

2019年10月17日(木) 研修  
@愛知県衛生研究所

# カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の検査

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室  
松井 真理

## 地方衛生研究所における薬剤耐性菌検査体制整備までの経緯

	感染症法改正・通知など	感染症・レファレンスセンターの活動
2011年 (H23)	6月 医政局指導課長通知 「医療機関における院内感染対策について」 旭研における院内感染原因微生物の検査体制充実強化	依頼に応じた個別研修など
2014年 (H26)	9月 感染症法 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症 薬剤耐性アシネトバクター感染症 が5類全数把握疾患となる	研修
2015年 (H27)		薬剤耐性菌レファレンスセンター充足 陽性コントロール配布
2017年 (H29)	3月 健康局結核感染症課長通知 「CRE感染症等に係る試験検査の実施について」 → CRE病原体サーベイランス開始 (バンコマイシン耐性緑膿菌 (VRE)、薬剤耐性アシネトバクターの検査は別枠)	検査に関する問い合わせ対応
2019年 (R1)	厚生労働省外部病態管理事業 課題1 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌	

## カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症

### 感染症法 5類全数把握疾患 (2014年9月～)

届出のために必要な検査所見

➢ 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出

➢ 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認

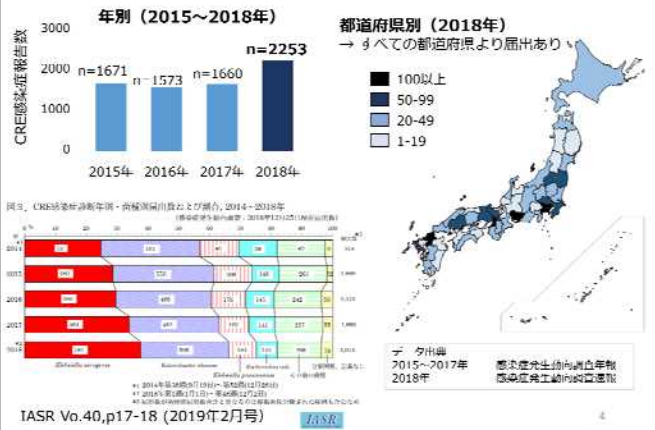
	最小発育阻止濃度(MIC)	感受性ディスク(KB)の 阻止円の直径
メロペネム	≥2μg/mL	22mm以下
あるいは		
イミペネム	≥2μg/mL	22mm以下
セフメタゾール	≥64μg/mL	12mm以下

>32μg/mLも  
同じ意味

➢ 菌が分離された検査材料が

- 通常無菌的であるべき検体 (血液、膿水、胸水、髄液その他) の場合  
→ 上記を満たす株が分離された時点で届出対象となる
- 通常無菌的ではない検体 (喀痰、膿、尿その他) の場合  
→ 分離菌が感染症の起原菌と判定された場合、届出対象となる

## CRE感染症届出状況



## CREとCPE

### CRE: カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

→ 薬剤感受性 (MIC値) で判定可能、感染症法の届出対象

### CPE: カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌

臨床的・疫学的に重要  
CRE院内感染事例の多くがCPECによる  
→ CPEが否かの鑑別が求められる

主なカルバペネマーゼ遺伝子型

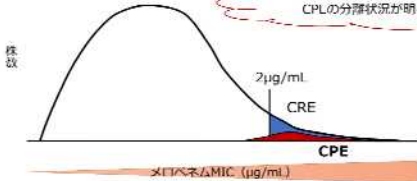
IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型

国内型

海外型 (海外で報告多い)

→ 薬剤感受性のみでは判定できない、遺伝子検査など追加検査が必要

CRE病原体サーベイランスによって、  
CPEの分類状況が明らかに!



## CRE病原体サーベイランス検査結果報告項目

通知別添に示された検査項目1~3のうち、原則実施 (6項目: 太字)、推奨 (7項目) の結果をNESID病原体検出情報システムを通して報告  
1で検出された遺伝子型と2 (及び3を実施した場合は3) の産生性の結果が一致することを確認する

1 カルバペネマーゼ遺伝子の検出  
IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型 PCR法  
VIM型、GES型 (一部カルバペネマーゼ)、IMI型、KHM型、SMB型

2 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認  
メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク法  
ポロン酸

3 カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法 → CPCが否かの判定に有用  
Carba NP テスト  
・結果を確認しやすい (色で判別)  
・子間やコストがややかかるが、産科機関ではほとんど実施できない  
Carbapenem Inactivation Method (CIM)  
・子間やコスト面から導入しやすい  
・医療機関によっては実施可能

### CRE病原体サーベイランス報告データの精度管理 (2018年検体採取分)

原則、毎週金曜日にデータ確認、該当検体について順次問い合わせ

問い合わせ対象	該当株数 (自治体数)	対応状況 (2019.7.2現在)
● 遺伝子検査と表現型検査 結果矛盾	6 (5自治体)	修正 4 確認中 2
● 海外型カルバペネマーゼ遺伝子 陽性かつ患者渡航歴無し・不明 → シークエンスにて確定依頼 (型別入力済検体除く)	12 (6自治体)	確定済 5 確認中 7
● 入力形式が異なる 例：菌種名間違い、空欄 結果入力形式間違い、空欄	50 (24自治体)	修正 43 確認中 7
● 原則実施検査項目の未実施 遺伝子検査項目 表現型検査項目	該当なし 27 (3自治体)	未実施のため修正変更なし

### CRE病原体サーベイランス結果

集計結果等はIASRで還元

・ 2017年検体採取分 集計結果  
IASR Vol.39, p162-163 (2018年9月号)

・ CRE病原体サーベイランス報告状況  
IASR Vol.40, p19-20 (2019年2月号)

・ 2018年検体採取分 集計結果 **NEW**  
・ 海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の増加  
IASR Vol.40, p157-158  
p158-159 (2019年9月号)



### 病原体サーベイランス結果の活用

病原体サーベイランス  
薬剤耐性研究センター (ハンセン庁舎)

発生動向調査 (患者報告)  
感染症疫学センター (戸山庁舎)

電話会議  
(週に1度)



- ・ それぞれのサーベイランスで集積が認められる事例を双方で確認
- ・ 必要に応じて各センターから自治体へ問い合わせ、結果をフィードバック
- ・ 自治体等からの個別問い合わせで把握した事例について情報共有、リーバイランスデータ構築

地方衛生研究所 検査担当

自治体

保健所  
地方衛生研究所 感染症情報センター

参考：IASR Vol.40, p20-21 (2019年2月号)

### CRE病原体サーベイランス検査実施状況と陽性数 (2018年検体採取 n=1,684)

少なくとも1つのカルバペネマーゼ遺伝子検出 297株\*\*\* (17.6%)

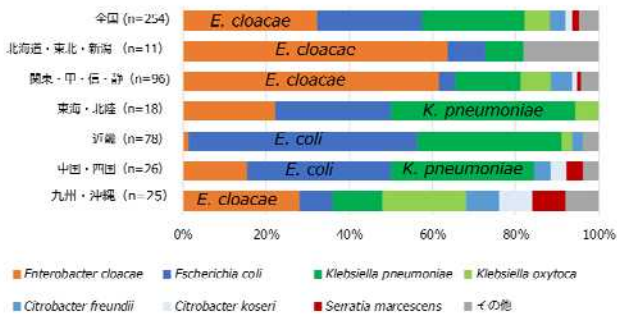
検体採取機関	2018年1~12月 (n=1,684)			
	検査項目	登録 検体数*	検出陽性株数 (%)	陽性率 (%**)
原則実施	IMP型	77	1,684 (100.0)	254 (15.1)
	NDM型	72	1,684 (100.0)	31 (1.8)
	KPC型	72	1,684 (100.0)	10 (0.6)
	OXA-48型	77	1,684 (100.0)	3 (0.2)
	メタロ-β-ラクタム β-ラクタム	72	1,605 (98.9)	279 (16.8)
	ポロリン酸式鉄	77	1,653 (98.7)	663 (40.1)
推奨	VIM型	51	1,080 (64.1)	0 (0.0)
	GCS型	45	866 (51.4)	2 (0.2)
	IMI型	18	282 (16.7)	1 (0.4)
	KHM型	16	275 (13.4)	0 (0.0)
	SMB型	13	214 (12.7)	0 (0.0)
	Carba NP test	14	237 (14.1)	45 (19.0)
CIM	33	494 (29.3)	83 (16.8)	

\* その検査項目結果を1株でも報告した登録検体数  
\*\* 検査実施検体に対する陽性率 (%)  
\*\*\*複数型のカルバペネマーゼ遺伝子検出株4株を含む

参考：IASR Vol.40, p157-158

10

### CRE病原体サーベイランス (2018年検体採取分) 地域別IMP型検出菌種内訳



参考：IASR Vol.40, p157-158

11

### 海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の増加

特に、海外渡航歴無し・不明症例からのNDM型検出が増加!  
(海外渡航歴無し・不明症例からの検出時には結果確定のため、シークエンスをお願いします)

2017年

海外渡航歴有り : N 6  
海外渡航歴無し・不明 : N 8

2018年

海外渡航歴有り : N 9  
海外渡航歴無し・不明 : N 33



参考：IASR Vol.40, p158-159

12



### CRE病原体サーベイランス報告状況 (2018年検体採取分)

- 発生動向調査 (患者報告) 2,289例 (2019年5月31日現在)
- 病原体サーベイランス (病原体報告) 1,653株\* (2019年4月28日現在)

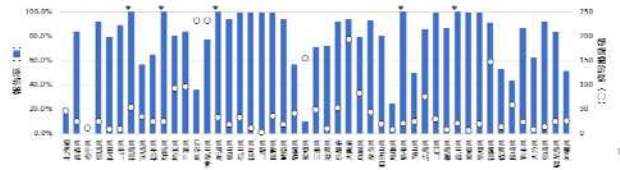
\*通知で原則実施とされた検査項目が全て報告された株 (CRE病原体報告数の98%)

月別 (範囲 61-79%, 中央値72%)



報告率 (%)  
= 病原体報告数 / 患者報告数 × 100  
= 72.2%  
(2017年 48.1%より大幅上昇)

都道府県別 (範囲 0-100%, 中央値86%)



### CRE病原体サーベイランス検査結果報告項目

通知別添に示された検査項目1~3のうち、原則実施 (6項目:太字)、推奨 (7項目) の結果をNESID病原体検出情報システムを通して報告  
1で検出された遺伝子型と2 (及び3を実施した場合は3) の産生性の結果が一致することを確認する

1 カルバペネマーゼ遺伝子の検出  
**IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型** PCR法  
VIM型、GES型 (一部カルバペネマーゼ)、IMI型、KHM型、SMB型

2 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認  
**メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)** ディスク法  
ポロン酸

3 カルバペネマーゼ産生性を確認する他の方法 → CPEか否かの判定  
Carba NP テスト

- 結果を認識しやすい (色で判定)
- 手前やフストがややかるが、医療機関ではほとんど実施できない

Carbapenem Inactivation Method (CIM)

- T皿やコスト皿から導入しやすい
- 医療機関によっては実施可能



ディスク法



+



-

### 厚生労働省外部精度管理事業 -令和元年度- 課題1 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

スケジュール 4/22~5/10 参加登録  
6/17 検体発送 (8検体)  
7/26 検査実施  
8/2 検査結果登録締め切り  
検体内容公開

検体内容 (必須項目のみ示す)

	1. PCR法 (遺伝子検査)				2. ディスク法 (薬剤抵抗検査)			
	IMP型	IMP遺伝子型	NDM型	NDM遺伝子型	KPC型	OXA-48型	MBL阻害剤抵抗	ポロン酸
検体(A)	+	+	-	-	-	-	+	-
検体(B)	-	-	-	-	+	-	-	+
検体(C)	-	-	+	5	-	-	+	-
検体(D)	-	-	-	-	-	+	-	-
検体(E)	+	+	-	-	-	-	+	-
検体(F)	-	-	-	-	-	-	-	-
検体(G)	-	-	-	-	-	-	-	+
検体(H)	-	-	-	-	-	-	-	+

### H29年通知 検査法に記載のあるカルバペネマーゼの主な特徴

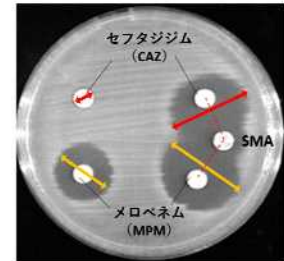
Amblerの分類	遺伝子型	検査 結果 判定	CPEにおける 日本での 分離報告	β-ラクタマーゼ阻害剤 (+阻害有り; -阻害なし)		
				メルカプト酢酸 ナトリウム(SMA)	ポロン酸	クロキサシリン
A	KPC型	●	海外型 持ち込み例が主	-	+	-
	IMI型	○	報告あり	-	+?	-
	GES型 (一部の型のみ カルバペネマーゼ)	○	少ない	-	+?	-
B (メタロ- β-ラクタ マーゼ)	NDM型	●	海外型 国内例が増加傾向	+	-	-
	IMP型	●	国内型 多い	+	-	-
	VIM型	○	報告あり?	+	-	-
	KHM型	○	報告あり (ごく稀)	+	-	-
	SMB型	○	報告あり (ごく稀)	+	-	-
D	OXA-48型	●	海外型 持ち込み例が主	-	-	-

\*実際には、カルバペネマーゼだけでなく複数のβ-ラクタマーゼを産生する株が多い。  
\*複数のβ-ラクタマーゼを同時に産生する株の場合、阻害効果がはっきり確認できないこともあるため、ディスク法とPCRの結果に矛盾がないことを確認する。

### 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認判定方法

メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)

→ クラスB β-ラクタマーゼ (メタロ-β-ラクタマーゼ:MBL) 阻害剤



陽性判定  
抗生薬ディスク (CAZ, MPM) と阻害剤 (SMA) を結んだ線に対して垂直な方向 (図の矢印) に阻止円径が拡張

CAZ, MPMのいずれか片方でも拡張を認めた場合は、陽性と判定する

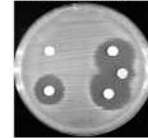
ポイント

阻止円径の拡張の方向に注意!!

### 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認判定方法

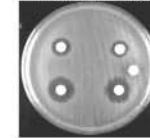
メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)

1. *K. pneumoniae*



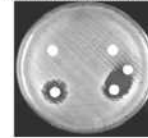
⇒ 陽性  
(PCR:IMP型)

2. *K. pneumoniae*



⇒ 陰性  
(PCR:KPC型)

3. *K. pneumoniae*



⇒ 陽性  
(PCR:NDM型)

4. *E. cloacae*



⇒ 陰性  
(PCR:カルバペネマーゼ  
遺伝子検出なし)

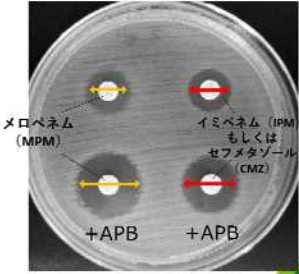
拡張方向を  
しっかり  
確認!

### 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認判定方法

ボロン酸 (略号: APB)

→ KPC型、AmpC β-ラクタマーゼ阻害剤

病原体検出マニュアル  
薬剤耐性部 Ver1.1 p.36-37



**陽性判定**  
APB添加によって5mm以上の阻止円径拡張を認めるものを陽性とする。(特にAmpC β-ラクタマーゼ産生の場合、株によっては5mmに満たない場合もある。)

KPC型陽性株は、IPM、MPMの拡張を認めることを確認する

注: NESID報告は、カルバペネム系抗肉薬 (IPM, MPM) を使用した場合の判定を入力すること

**ポイント**

クロキサシリンの結果とあわせて確認すると解釈しやすい

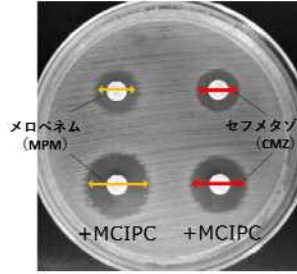
\*阻止円が全く形成されない場合の直径は = mm

### 阻害剤を用いたβ-ラクタマーゼ産生性の確認判定方法

クロキサシリン (略号: MCIPC)

→ AmpC β-ラクタマーゼ阻害剤

推奨検査項目  
現状では病原体バイランス報告対象外



**陽性判定**

MCIPC添加によって5mm以上の阻止円径拡張を認める。(株によっては5mmに満たない場合もある。5mm以下の拡張を認める場合は、PCR法の結果と併せて確認必須)

MPMとCMZのいずれか片方でも拡張を認めれば陽性と判定

**ポイント**

ボロン酸の結果とあわせて確認すると解釈しやすい

### ボロン酸とクロキサシリンの判定結果解釈

阻害効果の有無

ボロン酸のみ	ボロン酸 クロキサシリン	クロキサシリンのみ	いずれも阻害なし
KPC型	AmpC	判定保留 (PCR法による遺伝子 検出結果を確認する)	KPC型、AmpC いずれも産生しず

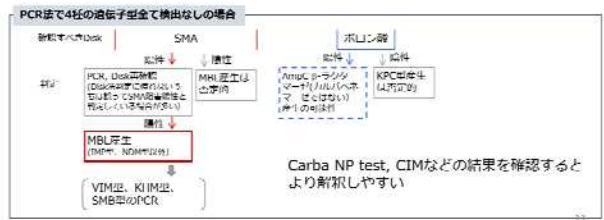
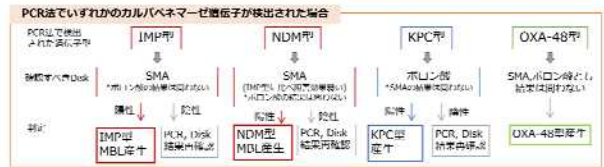
#### AmpCについて

染色体上にAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を元来保有する菌株が存在する。  
*Klebsiella aerogenes*  
*Enterobacter cloacae*  
*Citrobacter freundii*  
*Serratia marcescens*  
*Morganella morganii* など

マニュアルで紹介したプラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ検出用のPCRでは、必ずしも陽性バンドが検出されるわけではない。解釈の際は留意する。  
(参考文献: Clin Microbiol Rev 2009, (22):161-182)

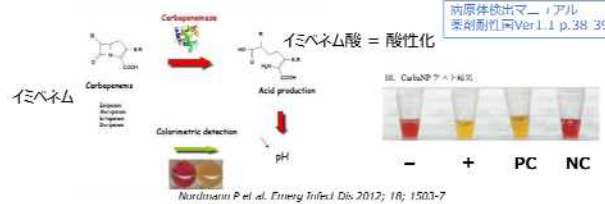
### PCR結果とディスク法結果の照らし合わせ

(病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌より)



### Carba NP test: イミペネムを基質としたCPE検出法

病原体検出マニュアル  
薬剤耐性部 Ver1.1 p.38-39



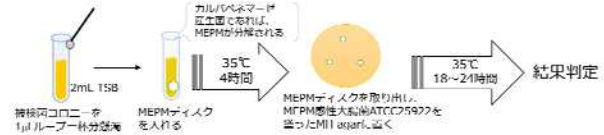
**長所**  
→ 迅速に (2時間以内) 判定可能  
→ 判定が比較的容易  
→ カルバペナーゼを一律に検出可能

**短所**  
→ やや高価 (基質のイミペネム)  
→ OXA-48型など一部のカルバペナーゼでは偽陰性となりうる

菌体を溶菌させる  
↓  
イミペネム・フェノールレッド溶液に加える  
↓  
37°C培養  
60~120分後に確認  
変化したものを陽性と判定

### Carbapenem Inactivation Method (CIM)

- カルバペナーゼ産生性を確認するための試験
- CLSI 2017に記載された改良法 (mCIM) が現在主流となっている



参考文献  
1. CLSI 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S27  
2. van der Zwaluw K. et al. 2015. PLoS One 23:10(3):e0123690  
3. Pierce V.M. et al. 2017. J Clin Microbiol. 55(8):2321-2333

## β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンスによる型別

得られた塩基配列を参照配列と比較し、アミノ酸配列が一致すればよい

	登録バリエーション (2019.7.10ver., 配列非公開含む)	主なバリエーション 参照配列のGenBank Accession no.
IMP型	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> ~ <i>bla</i> <sub>IMP-60</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> ⇒ S71932 (NG049172) <i>bla</i> <sub>IMP-6</sub> ⇒ AB040994 (AB040994)
NDM型	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ~ <i>bla</i> <sub>NDM-28</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ⇒ FN396876 (NG049326) <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> ⇒ JN104597 (NG049337)
KPC型	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> ~ <i>bla</i> <sub>KPC-44</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> ⇒ AY034847 (NG049253)
OXA-48型	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-181</sub> など	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> ⇒ AY236073 (NG049762) <i>bla</i> <sub>OXA-181</sub> ⇒ JN205800 (NG049482)
GES型	<i>bla</i> <sub>GES-1</sub> ~ <i>bla</i> <sub>GES-41</sub> (カルバペネマーゼは一部のみ)	<i>bla</i> <sub>GES-5</sub> ⇒ AY494717 (NG049137) <i>bla</i> <sub>GES-24</sub> ⇒ AB901141 (NG049127)

参照配列 (GenBank accession No.) のリストは下記より確認可能

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/>

・シーケンス用プライマー例

IMP型 → 病原体検出マニュアルVer1.1 (IMP-1型のみ)

NDM型 → J Antimicrob Chemother 2011 (66):1260-1262

PCRのみ

→ IMP型

シーケンス型別

→ IMP-1, IMP-6

(年は不変)

## CRE病原体サーベイランス (2018年検体採取分) IMP型シーケンス

IMP型シーケンス報告

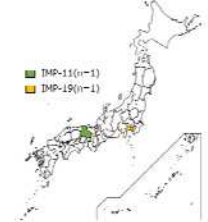
18府県23機関 n=123 (IMP型検出株の48%)

IMP-1  
(16府県 n=57)

IMP-6  
(6府県 n=64)

シーケンス実施あり  
府県別の分布

その他のIMP型  
(2県 n=2)



IMP-6産生株の特徴  
・イミペネム感受性  
・メロペネム耐性

## まとめ

- ・ CRE病原体サーベイランスにより、臨床的・疫学的に重要とされるカルバペネマーゼ遺伝子保有株の分離状況が把握できるようになった
  - CRE届け出基準を満たす株の約2割がCPE
  - カルバペネマーゼ遺伝子はIMP型が主、菌種・遺伝子型には地域特性
  - 海外型カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM型、KPC型、OXA-48型) 陽性の国内事例が増加傾向
- ・ CREの検査
  - 遺伝子検査と表現型検査の結果に矛盾がないことを確認
- ・ 薬剤耐性菌検査に関するお問い合わせ  
国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター第一室  
taiseikin@niid.go.jp

## 謝辞

CRE病原体サーベイランスにご協力いただいております  
全国の地方衛生研究所及び保健所の皆様に  
深く感謝申し上げます