

V. 薬剤耐性菌の性状解析

1.対象菌株の選定

今回の調査において薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用した酵素基質培地(クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地、クロモアガーVRE スクリーン培地)から分離された菌株および薬剤感受性試験の結果から ESBL 産生が疑われる菌株を対象とした。

2.試験方法

1)ESBL の確認

クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地から分離された大腸菌については ESBL 産生が疑われるため、MASTDISCS™ID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase(ESBL) Detection Discs(Mast 社製)を用いて ESBL の確認試験を行った。

2)ESBL の遺伝子型別

分離された ESBL 産生大腸菌については PCR 法^{4,5}により *bla*_{CTX-M-1}、*bla*_{CTX-M-2}、*bla*_{CTX-M-9}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV} の検出を行った。

3)PFGE 解析

サルモネラ属菌(*S. Infantis* および *S. Schwarzengrund*)、ESBL 産生大腸菌について、以下に示した条件でパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による核型解析を行った。供試菌株のプラグを作成し、制限酵素 *Xba* I で 30℃、5 時間の処理を行った後、CHEF DRⅢを用いて電気泳動を行った。なおゲルは 1%PrimeGel™ Agarose GOLD 3-40K、泳動バッファーは×0.5TBE を用いた。また泳動条件は温度 14℃、電圧 6V/cm、角度 120°、パルスタイム 2.2-54.2 秒を 18 および 20 時間で行った。泳動終了後、Ethidium bromide により染色を行い、GelDox XR を用いて画像データとした。さらに、得られた画像データをもとに BioNumerics を用いて平均距離法(UPGMA 法)により系統樹を作成した。

4)試験に使用した機器・培地

ESBL の確認に使用した試薬を表 53、ESBL の遺伝子型別に使用した機器および試薬を表 54、ESBL 遺伝子検出用プライマーを表 55、PFGE 解析に使用した機器および試薬を表 56 に示した。

⁴ Hiki, M., et al.: *Foodborne Pathog Dis.*,**10**, 243-249, 2013

⁵ Kojima, A., et al.: *Antimicrob Agents Chemother.*,**49**, 3533-3537, 2005

表53 ESB�の確認に使用した試薬

名称	メーカー名	ロットNo.
MASTDISCSTMID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs	MAST	349722
ミューラーヒントン寒天培地	Oxoid	1333385

表54 ESB�の遺伝子型別に使用した機器および試薬一覧

名称	メーカー名	機種番号
サーマルサイクラー	Applied Biosystem	Veriti 96 well Thermal Cycler
DNeasy® Blood & Tissue kit	QIAGEN	-
10× Ex Taq Buffer	TaKaRa	-
2.5mM dNTP Mixture		-
TaKaRa Ex Taq HS		-
Primer	SIGMA	-
1× TBE(Tris-Borate-EDTA)	TaKaRa	-
Agarose LO3「TaKaRa」		-

表55 ESB�遺伝子検出用プライマー一覧

ターゲット	5'-3'	PCR産物サイズ
<i>bla</i> _{TEM}	ATGAGTATTCAACATTTTCG TTACCAATGCTTAATCAGTG	1080 bp
<i>bla</i> _{SHV}	ATGCGTTATATTGCGCTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA	871 bp
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	GACTATTCATGTTGTTGTTATTTTC TTACAAACCGTTGGTGACG	950, 1122, 876 bp
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	ATGATGACTCAGAGCATTCG TCAGAAACCGTGGGTACGA	876 bp
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAACGG TCACAGCCCTTCGGCCGATGATTCT	1007 bp

表56 PFGE解析に使用した機器および試薬一覧

名称	メーカー名	機種番号
パルスフィールドゲル電気泳動装置	Bio-Rad	CHEF DR III
画像解析装置	Bio-Rad	GelDoc XR
<i>Xba</i> I	TaKaRa	-
PrimeGel™ Agarose GOLD 3-40K	TaKaRa	-

3. 結果および考察

1)ESBL 産生大腸菌の検出状況

クロモアガー-ESBL 培地から分離された大腸菌 167 株が ESBL 産生株と推定された。

2)ESBL 遺伝子型別

前項 1)において、167 株が ESBL 産生と推定されたが、確認試験としてクロモアガー-ESBL 培地から分離された大腸菌 167 株全てについて遺伝子型を調べ、表 57 に示した。ESBL 産生大腸菌の遺伝子型を見ると、*bla*_{SHV} を保有する株が 43 株で最も多く、次いで *bla*_{CTX-M-2} が 25 株、*bla*_{CTX-M-1} が 21 株であった。

表57 ESBL産生大腸菌の遺伝子型株数

遺伝子型	株数
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	21
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-2} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM}	11
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	25
<i>bla</i> _{CTX-M-2} + <i>bla</i> _{TEM}	18
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	16
<i>bla</i> _{CTX-M-9} + <i>bla</i> _{SHV}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-9} + <i>bla</i> _{TEM}	8
<i>bla</i> _{SHV}	43
<i>bla</i> _{TEM}	5
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{TEM}	15

3)PFGE 解析

S. Infantis

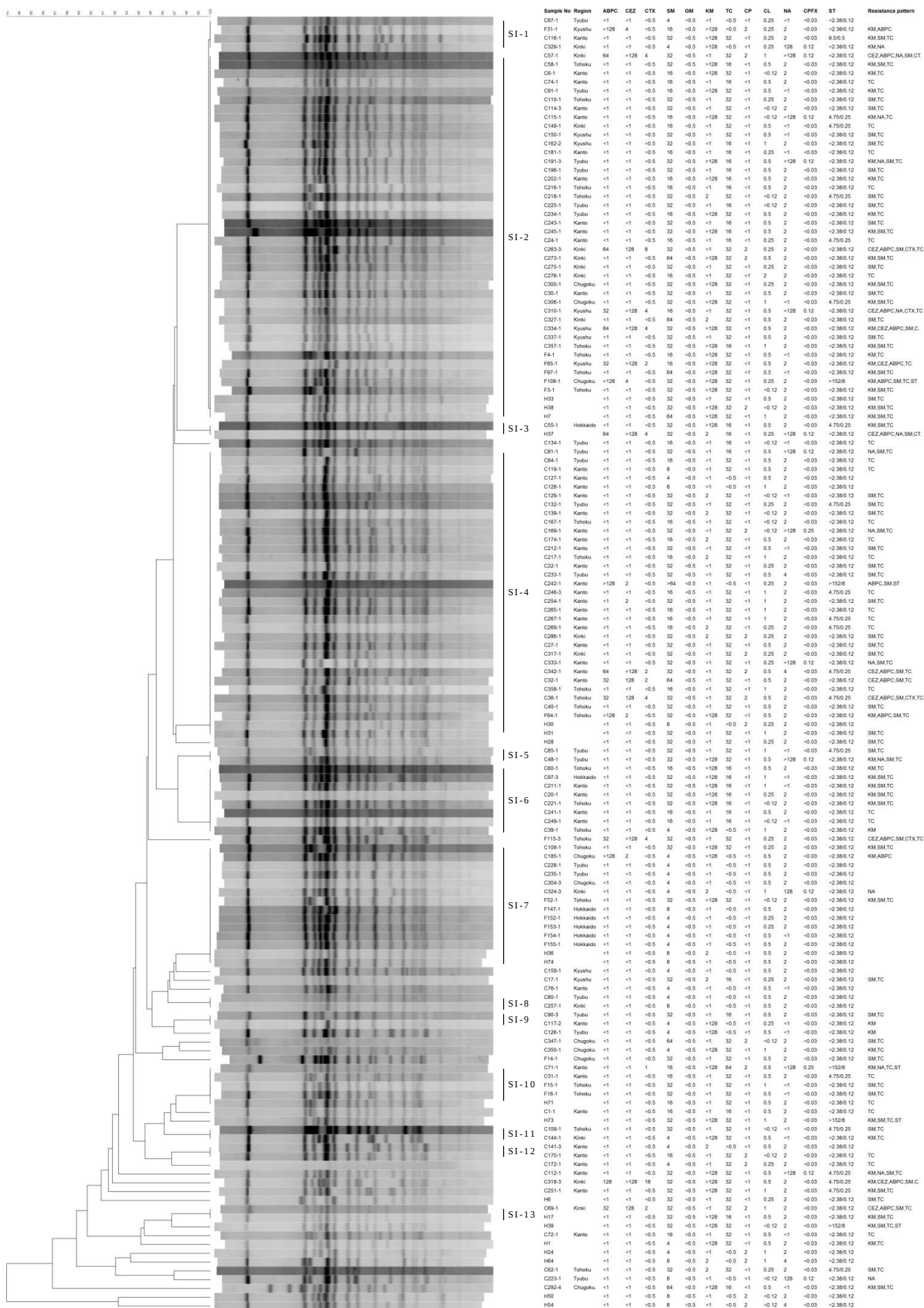
市販鶏肉および食鳥処理場鶏肉から分離されたサルモネラ属菌のうち、*S. Infantis* の PFGE による電気泳動図および平均距離法(UPGMA 法)により作成した系統樹を、薬剤感受性試験の結果と合わせて図 4 に示した。鶏肉から分離された *S. Infantis*(市販鶏肉由来 113 株、食鳥処理場鶏肉由来 18 株、ヒト由来 22 株)のうち制限酵素処理不完全のためスメア状となりバンドを確認できなかった株を除く 147 株について系統樹を作成したところ 40 パターンに分類された。この中で similarity 100%であった株は 13 パターン(SI-1 から SI-13)存在した。パターン SI-5 および SI-12 を示した株は、それぞれ同一の地域で採取された株であったが、これ以外のパターンを示した株は同一の PFGE パターン内でも採取地域が異なっていた。さらに SI-2、SI-7、SI-10 および SI-13 のように、鶏肉由来株とヒト由来株が同一 PFGE パターンを示す場合も存在し、薬剤感受性試験の結果が類似している株もあることから関連性が疑われた。

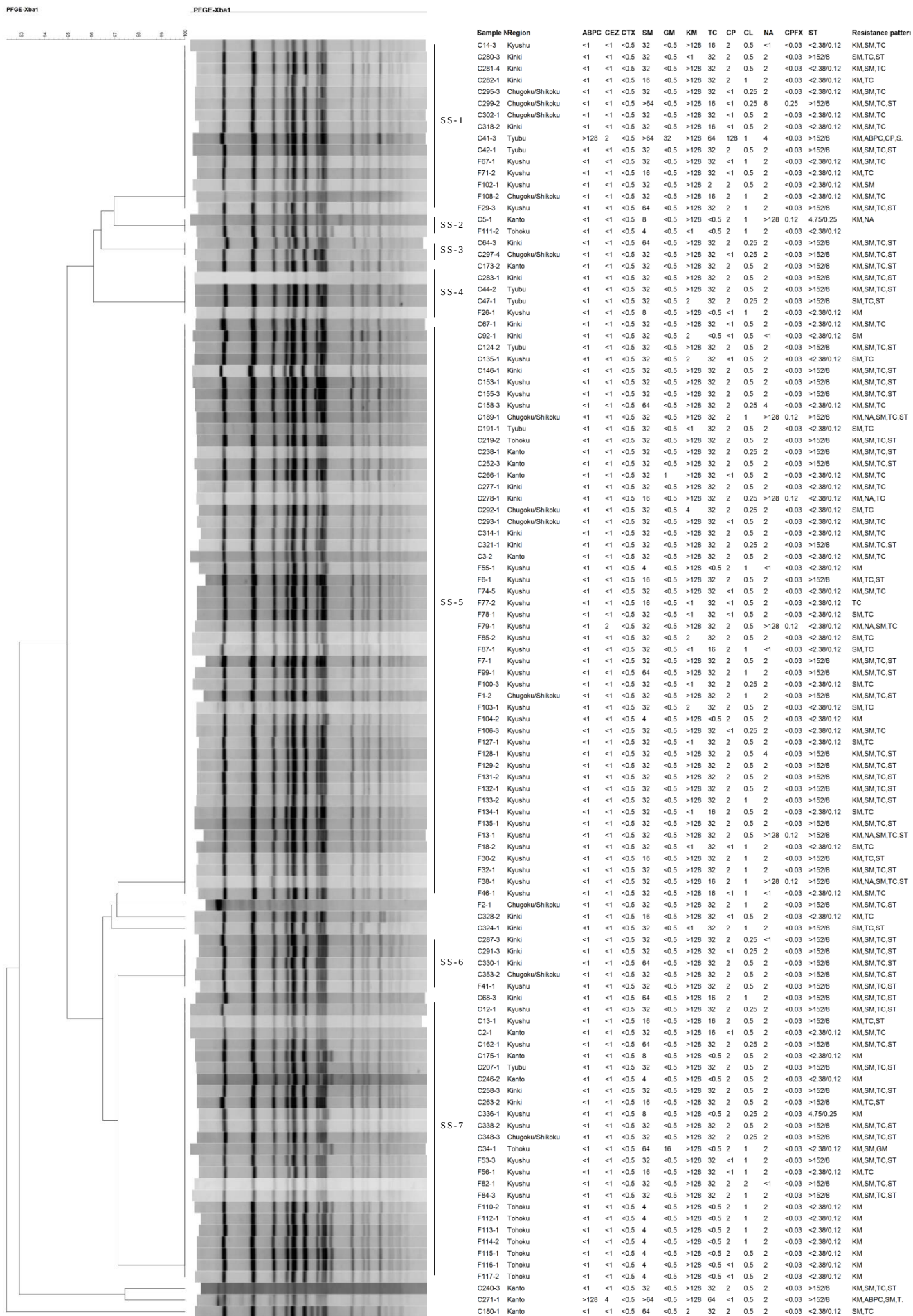
S. Schwarzengrund

市販鶏肉および食鳥処理場鶏肉から分離されたサルモネラ属菌のうち、*S. Schwarzengrund* の PFGE による電気泳動図および UPGMA 法により作成した系統樹を、薬剤感受性試験の結果と合わせて図 5 に示した。鶏肉から分離された *S. Schwarzengrund*(市販鶏肉由来 63 株、食鳥処理場鶏肉由来 49 株)のうち上記同様の理由によりバンドを確認できなかった株を除く 110 株について系統樹を作成したところ 13 パターンに分類された。この中で similarity 100%であった株は 7 パターン(SS-1 から SS-7)存在した。同一の PFGE パターンを示した中で薬剤感受性試験の結果を考慮してみると、類似している菌株もあることから *S. Infantis* と同様に関連性が疑われた。

ESBL 産生大腸菌

市販鶏肉および食鳥処理場鶏肉から分離された ESBL 産生大腸菌の PFGE による電気泳動図および UPGMA 法により作成した系統樹を、図 6 に示した。鶏肉から分離された ESBL 産生大腸菌のうち上記同様の理由によりバンドを確認できなかった株を除く 162 株について系統樹を作成したところ 151 パターンに分類された。この中で similarity 100%であった株は 12 パターン(EC-1 から EC-12)存在し、関連性が疑われた。





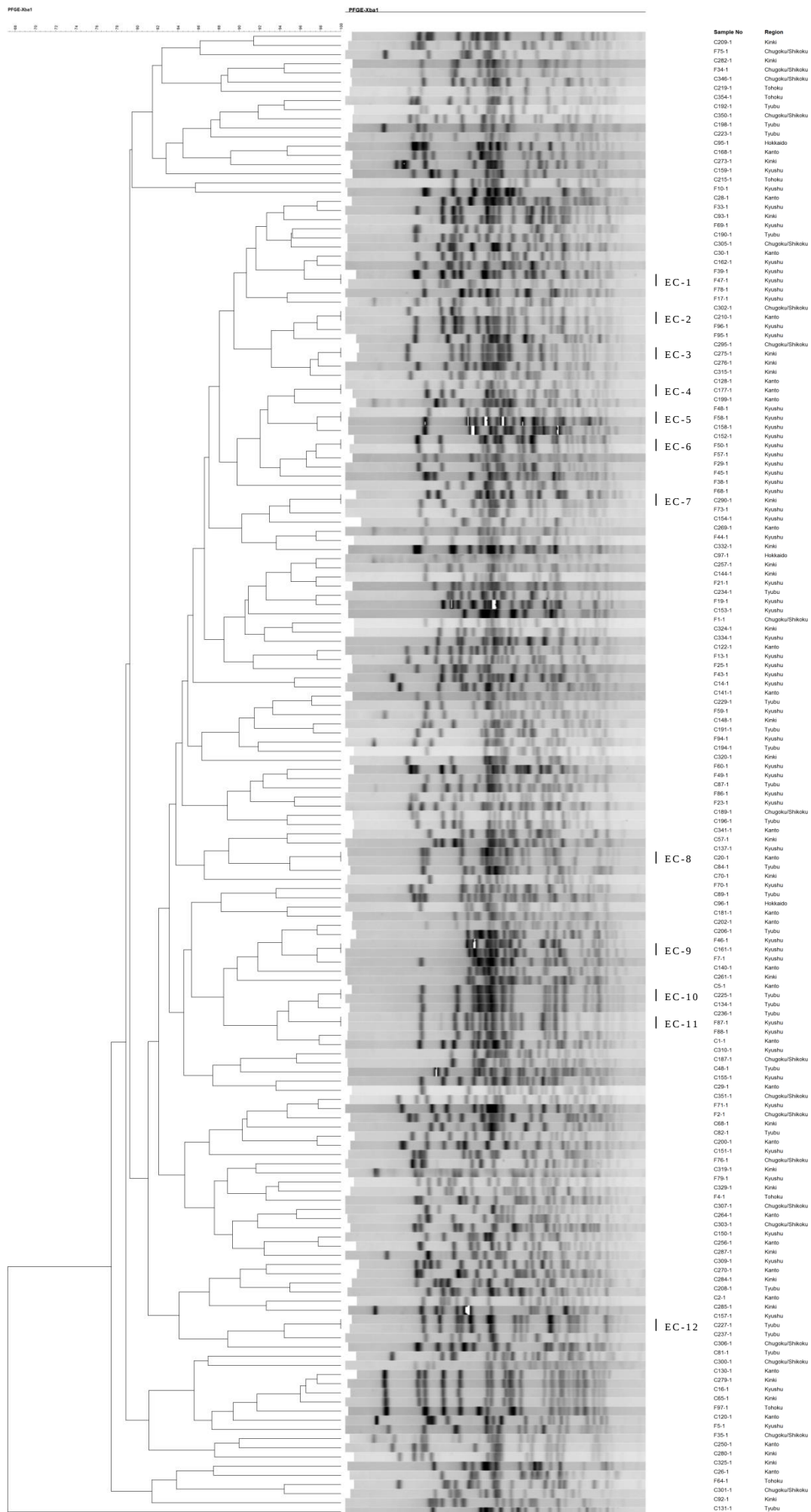


図 6 ESBL 産生大腸菌の PFGE による電気泳動図および系統樹

4.分離菌株の保存

本調査で分離され、薬剤感受性試験に供した菌株を-80℃で凍結保存した。
凍結保存した菌株数を表 58 に示した。

表58 凍結保存に供した分離菌株数

菌種		菌株数		
		市販鶏肉分離株	食鳥処理場鶏肉分離株	計
サルモネラ属菌	<i>S. Infantis</i>	113	18	131
	<i>S. Schwarzengrund</i>	63	49	112
大腸菌		106	60	166
腸球菌	<i>E. faecalis</i>	87	33	120
	<i>E. faecium</i>	77	25	102
合計		446	185	631

以 上