

[原 著]

血液培養から分離された *Acinetobacter* 属菌の同定に関する検討

東 由桂・渡 智久・柴崎有紀・米沢太亨
山内紫織・友田 豊・藤井 聡
旭川医科大学病院臨床検査・輸血部

(平成 26 年 12 月 5 日受付, 平成 27 年 3 月 5 日受理)

血液培養から分離された *Acinetobacter* 属菌 35 株, 35 症例を対象に菌形態, コロニー性状および各種培地での発育性の比較, 簡易同定キット, 質量分析法および遺伝子解析を実施した。さらに, 検出された菌種により, 血流感染症の臨床的重症度が異なるか否かを検証した。菌形態とコロニー形態, 培地の発育性, 簡易同定キットおよびバイテック MS では, *A. baumannii* complex 内の菌種を鑑別することは困難であった。non-*A. baumannii* complex は, *A. baumannii* complex と比較し, 菌体が細い, またはコロニーが小さめでやや乾いた質感など形態的特徴を認めるものがあつた。さらに, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* および *A. lwoffii* は一部のグラム陰性桿菌用選択培地に発育しなかつた。*rpoB* 遺伝子部分シーケンス (*rpoB*) の解析結果を基準にした各法の一致率は E/NF 77.1%, NID 62.9%, GN 88.6% および MS 91.4% であつた。16S rRNA 遺伝子シーケンスと *rpoB* との一致率は 48.6% (17 株/35 株) であつた。*rpoB* の解析から *A. baumannii* complex の内訳は, *A. nosocomialis* が 50% と最も多く, 次の代表菌種の *A. baumannii* は 21.4% であつた。*A. baumannii* complex の菌種間において, 重症度に違いはみられなかつたが, *A. baumannii* complex と non-*A. baumannii* complex の間で重症度に有意差を認めた。したがつて, 両者を正確に鑑別することは重要であり, *rpoB* との一致率, 簡便性から両者の鑑別にはバイテック MS が有用であつた。

Key words: *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii* complex, 血液培養, バイテック MS

序 文

Acinetobacter 属菌は, 土壌や水回り等の環境中に存在する細菌である。本菌は, グラム陰性菌でありながら湿潤環境だけでなく, 乾燥表面でも長期間生存可能なことが知られている。通常は, 非病原性とみなされるが, ヒトの皮膚や粘膜に定着し, 免疫力が低下した患者に日和見感染症を引き起こす。そのため, 医療施設では, 肺炎, 尿路感染症およびカテーテル関連血流感染症などの院内感染が問題となっている^{1)~3)}。

Acinetobacter 属菌は, 現在までに 34 菌種が命名されており⁴⁾, 未だ命名されていない genomic species を含めると, さらに多くの菌種が存在する。その中で, *A. baumannii* は臨床的に最も重要とされているが, 基本性状が酷似する *A. nosocomialis*, *A. pittii* および *A. calcoaceticus* の 3 菌種との鑑別が困難なことから包括的な呼称として *A. baumannii* complex と呼ばれる。それ以外には *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. ursingii* および *A. junii* などが知られている。日常検査における *Acinetobacter* 属菌の同定には, 簡易同定キットや自動機器が使用されている。しかし, *Acinetobacter* 属菌は腸内細菌と比して, 生化学的性状に乏しいことや簡易同定キット毎に同定可能菌種が大きく異なっているため, これらを単独で使用した場合の同定精度には限界がみられる。

今回我々は, 血液培養から分離された *Acinetobacter* 属菌を対象に, 従来法, 質量分析法および遺伝子

著者連絡先: (〒078-8510) 北海道旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1 番 6 号
旭川医科大学病院臨床検査・輸血部
渡 智久
TEL: 0166-69-3364
FAX: 0166-65-0878
E-mail: twatari@asahikawa-med.ac.jp

学的検査を用いて各同定法の成績を比較した。さらに、各菌種の臨床的な重要性についても検証を行った。

材料と方法

1. 対象

2006年～2013年の8年間に、当院で、血流感染症と診断された患者の血液培養から検出され、生物学的・酵素学的性状によって、*Acinetobacter* 属菌に同定された35株を対象とした。同一エピソードによる複数回の検出は、初回分離株のみを対象とした。また、コロニー形態の特徴を観察する目的で、そのコントロールとして標準菌株6菌種を追加した。

2. 菌株

臨床分離株は、マイクロバンク（イワキ）に凍結保存していた菌株をトリプチケースソイ5% ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトンディッキンソン、以下TSAB）にて35℃、24時間培養し、新たなTSABで継代培養したコロニーを用いた。標準菌株は、添付文書に準じて復元したものを用いた。

3. 方法

1) 菌形態および各培地におけるコロニー形態

臨床分離株35株と標準菌株について、グラム染色による菌形態、TSAB上におけるコロニー形態、各社のマッコンキー寒天培地とドリガルスキー寒天培地における発育の有無を確認した。グラム染色液は、neo-B&Mワコー（和光純薬）を使用した。コロニー形態の観察はTSABを使用し、培地は、ポアメディアマッコンキー寒天培地（栄研化学：栄研MC）、ニッスイプレートマッコンキー寒天培地（日水製薬：日水MC）、バイタルメディア改良マッコンキー寒天培地（極東製薬：極東MC）、マッコンキーII寒天培地（日本ベクトンディッキンソン：BDMC）、ポアメディアドリガルスキー改良培地Blue（栄研化学：栄研DRG）、ニッスイプレートドリガルスキー改良寒天培地（日水製薬：日水DRG）、バイタルメディアBTB寒天培地（極東製薬：極東DRG）およびBTB乳糖加寒天培地（日本ベクトンディッキンソン：BDDR）を使用した。培養条件は、好気環境下で35℃、24時間とした。

2) 各種簡易同定キットおよび自動同定機器による同定試験

簡易同定キットは、BD BBLCRYSTAL E/NF 同定検査試薬（日本ベクトンディッキンソン、E/NF）を使用した。自動同定機器は、MicroScan WalkAway96PlusのマイクロスキャンNegシリーズIDパネル（シーメ

ンスヘルスケア・ダイアグノスティクス、NID）およびVITEK2のGN同定カード（シスメックス・ビオメリュー、GN）を使用した。操作手順ならびに判定は、それぞれの添付文書に従った。

3) バイテックMS（シスメックス・ビオメリュー、MS）による同定試験

TSAB上のコロニーをバイテックMSターゲットスライド（シスメックス・ビオメリュー）に白金耳で塗布し、バイテックMSマトリックス-CHCA（シスメックス・ビオメリュー）を1μl添加して乾燥後にMSで測定した。測定結果の解析は、専用プログラムのMylaミドルウェア（シスメックス・ビオメリュー、Myla）を使用した。判定は添付文書に従い、候補菌名が1菌種かつ60%以上の信頼値を示したものを菌名とした。Mylaで*A. baumannii* complexとなった菌株は、SARAMIS (BIOMERIEUX, SARAMIS)で解析し、マススペクトルのパターンマッチングによる詳細な菌名の鑑別が可能であるかを検証した。被検菌データと既存のデータベースを照合することにより、メインピークの一貫率が高い順に数個から数十個挙げられる候補菌名パターンを確認した。

4) 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析 (16S)

PCR法で16S rRNA 遺伝子の領域を増幅した。PCR反応は、TaKaRa EX-Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を使用し、増幅産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した。それらをBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いてシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。その後、BLASTにて相同性検索を行った⁵⁾。菌種の確定は、98.7%～100%の類似度で、一菌種のみが候補として示された場合に、その菌種を同定菌名と確定した。また、この範囲内であっても、複数菌種が候補に挙げられた場合には、同定不能とした。

5) *rpoB* 遺伝子部分シーケンス解析 (*rpoB*)

Bernard La Scolaらの方法⁶⁾に従い、約4000 bpの*rpoB* 遺伝子における特定の領域2ヶ所（zone1: 350 bpおよびzone2: 450 bp）を解析対象とした。はじめにzone1の解析を行い、*A. junii*/*A. grimontii* および*A. baylyi*/*A. genomic species 11*は、zone2を用いた。16Sと同様に塩基配列を決定した後、BLASTにて相同性検索を行った。

6) 薬剤感受性試験

A. baumannii complexを対象として、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の微量液体希釈法⁷⁾に準じて、MIC値を測定した。測定は、ドレイプレート‘栄研’DP35（栄研化学）を使用した。

Table 1. 臨床分離株と標準菌株の菌形態と TSAB^{*1} 上のコロニー形態

菌名 (株数)	種類	株数	形態	大きさ ^{**2}	色調 ^{**2}	形 ^{**2}	質 ^{**2}
<i>A. baumannii</i> (7)	Isolated	6	球状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
	ATCC 19606	1					
<i>A. johnsonii</i> (1)	ATCC 17909	1	球状	1.5 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>A. haemolyticus</i> (1)	ATCC 17906	1	球状	2 mm	β溶血、 白色	円形・隆起	スムーズ ややムコイド
<i>A. ursingii</i> (5)	Isolated	4	やや細い 桿状	1 mm	灰白色	円形 凹レンズ状～ 扁平	やや乾燥
	ATCC BAA-617	1					
<i>A. calcoaceticus</i> (2)	Isolated	1	球状	1 mm 未満	灰白色	円形・ドーム状	スムーズ
	ATCC 23055	1					
<i>A. lwoffii</i> (1)	ATCC 15309	1	球状	1 mm	灰白色	円形・ドーム状	粘稠性あり
<i>A. nosocomialis</i> (14)	Isolated	14	球状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>A. pittii</i> (6)	Isolated	6	球状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'Close to 13TU' (1)	Isolated	1	球状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU/13BJ (1)	Isolated	1	やや細い 桿状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>A. soli</i> (1)	Isolated	1	やや細い 桿状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ
<i>A. grimontii</i> (1)	Isolated	1	やや細い 桿状	2 mm	灰白色	円形・隆起	スムーズ

^{*1}TSAB：トリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地

^{**2}培養条件：好気，35℃，24時間培養

7) 菌種と重症度の関連性の検証

35 症例について、年齢、性別、基礎疾患などの臨床的背景から、血液培養採取時の Pitt bacteremia score^{®9)} (PBS) を算出して患者重症度の指標とし、菌種との関連性について検証した。統計学的解析は SPSS ソフト (Ver.21) を用い、各群の比較は unpaired t 検定で p<0.05 を有意差ありとした。

8) 菌名の取り扱い

A. baumannii complex は、*A. baumannii*、*A. nosocomialis*、*A. pittii*、*A. calcoaceticus* および *Acinetobacter* genomic species 'Close to 13TU' を含むため、*rpoB* および 16S との比較において、各種同定キットおよび MS で *A. baumannii* と同定された場合には、許容できる一致として、本文では許容一致率と表す。*A. baumannii* complex 以外の菌種は、non-*A. baumannii* complex と称する。

結 果

1. 各菌種におけるグラム染色形態および各培地上におけるコロニー形態の特徴

臨床分離株 35 株および標準菌株 6 株について、グラム染色形態および TSAB 上におけるコロニー形態の比較を Table 1 に示した。グラム染色の菌体は大部

分が球状であったが、*A. ursingii*、*A. soli*、*A. grimontii* および *A. genomic species* 14TU/13BJ では、球状よりもやや細長い菌体がみられた。また、TSAB におけるコロニー形態は、*A. baumannii* を含む大部分が灰白色コロニーを形成したが、*A. ursingii* はより小型であり、やや乾燥した質感であった (Fig. 1)。*A. ursingii* と *A. lwoffii* のコロニーは質感がまったく異なっており、やや乾燥している *A. ursingii* に対して、*A. lwoffii* は白金耳で触ると糸を引く粘稠性を示した。

さらに、各社のマッコンキー寒天培地とドリガルスキー寒天培地における発育状況を Table 2 に示した。標準菌株の *A. calcoaceticus* はすべての培地に発育せず、*A. lwoffii* はマッコンキー寒天培地に発育しなかった。しかし、臨床分離株の *A. calcoaceticus* は、いずれの培地にも発育し、標準菌株の発育性と乖離がみられた。

2. *rpoB* と各種簡易同定キットおよびバイテック MS の同定結果の比較

rpoB と各種簡易同定キットおよび MS における許容一致率は E/NF 77.1%、NID 62.9%、GN 88.6% および MS 91.4% であった。全体の許容一致率は 62.9% (22/35 株) であった。*rpoB* といずれかの方法が完全

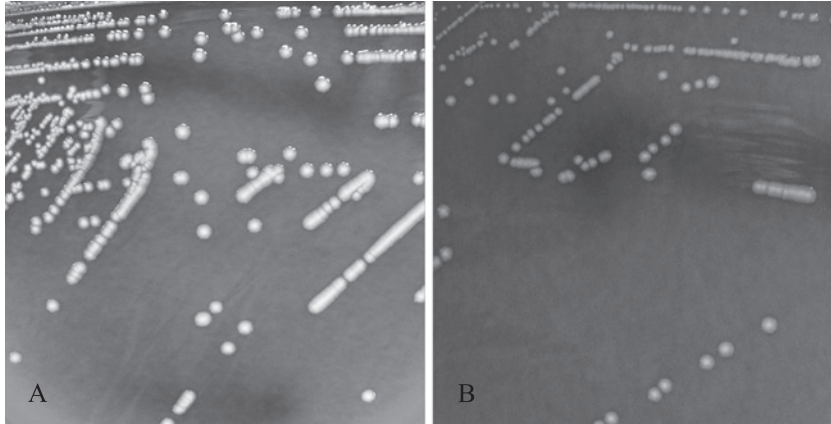


Fig 1. *A. baumannii* および *A. ursingii* のコロニー形態の比較
 A : *A. baumannii*
 B : *A. ursingii*
 トリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地, 好気, 35°C, 24 時間培養

Table 2. 臨床分離株と標準菌株の各種培地における発育性

菌名 (株数)	種類	株数	栄研 MC	日水 MC	極東 MC	BD MC	栄研 DRG	日水 DRG	極東 DRG	BD DRG
<i>A. baumannii</i> (7)	Isolated	6	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 19606	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. johnsonii</i> (1)	ATCC 17909	1	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. haemolyticus</i> (1)	ATCC 17906	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. ursingii</i> (5)	Isolated	4	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC BAA 617	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. calcoaceticus</i> (2)	Isolated	1	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 23055	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. lwoffii</i> (1)	ATCC 15309	1	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>A. nosocomialis</i> (14)	Isolated	14	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. pittii</i> (6)	Isolated	6	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'Close to 13TU' (1)	Isolated	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU/13BJ (1)	Isolated	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter soli</i> (1)	Isolated	1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. grimontii</i> (1)	Isolated	1	+	+	+	+	+	+	+	+

MC : マッコンキー寒天培地 DRG : ドリガルスキー寒天培地

不一致となった13株 (Table 3) において, NID はすべての株で誤同定を示した。また, *A. ursingii* 4株では, E/NF と NID で *A. lwoffii* や *A. baumannii* に同定されたのに対し, GN と MS では *rpoB* とすべて一致した。*rpoB* で *A. soli*, *A. grimontii* および *A.*

genomic species 14TU/13BJ となった3株について, MS では *A. radioresistens*, *A. junii* および *A. haemolyticus* と同定された。

3. *rpoB* と 16S の同定結果の比較

16S と *rpoB* の結果が乖離した例を Table 4 に示

Table 3. 各種同定キット間における乖離例の比較結果

菌株 No.	<i>rpoB</i> シークエンス	16S シークエンス	E/NF	NID	GN	MS
3	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Non-ID	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
8	<i>A. pittii</i>	Non-ID*	<i>A. baumannii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
11	<i>A. pittii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
14	<i>A. pittii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
16	<i>A. calcoaceticus</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
22	<i>A. pittii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> complex
25	<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU/13BJ	Non-ID	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Non-ID
35	<i>A. soli</i>	<i>A. soli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. radioresistens</i>
36	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>
38	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>
43	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>
61	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. ursingii</i>	<i>A. ursingii</i>
63	<i>A. grimontii</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i>

E/NF : BD BBLCRYSTAL E/NF, NID : マイクロスキャン Neg シリーズ ID パネル, GN : VITEK2 GN, MS : VITEK MS
*Non-ID : no-identification

Table 4. *rpoB* と 16S の結果乖離例

<i>rpoB</i> *1	16S**2	株数
<i>A. nosocomialis</i>	Non-ID**3	7
<i>A. pittii</i>	Non-ID	5
<i>A. calcoaceticus</i>	Non-ID	1
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'Close to 13TU'	Non-ID	1
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU/13BJ	Non-ID	1
<i>A. grimontii</i>	Non-ID	1
<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	1
<i>A. pittii</i>	<i>A. baumannii</i>	1

*1 相同性 : 97 ~ 100%

**2 相同性 : 99.67 ~ 100%

**3 Non-ID : no-identification

す。16S の同定率は 54.3% (35 株中 19 株) であり、そのうち *rpoB* と結果が一致したのは 17 株であった (一致率 : 48.6%)。その内訳は、*A. baumannii* 6 株、*A. nosocomialis* 6 株、*A. ursingii* 4 株および *A. soli* 1 株であった。一方、結果が乖離した 2 株は、*rpoB* の *A. nosocomialis*、*A. pittii* に対して、16S では *A. calcoaceticus*、*A. baumannii* と同定された。また、35 株中 16 株は、16S では相同性の高い菌種が複数存在したことから鑑別は不可能であった。

今回の *rpoB* の結果から臨床分離株 35 株中 28 株 (80%) が *A. baumannii* complex に含まれる菌名となり、その内訳は *A. nosocomialis* が 50% で最も多く、代表菌種である *A. baumannii* は 21.4% であった (Table 5)。

4. *rpoB* と SARAMIS の解析結果との比較

SARAMIS の解析結果は、①候補菌が 1 菌種であった、②複数菌種が候補となったが、半数以上が特定の菌種であった、③複数菌種が同様の割合で候補として

Table 5. *rpoB**シーケンスにおける菌種の内訳

	割合	菌名	株数	<i>A. baumannii</i> complex 内の割合
<i>A. baumannii</i> complex	80%	<i>A. baumannii</i>	6	21.4%
		<i>A. nosocomialis</i>	14	50%
		<i>A. pittii</i>	6	21.4%
		<i>A. calcoaceticus</i>	1	3.6%
		<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'Close to 13TU'	1	3.6%
non- <i>A. baumannii</i> complex	20%	<i>A. ursingii</i>	4	
		<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU/13BJ	1	
		<i>A. soli</i>	1	
		<i>A. grimontii</i>	1	

*相同性 97 ~ 100%

あがり、菌種を鑑別できなかった、以上の3パターンに分類された。各パターンの頻度は①2株、②18株、③8株であった。②は半数以上を占める特定の菌種を同定菌種とした場合、①および②における *rpoB* との一致率は、①は100% (2株中2株) および②は94.4% (18株中17株) であった。各パターンにおける菌種の内訳は、①は *A. baumannii* 2株、②は *A. baumannii* 4株、*A. nosocomialis* 13株であった。不一致となった1株は、*rpoB* が *A. pittii* であったのに対し、SARAMISでは *A. baumannii* と同定された。③は *A. pittii* 5株、*A. nosocomialis* 1株、*Acinetobacter* genomic species 'Close to 13TU' 1株および *A. calcoaceticus* 1株であった。

5. 薬剤感受性試験結果

対象となった28株の各薬剤のMIC値の出現範囲をTable 6に示した。5菌種において、菌種に特徴的な感受性パターンは認められなかった。

6. 菌種と重症度の関連性の検証

臨床的背景の調査結果を比較した。年齢は1歳から83歳(平均58歳)で男性21名および女性14名であった。35名の主な基礎疾患は、悪性腫瘍18名(肺9名、上部消化管5名、下部消化管4名)が最も多く51%を占めていた。続いて縦隔腫瘍・脳腫瘍3名、潰瘍性大腸炎・クローン病3名、腎不全4名、脳血管疾患3名、骨髄異形成症候群1名、全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患1名、気管支肺炎1名および多発性外傷1名であった。

PBSと菌種の関連性について、*A. baumannii* complex と non-*A. baumannii* complex で比較した結果、年齢、発熱および血圧のスコアを単独で比較した場合には両者の間に統計学的有意差は認められなかった。しかし、PBSでは *A. baumannii* complex と non-

A. baumannii complex の間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた (Table 7)。一方、*A. baumannii* complex の *A. baumannii*、*A. nosocomialis* および *A. pittii* の3菌種の間で、PBSの統計学的有意差は認められなかった。

考 察

A. baumannii は、*Acinetobacter* 属菌の中でヒトに病原性を示す菌種として知られている。しかし、微生物検査室で同定される *A. baumannii* は、*A. baumannii*、*A. calcoaceticus*、*A. pittii* および *A. nosocomialis* の4菌種を含んでいる。生物学的・酵素学的性状を用いた簡易同定キットおよび自動同定装置では、これら4菌種の鑑別が困難であるため、日常的に *A. baumannii* complex または代表的な菌名である *A. baumannii* として報告されている。さらに近年は、*Acinetobacter* genomic species 'Close to 13TU' および *Acinetobacter* genomic species 'Between 1 and 3' の2菌種が *A. baumannii* complex に含まれるという報告¹⁰もあり、これらは遺伝子検査による鑑別が余儀なくされる。一方で、non-*A. baumannii* complex は、従来からヒトに対する病原性は低いとされてきたが、近年敗血症などの重症感染症の起炎菌とする報告^{11)~13)}が見受けられるようになり、無菌材料から分離された場合は菌種レベルの同定が求められる。そこで、本検討では、過去に血液培養から検出された *Acinetobacter* 属菌について、グラム染色およびコロニー形態の観察、各選択培地における発育性の比較、各種同定キット、バイテックMSおよび遺伝子検査の各同定法を用いて再度菌種同定を実施した。16Sは、*A. baumannii* complex の菌種間において99.8%以上の相同性を示す⁶⁾といわれていることから、本検討は

Table 6. *A. baumannii* complex の菌種別感受性試験結果

	<i>A. baumannii</i> n=6	<i>A. pittii</i> n=6	<i>A. nosocomialis</i> n=14	<i>A. calcoaceticus</i> n=1	<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'Close to 13TU' n=1
Piperacillin	4/16	4/64	<1/32	32	16
Sulbactam/ Cefoperazone	<8/8	<8/8	<8/8	<8/8	<8/8
Tazobactam/ Piperacillin	<4/16	<4/16	<4/16->4/64	<4/16	<4/16
Ceftazidime	1/2	1/4	1/8	4	2
Cefepime	0.5/2	1/4	1/16	2	2
Cefozopran	0.5/1	0.5/2	0.5/8	1	1
Imipenem	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25	0.25	0.25
Meropenem	0.25	0.25/1	0.25/0.5	0.25	0.25
Dripenem	0.25	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25	0.25
Aztreonam	8/16	4/>16	8/>16	>16	16
Gentamycine	0.25/0.5	0.5/1	0.5/>8	0.25	1
Tobramycine	0.25/1	0.25/0.5	0.5/8	0.25	0.5
Amikacin	1/2	1/4	1/32	1	2
Minocycline	0.25	0.25	0.25/0.5	0.25	0.25
Clindamycine	2/4	2	2/8	2	2
Fosfomycin	64/>128	128/>128	64/>128	64	128
Ciprofloxacin	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/2	0.12	0.12
Levofloxacin	1	1	1	1	1
Sulfamethoxazole- trimethoprim	19/1	19/1	19/1->38/2	19/1	19/1

Table 7. PBS*および菌種の関連性

	Total n=35	<i>A. baumannii</i> complex n=28	non- <i>A. baumannii</i> complex n=7	P value
Age (years)	58±25	58±24	54±29	0.72
Fever score	0.89±0.83	1.00±0.86	0.43±0.54	0.11
Hypotension score	0.97±1.01	1.07±1.02	0.57±0.98	0.26
PBS	1.89±1.61	2.11±1.69	1.00±0.82	<0.05

*PBS : Pitt bacteremia score

rpoB の結果を基準とした。その結果, *A. baumannii* complex 内の菌種分布は *A. nosocomialis* が 50% を占め, 代表菌種である *A. baumannii* は 21.4% であった。これは国内の医療機関で自動分析装置によって *A. baumannii* と同定された菌の中で, 真の *A. baumannii* は約 3 割であるとの報告¹⁴⁾ と概ね一致する結果となった。国外の血液培養の調査において, アジア圏は *A. baumannii* が 50~70% を占めている^{15)~17)} のに対し, EU 諸国の優勢菌種は *A. nosocomialis* と *A. pittii* であり, 次に *A. baumannii* が続いている¹⁸⁾¹⁹⁾。このように, *A. baumannii* complex 内の菌種は, 地域によって分布が異なることが考えられる。

今回検討に用いた *Acinetobacter* 属菌の菌形態は, 大部分がグラム陰性球菌様であり, コロニーは灰白色を示し, 表面は滑らかな性状であった。特に *A. baumannii* complex は, 形態的特徴の相違点に乏しく, これらの性状からは菌種を見分けることができなかった。一方, non-*A. baumannii* complex は, *A. baumannii* complex と比べてやや細長い菌体を示す傾向がみられた。中でも, *A. ursingii* は, 小さなコロニーとやや乾燥した質感から *A. baumannii* complex とは容易に区別することができた。薬剤感受性試験の MIC 分布からは各細菌の特徴的なパターンを認められなかった。今回, non-*A. baumannii* complex で最多の

A. ursingii は、2001年に新菌種として登録された比較的新しい菌種であり、現在国内で使用されている同定機器のデータベースへの登録はVITEK2 GN同定カードとMatrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)のみとなっている。血流感染症から検出されたnon-*A. baumannii* complexでは、*A. ursingii*が2番目に多かったとされ²⁰⁾、NICUでアウトブレイクを起こした事例²¹⁾もあることから、日常検査で遭遇する可能性が低いとは考えにくい。今回の結果から、血液由来の*Acinetobacter*属菌が簡易同定キットや自動同定装置で*A. lwoffii*と同定された場合は、*A. ursingii*が誤同定されている可能性が示唆された。臨床分離株14株が、いずれかの簡易同定キットで*A. lwoffii*と同定されたのに対し、*rpoB*により*A. lwoffii*と同定された株は存在しなかった。このことは、*A. lwoffii*が血液培養から分離される頻度は低いことが予測される。また、簡易同定キットで*A. lwoffii*となった場合は、標準菌株で認めたマッコンキー寒天培地の非発育や糸ひき現象なども鑑別性状に加え、菌種を決定していく必要がある。

A. calcoaceticus は、標準菌株および臨床分離株の間で、マッコンキー寒天培地およびドリガルスキー寒天培地の発育性能に乖離が認められた。SaccharolyticとAsaccharolyticの*Acinetobacter*属菌では、マッコンキー寒天培地の発育がそれぞれ96%および74%²²⁾といわれており、マッコンキーに発育しない株が存在する。そのため、ほとんどがAsaccharolyticな*Acinetobacter*属菌は、培地の発育性能だけで菌種の鑑別は困難と思われる。

*rpoB*の同定結果と各種簡易同定キットの比較では、一致率はGN、E/NF、NIDの順であった。この結果は、各簡易同定キットの基質数に比例しており、GN、E/NF、NIDは、それぞれ47項目、29項目、23項目となっている。*Acinetobacter*属菌のように、生物学的・酵素学的反応に乏しく、性状の違いが明確でない菌種を同定する際には、複数の項目によって鑑別することになるため、使用する簡易同定キットの選択も重要となる。

*rpoB*とMSの比較で不一致を示した3株は*Acinetobacter genomic species 14TU/13BJ*、*A. soli*および*A. grimontii*であった。これらは、MSのデータベースに未登録菌種であった。MSは測定した菌種がデータベースに未登録の場合、既存データベースと一致せずに同定不能になる。しかし、前述の3株は、MSの測定で同定不能とはならず誤同定された。これは、

試験菌株がデータベースの既登録菌種とリボゾームタンパクが酷似しており、遺伝子的相同性の高い菌種に同定されたことが示唆される。例えば、*A. grimontii*と*A. junii*は遺伝子的相同性が高く、*rpoB*においてもzone1の解析のみでは鑑別することはできない。そのため、これを鑑別するために菌種間で塩基配列が異なる別の領域(zone2)で解析をおこなう必要があった。つまりは、両細菌の遺伝子的相同性が高いことから、菌体の構成タンパク質の相同性も高く、双方のタンパク質の相違点を検出できずに構成タンパク質が酷似する菌種が候補菌名として抽出された可能性がある。そこで、遺伝子的相同性の高い菌種をSARAMISで解析した。Mylaで*A. baumannii* complexとなった28株のマススペクトルのパターンマッチングによる候補菌パターンを調査したところ、候補菌が1種類となった株は2株であり、そのほかは、菌名推定が可能なレベルにとどまるか、候補菌名が多岐に及ぶことで菌種を確定できないものがみられた。したがって、MSでは、独自の同定アルゴリズムを用いた方法(Myla)やマススペクトルのパターンマッチング(SARAMIS)による方法によっても*A. baumannii* complex内の同定には精度に課題が残り、同時に、MALDI-TOFを原理とした同定法は、遺伝子的相同性の高い菌種の鑑別には限界があることが示唆された。

A. baumannii complex内の菌種によって、重症度との間に関係性があるかを調査した。*A. baumannii* complexの菌種間において、2株以上の株が検出された3菌種を比較したところ*A. baumannii*、*A. nosocomialis*および*A. pittii*との間で、PBSに統計学的有意差は検出されなかった。しかし、米国で血流感染の原因菌として分離された*Acinetobacter*属菌を対象とした研究では、*A. baumannii*による感染例と*A. nosocomialis*および*A. pittii*による感染例を比較した場合に*A. baumannii*において死亡率が優位に高いことが報告されている²³⁾。しかし、*A. baumannii* complexに属する菌種の鑑別を微生物検査室で実施することは非常に困難であり、今回の検討でも、それらの菌種間においてPBSの有意な差も認められなかったことから、敗血症性ショックなど急速な病態の悪化や多剤耐性株など、特殊な株が検出された場合を除き、日常検査においては*A. baumannii* complexまでの同定レベルで良いと思われる。一方、*A. baumannii* complexとnon-*A. baumannii* complexでは、*A. baumannii* complex検出例においてPBSが有意に高く、より重症な感染症を引き起こす可能性が示唆された。このことから、*A. baumannii* complexとnon-*A. baumannii*

complex の鑑別は重要であると考えた。

易感染状態にある患者にとって、生活環境中および病院内に生息するブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌の定着および感染は身近な問題であり、それらによる重症感染症では、より正確な同定が求められる場合が少なくない。

今回の検討において、各簡易同定キットにおける *Acinetobacter* 属菌の同定精度を明らかにすることができた。*A. baumannii* complex に対しては、いずれの簡易同定キットも許容できる精度を有していたが、non-*A. baumannii* complex については、同定精度が不十分なものもあり、この点を理解した上で使用する必要がある。また、MS は、non-*A. baumannii* complex についても同定精度が高く、今後国内で MALDI-TOF MS を原理とする同定装置が普及することで、従来から同定困難といわれている細菌の同定精度が向上していくと思われる。

結 語

今回の検討によって、各種簡易同定キットならびに MS による *Acinetobacter* 属菌の同定成績を明らかにすることができた。MALDI-TOF MS を原理とする同定装置バイテック MS による *Acinetobacter* 属菌の同定は、*A. baumannii* complex 内の詳細な菌種の鑑別に課題は残るものの、臨床上重要と思われるレベルの同定は可能であった。

謝辞：本研究は、特定非営利活動法人つくば臨床検査教育・研究センターにおける平成 25 年研究奨励助成金を受けて実施した。

文 献

- Bergogne-Berezin, E., K.J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. As nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9: 148-165.
- Cisneros, J.M., M.J. Reyes, J. Pachon, et al. 1996. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin. Infect. Dis. 22: 1026-1032.
- Wisplinghoff, H., M.B. Edmond, M.A. Pfaller, et al. 2000. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. Clin. Infect. Dis. 31: 690-697.
- Euzéby, J.P. 1997. List of bacterial names with atand-
ing in nomenclature.: a folder available on the Internet. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 590-592.
- 大楠清文. 2013. いま知りたい臨床微生物検査 実践ガイド. p.100-117, 医歯薬出版, 東京.
- La Scola, B., V.A. Gundi, A. Khamis, et al. 2006. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular identification of *Acinetobacter* Species. J Clin Microbiol 44: 827-832.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third Information Supplement. M100-S23, CLSI, Wayne, PA. USA.
- Rhee, J.Y., K.T. Kwon, H.K. Ki, et al. 2009. Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: A comparison of the pitt bacteremia score and the acute physiology and chronic health evaluation II scoring systems. SHOCK 31 (2): 146-150.
- Feldman, C., S. Alanee, V.L. Yu, et al. 2009. Severity of illness scoring systems in patients with bacteraemic pneumococcal pneumonia: implications for the intensive care unit care. Clin Microbiol infect 15: 850-857.
- Nemec, A., L. Krizova, M. Maixnerova, et al. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Research in Microbiology 162: 393-404.
- Loubinoux, J., L. Mihaila-Amrouche, A. Le Fleche, et al. 2003. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. J. Clin. Microbiol. 41: 1337-1338.
- Nemec, A., T. De Baere, I. Tjernberg, et al. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1891-1899.
- Visca, P., A. Petrucca, P. De Mori, et al. 2001. Community-acquired *Acinetobacter radioresistens* bacteremia in an HIV-positive patient. Emerg. Infect. Dis. 7: 1032-1035.
- JANIS. 2010. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた多剤耐性アシネトバクターの国内分離状況. LASR 31: 201-202.
- Koh, TH, TT Tan, CT Khoo, et al. 2012. *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex species in clinical specimens in Singapore. Epide-

- miol Infect 140: 535-538.
- 16) Lee, Y.C., Y.T. Huang, C.K. Tan, et al. 2011. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13 TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J. Antimicrob. Chemother. 66: 1839-1846.
 - 17) Park, K.H., J.H. Shin, S.Y. Lee, et al. 2013. The Clinical Characteristics, Carbapenem Resistance, and Outcome of *Acinetobacter* Bacteremia According to Genospecies. PLoS One 8: e65026.
 - 18) Karah, N., B. Haldorsen, K. Hegstad, et al. 2011. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. Blood culture isolates from Norway. J. Antimicrob. Chemother. 66: 738-744.
 - 19) Schleicher, X, PG Higgins, H Wisplinghoff, et al. 2012. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). Clin. Microbiol. Infect. 19: 737-742.
 - 20) Turton, J.F., J. Shah, C. Ozongwu, et al. 2010. Incidence of *Acinetobacter* Species Other than *A. baumannii* among Clinical Isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging Species. J. Clin. Microbiol. 48: 1445-1449.
 - 21) Máder, K, G Terhes, E Hajdú, et al. 2010. Outbreak of septicaemic cases caused by *Acinetobacter ursingii* in a neonatal intensive care unit. Int J Med Microbiol 300: 338-340.
 - 22) Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, et al. 2007. Manual of Clinical Microbiology, 9th, p. 770-774.
 - 23) Wisplinghoff, H., T. Paulus, M. Lugenheim, et al. 2012. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. J. Infect. 64: 282-290.

A study on identification of *Acinetobacter* species isolated from blood culture

Yuka Azuma, Tomohisa Watari, Yuki Shibazaki, Takatoshi Yonezawa,
Shiori Yamauchi, Yutaka Tomoda, Satoshi Fujii

Department of Medical Laboratory and Blood Center, Asahikawa Medical University Hospital

Acinetobacter species include many strains, such as *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. Iwoffii* and *A. radioresistens*. In our routine identification methods, it is considerably difficult to identify all of the species because of their bacteriological similarities. It is particularly difficult to distinguish *A. baumannii* complex, which consists of *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* and *A. calcoaceticus*. In this study, 35 *Acinetobacter* isolates from blood culture were examined using conventional identification methods such as Gram stain, growth capability on the MacConkey agar and Drigalski agar, MALDI-TOF-MS (VITEK MS) and molecular biological method (*rpoB* gene sequence analysis and 16SrRNA gene sequence analysis). The species consisted of *A. baumannii* complex (80%) and non-*A. baumannii* complex (20%). *A. nosocomialis* (50%) was the most prevalent species in the *A. baumannii* complex, followed by *A. baumannii* (21.4%), and *A. pittii* (21.4%). The coincidence rate based on *rpoB* gene sequence was 77.1% (E/NF), 62.9% (NID), 88.6% (GN) and 91.4% (MS). Because severity of illness score (pitt bacteremia score) of *A. baumannii* complex was significantly higher than that of non-*A. baumannii* complex, it is important to exactly distinguish *A. baumannii* complex from non-*A. baumannii* complex. There was no difference in severity of illness score among *A. baumannii* complex. VITEK MS was useful for distinguishing *A. baumannii* complex from non-*A. baumannii* complex.