

## 【原著・臨床】

臨床材料からのメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の  
検出状況と薬剤感受性三澤 成毅<sup>1)</sup>・小栗 豊子<sup>2)</sup>・中村 文子<sup>1)</sup>・田部 陽子<sup>3)</sup>・近藤 成美<sup>3)</sup>  
三宅 一徳<sup>3)</sup>・三宅 紀子<sup>3)</sup>・猪狩 淳<sup>3)</sup>・大坂 顯通<sup>4)</sup><sup>1)</sup> 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部\*<sup>2)</sup> 順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科<sup>3)</sup> 同 医学部臨床検査医学<sup>4)</sup> 同 医学部輸血・幹細胞制御学

(平成 18 年 9 月 13 日受付・平成 19 年 1 月 30 日受理)

当院における 2001～2005 年の各種臨床材料からのメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生グラム陰性桿菌の検出状況、薬剤感受性および日常検査におけるスクリーニングについて検討した。メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) 阻害試験でスクリーニングされた MBL 産生株は、5 年間で重複例を除き 352 株であった。これらのうち、PCR 法でプラスミド性 MBL 遺伝子が検出された株は 247 株で、MBL 遺伝子型はすべて IMP-1 group であった。247 株の菌種は、ブドウ糖非発酵菌は *Pseudomonas aeruginosa* 79 株 (32.0%)、*Pseudomonas putida/fluorescens* 38 株 (15.4%)、*Acinetobacter* spp. 37 株 (15.0%)、*Achromobacter* spp. 11 株 (4.5%)、*Alcaligenes* spp. 6 株 (2.4%)、腸内細菌科では *Enterobacter cloacae* 50 株 (20.2%)、*Citrobacter freundii* 12 株 (4.9%)、*Providencia rettgeri* 7 株 (2.8%)、*Serratia marcescens* 3 株 (1.2%)、*Klebsiella* spp. 3 株 (1.2%)、*Escherichia coli* 1 株 (0.4%) であった。IMP-1 group 陽性株は全体的には年次的に増加傾向は認められなかったものの、*P. aeruginosa* および *E. cloacae* は、それぞれ 2005 年、2003～2005 年でやや増加していた。IMP-1 group 陽性株の薬剤感受性は、*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter* spp., *S. marcescens* で多剤耐性株が多かった。一方、*S. marcescens* を除く腸内細菌科、*Acinetobacter lwoffii* および *Alcaligenes* spp. では多剤耐性株が少なく、imipenem (IPM) 感性株が多かった。*P. aeruginosa* は MBL 遺伝子保有株が最も多く、最近 5 年間の頻度は 0.3～1.5% であった。一方、多剤耐性株は年次的に増加傾向であり、2005 年における IPM-gentamicin (GM)-levofloxacin (LVFX) 耐性と IPM-amikacin (AMK, 中間を含む)-LVFX 耐性の頻度は、それぞれ 3.7%, 3.9% であった。MBL 産生菌は日常検査で監視すべき耐性菌であり、SMA 阻害試験はこのタイプの耐性菌の検査にきわめて有用と考えられた。

**Key words:** metallo-β-lactamase, IMP-1, sodium mercaptoacetic acid, multidrug-resistant, *Pseudomonas aeruginosa*

メタロ-β-ラクタマーゼ(以下、MBL)は活性中心に亜鉛を有し、Bush の機能分類で group 3, Ambler の分子分類で class B に分類される β-ラクタマーゼ<sup>1,2)</sup>である。MBL の重要な特徴はカルバペネム系薬を含むほとんどの β-ラクタム系薬を加水分解する点にあり、現状で最も強力な β-ラクタマーゼである。MBL は 1966 年に発見<sup>3)</sup>されたが、1987 年イミペネムの臨床使用が開始されると、1990 年代初頭のわが国で *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3)</sup> や *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* (以下、亜種名は省略)<sup>4)</sup> から伝達性プラスミド媒介性の MBL 遺伝子が発見され、IMP-1 と命名<sup>5)</sup>された。近年では IMP-1 以外の IMP 型や VIM 型とそれらの variant<sup>6)</sup>、SPM

型<sup>7)</sup>および GIM 型<sup>8)</sup>がアジア、欧州、南アメリカで発見され、IMP-1 型を中心に他のグラム陰性桿菌へ拡大する傾向が指摘されている<sup>9,10)</sup>。最近では MBL 産生 *P. aeruginosa* の病院内拡散や感染事例もみられるようになってきた。

カルバペネム系薬は重症感染症の特効薬的存在であり、特に緑膿菌感染症の治療にとって、本薬剤耐性菌の増加は重大な問題となることが危惧されている。

*P. aeruginosa* 等のグラム陰性桿菌は、地域や病院施設ごとの分離頻度や薬剤感受性に相違があることが知られている<sup>11)</sup>。また、同一起原の株が複数の医療施設に伝播していることも報告<sup>12)</sup>され、微生物検査室では自施設における分離菌の

動向を監視する必要がある。

私どもは以前から特に薬剤耐性菌の多いグラム陰性桿菌の検出状況や薬剤感受性に注目し、その動向を調査、報告<sup>13,14)</sup>してきた。当院では2000年にIMP-1型MBL産生*P. aeruginosa*を検出して以来、日常検査での監視を強化してきた。そこで今回私どもは、当院におけるMBL産生菌の最近5年間の検出状況と薬剤感受性、および日常検査におけるMBL産生菌のスクリーニングについて検討した。

## I. 材料と方法

### 1. 使用菌株

使用菌株は、2001～2005年の5年間に当院検査部に提出された各種臨床材料から分離の腸内細菌科およびブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌（以下、非発酵菌）のうち、次項2のスクリーニング検査によってMBL陽性と判定された株を対象とし、次いで3のPCR法でMBL遺伝子が検出された株とした。日常検査における同定および薬剤感受性はMicro Scan Walk Away (DADE BEHRING)を使用し、必要に応じ従来法や同定キットを用いて再同定を行った。

スクリーニング検査でMBL陽性と判定された株は同一患者からの同一菌種を1株として年単位で集約した。なお、同一患者由来でも複数年にわたって検出された場合や、同時に複数のMBL陽性菌種が検出された場合は別に集計に加えた。その結果、対象菌株の合計は352株となった。これら352株からPCR法によってプラスミド媒介性MBL遺伝子が検出されたのは247株で、これを原則として使用菌株とした。ただし由来材料の集計では、同一菌種でも異なる材料から検出された場合は別として扱ったため、菌株数は264株とした。なお、増加分17株についてもプラスミド媒介性MBL遺伝子の有無を確認した。

### 2. 日常検査におけるMBL産生菌のスクリーニング

日常検査におけるMBL産生菌のスクリーニングは、薬剤感受性検査でカルバペネム系薬耐性、または第3世代、第4世代セフェム系薬耐性を示す株を中心に、Shibataら<sup>15)</sup>によるメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)による阻害試験に準じて行った。すなわち、SMA含有ディスクは抗生物質検定用ペーパーディスク(直径6mm薄型：東洋濾紙)にSMA(特級：和光純薬)3mgを含有させて使用した。対象薬はceftazidime(CAZ)およびimipenem(IPM)ディスク(センシディスク：日本ベクトン・ディッキンソン)を用いた<sup>16)</sup>。

### 3. PCR法によるMBL遺伝子検出

MBL遺伝子の検出は、Shibataらの方法<sup>15)</sup>に準じて行い、PCR法によってIMP-1、IMP-2、VIM-2遺伝子(*bla*<sub>IMP-1</sub>、*bla*<sub>IMP-2</sub>、*bla*<sub>VIM-2</sub>)を検索した。すなわち、新鮮純培養菌をTris-EDTA buffer 50 μLにMcFarland No. 0.5の濁度に調製、100℃ 10分間加熱後、その遠心上清2.5 μLをtemplate DNAとして用いた。PCR反応液は

TAKARA TAQ™(TAKARA)を用いて調製し、全量25 μLで行った。サーマルサイクラーはGene Amp PCR System 9600-R(日本ロシユ)を用い、増幅産物は1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウム・ブロマイド染色を行って確認した。

### 4. *P. aeruginosa*の群別

*P. aeruginosa*は「緑膿菌群別用免疫血清(デンカ生検)」を用いて群別を行った。群別の手順は添付の説明書に従った。

### 5. 薬剤感受性測定

薬剤感受性は、本学会標準法<sup>17)</sup>に従いMIC-2000 system(DYNATECH)を用いる微量液体希釈法にて、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。使用培地は2価イオン調整Mueller-Hinton broth(DIFCO)を用いた。使用抗菌薬は以下に示す合計10薬剤である。すなわち、piperacillin(PIPC)、CAZ、IPM、meropenem(MEPM)、aztreonam(AZT)、gentamicin(GM)、amikacin(AMK)、arbakacin(ABK)、ciprofloxacin(CPFX)、polymyxin B(PL-B)で、力価の明らかなものを使用した。PL-B感受性は2004～2005年分離株についてのみ検討した。

*P. aeruginosa*における多剤耐性の年次推移の検討には、日常検査による薬剤感受性データを用いた。使用抗菌薬は、IPM、GM、AMKおよび検討期間中に共通で検査されたlevofloxacin(LVFX)を用いた。

精度管理菌株は*Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*Enterococcus faecalis* ATCC 29212、*Escherichia coli* ATCC 25922、*P. aeruginosa* ATCC 27853を使用した。

### 6. MICブレイクポイントおよび多剤耐性

MICの感性、耐性ブレイクポイントは、Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI/旧NCCLS)の基準<sup>18)</sup>を用いた。なお、ABKはAMKの基準を用いた。多剤耐性の検討は、前項5の標準法で測定した結果についてはIPM、GM、CPFX3薬剤耐性(中間を含まない)を集計した。*P. aeruginosa*における多剤耐性に関する年次推移の検討は、日常検査データを用い、以下の3種について集計した。すなわち、①感染症法における薬剤耐性緑膿菌の検査室での判断基準(IPM、AMK、LVFX)を基準に、②IPM、GM、LVFX3薬剤耐性(中間を含まない)および、③②の定義に中間を含めたもの、である。LVFXはCPFXが検討期間中で共通して検査されていなかったために用いた。

## II. 結果

### 1. IMP-1 group 遺伝子陽性菌種、遺伝子型および年次推移

使用菌株247株のPCR法によるMBL遺伝子の検討では、全株から*bla*<sub>IMP-1</sub> group 遺伝子が検出され、*bla*<sub>IMP-2</sub> および *bla*<sub>VIM-2</sub> group 遺伝子は検出されなかった。IMP-1 group 遺伝子陽性株の菌種(属)および分離患者数の年次推移をTable 1に示した。

Table 1. Strains carrying IMP-1 group gene from routinely screened MBL-positive gram-negative bacilli from clinical specimens

Organism	No. of patients the following year:						
	2001	2002	2003	2004	2005	Total	(%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	19	14	14	27	79	(32.0)
<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	12	10	4	9	3	38	(15.4)
<i>Achromobacter</i> spp. <sup>a</sup>	3	7	1			11	( 4.5)
<i>Alcaligenes</i> spp. <sup>b</sup>		2	3	1		6	( 2.4)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	5	7	9	5	31	(12.6)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		2	3	1		6	( 2.4)
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	1				2	3	( 1.2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1	12	24	11	50	(20.2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>			1			1	( 0.4)
<i>Klebsiella oxytoca</i>			1	1		2	( 0.8)
<i>Escherichia coli</i>				1		1	( 0.4)
<i>Citrobacter freundii</i>	2	5	2	2	1	12	( 4.9)
<i>Providencia rettgeri</i>		6		1		7	( 2.8)
Total	30	57	48	63	49	247	(100)

<sup>a</sup> *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (8) and *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (3).

<sup>b</sup> *A. faecalis* (5) and other *Alcaligenes* species (1).

Table 2. Sources of specimens of MBL-producing strains carrying IMP-1 group gene from 2001 to 2005

Organism	Total no. of strains*	No. (%) of strains of the following specimens:									
		Sputum/other respiratory tract	(%)	Feces/bile/intestinal	(%)	Urine/genital tracts	(%)	Blood/intravenous catheter	(%)	Pus/discharge/drainage	(%)
<i>P. aeruginosa</i>	90*	21	(23.3)	17	(18.9)	48	(53.3)	1	( 1.1)	3	( 3.3)
<i>P. putida/fluorescens</i>	38	11	(28.9)	4	(10.5)	23	(60.5)				
<i>Achromobacter</i> spp.	11	2	(18.2)	1	( 9.1)	6	(54.5)			2	(18.2)
<i>Alcaligenes</i> spp.	6					6	(100)				
<i>A. baumannii</i>	32*	20	(62.5)	2	( 6.3)	7	(21.9)			3	( 9.4)
<i>A. lwoffii</i>	6	3	(50.0)	1	(16.7)	1	(16.7)	1	(16.7)		
<i>S. marcescens</i>	4*	1	(25.0)			2	(50.0)			1	(25.0)
<i>E. cloacae</i>	54*	32	(59.3)	3	( 5.6)	13	(24.1)	1	( 1.9)	5	( 9.3)
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	(100)								
<i>K. oxytoca</i>	2	1	(50.0)							1	(50.0)
<i>E. coli</i>	1	1	(100)								
<i>C. freundii</i>	12	2	(16.7)			10	(83.3)				
<i>P. rettgeri</i>	7					7	(100)				
Total	264	95	(36.0)	28	(10.6)	123	(46.6)	3	( 1.1)	15	( 5.7)

\* 11 of *P. aeruginosa*, 1 of *A. baumannii*, 1 of *S. marcescens*, and 4 of *E. cloacae* were isolated from the multiple sources.

IMP-1 group 遺伝子陽性菌の菌種(属)は、非発酵菌では *P. aeruginosa* が 79 株 (32.0%) で最も多く、次いで *Pseudomonas putida/fluorescens* が 38 株 (15.4%)、*Acinetobacter* spp. が 37 株 (15.0%) であった。その他は *Achromobacter* spp. や *Alcaligenes* spp. が認められたが少数 (5% 以下) で、非発酵菌の合計は全体の 69.3% を占めた。腸内細菌科は全体の 30.7% を占め、*Enterobacter cloacae* が最も多く 50 株 (20.2%) で、次いで *Citrobacter freundii* 12 株 (4.9%) であった。その他の菌種はいずれも少数であり、*S. marcescens*、*Klebsiella* spp.、*E. coli*、*Providencia rettgeri* が認められた。

IMP-1 group 遺伝子陽性菌の 5 年間における検出患者数の推移は、非発酵菌では、*P. aeruginosa* は 2001 年 5

人、2002~2004 年は 10 人台であったが 2005 年は 27 人でやや増加していた。その他、*P. putida/fluorescens* や *Acinetobacter baumannii* も毎年検出されていたが、検出患者数の増加傾向は認められなかった。腸内細菌科では、*E. cloacae* および *C. freundii* が毎年検出され、*E. cloacae* では 2001~2002 年は 1~2 人であったが、2003 年以降は 11~24 人でやや増加していた。*C. freundii* は 5 人以下で推移していた。少数検出菌種のうち、*S. marcescens* は 2001 年と 2005 年に検出されたのみであった。

## 2. IMP-1 group 遺伝子陽性菌の由来材料

IMP-1 group 遺伝子陽性菌の由来材料を菌種別に Table 2 に示した。なお、菌株数は使用 247 株の一部で複数の異なる材料から本遺伝子陽性菌が検出され、これらを

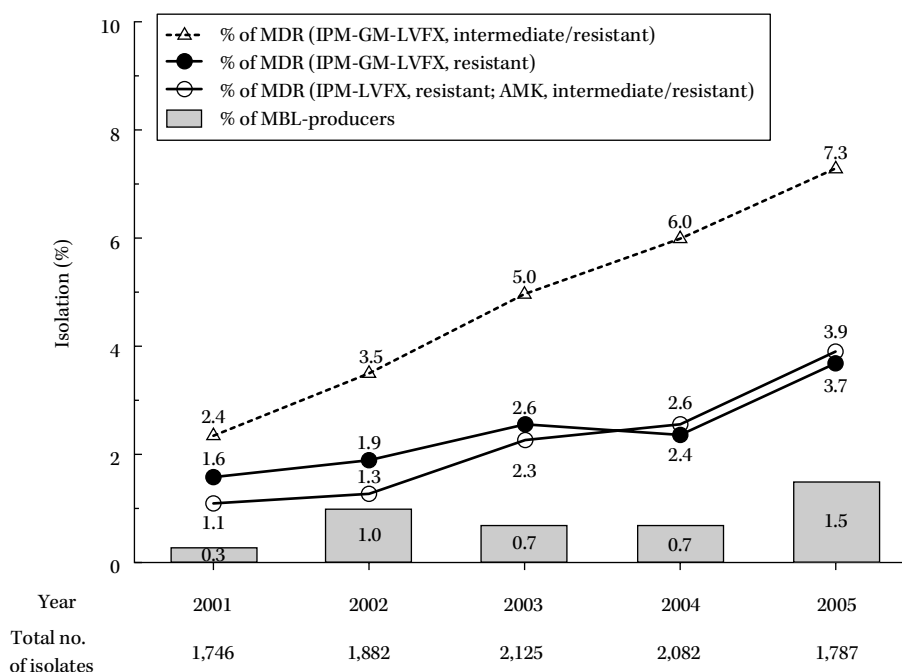


Fig. 1. Annual changes in frequency of metallo- $\beta$ -lactamase-producing (MBL) and multidrug-resistant (MDR) isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.  $\circ$ , resistant to imipenem (IPM) and levofloxacin (LVFX; as a substitute for ciprofloxacin), intermediate or resistant to amikacin (AMK);  $\bullet$ , resistant to IPM, gentamicin (GM), and LVFX;  $\triangle$ , intermediate or resistant to IPM, GM, and LVFX.

別に集計に加えたことから合計 264 株とした。増加分 17 株もすべて IMP-1 group 遺伝子陽性であった。非発酵菌では *P. aeruginosa*, *P. putida/fluorescens*, *Achromobacter* spp. および *Alcaligenes* spp. は尿・生殖器由来が多く 53.3~100% を占めたが, *Acinetobacter* 2 菌種は呼吸器系材料が 50~62.5% を占めた。腸内細菌科では, *S. marcescens*, *C. freundii* および *P. rettgeri* は尿・生殖器由来が多く 50.0~100% であったが, *E. cloacae* は呼吸器系材料が 59.3% と多かった。*Klebsiella* spp. および *E. coli* は分離株数が少数であり, 由来材料の傾向は明らかでなかったが, 呼吸器系材料と膿・分泌物から分離された。また, 血液・血管カテーテルからは, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter lwof-fii*, *E. cloacae* がそれぞれ 1 株分離された。

結果は省略したが, IMP-1 group 遺伝子陽性菌検出例における菌検出の持続期間は, ほとんどが 1~3 カ月以内の短期間であった。菌検出期間の最長例は *P. aeruginosa* 検出患者で 25 カ月間にわたり尿から頻回に検出された 1 例が認められた。患者は基礎疾患に悪性リンパ腫と神経因性膀胱を有し, 外来通院で放射線治療を受けていたが, 治療のたび尿から MBL 産生菌が繰り返し分離された。

### 3. *P. aeruginosa* における IMP-1 group 遺伝子陽性株および多剤耐性株の年次推移

*P. aeruginosa* における IMP-1 group 遺伝子陽性株および多剤耐性株の分離頻度を年次的に Fig. 1 に示した。検

討期間外のため成績は省略したが, 当院では IMP-1 group 遺伝子陽性株を 2000 年分離の多剤耐性株から検出している。IMP-1 group 遺伝子陽性株の頻度は, 2001~2004 年までは 1% 以下であったが, 2005 年は 1.5% であった。一方, 多剤耐性株の分離頻度は年次的に増加し, 耐性薬剤の組み合わせが IPM-AMK-LVFX と IPM-GM-LVFX で耐性のみ集計した場合, 2001 年~2002 年は前者が 1.1~1.3%, 後者が 1.6~1.9% で前者の方がやや低い頻度であったが, 2003 年以降は両者の頻度がほぼ同等であった。一方, IPM-GM-LVFX の組み合わせで中間も耐性に含めた場合は, 2001 年は 2.4% であったが, 2003 年には 5% に達し 2005 年は 7.3% であった。

IMP-1 group 遺伝子陽性 *P. aeruginosa* の血清群は E 群が最も多く 70% 以上を占めた。その他の群は少数であり, B 群 6 株, F 群および I 群 2 株, G 群 1 株が認められ, 型別不能は 9 株認められた。また, ムコイド型株が 2 株, メラニン色素産生株が 1 株認められたが, ムコイド型株の検出例は 2 例ともに非ムコイド型株 (E 群) と同時に検出されていた。

### 4. 薬剤感受性

IMP-1 group 遺伝子陽性株に対する使用 10 薬剤の薬剤感受性を MIC<sub>50</sub> 値, MIC<sub>90</sub> 値で, IPM, GM, CPF3 3 薬剤耐性の割合を Table 3 に示した。IMP-1 group 遺伝子陽性の非発酵菌では, PL-B を除き MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> 値の多くが耐性または中間の範疇にあるものが多かった。一

Table 3. Susceptibilities of 10 antimicrobials against 247 strains of gram-negative bacilli carrying IMP-1 group gene

Organism	No. of strains	MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (μg/mL) <sup>a</sup>										% of multidrug resistance <sup>c</sup>
		PIPC	CAZ	IPM	MEPM	AZT	GM	AMK	ABK	CPFX	PL-B <sup>b</sup>	
<i>P. aeruginosa</i>	79	>128/ >128	>128/ >128	>128/ >128	>128/ >128	32/64	>128/ >128	64/ >128	32/128	32/128	2/2	78.5
<i>P. putida/fluorescens</i>	38	128/ >128	>128/ >128	64/ >128	>128/ >128	64/ >128	64/ >128	32/ >128	2/8	4/32	1/2	50.0
<i>Achromobacter</i> spp.	11	32/ >128	>128/ >128	32/128	64/128	>128/ >128	>128/ >128	>128/ >128	>128/ >128	16/32	2/2	72.7
<i>Alcaligenes</i> spp.	6	4/64	>128/ >128	1/8	4/32	32/64	32/ >128	8/128	8/32	64/ >128	2/4	0
<i>A. baumannii</i>	31	64/ >128	>128/ >128	16/64	32/64	64/ >128	64/ >128	16/64	2/32	32/128	≤1/≤1	38.7
<i>A. lwoffii</i>	6	32/ >128	>128/ >128	2/64	4/128	16/ >128	2/8	16/128	≤1/≤1	≤1/64	≤1/≤1	0
<i>S. marcescens</i>	3	>128/ >128	>128/ >128	>128/ >128	64/ >128	32/64	64/ >128	16/ >128	16/64	16/16	>128/ >128	66.7
<i>E. cloacae</i>	50	32/ >128	>128/ >128	2/4	2/8	8/64	2/2	2/2	≤1/≤1	2/4	≤1/≤1	2.0
<i>K. pneumoniae</i>	1	128/128	32/32	≤1/≤1	2/2	≤1/≤1	≤1/≤1	8/8	2/2	≤1/≤1	≤1/≤1	0
<i>K. oxytoca</i>	2	>128/ >128	128/128	≤1/≤1	≤1/2	≤1/ >128	2/2	8/16	2/2	≤1/32	≤1/≤1	0
<i>E. coli</i>	1	>128/ >128	128/128	≤1/≤1	≤1/≤1	16/16	2/2	≤1/≤1	≤1/≤1	4/4	≤1/≤1	0
<i>C. freundii</i>	12	>128/ >128	128/ >128	≤1/2	≤1/2	16/64	≤1/4	8/32	≤1/4	2/2	≤1/≤1	0
<i>P. rettgeri</i>	7	16/ >128	128/ >128	16/64	32/64	≤1/32	8/128	16/32	2/8	32/64	>128/ >128	28.6

Abbreviations: PIPC, piperacillin; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEPM, meropenem; AZT, aztreonam; GM, gentamicin; AMK, amikacin; ABK, arbekacin; CPFX, ciprofloxacin; PL-B, polymyxin B.

<sup>a</sup> Numbers underlined indicate susceptible by MIC breakpoint based on CLSI/NCCLS. (For ABK was that used for AMK.)

<sup>b</sup> MIC of PL-B is determined only for selected strains isolated in the last 2 years, and susceptible strains with MIC of ≤ 2 μg/mL.

<sup>c</sup> Multidrug resistance is defined as resistant to IPM, GM, and CPFX.

方, *Alcaligenes* spp.の PIPC, IPM, MEPM, AMK, *A. lwoffii*の IPM, MEPM, GM, AMK, CPFXでは MIC<sub>50</sub>値 または MIC<sub>90</sub>値が感性または中間の範疇であった。

腸内細菌科では, β-ラクタム系薬の PIPC と CAZ の MIC<sub>50</sub>および MIC<sub>90</sub>値は,ほとんどの菌種で耐性または中間の範疇であった。一方,その他の抗菌薬では *S. marcescens* と *P. rettgeri*を除き,ほとんどが感性の範疇であった。IPM と MEPM の MIC<sub>50</sub>値はともに 2 μg/mL 以下, MIC<sub>90</sub>値は 8 μg/mL 以下であった。アミノ配糖体系薬や CPFX の MIC<sub>50</sub>および MIC<sub>90</sub>値も低く,感性の範疇にあるものが多かった。*S. marcescens* および *P. rettgeri* は 10 薬剤すべての MIC<sub>90</sub>値が耐性または中間の範疇であり,多剤耐性の傾向が顕著であった。PL-B は 2004~2005 年分離株のみ検討した。非発酵菌では MIC<sub>90</sub>値は 4 μg/mL 以下,腸内細菌科では *S. marcescens* と *P. rettgeri*を除き MIC<sub>90</sub>値は 1 μg/mL 以下でともに低い値であった。

IPM, GM および CPFX の 3 薬剤に耐性を示す多剤耐性株の割合は,非発酵菌では *P. aeruginosa* と *Achromobacter* spp.で高く,それぞれ 78.5%, 72.7% であり,次いで

*P. putida/fluorescens* 50.0%, *A. baumannii* 38.7% の順で, *Alcaligenes* spp.と *A. lwoffii*では多剤耐性株が認められなかった。腸内細菌科では *S. marcescens* が 66.7% と最も高く,次いで *P. rettgeri* 28.6% であり,他の菌種では多剤耐性株はほとんど認められなかった。

### III. 考 察

今回の検討では,日常検査による薬剤感受性結果と SMA 阻害試験で MBL 陽性と判定された株のうち,非発酵菌 4 属,9 菌種および腸内細菌科 6 属,7 菌種から IMP-1 group 遺伝子が検出された。なお, SMA 阻害試験陽性で,プラスミド媒介性 MBL 遺伝子陰性であった菌は対象から除外したが,これらは *Chryseobacterium* spp.等の染色体性に MBL 遺伝子を保有する菌種であった。

プラスミド媒介性 MBL 遺伝子保有菌の分離に関する全国調査は, Senda らによる報告 (1994~1995 年分離株)<sup>19)</sup>が最初である。MBL 産生菌種は *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*, *P. putida*, *Klebsiella pneumoniae* であった。その後の Kurokawa らによる調査 (1996~1997 年分離株)<sup>10)</sup>では



MBL 産生菌種が拡大し、非発酵菌では *Acinetobacter* spp. と *Burkholderia cepacia*, 腸内細菌科では *E. coli*, *C. freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris*, *P. rettgeri* から MBL 産生株が検出された。今回の検討でもこれらの報告と同様に MBL 産生菌種が年とともに拡大の傾向がうかがわれ、新たに *Alcaligenes* spp. や *Klebsiella oxytoca* から MBL 産生株が検出された。

MBL 産生株が多い菌種とされる *P. aeruginosa* と *S. marcescens* の分離頻度は、Kurokawa ら<sup>10)</sup>はそれぞれ 1.3%, 4.4% と報告している。*P. aeruginosa* については 2001 年<sup>11)</sup>および 2002 年<sup>12)</sup>の全国調査があり、MBL 産生株の検出頻度はそれぞれ約 1.5%, 1.9% で、当院における頻度の方が低率であった。しかし、2005 年は検出患者数が前年と比較してやや増加していた。患者は特定の病棟または時期に集中していなかったものの、今後の動向を注意深くみていく必要がある。また、*S. marcescens* の当院における MBL 産生株の頻度は 1% 以下であり、現在のところ MBL 産生株の分離頻度はきわめて低いものと考えられた。当院における MBL 産生菌の頻度が他に比較して低い背景には、検査結果に MBL 産生菌であることをコメントしてきたこと、同時に感染対策室にも情報を提供して監視を強化してきたこと、が考えられた。

なお、両菌種の過去の保存株を用いて MBL 遺伝子を検索したが、*P. aeruginosa* では 1995 年、*S. marcescens* では 1990 年代前半に分離の多剤耐性株<sup>14)</sup>から IMP-1 group 遺伝子が検出された。

その他の MBL 産生菌種は、非発酵菌では *P. putida/fluorescens* や *A. baumannii* が毎年検出されており、これらは Shibata ら<sup>15)</sup>や Nishio ら<sup>20)</sup>による多施設共同検討でも *P. aeruginosa* に次いで多い菌種であった。腸内細菌科の検出は散発的であったが、2003 年から *E. cloacae* の分離が増加した。これは分院からの検体検査を受託していたことが主に影響したが、同時期から当院でも分離が増加傾向であった。MBL 産生 *E. cloacae* は喀痰等の呼吸器材料から多く検出されていた。

MBL 産生菌の由来材料は、それぞれの菌種本来の由来材料の傾向に一致していた。薬剤耐性菌は一般に尿由来株に多いとされるが、今回の検討では MBL 産生菌全体に共通した特徴ではなかった。MBL 産生 *P. aeruginosa* の由来材料は尿（カテーテル尿）が多い点<sup>21)</sup>は、他の報告<sup>11,12)</sup>とも一致していた。MBL 産生菌出現の背景には、尿路におけるカテーテル留置がハイリスク因子の一つとして報告<sup>22)</sup>されている。なお、血液からは *P. aeruginosa* および *E. cloacae*, 血管カテーテルからは *A. lwoffii* がそれぞれ 1 例、1 回のみ分離された。*P. aeruginosa* 分離の 1 例は CPF 感性株であった。

*P. aeruginosa* における MBL 産生菌の血清群は、E 群が最も多く、その他 B 群、F 群、I 群が少数であった。これらは本菌における優位な血清群<sup>23)</sup>でもあることから、

MBL 産生菌に特徴的ではなかった。

今回の検討で検出された MBL 産生遺伝子は、すべて IMP-1 group であり、現在のわが国において最も優位なタイプであった。IMP-1 group には variant が存在し、IMP-3, IMP-6, IMP-10 等は互いに相同性が高く PCR 法では区別<sup>6)</sup>できない。IMP-1 group の多くは IMP-1 と考えられているが、同一施設内で複数の variant が検出<sup>24)</sup>されている。また、IMP-11<sup>25)</sup>, IMP-2 group や VIM-2 group 遺伝子保有株が関西<sup>20)</sup>, 九州<sup>26)</sup>, 中部<sup>27)</sup>, 東北<sup>28)</sup>で検出されている。関東では VIM-2 group 遺伝子保有 *P. fluorescens* の報告が 1 例<sup>29)</sup>のみで、今回の検討を含め IMP-1 group 以外の MBL 産生株は現在のところ、まれと考えられた。

*P. aeruginosa* における多剤耐性株は 2001 年以降、年次的に増加傾向であった。多剤耐性の判定は、感染症法における薬剤耐性緑膿菌の検査室での判断基準は IPM, AMK, CPF を用いる。AMK は CLSI 標準法<sup>18)</sup>の耐性ブレイクポイントが高い部分に設定されていること、本菌における GM と AMK の感受性は完全に相関せず GM 耐性、AMK 感性株が認められることから今回の検討では GM を重視した。5 年間の検討では、IPM-GM-LVFX にすべて耐性の条件で集計した場合、特に 2003 年以降は IPM-AMK-LVFX による場合と両者の頻度にほとんど差がみられなくなっていた。MBL 産生菌の出現と相まって本菌におけるアミノ配糖体系薬耐性の様相に変化が生じているのかもしれない。わが国における多剤耐性株の分離頻度は、2001 年分離株の全国調査<sup>11)</sup>で IPM, GM, CPF 3 薬剤耐性株の頻度が 2.8% と報告されているが、今回検討の同時期における頻度の方が低率であった。また、先の IPM-GM-LVFX の組み合わせで中間も含めた場合の頻度は、耐性のみ集計した場合に比べて約 2 倍であり、年次的に増加の度合いが大きくなる傾向であった。中間の感受性を有する株は耐性因子を保有している可能性があり、今後これらが耐性株へ移行して多剤耐性株の増加につながることも考えられる。

MBL 産生菌の薬剤感受性は、*P. aeruginosa* や他の非発酵菌の多く、および *S. marcescens* では、多剤かつ高度耐性の傾向が顕著であった。これらの菌種で多剤耐性株が多い点は、日常検査で MBL 産生菌を疑う特徴として重要である。しかし、カルバペネム系薬やアミノ配糖体系薬、新キノロン系薬に感性を示す株が少数存在することが、今回の検討や他の報告<sup>4,5,12,20,30)</sup>でも認められている。特に *P. aeruginosa* では、今回検討した MBL 遺伝子陽性 79 株の IPM, GM および CPF 3 薬剤耐性株の割合は約 79% であり、日常検査では抗緑膿菌薬に感性を示す MBL 産生株の存在にも注意が必要である。また、*P. aeruginosa* の MBL 遺伝子保有株の GM と AMK の感受性を詳細に比較すると、両薬剤の耐性率は GM では 93.7%, AMK では中間を含め 64.6% であった。このよう

に、MBL産生株でもGMとAMKで耐性率に差が生じることも注意すべき点である。

*P. aeruginosa* 以外の非発酵菌で分離株数および多剤耐性株が多かった *P. putida/fluorescens* と *A. baumannii* では、*P. putida/fluorescens* は両者を正確に区別することが困難であるが、*P. putida* は薬剤耐性傾向が強いとされ<sup>31)</sup>、今回の検討でも同様の傾向であった。*A. baumannii* はMBL産生株を含め、β-ラクタマーゼ阻害薬との合剤のMIC値が低いことが報告<sup>20, 32)</sup>されている。*S. marcescens* を除く腸内細菌科、*Alcaligenes* spp. および *A. lwoffii* は、カルバペネム系薬のMIC値が感性の範疇にあるものが多く認められた。しかも、これらの菌種は他の系統（アミノ配糖体系、キノロン系）の抗菌薬にも感性を示す株が多かった。このような薬剤感受性の特徴は、特に腸内細菌科のMBL産生菌が日常検査で発見されにくい要因となるものと考えられた。私どもが今回の検討期間を含め日常検査で腸内細菌科のMBL産生菌をスクリーニングした経験では、CAZ、cefoperazone/sulbactam (CPZ/SBT)、第4世代セフェム系薬感受性が中間または耐性の場合が多く、カルバペネム系薬のMIC値は感性の範疇にあるもののやや高い(2~4 μg/mL)ことが多い。腸内細菌科は本来これらの抗菌薬に感性を示すことから、このような株がみられた場合にはMBL産生菌を疑うべきである。同様のことはShibataら<sup>15)</sup>やHirakata<sup>33)</sup>らによる報告でもみられ、CAZやCPZ/SBTがMBL産生菌のスクリーニングに使用されている。今回検討した10薬剤中、CAZはMBL産生菌に対して最も高率に耐性を示し、カルバペネム系薬感性株に対しても同様にほとんどが耐性を示した。CAZは日常検査に広く用いられていることから、本薬剤の感受性に特に注意してみるのが良いと考えられる。なお、*S. marcescens* は他の腸内細菌科と異なり、多剤耐性株として検出されることが多い。

以上の結果から、日常検査におけるMBL産生菌の検出は、*Acinetobacter* spp.や*Alcaligenes* spp.を除く非発酵菌ではCAZ耐性を示す多剤耐性株、腸内細菌科ではCAZに中間または耐性を示す株をスクリーニングし、SMA阻害試験で確認するのが効率的と考えられた。SMA阻害試験によるMBL産生菌の検出率は、重高らによる比較検討<sup>26)</sup>で約98%と高い結果が報告されている。本試験は簡便であり、疑わしい株について同定検査と組み合わせることで、プラスミド媒介性MBL遺伝子保有菌を高い確率でスクリーニングできると考えられた。SMA等のMBL阻害薬による検査の実施率は、最近の全国調査<sup>34)</sup>では約41%であるが、日常検査におけるMBL産生菌の検査に今後不可欠と考えられた。本試験は当初、SMA類似の化合物とCAZの組み合わせが用いられた。今回の日常検査での検討では、CAZに高度耐性を示す一部の株で阻害による感受性の復活が阻止円の出現にまでいたらず、IPMと組み合わせた方が検出容易となる場合が認

められた。そこで、CAZと同時にIPMを検査することでさらに信頼性の高い結果が得られるようになった。これら2薬剤の併用はShibataらの報告<sup>15)</sup>にもみられている。なお、CAZとIPMディスクのいずれにも阻止円が出現しない場合もあり、このような株はPCR法によるMBL遺伝子の確認が必要である。今回の検討ではretrospectiveにこのような株が*P. aeruginosa*で2株認められた。

*P. aeruginosa* におけるMBL産生株の頻度は、年次的に大きな変化が認められなかったものの、多剤耐性株は年次的に増加していた。多剤耐性株増加の背景にはMBL以外の耐性機構の関与も示唆され、この場合カルバペネム系薬に対する耐性度はあまり高くないとされている<sup>35)</sup>。成績は省略したがMBL非産生の多剤耐性株の薬剤感受性も検討したが、IPMのMIC分布は16~32 μg/mLであり、高度耐性株は認められなかった。薬剤耐性菌の消長には抗菌薬使用が関連し、IPM使用が本菌におけるIPM耐性菌出現と強く関連していることが報告<sup>36)</sup>されている。当院における抗菌薬使用は、昨年度における注射薬の処方量を調査しえたが、カルバペネム系薬が最も多かった。また、日常検査成績による抗緑膿菌薬に対する耐性率は以前からIPMで高い傾向が認められており<sup>13)</sup>、最近までこの傾向が続いている。抗菌薬処方量は1年のみの統計結果から耐性菌の増加と関連づけるには十分でないものの、当院における多剤耐性株の増加にカルバペネム系薬の使用が関係している可能性が示唆された。また、MBL産生菌を含め多剤耐性株の増加が同一起源の株に由来している可能性もあり、遺伝学的な検討も同時に行う必要がある。

今回の検討では、MBL産生菌は*P. aeruginosa*に多く、多剤耐性の傾向が最も顕著であった。また、多剤耐性株も増加傾向にあることから、今後の動向にはいっそうの注意が必要であり、日常検査レベルでの監視が必要と考えられた。

なお、本論文の要旨は、第49回日本化学療法学会総会(2001年、横浜)、第48回日本化学療法学会東日本支部総会(2001年、東京)、第51回日本化学療法学会総会(2003年、横浜)、第38回緑膿菌感染症研究会(2004年、東京)、第80回日本感染症学会総会(2006年、東京)にて発表した。

## 文 献

- 1) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33
- 2) Bush K: Metallo-β-lactamases: A class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (Suppl 1): S48-53
- 3) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-51

- 4) Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M: Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824-29
- 5) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al: Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71-8
- 6) 荒川宜親: 広域  $\beta$ -ラクタム薬耐性に関与する  $\beta$ -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関。日本臨床微生物学雑誌 2003; 13: 12-23
- 7) Toleman M A, Simm A M, Murphy T A, Gales A C, Biedenbach D J, Jones R N, et al: Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-79
- 8) Castanheira M, Toleman M A, Jones R N, Schmidt F J, Walsh T R: Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>GIM-1</sub>*, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-61
- 9) Cornaglia G, Riccio M L, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini G M: Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899-900
- 10) Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y: Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* 1999; 354: 955
- 11) Tsuji A, Kobayashi I, Oguri T, Inoue M, Yabuuchi E, Goto S, et al: An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at the medical institutes nationwide in Japan. *J Infect Chemother* 2005; 11: 64-70
- 12) Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, et al: Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographic diverse of Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 458-61
- 13) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 猪狩 淳: 臨床材料からの多剤耐性緑膿菌の動向。第35回緑膿菌感染症研究会講演記録 2001; 102-6
- 14) 三澤成毅, 小栗豊子, 猪狩 淳: 臨床材料より分離された *Serratia marcescens* の細菌学的検討, 第2報薬剤感受性。日化療会誌 1998; 46: 462-7
- 15) Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al: PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamase and integrases carried by gram-negative bacteria in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-13
- 16) 三澤成毅: セラチア (*Serratia*) の検査法, 2. 薬剤感受性の動向および疫学的マーカーの検査法。検査と技術 2004; 32: 103-9
- 17) 抗菌薬感受性測定法検討委員会 (委員長: 斎藤厚) 報告 (1992年): I. 微量液体希釈法によるMIC測定法 (日本化学療法学会標準法) の一部修正。Chemotherapy 1993; 41: 183-5
- 18) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, CLSI document M100-S8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2006
- 19) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al: PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broadspectrum  $\beta$ -lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2909-13
- 20) Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, et al: 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: 5256-63
- 21) 三澤成毅, 中村文子, 小栗豊子, 猪狩 淳: 当院における最近のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の動向。第38回緑膿菌感染症研究会講演記録, 2004; 115-9
- 22) Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al: Clinical and bacteriological characteristics of IMP-1 type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 26-32
- 23) 緑膿菌感染症学調査研究会 (PER2001), 小栗豊子, 辻明良, 小林寅詰, 井上松久, 五島瑳子: 臨床材料から分離された緑膿菌の分離状況と血清型別成績。第36回緑膿菌感染症研究会講演記録, 2002; 35-9
- 24) 篠田陽子, 富田亜紀子, 板谷一宏, 陳 戈林, 和久田梨香, 福地邦彦, 他: 昭和大学病院における多剤耐性緑膿菌が保有するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の解析。臨床病理 2006; 54: 699-705
- 25) Jones R N, Deshpande L M, Bell J M, Turnidge J D, Kohno S, Hirakata Y, et al: Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo- $\beta$ -lactamases in multidrug-resistant gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 289-94
- 26) 重高正行, 村谷哲郎, 小林とも子, 大久保孔平, 松本哲朗: Metallo- $\beta$ -lactamase 産生株検出における市販の確認セットの比較。感染症学雑誌 2006; 80: 391-8
- 27) 神田成夫, 大石和伸, 柴田尚宏, 荒川宜親: 尿より検出された VIM-2 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生緑膿菌の一例。日本臨床微生物学雑誌 2003; 13: 118
- 28) Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, et al: Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>VIM-2</sub>* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 626-8
- 29) 高野さかえ, 常松範子, 斉木由美子, 柴田尚宏, 荒川宜親: 関東で初めて検出された VIM-2 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas fluorescens* の1症例。日本臨床微生物学雑誌 2004; 14: 163
- 30) Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, et al: Production of CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase by five gram-negative bacilli: survey of



- clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 631-8
- 31) Yomoda S, Okubo T, Takahashi A, Murakami M, Iyobe S: Presence of *Pseudomonas putida* strains harboring plasmids bearing the metallo-β-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* in a hospital in Japan. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4246-51
- 32) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 猪狩 淳: 臨床材料からの *Acinetobacter* の検出状況と薬剤感受性について。第 37 回緑膿菌感染症研究会講演記録, 2003; 100-4
- 33) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, et al: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-β-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2006-11
- 34) 浦 敏郎, 三澤成毅: 微生物検査部門 ③微生物検査サーベイ報告。平成 15 年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書, 日本臨床衛生検査技師会, 東京, 2004; 533-72
- 35) Livermore D M: Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-40
- 36) Harris A D, Smith D, Johnson J A, Bradham D D, Roghmann M-C: Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 340-5

### Prevalence and antimicrobial susceptibility of metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacilli from clinical specimens

Shigeki Misawa<sup>1)</sup>, Toyoko Oguri<sup>2)</sup>, Ayako Nakamura<sup>1)</sup>,  
Yoko Tabe<sup>3)</sup>, Shigemi Kondo<sup>3)</sup>, Kazunori Miyake<sup>3)</sup>,  
Noriko Miyake<sup>3)</sup>, Jun Igari<sup>3)</sup> and Akimichi Ohsaka<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup> Clinical Laboratory, Juntendo University Nerima Hospital

<sup>3)</sup> Department of Laboratory Medicine, Juntendo University School of Medicine

<sup>4)</sup> Transfusion Medicine and Stem Cell Regulation, Juntendo University School of Medicine

We studied the prevalence, antimicrobial susceptibility, and performance in the screening of metallo-β-lactamase (MBL)-producing gram-negative bacilli from clinical specimens at Juntendo University Hospital from 2001 to 2005. A total of 352 nonduplicate strains were screened for MBL production by the routine antimicrobial susceptibility test and disk approximation test using the sodium mercaptoacetic acid (SMA) test. Of these, 247 MBL-positive strains were detected in genes for the IMP-1 group (*bla<sub>IMP-1</sub>*) by PCR in 79 (32.0%) for *Pseudomonas aeruginosa*, 38 (15.4%) for *Pseudomonas putida/fluorescens*, 37 (15.0%) for *Acinetobacter* spp., 11 (4.5%) for *Achromobacter* spp., 6 (2.4%) for *Alcaligenes* spp., 50 (20.2%) for *Enterobacter cloacae*, 12 (4.9%) for *Citrobacter freundii*, 7 (2.8%) for *Providencia rettgeri*, 3 (1.2%) for *Serratia marcescens*, 3 (1.2%) for *Klebsiella* spp., and 1 (0.4%) for *Escherichia coli*. No strains were detected in genes for the IMP-2 group (*bla<sub>IMP-2</sub>*) or VIM-2 group (*bla<sub>VIM-2</sub>*). There was no significant increase in number of IMP-1 group positive strains in the last 5 years except *P. aeruginosa* and *E. cloacae*. IMP-1 group positive *P. aeruginosa* and *E. cloacae* represented slightly increase in 2005 and 2003 to 2005, respectively. Susceptibility to the 10 antimicrobial agents of IMP-1 group-positive strains was species-dependent. Most strains of *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter* spp., and *S. marcescens* were highly and multiresistant to antimicrobials, including carbapenems and broad-spectrum β-lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones. Among the family *Enterobacteriaceae* other than *S. marcescens*, *Acinetobacter lwoffii* and *Alcaligenes* spp. were frequently susceptible to carbapenems. IMP-1 group-positive strains have been detected most frequently in *P. aeruginosa* and disseminated to other glucose-nonfermenters and *Enterobacteriaceae* at our hospital and nationwide. The incidence of MBL-producing *P. aeruginosa* was ranged from 0.3 to 1.5% in the last 5 years. In contrast, the incidence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* characterizing as following two combinations: resistant to imipenem, gentamicin, and levofloxacin; resistant to imipenem, levofloxacin, and intermediate or resistant to amikacin have annually increased 3.7% and 3.9%, respectively in 2005. These results emphasize the need for daily surveillance of MBL-producing bacteria with both routine antimicrobial susceptibility tests and SMA tests in the microbiology laboratory.