

[原 著]

クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地を用いたグラム陰性桿菌の  
簡易同定法と ESBL 産生菌の効率的な検出法の評価：  
質量分析法との同定精度の比較と費用対効果を含めた検討

中山麻美<sup>1)</sup>・大瀧博文<sup>2)</sup>・大楠清文<sup>3)</sup>・米玉利準<sup>1)</sup>・白井菜月<sup>1)</sup>・丹羽麻由美<sup>1)</sup>  
太田浩敏<sup>1)</sup>・古田伸行<sup>1)</sup>・渡邊珠代<sup>4)</sup>・伊藤弘康<sup>5)</sup>・村上啓雄<sup>4)</sup>・清島 満<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 岐阜大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 関西医療大学保健医療学部臨床検査学科

<sup>3)</sup> 東京医科大学微生物学講座

<sup>4)</sup> 岐阜大学医学部附属病院生体支援センター

<sup>5)</sup> 岐阜大学大学院医学系研究科病態情報解析医学分野

(平成 27 年 3 月 19 日受付, 平成 27 年 6 月 8 日受理)

近年,自動同定機器や質量分析法の普及にともない,菌種の同定が迅速に行われるようになってきた。これらの同定法は,多くの集落の中から検査者が選定した菌株に対して適用されるが,臨床検体中には複数の菌種や薬剤耐性菌が混在している場合があり,複数の菌種あるいはクローンの集落から起炎菌や薬剤耐性菌を適切に選定して同定や感受性試験を実施できるかの根本的な問題はまだ解決されていない。今回われわれは,グラム陰性桿菌の菌種を集落の色調で識別できると同時に extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生菌の有無を培養翌日に判定できるクロモアガーオリエンタシオン (CHO)/ESBL 分画培地 (関東化学) の特長を活用して迅速かつ効率的な簡易同定法を考案し,その基礎的な評価と日常検査における前向き検討を実施した。基礎的検討に用いた ATCC 標準株ほか既知の 87 菌株の同定精度は 97.7% (85/87) であった。前向き検討では 207 検体から分離された 264 菌株の同定精度は 98.6% (260/264) で質量分析法の 93.1% (246/264) と比較して優れていた。ESBL 産生菌と判定された 20 菌株は,全て ESBL 分画に発育を認めた。同定にかかる費用は従来法に比較して約 62% 削減できた。簡易同定法は,培養翌日に菌種の推定と ESBL 産生菌の有無を同時に把握することができるため,日常検査の効率化のみならず,迅速な治療抗菌薬の選択や医療関連感染対策においても有用である。

**Key words:** クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地, 簡易同定法, ESBL 産生菌, 費用対効果

序 文

近年, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生菌やカルバペネマーゼ産生菌等の各種耐性菌が医療

施設関連感染症の原因菌として問題となっている。特に, ESBL 産生菌は経年的に検出率が上昇し, さらには院内感染事例も散見され<sup>1)2)</sup>, 腸内細菌科の菌種における薬剤耐性菌検査がこれまで以上に重要度を増してきている<sup>3)4)</sup>。また, 尿路感染症や腹腔内感染症では, 複数の腸内細菌科の菌種が起炎菌となるケースも多い。したがって, 様々な薬剤感受性の表現型を持つ菌が混在した場合でも, それらを見落とすことなく識別して確実に検出する必要がある。とりわけ, ESBL 産生菌の有無を迅速に判定することは, 患者の治療およ

著者連絡先: (〒501-1194) 岐阜県岐阜市柳戸 1-1  
岐阜大学医学部附属病院検査部  
中山麻美  
TEL: 058-230-7259  
FAX: 058-230-7257  
E-mail: anakayam@gifu-u.ac.jp

Table 1. Modified algorithm for presumptive identification of Gram-negative bacilli isolated from clinical specimens

Colony color	OIML			SIM		Acylamidase	Expected isolate(s)
	IND <sup>a)</sup>	ODC <sup>b)</sup>	LDC <sup>c)</sup>	IPA	H <sub>2</sub> S		
Purplish pink	+						<i>Escherichia coli</i>
	-	-	+				<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	+	-	+				<i>Klebsiella oxytoca</i>
Metalic blue	+ or -	-	-				<i>Citrobacter freundii</i>
	+	+	-				<i>Citrobacter koseri</i>
	-	+	+				<i>Enterobacter aerogenes</i>
	-	+	-				<i>Enterobacter cloacae</i>
Aqua blue							<i>Serratia marcescens</i>
	-	+	-	+	+		<i>Proteus mirabilis</i>
	-	-	-	+	+		<i>Proteus penneri</i>
Brown	+	-	-	+	+		<i>Proteus vulgaris</i>
	+	-	-	+	-		<i>Providencia sp.</i>
	+	+	-	+	-		<i>Morganella morganii</i>
Yellow-green						+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Other colors	Requirement for confirmation of identification						

<sup>a)</sup>: spot indole test, <sup>b)</sup>: ornithine decarboxylase, <sup>c)</sup>: lysine decarboxylase

び感染対策上も有用であると考えられる。

2013年に上市された、クロモアガーオリエンタシオン(CHO)/ESBL分画培地(関東化学株式会社)は、CHOの非選択分画と、ESBL産生菌のスクリーニングに優れたCHOを基礎培地とするクロモアガーESBL分画(ESBL分画)の2分画で構成されている。すなわち、本分画培地のみで薬剤感性菌と耐性菌を識別できるだけでなく、菌種の推定とESBL産生菌の有無を同時に判定することができる。さらには、大楠が過去に報告<sup>5)</sup>した発色基質培地と生化学的性状を用いるアルゴリズムとCHO/ESBL分画培地を組み合わせることによって、日常検査の効率化に繋がると考えた。

そこで今回、早期の菌種の報告および薬剤耐性菌検出の効率化を目的として、様々な薬剤耐性菌を使用し、CHO/ESBL分画培地の基礎的な検討・評価を行った。さらには、大楠のアルゴリズム<sup>5)</sup>に改良を加えたグラム陰性桿菌の簡易同定法を構築し、日常検査において本分画培地を用いた検査法の同定精度と費用対効果を含めてその有用性を前向きに検討した。

材料と方法

<簡易同定法の構築>

CHROMagar Orientation培地(日本ベクトン・ディッキンソン)に発育した集落の色調と簡易的な生化学的性状の組み合わせで菌種を同定する大楠のアル

ゴリズム<sup>5)</sup>を一部改良し、簡易同定法を構築した(Table 1, Fig. 1)。菌種の鑑別に用いた生化学的性状は、スポットインドール反応(IND)、オルニチン脱炭酸反応(ODC)、リジン脱炭酸反応(LDC)、IPA反応(IPA)、硫化水素産生性(H<sub>2</sub>S)およびアシルアミダーゼ産生(ACE)の6種類である。INDはDMACAインドール試薬(日本ベクトン・ディッキンソン)を、ODC、LDCはOIML培地(栄研化学)、IPA、H<sub>2</sub>SはSIM培地(栄研化学)、ACEはアセトアミド培地(栄研化学)を使用した。改良を加えた点は、次の3つである。まず、*Proteus sp.*、*Morganella sp.*、*Providencia sp.*の鑑別を行うためにSIM培地を追加した。次に、大楠のアルゴリズム<sup>5)</sup>では緑膿菌を鑑別するために抗血清を使用していたが、代わりにアセトアミド培地を使用した。そして、当院における分離頻度や集落の色調を考慮し、*Salmonella sp.*のアルゴリズムを削除した。

<基礎的検討>

1. CHO/ESBL分画培地の発育支持能の評価

*Escherichia coli* (ATCC 25922)および当院で分離されたESBL産生*E. coli* (CTX-M-1 group)、ESBL産生*Klebsiella pneumoniae* (ATCC 51983, SHV-5)を用いて、CHO/ESBL分画培地の発育支持能について検討した。最初に滅菌生理食塩水でMcFarland No. 0.5の濃度に調整した菌液を原液とし、10<sup>-1</sup>から10<sup>-7</sup>まで段階希釈した。そして、それぞれの希釈系列の菌

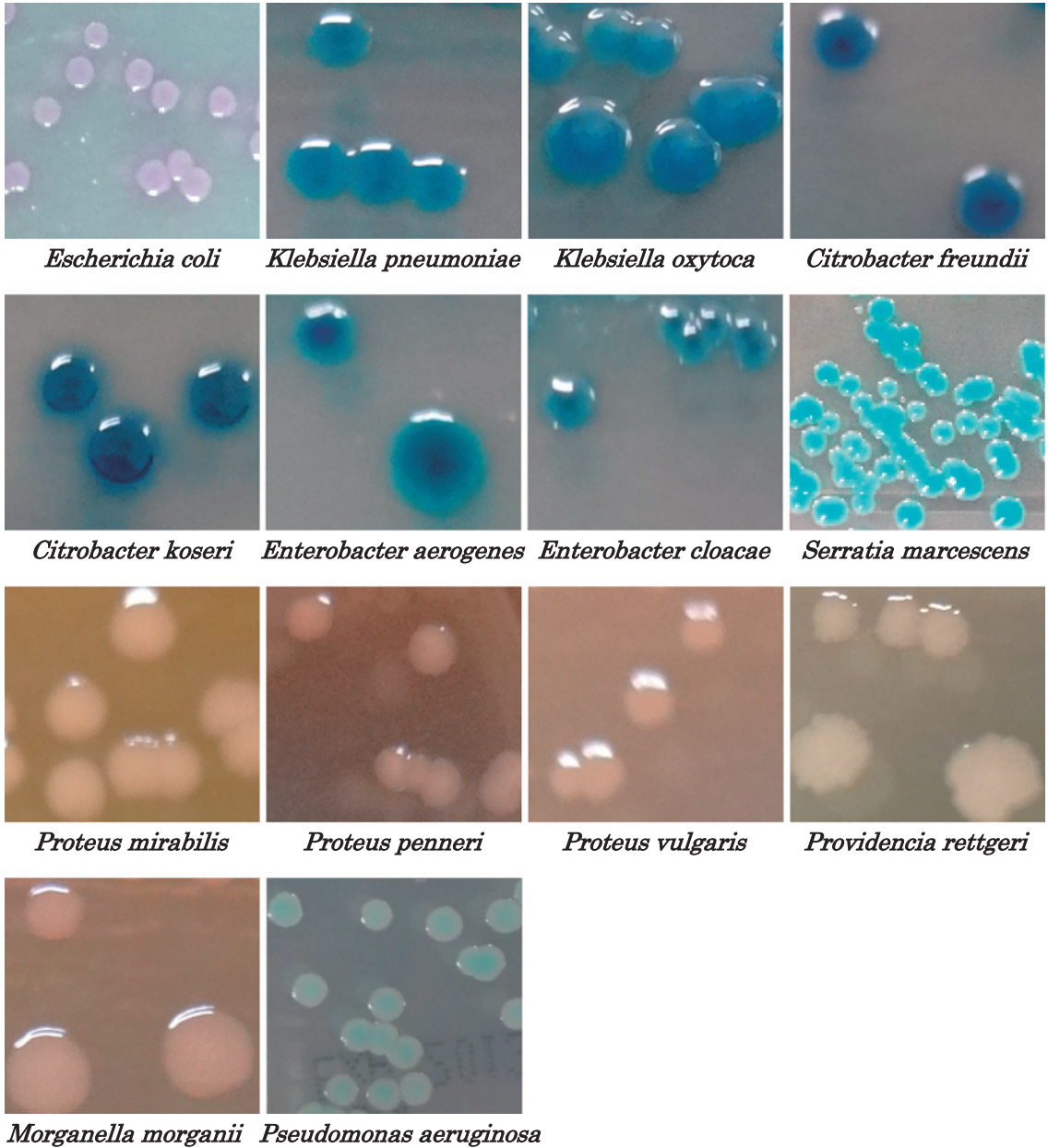


Fig. 1. Bacterial colonies on CHROMagar Orientation medium

液を用いて Miles & Misra 法<sup>6)</sup>で評価および判定を行った。なお、比較対照の培地には、トリプチケースソイ寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン）を使用した。

2. 既存菌株を用いた本分画培地の発育能および簡易同定法の同定精度の評価

腸内細菌科の ATCC 標準株 (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter cloacae* ATCC

Table 2. List of strains and resistance group for the initial phase of this study

Bacteria	Resistance gene (ESBL, PABL, MBL)	No. of strains
<i>Escherichia coli</i>	-	4
	TEM group	1
	SHV group	2
	CTX-M-1 group	4
	CTX-M-2 group	2
	CTX-M-9 group	7
	CMY-2	3
	IMP-1 group	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	4
	CTX-M-1 group	4
	CTX-M-2 group	3
	CTX-M-9 group	5
	CMY-8	2
	DHA-1	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	4
<i>Proteus mirabilis</i>	-	4
	CTX-M-2 group	4
	CTX-M-9 group	1
<i>Proteus vulgaris</i>	-	3
<i>Proteus penneri</i>	-	1
<i>Serratia marcescens</i>	-	4
	IMP-1 group	1
<i>Citrobacter freundii</i>	-	3
	IMP-1 group	1
<i>Citrobacter koseri</i>	-	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	4
	VIM-2 group	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	3
<i>Morganella morganii</i>	-	3
<i>Providencia rettgeri</i>	-	2
Total		87

23355, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Citrobacter koseri* ATCC 10786, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Morganella morganii* NRBC 3168) 11 株, 当院で分離された cefpodoxime の MIC が 1 µg/ml 以下の腸内細菌科の菌 31 株および ESBL 産生菌 (CTX-M 型) 13 株, 近畿耐性菌研究会より分与を受けた ESBL 産生菌 (TEM 型, SHV 型, CTX-M 型)<sup>11)</sup> 20 株, plasmid-mediated AmpC β-lactamase (PABL) 産生菌 (CMY 型, DHA 型)<sup>7)</sup> 8 株, metallo β-lactamase (MBL) 産

生菌 (IMP 型, VIM 型)<sup>8)</sup> 4 株の計 87 株を用いて, McFarland No. 0.5 の濃度にて CHO/ESBL 分画培地に塗布し, 発育の可否を調査した。なお, 当院で分離された ESBL 産生菌は, cefpodoxime の MIC が 2 µg/ml 以上を示し, amoxicillin-clavulanate, cefpodoxime, ceftazidime, cefotaxime および cefpirome を用いた double-disk synergy test (DDST)<sup>9)</sup> で陽性を示し, かつ PCR 法<sup>10)11)</sup> にて耐性遺伝子の保有を確認した菌株を用いた。検討に用いた菌株を菌種別, 耐性因子別に整理し Table 2 に示した。

<前向き検討>

1. 対象検体および培養・同定検査

2013 年 8 月 1 日から 9 月 30 日および 12 月 1 日から 12 月 31 日までの計 3 ヶ月間に当院検査部に提出された検体のうち, グラム染色でグラム陰性桿菌が有意に認められた 207 検体に対して, 日常検査に使用する培地とは別に本分画培地を追加した。207 検体中, 全例でグラム陰性桿菌の発育を認め, コロニーの性状の違いにより分離された 264 株を対象として検討を行った。

臨床検体を CHO/ESBL 分画培地に塗布し, 35°C, 好気条件下で 18~24 時間培養した。本分画培地に発育した集落の同定は, 簡易同定法および従来法を用いて実施した。従来法はマイクロスキャン Neg EN Combo1J (SIEMENS) を使用した。簡易同定法と従来法とで菌名が異なる場合には, アピ 20E (シスメックス・ピオメリユー) または 16S rDNA 解析で精査した。そして, 従来法および追加解析の結果を基準として, 簡易同定法の菌種の同定精度を検討した。

一方, ESBL 分画培地に集落が発育し, 腸内細菌科の菌種と判定された菌株は, DDST 法と ESBL/AmpC 鑑別ディスク (関東化学) を用いて耐性因子の確認試験を実施した。

3. 簡易同定法と質量分析法との菌種の同定精度の比較・検討

分離された 264 菌株を MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) を使用してセルスマ法で測定し, 菌種の同定を行った。菌種レベルの確定は Score>2.0 とし, それより低いスコアを示した場合は, エタノール・ギ酸抽出法にて再度測定した。

4. ESBL 産生 *E. coli* と ESBL 非産生 *E. coli* が同時検出された検体における釣菌確率の評価

ESBL 産生 *E. coli* と ESBL 非産生 *E. coli* の 2 株が同時検出された 1 検体において, 非選択分画と ESBL 分画のそれぞれからランダムに集落を釣菌し, 前述と同様に ESBL 産生の確認試験を実施した。また, Iijima

Table 3. Accuracy of the Modified algorithm

Isolated bacteria	No. of isolates	Identification accuracy
<i>Escherichia coli</i>	91/91	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49/49	100%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10/10	100%
<i>Citrobacter freundii</i>	9/10	90%
<i>Citrobacter koseri</i>	1/1	100%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1/1	100%
<i>Enterobacter cloacae</i>	11/14	78.6%
<i>Serratia marcescens</i>	7/7	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	8/8	100%
<i>Proteus penneri</i>	2/2	100%
<i>Proteus vulgaris</i>	1/1	100%
<i>Providencia sp.</i>	2/2	100%
<i>Morganella morganii</i>	4/4	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43/43	100%
Other spices*	21/21	100%
Total	260/264	98.5%

\*Other spices (No. of isolates): *Acinetobacter baumannii/haemolyticus* (8), *Stenotrophomonas maltophilia* (6), *Barkholderia cepacia* (2), *Pseudomonas fluorescens/putida* (2), *Acinetobacter lwoffii* (1), *Chryseobacterium indologenes* (1), *Providencia rettgeri* (1)

らの方法<sup>12)</sup>  $[D=1-(1-P)^n]$  を用いて、ESBL 産生 *E. coli* の釣菌確率を算出して比較した。

#### 5. 費用対効果の検証

検討期間中、菌種の同定のみにかかった費用を算出し、簡易同定法と従来法の同定費用を比較検討した。菌種の同定にかかった費用は、従来法では同定に使用したキットの価格（定価）、簡易同定法においては、CHO/ESBL 分画培地、生化学的性状に使用した試験管培地の価格（定価）を算出した。なお、スポットインドル試験は、1 回に使用した価格が 1 円以下のため、同定費用から除外した。また、検査に要した時間当たりの人件費は同定費用に含まれていない。

## 結 果

### <基礎的検討>

#### 1. Miles & Misra 法による培地の発育支持能試験

今回使用した菌株 (*E. coli* ATCC 25922, ESBL 産生 *E. coli*, ESBL 産生 *K. pneumoniae*) において、非選択分画および ESBL 分画 (*E. coli* ATCC 25922 は除く) とともに良好な発育を認めた。トリブチケースノイ寒天培地と比較した場合、各々の希釈系列の発育における差異は認められなかった。

#### 2. 既存菌株を用いた本分画培地の発育能および簡易同定法の評価

ATCC 標準株および cefpodoxime の MIC が 1 μg/ml 以下を示す当院分離株において、すべての菌株で非選択分画に発育を認め、ESBL 分画では発育を認めなかった。また、ESBL 産生菌、PABL 産生菌および MBL 産生菌においては、すべての菌株で非選択分画に発育を認め、PABL 産生菌の 1 株 (CMY-2 型) を除く 44 株は ESBL 分画にも発育を認めた。

簡易同定法の同定精度は 97.7% (85/87 株) であった。*P. vulgaris* の 1 株が通常 (茶色) とは異なる緑色の集落色調を呈したため同定できなかった。しかし、培地背景が褐色であり、IPA 反応陽性菌であることは推測可能であった。

また、MBL 産生 *E. coli* の 1 株は、スポットインドル試験は陽性であったが、通常 (ピンク色) とは異なる緑色の集落色調を示したため同定できなかった。その他、本培地において微小集落を示した ESBL 産生 *E. coli* が 1 株存在したが、簡易同定法による同定は可能であった。上記の結果から、ESBL 分画における耐性菌 (ESBL 産生菌、PABL 産生菌、MBL 産生菌) 検出の特異度は 100% であった。

### <前向き検討>

#### 1. 簡易同定法の同定精度

簡易同定法を用いた菌種の同定精度を Table 3 に示した。菌種の同定精度は 98.5% (260/264 株) であった。その菌種の内訳は *E. coli* 100% (91/91 株), *K. pneumoniae* 100% (49/49 株), *P. aeruginosa* 100% (43/43 株), *K. oxytoca* 100% (10/10 株), *C. freundii* 90% (9/10 株), *C. koseri* 100% (1/1 株), *E. aerogenes* 100% (1/1 株), *E. cloacae* 78.6% (11/14 株), *S. marcescens* 100% (7/7 株), *P. mirabilis* 100% (8/8 株), *P. penneri* 100% (2/2 株), *P. vulgaris* 100% (1/1 株), *Providencia sp.* 100% (2/2 株), *Morganella morganii* 100% (4/4 株), その他の菌種 100% (21/21 株) であった。同定できなかった *C. freundii* の 1 株は、従来法と追加試験により *Aeromonas hydrophila* group と同定された。また、*E. cloacae* の 3 株は、そのうち 2 株が *Enterobacter mori*, 1 株が *Citrobacter braakii* と同定された。*C. braakii* は *Citrobacter* 属の中で唯一 ODC が陽性であるため、*E. cloacae* と誤同定された。

#### 2. 簡易同定法と質量分析装置の菌種別の同定精度の比較

簡易同定法を用いた菌種別の同定精度は 98.6% (260/264 株) であったのに対し、質量分析装置を用

Table 4. Comparison of the identification accuracy of modified algorithm and MALDI-TOF MS: A prospective study of 264 isolates

Organism (No. of isolates)	No. (%) of isolates correctly identified	
	Modified algorithm	MALDI-TOF MS
<i>Escherichia coli</i> (91)	91 (100)	91 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (49)	49 (100)	49 (100)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (10)	10 (100)	10 (100)
<i>Citrobacter freundii</i> (9)	9 (100)	9 (100)
<i>Citrobacter koseri</i> (1)	1 (100)	1 (100)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)
<i>Enterobacter cloacae</i> (11)	11 (100)	4 (36)
<i>Serratia marcescens</i> (7)	7 (100)	7 (100)
<i>Proteus mirabilis</i> (8)	8 (100)	8 (100)
<i>Proteus penneri</i> (2)	2 (100)	0 (0)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	1 (100)	0 (0)
<i>Providencia</i> sp. (3)	3 (100)	3 (100)
<i>Morganella morganii</i> (4)	4 (100)	4 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (43)	43 (100)	43 (100)
<i>Acinetobacter baumannii/haemolyticus</i> (8)	8 (100)	7 (87.5)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (6)	6 (100)	6 (100)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (1)	1 (100)	0 (0)
<i>Barkholderia cepacia</i> (2)	2 (100)	2 (100)
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (2)	2 (100)	0 (0)
<i>Enterobacter mori</i> (2)	0 (0)	0 (0)
<i>Aeromonas hydrophila</i> group (1)	0 (0)	1 (100)
<i>Citrobacter braakii</i> (1)	0 (0)	0 (0)
<i>Chryseobacterium indologenes</i> (1)	1 (100)	0 (0)
Total (264)	260 (98.6)	246 (93.1)

Table 5. Characterization of ESBL producers and ABL producing bacteria detected on CHO/ESBL media

Organism	No. of isolates		
	Recovered	ESBL <sup>a)</sup>	ABL <sup>b)</sup>
<i>Escherichia coli</i>	18	18	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	
<i>Citrobacter freundii</i>	2		2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	
<i>Enterobacter mori</i>	1		1
Total	24	20	4

<sup>a)</sup>: extended spectrum β-lactamase

<sup>b)</sup>: AmpC β-lactamase

いた菌種別の同定精度は93.1% (246/264株)と、簡易同定法の同定精度の方が高かった。その菌種別の比較をTable 4に示した。質量分析法は、*E. cloacae*が

36% (4/11株)、*P. penneri*が0% (0/2株)と低い同定精度であった。

### 3. 薬剤耐性菌の鑑別状況

ESBL分画に集落の発育を認めたのは54株であった。そのうち24株は腸内細菌科の菌種と判定された (Table 5)。その菌種と株数の内訳は、*E. coli* 18株、*C. freundii* 2株、*K. oxytoca* 1株、*E. aerogenes* 1株、*P. mirabilis* 1株、*E. mori* 1株であった。このうち、ESBL産生菌と判定されたのが20株で、残りの4株は、AmpC β-lactamase (ABL)産生菌と判定された。従来法にてESBL産生菌と判定された株は、全てESBL分画に発育を認めた。また、複数の菌種が混在し、かつESBL産生菌の菌量が少ない検体においても、ESBL産生菌を見逃すことなく釣菌可能であった (Fig. 2)。

### 4. 非選択分画とESBL分画におけるESBL産生菌の釣菌確率

検体中のESBL産生*E. coli*の存在率は5.6%で

あった。釣菌数を5コロニーと仮定した場合の非選択分画におけるESBL産生菌の釣菌確率は25%であった。一方、ESBL分画では100%の確率でESBL産生菌を釣菌できた (Table 6)。

#### 5. 費用対効果の検証

検討対象となった264株について、簡易同定法と従来法の同定費用を算出した (Table 7)。なお、従来法については同定と薬剤感受性検査を同時に測定できるプレートを使用した。費用の算出に関しては同定パネルを使用したと仮定して、同定にかかった費用のみ

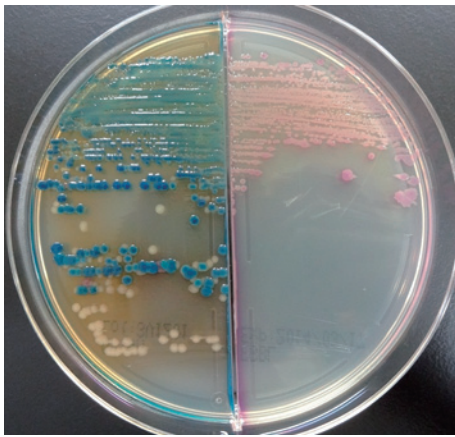


Fig. 2. An isolated case of ESBL-producing *E. coli* in urine specimen from patient with polymicrobial urinary-tract infection

を算出した。簡易同定法を用いた検査法は従来法と比べて、約62%の費用を削減できた。

#### 考 察

臨床微生物検査において起炎菌を迅速かつ正確に同定することはきわめて重要である。同定キットや自動同定機器そして近年では質量分析法などの技術革新によって確かに菌種の同定が迅速に行われるようになったのは事実である。しかしながら、これらの同定法はすべて培養後に多くの集落のなかから選定された菌株に対して適用される。細菌感染症では、複数の菌種や薬剤耐性菌が原因となる場合もあり、これら複数のクローンあるいは複数菌種の菌株から起炎菌や薬剤耐性菌を取りこぼすことなく選定して同定や感受性試験を実施するといった根本的な問題はまだ解決に至っていない。すなわち、培地に発育した複数菌あるいは複数クローンが混在している場合に集落の形状だけを頼りに検査対象とすべき集落を選定することは検査の正確度にも大きな影響を与える。また、1枚の培地で、菌種の同定と薬剤耐性菌の鑑別を行うことは困難を極める。これらの背景を鑑み、今回われわれは、集落の色調によるグラム陰性桿菌の識別とESBL産生菌の有無を培養後すぐに判定できるCHO/ESBL分画培地を用いた迅速かつ効率的な検査法を考案して、その検討・評価を実施した。

はじめに、本分画培地の基礎的な評価のために ceftopodoxime の MIC が  $1 \mu\text{g/ml}$  以下を示す当院分離株を用いて発育支持能を検討した。耐性因子を有さない

Table 6. Comparison of non-selective area with ESBL area in detection ratio of ESBL *E. coli*

Area	No. of Examined colonies	No. of ESBL colonies	ESBL ratio (%)	Detection ratio (%)*
Non-selective area	18	1	5.6	25
ESBL area	6	6	100	100

\*It is assumed that five colonies were examined at a time.

Table 7. Comparison of modified algorithm with Microscan panel in cost required for identification

Item (cost per test)	Microscan NENC1J (n = 264)		Modified algorithm (n = 264)	
	No. of tests	Total cost (yen)	No. of tests	Total cost (yen)
Microscan NENC1J (1,000 yen)	264	264,000	25	25,000
CHROMagar Orientation/ESBL medium (280 yen)	—	—	207	57,960
OIML medium (108 yen)	—	—	102	11,016
SIM medium (80 yen)	—	—	17	1,360
Acylamidase medium (100 yen)	—	—	43	4,300
Total		264,000		99,636

菌株のすべてにおいて非選択分画にて良好な発育を認め、ESBL分画における非特異的な発育は認めなかった。次に、各種耐性菌を用いた検討では、ABL産生菌の1株を除いたすべての株がESBL分画にて発育を認めた。しかし、ESBL産生菌のみならず、ABL産生菌やMBL産生菌も発育するため、ESBL産生菌か否かの判定には確認試験を必要とする。なお、基礎的検討における簡易同定法の菌種の同定精度は97.7%と良好な結果を示した。簡易同定できなかった2菌株の集落はいずれも緑色を呈しており、簡易同定法に当てはまらない色調であった。しかし、このような場合は従来法で同定するという手順になっているため、実際には誤同定とはならない。

日常検査における前向き検討での簡易同定法の同定精度は98.6%であった。千葉県こども病院で検討された大楠のアルゴリズム<sup>5)</sup>の同定精度は98.7%と報告されており、ほぼ同様の結果を示した。今回われわれの提案した簡易同定法は、大楠の報告<sup>5)</sup>で課題に挙げられた *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (P-M-P) グループについて、OIML培地とSIM培地を追加することでこれらの菌群でも鑑別同定ができるように改良を加えた。したがって、大楠のアルゴリズム<sup>5)</sup>は腸内細菌科 (*Salmonella* 属は除外) の12菌種を簡易同定できるのに対して、今回われわれが構築した簡易同定法は14菌種を鑑別することができるため、日常検査における実用性がより高まった。

さらには、簡易同定法と質量分析装置を用いた菌種の同定精度を比較したところ、簡易同定法が98.6% (260/264株) であったのに対して、質量分析法は93.1% (246/264株) であった。実際、腸内細菌科の鑑別は16S rDNA解析においても難しいケースが多く、むしろ生化学的性状に基づいた同定法の方が有用である場合も少なくない<sup>13)</sup>。特に *Enterobacter* sp. の菌種の同定は質量分析法では困難であることが本検討で実証された。一方、本分画培地を用いた簡易同定法は、菌種鑑別のキーとなる生化学的性状を含有していることが、質量分析法を用いた同定よりも高い同定精度が得られた要因であったと考える。よって、近年、日常検査において質量分析法が普及していくなかあって、本分画培地と簡易同定法を用いた菌種の同定は、設備投資や汎用性の側面から鑑みても依然として利用価値が高いことが示唆された。

ESBL産生菌のスクリーニングに関する検討では、従来法でESBL産生菌と判定された20株、全てがESBL分画での発育を認め、基礎的検討の結果と同様、スクリーニング培地としての使用に適していると

考えられた。しかし、ABL産生菌4株もESBL分画で発育を認めた。この4株はいずれも染色体性にABL遺伝子を保有している菌種であるため<sup>14)</sup>、確認試験の結果を踏まえABL遺伝子の過剰発現によるものであると判断した。したがって、本分画培地はESBL産生菌のみを発育支持しているわけではないが、第3世代セファロスポリン系抗生薬に対して耐性を持つ菌に対する選択性は高いと推察された。菌種によって発育する集落の色調が異なるため、ESBL産生菌か否かを推定することができ、日常検査に本分画培地を用いることは十分可能である。つまり、ESBL産生菌は一般的に *E. coli* の占める割合が最も高く<sup>1)</sup>、集落の色調はピンク色である。一方、染色体性にABL遺伝子を保有する *Citrobacter* 属菌や *Enterobacter* 属菌は青色を呈することから菌種の推定のみならず、その耐性機序も想定できるので本分画培地を日常検査に用いる有用性は高い。

ESBL産生の *E. coli* とESBL非産生の *E. coli* が同時に分離された検体を用いた非選択分画とESBL分画におけるESBL産生菌の釣菌確率の調査では、非選択分画における釣菌確率が25%であったのに対し、ESBL分画では100%であった。本事例のように、少量の薬剤耐性菌が混在している場合に見逃すことなく釣菌が可能である。また、薬剤感性菌と耐性菌が同時に存在していた場合でも、その両方を同一の培地で鑑別できることから、薬剤感受性試験の実施においても非常に意義が高い。

現在、同定検査と薬剤感受性検査を同一のプレートにて測定しているが、今後の質量分析装置の普及に伴い、両検査を別々に実施する施設が増加していくことが予想される。質量分析装置を用いた菌種の同定法は、集落を形成後、かつ単一な集落が得られて初めて検査を実施することができる。しかし、複数菌混在しているケースにおいて、検査を実施する集落の選定には経験を要する。また、質量分析装置で耐性菌を鑑別する検討<sup>15)16)</sup>が行われているが、日常検査での実用化にはまだ時間がかかるであろう。一方で、本分画培地を用いた場合は、集落を形成する段階で菌種によって集落の色調が異なるため、初心者でも集落の選定が容易である。さらには、複数菌混在しているケースにおいても、培養翌日に一目で菌種やESBL産生菌の有無を判定することができるため、経験年数の浅い技師でも見逃すことなく検査を実施することが可能である。

今回のわれわれの検討では、同定にかかった費用を従来法と比較して約62%減少させることができた。



大楠の報告<sup>5)</sup>でも、アルゴリズムを用いた検討期間中の同定コストは、生化学的性状に基づいた同定検査キットを使用した従来法と比較し、約70%減少したことを示している。一方、質量分析法は装置自体の価格が約3千万円で、さらに保守点検の費用を含めると高額となるため、導入できる施設は限られる。したがって、費用対効果と簡易同定法の高い同定精度および特殊な機器を必要としないことを踏まえると、今回考案した検査法は様々な施設における日常検査の選択肢の1つとして検討に値するであろう。

今回われわれが注目したCHO/ESBL分画培地は、集落形成の段階で菌種により色調が異なるため、培養翌日に菌種の推定が可能であり、さらには、ESBL分画における発育の有無により薬剤耐性菌の存在を把握することができる。よって、これらの情報を培養の翌日に得られることが、本分画培地の最大の利点である。また、多くの薬剤耐性菌は確認試験の実施のために最終報告まで3~4日を要している。しかし、CHO/ESBL分画培地と簡易同定法を用いた場合の最終報告までの時間は、2~3日となり、早期の結果報告に非常に有益である。すなわち、本手法を含む迅速な検査を活用することによって、適正な抗菌薬治療に必要な情報を検査室からいち早く提供することが可能となり、ひいては早期の感染対策実施に寄与できるものと考えられる。

**謝辞:** 本検討に用いた菌株の分与にご協力を賜りました。第17回近畿耐性菌研究会(代表幹事:和田恭直)に厚く御礼申し上げます。

**利益相反:** 申告すべき利益相反なし

## 文 献

- Nakamura, T., M. Komatsu, K. Yamasaki, et al. 2012. Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical samples in the Kinki Region of Japan. *Am. J. Clin. Pathol.* 137: 620-626.
- 宇賀神和久, 火石あゆみ, 阿南晃子, 他. 2011. 一大学病院におけるESBL産生菌の分離背景. *環境感染誌* 26: 228-233.
- 長野則之, 長野由紀子, 荒川宜親. 2013. 話題の薬剤耐性菌: 新型カルバペネマーゼOXA-48型産生 *Enterobacteriaceae* の出現. *日臨微誌* 23: 175-185.
- 山崎勝利, 小松 方, 福田砂織, 他. 2013. 2011年に臨床材料から分離したプラスミド性AmpC  $\beta$ -lactamase産生腸内細菌の調査. *日臨微誌* 23: 194-202.
- Ohkusu, K. 2000. Cost-effective and rapid presumptive identification of gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4586-4592.
- 坂崎利一. 1978. 培地の試験法. p. 201-210. 新細菌培地学講座(上), 近代出版, 東京.
- Yamasaki, K., M. Komatsu, N. Abe, et al. 2010. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the Kinki region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3267-3273.
- Nishio, H., M. Komatsu, N. Shibata, et al. 2004. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5256-5263.
- Tzelepi, E., P. Giakkoupi, D. Sofianou, et al. 2000. Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 542-546.
- Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, et al. 2006. PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50: 791-795.
- Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, et al. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 53-56.
- Iijima, Y., S. Tanaka, K. Miki, et al. 2007. Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 303-308.
- Bizzini, A., C. Durussel, J. Bille, et al. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1549-1554.
- Livermore, D. M. 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584.
- Burckhardt, I., S. Zimmermann. 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3321-3324.

- 16) Sparbier, K., S. Schubert, U. Weller, et al. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* 50: 927-937.

## Accuracy and Cost-Effectiveness of the CHROMagar Orientation/ESBL medium for Identification and Detection of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing Gram-Negative Bacilli in Comparison to Conventional Methodology and Mass Spectrometry

Asami Nakayama<sup>1)</sup>, Hirofumi Ohtaki<sup>2)</sup>, Kiyofumi Ohkusu<sup>3)</sup>, Jun Yonetamari<sup>1)</sup>, Natsuki Shirai<sup>1)</sup>, Ayumi Niwa<sup>1)</sup>, Hirotohi Ohta<sup>1)</sup>, Nobuyuki Furuta<sup>1)</sup>, Tamayo Watanabe<sup>4)</sup>, Hiroyasu Ito<sup>5)</sup>, Nobuo Murakami<sup>4)</sup>, Mitsuru Seishima<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Clinical Laboratory, Gifu University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Medical Technology, Kansai University of Health Sciences

<sup>3)</sup>Department of Microbiology, Tokyo Medical University

<sup>4)</sup>Center for Nutrition Support & Infection Control, Gifu University Hospital

<sup>5)</sup>Department of Informative Clinical Medicine, Gifu University Graduate School of Medicine

Automated microbiology systems for identification including mass spectrometry are already in widespread use in clinical microbiology. In recent years, advances in technology has allowed laboratorians to select from among the colonies isolated on various media and rapidly identify organisms; however, as clinical specimens often contain a mix of genera, species and clones often possessing resistance markers for antimicrobial agents, the selection of the appropriate colonies from mixed culture for identification and antimicrobial susceptibility testing remains a challenge in clinical microbiology. We evaluated the performance of CHROMagar Orientation (CHO)/ESBL medium which differentiates Gram-negative bacteria based on pigmentation and detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing organisms following overnight incubation. In the initial phase of the study, using ATCC isolates and previously identified clinical isolates, we showed 97.7% (85/87) agreement between CHO/ESBL and conventional methodology. In the prospective study, of the 264 isolates recovered from 207 clinical specimens there was 98.5% agreement (260/264) between CHO/ESBL and conventional methodology which was superior to selection of colonies for mass spectrometry which identified 93.1% (246/264) of the isolates. Of the 20 isolates confirmed to be ESBL-producers, all were detected by the CHO/ESBL differential medium. Operating cost using CHO/ESBL was shown to decrease 62% in comparison to conventional methodology. As CHO/ESBL allows the laboratorian to presumptively identify isolates as well as detect ESBL-producers simultaneously following overnight incubation, this significantly improves workflow thereby supporting earlier selection of the appropriate antimicrobial therapy and implementation of infection control measures.