

[症例報告]

チミジン要求性 *Escherichia coli* Small Colony Variant による小児の急性腎盂腎炎

高橋尚子¹⁾・樋口 徹²⁾・伊藤健太²⁾・早川 登¹⁾

¹⁾ あいち小児保健医療総合センター中央検査部

²⁾ あいち小児保健医療総合センター総合診療部

(令和3年11月2日受付, 令和4年3月28日受理)

腎盂腎炎の小児患者の尿から, *Escherichia coli* Small Colony Variant (SCV) が分離された。尿のグラム染色ではグラム陰性桿菌が観察され, Cefotaxime による治療を開始した。培養検査ではマッコンキー寒天培地に小型コロニーの発育が認められ, 腸内細菌用パネルを用いた同定・薬剤感受性検査では被験菌の発育は認められなかった。同パネルと *Haemophilus* 属菌用ブロスを用いた検査では被験菌の発育を認め, *E. coli* と同定された。薬剤感受性検査の結果, Ampicillin (ABPC) に対する MIC は 8 µg/mL 以下であった。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法でも同菌と同定され, 抗菌薬を ABPC に de-escalation した。被験菌は発育にチミジンを要求した。栄養豊富な培地を用いることで, 参考値として SCVs の MIC を報告できる可能性がある。

Key words: *Escherichia coli*, Small Colony Variant (SCV)

序 文

Small Colony Variants (SCVs) は, その菌種の通常型に比べて発育が遅く, 小型のコロニーを形成する細菌の亜集団の総称である。臨床検体からの分離例は *Staphylococcus aureus*^{1)~4)} についての報告が多いが, *Escherichia coli*^{5)~9)}, *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁾, *Serratia marcescens*¹¹⁾ 等様々な菌種においても報告がなされている。SCVs は嚢胞性線維症¹⁾²⁾, 気管支拡張症¹⁰⁾, 再発性膀胱炎⁷⁾, 慢性人工股関節炎⁹⁾ 等で長期間または頻回の抗菌薬投与を受けた患者の喀痰, 尿, 膿瘍, 血液等からの分離が報告されており, 持続性, 再発性の感染症の原因になると考えられている。また, SCVs は発育に様々な条件を要求し, 生化学性状も典型的でないため, 分離・同定・薬剤感受性検査が困難となることがある¹⁾。

E. coli は, 腸内細菌目に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で, 小児腎盂腎炎の起因菌の大部分を占める。通常普通寒天培地に良好に発育し, 薬剤感受性検査を行う際は, ミュラーヒントン寒天培地 (MHA) またはミュラーヒントンプロス (MHB) が用いられる¹²⁾。

今回我々は, 腎盂腎炎の小児患者の尿から, MHA, MHB に発育せず, 発育にチミジンを要求する *E. coli* SCV を分離したので報告する。

症 例

患者: 1歳3か月, 女児

主訴: 発熱

既往歴: 左完全重複腎盂尿管, 左異所開口尿管(尿道開口), 複数回の尿路感染症既往があり, Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST) 合剤を予防内服中であった。

現病歴: X-2日から発熱し, X-1日に当院救急外来を受診したが, 膿尿なく他にも明らかな熱源がなかったため帰宅となった。発熱が続いたため X 日に再度当院救急外来を受診した。

入院時身体所見: 体重 9.5 kg, 脈拍数 148 回/分, 呼吸数 32 回/分, 体温 40.9℃, 血圧 114/87 mmHg, SpO₂ 96% (室内気), 顔色はよいがぐったり, 眼瞼結膜充血なし, 咽頭発赤なし, 頸部リンパ節腫脹なし, 肺音清明で左右差なし, 腹部平坦・軟・圧痛なし, 腸蠕動音良好, 皮膚異常所見なし。

入院時の血液, 尿検査所見を Table 1 に示す。白血球数 8,660/µL, CRP 19.9 mg/dL と炎症反応の上昇が認められ, 尿沈渣で白血球数 15,324/µL と膿尿が認められた。尿のグラム染色でグラム陰性桿菌が観察され, エコー検査で左腎盂に debris が認められたことから, 腎盂腎炎及び膿腎症と診断され Cefotaxime による治療を開始し入院となった。培養検査では X+1 日に平板培地上に小型コロニーの発育が認められたが, 腸内細菌用パネルを用いた同定・薬剤感受性検査では被験菌の発育は認められなかった。SCV を疑い, *Haemophilus* 属菌用ブロスを使用して行った同定・薬剤感受性検査では被験菌の発育が認められ, *E. coli* と同定された。Ampicillin (ABPC) に対する MIC は 8 µg/mL 以下であった。X+3 日に解熱し, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) でも同菌と同定されたため, 抗菌薬を ABPC に de-escalation した。X+7 日に行ったエコー検査で debris の減少が確認され, Amoxicillin

著者連絡先: (〒474-8710) 愛知県大府市森岡町七丁目 426 番地
あいち小児保健医療総合センター中央検査部
高橋尚子
TEL: 0562-43-0500(内線 1215)
FAX: 0562-43-0504
E-mail: naoko_takahashi@sk00106.achmc.pref.aichi.jp

Table 1. Laboratory findings on admission

Hematology	
WBC	8,660 / μ L
Neutrophil	18 %
Lymphocyte	68 %
Monocyte	14 %
Hemoglobin	11.2 g/dL
Platelet	37.5×10^3 / μ L
Biochemistry	
TP	6.8 g/dL
Albumin	4.2 g/dL
BUN	7.0 mg/dL
Creatinine	0.26 mg/dL
AST	30 U/L
ALT	12 U/L
LD	163 U/L
Na	134 mEq/L
K	3.8 mEq/L
Cl	101 mEq/L
CRP	19.90 mg/dL
Urinalysis (Bag urine)	
Nitrate	—
WBC	3+
Ketone body	—
Urinary sediment (Bag urine)	
WBC	15,324 / μ L
RBC	311.6 / μ L
Bacteria	±

WBC, White blood cell; TP, Total protein; BUN, Blood urea nitrogen; AST, L-aspartate aminotransferase; ALT, L-alanine aminotransferase; LD, Lactate dehydrogenase; CRP, C-reactive protein; RBC, Red blood cell

(AMPC) 内服へ変更して退院となった。debris が残存していたことと、既往疾患に対する手術が退院の 14 日後に予定されていたことから、AMPC の内服期間は 15 日間とした。

細菌学的検査所見

1. 顕微鏡学的検査

提出された尿検体を、フェイバー G「ニッスイ」(日水製薬)を用いてグラム染色を実施した所見を Figure 1 に示す。腸内細菌を疑う形態のグラム陰性桿菌が認められ、白血球による貪食像が観察された。

2. 培養検査

尿検体を 5% 羊血液寒天培地 (栄研化学) とマッコンキー寒天培地 (日本 BD) に画線塗抹し、好気環境下で 35℃, 18 時間培養した結果、 10^5 CFU/mL のコロニーが生育した。5% 羊血液寒天培地上のコロニーは直径 0.2~1.0 mm 程度で大小不同、マッコンキー寒天培地上のコロニーは直径 2.0~3.0 mm 程度で半透明であった。生育コロニーのグラム染色では、マッコンキー寒天培地上のコロニーは腸内細菌様のグラム陰性桿菌であったが、5% 羊血液寒天培地上のコロニーは菌体が膨張、伸長していた (Figure 2)。

追加検査として、被験菌を普通寒天培地 (日水製薬)、5%

羊血液寒天培地、マッコンキー寒天培地、ヘモフィルス ID4 分画培地 (日本 BD)、MHA (栄研化学)、MHB (極東製薬)、Haemophilus test medium broth (HTMB, ベックマン・コールター・ジャパン)、Lysed horse blood broth (LHBB, ベックマン・コールター・ジャパン) に接種し、それぞれ好気環境下と 5%CO₂環境下で 35℃, 48 時間培養した。その結果、普通寒天培地、5% 羊血液寒天培地、マッコンキー寒天培地、ヘモフィルス ID4 分画培地のすべての分画、HTMB で発育を認め、発育状態はそれぞれの培養環境の間に差がなかった。MHA, MHB, LHBB では何れの環境でも発育しなかった。

3. 生化学性状による同定検査・薬剤感受性検査

マッコンキー寒天培地から分離された被験菌を TSI 寒天培地 (栄研化学)、SIM 培地 (栄研化学) に接種し好気環境下、35℃ で培養したところ、培養 6 時間後に TSI 寒天培地の高層部及び斜面部がわずかに黄変し、腸内細菌目細菌が疑われた。培養 18 時間後に SIM 培地を観察した結果、運動性陽性、ガス産生能陽性であった。

純培養した被験菌を McFarland 0.5 と同等に濁度調整して菌液を作製し、100 μ L を希釈水 (ベックマン・コールター・ジャパン) に添加して Neg Combo EN2J パネル (ベックマン・コールター・ジャパン) に接種した。MicroScan Walkaway 40 plus (ベックマン・コールター・ジャパン) による同定・薬剤感受性検査を行った結果、24 時間培養後にグロースウェルでの発育を認めず、発育不良と判定された。*E. coli* ATCC 25922 を用いた同ロットの Neg Combo EN2J パネルの精度管理測定では、同定・薬剤感受性検査結果ともに精度管理限界値内であった。

次に同様に濁度調整した菌液 100 μ L を、HTMB, LHBB にそれぞれ添加し、Neg Combo EN2J パネルに接種して好気環境下で 35℃, 18 時間培養したところ、HTMB を用いたパネルのグロースウェルに発育が認められた。HTMB が黄色に色づいているため自動判定はできず、生化学性状、MIC を目視で判定した (Table 2, Table 3)。生化学性状をシステムに入力した結果、*E. coli* (97.88%), *Salmonella* Paratyphi A (2.12%) と同定された。LHBB を用いたパネルのグロースウェルには発育が認められなかった。

4. 質量分析法による同定検査

MALDI-TOF MS による同定検査を行った。純培養した被験菌を、セルスメア法を用いて MALDI バイオタイパシシステム (Bruker) で測定し同定した。データベースはバージョン 8.0.0.0 を使用した。スコアが高い順に 1 から 10 番目まで候補が挙げられ、全てスコア 2.00 以上で *E. coli* であった。MALDI-TOF MS では *Shigella* spp. と *E. coli* を区別して同定できないが、運動性陽性、ガス産生能陽性であったことから、被験菌は *E. coli* と同定された。

5. チミジンを添加した培地での発育・生化学性状・薬剤感受性検査

追加検査として、被験菌のチミジン要求性を調査した。チミジン (関東化学) の 100 μ g/mL 水溶液を作製し、McFarland 0.5 と同等に濁度調整した被験菌液を全面に塗布した MHA に直径 5 mm の濾紙を置いて、その濾紙にチミジン液を約 1 μ L を滴下し好気環境下で 35℃, 18 時間培養した結果、チミジン液を滴下した濾紙周辺にのみコロニーの形成が認められ

た (Figure 3)。

100 $\mu\text{g/mL}$ チミジン液を MHB で段階希釈して 10^{-6} ~ 10^{-10} $\mu\text{g/mL}$ の溶液を調製した。希釈系列にそれぞれ最終濃度が 5×10^5 CFU/mL になるように被験菌液を加えて好気環境下で 35°C , 18 時間培養した。対照として, *E. coli* ATCC 25922 を 5×10^5 CFU/mL になるように MHB に加え, 同条件で培養した。培養後, それぞれの MHB をボルテックスミキサーで混和し, mini photo 2000s (日本製薬) で 620 nm の波長における吸光度を測定した。それぞれのチミジン濃度における MHB の吸光度を Table 4 に示す。チミジン濃度が 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$ の場合に最も吸光度が高く, 被験菌の発育が良好であった。

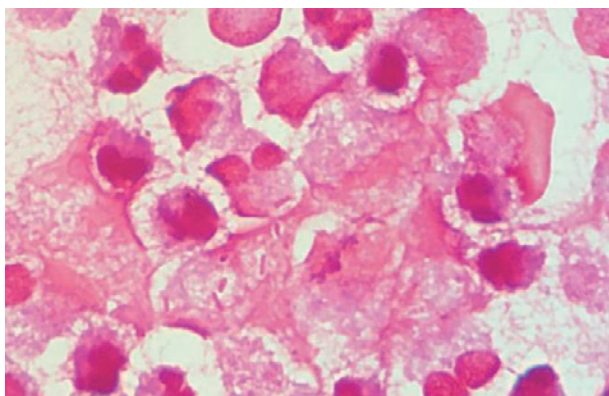


Figure 1. Urinary Gram stain showing gram-negative rods ($\times 1,000$)

予めチミジンを 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した希釈水に McFarland 0.5 と同等に濁度調整した被験菌液 100 μL を加え, Neg Combo EN2J パネルに接種して MicroScan Walk-away 40 plus による同定・薬剤感受性検査を実施した結果, グロースウェルに発育が認められ, 生化学性状, MIC が自動判定された (Table 2, Table 3)。同定結果は *E. coli* (99.99%) であった。

同様の手順で, 10^{-1} $\mu\text{g/mL}$ チミジン加希釈水を用いて *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 を Pos Combo 1J パネルに接種し ST 合剤の薬剤感受性検査を実施した結果, ST 合剤に対する MIC は $2/38$ $\mu\text{g/mL}$ より高値であり, 精度管理限界値 (0.5/9.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下) の範囲外であった。

考 察

今回我々は, 検出された *E. coli* SCV を希釈水を用いて Neg Combo EN2J パネルに接種して行った同定・薬剤感受性検査が発育不良により判定不能となったため, HTMB を用いて同パネルに接種し結果を得た。同定検査に用いたデータベースは, 菌種が既知の菌株を希釈水を用いて同パネルに接種した場合の各生化学性状の陽性率をもとに作成されており, HTMB を用いた場合の同定結果は妥当性が確認できないため, MALDI-TOF MS による追加検査で *E. coli* と同定し, 3 日後に同定菌名を報告した。また, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドラインは *E. coli* の薬剤感受性検査を微量液体希釈法で行う場合は MHB を用いるよう示していることから¹²⁾, HTMB を用いて得られた MIC は参考値とし, 菌名と同時に報告した。

本症例では, HTMB を用いた薬剤感受性検査により得ら

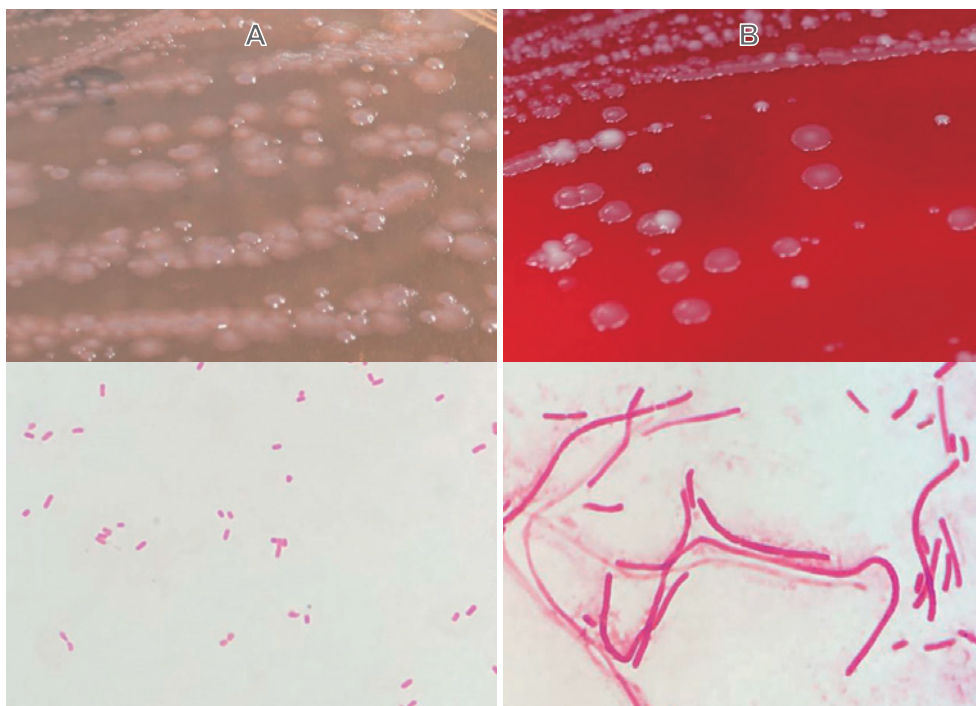


Figure 2. Colonies and microscopic morphology using gram staining of *E. coli* SCV in different media ($\times 1,000$)
A: MacConkey agar incubated for 18 h, B: 5% sheep blood agar incubated for 18 h

Table 2. Biochemical reactions of *E. coli* SCV

Biochemical tests	Medium	MHB + HTMB	MHB + thymidine
		reactions	reactions
Glucose fermentation		+	+
Sucrose fermentation		+	+
Sorbitol fermentation		+	+
Raffinose fermentation		—	—
Rhamnose fermentation		+	+
Arabinose fermentation		+	+
Inositol fermentation		—	+
Adonitol fermentation		—	+
Melibiose fermentation		—	—
Urea hydrolysis		—	—
H ₂ S production		—	—
Indole production		+	+
Lysine decarboxylase		+	+
Arginine decarboxylase		+	—
Ornithine decarboxylase		+	+
Tryptophan deaminase		—	—
Esculin hydrolysis		—	—
Voges-Proskauer Test		—	—
Citrate utilization		—	—
Malonate utilization		—	—
β-galactosidase		—	+
Resistance for Colistin, MIC >4 μg/mL		—	—
Resistance for Cefalothin, MIC >8 μg/mL		—	—
Oxidase		—	—

MHB, Mueller-Hinton broth; HTMB, Haemophilus test medium broth

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of *E. coli* SCV

Antimicrobial agent	Medium	MHB + HTMB	MHB + thymidine
		MIC (μg/mL)	MIC (μg/mL)
Ampicillin		≤8	≤8
Ampicillin/sulbactam		≤8/4	≤8/4
Amoxicillin/clavulanic acid		≤8/4	≤8/4
Piperacillin/tazobactam		≤8/8	≤8/8
Cefazolin		≤2	≤2
Cefotiam		≤8	≤8
Cefotaxime		≤1	≤1
Ceftazidime		≤1	≤1
Cefepime		≤2	≤2
Cefaclor		≤8	≤8
Cefpodoxime		≤2	≤2
Cefmetazole		≤16	≤16
Aztreonam		≤4	≤4
Imipenem		≤1	≤1
Meropenem		≤0.25	≤0.25
Gentamicin		≤2	≤2
Amikacin		≤8	≤8
Minocycline		≤4	≤4
Fosfomycin		≤4	≤4
Sulfamethoxazole/trimethoprim		≤2/38	>2/38
Ciprofloxacin		≤1	≤1
Levofloxacin		≤0.12	≤0.12
Tigecycline		≤1	≤1

MHB, Mueller-Hinton broth; HTMB, Haemophilus test medium broth

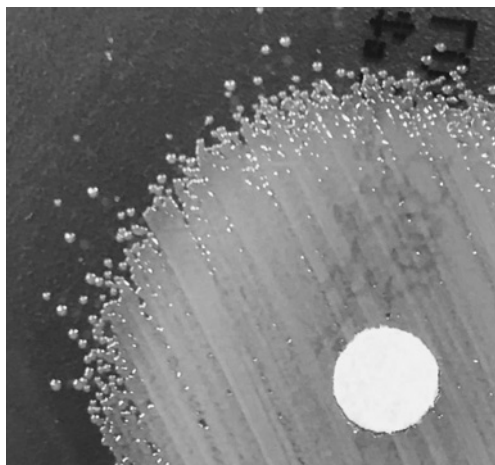


Figure 3. *E. coli* SCV in Mueller Hinton agar showing growth only around a thymidine-containing disc

れた MIC を参考値として報告した。その際検査室から主治医には、分離された *E. coli* は CLSI ガイドラインに準拠した方法では結果が得られず、妥当性が確認されていない方法を用いて MIC が得られた経緯を説明し、報告結果が参考値である了承が得られた上で今後の治療方針を決定した。ガイドラインから逸脱した方法で得られた MIC を参考に抗菌薬を選択した場合、主治医は慎重に治療効果を判定する必要があるため、SCV 症例においては検査室と診療科との情報共有が重要である。

E. coli SCVs にはヘミン⁹⁾、チミジン⁶⁾⁷⁾、CO₂⁵⁾⁸⁾等に依存して増殖を示す株が報告されている。今回我々は、被験菌がヘモフィルス ID4 分画培地のヘミンを含まない分画に発育したこと、好気環境下と 5%CO₂環境下で発育状況に差がなかったこと、MHA、MHB に発育しなかったことからチミジン要求性 *E. coli* SCV を疑った。また、チミジン要求性 *S. aureus* SCVs は、特に嚢胞性線維症で感染抑制のために ST 合剤の長期投与を受けた患者から検出されるとの報告¹⁾²⁾や、膀胱炎を繰り返し、そのたびに ST 合剤で治療を受けていた患者の尿からチミジン要求性 *E. coli* SCV が検出されたとの報告⁷⁾があるため、患者が ST 合剤を予防内服していた本症例では、チミジン要求性 *E. coli* SCV が疑われた。

腸内細菌の培養に使用する多くの培地には窒素源としてペプトンが添加されており、今回使用した 5% 羊血液寒天培地には 10 g/L、マッコンキー寒天培地には 20 g/L のペプトンが含まれていた。一方、MHA、MHB には窒素源としてカザミノ酸が添加されている。ペプトンは蛋白質を酵素で加水分解することで得られチミジンを含むが、カザミノ酸は蛋白質を酸で加水分解することで得られ、その処理の過程でチミジンが失われる¹³⁾。チミジンは DNA の構成要素であり、一般細菌の多くはチミジンを合成できるため MHA、MHB に発育するが³⁾、被験菌はチミジンを合成できないため、MHA、MHB に発育しなかったのだと考えられた。また、チミジン要求性 *S. aureus* SCV は細胞分裂の障害によって細胞が膨化し、グラム染色で観察すると多形性の球菌を示すが、チミジンを添加し培養することでこの変化は見られなくなるとの

Table 4. Growth of *E. coli* SCV in Mueller Hinton broth containing thymidine at 10⁻⁶-10 µg/mL

Organisms	Thymidine (µg/mL)	OD at 620 nm
<i>E. coli</i> SCV	0	0.00
	10 ⁻⁶	0.01
	10 ⁻⁵	0.09
	10 ⁻⁴	0.13
	10 ⁻³	0.37
	10 ⁻²	0.41
	10 ⁻¹	0.44
	1	0.35
	10	0.22
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0.42

OD, Optical density

報告がある¹⁾。5% 羊血液寒天培地上とマッコンキー寒天培地上で発育コロニーのグラム染色所見が異なっていたことについては、培地のチミジン含有量の違いが関係しているのではないかと考えられた。

薬剤感受性検査に使用した MHB、HTMB、LHBB のうち、被験菌が発育可能であったのは HTMB のみであった。MHB は牛肉エキス、カザミノ酸、スターチを含み、HTMB は MHB に酵母エキス、ヘマチン、NAD を添加したものである。牛肉エキスと酵母エキスがチミジンを含むため¹³⁾、HTMB 中のチミジンが被験菌が発育可能な濃度にまで達したのだと考えられた。LHBB は MHB にウマ溶血液を添加したものであるが、ウマ溶血液はチミジンホスホリラーゼと呼ばれる酵素を含み、この酵素は培地中のチミジンを分解するため¹⁴⁾、LHBB には被験菌が発育しなかったのだと考えられた。

HTMB を用いて薬剤感受性検査を行った際、被験菌の ST 合剤に対する MIC は 2/38 µg/mL 以下であったが、最も被験菌の発育が良好であった 10⁻¹ µg/mL のチミジンを添加して薬剤感受性検査を行った結果、ST 合剤に対する MIC は 2/38 µg/mL より高値であった。CLSI ガイドラインは、チミジン含有濃度の高い培地は ST 合剤の偽耐性の原因となりうるため、薬剤感受性検査に使用する培地の適合性を *E. faecalis* ATCC 29212 を用いて評価すべきとしている¹²⁾。そこで同濃度のチミジンを添加して *E. faecalis* ATCC 29212 の薬剤感受性検査を実施したところ、ST 合剤に対する MIC は 2/38 µg/mL より高値であり、精度管理限界値の範囲外であった。よってチミジンを添加した場合に被験菌の ST 合剤の MIC が高値を示したのは偽耐性の可能性があるといえる。ST 合剤の作用機序は細菌のテトラヒドロ葉酸の合成の障害であり、テトラヒドロ葉酸にはウラシルからチミジンへの変換を行うチミジル酸合成酵素に対する補因子としての機能がある。このため、ST 合剤によってテトラヒドロ葉酸の合成が阻害されると、DNA の構成要素であるチミジンの合成が阻害され、細菌の増殖が抑制される³⁾。このことから、チミジンを細胞外から取り込む被験菌は ST 合剤の作用を受けにくいと考えられる。よって被験菌は ST 合剤耐性とみなすべきと考え、ST 合剤の MIC を 2/38 µg/mL 以下から 2/38 µg/mL より高値と訂正し報告した。

CLSI ガイドラインは、*E. coli* や *S. aureus* 等多くの菌種について薬剤感受性検査に MHA, MHB を用いるよう指定しているが¹²⁾、チミジン要求性 SCVs は MHA, MHB に発育せず、ガイドラインに準拠した方法では検査できない。本症例では、HTMB を用いてパネルに接種し *E. coli* SCV の薬剤感受性検査を行い、チミジン要求性が判明した後に MHB にチミジンを添加して再検査した。これまでに、チミジン要求性 *E. coli* SCVs については、培地にチミジンを添加して微量液体希釈法で MIC を測定し、CLSI ガイドラインの基準を用いて薬剤感受性を判定したことに加え、ガイドラインに記載の Extended-Spectrum- β -Lactamases (ESBLs) 産生菌の確認検査を 5% 羊血液加 HMA を用いてディスク拡散法で行い、ESBL 産生菌であることを確認したとの報告がある⁷⁾。また、チミジン要求性 *S. aureus* SCVs については、国内で販売されている Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) スクリーニング培地の有用性が検討されており、多くのメーカーの培地にチミジン要求性 MRSA SCVs は発育しなかったが、チミジンを添加した改良スクリーニング培地を調整し検討したところ、チミジン要求性 MRSA SCVs を検出できたとの報告がある³⁾。チミジン要求性 SCVs の薬剤感受性検査は、培地にチミジンを添加する、または発育可能な培地で代替するなどの方法で実施できる場合がある。

今回我々はチミジン要求性 *E. coli* SCV による小児の腎盂腎炎を経験した。SCVs は生化学性状が非典型的で検査が困難となることが多いが、持続性や再発性の感染症の原因となりうるため正確な菌名と薬剤感受性結果を得ることが望ましい。SCVs の迅速な菌名同定には MALDI-TOF MS が有用である可能性がある。SCVs が MHA, MHB に発育しない場合、栄養豊富な培地を用いて薬剤感受性検査を行うことで参考値として MIC を報告できる場合がある。ただし MIC から薬剤感受性を解釈する際には注意が必要であり、SCVs の発育条件を検討し、その情報を検査室と診療科との間で十分に共有した上で、慎重に抗菌薬の治療効果を判定する必要がある。

謝辞：菌名の同定にご協力いただきました半田市医師会健康管理センターの皆様に深く感謝いたします。

文 献

- Proctor, R.A, C von Eiff, B.C. Kahl, et al. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4: 295-305.
- Besier, S, J Zander, E Siegel, et al. 2008. Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants: Human Pathogens That Are Relevant Not Only in Cases of Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Clin Microbiol* 46: 3829-3832.
- 松本竹久, 堀内一樹, 根岸達哉. 2016. *Staphylococcus aureus* の small-colony variants. *日臨微誌* 26: 1-10.
- 谷本綾子, 藤原弘光, 田仲祐子, 他. 2005. 見逃されやすいチミジン依存性 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の性状. *日臨微誌* 15: 179-186.
- 高見沢将, 松本竹久, 中村宏信, 他. 2014. 血液培養から CO₂ 要求性 *Escherichia coli* が分離された 1 症例. *日臨微誌* 24: 29-35.
- Negishi, T, T Matsumoto, K Horiuchi, et al. 2018. Characterization of clinically isolated thymidine-dependent small colony variants of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase. *J Med Microbiol* 67: 33-39.
- Nagano, N, Y Kawakami, T Matsumoto, et al. 2020. Isolation of thymidine-dependent and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* small-colony variant from urine of a septuagenarian female patient with recurrent cystitis: A case report with genetic investigation. *J Infect Chemother* 26: 1066-1069.
- Park, YJ, N Le Phuong, NA Pinto, et al. 2018. Urinary tract infection caused by a small colony variant form of capnophilic *Escherichia coli* leading to misidentification and non-reactions in antimicrobial susceptibility tests. *Antimicrob Resist Infect Control* 7: 139.
- Roggenkamp, A, A Sing, M Hornef, et al. 1998. Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 36: 2530-2534.
- 永野夏海, 中矢秀雄, 夏目聖子, 他. 2018. 血液培養から *Pseudomonas aeruginosa* のヘミン要求性 Small Colony Variant を検出した 1 症例. *医学検査* 67: 99-104.
- 太田悠介, 松本竹久, 春日恵理子, 他. 2015. アスペルギローマ患者の喀痰及び肺組織より *Serratia marcescens* の Small-Colony Variant を検出した 1 症例. *日臨微誌* 25: 125-130.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31th Edition. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSIM100ED31:2021&scope=user> 2021 年 11 月 2 日現在.
- 日本ベクトン・ディッキンソン. 1995. BD BBL 培地マニュアル, (坂崎利一監修), 近代出版, 京都.
- Ferone, R, SR Bushby, JJ Burchall, et al. 1975. Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrob Agents Chemother* 7: 91-98.

Acute pyelonephritis in a pediatric patient caused by thymidine-requiring Small Colony Variant of *Escherichia coli*

Naoko Takahashi¹⁾, Toru Higuchi²⁾, Kenta Ito²⁾, Noboru Hayakawa¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Aichi Children's Health and Medical Center

²⁾Department of General Pediatrics, Aichi Children's Health and Medical Center

A Small Colony Variant (SCV) of *Escherichia coli* was isolated from the urine of a pediatric patient with acute pyelonephritis. Gram-negative rods phagocytosed by neutrophils were identified on urine Gram stain. The patient was initiated on cefotaxime. The urine culture yielded small, flat colonies formed on sheep blood agar and MacConkey agar after 18 hours of incubation. The isolate was inoculated into a test panel for *Enterobacterales* and was examined using a microbial identification and susceptibility system. However, the isolate did not grow in the controlled medium, invalidating the test. The isolate was suspected to be an SCV. Therefore, it was diluted with the broth for *Haemophilus* spp. susceptibility testing and inoculated into the same panel. Growth was observed, and the isolate was identified as *E. coli*. The MIC of ampicillin (ABPC) was 8 µg/mL or less. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) also identified the isolate as *E. coli*. Thus, the patient treatment was de-escalated to ABPC. Additional testing showed that the isolate required thymidine for growth. The use of nutrient-rich media may narrow down the MIC range for SCVs to be reported as a reference value. MALDI-TOF MS may be useful for the rapid identification of SCVs.