

沖縄県における 薬剤耐性菌サーベイランス

Pseudomonas aeruginosa
(緑膿菌)

沖縄赤十字病院 医療技術部 臨床検査課
上間 寛嗣

集計方法

- ・期間: 2015年1月～2015年12月
- ・条件: 各年ごとに患者の重複を除き、1患者1株とした。
2014年からは患者重複がある場合、無菌材料由来株を優先した。
IPM または MEPM、CPFX または LVFX、AMK が測定された菌株を対象とした。
- ・耐性菌判定基準: 下表 (CLSI M100-S22)

薬剤		判定 (R)
カルバペネム系薬	IPM	≥ 8
	MEPM	≥ 8
キノロン系薬	CFPX	≥ 4
	LVFX	≥ 8
アミノグリコシド系薬	AMK	$\geq 64^*$

* AMK は “MIC 32 (1) 中間” も含む。

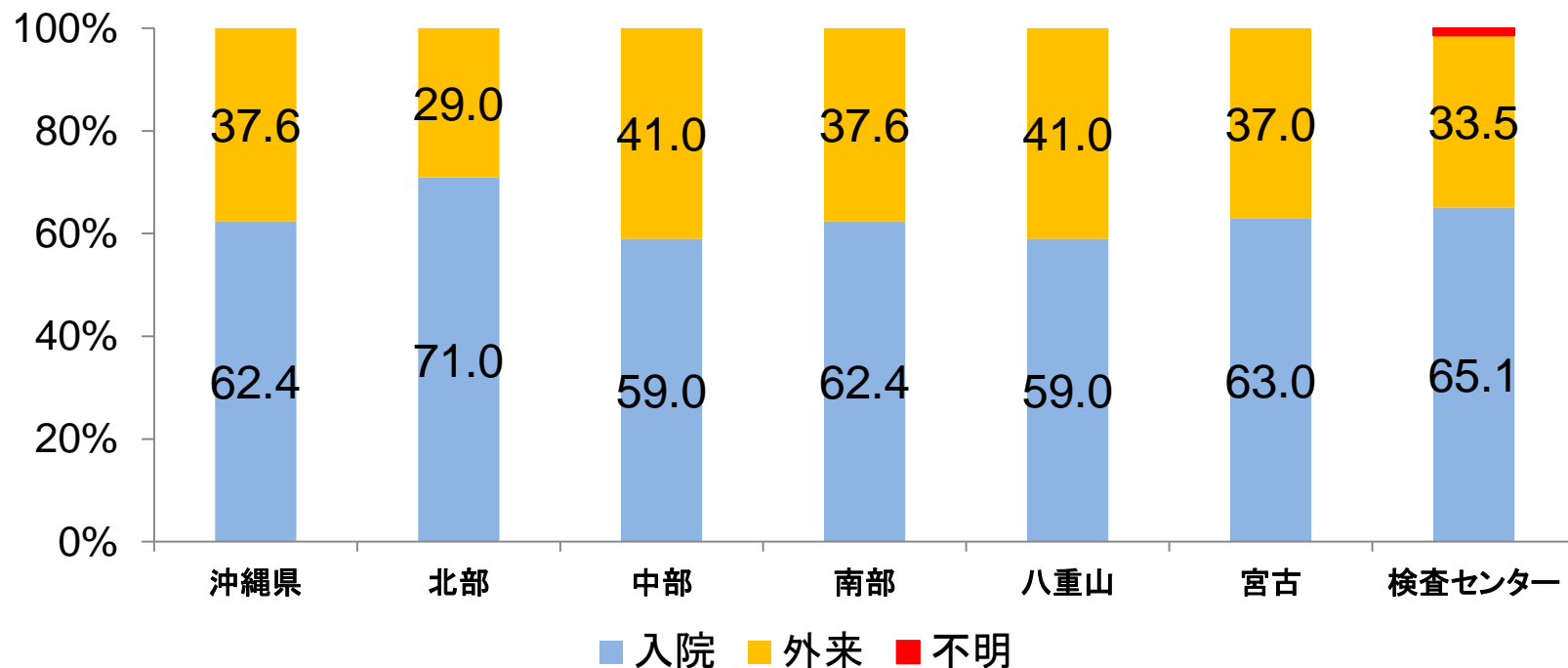
解析項目

- 1) *P. aeruginosa* の分離状況
- 2) アンチバイオグラム
- 3) 3系統薬剤における耐性菌の割合と経年変化
- 4) MBLs 産生 *P. aeruginosa* の薬剤感受性について
- 5) POT 法による *P. aeruginosa* 分子疫学解析

1) *P. aeruginosa*の分離状況

- 入院・外来別分離率
- 各施設における耐性 *P. aeruginosa* の分離頻度

入院・外来別分離率



	沖縄県	北部	中部	南部	八重山	宮古	検査センター
施設数	12	1	4	4	1	1	1
入院	2,497	326	900	746	102	143	280
外来	1,507	133	626	449	71	84	144
不明	0	0	0	0	0	0	6
total	4,010	459	1,526	1,195	173	227	430

・沖縄県全体と比較して各地区における入院・外来別分離率に変化はみられなかった。

各施設における耐性 *P. aeruginosa* の分離頻度

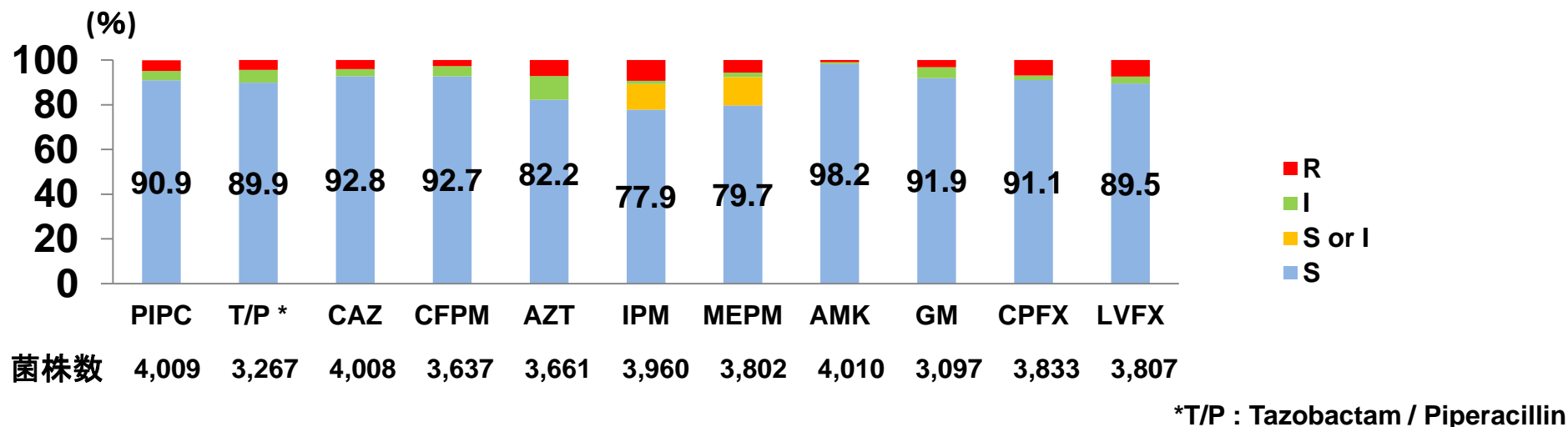
施設 番号	分離 株数	単剤耐性 (%)			二剤耐性 (%)			MDRP (%)
		カルバペネム	AMK	キノロン	カルバペネム + AMK	カルバペネム + キノロン	AMK + キノロン	
1	315	23 (7.3)	3 (1.0)	14 (4.4)	0	7 (2.2)	1 (0.3)	6 (1.9)
3	373	50 (13.4)	0	10 (2.7)	0	11 (2.9)	0	5 (1.3)
4	173	11 (6.4)	0	11 (6.4)	1 (0.6)	5 (2.9)	1 (0.6)	3 (1.7)
5	611	9 (1.5)	0	5/611 (0.8)	0	1 (0.2)	0	0
6	307	22 (7.2)	3 (1.0)	10 (3.3)	1 (0.3)	10 (3.3)	0	0
7	173	2 (1.2)	0	3 (1.7)	0	5 (2.9)	0	2 (1.2)
8	459	32 (7.0)	1 (0.2)	14 (3.1)	0	5 (1.1)	0	0
9	246	13 (5.3)	3 (1.2)	16 (6.5)	2 (0.8)	1 (0.4)	2 (0.8)	0
11	342	23 (6.7)	2 (0.6)	13 (3.8)	0	16 (4.7)	1 (0.3)	1 (0.3)
12	354	38 (10.7)	10 (3.8)	32 (9.0)	0	9 (2.5)	2 (0.6)	8 (2.3)
14	227	10 (4.4)	1 (0.4)	7 (3.1)	0	0	0	0
15	430	23 (5.3)	7 (1.6)	62 (14.4)	3 (0.7)	17 (4.0)	6 (1.4)	6 (1.4)
全体	4,010	256 (6.4)	30 (0.8)	197 (4.9)	7 (0.2)	87 (2.2%)	13 (0.3)	31 (0.7)

2) アンチバイオグラム

- ・アンチバイオグラムと各薬剤耐性率の比較
- ・各薬剤の MIC 分布

アンチバイオグラムと各薬剤耐性率の比較

【アンチバイオグラム (2015)】

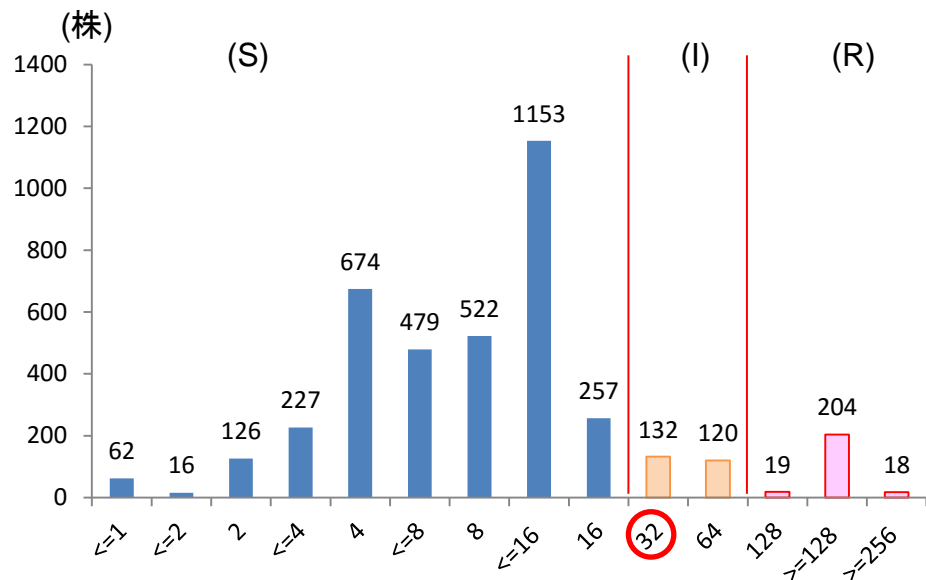


【本サーベイランスと JANIS の耐性率の比較】

	PIPC	T / P	CAZ	CFPM	AZT	IPM	MEPM	AMK	GM	CPFEX	LVFX
本サーベイランス (菌株数)	6.0% (4,009)	4.4 (3,267)	4.1 (4,008)	2.7 (3,637)	7.2 (3,661)	9.2 (3,960)	5.5 (3,802)	1.0 (4,010)	3.2 (3,097)	6.9 (3,833)	7.4 (3,807)
沖縄 (JANIS)	9.1	7.8	7.2	4.1	10.5	16.1	10.0	1.1	2.7		7.3
全国 (JANIS)	10.8	8.9	8.7	6.7	14.0	19.3	13.4	1.5	9.2		12.3

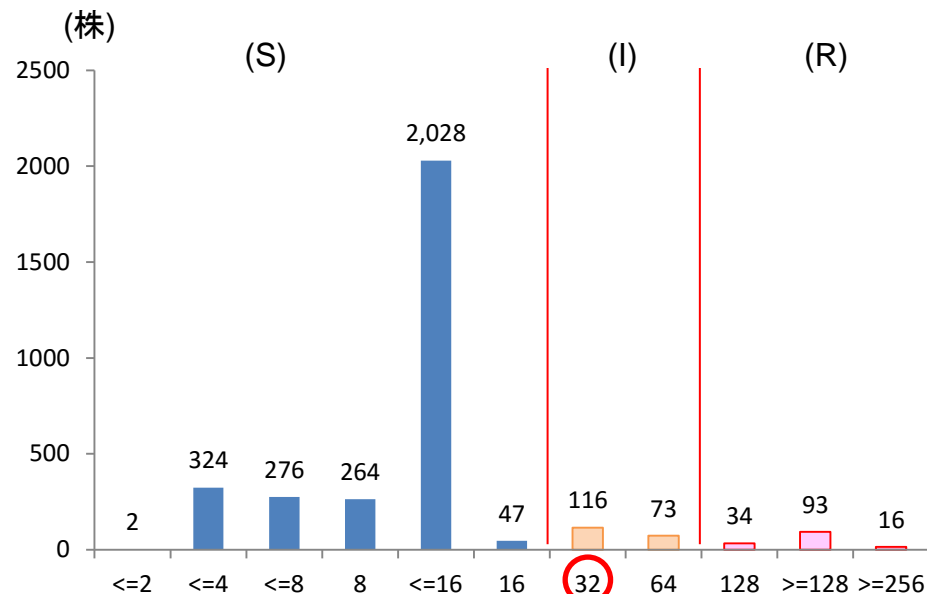
・JANIS (沖縄、全国) と比較して、β - ラクタム系薬の耐性率は低かった。

○ PIPC (n=4,009)



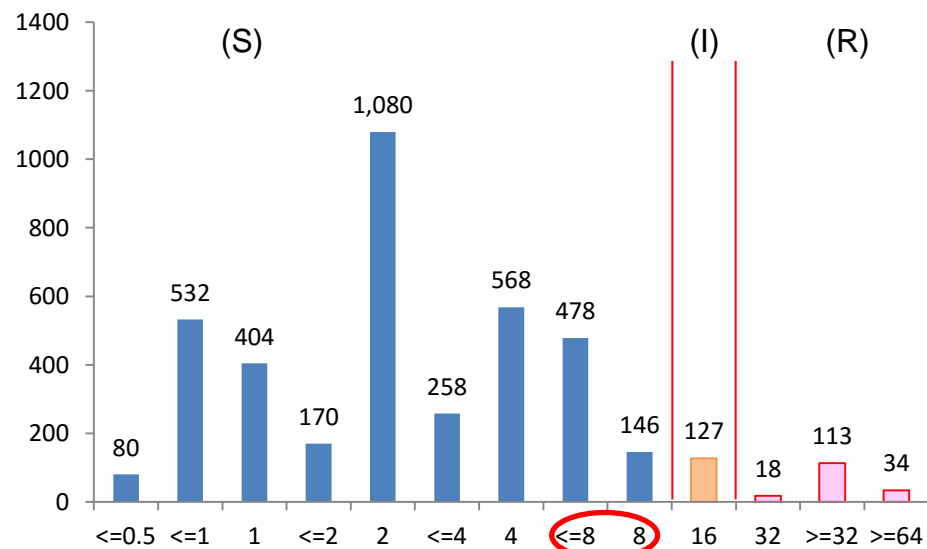
○ TAZ/PIPC (n=3,273)

○: MIC90



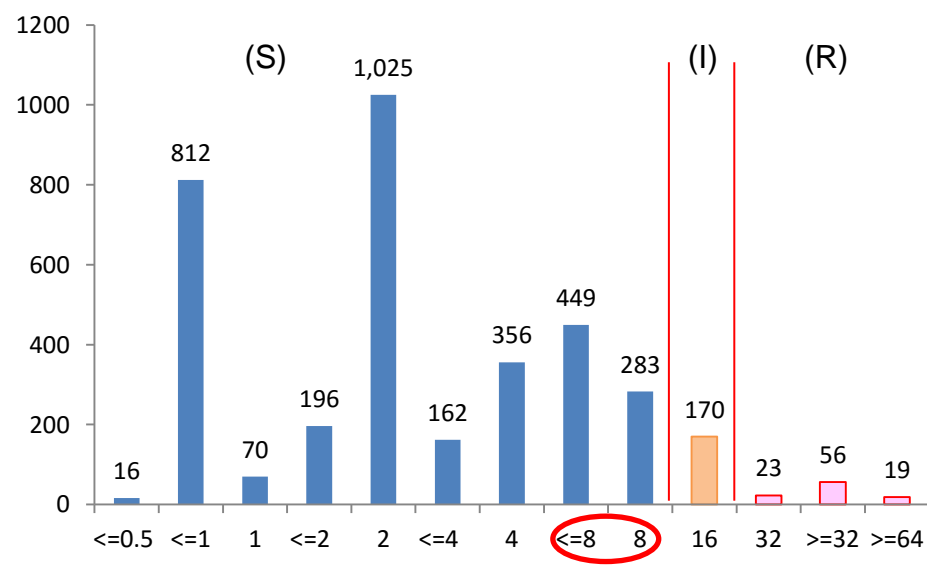
○ CAZ (n=4,008)

(株)

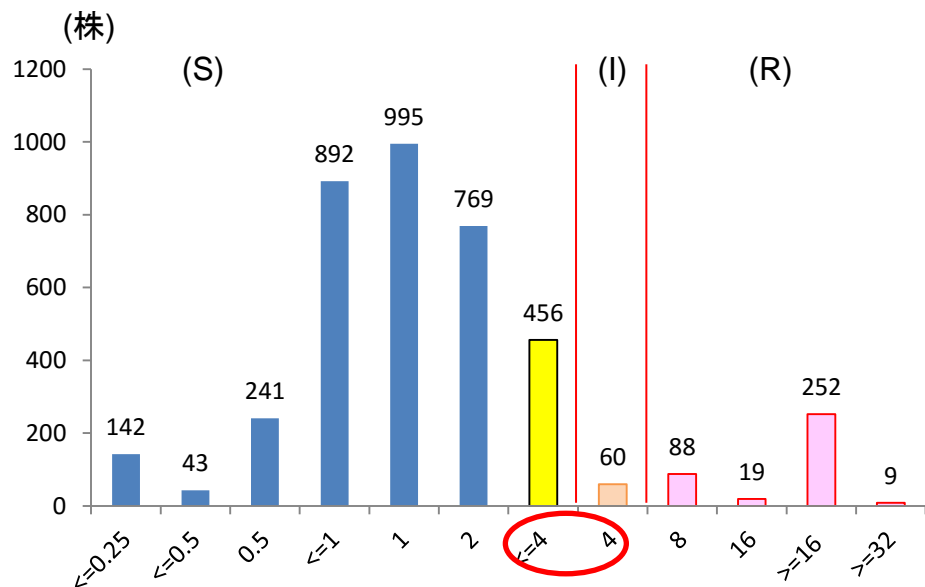


○ CFPM (n=3,637)

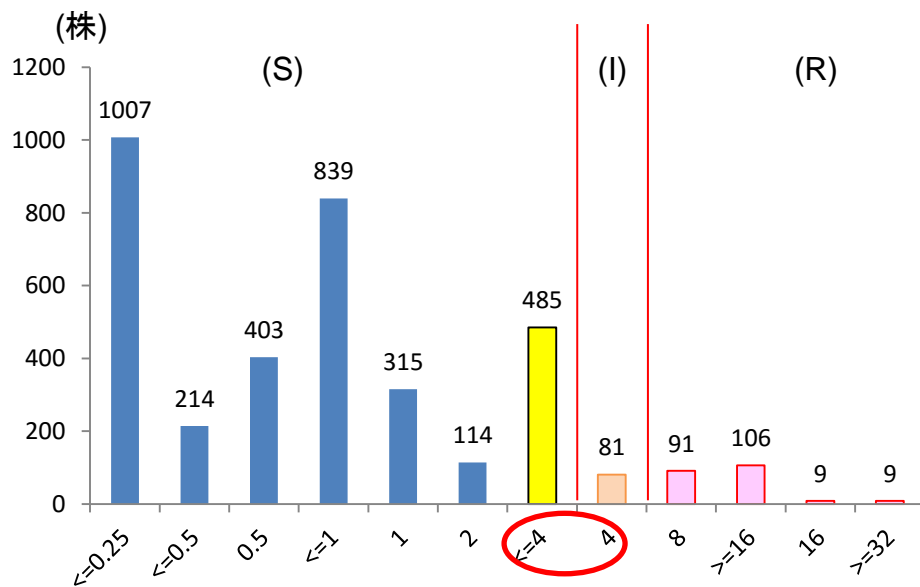
(株)



○ IPM (n=3,966)



○ MEPM (n=3,673)



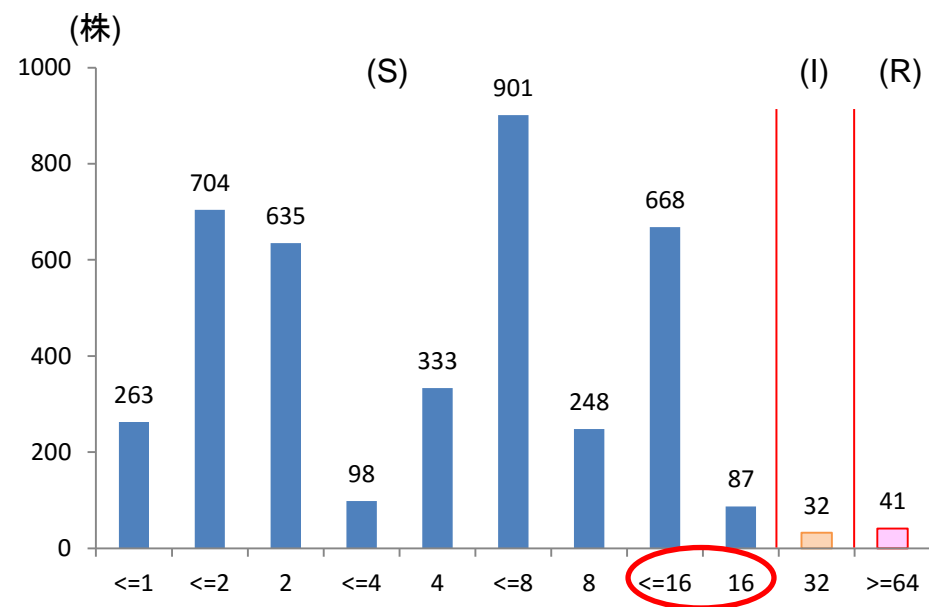
○: MIC90

○IPM と MEPM 両薬剤において

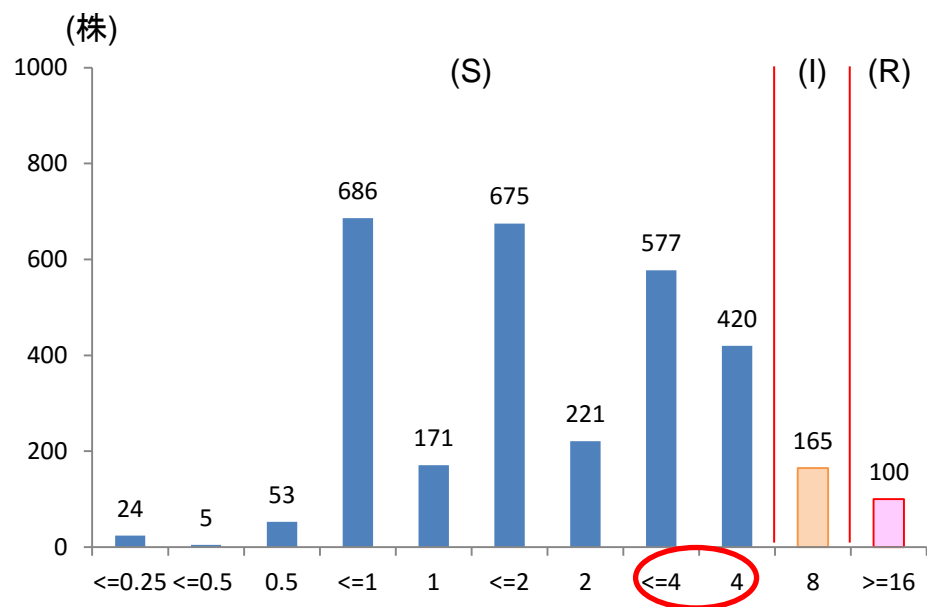
薬剤感受性試験用プレートの希釈系列の設定で最小値が「MIC ≤ 4 」と旧 CLSI のブレイクポイントで希釈系列が設定されている薬剤感受性プレートを使用している施設があった。

IPM / MEPM	S	I	R
CLSI M100-S19	≤ 4	8	$16 \le$
CLSI M100-S22	≤ 2	4	$8 \le$

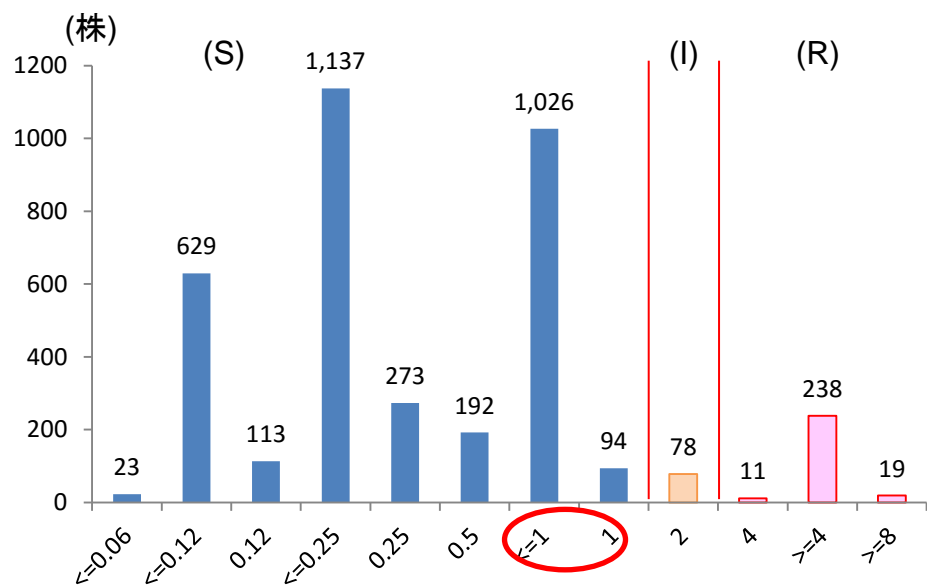
○ AMK (n=4,010)



○ GM (n=3,097)

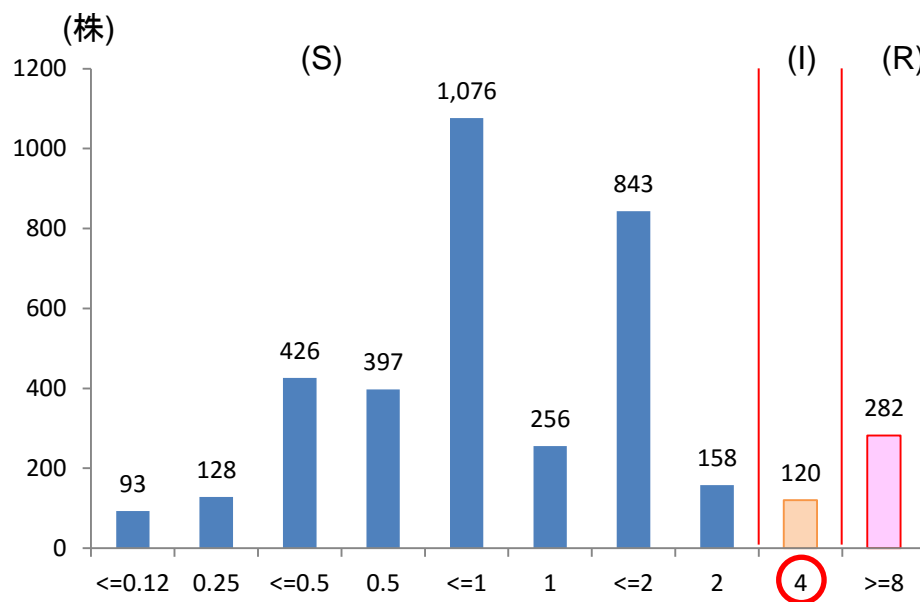


○ CPFEX (n=3,833)



○ LVFX (n=3,779)

○ : MIC90

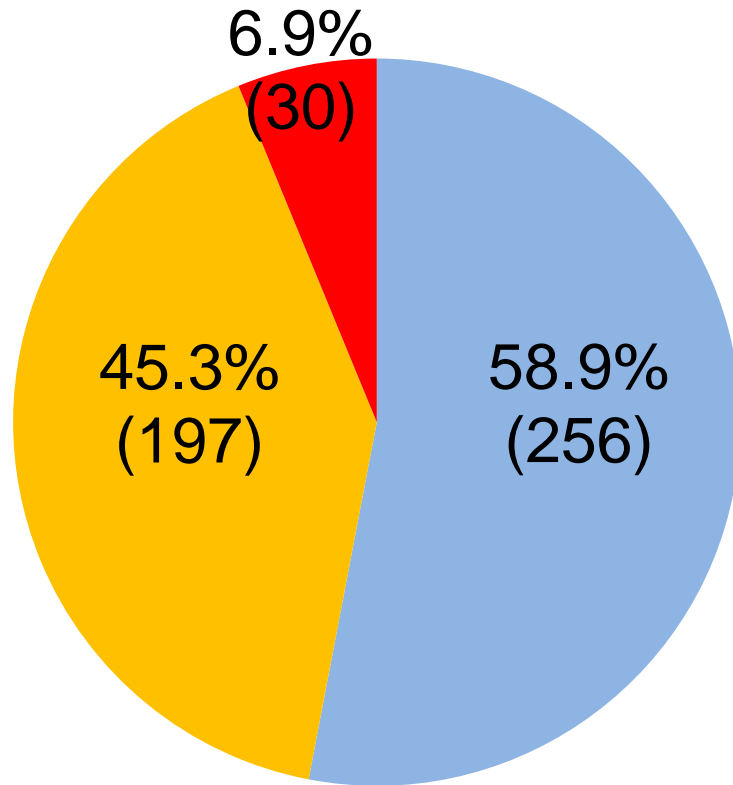


3) 3系統薬剤 (IPM・AMK・CPFX)における 耐性菌の割合と経年変化

- 耐性 *P. aeruginosa* の割合
- 地区別における3系統の薬剤耐性率の経年変化
- 2剤耐性および MDRP の経年変化

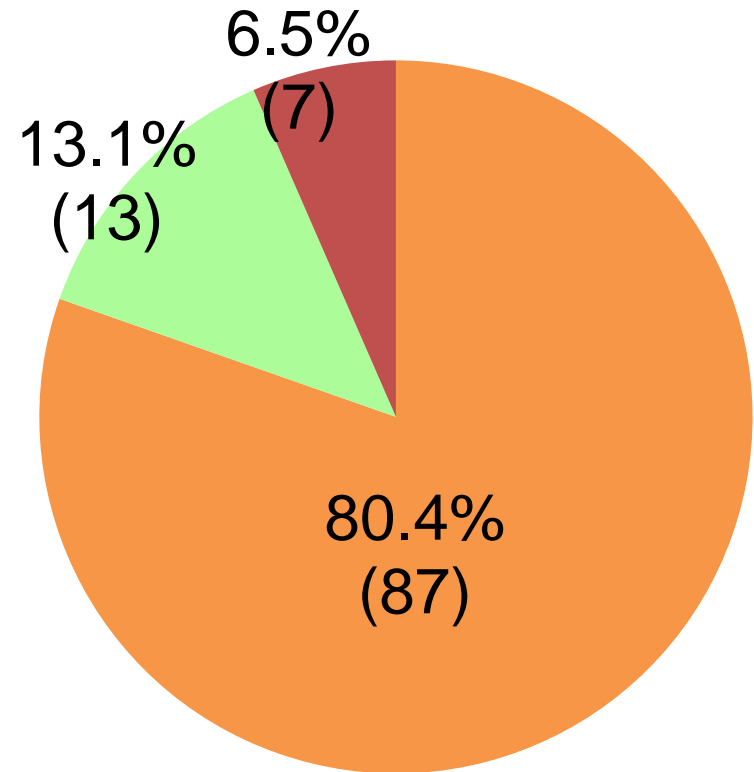
耐性 *P. aeruginosa* の割合

○単剤耐性株 (N=483)



- カルバペネム系薬
- キノロン系薬
- AMK (≥32含む)

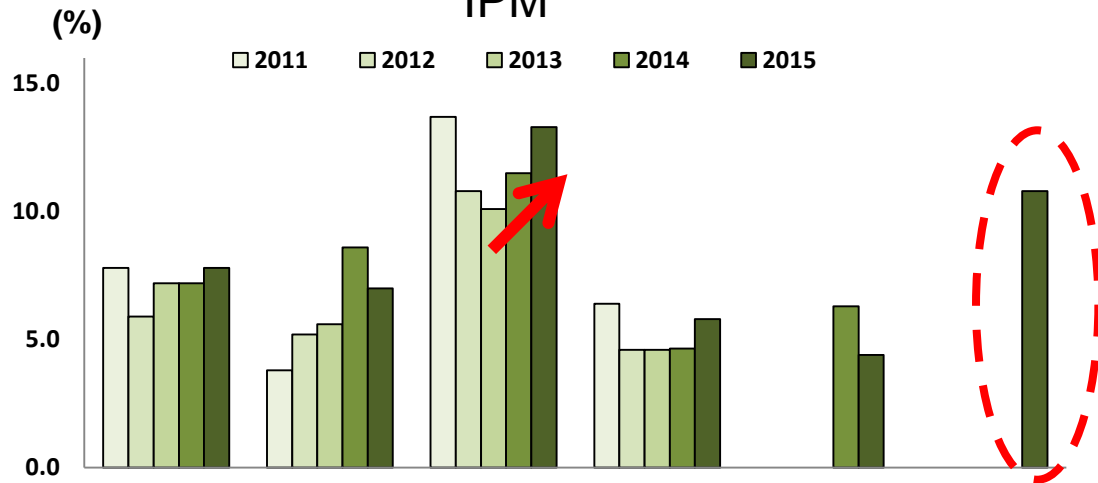
○2剤耐性株 (N=107)



- カルバペネム系薬 & キノロン系薬
- AMK & キノロン系薬
- AMK & カルバペネム系薬

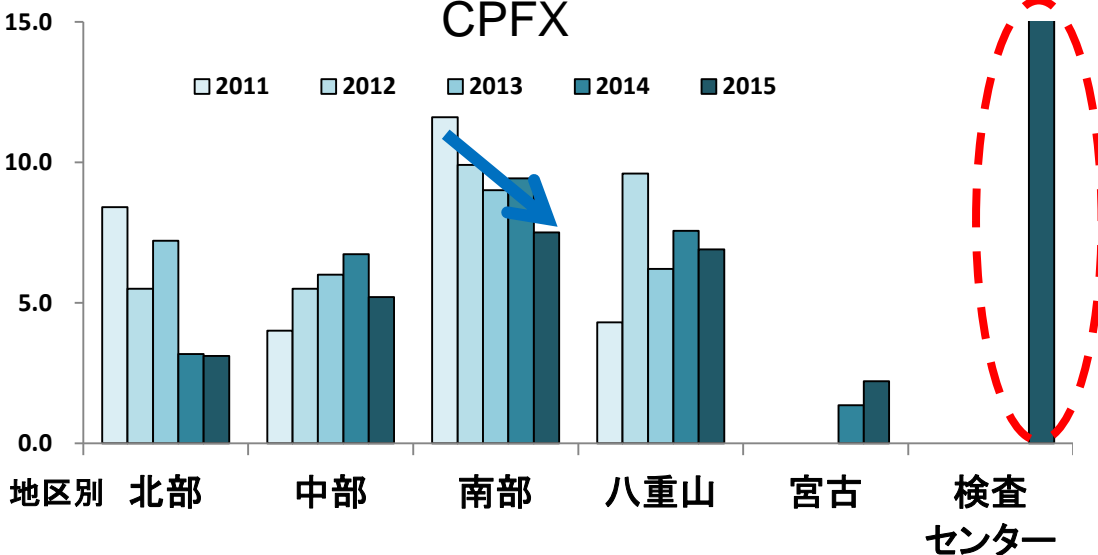
地区別における3薬剤耐性率の経年変化

IPM

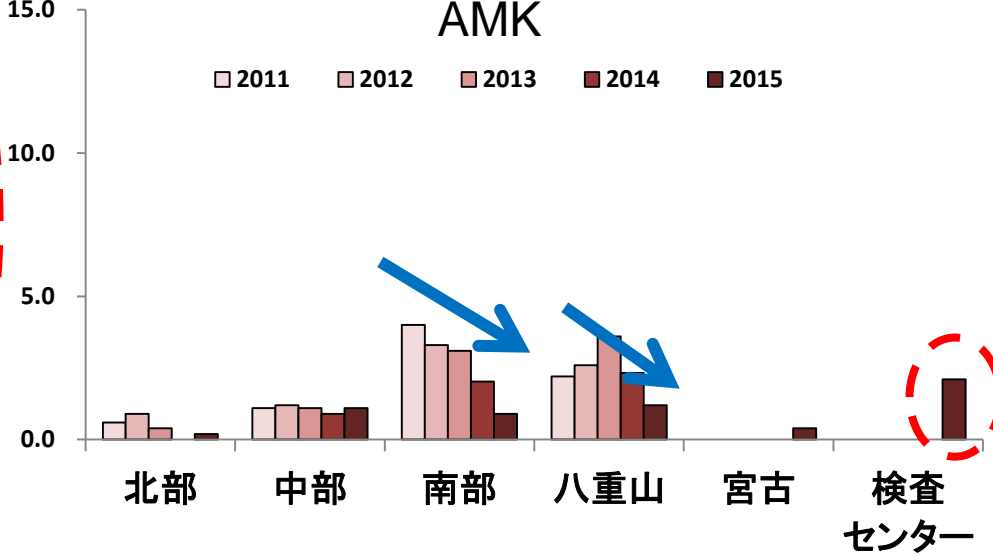


- ・(南部地区)
IPMは耐性率が増加傾向にあり、CPFXとAMKは減少傾向であった。
- ・(八重山地区)
AMKの耐性率は減少傾向にあった。
- ・(検査センター)
3系統の薬剤すべてで高い耐性率を示した。

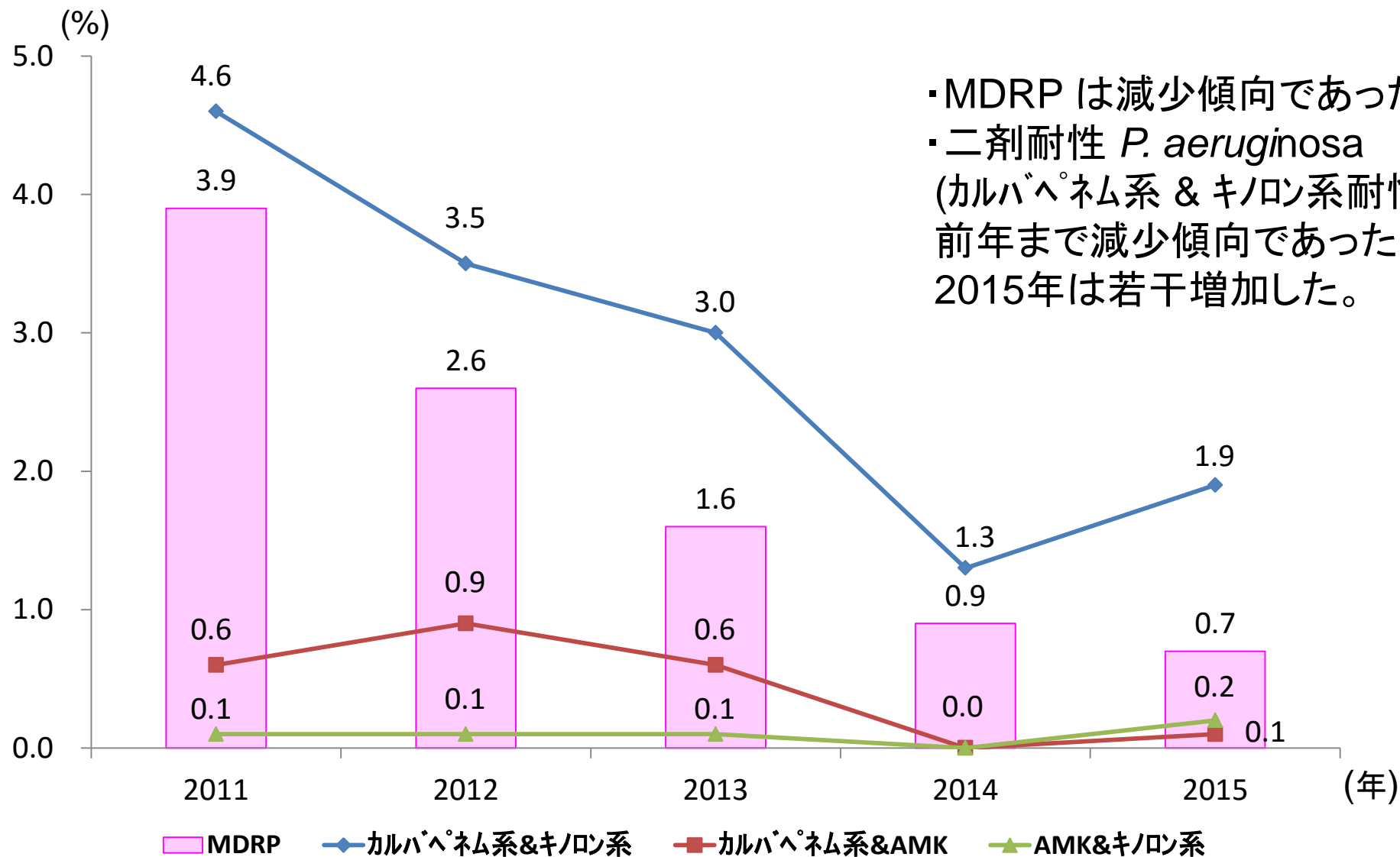
CPFX



AMK



MDRP と 2剤耐性 *P. aeruginosa* の経年変化



- ・MDRP は減少傾向であった。
- ・二剤耐性 *P. aeruginosa* (カルバペネム系 & キノロン系耐性) は前年まで減少傾向であったが、2015年は若干増加した。

4) MBLs 産生 *P. aeruginosa* の薬剤感受性について

MBLs 産生 *P. aeruginosa* の薬剤感受性(2015)

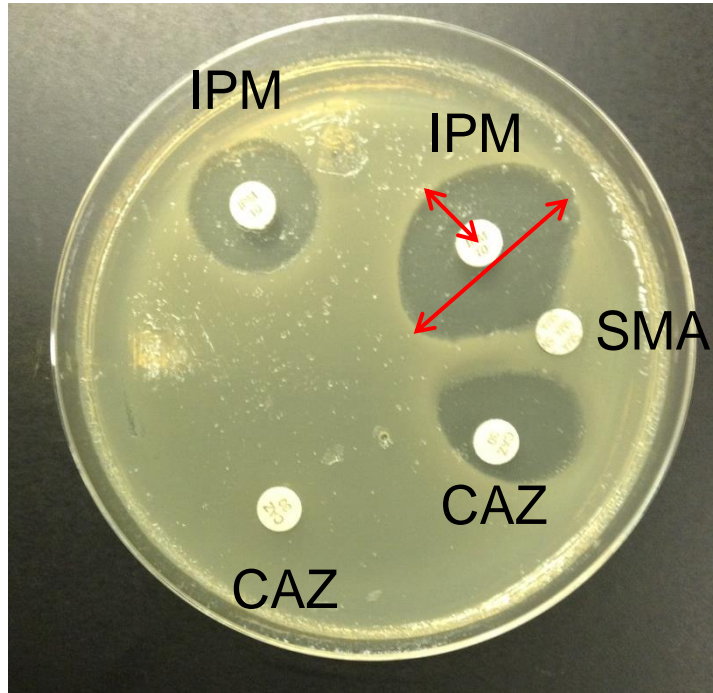
(N=11)

施設 番号	菌種	MIC (µg/mL)										
		PIPC	PIPC/TAZ	CAZ	CFPM	AZT	IPM	MEPM	AMK	GM	CPFX	LVFX
3	<i>P. aeruginosa</i>	32	<=16	4		4	>8	8	<=16	<=4		0.5
3	<i>P. aeruginosa</i>	<=16	<=16	2		4	>8	8	<=16	<=4		0.5
3	<i>P. aeruginosa</i>	<=16	<=16	2		4	>8	8	<=16	<=4		0.5
5	<i>P. aeruginosa</i>	16	<=16	8	2	16	4	>16	<=1		<=0.12	<=1
6	<i>P. aeruginosa</i>	16	32	1	<=1		1	16	<=1		<=0.12	<=1
11	<i>P. aeruginosa</i>	8	<=16	4	4	16	>8	8	2	1	0.5	4
11	<i>P. aeruginosa</i>	16	<=16	4	>16	>16	8	8	2	1	1	4
7	<i>P. aeruginosa</i> (MDRP)	128	32	>16	>32	>32	>16	>16	>32		>4	>4
7	<i>P. aeruginosa</i> (MDRP)	128	64	>16	>32	>32	>16	>16	>32		>4	>4
7	<i>P. aeruginosa</i>	>128	128	>16	>32	>32	>16	>16	4		>4	>4
14	<i>P. aeruginosa</i>	>=128	>=128	16	8	>=64	>=16	>=16	<=2	2	<=0.25	1

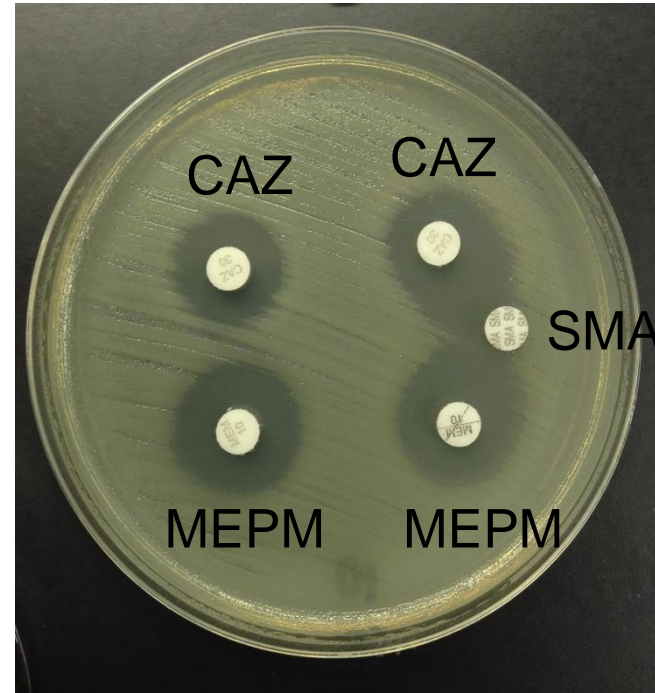
* β-ラクタム系薬剤について感性 (S) を青字で示す。

SMA ディスクを用いた MBLs 検出法

SMA : メルカプト酢酸ナトリウム (3mg/ディスク; 栄研化学)



MBLs (+)



MBLs (-)

○ 判定法

対象ディスクと比較して、**垂直方向に 5mm 以上の拡大** が認められた場合にのみ「陽性」と判定する。

*画像提供

琉球大学医学部附属病院 細菌検査室

まとめ①

- ・地区別の3薬剤耐性率の年次変化にて、南部地区は IPM の耐性率が増加傾向にあり、CPFX・AMK は減少傾向にあった。
- ・八重山地区における AMK の耐性率は減少傾向を示した。
- ・MDRP は、沖縄県全体では減少傾向にあった。
2 剤耐性株のうち、カルバペネム/キノロン耐性の株は前年と比較して増加傾向にあり、中部・南部・八重山地区にて、増加を示した。
- ・検査センターの 3 薬剤耐性率は、他の地区に比べて高い耐性率を示した。
- ・MBLs 産生株と判定された株のうち、カルバペネム系薬以外の β -ラクタム系抗菌薬の MIC の低い株が多くみられた。このことから、各施設において、MBLs 産生を疑う明確なスクリーニング基準を設ける必要があり、また、SMA 法陽性株については遺伝子検査を行う必要があるのではないかと考える。

5) POT 法による *P. aeruginosa* 分子疫学解析

- 概要
- 方法
- 電気泳動結果
- 結果および考察

POT 法による *P. aeruginosa* 分子疫学解析

POT 法: 2本の反応チューブを用いて Multiplex PCR を行い、PCR 産物の有無を2進法で判定し、得られた POT 値から遺伝子型を決定する。

目的: 沖縄県内で検出された 2剤耐性または多剤耐性 *P. aeruginosa* (MDRP) の疫学解析

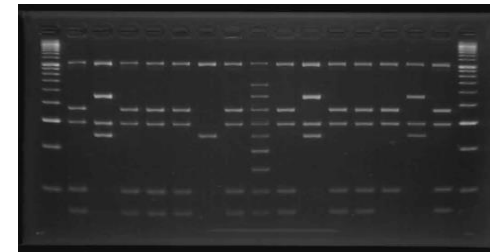
対象期間: 2014年1月～2015年12月

収集菌株: 41株 (MDRP: 19株 2剤耐性: 22株)*¹

*¹. 同一患者 (2名) から分離された菌株を7株含む

方法:

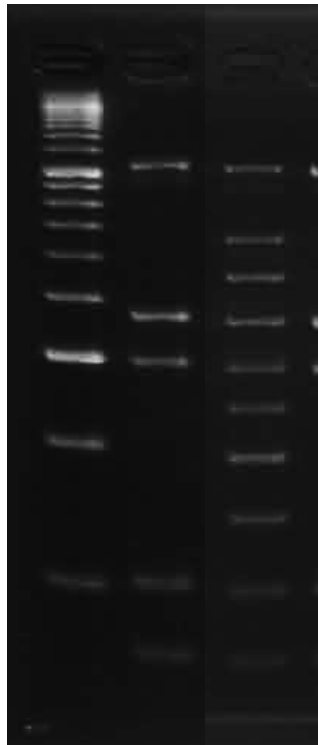
1. 前培養: スキムミルクにて冷凍保存株 (-80°C) した菌をヒツジ血液寒天培地に接種し、1回継代 (18時間培養) した菌株を用いた。
2. DNA 抽出: Cica genius DNA Extraction Kit (関東化学)
3. PCR: Cica genius 分子疫学解析 POT キット(緑膿菌用, 関東化学)
 - 1) PCR mixtute: 添付書に準ず。
 - 2) PCR 条件:
 - 94°C; 15秒 65°C: 60秒 (× 15回)
 - 94°C; 15秒 65°C: 180秒 (× 10回)
4. 電気泳動; 4% agarose gel / 1時間
5. 得られたバンドサイズから POT 値に換算



電気泳動結果からPOT値への変換

Reaction Mixture 1

Marker
Sample
Pos Ctl

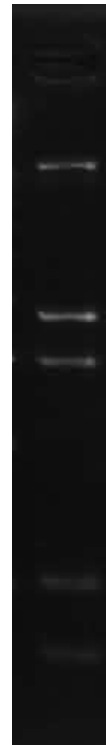


(bp) PCR
Pos Ctl

506
336
281
235
201
175
151
126
103
85

2進法に変換

Sample



1
0
0
1
1
0
0
0
1
1

POT値へ変換

PCR 産物 (bp)	バンドの有無(0or1)	POT係数
506	1	-
336	0	×
281	0	×
235	1	×
201	1	×
175	0	×
151	0	×
126	0	×
103	1	×
85	1	×

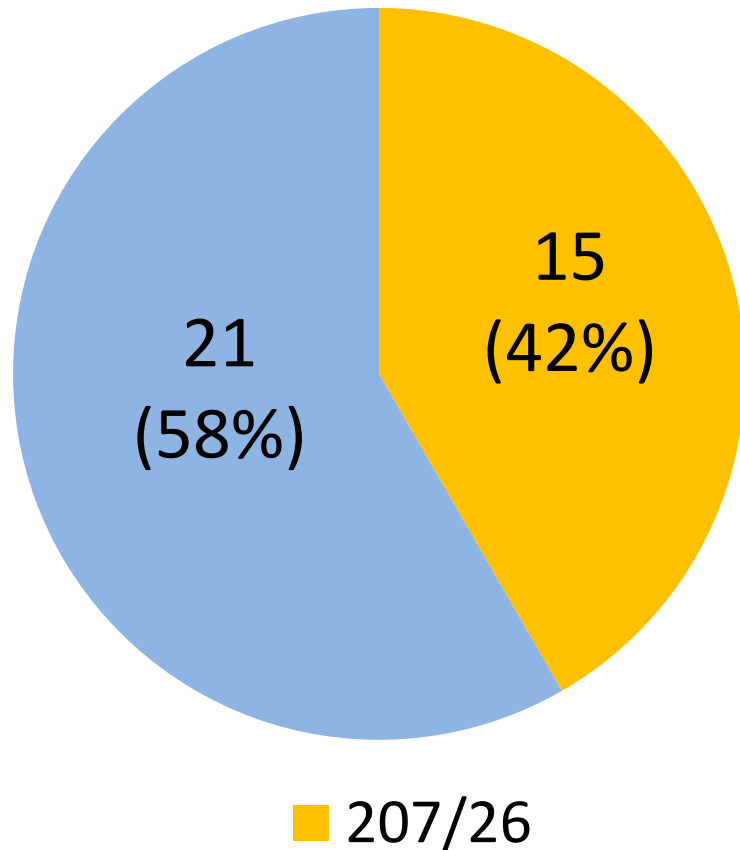
POT1
192

POT2
24

Positive Control を対象として、各 Sample レーンに各サイズのバンドがあるかを確認し、ある場合を“1”、ない場合を“0”とカウントして、解析用 Excel に入力し、POT 型へと変換する。Reaction Mixture 1と2それぞれの POT 値を合計して、POT 型が決定される。

解析結果

○POT 型の内訳 (N=36、重複株を除く)



主な POT 型は 207/26 (42%) であった。

POT 型 (POT1/POT2)	株数
44/0	1
124/0	2
125/0	1
126/0	2
201/16	1
203/32	1
207/0	2
207/4	1
207/8	1
207/26	15
207/58	1
364/0	1
376/0	1
383/0	1
383/4	3
410/0	1
622/20	1
Total	36

各施設における 207/26 型

施設 No.	総株数	207/26	207/26 (MDRP)
3	13	7	5
12	9	5	5
15	8	1	1
4	4	1	1
13	1	1	1
7	1	-	-
Total	36	16	14

施設 No.12 にて検出された 207/26 型は、同一病棟の患者 (5名) から検出された株であり、院内伝播が疑われた株であった。施設 No.3 については不明であった。

まとめ②

- ・17 の POT 型が検出された。最も多く検出された型は **207/26 型** (MDRP:13株、2剤耐性:2株) であった。院内伝播が疑われた 5株は同型 (207/26型) であった。
- ・**203/32 型**と **364/0 型**は、それぞれ同一の患者から異なる時期に検出された株であった。異なる時期に検出されたそれぞれの株の POT 型が同じであることから、患者は同一菌株で感染もしくは保菌していることが示唆された。
- ・POT1 における 207 型は分離事例の多い型であり、MDRP の報告も多い。
今回、207/26 型は八重山地区を除く、5 施設すべてより検出されており、沖縄県または各施設における優位な型である可能性が示唆された。今後、さらなる解析が必要である。