRGBS isolates were reported by several groups in Japan (4), the United States (5), and Canada (6, 7). Moreover, recent reports showed that PRGBS isolates tend to exhibit non-susceptibility to fluoroquinolones and resistance to macrolides (8, 9). Furthermore, the property of beta-hemolysis on blood agar plates is a very important differentiating characteristic for detecting GBS isolates in clinical bacteriology laboratory procedures. In the present study, we isolated and characterized three GBS clinical isolates that were initially suspected to be PRGBS, although they formed unusual small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates.

The three isolates characterized in this investigation were recovered from two patients in one hospital in 2011. The first patient was an 88-year-old man who was admitted to the hospital twice in 2010. However, GBS was not isolated while he was hospitalized. In January 2011, two GBS isolates, MRY11-004 and MRY11-005, were recovered from his blood and sputum, respectively. The second patient was an 83-year-old man. He was admitted to the hospital in October 2011, and NUBL-2449 was isolated from his sputum in November 2011 (Table 1).

The three clinical isolates were initially isolated during routine microbiology testing in the hospital. In this hospital, a sheep blood agar plate (Nissui) and a chocolate II agar plate (BD) were used in routine laboratory procedures. Since these isolates grew well on the chocolate II agar plate, they were initially recovered from that plate. After transport to our laboratory, these isolates were confirmed as GBS by using the API 32 Strep system (bioMérieux), a streptococcal grouping kit (Kanto Chemistry), and nucleotide sequences of 16S rRNA genes (10). However, they also formed small non-beta-hemolytic colonies on the sheep blood agar plate (Fig. 1; see also Fig. S1 in the supplemental material). These GBS isolates were suspected as PRGBS because of indications of their penicillin-nonsusceptible properties (MICs, 0.5 μg/ml) and slightly elevated MICs of cephalosporins (≥4 μg/ml for cefotiam, 1 μg/ml for cefotaxime, 1 μg/ml for cefepime, 0.5 to 1 μg/ml for ceftriax-

one, >1 μg/ml for cefixime, and 0.25 to 0.5 μg/ml for ceftidoren) as measured using the MicroScan (Siemens) MicroFAST 5J panel. Therefore, in our laboratory, we measured the MICs for these isolates by applying the agar dilution method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute, and all of the isolates showed reduced susceptibilities to penicillin G (MIC, 0.25 μg/ml), ceftizoxime (MIC, 4 μg/ml), oxacillin (MIC, 4 μg/ml), and ceftibuten (MIC, >256 μg/ml) and resistance to erythromycin (MIC, >128 μg/ml), clindamycin (MIC, >128 μg/ml), and levofloxacin (MIC, 128 μg/ml) (Table 1). Moreover, these isolates harbored five amino acid substitutions in PBP2X, including V405A, which is frequently observed in PRGBS (3). In addition, these isolates harbored several amino acid substitutions in the quinolone resistance-determining regions of GyrA, GyrB, and ParC, which were reported to be responsible for fluoroquinolone resistance in GBS (8, 11). Furthermore, an *erm*(B) gene, which confers resistance to macrolides and lincosamides (12, 13), was detected by PCR (see Table S1 in the supplemental material). Therefore, these isolates were characterized as multidrug-resistant PRGBS. Moreover, these isolates showed identical pulsotypes based on the pulsed-field gel electrophoresis results (see Fig. S2 in the supplemental material) and identical sequence types (ST1) based on multilocus sequence typing, which suggest that these isolates have similar genetic backgrounds.

We characterized the phenotypic and genetic aspects of the three isolates, and they were ultimately confirmed as multidrug-resistant PRGBS isolates, although they formed small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. To date, clinical PRGBS isolates with these phenotypes have not been reported. Therefore, this is the first report describing the emergence of mul-

Received 20 January 2014 Returned for modification 27 January 2014

Accepted 6 March 2014

Published ahead of print 12 March 2014

Editor: P. H. Gilligan

Address correspondence to Kouji Kimura, koujikim@med.nagoya-u.ac.jp.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00226-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00226-14

TABLE 1 Origins and MICs of a reference strain and three clinical isolates

Strain or clinical isolate	Patient age (yr) ^a	Specimen	Sequence type	Date of isolation (mo/yr)	Serotype	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of ^b :									
						PEN	AMP	OXA	CTX	CTB	ZOX	MEM	ERY	CLI	LVX
2603V/R			110		V	0.03	0.06	0.25	≤ 0.03	16	0.25	0.03	0.12	0.12	1
MRY11-004	88	Blood	1	1/2011	VIII	0.25	0.25	4	0.5	>256	32	0.12	>128	>128	128
MRY11-005	88	Sputum	1	1/2011	VIII	0.25	0.25	4	0.5	>256	32	0.12	>128	>128	128
NUBL-2449	83	Sputum	1	11/2011	VIII	0.25	0.25	4	0.5	>256	32	0.12	>128	>128	128

^a The two patients were male.

^b PEN, penicillin G; AMP, ampicillin; OXA, oxacillin; CTX, cefotaxime; CTB, ceftibuten; ZOX, ceftizoxime; MEM, meropenem; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; LVX, levofloxacin.

tidrug-resistant PRGBS isolates forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. Although supplementation with hemin, menadione, or thymidine did not cause reversal of the formation of small colonies to normal-sized colonies, we cannot reject the possibility that these isolates are small-colony variants because specific substances that can restore these isolates to their wild-type phenotype may be identified in the future (see Supplemental Text S1 in the supplemental material). We will elucidate whether it is appropriate to call these isolates "small-colony variants" in a future study.

The three isolates showed weak beta-hemolytic activity in the high-cell-density area on the sheep blood agar plates. Therefore, we performed a nucleotide sequencing analysis of genes related to hemolytic activity (see Supplemental Text S2 in the supplemental material) in these isolates. The results showed that they harbored a deletion in the deduced amino acid of CylK through positions 127 to 191. A previous study showed that the ΔCylK mutant of GBS showed less beta-hemolytic activity than the wild type (14, 15). Although CylK is a GBS-specific protein with unknown functions, it is thought to be essential for the full expression of beta-hemolytic activity of GBS isolates (14). Therefore, the deletion of CylK in the three isolates might be a major cause for the non-beta-hemolytic activity observed around the bacterial colonies.

Although these isolates formed only small colonies on sheep blood agar plates, considering that one of the isolates, MRY11-004, was recovered from blood, these isolates may have some virulence in humans and may cause severe diseases. Indeed, an event of probable nosocomial spread of multidrug-resistant PRGBS isolates has been previously reported (8). However, the possibility of

direct contact between the two inpatients from whom the PRGBS isolates were recovered was low because they were admitted to different wards of the hospital. Nonetheless, the possibility of nosocomial spread of these isolates cannot be completely denied. These isolates showed a multidrug resistance profile, suggesting a more limited option in antimicrobial prescription in case of infections due to these PRGBS isolates. Moreover, these multidrug-resistant PRGBS isolates forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates may cause problems in bacterial isolation and identification. Therefore, the existence of such unique isolates can be overlooked during the bacterial identification step in routine clinical microbiology tests, which may cause clinical misdiagnosis and treatment failure.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all of the members of the Arakawa laboratory for technical advice and discussions.

This work was supported by grants H21-Shinkou-Ippan-008 and H24-Shinkou-Ippan-010 from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and, in part, by a research grant for medical science from the Takeda Science Foundation (2012) and a grant from the Association for Research on Lactic Acid Bacteria.

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. 2002. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm. Rep.* 51:1–22.
- Schuchat A. 1999. Group B *streptococcus*. *Lancet* 353:51–56. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07128-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07128-1).
- Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. 2008. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2890–2897. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00185-08>.
- Nagano N, Nagano Y, Kimura K, Tamai K, Yanagisawa H, Arakawa Y. 2008. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4258–4267. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00596-08>.
- Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, Gertz RE, Jr, Schrag S, Nizet V, Beall BW. 2008. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2915–2918. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00461-08>.
- Gaudreau C, Lecours R, Ismail J, Gagnon S, Jette L, Roger M. 2010. Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:594–595. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp458>.
- Longtin J, Vermeiren C, Shahinas D, Tamber GS, McGeer A, Low DE, Katz K, Pillai DR. 2011. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2983–2985. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01243-10>.

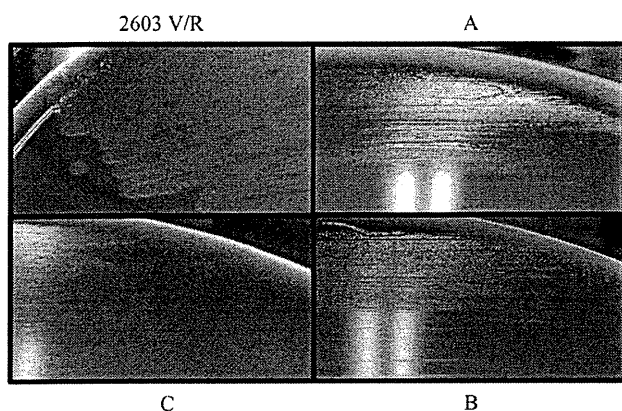


FIG 1 Enlarged colonies of strain 2603V/R and the three clinical isolates, MRY11-004 (A), MRY11-005 (B), and NUBL-2449 (C).

8. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y. 2012. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex I. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:849–856. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr546>.
9. Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Suzuki S, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y. 2013. High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:539–542. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks423>.
10. Sasaki T, Nishiyama T, Shintani M, Kenri T. 1997. Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51:242–247.
11. Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, Itoh Y, Ezaki T. 2003. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3605–3609. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.11.3605-3609.2003>.
12. Marimon JM, Valiente A, Ercibengoa M, Garcia-Arenzana JM, Perez-Trallero E. 2005. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:5069–5074. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.12.5069-5074.2005>.
13. Gygax SE, Schuyler JA, Kimmel LE, Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. 2006. Erythromycin and clindamycin resistance in group B streptococcal clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1875–1877. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.5.1875-1877.2006>.
14. Forquin MP, Tazi A, Rosa-Fraile M, Poyart C, Trieu-Cuot P, Dramsi S. 2007. The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the group B *Streptococcus* (GBS)-specific gene *cylK* modulate hemolysin production and virulence of GBS. *Infect. Immun.* 75:2063–2066. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01565-06>.
15. Gottschalk B, Bröker G, Kuhn M, Aymanns S, Gleich-Theurer U, Spellerberg B. 2006. Transport of multidrug resistance substrates by the *Streptococcus agalactiae* hemolysin transporter. *J. Bacteriol.* 188:5984–5992. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00768-05>.

多剤耐性緑膿菌の検出におけるクロモアガー MDRP スクリーン培地の基礎検討

松浦 香里¹⁾ 馬場 尚志¹⁾²⁾ 麻生 都¹⁾ 森田 恵美¹⁾
 金谷 和美¹⁾ 河村 佳江¹⁾ 飯沼 由嗣¹⁾²⁾

1) 金沢医科大学病院中央臨床検査部 (〒 920-0293 石川県河北郡内灘町大学 1-1)

2) 金沢医科大学臨床感染症学

要 旨

多剤耐性緑膿菌は、病院感染対策上最も重要な病原体の1つであり、確実な感染対策を行うためにも、迅速かつ効果的なスクリーニング法が求められている。今回我々は、臨床分離株のうち imipenem, ciprofloxacin, amikacin のいずれか1つ以上に耐性を示した緑膿菌 31 株と、同様の耐性を持つ他のグラム陰性桿菌 30 株を用い、クロモアガー MDRP スクリーン培地 (MDRP 培地) の有用性に関する基礎的検討を行った。結果は、緑膿菌では多剤耐性菌以外の株でも一部に発育が見られたものの、多剤耐性緑膿菌 8 株全てで青緑色のコロニー形成を認めた。一方、他の菌種は高度耐性株を含め多くの株で発育が抑制され、発育を認めた場合でもコロニーの色調から容易に緑膿菌との違いが判別できた。この結果から、最終的な判定には薬剤感受性検査の実施が不可欠であるものの、MDRP 培地が多剤耐性緑膿菌のスクリーニング培地として高い有用性を持つ可能性が示唆された。

キーワード

多剤耐性緑膿菌、クロモアガー MDRP スクリーン培地

多剤耐性緑膿菌は、imipenem (IPM) などのカルバペネム系薬、ciprofloxacin (CPFX) などのフルオロキノロン系薬、amikacin (AMK) などのアミノグリコシド系薬の3系統全てに耐性を示す緑膿菌である。多剤耐性緑膿菌は本邦で使用可能な抗菌薬のほとんどが無効であり、その感染症は極めて難治性であるため、病院感染対策上最も重要な病原体の1つとなっている。感染症法でも、MIC 値が IPM 16 µg/ml 以上、CPFX 4 µg/ml 以上、AMK 32 µg/ml 以上の全てを満たす緑膿菌による感染症を、薬剤耐性緑膿菌感染症と定義し5類定点報告疾患とするなど、その分離動向が注目されている¹⁾。

本邦における現状について、2012年の厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門のデータでは、多剤耐性緑膿菌は緑膿菌全体の約2%程度を占めている²⁾。また、多剤耐性緑膿菌分離患者の培養検体

提出全患者に占める割合は、サーベイランス参加施設全体では平均0.14%であるものの、7.45%と高率に分離されている施設も見られる²⁾。さらに、サーベイランス参加施設の53.2%で少なくとも1株以上分離されているなど²⁾、決して稀な薬剤耐性菌ではない。

本邦でもこれまでに多くの多剤耐性緑膿菌の施設内アウトブレイクが報告されている³⁻⁶⁾。緑膿菌は湿潤環境など広く医療環境に定着しうるため、多剤耐性緑膿菌が一旦施設内で蔓延するとその終息には多くの労力および長い期間を要する。それを防止するためには、より早期に検出し厳重な感染対策を実施することが必要であり、効率的なスクリーニング法の開発が期待されている。

クロモアガー MDRP スクリーン培地 (以下、MDRP 培地) は、多剤耐性緑膿菌の検出を目的として、関東化学株式会社が酵素基質培地であるクロモアガー

(平成 25 年 9 月 9 日受付・平成 25 年 10 月 7 日受理)

培地に AMK, CPFEX, cefepime を加え開発した培地である。今回我々は、MDRP 培地の多剤耐性緑膿菌スクリーニングにおける有用性について基礎的検討を行った。

I 対象および方法

1. 使用菌株

各種検体からの臨床分離株のうち、IPM の MIC 16 $\mu\text{g/ml}$ 以上、CPFEX の MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上、AMK の MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ 以上のいずれか 1 つ以上を示した *Pseudomonas aeruginosa* 31 株と、比較対象として同様の耐性を持つグラム陰性桿菌 10 菌種 30 株 (*Pseudomonas putida* 2 株, *Stenotrophomonas maltophilia* 9 株, *Achromobacter xylosoxidans* 6 株, *Elizabethkingia meningoseptica* 2 株, *Chryseobacterium indologenes* 1 株, *Escherichia coli* 3 株, *Klebsiella pneumoniae* 3 株, *Klebsiella oxytoca* 2 株, *Enterobacter cloacae* 1 株, *Providencia rettgeri* 1 株) を使用し検討を行った。対象菌株を選定する際の MIC 値は、マイクロスキヤン WalkAway 96 Plus (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス) を使用し、微量液体希釈法にて測定した。また、薬剤感受性試験の標準菌株は、*P. aeruginosa* ATCC 27853 株を使用した。

2. 検討方法

ポアメディア羊血液寒天培地 (栄研化学) にて一夜培養したそれぞれの菌株を McFarland No. 0.5 ($1-9 \times 10^8$ CFU/ml) に調整し、さらに滅菌生食水で 10 倍希釈して $1-9 \times 10^7$ CFU/ml の菌液を調製した。調整した菌液を、MDRP 培地 (関東化学) に 10 μl の定量白金耳 1 白金耳分塗布し、37°C で 24 時間および 48 時間培養した後に形成されたコロニーの性状及び色調を確認した。

得られた結果について、MIC 値が IPM 16 $\mu\text{g/ml}$ 以上、CPFEX 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上、AMK 32 $\mu\text{g/ml}$ 以上の全てを満たす緑膿菌を多剤耐性株と定義し、多剤耐性緑膿菌検出における感度および特異度を算出した。再現性を確認するため、実験は異なる日に 3 回行った。

接種菌量が少ない場合における多剤耐性緑膿菌の検出感度を検討するために、上記と同様に調製した菌液を、滅菌生食水によりさらに 10 倍希釈を繰り返して、 $1-9 \times 10^3$ CFU/ml から $1-9 \times 10^5$ CFU/ml の菌液

に相当する 4 段階希釈系列を作成した。これらを MDRP 培地に 10 μl の定量白金耳 1 白金耳分塗布し (接種菌量は $1-9 \times 10^0$ から $1-9 \times 10^3$ CFU/ml に相当)、37°C で 24 時間および 48 時間培養し、形成されたコロニー数を確認した。

II 結果

1. 多剤耐性緑膿菌の検出

対象となった緑膿菌 31 株は、多剤耐性株が 8 株、2 剤耐性菌が 14 株 (IPM・CPFEX 耐性 13 株, AMK・CPFEX 耐性 1 株)、1 剤耐性菌が 9 株 (IPM 耐性 6 株, CPFEX 耐性 3 株) であった。

多剤耐性緑膿菌は、8 株全てが MDRP 培地上に青緑色のコロニー形成を認め、周囲の培地の青変も見られた (図 1)。一方、多剤耐性株以外の 23 株では、13 株 (56.5%) は発育を認めなかったが、IPM と CPFEX の 2 剤耐性 9 株と CPFEX 単独耐性 1 株の計 10 株において多剤耐性株と同様の青緑色コロニーの形成が見られた (表 1)。また、コロニーの大きさや数も多剤耐性株と明らかな差は見られなかった。この 10 株はいずれも AMK 感性であったが、MIC 値は 8 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、4 $\mu\text{g/ml}$ 以下の株で発育したものは無かった (図 2)。再現性を確認するため、3 回実験を繰り返したが、いずれも同じ結果となった。

2. 他菌種に対する発育抑制

緑膿菌以外のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 20 株および腸内細菌科 10 株の計 30 株においては、IPM・AMK・CPFEX 3 剤全てに耐性を持つ 8 株 (*S. maltophilia* 7 株, *E. meningoseptica* 1 株) を含む 22 株 (73.3%) では発育を認めなかった。一方、*P. putida* 2 株 (IPM・CPFEX 耐性)、*A. xylosoxidans* 4 株 (3 剤耐性 1 株, AMK・CPFEX 耐性 3 株)、*K. pneumoniae* 1 株 (AMK・CPFEX 耐性)、*K. oxytoca* 1 株 (CPFEX 耐性) の計 8 株でコロニーの形成が認められた (表 2)。しかし、このうち 4 株 (*A. xylosoxidans* 3 株および *K. oxytoca* 1 株) は発育が遅く、24 時間培養ではコロニーが確認できなかった。また、コロニーの性状についても、*P. putida* は淡青色、*A. xylosoxidans* は白色、*K. pneumoniae* は白青色、*Klebsiella oxytoca* は淡紫色と、緑膿菌とは明らかに異なる色調を呈した (図 1)。再現性を確認するため、3 回実験を繰り返した

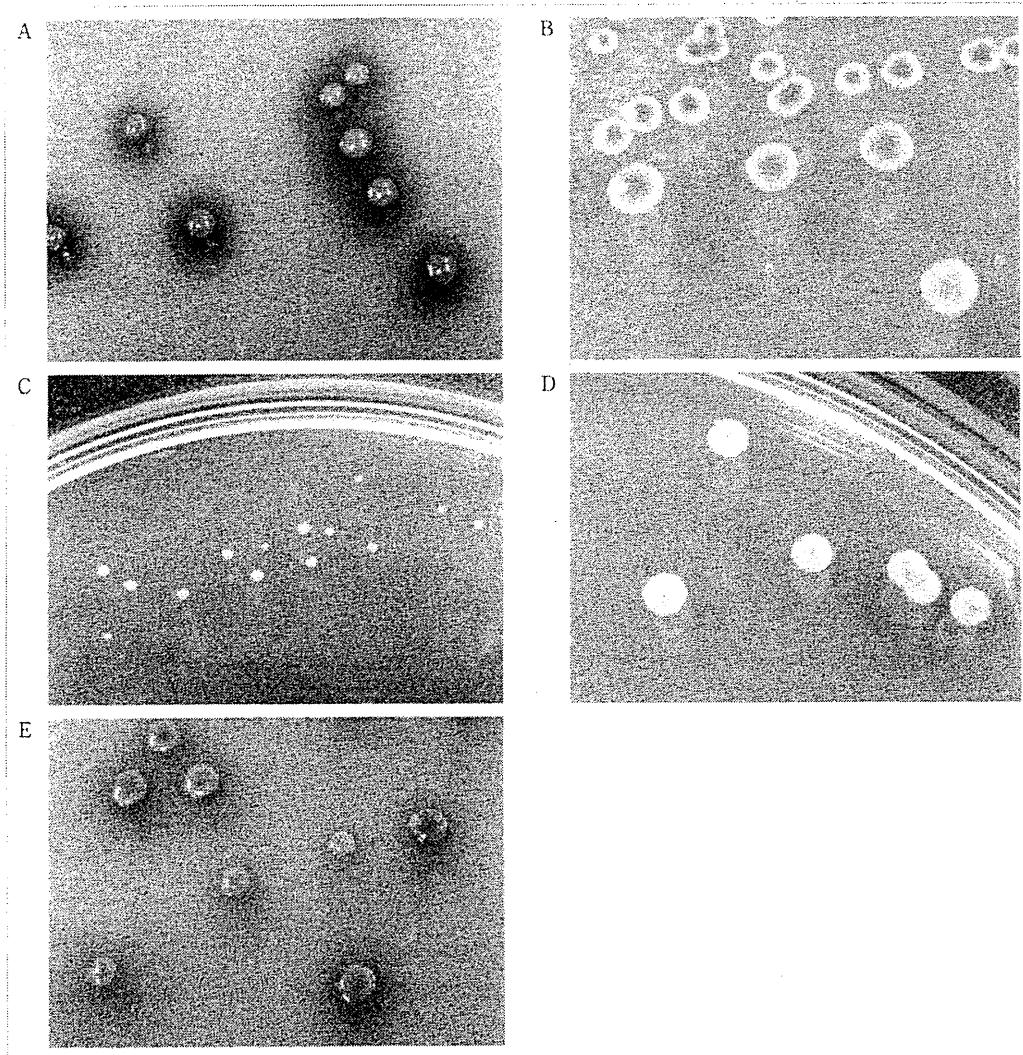


図1 各菌種のコロニー性状

A : *Pseudomonas aeruginosa*, B : *Pseudomonas putida*, C : *Achromobacter xylosoxidans*, D : *Klebsiella pneumoniae*, E : *Klebsiella oxytoca*.

表1 緑膿菌の発育状況

耐性パターン	株数	発育あり	発育なし
多剤耐性	8	8	0
2剤耐性	IPM・CPFX耐性	9	4
	AMK・CPFX耐性	0	1
1剤耐性	IPM耐性	0	6
	CPFX耐性	1	2
計	31	18	13

IPM : imipenem, CPFX : ciprofloxacin, AMK : amikacin.

が、いずれも同じ結果となった。

3. 多剤耐性緑膿菌検出における感度および特異度

検討した多剤耐性緑膿菌8株は、全てMDRP培地で発育した。また、菌量が少ない場合でも、多剤耐

性緑膿菌8株では接種菌量にほぼ相当するコロニー数が得られ、感度は維持されていた(表3)。一方、多剤耐性緑膿菌を除いた53株のうち非多剤耐性緑膿菌10株において、コロニーの性状からでは多剤耐性緑膿菌と判別不可能な菌の発育を認めた。この10株を偽陽性とする、多剤耐性緑膿菌検出における感度は100% (8株/8株)、特異度は81.1% (43株/53株)となった。

III 考察

多剤耐性緑膿菌に対し確実な感染対策を実施するには、同菌のより迅速かつ確実な検出が重要となる。

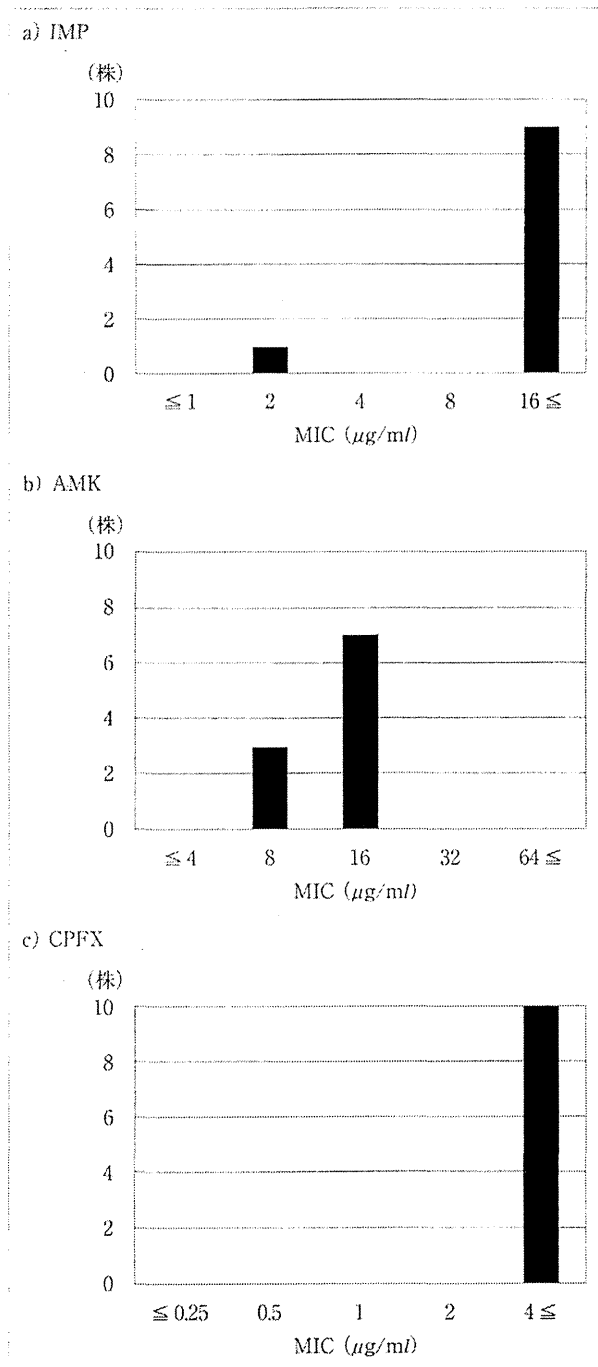


図2 発育を認めた非多剤耐性緑膿菌 10 株における MIC 値分布
 IMP : imipenem, AMK : amikacin, CPFAX : ciprofloxacin.

しかし、通常の検査法では、分離培養に加え、菌種同定および薬剤感受性試験の実施が必要であり、検体提出から報告まで3日以上要することが多い。また、複数の株の緑膿菌が定着している場合に通常の分離培地を用いると、薬剤耐性株が釣菌から漏れてしまう可能性もある。さらに、アウトブレイク発生

表2 他菌種の発育状況

菌種	IPM, CPFAX, AMK に対する耐性	株数	発育あり
<i>Pseudomonas putida</i>	3 剤耐性	0	0
	2 剤耐性	2	2 ^{a)}
	1 剤耐性	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3 剤耐性	7	0
	2 剤耐性	1	0
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1 剤耐性	1	0
	3 剤耐性	1	1 ^{b)}
	2 剤耐性	5	3 ^{c)}
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1 剤耐性	0	0
	2 剤耐性	1	0
	3 剤耐性	1	0
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1 剤耐性	0	0
	2 剤耐性	1	0
	3 剤耐性	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1 剤耐性	3	0
	2 剤耐性	0	0
	3 剤耐性	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 剤耐性	2	0
	2 剤耐性	1	1 ^{d)}
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 剤耐性	2	1 ^{e)}
	2 剤耐性	0	0
	3 剤耐性	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 剤耐性	1	0
	2 剤耐性	0	0
	3 剤耐性	0	0
<i>Providencia rettgeri</i>	1 剤耐性	0	0
	2 剤耐性	1	0
計		30	8

IPM : imipenem, CPFAX : ciprofloxacin, AMK : amikacin.
 a) IPM・CPFAX 耐性, b) 48 時間培養で発育, c) 全て AMK・CPFAX 耐性, 2 株は 48 時間培養で発育, d) AMK・CPFAX 耐性, e) CPFAX 耐性, 48 時間培養で発育.

時などには、患者スクリーニングや環境培養など一度に多くの検体を処理することが必要となることも想定され、簡便かつ効率の良いスクリーニング法への期待は高い。

今回の検討では、クロモアガー MDRP スクリーン培地を用いることにより、多剤耐性緑膿菌 8 株全てで発育が認められ検出可能であった。また、接種菌量を少なくしても検出感度は維持されており、多剤耐性緑膿菌の分離培地として十分な性能を持っていると考えられた。さらに、多剤耐性株でも緑膿菌以外の菌では、30 株中 22 株で発育抑制されたほか、コロニー形成を認めた場合でもその性状や色調により容易に緑膿菌との違いが判別できるなど、選択培

表3 少ない接種菌量での多剤耐性緑膿菌の検出

菌株 (多剤耐性緑膿菌)	培地上に発育したコロニー数 (CFU)			
	>500	85	2	1
A	>500	85	2	1
B	>500	102	4	1
C	252	23	3	2
D	>500	101	15	4
E	>500	115	8	1
F	>500	92	6	2
G	>500	96	8	1
H	>500	155	12	1
相当する接種菌量 (CFU)	$1-9 \times 10^3$	$1-9 \times 10^2$	$1-9 \times 10^1$	$1-9 \times 10^0$

地としての高い性能も示唆された。一方、1剤もしくは2剤耐性の緑膿菌23株では、IPMとCPFXの2剤耐性株の69.2% (9株/13株)で発育が見られるなど、10株 (43.5%)において多剤耐性株と判別不可能なコロニーの形成が認められた。この結果から、AMK耐性に関する選択性がやや低いことが示唆されたが、発育した株のAMKのMIC値はいずれも8 µg/ml以上であった。既に耐性化傾向が見られるこれらの緑膿菌は、抗菌薬投与により容易に耐性化するほか、2剤耐性緑膿菌を含め接触予防策の対象としている医療施設も多く、感染対策上注意を払うべき対象であり、その分離には一定の意義があると考えられた。

今回の検討では、MDRP培地の多剤耐性緑膿菌検出における感度および特異度は、それぞれ100% (8株/8株)、81.1% (43株/53株)であった。多剤耐性緑膿菌検出を目的としたスクリーニング培地に関する既存の報告は少ないが、横山らはCHROMager培地をベースに各種抗菌薬を添加することにより、感度80.9%、特異度96.7%の成績を得たと報告している⁷⁾。検討に用いた菌株が異なり単純には比較できないが、今回の検討の中でMDRP培地は、特異度が劣るものの感度の点で優れる結果となった。一般にスクリーニング検査では、対象を感度良く検出することが最も重要な要件となるため、MDRP培地は、最終的な判定には薬剤感受性検査の実施が不可欠であるものの、多剤耐性緑膿菌用スクリーニング培地として高い有用性を持つことが示唆された。

一方、今回の検討では臨床分離株ではあるものの、一旦保存したものを菌液調整し培地に接種している。実際のスクリーニング培養では、喀痰など臨床検体を直接塗布するほか、複数の菌が存在する症例にも

しばしば遭遇する。よって、真の臨床的有用性を確認するためには、今後さらに種々の臨床検体を用いた検討を追加する必要があると考えられる。

IV 結 語

クロモアガーMDRPスクリーン培地について、多剤耐性緑膿菌検出に関する基礎的検討を行った結果、最終的な判定には薬剤感受性検査の実施が不可欠であるものの、本培地がスクリーニング培地として高い有用性を持つ可能性が示唆された。今後は、さらに種々の臨床検体を用いた検討を追加し、本培地の臨床的有用性を確認することが必要である。

本論文の要旨は、第62回日本医学検査学会 (2013年5月、高松)において報告した。

■文献

- 1) 厚生労働省ホームページ. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-42-01.html>
- 2) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業ホームページ. http://www.nih-janis.jp/report/open_report/2012/3/1/ken_Open_Report_201200.pdf
- 3) Nagao M *et al.* : Control of an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a haemato-oncology unit, *J Hosp Infect* 2011; 79: 49-53.
- 4) Tsutsui A *et al.* : Genotypes and infection sites in an outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *J Hosp Infect* 2011; 78: 317-322.
- 5) Kouda S *et al.* : Sporadic isolations of a multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone during a 14-month epidemic in a general hospital in Hiroshima, *Infection* 2011; 39: 247-253.
- 6) Sekiguchi J *et al.* : Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital, *J Infect Chemother* 2007; 13: 418-422.
- 7) 横山 覚, 他: 多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価, *日臨徴誌* 2012; 22: 126-134.

Fundamental assessment of the CHROMagar™ MDRP medium in the screening of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Kaori MATSUURA¹⁾ Hisashi BABA¹⁾²⁾ Miyako ASOU¹⁾ Emi MORITA¹⁾
Kazumi KANAYA¹⁾ Kae KAWAMURA¹⁾ Yoshitsugu IINUMA¹⁾²⁾

1) Center of Laboratory Medicine, Kanazawa Medical University Hospital (1-1, Daigaku, Uchinada-machi, Kahokugun, Ishikawa 920-0293, Japan)

2) Department of Infectious Diseases, Kanazawa Medical University

Summary

Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) is one of the most important pathogens in hospital infection control. Rapid and efficient methods of detecting MDRP are needed because early recognition of MDRP colonization/infection is important in the prevention of MDRP nosocomial spread. We evaluated the fundamental performance of CHROMagar™ MDRP medium, a novel chromogenic agar medium, in the detection of MDRP. We cultured 31 *P. aeruginosa* and 30 other Gram-negative bacilli that were resistant to one or more of the following antibiotics on CHROMagar™ MDRP medium: imipenem, ciprofloxacin and amikacin. As a result, all 8 isolates of MDRP were observed as blue-green colonies on the medium, although some of the non-MDRP *P. aeruginosa* isolates also grew. Among the bacteria other than *P. aeruginosa*, 8 of 30 strains were recovered. The observed colonies were easily distinguished from that of *P. aeruginosa* by the difference of color. Thus, our data suggest that CHROMagar™ MDRP medium could be highly useful as a screening tool for detecting MDRP although antimicrobial susceptibility testing is necessary for confirmation.

Key words: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, CHROMagar™, MDRP medium

(Received: September 9, 2013; Accepted: October 7, 2013)

講 座

医療関連感染と制御²

医療関連感染で問題となる病原微生物・感染性因子の制御
(1) 細菌

飯沼 由嗣

ISSN 2187-431X

日本防菌防黴学会誌

JOURNAL OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

講座

医療関連感染と制御 2

医療関連感染で問題となる病原微生物・感染性因子の制御
(1) 細菌

飯沼 由嗣

1. 医療関連感染で問題となる病原微生物の特徴^{1,2)}

医療環境にはさまざまな病原体が存在し、医療関連感染の原因となる。これらの菌の多くは入院患者をルーツとする。医療関連感染は、抗菌薬に耐性をしめす薬剤耐性菌の頻度が高いが、これは医療施設内で使用される抗菌薬がその重要な要因となる。当初感受性菌であってもある抗菌薬 (A) を使用することにより耐性のクローンが体内で増殖し、これが職員を介してあるいは環境汚染からの伝播により、他の入院患者に伝播する (図1)。伝播した菌はもともとその抗菌薬に無効のため、治療として別の抗菌薬 (B) を選択することになるが、さらにそれにも耐性の耐性クローン (薬剤 A, B 耐性菌) が体内で増殖し、次の患者に伝播する。次の患者は、また異なる抗菌薬 (C) を用いるが、結果的にこれも効かない耐性菌 (A, B, C 耐性 = 多剤耐性菌) が増殖した場合

には、治療手段がきわめて限られることになる。このように、複数の系統 (通常3系統以上) の抗菌薬に対して耐性化した菌を、多剤耐性菌 (Multi-drug resistant organisms, MDRO) と呼び、医療関連感染において最も警戒すべき病原体として認識されている。多剤耐性菌は、治療手段も限られ、治療困難な感染症を引き起こす。治療が困難あるいは時間がかかるため、その間菌が患者より持続的に排出され、別の患者への伝播のリスクが高まる。医療関連感染でアウトブレイクを起こすのは、通常このような多剤耐性菌である。

環境中には無数の薬剤耐性菌が存在するが、それらが全て感染症に起炎菌となるわけではなく、むしろ限られた菌のみが感染症の起炎菌となる。感染伝播を容易とする特性として、ヒトの常在菌として定着し、感染症を引き起こす病原性を有することが重要である。常在菌として定着できる特性を持った菌は、感染症の原因菌となり

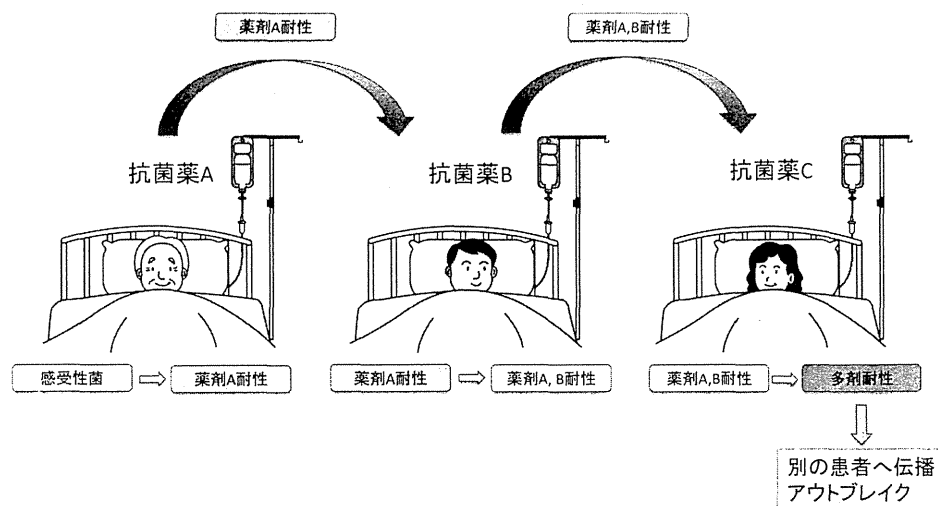


図1. 薬剤耐性菌の多剤耐性化

- ・ 抗菌薬への曝露と伝播を繰り返し、次第に薬剤耐性度が高まる
- ・ 多剤耐性菌は院内伝播が起こりやすく、治療手段が限定されるため予後も悪くなる

やすくなる。たとえば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) は、皮膚常在菌として定着し、また薬剤耐性腸内細菌 (大腸菌、クレブシエラ、腸球菌など) は、大腸常在菌として定着し、それぞれ院内感染症の原因菌となる。緑膿菌やアシネトバクターなどのいわゆるブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌とよばれる菌やセラチアは、元来低病原性であるが、特に免疫力の低下した入院患者に感染伝播し、感染症を引き起こす。これらの菌は、ヒトの常在菌ではなく、基礎疾患などのリスクがない場合にはヒトに感染症を起こすことはないが、重篤な基礎疾患、重度の免疫不全や広域抗菌薬の長期使用、医療上必要なさまざまな人工物 (血管内留置カテーテル、尿道留置カテーテル、ドレナージチューブ、気道チューブなど) が挿入されている場合などに、ヒトに定着し感染症を引き起こす。これらの環境菌はほとんどが元来薬剤耐性菌であり、また抗菌薬に対する耐性化も容易に起こる。

薬剤耐性菌や環境菌は、医療関連感染の主要な病原体である。この一方で、通常入院患者や病院環境には存在しないが、病院外部より持ち込まれて医療関連感染を引き起こす病原体がある (インフルエンザウイルス、ノロウイルスなど)。これらの病原体は、市中での感染を引き起こす病原体であり、健常人にも感染を発生させることのできる強毒菌 (病原体) である。市中で感染し入院し、不適切な感染対策実施状況下で院内での感染伝播が発生する場合と医療職員などが市中で感染し、施設内に持ち込む場合がある。健常人である医療職員が感染した場合には症状が軽く、免疫力の低下した入院患者に感染発病して初めて発見される場合もある。

2. 医療関連感染に関連する病原体の感染伝播経路^{2, 3)}

医療関連感染を含む感染症の発生のためには、感染症を引き起こす病原体の存在と感染ルート、さらには宿主が感染症に感受性である (感染防御可能な免疫を保持していない) ことが必要である (図2)。医療関連感染では、感染症を引き起こす病原体は、その病原体を保有する入院患者および病原体で汚染された環境に存在する。しかしながら、病原体は存在するだけでは感染は成立しない。感染症が成立するための病原性や菌量、患者からの排出、さらにはそれらの病原体が感染伝播する経路も必要である。

感染伝播経路としては通常接触、飛沫、空気の3つの感染経路が重要となる (図3)。薬剤耐性菌や環境菌のほとんどは接触にて伝播する。接触感染は、それらの病原体を保有する患者から直接感染伝播することもあるが、通常は医療従事者の手を介した伝播や、汚染された環境

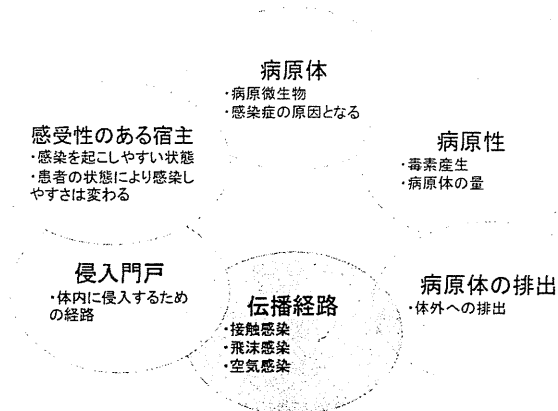


図2. 感染成立に必要な要素

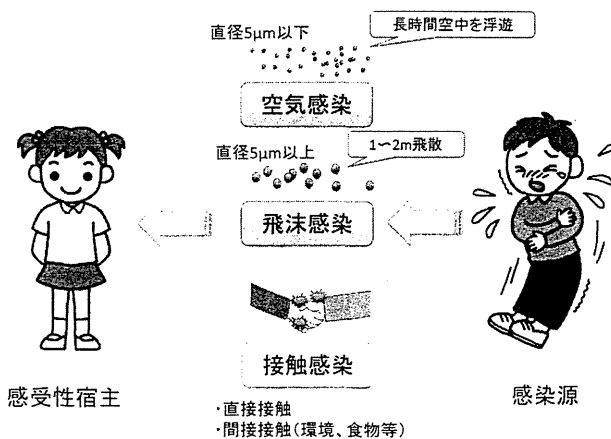


図3. 病原体の感染経路

からの伝播がほとんどである。このため、感染伝播防止として、患者の隔離や手袋やガウンなどの个人防护具 (PPE) による感染伝播防止が必要となる。飛沫感染は、気道系に感染する病原体が患者の咳やくしゃみなどのしぶき (飛沫) によって感染伝播するものである。飛沫は通常、1~2メートルの範囲で患者から排出され、直接感染伝播する。飛沫とともに排出された病原体は、短時間であれば環境中でも生息することが可能であるため、接触感染でも伝播可能である。飛沫感染で感染伝播可能な飛沫粒子の大きさは、通常5 μ m以上とされる。このサイズの粒子は、市販されている不織布マスクで防御可能な大きさとなる。さらに、飛沫粒子の水分が蒸発し、5 μ m以下の微粒子で感染する感染症もあり、空中を長時間に浮遊し感染伝播する。これを空気感染と呼ぶ。空気感染する病原体は、感染力が非常に強いいため、患者の入院環境から病原体が流出しないための陰圧空調個室隔離が必要となる。また対応する医療者は、微粒子を防御できるマスク (N95マスクなど) が必要となる。

表1に医療関連感染の原因となる微生物と主な感染経路を示す。接触感染を起こす病原体としては、MRSAや多剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌、病原性大腸菌やノロウイルス、*Clostridium difficile*などの感染性胃腸炎

表1. 医療関連感染の原因となる微生物と主な感染経路

感染経路	病原体 (感染症)		
	細菌	ウイルス	真菌, 原虫他
接触感染	薬剤耐性菌 (MRSA, 多剤耐性緑膿菌, 多剤耐性アシネトバクター, ESBL産生菌, メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌, プラスミド性 Class C β-ラクタマーゼ産生菌, CRE, VRE など), 感染性胃腸炎 (病原性大腸菌, サルモネラなど), <i>Clostridium difficile</i>	感染性胃腸炎 (ノロウイルス, ロタウイルスなど), 流行性角結膜炎 (アデノウイルス)	疥癬
飛沫感染	百日咳, 溶血性レンサ球菌, マイコプラズマ, ジフテリア, 髄膜炎菌	インフルエンザ, 風疹, 流行性耳下腺炎, RSウイルス (+接触)	
空気感染	結核 (肺結核, 喉頭結核)	麻疹, 水痘 (播種性帯状疱疹)	
病院環境	バチルス属菌, 耐性菌ではないグラム陰性桿菌 (セラチア, Enterobacter 属菌, Citrobacter 属菌, 緑膿菌など), 緑膿菌以外の Pseudomonas 属菌 (<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> など), <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , Alcaligenes 属菌, レジオネラ		アスペルギルス
血液体液曝露		肝炎ウイルス, HIV, SFTS	プリオン

*MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, ESBL: 基質拡張型β-ラクタマーゼ, CRE: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌, VRE: バンコマイシン耐性腸球菌, HIV: ヒト免疫不全ウイルス, SFTS: 重症熱性血小板減少症候群

起炎病原体, アデノウイルス, 疥癬などが挙げられる。飛沫感染を起こす病原体としては, 百日咳菌, 溶血性レンサ球菌, マイコプラズマ, インフルエンザ, RSウイルスなどが挙げられる。RSウイルスは小児の気道感染症の原因病原体であるが, 飛沫により汚染された環境からの伝播が特に問題となる。空気感染を起こす病原体としては, 結核, 麻疹, 水痘が挙げられる。結核は, 気道からの排出が起こる病態 (肺結核, 喉頭結核, 気管支結核など) の場合に空気感染を起こす。また免疫不全者に発生するよる播種性帯状疱疹では, 水痘と同じように空気感染を起こすため, 注意が必要である。

おもに環境中に存在し, 入院患者に感染する病原体もある。芽胞菌であるバチルス属をはじめ, セラチアやエンテロバクター属菌などの薬剤耐性菌ではないグラム陰性桿菌 (腸内細菌科) あるいは元来環境菌であるブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 (非発酵菌) とよばれる緑膿菌 (多剤耐性以外), 緑膿菌以外の Pseudomonas 属菌, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* などが代表的な病原菌となる。これらの環境菌は, 一般的に病原性は低く, 免疫状態の低下した入院患者にのみ感染症を引き起こす。なお非発酵菌の多くは元来薬剤耐性傾向が強いが, 多剤耐性あるいはプラスミド性メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) などを保有しない限り, 接触予防策の対象とはならない。これらの病原体の感染防御については, 日常的に行うべき感染予防策 (標準予防策) において実施されることになる。

レジオネラ菌は, 停滞あるいは循環する水環境中で繁殖し, ヒトに感染を引き起こす。わが国では循環式浴槽を用いた大規模入浴施設での感染症の発生が多く見られるが, 病院内の給湯設備内での繁殖および感染の報告もある。またアスペルギルス (真菌) は病院環境中に普遍的に存在する微生物であるが, 高度免疫不全状態の患者に, 重症の肺炎 (侵襲性肺アスペルギルス症) を引き起こす。

3. 宿主要因について

医療関連感染を引き起こす病原体は, 入院患者が保有する病原体を含めた施設環境中の微生物またはその患者自身が保有する常在菌である。薬剤耐性菌や *C. difficile* などは, 入院患者に一旦定着し, 感染症を発症することが多いため, 厳密に外因性感染か内因性感染かの鑑別は困難である。

入院患者の多くは何らかの免疫不全要因を持っている。免疫不全は大きく分けて①皮膚/粘膜バリアの破綻, ②好中球減少, ③細胞性免疫低下, ④液性免疫低下に分類される (表2)。実際には, これらの因子を複数保有する場合が多い。それぞれの免疫不全にともなう感染症起炎菌には特徴がみられる⁴⁾。皮膚/粘膜バリア破綻では, 破綻がある部位の常在菌や定着菌が原因となる。例えば, 手術後の術創部感染や血管内留置カテーテル感染では皮膚常在菌であるブドウ球菌が原因となることが多い。好中球減少時には, ブドウ球菌, レンサ球菌, 腸球菌, 腸内細菌といったヒトの常在菌が原因となることが多い。緑膿菌は好中球減少時に重篤な感染症を引き起こすため特に注意が必要である。一般的に免疫不全という場合には, 細胞性免疫低下を指すことが多い。これは, ステロイドや様々な免疫抑制剤投与にともなうものであり, リステリア, ノカルジアや結核菌を含む抗酸菌などいわゆる細胞内寄生細菌による感染症が多く見られる。また細菌以外にも様々な真菌, 原虫, ウイルスなど多彩な感染症がみられる。液性免疫低下では, 肺炎球菌やインフルエンザ菌といった有荚膜菌による感染症が見られる。脾臓摘出後には, 液性免疫低下と同様の病態が問題となる。

これらの免疫不全を改善するためには, 免疫不全の原因となる病態の改善が必要となる。医療関連感染に関連して, 患者の免疫を付与するためのワクチンは少ない (結核菌 [BCG], 肺炎球菌, インフルエンザ菌 Typeb, 髄膜炎菌のみ)。感染症を予防するための抗微生物薬投

表2. 免疫不全の種類と関連する微生物

免疫不全	主な病態	細菌	真菌	原虫	ウイルス
皮膚/粘膜バリアの破綻	悪性腫瘍, 抗がん剤投与 (抗菌薬投与)	破綻がある部位の常在菌, 定着菌	カンジダ		
好中球減少	抗がん剤投与, 造血器悪性腫瘍, 造血幹細胞移植後	黄色ブドウ球菌, レンサ球菌, 腸球菌, 腸内細菌, 緑膿菌	カンジダ, アスペルギルス		
細胞性免疫低下	ステロイド, 免疫抑制剤投与 (移植後, 自己免疫疾患等), HIV	リステリア, ノカルジア, 抗酸菌 (細胞内寄生細菌)	ニューモシステリス, アスペルギルス, カンジダ, クリプトコッカス	トキソプラズマ	HSV, CMV, VZV, EBV, HHV-6
液性免疫低下	多発性骨髄腫, リツキシマブ (抗CD20抗体), (脾摘後)	肺炎球菌, インフルエンザ菌, 髄膜炎菌 (有荚膜菌), 緑膿菌			CMV, VZV

表3. ワクチンで防御可能な感染症

細菌	ウイルス
肺炎球菌 (小児用, 成人用) インフルエンザ菌 Typeb 結核菌 (BCG) ジフテリア 百日咳 破傷風 髄膜炎**	麻疹 風疹 ムンプス* 水痘* 肝炎 (A型, B型)* ヒトパピローウイルス インフルエンザウイルス* ポリオ 日本脳炎 ロタウイルス*

*定期接種となっていない

**わが国では認可されていない

与が, 免疫不全の期間投与される場合もある。例えば, 術創部感染予防では, 手術する部位に定着する微生物に対して有効な抗菌薬を術前および術中に投与し, 感染を予防する。好中球減少が長く続く可能性がある場合には, キノロン系抗菌薬の内服予防が行われる場合もある。真菌では, ニューモシステリスやカンジダ予防のために, 予防的抗菌薬投与を行う。

医療従事者においては, 市中での感染および医療施設内への持ち込みが問題となる。またこれらの病原体に感染した患者からの職業感染も問題となる。このため, ワクチンで防御可能な感染症については, ワクチンによる免疫獲得が必要となる (表3)⁵⁾。わが国で定期接種となっているワクチンのほとんどは小児が対象であり, ワクチン未接種およびワクチンによる免疫獲得が不十分な場合には所属施設毎にワクチン接種を考慮する必要がある。特に, 病原性が高く感染伝播のリスクの高い麻疹, 水痘, 風疹, ムンプスについては, 抗体価を測定の上, 抗体が不十分であればワクチン接種が望ましい。結核菌については, 成人におけるBCGワクチンの効果のエビデンスは乏しいとされるが, 結核病棟勤務など結核曝露リスクが高い場合, ワクチン未接種あるいはツベルクリン反応陰性であればワクチン接種を考慮する。

百日咳は, 成人におけるワクチン免疫の低下に伴い, 成人での発症が増加傾向にある。成人においては症状は比較的軽微にとどまることが多いが, 幼児における感染症 (細気管支炎など) は非常に重篤な病態を引き起こす場合もあり, 長引く咳などの自覚症状があれば, 適切な診断および治療, さらに施設内伝播防止のためのマスク着用などが必要となる。

4. 医療関連感染に関連する微生物 (細菌) の制御

4.1 医療関連感染で問題となる病原体の細菌学的な特徴^{6, 7)}

市中から施設内への持ち込みによって起こる感染症は, 感染患者の早期発見と適切な感染対策によって制御可能である。ここでは, 医療施設内に生息し, 入院患者や入所者に感染伝播する病原体 (細菌) について解説する。そのほとんどは薬剤耐性菌であるが, その薬剤耐性機序や定義, 検出法, 疫学, 有効な抗菌薬, ヒトにおける保菌部位, 関連する感染症について表4に示す。わが国で問題となる薬剤耐性菌は, グラム陽性菌では, MRSAおよびバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が挙げられる。また, グラム陰性菌では, 多剤耐性緑膿菌 (MDRP), 多剤耐性アシネトバクター (MDRA), ESBLやメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL), プラスミド性 AmpC 産生の腸内細菌科細菌 (大腸菌, クレブシエラ属など) が問題となる。また, 薬剤耐性菌の範疇には入らないが, *C. difficile* も主要な施設内感染起炎菌である。

薬剤耐性機序のうち, MRSA は遺伝子の伝播ではなく, 耐性菌そのものの伝播により拡散される。その他の耐性菌は, 菌そのものの伝播の他に, 細菌の細胞内にあるプラスミドとよばれる小遺伝子上に存在する耐性遺伝子が伝播することにより耐性因子が拡散される。多くの耐性菌の検出法は確立されており, 一般病院の細菌検査室でも検出可能となっている。しかしながら, 比較的最近確認された耐性菌 (KPC 産生菌, プラスミド性 AmpC 産

表4. 医療関連感染で問題となる細菌の特徴

病原微生物	薬剤耐性機序 / 定義	薬剤耐性遺伝子の伝播	検出法	疫学	有効な抗菌薬	ヒトにおける主な保菌部位	関連する感染症
MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)	<i>mecA</i> 遺伝子の獲得により、Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a) が産生される。PBP2a はβ-ラクタム系抗菌薬全般に親和性が低く、耐性を獲得する。また、同時に他の系統の薬剤耐性(キノロン系、マクロライド系、など)を獲得することが多い。	なし	オキサシリン(ペニシリン)またはセフォキシチン(セフェム系抗菌薬)に耐性を示す。 PBP2a 陽性(凝集反応)	定点施設あたり年間50人前後(感染症発生動向調査より、感染症発症例)	グリコペプチド系抗菌薬(バンコマイシン、テイコプラニン)リネゾリド ダブトマイシン Q/D	皮膚、鼻前庭、上気道、直腸周囲、咽頭	血流感染、院内肺炎、術創部感染、心内膜炎、軟部組織感染、骨髄炎
VRE (バンコマイシン耐性腸球菌)	バンコマイシン耐性遺伝子である <i>vanA</i> または <i>vanB</i> 遺伝子を獲得した腸球菌。腸球菌は元来セフェム系抗菌薬に耐性であり、 <i>Enterococcus faecium</i> はペニシリン系抗菌薬に耐性のことが多い。	あり	グリコペプチド系抗菌薬に耐性を示す。但し、 <i>vanB</i> 陽性株は、テイコプラニン感受性となる場合が多い。	全国で73~120例/年間(感染症発生動向調査より、感染症発症例)	リネゾリド ダブトマイシン Q/D <i>E. faecalis</i> ではペニシリンが有効	大腸、肛門/腔周囲	血流感染、カテーテル関連尿路感染、心内膜炎、術創部感染
多剤耐性緑膿菌(MDRP)	カルバペネム、アミノグリコシド、キノロン系薬の3系統の耐性を獲得した緑膿菌。カルバペネム耐性機序として分解酵素(メタロ-β-ラクタマーゼ [MBL] など)を保有する場合が多い。また MBL 保有菌は他の系統の薬剤も耐性を獲得することが多く、多剤耐性傾向を示す。MBL は日本では IMP 型と VIM 型が多い。	あり	MBL: カルバペネムあるいはセフトジジム(第3世代セファロスポリン薬)耐性で疑い、阻害剤(SMA ディスクなど)の作用による感受性の回復により判定する。 その他の耐性は、薬剤感受性試験にて判定する。	定点施設あたり年間1人前後(感染症発生動向調査より、感染症発症例)	コリスチン*	腸管内	
多剤耐性アシネトバクター属菌(MDRA)	カルバペネム、アミノグリコシド、キノロン系薬の3系統の耐性を獲得した緑膿菌。カルバペネム耐性機序として分解酵素(MBLやOXA型β-ラクタマーゼなど)を保有する場合が多い。MBLやOXA保有菌は他の系統の薬剤も耐性を獲得することが多く、多剤耐性傾向を示す。OXAを保有し多剤耐性傾向を示す菌は <i>A. baumannii</i> であるが、正確な同定のためには遺伝子検査が必要である。	あり	MBL: MDRP 参照 OXA: 特異的な検出法はない。確定診断には遺伝子の検出が必要。	定点施設あたり年間0.01人(感染症発生動向調査より、感染症発症例)	チゲサイクリン コリスチン*	肛門/腔周囲、皮膚	血流感染、人工呼吸器関連肺炎、院内肺炎、術創部感染、カテーテル関連尿路感染
薬剤耐性腸内細菌科細菌 (ESBL産生菌、カルバペネマーゼ[MBL, KPC**など]産生菌、プラスミド性AmpC産生株ほか)	腸内細菌科細菌(大腸菌、クレブシエラ属、プロテウス)は第三世代セファロスポリン系薬に通常感受性であるが、この薬剤を分解する酵素を獲得し耐性化したものである。カルバペネムを分解する酵素を持つ腸内細菌科の菌も増加傾向にある。わが国では、MBL保有株が多い。ESBLあるいはMBL保有株はアミノグリコシド、キノロン系薬にも耐性を示すことが多い。ESBLは日本ではCTX-M型が多い。	あり	ESBL: 第3世代セファロスポリン薬耐性(低感受性)で疑い、阻害剤(クラブラン酸)による感受性の回復により判定する。 MBL: MDRP 参照 KPC: カルバペネム耐性~低感受性で疑い、エルタベネムディスクを用いた Modified Hodge test により判定する。 プラスミド性 AmpC: 第3世代セファロスポリン薬耐性(低感受性)で疑い、阻害剤(ポロン酸)による感受性の回復により判定する。	ESBL: 大腸菌の約10~20%	ESBL: TAZ/PIPC, カルバペネム カルバペネマーゼ: チゲサイクリン、コリスチン*	大腸 <i>Klebsiella pneumoniae</i> では加えて鼻腔、口腔、皮膚 セラチア属菌では加えて尿路内	
<i>Clostridium difficile</i>	病院環境に普遍的に存在し、入院患者の腸内に保菌状態となる。多くの抗菌薬に耐性を示し、抗菌薬の使用が最大のリスク因子となる。欧米では、病原性の強い菌株による医療関連感染が問題となっている。	なし	迅速抗原検査(C.DIFF QUIK CHEK コンプリート、アリアアメディカルほか)により便中の毒素や菌体抗原の有無を判定する。 毒素抗原検査の感度は低いため、専用の培地(CCF A 培地など)を用いて嫌気性培養検査を行い確認する場合もある。	不詳 病院環境とは接点のない健康人においても保菌が認められる。	メトロニダゾール(内服、点滴*) バンコマイシン(内服)	大腸	<i>C. difficile</i> 関連腸炎(偽膜性腸炎、中毒性巨大結腸)

*日本未発売

** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase