

[原 著]

血液培養より検出される coagulase-negative staphylococci の陽性検出時間を用いた有意菌判断基準の設定

大城健哉^{1,2)}・内間かおる¹⁾・大城涼子¹⁾・大城織江¹⁾・平良英司¹⁾・親川晃八¹⁾¹⁾ 社団法人 北部地区医師会病院 臨床検査室²⁾ 現 特定医療法人 仁愛会 浦添総合病院 臨床検査部

(平成 16 年 4 月 26 日受付, 平成 16 年 9 月 27 日受理)

血液培養より検出された coagulase-negative staphylococci (CNS) 93 株を対象とし、臨床的有意性判定に基づき、陽性検出時間やスライム産生性、中心静脈カテーテル留置の有無などから有意菌判断基準の設定を試みた。血液培養は BACTEC 9120 にて行い、スライム産生は Congo Red Agar 法にて検出した。臨床的には 21 株 (22.6%) が有意菌と判定され、平均陽性検出時間は 22.1 時間で、汚染菌の 45.6 時間と比較して有意に ($P < 0.0001$) 短い結果であった。スライム産生株の 13 株中 12 株が有意菌と判定されており、スライム産生性は有意菌判断に有用と思われたが、その結果を得るまで最低 2 日間を要する。一方、有意菌の 15 株 (71.4%) が中心静脈カテーテル留置患者由来であったことと、有意菌が有意に短時間で検出されたことから、血液培養より検出される CNS の有意菌判断基準を「中心静脈カテーテル留置があり、かつ 30 時間以内に陽性検出」と設定した。この基準に合致する 15 株中 13 株が有意菌と判定されており、偽陰性例が存在するものの臨床的に信頼性が高く迅速性にも優れており、より簡便な判断基準と考えられた。

Key words: 血液培養, coagulase-negative staphylococci, 陽性検出時間, スライム産生性, 陽性尤度比

血液培養より coagulase-negative staphylococci (CNS) が検出されたとき、一般的にその多くが汚染菌と見なされることが多いが、カテーテル関連血流感染¹⁾や、人工弁置換後の感染性心内膜炎²⁾、経皮経管冠動脈拡張術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA) 後の菌血症³⁾などの起炎菌となりうるため注意が必要である。

今回我々は、CNS の病原因子の一つであるスライム産生性⁴⁾と、自動血液培養装置へのボトルセットから陽性検出までの時間 (陽性検出時間) に着目し、血液培養より検出される CNS の有意菌判断基準の設定を目的として検討を行ったので報告する。

I. 対象と方法

1. 対象

北部地区医師会病院 (沖縄県名護市在), 病床数 210 床, 診療科: 内科 (呼吸器科, 消化器科, 内分泌科, 循環器科), 外科, 整形外科にて, 1997 年 4 月から 2000 年 10 月までの 3 年 7 カ月間に実施された血液培養 3,057 検体から検出された 518 検体 561 株のうち単独検出された CNS 98 株中カルテ調査可能であった 84 患者 93 株を対象とした。重複のあった 9 患者は 5 例で検出菌種が異なり, 4 例で採血日が 3 週間以上隔てていたため別々のエピソードとして扱った。

菌株の内訳は *Staphylococcus epidermidis* 44 株, *Staphylococcus hominis* 18 株, *Staphylococcus capitis* 13 株, *Staphylococcus haemolyticus* 6 株, *Staphylococcus warneri* 5 株, *Staphylococcus caprae* 4 株, *Staphylococcus cohnii* 1 株, *Staphylococcus hyicus* 1 株, *Staphylococcus saprophyticus* 1 株で, 菌種同定は N-ID テスト SP-18 (日水製薬) を用いて行った。

なお, 今回の対象株に同時複数回採血にて検出され

著者連絡先: (〒901-2132) 沖縄県浦添市伊祖 4-16-1
特定医療法人 仁愛会浦添総合病院
臨床検査部 大城健哉
TEL: 098-878-0231 内線 1149
FAX: 098-878-5593
E-mail: toshiro@jin-aikai.or.jp

たものはなかった。

2. 血液培養

血液培養は自動血液培養装置 BACTEC 9120 (日本ベクトン・ディッキンソン) にて 1 件につき好気用・嫌気用 resin 入りボトルを使用し 7 日間培養を行った。採血は 70% アルコールで穿刺部位を消毒後、10% ポビドンヨードにて消毒し行われている。また、夜間・休日においても、採血後速やかに看護スタッフによって装置へボトルセットされ培養を行っているため、陽性検出時間は採血からの時間に極めて近いものと考えられる。

3. 臨床的有意性判定

対象患者についてカルテ調査を行い、Souvenir らの方法⁵⁾を参考に有意性の判定を行った。すなわち、38.0°C 以上の発熱、収縮期血圧 90 mmHg 未満、白血球数増多または減少または未熟顆粒球 10% 以上のいずれか 1 項目以上に該当し、表 1 のとおり、同時に実施された中心静脈カテーテル先端部の培養結果やカテーテル抜去後解熱の有無、刺入部発赤の有無、末梢静脈カテーテルの管理状況、PTCA、皮膚疾患の有無、観血的処置後などを考慮し、他材料の培養検査結果や発熱原因の確定状況などから、有意菌、中間菌 (有意菌の可能性を否定できない)、汚染菌の三つに分類した。

4. スライム産生性

スライム産生試験は Freeman らの方法⁶⁾に従い、Congo Red Agar (CRA) 法にて行った。培地組成は sucrose (関東化学) 50 g/L, Congo Red (関東化学) 0.8 g/L, ブレインハートインフュージョン寒天培地 (栄

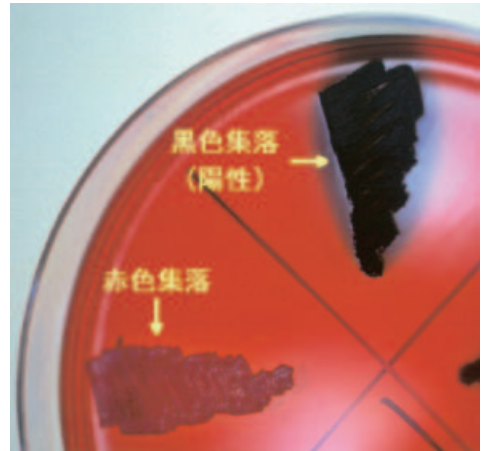


図1 スライム産生試験 (Congo Red Agar 法)

研化学) 52 g/L で、それぞれ 121°C で 15 分間滅菌後、約 50°C で混和し直ちにシャーレに流して平板に固めた。

この CRA に対象菌株をコロニーより直接接種し 35°C、24 時間、通常大気培養後 1 回目の判定を行い、続けて一夜室温放置後最終判定を行った。CRA 上でコロニーが明らかに黒色を呈する菌株 (図 1) をスライム産生株と判定した。

5. 検討方法

1) 有意菌判断基準項目

有意菌、中間菌、汚染菌における菌種、スライム産生性、陽性検出ボトル数の割合、中心静脈カテーテル留置の有無について比較検討した。

表 1 臨床的有意性判定基準とそれに合致した症例数

判定	判定基準	症例数
有意菌	・中心静脈カテーテル先端部より同一菌種検出	7
	・他のカテーテル先端部培養より同一菌種検出	2
	・他に明らかな発熱原因がなく下記のいずれかに該当するもの	
	1) 中心静脈カテーテル抜去後解熱	5
	2) 中心静脈カテーテル刺入部の発赤	2
中間菌	・他のカテーテル刺入部の発赤	2
	4) PTCA 後の発熱	3
	・他に発熱原因が確定されているが下記のいずれかに該当するもの	
	1) 中心静脈カテーテル抜去後解熱	2
	2) 皮膚炎	1
汚染菌	・他に明らかな発熱原因がなく下記のいずれかに該当するもの	
	1) 中心静脈カテーテル 1 カ月以上の長期留置	3
	2) 観血的処置後の発熱	1
汚染菌	・発熱原因となる感染症や疾患が確定されたもの	65

表 2 臨床的有意性と有意菌判断基準項目

菌株数	陽性株数 (%)				陽性検出時間**
	<i>S. epidermidis</i>	スライム産生性あり	両ボトルにて陽性検出	中心静脈カテーテル留置あり	
有意菌	21	16 (76.2)* ¹	12 (57.1)	12 (57.1)* ²	22.1 ± 8.2* ⁴
中間菌	7	3 (42.9)	1 (14.3)	4 (57.1)	26.3 ± 10.0* ⁵
汚染菌	65	25 (38.5)* ¹	0 (0.0)	13 (20.0)* ²	45.6 ± 23.8* ^{4,5}

*¹~⁵: 同一数字は両者間で以下のとおり統計学的有意差を示す: 1, $P=0.0026$; 2, $P=0.0019$; 3, $P<0.0001$; 4, $P<0.0001$; 5, $P=0.0100$. ** Mean hour ± SD

2) 陽性検出時間の分布

陽性検出時間を 2 時間の幅で階級化し、有意菌、中間菌、汚染菌の分布を調べた。また、スライム産生性、臨床的有意性について平均陽性検出時間を比較した。

3) 有意菌判断基準の設定

有意菌判断基準の設定を、中間菌を除く有意菌と汚染菌を対象に、有意菌検出能力(感度、特異度、陽性適中度、陰性適中度、陽性尤度比)に基づいて行った。

4) 統計学的有意差検定

統計学的有意差検定は陽性検出時間の比較に Mann-Whitney's *U* test を用い、検出菌株数の比較に Fisher's exact probability test を用いた。

表 3 検出菌種別の菌株数と有意菌の割合

菌種	菌株数	有意菌株数 (%)
<i>S. epidermidis</i>	44	16 (36.4)
<i>S. hominis</i>	18	1 (5.6)
<i>S. capitis</i>	13	2 (15.4)
<i>S. hoemolyticus</i>	6	1 (16.7)
<i>S. warneri</i>	5	1 (20.0)
<i>S. caprae</i>	4	0 (0.0)
<i>S. cohnii</i>	1	0 (0.0)
<i>S. hyicus</i>	1	0 (0.0)
<i>S. saprophyticus</i>	1	0 (0.0)

3. 有意菌判断基準項目

菌種別では、*S. epidermidis* 44 株中 16 株 (36.4%) で有意菌と判定されており (表 3), *S. epidermidis* は有意菌に多く含まれていた (表 2)。また、スライム産生性あり、両ボトルにて陽性検出、中心静脈カテーテル留置ありでも汚染菌と比較して、有意に有意菌に多く含まれていた。

4. 陽性検出時間の分布

全体では図 2 のとおり、30 時間付近に谷がある不明瞭な 2 峰性分布を示し、有意菌と中間菌は汚染菌と比較して有意に早期に検出されていた (表 2)。

スライム産生株 (mean hour ± SD; 22.3 ± 10.1) は非

II. 結 果

1. 臨床的有意性判定

有意菌と判定された株が計 21 株 (22.6%), 中間菌 7 株 (7.5%), 汚染菌 65 株 (69.9%) で、詳細は表 1 のとおりであった。

2. スライム産生性

CRA 法にて 13 株が陽性と判定され、菌種はすべて *S. epidermidis* であった。臨床的には中心静脈カテーテル感染症 9 例, PTCA 後の菌血症 2 例, 末梢静脈カテーテル感染症 1 例, 観血的処置後の菌血症 1 例で、12 例が有意菌 (表 2) と判定されていた。

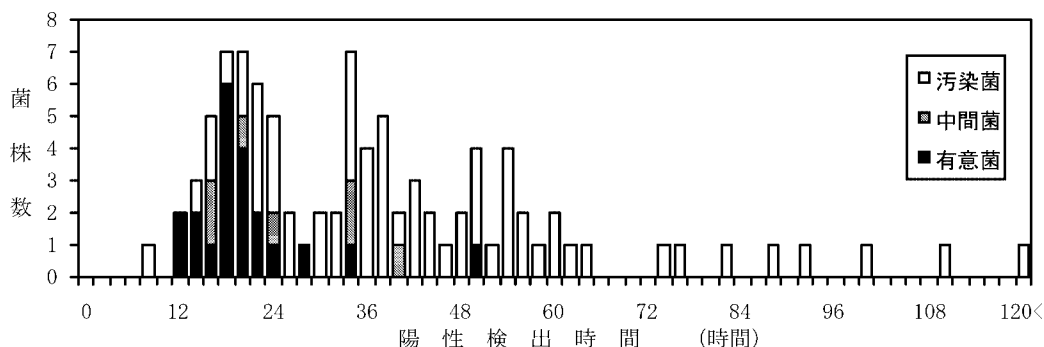


図 2 有意性による陽性検出時間の分布

表4 各有意菌判断基準における有意菌検出能力

有意菌判断基準	感度%	特異度%	陽性適中度%	陰性適中度%	陽性尤度比
24時間以内に陽性検出	76.2	83.1	59.3	91.5	4.5
30時間以内に陽性検出	90.5	75.4	54.3	96.1	3.7
36時間以内に陽性検出	95.2	63.1	45.5	97.6	2.6
スライム産生株	57.1	100	100	87.8	0
中心静脈カテーテル留置あり	71.4	78.4	51.7	89.5	3.3
両ボトルにて陽性検出	57.1	80.0	48.0	85.2	2.9
中心静脈カテーテル留置ありかつ 24時間以内に陽性検出	57.1	98.5	92.3	87.7	37.1
中心静脈カテーテル留置ありかつ 30時間以内に陽性検出	61.9	98.5	92.9	98.9	40.2
中心静脈カテーテル留置ありかつ 36時間以内に陽性検出	66.7	96.9	87.5	90.0	21.7

産生株 (41.6±23.3) と比較して有意に ($P=0.0003$) 短い時間であった。

5. 有意菌判断基準の設定

以上の結果より、有意菌の検出能力から有意菌判断基準の設定を試みた(表4)。一般的に陽性尤度比が0.1以下であれば除外診断に、また10以上であれば確定診断に有効⁷⁾とされている。これに合致した基準は陽性尤度比が0.1以下で「スライム産生株」、10以上で「中心静脈カテーテル留置ありかつ24時間以内に陽性検出」と「中心静脈カテーテル留置ありかつ30時間以内に陽性検出」、「中心静脈カテーテル留置ありかつ36時間以内に陽性検出」であった。

III. 考 察

近年、血液培養分離菌に占めるグラム陽性菌の割合が増加傾向にあり、なかでもCNSは当院においても全検出菌の21.6%を占め、*Staphylococcus aureus*を上回る高頻度検出菌種となっている。また、CNSは表皮や環境からの汚染とされることが多いが、易感染状態にある患者に感染症をひき起こす場合もあり、その判断は困難をきわめる。臨床的にもその判断に苦慮することがあり、細菌検査室側へアドバイスを求められることも少なくない。

これまで提唱された血液培養から分離されるCNSの有意菌判断方法として、陽性検出日数⁸⁾や複数回採血による連続検出⁵⁾、*ica* 遺伝子や *mecA* 遺伝子の検出⁹⁾などが挙げられる。

複数回連続して検出される方法では、1セットから分離された菌種も原因菌となりうる^{10, 11)}ため、真の菌血症を見逃す恐れがある。また、我が国では血液培養の重要性の認識度や診療報酬制度の問題などから、複数回採血が徹底されておらず、また新生児や小児など

患者によっては複数回採血が困難な場合があるため、この方法を適応できるケースは限られている。

このような理由から、血液培養より検出されるCNSの、より簡便で信頼性のある有意菌判断基準の設定が望まれた。

我々は経験的に、血液培養から分離されるCNSには早期に検出される菌株と遅れて検出される菌株があることに気づいていた。この現象は、有意菌が早期に検出され汚染菌が遅れて検出されたことによるものと推測された。今回、この推測を証明すべく、またさらに発展させ血液培養から分離されるCNSの有意菌判断基準の設定を目的として検討を行った。

CNSの病原因子の一つとしてスライム産生性⁴⁾が知られている。スライム産生株は、産生したスライムによって血管内カテーテルなどの異物に付着して増殖し、生体内防御反応や抗菌薬の浸透を阻害することでカテーテル関連血流感染症などをひき起こす¹²⁾。

このスライム産生性を確認する方法として、PCR法によるスライム産生責任遺伝子 *ica* の検出が最も信頼性が高い¹³⁾とされている。今回実施したCRA法は、陽性判定(黒色度)が不明瞭な株が存在するため¹³⁾偽陰性を生じる可能性があるものの、一般の細菌検査室レベルで容易に検査可能であり、試験管法であるChristensenらの方法¹⁴⁾と比較しても簡便で信頼性が高い⁶⁾ことから本法を採用した。

今回、臨床的に有意菌と判定された菌株中18株が中心静脈カテーテルや末梢静脈カテーテル、胸腔ドレーナージカテーテルに関連するカテーテル関連血流感染症で、そのうち10株(55.6%)がスライム産生株で、Arciolaらの報告¹³⁾(48.5%)とほぼ同等の結果となった。また、スライム産生株の13株中12株が有意菌と判定されていた(表2)ことから、CRA法はCNSの

病原性を確認する上で特異度の高い検査法であると考えられた。

陽性検出時間の分布(図2)では、全体では30時間付近に谷がある不明瞭な2峰性分布を示し、有意菌は早期に検出されていた(表2)。対象菌種が異なるものの、大塚ら¹⁵⁾がコリネ型菌を対象に行った検討結果でも有意菌が早期に検出されていた。これは、我々が認識していた早期に検出される菌株と遅れて検出される菌株の存在を裏づける結果であり、有意菌が早期に検出されるとの推測を証明する結果となった。

また、スライム産生株は非産生株と比較して早期に検出されていた。スライム産生株は血管内カテーテル類でバイオフィルムを形成し¹⁾増殖、はく脱するため、血中には持続的あるいは間歇的に存在し、採血時に一定量の菌量が得られると推測される。よって、スライム産生株が早期に検出された理由として、採血時の菌量によるものと考えられた。

スライム産生性は他の報告¹⁶⁾では *S. epidermidis* 以外の菌種にも認められているが、今回検出されたスライム産生株はすべて *S. epidermidis* であった。よって、*S. epidermidis* に占める有意菌の割合が高かった(表2)理由として、菌種の要因よりむしろ *S. epidermidis* に占めるスライム産生株の割合によるものと考えられた。

以上の結果より、有意菌の検出能力から有意菌判断基準の設定を試みた(表4)。

「スライム産生株」は特異度、陽性適中度100%で、陽性尤度比も0となり除外診断に最も有効と考えられた。つまり「スライム産生試験陽性」であれば起炎菌の可能性が極めて高いことになる。しかし、陽性検出からスライム産生性が判明するまでおよそ2日間の日数を要するため、疫学的に有用ではあるが迅速性に劣り、実際の診断および治療への応用は困難であると考えられた。

一方、陽性尤度比が10以上を示した基準のうち、陽性尤度比および陽性適中度が最も高い「中心静脈カテーテル留置あり、かつ30時間以内に陽性検出」が確定診断に有効と考えられた。この基準に合致する15株の臨床的有意性判定では13株が有意菌、1株が中間菌、1株が汚染菌と判定されていた。一方、この基準に合致しなかった臨床的有意菌が8株あり、注意が必要である。

今回、中心静脈カテーテル留置の有無を有意菌判断基準に用いたが、中心静脈カテーテル以外にも胸腔ドレーナージカテーテルや末梢静脈カテーテルなど種々のカテーテル類、また広義ではPTCAもカテーテル関

連血流感染症の原因となり、最終的には臨床的判断が重要となってくるものの、細菌検査室の立場から提案できる「中心静脈カテーテル留置あり、かつ30時間以内に陽性検出」は陽性適中度が高く、補助診断に有用であると考えられた。

しかし、この有意菌判断基準を用いるためには、血液培養採血後速やかな自動血液培養装置へのボトルセットが大前提となる。ボトルセットの遅れによって正確な陽性検出時間が得られないため¹⁷⁾である。幸いにも当院では臨床検査室全スタッフの協力はもちろん、検体提出側である看護スタッフの積極的な協力が得られ、夜間・休日にかかわらず24時間365日速やかなボトルセットが行われている。当院スタッフ協力のもと、判断に苦慮することの多い血液培養より検出されるCNSの有意菌判断基準を設定することができた。また、今後この有意菌判断基準を用いるためにも、各スタッフの協力が必要不可欠であると考えられた。

IV. 結 語

血液培養から検出されるCNSの有意菌判断基準を「中心静脈カテーテル留置患者から30時間以内に検出された菌株」と設定した。この基準には93株中15株が該当し、そのうち13株が起炎菌と判定されていたことから臨床的に信頼性が高く、補助診断に有用であり、より簡便な基準が設定されたと結論された。

文 献

- 1) Huebner, J., D. A. Goldmann. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50: 223-236.
- 2) 澤江義郎. 1987. 日和見感染症と治療 (b) 表皮ブドウ球菌感染症. *治療学* 13: 471-476.
- 3) Samore, M. H., M. A. Wessollosky, S. M. Lewis, et al. 1997. Frequency, risk factors, and outcome for bacteremia after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am. J. Cardiol.* 79: 873-877.
- 4) Peters, G. 1988. New considerations in the pathogenesis of coagulase-negative staphylococcal foreign body infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 21: 139-148.
- 5) Souvenir, D., D. E. Anderson, S. Palpant, et al. 1998. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1923-1926.
- 6) Freeman, D. J., F. R. Falkiner, C. T. Keane. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42: 872-874.

- 7) 北村 聖. 2003. 尤度比. 日本検査血液学会雑誌 4: 153-155.
- 8) Kirchhoff, L. V., J. N. Sheagren. 1985. Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus. *Infect. Control* 6: 479-486.
- 9) Frebourg, N. B., S. Lefebvre, S. Baert, et al. 2000. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38: 877-880.
- 10) Mirrett, S., M. P. Weinstein, L. G. Reimer, et al. 2001. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3279-3281.
- 11) 大城健哉, 松堂裕子, 神田清秀, 他. 2004. 血液培養複数回採血の有用性. *医学検査* 53: 1127-1130.
- 12) 池田文昭, 横田好子, 峯 靖弘. 1991. *Staphylococcus epidermidis* の slime 産生株による biofilm 形成と抗菌剤の作用について. *感染症学雑誌* 65: 875-882.
- 13) Arciola, C. R., L. Baldassarri, L. Montanaro. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2151-2156.
- 14) Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, et al. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.
- 15) 大塚喜人, 吉部貴子, 室谷真紀子, 他. 2004. 血液培養より検出されたコリネフォルム菌の起炎性判断基準に関する検討. *医学検査* 53: 22-27.
- 16) Levy, M. F., D. D. Schmitt, D. D. Edmiston, et al. 1990. Sequential analysis of Staphylococcal colonization of body surfaces of patients undergoing vascular surgery. *J. Clin. Microbiol.* 28: 664-669.
- 17) 川上小夜子, 斧 康雄, 宮澤幸久. 2002. 全自動血液培養装置へのボトルセットの遅れが微生物の検出に及ぼす影響について. *日本臨床微生物学雑誌* 12: 86-92.

Proposal of criteria for determining clinically significant bacteria using the time to positive culture of coagulase-negative staphylococci in blood cultures

Takeya Ohshiro,^{1, 2)} Kaoru Uchima,¹⁾ Ryouko Ohshiro,¹⁾ Oriie Ohshiro,¹⁾
Hideji Taira,¹⁾ Kouhachi Oyakawa¹⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Northern part of Okinawa Medical Association Hospital

²⁾ Present address for corresponding: Department of Clinical Laboratory, Urasoe General Hospital

Ninety-three strains of coagulase-negative staphylococci (CNS) were used to determine the criteria for determining clinically significant bacteria based on the time to positive culture, positive slime production, and the presence of an indwelling central venous catheter. Blood culture was tested using BACTEC 9120 system, and slime-forming ability was tested on Congo red agar plates. Twenty-one strains (22.6%) were judged to be clinically significant bacteria, and the mean time to positive culture was 22.1 hours, which was significantly shorter than that (45.6 hours) to positive culture of contaminants ($P < 0.0001$). Twelve of the 13 slime-producing strains were determined to be significant bacteria, suggesting that slime-forming ability was useful for determining significant bacteria; however, the detection took at least 2 days. On the other hand, 15 (71.4%) of the significant bacteria were derived from patients with an indwelling central venous catheter, and were detectable in a significantly shorter time. Therefore, we propose that the criteria for determining clinically significant CNS detected from blood cultures should be the presence of an indwelling central venous catheter and the time to positive culture of less than 30 hours. Thirteen of the 15 strains meeting these criteria were determined to be significant bacteria, although there were some false-positives. Thus, the proposed criteria are clinically very reliable, fast, and easy to implement.