

# レファレンスセンター会議 薬剤耐性菌

世話人：国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 松井真理

## 今年度の活動計画

- ①陽性コントロールDNA配布
- ②研修予定
- ③カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）病原体サーベイランス集計還元
- ④薬剤耐性菌情報還元用ホームページの開設について

## 薬剤耐性菌検査に関する情報提供

- ①CRE病原体サーベイランス情報還元
- ②CRE検査における確認事項

## その他

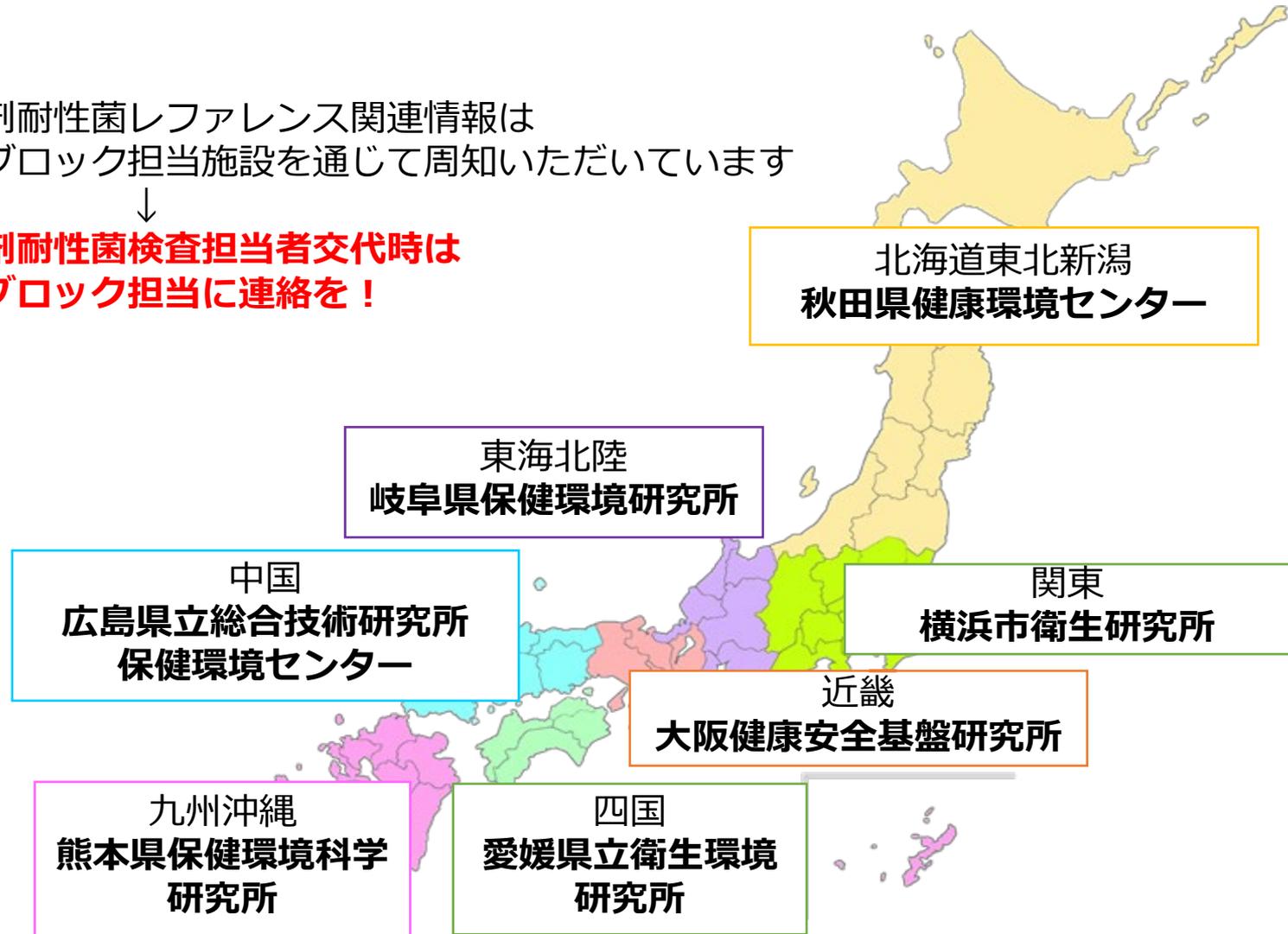
- ・AMED研究班 共同研究について
- ・薬剤耐性菌レファレンス活動に関する意見・要望など

# 薬剤耐性菌 レファレンス担当施設

薬剤耐性菌レファレンス関連情報は  
各ブロック担当施設を通じて周知いただいています



**薬剤耐性菌検査担当者交代時は  
各ブロック担当に連絡を！**



# 今年度の活動計画①

## 陽性コントロールDNA一斉配布

- 陽性コントロールDNA一斉配布

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)

薬剤耐性アシネトバクター (MDRA) 検査用

\*内容物は令和5年度と同一遺伝子型 ↓

陽性コントロールDNAセット



カルバペネマーゼ遺伝子 (12種)	IMP-1型 (IMP-1、IMP-6の2種)、IMP-2型、NDM型、KPC型、OXA-48型、VIM-2型、GES型、IMI型、KHM型、SMB型、FRI型
基質拡張型 β-ラクタマーゼ遺伝子 (6種)	TEM型、SHV型、CTX-M-1グループ、CTX-M-2グループ、CTX-M-8グループ、CTX-M-9グループ
AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 (6種)	MOX型、CIT型、DHA型、ACC型、EBC型、FOX型
van遺伝子及びddl遺伝子 (6種)	vanA、vanB、vanC1、vanC2/3、ddl ( <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> の2種)
OXA型カルバペネマーゼ遺伝子 (5種)	OXA-51-like、OXA-23-like、OXA-58-like、OXA-24-like、ISAb1

現在 各ブロックのレファレンス担当施設を通じて、送付希望申込み中  
(感染研締め切り7/12)



7月末頃 感染研より、送付希望施設へ発送予定

今年度の活動計画②

# 薬剤耐性菌検査に関する研修予定

	基本コース（初心者向け） 2.5日間	アップデートコース（経験者向け） 1日間
日時	2024年9月25日（水） 9:00-18:00 26日（木） 9:00-18:00 27日（金） 9:00-12:00	2024年10月8日（火） 9:30-17:00
場所	国立感染症研究所 村山庁舎 （講義のみZoomウェビナー聴講可）	Zoomウェビナー （国立感染症研究所 ハンセン庁舎参加可）
概要	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 講義及び実習</li> <li>・ 健感発0328第4号（平成29年3月28日）別添1～3の検査項目</li> <li>・ 薬剤感受性試験、薬剤耐性菌検査の基本</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 講義のみ</li> <li>・ 薬剤耐性菌検査関連の情報アップデート 講義内容案 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 報告が稀な薬剤耐性遺伝子保有株の特徴</li> <li>- タイピング解析いろは（演習あり）</li> <li>- 疫学アップデート</li> <li>- 新規抗菌薬とその薬剤感受性試験</li> </ul> </li> <li>・ 外部講師の特別講演</li> </ul>
対象者	原則、薬剤耐性菌研修基本コース 現地参加経験のない方	薬剤耐性菌検査実施経験のある方
人数	30名まで（感染研村山庁舎） （100名程度まで：ウェビナー）	200名程度まで（ウェビナー） （20名程度まで：感染研ハンセン庁舎）

案内・参加申し込みは各ブロックのレファレンス担当施設を通じて

実施要綱配布

衛微協後

参加申し込み締切

7月下旬～8月上旬頃を予定

参加決定案内

8月予定

# 今年度の活動計画②

## 薬剤耐性菌検査に関する研修 基本コース（初心者向け）

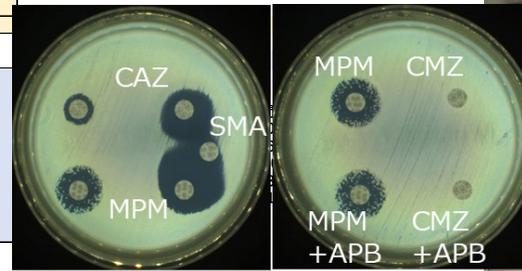
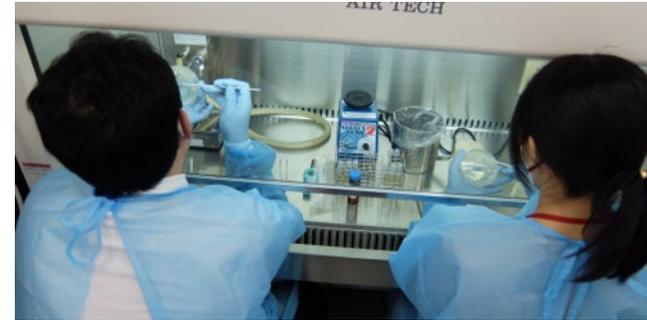
目的：薬剤耐性菌検査の基本知識及び検査技術の取得（対象：CRE, VRE, VRSA, MDRA, MDRP）

目標：平成29年通知に基づくカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）を適切に検査報告できる

研修内容	場所（担当者）
9月26日（火）	
8:30～参加受付	
9 全体連絡	講義室（松井）
バイオセーフティ講習	講義室（松井）
10 休憩	
☆あいさつ	講義室（Zoom音井センター長）
☆抗菌薬総論	講義室（鈴木里）
11 ☆薬剤耐性機構 β-ラクタマーゼを中心に	講義室（鈴木里）
12 昼食休憩	
13 実習室へ移動	
実習内容説明 薬剤感受性試験法	実習室（松井）
14 薬剤感受性試験 ・Etest ・ディスク拡散法 ・微量液体希釈法 ・寒天平板希釈法	実習室
15 休憩・講義室へ移動	
☆薬剤耐性菌検査法 （主にCREの検査について）	講義室（松井）
16 遅くとも18:00解散	

研修内容	場所（担当者）
確認テスト	
8:30開場	
9 確認テスト	講義室
☆CRE病原体サーベイランス	講義室（松井）
10 実習室へ移動	
薬剤感受性試験 結果判定 （グループワーク）	実習室
11 薬剤感受性試験解説	実習室
12 mCIM、CarbaNP実施	
13 昼食休憩	
☆VRE, MDRAの 疫学と検査法	講義室 （鈴木、松井）
☆CRE検査法（前日の復習）	講義室（松井）
14 実習室へ移動	
15 実習内容説明 CarbaNP判定 ディスク法 mCIM	実習室
16 VRE、MDRA結果観察	
17 遅くとも18:00解散	
18:30～ 情報交流会（予定）	

研修内容	場所（担当者）
9月28日（木）	
8:30開場	
9 結果判定	実習室
報告書作成	実習室
10 結果解説	実習室
11 講義室へ移動	
☆NESID, JANISデータの 見方	講義室（鈴木里）
12 ☆総括、あいさつ	講義室（鈴木里、松井）
遅くとも12:30解散	



講義（約6時間）：Zoom聴講可

実習（約10時間）：現地受講のみ



現地修了生には  
参加証明書を発行



令和5年度 30施設30名参加

## 今年度の活動計画②

# 薬剤耐性菌検査に関する研修 アップデートコース

目的：薬剤耐性菌検査の疫学や検査技術に関する最新知識の取得（対象：CRE, VRE, VRSA, MDRA, MDRP）

目標：医療機関や保健所が実施する薬剤耐性菌対策に対して、病原体試験解析担当者として専門的な支援・助言が可能になること。地域における薬剤耐性菌の調査研究を実施。

	9:30～ あいさつ
	9:45～11:00
10	検査法アップデート (報告が稀な耐性遺伝子の特徴など)
11	11:00～12:00 タイピングのいろは (演習あり)
12	昼食休憩
13	13:00～13:30 タイピング演習解説
	13:30～14:15 疫学アップデート
14	14:20～15:00 新規抗菌薬
15	休憩
	15:30～16:30 特別講演
16	16:30～17:00 まとめ、あいさつ

← 令和6年度タイムテーブル案（右は事前にいただいた要望）

- ・ 稀な遺伝子型株の特徴、検査問い合わせの多い内容
- ・ カルバペネマーゼ遺伝子全長配列決定方法
- ・ CRE検査に関する疑問点解説
  - SMAディスク判定困難例
  - 医療機関と同定菌種名が異なる場合の対応

- ・ CREを中心に（可能であればVRE,MDRA)薬剤耐性菌の全ゲノム解析についての概論
- ・ 院内・地域内感染が疑われる事例で行政検査として実施する際に抑えておくべきポイント

- ・ セフィデロコル耐性について、地方衛生研究所でできる検査
- ・ セフィデロコルの薬剤感受性試験で難しいポイントは？

CRE等検査に関する疑問点解説の  
質問を募集予定です！

# 薬剤耐性菌の検査に関する研修体制

参加者アンケートでは、  
ハイブリッド型研修・現地研修の希望は半々

## ハイブリッド型研修のメリット

- ・ 旅費の心配がなく複数名参加可能
- ・ 自施設の試薬等を使用した検査結果の確認  
→ 試薬の劣化の可能性判明、精度管理としての一面

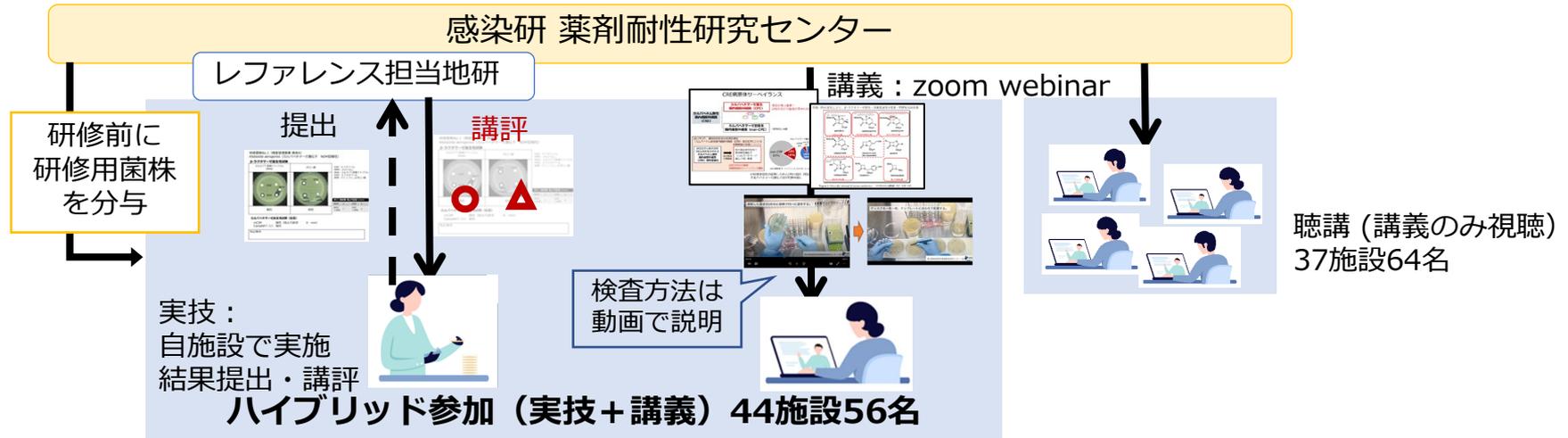
## ハイブリッド型研修のデメリット

- ・ 経験者のいない施設にはハードルが高い  
→ 現地研修の継続も必要

初心者の方、特に薬剤耐性菌  
検査経験者のいない施設の方は  
現地研修参加をおすすめします！！

Web講義配信は今年も継続します  
業者のサポートをいれ、利便性向上予定  
継続者講習としてご活用ください

令和4年度 ハイブリッド型研修 実技+講義、@自施設より参加（2日、受講・聴講 64施設121名）



# CRE病原体サーベイランス集計還元

病原微生物検出情報（IASR）で還元 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr.html>

・ **2017年検体採取分 集計結果**

Vo.39, p162-163 (2018年9月号)

・ **2018年検体採取分 集計結果**

Vol.40, p157-158 (2019年9月号)

・ **海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の増加**

Vol.40, p158-159 (2019年9月号)

・ **2019年検体採取分 集計結果**

Vol.42, p123-124 (2021年6月号)

・ **2020年検体採取分 集計結果**

Vol.43, p215-216 (2022年9月号)

・ **2021年検体採取分 集計結果**

Vol.44, p130-131 (2023年8月号)

・ **2022年検体採取分 集計結果** **NEW**

Vol.45, pXX (2024年7月号掲載予定)

・ **2023年検体採取分 集計作業中 → 病原体検出情報システム登録をお願いします**



## 今年度の活動計画④

# 薬剤耐性菌情報還元用ホームページ開設（9月頃～運用予定）



地方衛生研究所単位で  
1アカウント発行（ID, パスワード）  
\*ただし、アカウント管理者1名登録、  
アカウント情報は各所内の薬剤耐性菌検査担当者で共有可



## 使用用途

### ・感染研AMR ⇒ 全施設

薬剤耐性菌関連資料（研修資料等）  
をアップし、随時ダウンロード可能

### ・感染研AMR ⇔ 個別の地研

ゲノムデータ等、個別の試験解析結果を共有

各ブロックのレファレンス担当施設を通じて  
アカウント管理者情報登録のお願い（部署名、メールアドレス←可能な限り個人アドレス）



8月末頃、感染研より初期アカウント情報のお知らせ（アカウント管理者宛にメール）

薬剤耐性菌検査に関する情報提供  
①CRE病原体サーベイランス情報還元

# CRE病原体サーベイランス2022年検体採取株の検査数と陽性数

		検体採取期間	2022年1～12月 (n=1,426)			
		検査項目	検査実施 機関数*	検査実施株数 (%)	陽性数 (%**)	
原則 実施	遺伝子 検査	IMP型	74	1,426 (100.0)	173	(12.1)
		NDM型	74	1,426 (100.0)	33	(2.3)
		KPC型	74	1,426 (100.0)	2	(0.1)
		OXA-48型	74	1,426 (100.0)	2	(0.1)
	表現 型 検査	メタロ-β-ラクタマーゼ試験	74	1,426 (100.0)	206	(14.4)
		ボロン酸試験	74	1,426 (100.0)	230	(16.1)
推奨	遺伝子 検査	VIM型	62	1,165 (81.7)	0	(0.0)
		GES型	61	1,157 (81.1)	2	(0.2)
		IMI型	31	373 (26.2)	0	(0.0)
		KHM型	30	431 (30.2)	0	(0.0)
		SMB型	27	327 (22.9)	0	(0.0)
	表現 型 検査	Carba NP test***	15	241 (16.9)	40	(16.6)
		CIM***	47	673 (47.2)	117	(17.4)
<b>いずれかのカルバペネマーゼ遺伝子陽性</b>			<b>1,426</b>	<b>212</b>	<b>(14.9)</b>	

\* その検査項目結果を1株でも報告した検査実施機関数、検査項目は2017年3月通知（健感発0328第4号）に基づく

\*\* 検査実施株数に対する陽性率 (%)

\*\*\* CarbaNP test, CIMの少なくとも一方が実施された株は52施設831株（全体の58.3 %）、カルバペネマーゼ遺伝子非検出株に絞ると 51施設 698株（非検出株の57.5 %）

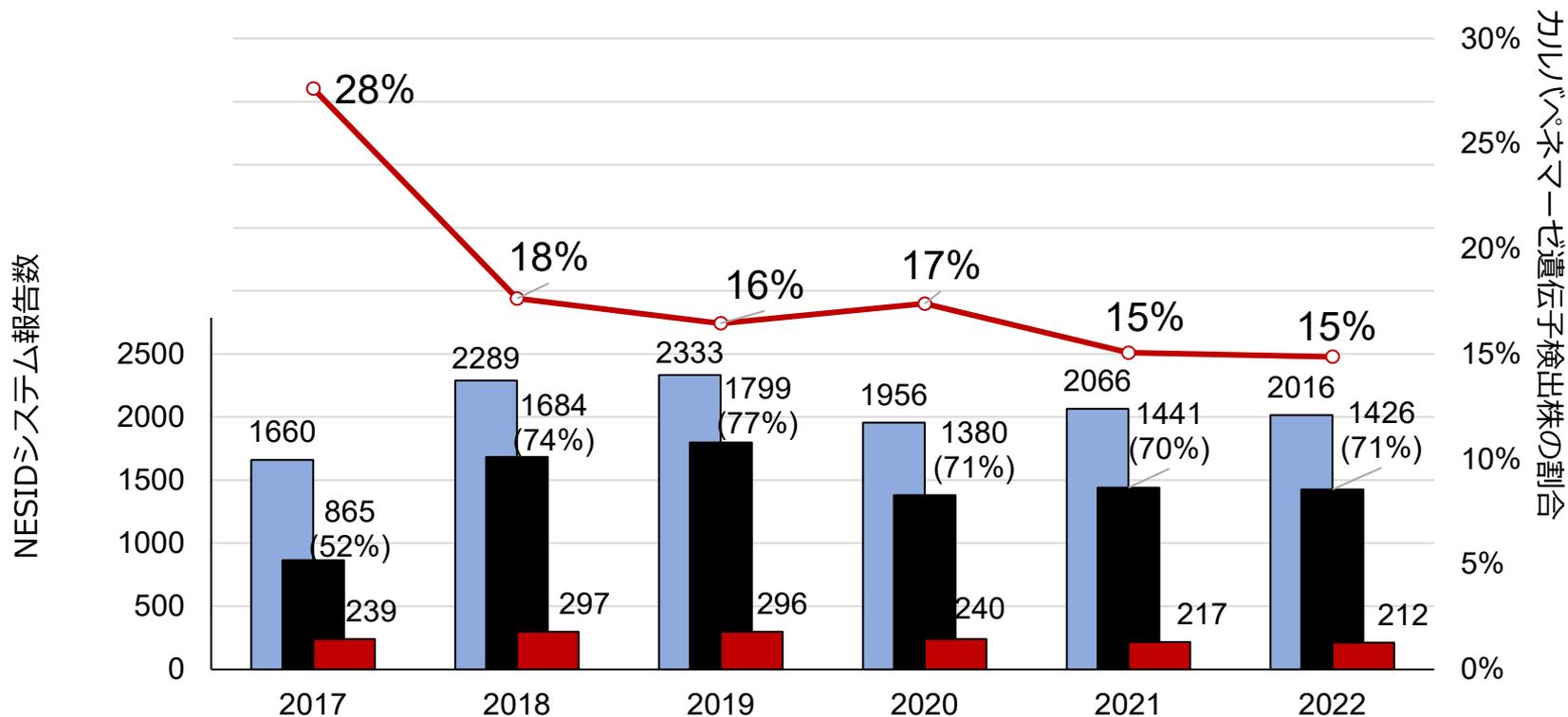
# CRE病原体サーベイランス、カルバペネマーゼ遺伝子検出株の推移

■ CRE感染症届出患者数

■ CRE病原体報告株数（報告率）

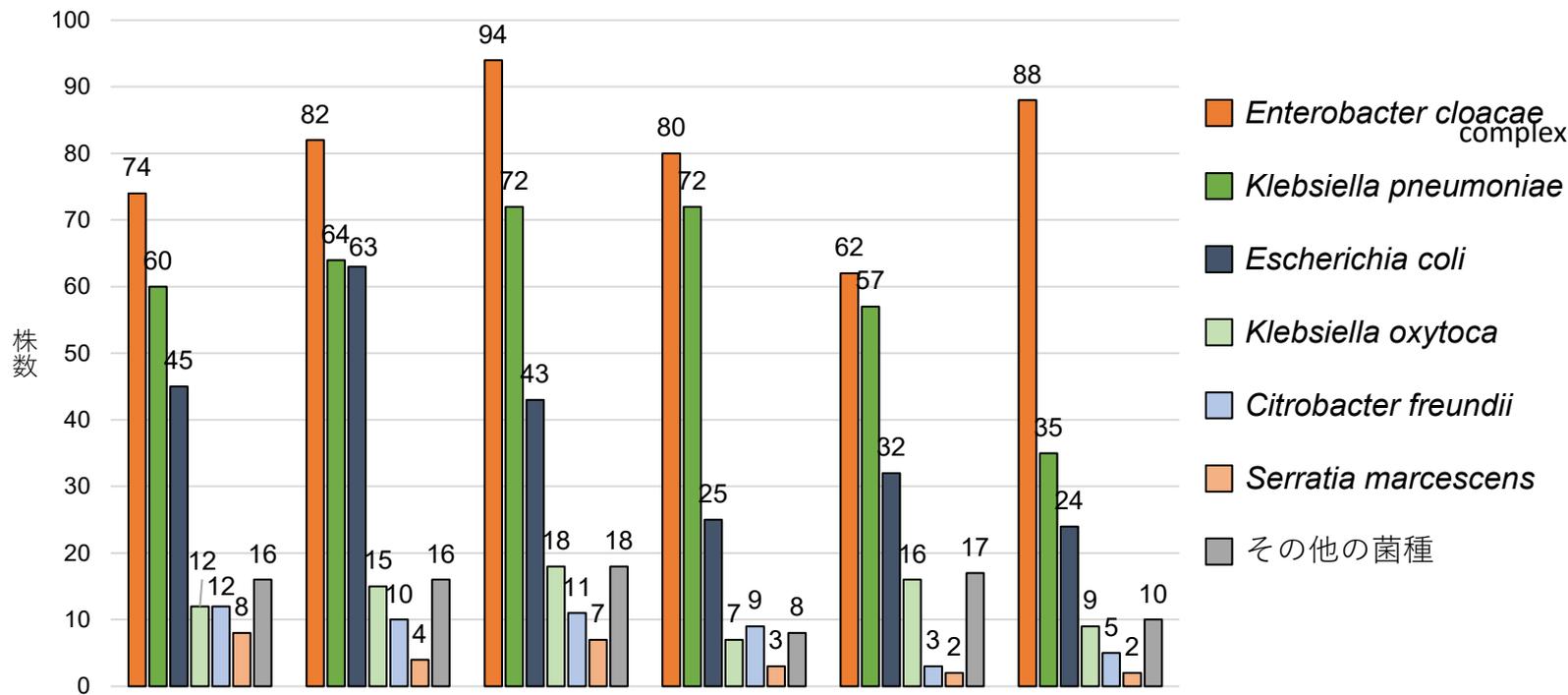
■ カルバペネマーゼ遺伝子検出株数

○— カルバペネマーゼ遺伝子検出株の割合



カルバペネマーゼ遺伝子検出株の割合は少しずつ減少  
2022年はこれまでで最も低い（14.9%）

# CRE病原体サーベイランス、IMP型陽性株の菌種別報告数



検体採取年	2017	2018	2019	2020	2021	2022
CRE病原体報告株数	865	1684	1799	1380	1441	1426
IMP型陽性株数	227	254	263	204	189	173
CRE病原体報告株数に対するIMP型陽性株 (%)	26.2 %	15.1 %	14.6 %	14.8 %	13.1 %	12.1 %

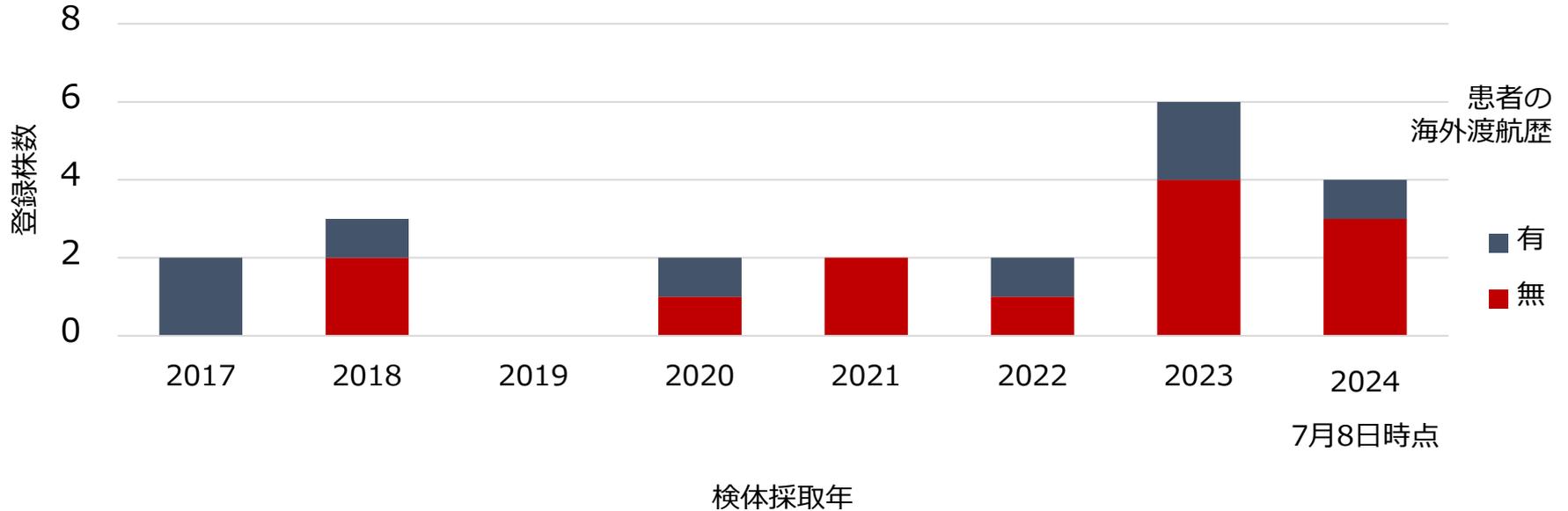
IASR  
2024年7月号予定

IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子陽性株の割合は減少傾向、菌種内訳に変化  
 → 病原体サーベイランスの継続実施の成果！  
 全国的かつ継続的なサーベイランスの重要性を示すデータ

# OXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子陽性株増加傾向

CRE病原体サーベイランス OXA-48型陽性株

(CRE感染症届出患者分離株のみ, n=21)



## 菌種内訳

<i>Escherichia coli</i>	n=11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n=9
<i>Serratia marcescens</i>	n=1

2024年7月8日時点暫定データ

薬剤耐性菌検査に関する情報提供  
②CRE検査における確認事項

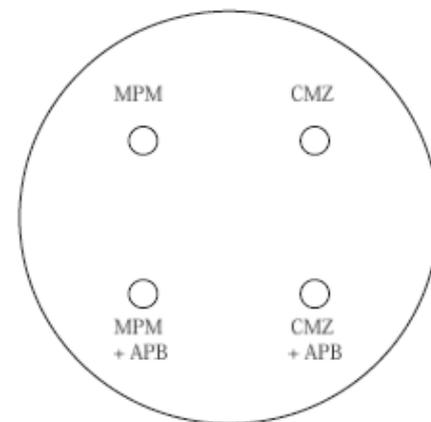
# 情報提供②CRE検査における確認事項 ディスク法検査方法再確認のお願い

## ・菌液の塗り方

隙間のないように丁寧に



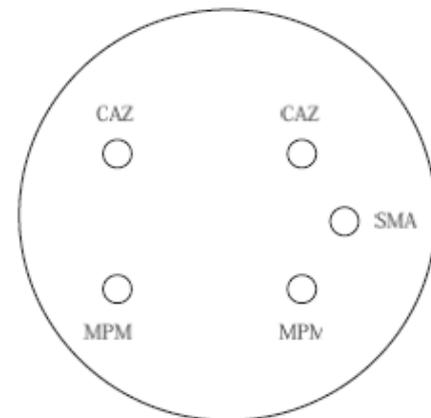
A.



## ・ディスクの置き方

テンプレート (→) を使用して目線を一定に置く

B.



## ・培地の厚さは適切？

厚さ4 mm

## ・ディスクの期限・保存条件はOK？

病原体検出マニュアル  
カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 改訂予定

情報提供②CRE検査における確認事項

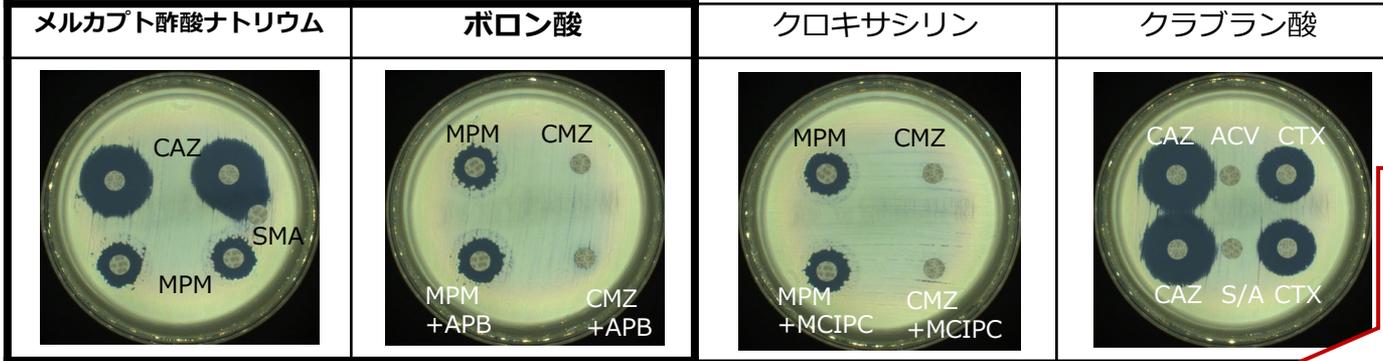
# OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌に注意

令和5年度研修菌株 No.4

令和元年度精度管理事業 検体D 菌種：*Escherichia coli*

CRE判定基準を満たす薬剤：MicroScan なし（CREと判定されない）  
Vitek2 メロペネム・イミペネムとセフメタゾール

カルバペネム  
MIC低いこと  
がある



陰性

陰性

陰性

陰性

(MPM+APB)-MPM=14-13=1 mm  
(CMZ+APB)-CMZ=6-6=0 mm

(MPM+MCIPC)-MPM=13-13=0 mm  
(CMZ+MCIPC)-CMZ=6-6=0 mm

OXA-48型の  
阻害剤はない  
=ディスク法から  
の推測困難

カルバペネマーゼ遺伝子		カルバペネマーゼ以外のβ-ラクタマーゼ遺伝子	
IMP型	-	CTX-M-1 group	-
NDM型	-	CTX-M-2 group	-
KPC型	-	CTX-M-9 group	-
<b>OXA-48型</b>	<b>+</b>	MOX型	-
VIM型	-	CIT型	-
GES型	-	DHA型	-
IMI型	-	ACC型	-
KHM型	-	EBC型	-
SMB型	-	FOX型	-
FRI型	-		

略号

CAZ：セフトアジウム、MPM：メロペネム、CMZ：セフメタゾール、CTX：セフトキシム  
SMA：メルカプト酢酸ナトリウム、APB：アミノフェニルボロン酸、MCIPC：クロキサシリン、  
ACV：クラブラン酸、S/A：スルバクタム/アンピシリン

Carba NP test 陰性

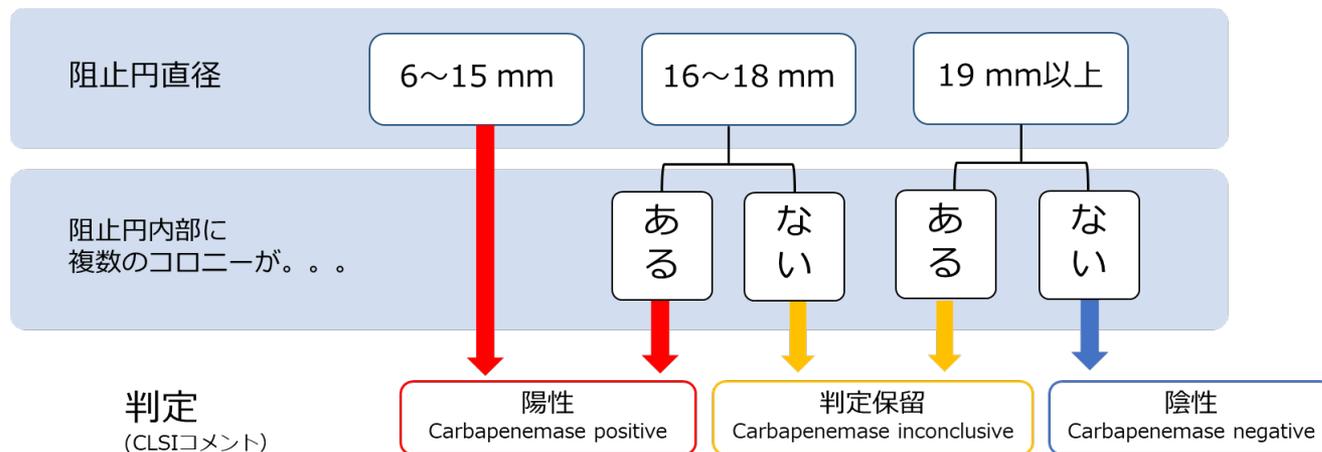
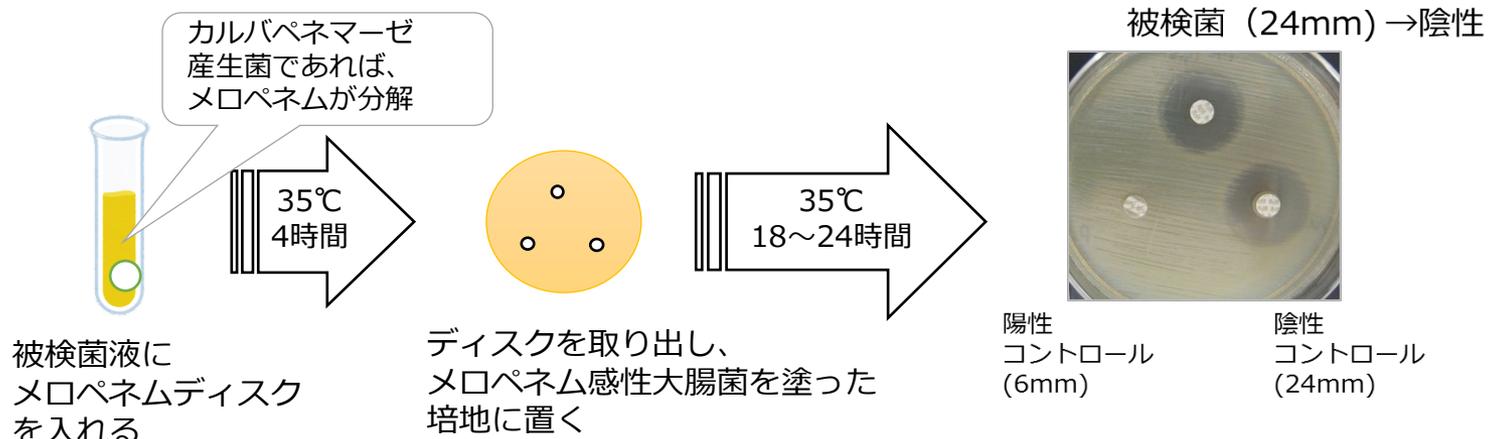
mCIM **陽性**（阻止円直径 6mm）

・β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンス結果は *bla*<sub>OXA-181</sub>  
・OXA-48型カルバペネマーゼ産生株は、阻害剤を用いたディスク法では鑑別困難（OXA型の明確な阻害剤なし）。カルバペネマーゼ産生性試験でも陰性と判定されることがある。遺伝子検査が必須

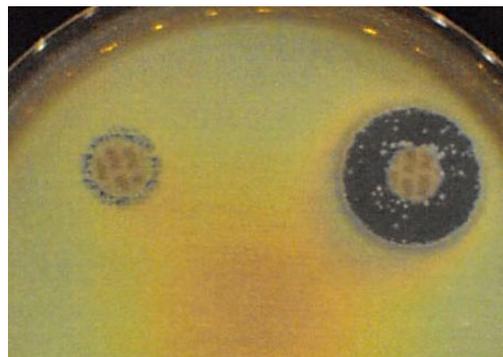
mCIM結果確認  
CarbaNP偽陰性  
になることあり

**mCIM 明確な陽性（≦10mm）かつ カルバペネマーゼ遺伝子陰性  
→ PCR等 要再検査（マルチ/シングルPCRを併用するなど）  
判定解釈困難な場合はご連絡ください！**

# 情報提供②CRE検査における確認事項 カルバペネマーゼ産生性試験、mCIM



**陽性**  
6mm

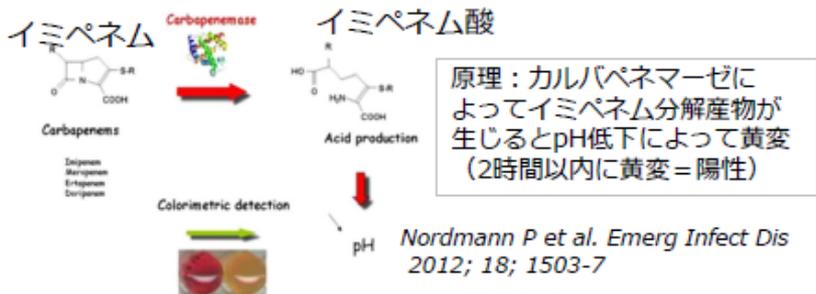


**陽性**  
17mm  
内部コロニーあり

# 情報提供②CRE検査における確認事項 カルバペネマーゼ産生性試験の注意点

遺伝子検査結果の裏付け、遺伝子検査で補足しきれないカルバペネマーゼ産生株の確認に有用  
(手順は、病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌Ver2.0 p42-45)

## CarbaNP test



**メリット**  
迅速 (2時間以内) 判定可能

**デメリット**  
自家調整試薬はpH調整必要、基質のイミペネムがやや高価  
OXA-48型, GES型は、偽陰性となりうる

**特異度高い**  
**CarbaNP陽性**  
**=カルバペネマーゼ産生**

## modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM)



**メリット**  
手間、コストの面から導入しやすい

**デメリット**  
*Enterobacter*属 AmpC過剰産生株での偽陽性報告あり

**感度高い**  
**見落とし防ぐ役割**  
**特に明確な陽性の場合**  
**カルバペネマーゼ産生**

004-06 第32回日本臨床微生物学会  
2021年1月28日~2月28日  
カルバペネマーゼ産生性確認試験で陽性を示す、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla<sub>ACT-28</sub>* 保有 *Enterobacter cloacae* complex について  
○塩本 高之, 奥玉 洋江, 城連 美夏, 谷村 隆英, 金戸 恵子, 木村恵梨子, 松井 真理, 鈴木 里和, 菅井 基行  
石川県保健環境センター, 石川県疫学中部保健福祉センター, 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター  
*E. kobei* ST125

P1-013 第33回日本臨床微生物学会  
2022年1月28日~1月30日  
カルバペネマーゼ産生性試験で偽陽性を示す *Enterobacter cloacae* complex 2株の解析  
○松本 裕子, 小泉 充正, 松井 真理, 鈴木 里和, 菅井 基行  
横浜市衛生研究所微生物検査研究課, 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター  
*E. kobei* ST125  
*Enterobacter roggenskampii* ST1593

Antimicrob Agents Chemother 2019,63(5), e02388-18  
→ *Enterobacter kobei* ST125 (染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla<sub>ACT-28</sub>*) では、偽陽性が確認

# β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンス

OXA-48型のバリエーション  
OXA-48, -181, -232など

## β-ラクタマーゼ遺伝子シーケンスによる型別

BLAST探索では誤った登録名の配列と一致することがある。  
参照配列と比較して、結果を確定すること！

病原体検出マニュアル  
薬剤耐性菌Ver2.0 p.38

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 (2023-8-08.2ver.*, 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-100</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> ⇒ S71932 (NG049172) <i>bla</i> <sub>IMP-6</sub> ⇒ AB040994 (NG049220)
NDM型	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ~ <i>bla</i> <sub>NDM-60</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-184</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-59</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)

### 遺伝子検出結果の書き方

PCRのみ ⇒ IMP型

シーケンス型別 ⇒IMP-1, IMP-6  
(型は不要)

IMP型全長シーケンス方法、プライマー

Jpn J Infect Dis. 2021 Nov 22;74(6):592-599.

Jpn. J. Infect. Dis., 74, 592-599, 2021

#### Method

Subtype Screening of *bla*<sub>IMP</sub> Genes Using Bipartite Primers for DNA Sequencing

Ryuji Kawahara<sup>1</sup>, Masanori Watahiki<sup>2\*</sup>, Yuko Matsumoto<sup>3</sup>, Kaeoru Uchida<sup>4</sup>, Makiko Noda<sup>4</sup>, Kanako Masuda<sup>4</sup>, Chiemi Fukuda<sup>4</sup>, Yuki Abe<sup>4</sup>, Yukiko Asano<sup>4</sup>, Kazumori Oishi<sup>2</sup>, Keigo Shibayama<sup>4</sup>, and Hiroto Shinomiya<sup>1</sup>