

第 381 回雑誌会

(Sep. 16, 2022)

(1) Responses of *Enterococcus faecalis* resistance and cytolysin up-regulation to nutrients in constructed mesocosms

Ali L., Mustafa M., Xiao Z., Islam W., Ara U. and Ajmal M.

Journal of King Saud University – Science, 34 (1), 2022

Reviewed by Y. Kato

多剤耐性菌の蔓延は、環境および健康に対する重大なリスクを与えている。特に、*Enterococcus faecalis* の抗生物質耐性菌 (ARB) / 遺伝子 (ARG) の増殖は、世界中で公衆衛生上の脅威となっている。しかし、抗生物質耐性菌の拡散や病原性の発現に寄与する栄養素などの環境変数に関する理解は十分ではない。本研究では、*E. faecalis* の生存率、抗生物質耐性、バイオフィーム形成、クオラムセンシングに及ぼす栄養塩 (硝酸 (N)、リン酸 (P)) の影響を探ることを目的とした。実験で用いるメソコスムは、中国の福建農林大学に設置され、5 L の水道水と福州国家森林公园の汚染されていない土壌で作成した。蒸発の影響を避けるため、水道水を毎日散布し、ほぼ元の水位に戻した。メソコスムと栄養塩の組み合わせは、T1 (N と P を補充しないコントロール)、T2 (N と P の低用量)、T3 (N と P の中用量)、T4 (N と P の高用量) とした。合計 8 回 (0, 1, 7, 14, 28, 40, 60, 96 日) のサンプリングで 96 日間にわたりメソコスムから腸球菌を分離し、DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した後、プライマー 72-F 及び 210-R を用いて *E. faecalis* 16S rRNA 遺伝子を同定した。分離された *E. faecalis* に対してブロス微量希釈法でアンピシリン (AMP)、オキシテトラサイクリン (OXY)、シプロフロキサシン (CIP)、バンコマイシン (VAN)、クロラムフェニコール (CHL)、エリスロマイシン (ERY) に対する耐性を判定した。また、マイクロプレートリーダーを用いてバイオフィーム生産を測定し、リアルタイム PCR (qPCR) で 2 ヶ月間、7 回にわたってクオラムセンシング関連遺伝子の存在量を測定した。

単離した *E. faecalis* 株のうち、AMP (188/382 株, 49%)、OXY (83/382 株, 21.7%) および CIP (21/382 株, 5.5%) に対してそれぞれ耐性を示した。60 日目と 96 日目の *E. faecalis* のバイオフィーム生産量は有意に増加した ($p < 0.01$)。また、クオラムセンシング関連遺伝子の発現は、栄養未処理 (T1) のメソコスムと比較して、栄養強化処理 (T2~T4) において転写レベルで有意に上昇 (10 倍) した。N と P 投入における関連遺伝子の発現は、硝酸イオンとリン酸イオンが *E. faecalis* のクオラムセンシング遺伝子の増幅に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から、メソコスム中の N および P の存在は、時間の経過とともに *E. faecalis* に薬剤耐性を身に付けさせることが示唆された。

第 381 回雑誌会

(Sep. 16, 2022)

(2) Monitoring Carbapenem-resistant Enterobacterales in the environment to assess the spread in the community

Urase, T., Goto, S., and Sato, M.

Antibiotics, **11**, 917, (2022).

Reviewed by K. Tsuda

COVID-19 パンデミックの際に下水疫学 (WBE) の有用性が証明され、新興感染症の環境モニタリングの役割が認識された。一方で、化学療法におけるカルバペネムの重要性から、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) は、新しい抗生物質が緊急に必要とされる極めて重要な細菌群として WHO によってリストアップされている。本研究では、WBE を CRE に適用し、環境株と臨床株を比較することによって環境モニタリングで検出可能な CRE を明らかにすることを目的とした。試料は、下水処理場の流入水 (1 地点)、塩素処理後の放流水 (4 地点)、河川水 (5 地点) から採取した。試料中の細菌をメンブレンフィルター (0.45 μm) で回収し、メロペネム (MPM) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加・非添加の CHROMagar ECC 寒天培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。これらの培地から推定 CRE を単離した。その後、推定 CRE に対して、ダブルディスクシナジー試験を用いて MPM 耐性とメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) 産生を確認した。また、MPM 耐性が確認された菌株の DNA を抽出し、16S rRNA を増幅した。増幅した 16S rRNA をキットにより精製し、サンガー法により菌種を同定した。さらに、カルバペネマーゼをコードする遺伝子 (IMP 型, NDM 型, VIM 型, KPC 型, OXA-48-like 型, GES 型) を検出するために PCR スクリーニングを実施した。

CRE 単離株から NDM 型カルバペネマーゼを保有する *Escherichia coli* (6/9 株)、IMP 型カルバペネマーゼを保有する *Enterobacter cloacae* complex (9/58 株)、*Klebsiella pneumoniae* complex (13/47 株) が検出された。また、GES 型カルバペネマーゼを保有する *Enterobacter* (27/58 株)、*Klebsiella* (24/47 株)、*Raoutella* (7/7 株) が臨床単離株と比較して頻繁に検出された。これらの菌種の CRE は WBE による適用が可能であることが示唆された。臨床環境の CRE は 732/1799 株 (40.7%) が *Klebsiella aerogenes* であるのに対して、下水から単離された *Klebsiella aerogenes* (3/47 株) は極めて少なかった。したがって、*Klebsiella aerogenes* は下水サンプルからのモニタリングが困難な種である可能性が示唆された。一方において、KPC 型, OXA 型, VIM 型のカルバペネマーゼは検出されず、病院内での保有率は低いことが示唆された。これらの結果は、WBE を CRE に適用することの可能性と限界を示している。