

## カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の ディスク拡散法を用いたスクリーニング検査に関する検討

<sup>1)</sup> 神戸大学医学部附属病院検査部, <sup>2)</sup> 同 感染制御部, <sup>3)</sup> 同 感染症内科

中村 竜也<sup>1)2)</sup> 小林 沙織<sup>1)</sup> 大沼健一郎<sup>1)</sup>  
楠木 まり<sup>1)</sup> 林 伸英<sup>1)</sup> 大路 剛<sup>1)3)</sup>  
時松 一成<sup>2)</sup> 三枝 淳<sup>1)</sup> 荒川 創一<sup>2)</sup>

(平成 28 年 3 月 4 日受付)

(平成 28 年 10 月 27 日受理)

Key words: carbapenemase, faropenem, Enterobacteriaceae, screening

### 要 旨

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) は世界的に増加傾向にあり, 特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) が問題となっており, 日本では IMP 型が主である. これらを迅速かつ正確に検出することは, 抗菌薬適正使用や院内感染対策において重要である. そこで, ペネム系およびカルバペネム系抗菌薬の薬剤感受性ディスクを用いて, CPE スクリーニング基準の設定を試みた. カルバペネマーゼ産生株に対する阻止円径は, FRPM (5 $\mu$ g) 6~12mm (平均 6.9mm) と最小の阻止円径を示した. 遺伝子型別では, IMP-6 で IPM (10 $\mu$ g), BIPM (10 $\mu$ g) の阻止円が 30mm 以上を示す株が存在した. FRPM において阻止円が形成された株は全て IMP-6 型であった. ROC 解析によるカルバペネマーゼ産生株の cutoff 値は, FRPM 12 mm, MEPM (10 $\mu$ g) 24mm, BIPM 29mm, DRPM (10 $\mu$ g) 25mm, IPM 26mm, PAPM (10 $\mu$ g) 24mm となり, 感度は FRPM で 100% と最も良好であった. 一方, 特異度は MEPM, DRPM が 93.44% を示し, FRPM は 85.25% と 2 剤に比較して若干低値を示した. FRPM (5 $\mu$ g) ディスクを使用した薬剤感受性試験は, 簡便かつ正確な CPE のスクリーニングを可能にすると考えられた.

[感染症誌 91: 14~19, 2017]

### 序 文

近年, 世界的にグラム陰性桿菌の薬剤耐性化が問題となっている<sup>1)~3)</sup>. その耐性化は, 菌種を超えて伝達可能なプラスミド遺伝子上に様々な耐性遺伝子が集簇していることが原因の一つとされている<sup>4)</sup>. そして, それらのプラスミドをグラム陰性桿菌が獲得しやすいことが耐性菌拡大の理由として挙げられる. さらに, これら薬剤耐性菌による病院内感染に関する報告もあり<sup>5)~8)</sup>, 院内感染対策上も重要な問題である. その代表的な薬剤耐性菌にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae: 以下 CRE) がある. 2013 年 7 月, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) は KPC や NDM-1 など

の metallo  $\beta$ -lactamase (MBL) 産生遺伝子を獲得した CRE の世界的な拡散について注意勧告し, 日本では CRE を 2014 年 9 月に感染症法の 5 類感染症に指定し, 最も高度の耐性菌と位置付けた. CRE の耐性機序として最も重要なものにカルバペネム系抗菌薬を分解するカルバペネマーゼがあり, カルバペネマーゼを産生する腸内細菌は Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) と称されている. 日本における CPE の現状は IMP 型の MBL 産生菌が多く<sup>9)</sup>, 特に imipenem に感性を示す IMP-6 型 MBL が問題となっている<sup>10)</sup>. また, カルバペネマーゼ産生遺伝子を獲得しているにも関わらず, カルバペネム系抗菌薬の MIC が低値を示す株が存在しており, これらを見逃してしまうケースがあると考えられる. これらの株は一見カルバペネム系抗菌薬が有効と捉えられるが, それら抗菌薬の使用により耐性化する危険性もあり注意

別刷請求先: (〒650-0017) 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2

神戸大学医学部附属病院検査部 中村 竜也

Table 1 Strains and genotypes used in consideration

Carbapenemase	No.	Cephalosporinase	No.	ESBL <sup>1)</sup>	No.
IMP-1		CIT		TEM	
<i>K. pneumoniae</i>	2	<i>E. coli</i>	13	<i>E. coli</i>	1
<i>C. freundii</i>	2	<i>P. mirabilis</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>E. cloacae</i>	3	DHA		SHV	
<i>K. oxytoca</i>	3	<i>E. coli</i>	4	<i>E. coli</i>	1
<i>P. rettgeri</i>	2	<i>K. oxytoca</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>S. marcescens</i>	2	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M1	
IMP-6		MOX-1		<i>E. coli</i>	1
<i>E. coli</i>	12	<i>K. pneumoniae</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>K. oxytoca</i>	2	Chrom <sup>2)</sup> AmpC		<i>K. oxytoca</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	11	<i>E. cloacae</i>	1	CTX-M2	
<i>E. cloacae</i>	1	DHA + M9		<i>E. coli</i>	3
GES		<i>K. pneumoniae</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	3
<i>E. coli</i>	5	<i>E. cloacae</i>	1	<i>P. mirabilis</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	1	DHA + memb		CTX-M9	
NDM-1		<i>E. coli</i>	1	<i>E. coli</i>	10
<i>E. coli</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	1	<i>K. pneumoniae</i>	2
KPC		Chrom <sup>2)</sup> AmpC + memb <sup>3)</sup>		<i>E. cloacae</i>	2
<i>K. pneumoniae</i>	1	<i>E. aerogenes</i>	1	ESBL + memb	
SMB				<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>S. marcescens</i>	1			<i>S. marcescens</i>	1
				K1	
				<i>K. oxytoca</i>	4

1) ESBL: Extended spectrum  $\beta$ -lactamase

2) chrom: chromosomal

3) memb: variation of outer membrane protein

が必要である<sup>11)</sup>。ゆえに、検査室においては簡便で効率よくCPEをスクリーニングした上で、各種確認試験を用いて正確に検出することが重要である。そこで、カルバペネムおよびペネム系抗菌薬のディスクを用いたCPEのスクリーニングについて検討した。

### 対象および方法

#### 1. 使用菌株

使用菌株は当院にて検出および近畿耐性菌研究会で収集され保存された各種 $\beta$ ラクタマーゼ産生腸内細菌110株を用いた。内訳 (Table 1) はカルバペネマーゼ産生株48株、非カルバペネマーゼ産生株62株とした。耐性機序の確認は、既報のディスク法<sup>12)~15)</sup>を用いた各種確認法およびPCR法<sup>16)~19)</sup>により決定した。外膜蛋白変異は、PCR法<sup>20)</sup>によるOmpK36の確認または上記確認方法にて陰性でかつカルバペネム系薬剤のMIC値が上昇 ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上)を示した場合とした。精度管理用株として、*Escherichia coli* ATCC25924を使用した。

#### 2. 薬剤感受性試験

ディスク拡散法はCLSIのディスク拡散法 (M02-A10) に従い実施した<sup>21)</sup>。保存菌株は、5% ヒツジ血液寒天培地 (BD) に塗布し37°C 18時間、培養した。発育集落を0.9%生理食塩水に0.5McFarland濃度になるように菌液を調整し、直径10cmのミュラーヒントン寒天培地 (BD) に塗布した。ディスクは、ディ

スクディスクペンサーを使用しディスク中央どうしの距離は2.0cmに設置した。培養時間は37°C 18時間とし判定した。阻止円 (mm) の直径をノギスにて2重測定し、その平均値を求めた。小数点以下は四捨五入した。ディスクは、KBディスク“栄研” (栄研化学) を使用し、薬剤はfaropenem (FRPM:  $5\mu\text{g}$ 含有), meropenem (MEPM:  $10\mu\text{g}$ 含有), imipenem (IPM:  $10\mu\text{g}$ 含有), biapenem (BIPM:  $10\mu\text{g}$ 含有), panipenem (PAPM:  $10\mu\text{g}$ 含有), doripenem (DRPM:  $10\mu\text{g}$ 含有) の6薬剤を測定した。

#### 3. ROC解析

測定した阻止円径を用いてMedCalc ver12.3.0 (<https://www.medcalc.org/>) を使用して、ROC解析を実施し、cutoff値を求めた。cutoff値に対する各種抗菌薬のカルバペネマーゼ産生株検出の感度・特異度を求めた。

### 結 果

#### 1. ペネム系および各種カルバペネム系の阻止円径 (Table 2)

カルバペネマーゼ産生株に対する阻止円径は、FRPM 6~12mm (平均6.9mm), MEPM 6~31mm (平均16.1mm), IPM 6~30mm (平均22.4mm), BIPM 6~34mm (平均25.4mm), PAPM 6~28mm (平均19.8mm), DRPM 6~27mm (平均17.6mm)であった。遺伝子型別では、IMP-6でIPM, BIPMの阻止円が30

Table 2 Mean inhibition zone diameters and ranges produced by six carbapenems against Enterobacteriaceae (n = 218) with various  $\beta$ -lactamases

$\beta$ -lactamase	No.	Mean inhibition zone diam in mm (range) with:					
		Faropenem	Meropenem	Imipenem	Biapenem	Panipenem	Doripenem
Carbapenemase							
IMP-1	14	6 (6)	16.0 (6-26)	17.9 (6-25)	20.6 (6-33)	15.2 (6-26)	17.0 (6-27)
IMP-6	26	7.3 (6-12)	14.8 (6-20)	25.5 (16-30)	29.0 (21-34)	23.0 (12-28)	16.9 (6-21)
GES	5	6 (6)	23.2 (20-31)	22.0 (20-25)	24.3 (23-27)	19.2 (17-22)	23.7 (22-27)
NDM-1	1	6	6	6	6	6	6
KPC	1	6	14	19	18	16	16
SMB	1	6	6	6	6	6	6
Total	48	6.9 (6-12)	16.1 (6-31)	22.4 (6-30)	25.4 (6-34)	19.8 (6-28)	17.6 (6-27)
Cephalosporinase							
CIT	14	19.0 (14-24)	30.8 (27-37)	27.3 (22-30)	30.9 (28-37)	28.1 (24-32)	30.4 (26-36)
DHA	6	19.3 (14-24)	30.2 (30-31)	28.2 (26-30)	30.5 (30-32)	27.7 (26-30)	30.3 (29-32)
MOX-1	1	12	27	27	30	25	27
Chrom <sup>2)</sup> AmpC	1	17	32	28	31	29	27
DHA + M9	2	9 (6, 12)	26.5 (26, 27)	26.5 (25, 28)	29.0 (28, 30)	26.5 (25, 28)	27 (26, 28)
DHA + memb <sup>3)</sup>	2	6 (6)	14.5 (14, 15)	16.5 (14, 19)	20.5 (20, 21)	14.0 (14)	18.0 (18)
Chrom <sup>2)</sup> AmpC + memb	1	6	21	19	24	19	21
Total	27	16.6 (6-24)	28.6 (14-37)	26.3 (14-30)	29.6 (28-32)	26.4 (14-32)	28.6 (18-36)
ESBL <sup>1)</sup>							
TEM	2	22 (21, 23)	31.5 (31, 32)	30.5 (30, 31)	32.0 (31, 33)	30.0 (30)	32.5 (32, 33)
SHV	2	21.5 (20, 23)	30.5 (31, 32)	29.0 (28, 30)	31.5 (31, 32)	29.5 (29, 30)	30.0 (30)
CTX-M1	3	24.3 (23-26)	31.0 (30-32)	30.0 (30)	31.7 (31-32)	30.3 (29-32)	30.7 (30-32)
CTX-M2	7	21 (18-25)	30.4 (29-32)	28.0 (23-30)	30.1 (26-32)	28.4 (24-30)	29.7 (28-31)
CTX-M9	14	18.1 (11-24)	30.2 (26-34)	28.9 (25-33)	30.9 (23-34)	28.4 (24-32)	30.4 (27-34)
ESBL + memb	2	7 (6, 8)	21.5 (15, 28)	22.5 (18, 27)	22.0 (16, 28)	19.0 (11, 27)	20.5 (14, 27)
K1	4	23 (22-24)	30.8 (30-31)	28.5 (26-30)	29.5 (29-33)	28.3 (26-31)	30.0 (28-31)
Total	34	19.6 (6-26)	30.0 (15-32)	28.5 (18-33)	30.2 (16-34)	28.1 (11-32)	29.8 (14-34)

1) ESBL: Extended spectrum  $\beta$ -lactamase

2) chrom: chromosomal

3) memb: variation of outer membrane protein

Table 3 Sensitivity and specificity and Cut off value based on ROC curves for each drug for the CPE<sup>1)</sup>

Antimicrobial	Cut off	AUC <sup>2)</sup> value	SE <sup>3)</sup>	95%CI <sup>4)</sup>	P value	Sensitivity	Specificity
Faropenem	< = 12	0.947	0.0213	0.887-0.981	<0.0001	100.0	85.3
Meropenem	< = 24	0.955	0.0215	0.898-0.985	<0.0001	95.4	93.4
Biapenem	< = 29	0.773	0.0453	0.684-0.848	<0.0001	67.3	75.4
Doripenem	< = 25	0.963	0.0183	0.908-0.989	<0.0001	93.9	93.4
Imipenem	< = 26	0.846	0.0372	0.765-0.908	<0.0001	85.7	73.8
Panipenem	< = 26	0.916	0.0278	0.848-0.961	<0.0001	95.9	77.1

1) CPE: Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

2) AUC: Area under the curve

3) SE: Standard Error

4) CI: Confidence interval

mm以上を示す株が存在した。FRPMにおいても阻止円が形成された株は全てIMP-6型であった。セファロスポリナーゼ産生株では、FRPMの阻止円系は6~24mm(16.6mm)と他の薬剤と比較して影響を受けやすく、特にプラスミド性AmpCと外膜蛋白との耐性機序が存在した場合には阻止円が形成されなかった。ESBL産生株では、他の $\beta$ ラクタマーゼ型と比較して阻止円が大きい傾向にあり、カルバペネム系、ペ

ネム系共に感性のブレイクポイントの阻止円径を上回る値を示した。

## 2. ROC解析結果

ROC解析結果をTable 3に示した。カルバペネマーゼ産生株のcutoff値は、FRPM 12mm, MEPM 24mm, BIPM 29mm, DRPM 25mm, IPM 26mm, PAPM 24mmであった。そのcutoffを用いた場合、感度はFRPMで100%と最も良好であった。MEPM, DRPM,

PAPMも90%以上の感度であった。一方、特異度はMEPM, DRPMが93.4%と最も良好であった。FRPMは85.3%と2剤に比較して若干低値を示した。

### 考 察

本検討においてFRPMディスクを用いることで、日本で高率に分離されるCPEを感度100%でスクリーニングすることが可能であった。世界におけるCPEの遺伝子型の疫学は、ヨーロッパではNDM-1型やOXA48型が、北米ではKPC型が、東南アジアではNDM-1型がそれぞれ主流となっている<sup>22)</sup>。一方で、日本はIMP型のCPEが主流となっており、世界的な傾向とは相違がある。また、MBLに関しては、ヨーロッパや北米ではVIM型が主流であり、この点でも違いがある。日本においては、IMP感性、MEPM耐性を示すIMP-6型が増加しており、薬剤感受性試験においてカルバペネム系抗菌薬でIMPのみ測定している場合には検出もれが生じる可能性がある。また、低発現型の株ではMEPMのMIC値も上昇しにくいため、注意が必要である<sup>23)</sup>。よって、これらの株を効率よくスクリーニングする方法が求められる。今回の検討において、ROC解析の結果から、FRPMのAUCはMEPMやDRPMより低いものの、cutoff値に対する感度が100%であった。スクリーニングに使用する薬剤は、対象となる耐性株をできるだけ見逃さないことが必要であり、より感度の高い方法が望ましいと思われる。同様の報告として、Dayら<sup>24)</sup>は、KPCやNDM-1など日本での検出が稀な耐性株について検討している。No zoneおよびDouble zoneを陽性としているが、KPCで97.1%、NDM-1で100%、OXA-48で87.5%と良好な感度を得ており、FRPMディスクにおけるCPE検出は有用性が高いとしている。本検討結果と併せてFRPMを用いたスクリーニングは現在報告されているCPEを効率よく検出することが可能であると考えられた。また、OXA-48型については今回の検討では実施していないが、Double zoneを示すとしており、この点においては結果判定の際に留意する必要がある。他の薬剤では、MEPM, DRPM, PAPMで感度が90%以上であった。しかし、cutoff値がCLSIの基準において感性の範囲に入ってしまう、見落とす可能性があると考えられる。たとえば、MEPMではIMP-1型が1株、GES型が2株で感性の判定となり、6%が感性と判定された。FRPMはCLSIの判定基準が設定されていないため比較はできないが、49株中40株は阻止円が形成されず、スクリーニングにおける判定の簡便さにおいても有用性は高いと考える。また、他の薬剤と比較して、FRPMはディスクに5 $\mu$ gの含有量しか含まれていないため、これが阻止円の形成の差に結びつき、スクリーニング薬剤として適した結果

になったとも考えられた。一方、特異度はMEPM, DRPMと比較してFRPMは85.3%と低い値を示した。これは、セファロスポリナーゼを産生する株に対して、他の2薬剤よりも影響を受けやすいためであると考えられた<sup>25)</sup>。外膜蛋白の変異株を除くと4株中3株がセファロスポリナーゼ産生株であった。一方で、ESBL産生株に対してFRPMは1株が12mmを示したのみであった。以前の調査<sup>26)</sup>においても、ESBL産生*E.coli*174株中173株は2 $\mu$ g/mL以下を示しており、感受性は非常に良好なため今回設定したcutoffへの影響はほとんどないと考えられた。IPMはcutoff値に対し、感度85.7%、特異度73.8%であり、CPEを検出するスクリーニング薬剤には適切ではないことを認識する必要があった。CLSI M100-S21<sup>27)</sup>では、本Breakpointを使用した場合、Table 2A-S3に記載されたModified Hodge Testの実施は疫学調査および院内感染対策目的以外に実施する必要はないとしている。CLSIの会議報告の中で、CPE 474株を使用した結果、M100-S21ではIPMで感性が0%、MEPMで1.2%と報告されており<sup>28)</sup>、本結果と乖離した結果となっている。CLSI基準は米国を中心とした諸外国で検出された株を中心に検討されており、結果を解釈する際にこの点においても注意する必要がある。本検討においても、用いた株は、全てのCPEを網羅しているわけではなく、地域も近畿地区と偏りがあることを考慮する必要はある。これらの結果から、当院では効率的にCPEの検出を行うために、ESBLの確認試験(DDST)を実施する際にFRPMディスクを追加して測定している。FRPMがcutoff値以下を示した場合には、SMAディスクやEDTA、ボロン酸による阻害試験により $\beta$ ラクタマーゼの種類を決定している。以上より、FRPMディスクを使用したCPEのスクリーニングは、簡便性も高く、高感度に検出が可能であると考え

利益相反自己申告：申告すべきものなし

### 文 献

- 1) Zahar JR, Lesprit P : Management of multidrug resistant bacterial endemic. *Med Mal Infect* 2014 ; 44 : 405—11.
- 2) Hawkey PM : Multidrug-resistant Gram-negative bacteria : a product of globalization. *J Hosp Infect* 2015 ; 89 : 241—7.
- 3) Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD : The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015 ; 28 : 565—91.
- 4) McDermott PF, Walker RD, White DG : Antimicrobials : modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 2003 ; 22 ( 2 ) : 135—43.

- 5) Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, *et al.* : Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2007 ; 29 (3) : 306—10.
- 6) van Duin D, Doi Y : Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* : Are We at the End of the Road? *J Clin Microbiol* 2015 ; 53 (10) : 3116—7.
- 7) Roy S, Singh AK, Viswanathan R, Nandy RK, Basu S : Transmission of imipenem resistance determinants during the course of an outbreak of NDM-1 *Escherichia coli* in a sick newborn care unit. *J Antimicrob Chemother* 2011 ; 66 (12) : 2773—80.
- 8) Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, *et al.* : Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain : toward endemicity? *Clin Infect Dis* 2007 ; 45 (9) : 1171—8.
- 9) Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T : Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli : laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 (11) : 5256—63.
- 10) Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, Shimizu W, Onodera M, Yokozaki M, *et al.* : Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-6. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; 72 (1) : 109—12.
- 11) Murata M, Morinaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, Uno N, Kosai K, *et al.* : The Rapid Induction of Carbapenem-Resistance in an *Aeromonas dhakensis* Blood Isolate. *Jpn J Infect Dis* 2016 ; 69 (5) : 439—41.
- 12) Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A : Detection of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 (2) : 542—6.
- 13) Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA : Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. : Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2010 ; 36 (3) : 205—10.
- 14) Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, *et al.* : Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 (6) : 2551—8.
- 15) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, *et al.* : Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 (1) : 40—3.
- 16) Arlet G, Philippon A : Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 1991 ; 66 (1) : 19—25.
- 17) Pitout JD, Laupland KB : Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae : an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008 ; 8 (3) : 159—66.
- 18) Queenan AM, Bush K : Carbapenemases : the Versatile beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007 ; 20 (3) : 440—58.
- 19) Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, *et al.* : Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011 ; 66 (9) : 1998—2001.
- 20) Lee CH, Chu C, Liu JW, Chen YS, Chiu CJ, Su LH : Collateral damage of flomoxef therapy : in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007 ; 60 (2) : 410—3.
- 21) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standards - Tenth Edition, M02-A10.
- 22) 荒川宜親 : カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 ( carbapenem-resistant Enterobacteriaceae , CRE) 等新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点. *日治療会誌* 2015 ; 63 : 187—97.
- 23) Girlich D1, Poirel L, Nordmann P : Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 ; 75 (2) : 214—7.
- 24) Day KM, Pike R, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, *et al.* : Use of faropenem as an indicator of carbapenemase activity in the Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2013 ; 51 (6) : 1881—6.
- 25) Mushtaq S1, Hope R, Warner M, Livermore DM : Activity of faropenem against cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2007 ; 59 (5) : 1025—30.
- 26) Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Higuchi T, Ono T, *et al.* : Susceptibility of

- various oral antibacterial agents against extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Chemother 2014 ; 20 (1) : 48—51.
- 27) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2011 ; Document M100-S21.
- 28) Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Meeting Agenda Book January 2010. <http://clsi.org/standards/micro/microbiology-files/>

### The Development of Screening Methods Using the Disk Diffusion Method for Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Tatsuya NAKAMURA<sup>1)2)</sup>, Saori KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Kenichiro ONUMA<sup>1)</sup>, Mari KUSUKI<sup>1)</sup>, Nobuhide HAYASHI<sup>1)</sup>, Go OJI<sup>1)3)</sup>, Issei TOKIMATSU<sup>2)</sup>, Jun SAEGUSA<sup>1)</sup> & Soichi ARAKAWA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>2)</sup>Department of Infection Control and Prevention and <sup>3)</sup>Division of Infectious Disease, Kobe University Hospital

Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) are increasing globally. Particularly, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) are of concern. Rapid and accurate detection of these strains is critical for appropriate antimicrobial use and hospital infection control. In the present study, criteria for CPE screening were examined using a carbapenem susceptibility disk. Carbapenemase producers showed minimal inhibition zones for faropenem (5 $\mu$ g) : 6-12mm (mean : 6.9mm). Some strains with the IMP-6 genotype showed inhibition zones of >30mm for imipenem (10 $\mu$ g) and biapenem (10 $\mu$ g). All strains that formed inhibition zones for FRPM had the IMP-6 genotype. The cut off values of carbapenemase-producers, determined by ROC analysis, were 12mm for FRPM, 24mm for meropenem (10 $\mu$ g), 29mm for BIPM, 25mm for doripenem (10 $\mu$ g), 26mm for IPM, and 24mm for panipenem (10 $\mu$ g). Thus, the sensitivity was the highest (100%) for FRPM. Specificities were 93.44% for MEPM and DRPM and 85.25% for FRPM. Consequently, a drug sensitivity test using FRPM (5 $\mu$ g) disks facilitates simple and accurate CPE screening.