

微生物部門

精度管理事業委員

内藤 淳

愛知県厚生連安城更生病院

TEL 0566-75-2111

実務委員

椴山 弘

半田市医師会健康管理センター

多和田 行男

国立名古屋病院

微生物検査の精度管理調査

【はじめに】

微生物検査部門における平成 14 年度 精度管理事業として、供試菌株 2 菌種を設定し、同定検査ならびに薬剤感受性検査、および検出菌の解釈についての調査を実施した。

【参加施設】

愛知県下 63 施設を対象とした。

【供試菌株】

供試菌株は、臨床分離保存株の 2 菌種 2 菌株を用いて、仮想の臨床経過を設定し出題した。

試料 1 *Enterococcus gallinarum*

試料 2 *Serratia marcescens*

試料 1 および 2 は、独立した 1 コロニーを血液寒天培地で 18 時間培養後、スティックで培地上のコロニーを採取し、輸送用培地（プロコート 栄研器材）に入れたものを試料とした。

出題前に行った薬剤感受性成績の確認は栄研化学のドライプレートを使用した。

【調査の目的および結果】

－ 試料 1 －

《試料 1 のねらい》

- ・ *Enterococcus* 属の同定検査がどこまで行なわれているか？（属まで？菌名まで？）
- ・ 使用した検査試薬と得られた同定菌名について。
- ・ 感染症新法 4 類感染症の解釈について。（出題した株は該当菌ではない。）

《試料 1 設問》

同定・薬剤感受性サーベイを実施

菌株の由来 基礎疾患；急性骨髄性白血病。45 歳、女性。感染予防目的で CAZ（セフトジジム）、FLCZ（フルコナゾール）を投与中。本菌は監視培養のために採取された糞便より分離された。

試料 1 の同定検査の成績を（表 1）に示す。本菌は *Enterococcus gallinarum* である。63 施設すべてにおいて回答が得られたが、同定菌名はさまざまであった。用手法が 31 施設、自動機器が 32 施設で使用されていた。使用されたキット試薬は用手法が一番多く、次にマイクロスキャンが多かった。

表 1 同定菌名と測定装置

菌名	測定装置	件数
<i>Enterococcus sp</i>	用手法	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	用手法	4
<i>Enterococcus faecium</i>	用手法	1
<i>Enterococcus avium</i>	用手法	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	用手法	10
	マイクロスキャンWalk Away 40	6
	マイクロスキャンWalk Away 96	6
	ATB Expression,miniAPI	4
	バイテック60,120,240,480	2
	クリスタルリーダー	1
	RAISUS	1
	バイテック32,,JR	1
	センシミック リーダー	1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	用手法	6
	バイテック60,120,240,480	2
	バイテック32,,JR	1
	MIC2000	1
	オートセブターシステム	1
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	用手法	3
	バイテック32,,JR	2
	クリスタルリーダー	2
	ATB Expression,miniAPI	1

[使用試薬と同定菌名について]

表 2 使用試薬と同定菌名

試薬	<i>E.avium</i>	<i>E.casseliflavus</i>	<i>E.casseliflavus/gallinarum</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i>	<i>Enterococcus sp</i>	総計
GP1グラム陽性菌同定カード		3	2	1		3	2	4
GP同定検査キット		1	3			1		5
NegMIC5J						1		1
Pos BPCombo 31J						3		3
Pos BPCombo 11J						1		1
Pos Combo 11C						1		1
Pos Combo 11J						7		7
Rap ID STR		1						1
RSC1グラム陽性菌迅速コンビプレート						1		1
アピススレップ20		3	1		1	3	2	10
スレプトグラム						1	1	2
スレプトプレーキント/ID S5-2		1						1
ラピッドID32スレップアピ			1			5		6
従来法による同定	1	2		3		5	1	12
総計	1	11	8	4	1	32	6	63

使用した試薬と同定菌名を（表 2）に示す。

デイドベリング社のパネルを用いて同定を行ったのは 13 施設で、すべての施設で正しく同定

使用した試薬と同定菌名を（表 2）に示す。

デイドベーリング社のパネルを用いて同定を行ったのは 13 施設で、すべての施設で正しく同定されており成績は良好であった。日本ビオメリューのアピ（アピストレップ 20、ラピッド ID32 ストレップアピ）を使用した施設は 16 施設で、うち 6 施設がラピッド ID32 ストレップアピを使用し、成績は良好であった。一方、アピストレップ 20 は 10 施設で使用されており、正しく同定されたのは 4 施設、属レベルの同定が 2 施設、4 施設で誤同定であった。

アピストレップ 20 を使用し *Enterococcus casseliflavus* と回答したある施設からは、<メーカーから提供されていたコードブックのバージョンが古く、同定コードが正しく検索されなかったために誤同定となった。バージョンアップされた最新のコードで検索したら *Enterococcus gallinarum* と同定された>、という内容の報告を後日受けた。この施設では、施設別報告書を受け取ったあと、手技に注意して再度アピストレップ 20 で同定を行ってみたが *Enterococcus casseliflavus* と同定されるためメーカーに問い合わせ、電話でのやり取りの中で使用するコードブックの古さが発覚したということであった。

[性状検査項目について]

表 3 性状検査項目

グラム染色		カタラーゼ		運動性	
陽性	62	陽性	3	陽性	1
陰性	1	陰性	43	陰性	2
総計	63	実施せず	15	実施せず	56
		空欄	2	空欄	4
		総計	63	総計	63

黄色色素産生		4℃における発育		PYR試験	
陽性	8	陽性	28	実施せず	51
陰性	20	陰性	2	陽性	6
実施せず	30	実施せず	31	陰性	1
判定不能	2	空欄	2	空欄	5
空欄	3	総計	63	総計	63
総計	63				

従来法の実施状況を（表 3）に示す。本菌はグラム陽性球菌、カタラーゼ陰性、運動性陽性、黄色色素産生性陰性、PYR 試験陽性である。グラム染色はすべての施設で実施されていたが、1 施設で陰性という回答があった。また、本菌の同定に必要なカタラーゼ試験は 43 施設（68.3%）、黄色色素産生性は 28 施設（44.4%）、運動性は 3 施設（4.8%）で実施された。

《試料1 薬剤感受性検査》

[感受性検査の方法]

薬剤感受性の方法および使用試薬の使用状況を（表4）に示す。MICの自動機器が24施設とも多く、ついでKBディスクが15施設と多かった。

表4 感受性の方法

感受性の方法	試薬	総計
KBディスク	その他の感受性培地	1
	ミュラーヒントンII寒天培地	5
	ミュラーヒントンS	8
	感受性ディスク用培地N	1
KBディスク計		15
SNディスク	ミュラーヒントンS羊血液	1
	ミュラーヒントン寒天培地N	2
	ミュラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	1
SNディスク計		4
センシディスク	ミュラーヒントンII寒天培地	8
センシディスク計		8
昭和一濃度ディスク	ミュラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	1
	感受性ディスク用培地N	4
	感受性ディスク用培地N血液	1
昭和一濃度ディスク計		6
MIC自動化	GPS-420グラム陽性菌感受性カード	1
	GPS-421グラム陽性菌感受性カード	1
	Pos BPCombo 31J	3
	Pos BPCombo 41J	1
	Pos Combo 41C	1
	Pos Combo 41J	7
	ストレプトブレイクポイント/ID S5-2	1
	その他のセプター	1
	その他のセプター-MIC-2000	5
	その他の栄研化学・長瀬産業製品	2
	ミュラーヒントンS	1
MIC自動化計		24
MIC用手法	DP22	1
	ストレプトブレイクポイント/ID S5-2	1
	その他のセプター	2
	その他のセプター-MIC-2000	2
MIC用手法計		6
総計		63

[薬剤感受性成績]

ディスク拡散法では、ABPCをR(耐性)と回答した施設が2施設認められたが、30施設でS(感受性)という回答が得られた。また、VCMはR(耐性)4施設、S(感受性)7施設、I(中間)22施設となった。TEICは31施設でS(感受性)という回答が得られた。(表5・7・9)

微量液体希釈法では、ABPCは30施設すべてS(感受性)という回答が得られた。VCMは30施設すべてでI(中間)という回答が得られた。また、TEICは1施設でI(中間)という回答で残りの28施設でS(感受性)という回答が得られた。(表6・8・10)

本菌は出題前の検査でABPCのMIC [0.5 μg/ml] を確認し出題した。

表5 ABPCの感受性成績:ディスク拡散法

ABPC 判定	ABPC阻止円径(mm)	0	15	17.32	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28	32	総計
	SNディスク														1	1
1+	昭和一濃度ディスク				1											1
2+	昭和一濃度ディスク											1				1
3+	昭和一濃度ディスク									1	1		1			3
R	KBディスク	1														1
	昭和一濃度ディスク	1														1
S	KBディスク				1	1	2	1	2	2	3	1			1	14
	SNディスク		1					1	1							3
	センシディスク					1	2	2	1	1	1					8
総計		1	1	1	1	3	4	4	4	3	5	2	1	1	1	33

試薬	ABPC阻止円径(mm)	0	15	17.32	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28	32	総計
その他の感受性培地	KBディスク														1	1
ミューゼンII寒天培地	KBディスク			1						1	1	2				5
	センシディスク						1	2	2	1	1	1				8
ミューゼンS	KBディスク				1	1	2	1	1	1	1					8
ミューゼンS羊血液	SNディスク							1								1
ミューゼン寒天培地N	SNディスク										1				1	2
ミューゼン寒天培地N血液寒天培地	昭和一濃度ディスク			1										1		1
感受性ディスク用培地N	KBディスク											1				1
	昭和一濃度ディスク	1					1					1	1			4
感受性ディスク用培地N血液	昭和一濃度ディスク											1				1
総計		1	1	1	1	3	4	4	4	3	5	2	1	1	1	33

表6 ABPCの感受性成績:微量液体希釈法

ABPC 判定	ABPC MIC(μg/ml)	≤0.25	≤0.5	0.5	1	≥1	≤2	2	=2	≥2	>2	4	総計
S	MIC用手法				1	1	1				1	2	6
	MIC自動化	2	1	1	5	1	2	9	1	1	1	1	24
総計		2	1	1	5	2	3	9	1	1	1	3	30

試薬	ABPC MIC(μg/ml)	≤0.25	≤0.5	0.5	1	≥1	≤2	2	=2	≥2	>2	4	総計
DF22	MIC用手法											1	1
GPS-420グラム陽性菌感受性カード	MIC自動化				1								1
GPS-421グラム陽性菌感受性カード	MIC自動化					1							1
Pos BPCCombo 31J	MIC自動化	1							1	1			3
Pos BPCCombo 41J	MIC自動化									1			1
Pos Combo 41C	MIC自動化									1			1
Pos Combo 41J	MIC自動化								1	5		1	7
ストロブアレークポイント/ID S5-2	MIC自動化										1		1
	MIC用手法											1	1
その他のセプター	MIC自動化					1							1
	MIC用手法								1	1			2
その他のMIC-2000	MIC自動化						1	3				1	5
	MIC用手法												2
その他の栄研化学・長瀬産業製品	MIC自動化							1					1
2													2
ミューゼンS	MIC自動化	1											1
総計		2	1	1	5	2	3	9	1	1	1	3	30

出題前に行った薬剤感受性成績の確認は栄研化学のドライプレートを使用した。

ABPC では MIC を $[0.5 \mu\text{g/ml}]$ と設定した。ABPC の MIC を $[\leq 0.5 \mu\text{g/ml}]$ 、 $[0.5 \mu\text{g/ml}]$ 、 $[1 \mu\text{g/ml}]$ と回答した施設は合わせて 8 施設あり、そのうち 6 施設が栄研化学のドライプレートを使用していた。デイドベーリング社の製品を使用する施設の多くは $[2 \mu\text{g/ml}]$ と回答している。

現在、感受性成績が乖離した原因を調査中である。

VCM の MIC は出題前の検査で $[8 \mu\text{g/ml}]$ を確認し出題した。

表 7 VCM の感受性成績: ディスク拡散法

VCM 判定	VCM 阻止円径(mm)	9	10	11	12	14	14	15	16	17	総計	
+	昭和一濃度ディスク	1									1	
1+	昭和一濃度ディスク	4	1								5	
I	KBディスク							4	5	1	10	
	SNディスク							1			1	
	センシディスク							2	2	1	5	
R	KBディスク			1							1	
	SNディスク					1	2				3	
S	KBディスク								4		4	
	センシディスク								3		3	
総計		1	4	1	1	1	2	7	7	7	2	33

試薬	VCM 阻止円径(mm)	9	10	11	12	13.6	14	15	16	17	総計	
その他の感受性培地	KBディスク								1		1	
ミューゼントII 寒天培地	KBディスク				1			1	1	1	5	
	センシディスク							2	2	3	8	
ミューゼントS	KBディスク							2	3	3	8	
ミューゼントS 羊血液	SNディスク						1				1	
ミューゼント寒天培地N	SNディスク						1	1			2	
ミューゼント寒天培地N 血液寒天培地	SNディスク					1					1	
感受性ディスク用培地N	昭和一濃度ディスク	1									1	
	KBディスク							1			1	
感受性ディスク用培地N 血液	昭和一濃度ディスク		4								4	
	昭和一濃度ディスク										1	
総計		1	4	1	1	1	2	7	7	7	2	33

表 8 VCM の感受性成績: 微量液体希釈法

VCM 判定	VCM MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 8	8	≥ 8	> 8	≤ 16	16	=16	≥ 16	総計
I	MIC 用手法		2		1	1	1		1	6
	MIC 自動化	2	3	11	1		1	5	1	24
総計		2	3	13	1	1	2	6	1	30

試薬	VCM MIC ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 8	8	≥ 8	> 8	≤ 16	16	=16	≥ 16	総計
DP22	MIC 用手法						1			1
GPS-420グラム陽性菌感受性カード	MIC 自動化				1					1
GPS-421グラム陽性菌感受性カード	MIC 自動化					1				1
Pos BPCombo 31J	MIC 自動化	1					1	1		3
Pos BPCombo 41J	MIC 自動化							1		1
Pos Combo 41C	MIC 自動化					1				1
Pos Combo 41J	MIC 自動化			1	5	1				7
ストレプトブレイクポイント/ID S5-2	MIC 自動化								1	1
	MIC 用手法							1		1
その他のセプター	MIC 自動化							1		1
	MIC 用手法								1	2
その他のMIC-2000	MIC 自動化		1	2				2		5
	MIC 用手法						2			2
その他の栄研化学・長瀬薬業製品	MIC 自動化					2				2
ミューゼントS	MIC 自動化	1								1
総計		2	3	13	1	1	2	6	1	30

本菌は出題前の検査でTEICのMIC [$\leq 1 \mu\text{g/ml}$]を確認し出題した。

表 9 TEIC の感受性成績:ディスク拡散法

TEIC 判定	TEIC阻止円径(mm)	14	15	16	17	18	19	20	総計	
	SNディスク							1	1	
3+	昭和一濃度ディスク	1			5				6	
S	KBディスク				3	2	4	5	14	
	SNディスク		2				1		3	
	センシディスク			1	3		3	1	8	
実施せず	KBディスク							1	1	
総計		1	2	1	11	2	8	6	2	33

試薬	TEIC阻止円径(mm)	14	15	16	17	18	19	20	総計	
その他の感受性培地	KBディスク					1			1	
ミューヘントンII寒天培地	KBディスク				2		2	1	5	
	センシディスク			1	3		3	1	8	
ミューヘントンS	KBディスク				1	1	2	3	1	8
ミューヘントンS羊血液	SNディスク						1		1	
ミューヘントン寒天培地N	SNディスク		1					1	2	
ミューヘントン寒天培地N血液寒天培地	SNディスク		1						1	
	昭和一濃度ディスク					1			1	
感受性ディスク用培地N	KBディスク							1	1	
	昭和一濃度ディスク	1			3				4	
感受性ディスク用培地N血液	昭和一濃度ディスク				1				1	
総計		1	2	1	11	2	8	6	2	33

表 10 TEIC の感受性成績:微量液体希釈法

TEIC 判定	TEIC MIC($\mu\text{g/ml}$)	≤ 1	1	≤ 2	< 2	≤ 4	< 8 (空白)	総計
I	MIC用手法	1						1
S	MIC用手法	1	3	1				5
	MIC自動化	7	4	2	6	2	1	1
総計		9	7	3	6	2	1	29

試薬	TEIC MIC($\mu\text{g/ml}$)	1	≤ 1	≤ 2	< 2	≤ 4	< 8 (空白)	総計	
DP22	MIC 用手法	1						1	
GPS-420グラム陽性菌感受性カード	MIC 自動化	1						1	
GPS-421グラム陽性菌感受性カード	MIC 自動化					1		1	
Pos BPCombo 31J	MIC 自動化	3						3	
Pos BPCombo 41J	MIC 自動化						1	1	
Pos Combo 41C	MIC 自動化			1				1	
Pos Combo 41J	MIC 自動化			5	2			7	
ストレプトブレイクポイント/ID S5-2	MIC 自動化								
	MIC 用手法				1			1	
その他のセプター	MIC 自動化	1						1	
	MIC 用手法	2						2	
その他のMIC-2000	MIC 自動化	1	1	3				5	
	MIC 用手法			2				2	
その他の薬研化学・長瀬産業製品	MIC 自動化		1	1				2	
ミューヘントンS	MIC 自動化	1						1	
総計		9	3	7	6	2	1	1	29

[付加試験・付加コメント]

以下に付加試験、付加コメントの回答集計を示す。(表 11・12)

表 11 付加試験

	回答施設数
βラクタマーゼ試験(ニトロセフィン法)／陰性	9
βラクタマーゼ試験(アシドメトリー法)／陰性	1
βラクタマーゼ試験(ニトロセフィン法)／陽性	1
VCM 4 μg/ml含有寒天培地を用いた発育試験/陽性	1
VCM 6 μg/ml含有寒天培地を用いた発育試験/陽性	3
MRSAスクリーン寒天(MPIPC含有寒天)培地における発育/陰性	1

表 12 付加コメント

	回答施設数
クラスC型β-ラクタマーゼ産生菌ではない	1
ESBLs産生菌の可能性はある	1
VRE (VanAタイプ)の可能性はある	1
VRE (VanBタイプ)である	1
VRE (VanBタイプ)の可能性はある	2
VRE (VanCタイプ)である	4
VRE (VanCタイプ)の可能性はある	25
VREではない	11
耐性遺伝子はプラスミド上に存在すると考えられる	1
耐性遺伝子は染色体上に存在すると考えられる	15
耐性遺伝子の存在部位は不明である	1
4類感染症として取り扱う	4
感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律に規定された菌ではない	17
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要がある	2
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要はない	11
4類感染症の可能性はあるが、院内で対応ができないので検査を外注する	5

本菌種には *E. faecalis*、*E. faecium*、*E. avium*、*E. gallinarum*、*E. casseliflavus*、*E. flavescens* などがあり、VCM に耐性を示す *enterococci* を総称して VRE とよぶ。

VanA、vanB タイプは獲得性の耐性で伝達性プラスミドを介して他菌種へ伝播するが、vanC タイプは染色体上にあり伝達性はなく、VCM に軽度耐性を示すが TEIC には感性となる。

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 感染症の報告基準と下記に示す。本菌は *E. gallinarum* で vanC タイプが疑われる。

=====

－ バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）感染症の報告基準 －

診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断がなされたもの。

1) vanA、vanB 型

病原体の検出

血液、腹水、胸水、髄液など通常は無菌的な臨床検体からの分離された菌（当面は便や尿から分離されるなど定着例が疑われるものも含む）で、以下の検査室での判定基準を満たすもの。

VCM の MIC が $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ もしくは分離菌から、vanA、vanB 遺伝子の検出

2) vanC 型

血液、腹水、胸水、髄液など通常は無菌的な臨床検体からの分離された菌であって、vanC 遺伝子が検出されたもの。

=====

医師が診断し、上記の基準を満たすバンコマイシン耐性腸球菌が検出された場合は、4 類感染症に該当し全数把握の対象であることから、7 日以内に保健所へ届け出る必要がある。同時に、各施設の感染対策マニュアルに則り院内での感染対策を講じることも重要と思われる。

－ 試料 2 －

《試料 2 のねらい》

- ・ 腸内細菌科やその他のグラム陰性桿菌では ESBLs、AmpC β-ラクタマーゼ、メタロ β-ラクタマーゼなど種々の耐性機構がある。また、これら薬剤耐性菌の増加も問題になっている。
- ・ メタロ β-ラクタマーゼについて NCCLS では検査法の設定はなされていない。
- ・ 日常的に行なう薬剤感受性検査の成績から予想される薬剤耐性を推察し、教科書・文献などを参考に確認検査を実施することができるか？

《試料 2 設問》

Serratia marcescens の薬剤感受性サーベイを実施

《試料 2 薬剤感受性検査》

[感受性検査の方法]

表 1 感受性の方法

感受性の方法	試薬	計
KB	その他の感受性培地	1
	ミュラーヒントンII 寒天培地	6
	栄研 ミュラーヒントンS	6
	感受性ディスク用培地N	1
KB 計		14
SN	ミュラーヒントン寒天培地N	3
	ミュラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	1
	栄研 ミュラーヒントンS	1
SN 計		5
センシ	ミュラーヒントンII 寒天培地	6
センシ 計		6
昭和	感受性ディスク用培地N	6
昭和 計		6
MIC自動化	GNS-421グラム陰性菌感受性カード	2
	Neg BPCombo 3J	4
	Neg BPCombo 4J	1
	Neg Combo 4B	1
	Neg Combo 5J	6
	Neg MIC 5J	2
	Pos BPCombo31J	1
	グラムネガティブブレイクポイント/ID S5-1 (872)	3
	その他のMIC-2000	5
	その他の栄研化学・長瀬産業製品	2
MIC自動化 計		27
MIC用手法	DP21	1
	その他のMIC-2000	2
	その他のセブター	1
	グラムネガティブブレイクポイント/ID S5-1 (874)	1
MIC用手法 計		5
総計		63

薬剤感受性検査は、有効回答のあった 63 施設中 57 施設 (90.5%) で NCCLS に基づく感受性検査が行われており、6 施設が昭和一濃度ディスク法を行っていた (表 1)。NCCLS 法を行なう 57 施設のうち 32 施設 (56.1%) で微量液体希釈法による MIC 測定が行われている。

NCCLS ディスク法は 25 施設で行なわれており KB ディスクを使用する施設が多かった。

[薬剤感受性成績：IPM]

出題した菌株はメタロβ-ラクタマーゼを産生する。メタロβ-ラクタマーゼを産生する菌は、カルバペネム系を含むほとんどのβ-ラクタム系抗菌薬を加水分解する。

本菌は出題前の検査でIPMのMIC [$>8\mu\text{g/ml}$]を確認し出題した。

表2 IPM感受性成績:ディスク拡散法

IPM判定	IPM阻止円径(mm)	0	総計
	昭和	1	1
-	昭和	4	4
R	KB	14	14
	SN	4	5
	センシ	6	6
	昭和	1	1
総計		29	31

試薬	IPM阻止円径(mm)	0	総計
その他の感受性培地	KB	1	1
ミュラーヒントンII寒天培地	KB	6	6
	センシ	6	6
ミュラーヒントン寒天培地N	SN	3	3
ミュラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	SN	1	1
栄研ミュラーヒントンS	KB	6	6
	SN	1	1
感受性ディスク用培地N	KB	1	1
	昭和	5	6
総計		29	31

ディスク拡散法、微量液体希釈法とも成績は設定した値に収束していた。(表2・3)

微量液体希釈法では、デイドベーリング社パネルを使用する施設の成績が[$>8\mu\text{g/ml}$]に集中し良好であった。栄研化学・長瀬産業のパネルを使用する施設においても成績に問題はなかったが、MIC値にばらつきが見られた。栄研化学・長瀬産業の製品では、施設の要望に合わせた濃度構成でパネルが作成されるのがその理由と考えられる。

表3 IPM感受性成績:微量液体希釈法

IPM判定	IPM MIC値($\mu\text{g/ml}$)	>16	>32	>8	≥16	総計
R	MIC自動化	1	5	18	3	27
	MIC手法	2	1	2	5	5
総計		1	7	18	5	32

試薬	IPM MIC値($\mu\text{g/ml}$)	>16	>32	>8	≥16	総計
DP21	MIC手法	1				1
GNS-421グラム陰性菌感受性カード	MIC自動化				2	2
Neg BPCombo 3J	MIC自動化	1		3		4
Neg BPCombo 4J	MIC自動化			1		1
Neg Combo 4B	MIC自動化			1		1
Neg Combo 5J	MIC自動化			6		6
Neg MIC 5J	MIC自動化			2		2
Pos BPCombo31J	MIC自動化			1		1
グラムネガティブブレイクポイント/ID S5-1(872)	MIC自動化	2			1	3
その他のMIC-2000	MIC自動化	2		3		5
	MIC手法	1	1			2
その他のセプター	MIC手法				1	1
その他の栄研化学・長瀬産業製品	MIC自動化	1		1		2
(空白)	MIC手法				1	1
総計		1	7	18	5	32

[薬剤感受性成績：CAZ]

本菌は出題前の検査で CAZ の MIC [$>16 \mu\text{g/ml}$] を確認し出題した。

表 4 CAZ 感受性成績:ディスク拡散法

CAZ 判定	CAZ 阻止円径(mm)	0	8	総計	
-	昭和	4		4	
R	KB	12	1	13	
	SN	2	2	1	5
	センシ	6			6
	昭和	2			2
実施せず	KB		1	1	
総計		26	3	2	31

試薬	CAZ 阻止円径(mm)	0	8	総計	
その他の感受性培地	KB	1		1	
ミュラーヒントンII寒天培地	KB	5	1	6	
	センシ	6		6	
ミュラーヒントン寒天培地N	SN	2	1	3	
ミュラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	SN		1	1	
栄研 ミュラーヒントンS	KB	6		6	
	SN		1	1	
感受性ディスク用培地N	KB		1	1	
	昭和	6		6	
総計		26	3	2	31

表 5 CAZ 感受性成績:微量液体希釈法

CAZ 判定	CAZ MIC値($\mu\text{g/ml}$)	>16	>32	≤ 8	≥ 32	≥ 64	総計	
R	MIC自動化	1	17	6	1	1	26	
	MIC的手法			3	2		5	
S	MIC自動化			1			1	
総計		1	17	9	1	3	1	32

試薬	CAZ MIC値($\mu\text{g/ml}$)	>16	>32	≤ 8	≥ 32	≥ 64	総計	
DP21	MIC的手法		1				1	
GNS-421グラム陰性菌感受性カード	MIC自動化			1		1	2	
Neg BPCombo 3J	MIC自動化	1	3				4	
Neg BPCombo 4J	MIC自動化		1				1	
Neg Combo 4B	MIC自動化		1				1	
Neg Combo 5J	MIC自動化		6				6	
Neg MIC 5J	MIC自動化		2				2	
Pos BPCombo31J	MIC自動化		1				1	
グラムネガティブブレイクポイント/ID S5-1 (872)	MIC自動化		2		1		3	
その他のMIC-2000	MIC自動化	2	3				5	
	MIC的手法		2				2	
その他のセプター	MIC的手法				1		1	
その他の栄研化学・長瀬産業製品	MIC自動化	1	1				2	
(空白)	MIC的手法				1		1	
総計		1	17	9	1	3	1	32

[薬剤感受性成績：LVFX]

本菌は出題前の検査でLVFXのMIC [8 μg/ml] を確認し出題した。

表 6 LVFX 感受性成績:ディスク拡散法

LVFX 判定	LVFX 阻止円径(mm)	0	6	8	9	9.56	10	11	12	13	15	総計
+	昭和									1		1
1+	昭和						2	2		1		5
I	KB										1	1
R	KB	7	1	1	1			1	2			13
	SN			2		1	1	1				5
	センシ	1			1		1	1	2			6
総計		8	1	3	2	1	4	5	4	2	1	31

試薬	LVFX 阻止円径(mm)	0	6	8	9	9.56	10	11	12	13	15	総計
その他の感受性培地	KB	1										1
ミューラーヒントンII寒天培地	KB	2							1	2		6
	センシ	1			1		1	1	2			6
ミューラーヒントン寒天培地N	SN			1			1	1				3
ミューラーヒントン寒天培地N血液寒天培地	SN						1					1
栄研 ミューラーヒントンS	KB	4		1	1							6
	SN			1								1
感受性ディスク用培地N	KB			1								1
	昭和								2	2		6
総計		8	1	3	2	1	4	5	4	2	1	31

表 7 LVFX 感受性成績:微量液体希釈法

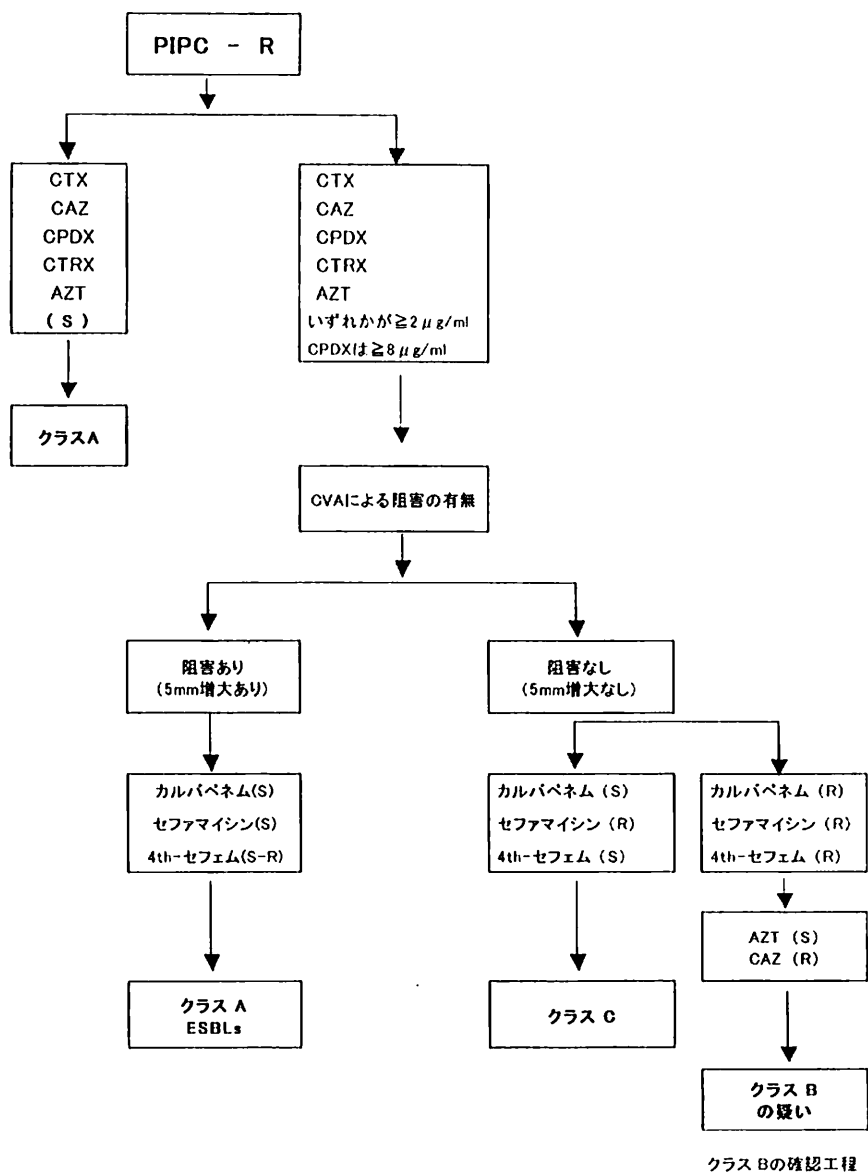
LVFX 判定	LVFX MIC値(μg/ml)	8	>4	>8	≥8 (空白)	総計
1+	MIC用手法	1				1
R	MIC自動化	3	4	16	1	26
	MIC用手法	2	1		1	4
総計		5	6	16	2	31

試薬	LVFX MIC値(μg/ml)	8	>4	>8	≥8 (空白)	総計
DP21	MIC用手法				1	1
GNS-421グラム陰性菌感受性カード	MIC自動化				2	2
Neg BPCombo 3J	MIC自動化		1	3		4
Neg BPCombo 4J	MIC自動化		1			1
Neg Combo 4B	MIC自動化		1			1
Neg Combo 5J	MIC自動化			6		6
Neg MIC 5J	MIC自動化			2		2
Pos BPCombo31J	MIC自動化			1		1
グラムネガティブブレイクポイント/ID S5-1(872)	MIC自動化			2		2
その他のMIC-2000	MIC自動化	2	1	1	1	5
	MIC用手法	2				2
その他のセプター	MIC用手法		1			1
その他の栄研化学・長瀬産業製品	MIC自動化	1		1		2
(空白)	MIC用手法			1		1
総計		5	6	16	2	31

メタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出は、薬剤感受性検査の成績から疑わしい菌株をスクリーニングすることから始まる。

以下に感受性成績から推定する薬剤耐性（β-ラクタマーゼ）分類の流れを示す。

〈認定臨床微生物検査技師制度 第2回過渡的特例措置指定講習会テキスト 35-67 より引用〉



拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の検出法として、NCCLSには *E. coli* および *Klebsiella spp.* に限定した ESBLs のスクリーニング法および確定法は存在するが、その他の菌種における ESBLs、AmpC β-ラクタマーゼ、メタロβ-ラクタマーゼのスクリーニング法および確定法は存在しない。

P. aeruginosa と *S. marcescens* 以外の菌種ではメタロβ-ラクタマーゼ産生菌であっても Imipenem (IPM) の MIC は必ずしも高くなるとは限らないため、Ceftazidime (CAZ) を検出薬剤として併せて用いる。CAZ の感受性成績は上記薬剤耐性を推定するうえで手がかりとなり、日常検査における測定が望まれる。

[付加試験・付加コメント]

以下に付加試験、付加コメントの回答集計を示す。(表 8・9)

表 8 付加試験

	回答施設数
2-メルカプトプロピオン酸 (2-MPA) またはメルカプト酢酸ナトリウムによる酵素阻害試験 / 陽性	29
クラブラン酸添加による β-ラクタム薬の感受性 (ESBL confirmation パネル) / 阻害効果なし	1
クラブラン酸添加による β-ラクタム薬の感受性 (ダブルディスク法) / 相乗作用なし	4
クラブラン酸添加による β-ラクタム薬の感受性 (栄研 ESBLs ディスク) / 相乗作用なし	13
βラクタマーゼ試験 (その他の方法) / 陽性	2
βラクタマーゼ試験 (アシドメトリー法) / 陽性	6
βラクタマーゼ試験 (ニトロセフィン法) / 陽性	12

得られた薬剤感受性の成績を前述の β-ラクタマーゼ分類に当てはめ疑わしい菌株をスクリーニングできたら、次に確認検査を行う。メタロ β-ラクタマーゼ産生株の検査には、2-メルカプトプロピオン酸 (またはメルカプト酢酸ナトリウム) ディスクと CAZ、IPM ディスクを用いた識別法が開発され市販品を利用できる。

2-mercaptopropionic acid test

ミューラーヒントン寒天培地に McFarland 0.5 の濁度に調整した菌液を接種し、CAZ および IPM ディスクを配置し、15～20mm の間隔でブランクディスクを配置し 2-メルカプトプロピオン酸を 2～3 μl 添加して、35℃、16～18 時間培養し、CAZ または IPM ディスク阻止円のブランクディスクと反対側に大きさと同形に変化を認めれば、メタロ-β-ラクタマーゼと判定する。最近、メルカプト酢酸 Na を含有させたディスクである「メタロ-β-ラクタマーゼ SMA '栄研」が発売されている。

表 9 付加コメント

	回答施設数
クラスC型 β-ラクタマーゼ産生菌の可能性はある	1
メタロ β-ラクタマーゼ産生菌である	13
クラスC型 β-ラクタマーゼ産生菌ではない	1
メタロ β-ラクタマーゼ産生菌の可能性はある	29
耐性遺伝子はプラスミド上に存在すると考えられる	18
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要はない	7
ESBLs産生菌の可能性はある	2
ESBLs産生菌ではない	5
感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律に規定された菌ではない	12
4類感染症として取り扱う	1
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要がある	1
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要があるかどうか不明である	1

メタロ β-ラクタマーゼ産生菌には耐性遺伝子を染色体上にもつもの (自然耐性) と、伝達性のあるプラスミド上にもつもの (獲得耐性) がある。今回出題した菌株および、現在問題となっているのは後者の方で性線毛を介してプラスミドが伝達、菌種を越えて拡散する。メタロ β-ラクタマ

ーゼ産生菌は、カルバペネム系抗菌薬はもちろんのこと、第三世代セフェム系、セファマイシン系抗菌薬に耐性、さらにはβ-ラクタマーゼ阻害剤の効果も認められないなど、治療抗菌薬の選択が非常に難しい。疑わしい菌株が検出された場合は手洗いの徹底など接触感染予防策を講じると共に、薬剤感受性検査の成績に基づき、抗菌薬の選択を注意深く行う必要がある。

メタロβ-ラクタマーゼ産生菌については NCCLS および法的な基準は存在せず、検出された場合の届出も必要ない。

【まとめ】

今回の微生物検査部門の精度管理調査では、2種類の薬剤耐性菌を出題した。事前に検査した感受性成績を基に行なった感受性サーベイは概ね良好な成績であった。

薬剤耐性を保有する菌ということで、<どのような薬剤耐性機構をもつのか？>、<検出・決定した場合の法的な届出は必要か？>など、得られた成績から次に行うべき確認検査を推理しながら検査を進められたと思う。

試料1の同定サーベイでは、使用した同定キットのコードブックの内容が古かったために誤同定となったという報告があった。同定検査から得られた“菌名”が行政への届出を左右する場合もあるので、従来法と同定キットを併せて用い慎重に行うことが重要である。また、同定キットの使用では判定機器、コードブックなどの判定に頼る部分が大きいため、ソフトのバージョンを常に最新に保てるようにメーカーの担当者と再度確認を行ってほしい。

試料2で出題したメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出基準はない。日頃から勉強会などへ足を運び新しい情報を収集したり、教科書や文献の中から自施設で行なえる範囲の確認検査を用意しておくことが望まれる。

【参考文献】

1. 久我明男,井上松久:基礎編 グラム陰性桿菌①大腸菌, 耐性菌感染症とその緊急具体策 化学療法の領域増刊号:34-40(2000)
2. 賀来満夫:基礎編 グラム陰性桿菌④セラチア, 耐性菌感染症とその緊急具体策 化学療法の領域増刊号:59-65(2000)
3. 山崎勝利:β-ラクタマーゼ,第8回日本臨床微生物学会教育セミナーテキスト:62-68(2001)
4. 小栗豊子:化学療法剤の基礎知識と薬剤感受性検査法,認定臨床微生物検査技師制度 第2回過渡的特例措置指定講習会テキスト:35-67(2002)
5. 檜原雅美:9月定期講習会参加レポート「耐性菌の検出と臨床的意義について④～メタロβ-ラクタマーゼ～」:<http://www.osaka-amt.or.jp/bukai/saikin/gazou/1.htm>