

[原 著]

血液培養陽性ボトルを用いたグラム陰性桿菌の直接薬剤感受性検査に関する検討

上地幸平・高橋安実・下地真里有・与儀翔平・上地あゆみ・前田士郎

琉球大学病院検査・輸血部

(令和4年4月14日受付, 令和4年7月19日受理)

適切な感染症治療を行うためには迅速かつ正確な薬剤感受性検査が必要不可欠である。今回, グラム陰性桿菌による血流感染症症例における薬剤感受性検査の結果報告時間の短縮を目的として血液培養ボトルからの直接薬剤感受性検査の検討を行った。対象は *Escherichia coli* 等の標準菌株8株と薬剤耐性遺伝子既知のグラム陰性桿菌20株を接種した疑似血液培養検体28件および臨床検体75件の計103件とした。血液培養陽性検体の前処理には赤血球溶解と遠心分離を行い, 薬剤感受性検査は微生物分類同定・感受性分析装置(VITEK® 2, bioMérieux)を用いて実施した。直接薬剤感受性検査における ± 1 管差以内の Essential agreement は97.8%, Category agreement は97.5%, Very major error 0.5%, Major Error 0%, Minor error 2.0%であり, 検査所要時間(中央値)は10.9時間(最短:6.0時間, 最長:18.7時間)であった。VITEK® 2を用いた直接薬剤感受性検査は迅速性および正確性に優れており, 抗菌薬適正使用に貢献できると考えられた。

Key words: 血液培養, グラム陰性桿菌, 迅速検査, 直接薬剤感受性検査(Direct-antimicrobial susceptibility testing : D-AST)

序 文

血流感染症(Bloodstream infection : BSI)では敗血症性ショックを呈することも多く, そのような症例では適切な治療を伴わない場合, 死亡率が高く, 予後不良である¹⁾。よって, 血液培養検査によってBSIの原因微生物を迅速に同定し, 薬剤感受性結果から適切な抗菌薬を選択することが重要であるが, 培養法を基にした薬剤感受性検査は結果を得るまでに2~3日間を要する²⁾。近年, 質量分析装置や全自動遺伝子検査装置を用いて, 血液培養陽性ボトルから直接, 菌種を同定し薬剤耐性遺伝子を検出することで, 結果報告時間の短縮, さらに抗菌薬適正使用支援チーム(Antimicrobial stewardship team : AST)の介入により抗菌薬適正使用に貢献することが報告されている^{3,4)}。しかし, 薬剤耐性機序が複雑なグラム陰性菌では基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(Extended-spectrum β -lactamase : ESBL)等, 既知の薬剤耐性遺伝子が未検出の場合であっても各種抗菌薬に対する感受性が高いとはいえ, 最終的な薬剤感受性結果が必要不可欠である。さらに, 直接薬剤感受性検査の有用性については, これまでに海外からは複数報告されているが, 本邦からの報告は少ないのが現状である^{5)~8)}。

今回, 我々はグラム陰性桿菌によるBSI症例を対象として, 血液培養陽性ボトルからの直接薬剤感受性検査(Direct-Antimicrobial susceptibility testing : D-AST)の検討を行っ

たので報告する。

対象と方法

1. 材料

標準菌株8株および全ゲノム解析により薬剤耐性遺伝子既知のグラム陰性桿菌(凍結保存菌株)20株を用いて作製した疑似血液培養検体28件, 2021年1月から12月の期間に当院検査・輸血部に提出された, 患者由来の血液培養検体のうち, 陽転後, グラム染色にてグラム陰性桿菌が確認された検体75件の計103件を対象とした(Table 1)。疑似血液培養検体はFA Plus培養ボトル(bioMérieux)に照射赤血球液-LR「日赤」5 mLと約100 CFU/mLに調整した標準菌株もしくは遺伝子型既知のグラム陰性桿菌の菌液1 mLを接種し, 作製した。また, 患者由来の血液培養検体は1名の患者で複数セット陽性となった場合, FA PlusもしくはFN Plus培養ボトル等, ボトルの種類に関わらず, 最初に陽性に転じた血液培養ボトルの培養液を用いた。

2. 血液培養陽性ボトルからの菌液調整

疑似血液培養検体および患者由来の血液培養検体は全自動血液培養装置BACT/ALERT® VIRTUO® (bioMérieux)を用いて培養した。平日日中に陽転した血液培養検体は微生物検査技師がグラム染色等の処理の後に菌液調整を行ったが, 夜間・休日に陽転した検体は翌朝以降, 微生物検査技師が勤務する時間帯に菌液調整を行った。

菌液調整は以下の手順で行った。①血液培養陽性ボトルから培養液1 mLをマイクロチューブに移し, Lysis buffer [rapid BACpro® II, Reagent 1 (Nittobo)] 500 μ L/tubeを添加し, ボルテックスミキサーで混和後, 低速遠心機を用いて3分間遠心分離した。②上清を除去し, 沈査に1 mLの滅菌蒸留水を添加, ボルテックスミキサーにて懸濁後, 低速遠

著者連絡先 : (〒903-0215) 沖縄県中頭郡西原町字上原 207
琉球大学病院検査・輸血部
上地幸平
TEL: 098-895-3331(内線 3332)
FAX: 098-895-1463
E-mail: uechi21@med.u-ryukyu.ac.jp

Table 1. A list of clinical blood culture specimens and storage strains

Species	ATCC No.	n	Drug-resistant enzymes
Storage strains (ATCC strains)			
<i>E. coli</i>	25922	1	none
<i>K. aerogenes</i>	13048	1	none
<i>K. pneumoniae</i>	700603	1	SHV-12
	BAA-1705	1	KPC-2
	BAA-1706	1	none
	BAA-2146	1	NDM-1
<i>A. baumannii</i>	19606	1	OXA-51
<i>P. aeruginosa</i>	27853	1	none
Storage strains (clinical isolates)			
<i>E. cloacae</i>		2	CTX-M-1 (1), IMP-1 (1)
<i>E. coli</i>		3	TEM-1 and OXA-10 (1), TEM-1 and CMY-2 (1), IMP-6 (1)
<i>K. pneumoniae</i>		4	none (1), SHV-15 (1), TEM-1, SHV-15 and CTX-M-15 (1), DHA-1 (1)
<i>S. marcescens</i>		1	GES-5
<i>A. baumannii</i>		3	OXA-51 (1), OXA-23 and OXA-69 (1), OXA-69 (ISAba1 positive) (1)
<i>A. nosocomialis</i>		2	none (1), IMP-14 (1)
<i>P. aeruginosa</i>		5	none (2), GES-5 (1), IMP-1 (1), IMP-6 (1)
Blood culture specimens (clinical isolates)			
<i>C. freundii</i> complex		1	AmpC β -lactamase hyperproducer
<i>E. cloacae</i> complex		5	None (4), AmpC β -lactamase hyperproducer (1)
<i>E. coli</i>		15	CTX-M-9 group (4)
<i>K. aerogenes</i>		4	none (2), AmpC β -lactamase hyperproducer (2)
<i>K. oxytoca</i>		4	none (4)
<i>K. pneumoniae</i>		16	none (12), CTX-M-1 group (4)
<i>P. mirabilis</i>		4	none (4)
<i>S. marcescens</i>		5	none (5)
<i>A. baumannii</i> complex		7	none (7)
<i>P. aeruginosa</i>		14	none (14)

心機にて1分間遠心分離した。③上清除去後の沈査に0.45%滅菌生理食塩水を加え、菌濃度 McFaland No. 0.5 に調整し、被検菌液とした。

3. 薬剤感受性検査および耐性菌検査

D-ASTは微生物分類同定・感受性分析装置 VITEK[®] 2 (bioMérieux) と AST-N404 カードを用いた。参照法とした菌集落からの薬剤感受性検査は VITEK[®] 2 で AST-N404 カード (*Enterobacteriales*, *Acinetobacter* species), AST-N309 カード (*Pseudomonas* species) を用いて行った。カテゴリ判定は CLSI M100-ED29 に準拠して行った⁹⁾。ESBL 産生の有無は clavulanic acid/amoxicillin および cefpodoxime (CPDX) (もしくは cefpirome), cefotaxime, ceftazidime (CAZ), aztreonam ディスク (栄研化学) を用いた Double-disk synergy test で, AmpC β -lactamase 産生は CPDX および cefmetazole (CMZ) ディスク (栄研化学) を用い, m-Aminophenylboronic Acid (50 mg/mL, Wako) と Cloxacillin sodium salt monohydrate (125 mg/mL, SIGMA) による阻害試験で, カルバペネマーゼ産生は modified Carbapenem inactivation method (mCIM) (*Enterobacteriales*) および CIMTris (Nonfermenting GNR) にて判定した¹⁰⁾¹¹⁾。また, 薬剤耐性遺伝子は特異的プライマーを用いた PCR 法により同定した¹⁰⁾。

4. 解析項目

D-AST の ± 1 管差以内の MIC の一致率 (Essential agreement : EA) は 13 薬剤 [ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), ceftriaxone (CTRX), CAZ, cefepime (CFPM), CMZ, imipenem (IPM), meropenem (MEPM), sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), amikacin (AMK), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CPFX)] について検討した。Category agreement (CA), Very major error (VME), Major error (ME), Minor error (MiE) の判定は, 抗菌薬の濃度設定の問題から VITEK[®] 2 AST N-404 カードではカテゴリ判定ができない CEZ を除く 12 薬剤について行った。VME は参照法が耐性で D-AST が感性, ME は参照法が感性で D-AST が耐性, MiE は参照法および D-AST のいずれか一方が中間, もう一方が感性または耐性の場合とした。CFPM のカテゴリ判定における用量依存的感性は中間として集計した。さらに, 血液培養陽転後, 菌液調整, VITEK[®] 2 搭載までに要した時間および VITEK[®] 2 搭載から直接薬剤感受性検査の結果判定までに要した時間 (中央値, 最小値, 最大値) をそれぞれ算出した。

結 果

臨床由来血液培養陽性検体 (n=75) から分離された菌種は *Escherichia coli* (n=15) および *Klebsiella pneumoniae*

Table 2. Results of the rapid antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative organism in this study

		n	EA (%)	CA (%)	MiE (%)	ME (%)	VME (%)
ABPC ^{*1*2}	BC	54	54 (100)	54 (100)	0	0	0
	SS	16	16 (100)	16 (100)	0	0	0
total		70	70 (100)	100 (100)	0	0	0
CEZ ^{*1*2*3}	BC	54	52 (96.3)	-	-	-	-
	SS	16	16 (100)	-	-	-	-
total		70	68 (97.1)	-	-	-	-
CTRX ^{*1*2}	BC	54	53 (98.1)	52 (96.3)	1 (1.9)	0	1 (1.9)
	SS	16	15 (93.8)	16 (100)	0	0	0
total		70	68 (97.1)	68 (97.1)	1 (1.4)	0	1 (1.4)
CAZ	BC	75	73 (97.3)	74 (98.7)	0	0	1 (1.3)
	SS	28	27 (96.4)	25 (89.3)	2 (7.1)	0	1 (3.6)
total		103	100 (97.1)	99 (96.1)	2 (1.9)	0	2 (1.9)
CFPM	BC	75	73 (97.3)	72 (96.0)	3 (4.0)	0	0
	SS	28	25 (89.3)	23 (82.1)	4 (14.3)	0	1 (3.6)
total		103	98 (95.1)	95 (92.2)	7 (6.8)	0	1 (1.0)
CMZ ^{*1}	BC	54	54 (100)	54 (100)	0	0	0
	SS	16	16 (100)	15 (93.8)	1 (6.3)	0	0
total		70	70 (100)	69 (98.6)	1 (1.4)	0	0
IPM	BC	75	71 (94.7)	72 (96.0)	1 (1.3)	0	2 (2.6)
	SS	28	26 (92.9)	27 (96.4)	1 (3.6)	0	0
total		103	97 (94.2)	99 (96.1)	2 (1.9)	0	2 (1.9)
MEPM	BC	75	74 (98.7)	75 (100)	0	0	0
	SS	28	28 (100)	28 (100)	0	0	0
total		103	102 (99.0)	103 (100)	0	0	0
SBT/ABPC ^{*2}	BC	61	59 (96.7)	58 (95.1)	3 (4.9)	0	0
	SS	22	22 (100)	21 (95.5)	1 (4.5)	0	0
total		83	81 (97.6)	79 (95.2)	4 (4.8)	0	0
TAZ/PIPC	BC	75	75 (100)	75 (100)	0	0	0
	SS	28	26 (92.9)	27 (96.4)	1 (3.6)	0	0
total		103	101 (98.1)	102 (99.0)	1 (1.0)	0	0
AMK	BC	75	74 (98.7)	75 (100)	0	0	0
	SS	28	28 (100)	27 (96.4)	1 (3.6)	0	0
total		103	102 (99.0)	102 (99.0)	1 (1.0)	0	0
GM	BC	75	75 (100)	75 (100)	0	0	0
	SS	28	28 (100)	28 (100)	0	0	0
total		103	102 (99.0)	102 (99.0)	0	0	0
CPFX	BC	75	75 (100)	74 (98.7)	1 (1.3)	0	0
	SS	28	26 (92.9)	26 (92.9)	2 (7.1)	0	0
total		103	101 (98.1)	100 (97.1)	3 (2.9)	0	0
total	BC		862/877 (98.3)	810/823 (98.4)	9/823 (1.1)	0	4/823 (0.5)
	SS		299/310 (96.5)	279/294 (94.9)	13/294 (4.4)	0	2/294 (0.7)
Total			1,161/1,187 (97.8)	1,089/1,117 (97.5)	22/1,117 (2.0)	0	6/1,117 (0.5)

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin, CTRX: ceftriaxone, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CMZ: cefmetazole, IPM: imipenem, MEPM: meropenem, SBT/ABPC: sulbactam/ampicillin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, CPFX: ciprofloxacin

EA: essential agreement, CA: category agreement, MiE: minor error, ME: major error, VME: very major error, BC: clinical blood culture samples, SS: strage strains

^{*1} Data for *Acinetobacter* species is not available.

^{*2} Data for *P. aeruginosa* is not available.

^{*3} CA, MiE, ME, and VME cannot be determined, because the susceptible MIC breakpoint of VITEK® 2 AST card for CEZ is set at 4 µg/mL, which differs from the susceptible MIC breakpoint recommended by CLSI, 2 µg/mL.

Table 3. Summary of cases showing very major errors

Isolates	MIC (Ref./D-AST) (μg/mL)				SS	
	BC				SS	
	<i>K. aerogenes</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>E. cloacae</i> complex (AmpC)	<i>P. aeruginosa</i> -	<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	<i>P. aeruginosa</i> -
Antimicrobials						
ABPC	≥32/≥32	≥32/≥32	≥32/≥32	.* ³	≥32/≥32	.* ³
CTRX	8 (R)/≤0.25 (S)	32/32	≥64/≥64	.* ³	1/1	.* ³
CAZ	0.25/0.25	16 (R)/4 (S)	≥64/≥64	4/4	4/4	≥64 (R)/8 (S)
CFPM	≤0.12/≤0.12	16/8	16/16	2/2	16 (R)/2 (S)	16/4
CMZ	≥64/≥64	≤1/≤1	≥64/≥64	.* ³	≥64/≥64	.* ³
IPM	1/1	≤0.25/≤0.25	4 (R)/1 (S)	8 (R)/1 (S)	0.5/0.5	≥16/≥16
MEPM	≤0.25/≤0.25	≤0.25/≤0.25	1/1	1/1	2/2	≥16/≥16
SBT/ABPC	≥32/≥32	4/4	≥32/≥32	.* ³	≥32/≥32	.* ³
TAZ/PIPC	8/8	≤4/≤4	≥128/≥128	8/8	32/16	≥128/≥128
AES	cephalosporinase	ESBL	ESBL, cephalosporinase	none	CRE, Carbapenemase	Acquired penicillinase, porin loss
Required times 1* ¹	22.9	1.2	0.6	0.8	1.0	1.0
Required times 2* ²	13.8	12.9	18.0	16.3	17.9	18.0

Results showing vary major errors are highlighted as grey shaded columns.

AES: Advanced Expert System, Ref.: reference method, BC: clinical blood culture samples, SS: storage strains

*¹ Median times (minutes) from the identification of samples as blood culture positive to applying the samples to VITEK® 2.

*² Median times (minutes) from applying blood culture positive samples to VITEK® 2 to completing the antimicrobial susceptibility testing.

*³ Data for *P. aeruginosa* is not available.

(n=16), *Pseudomonas aeruginosa* (n=14) の3菌種で全分離菌の6割を占め、複数菌種が分離された症例はなかった (Table 1)。

D-ASTにおけるEAは97.8%, CAは97.3%であった (Table 2)。CEZを除く12薬剤におけるVMEは0.5% [CTRX (1.4%) : AmpC β-lactamase 産生 *Klebsiella aerogenes*, CAZ (1.9%) : ESBL 産生 *E. coli* および *P. aeruginosa*, CFPM (1.0%) : ESBL 産生 *K. pneumoniae*, IPM (1.9%) : AmpC β-lactamase 産生 *Enterobacter cloacae* complex および *P. aeruginosa*] であったが、複数の抗菌薬にVMEを示した症例はなかった (Table 2, 3)。また、MEはいずれの抗菌薬に対しても認められなかったものの、MiEは2.0% (1.0~6.8%) であり、ABPCおよびMEPM, GMを除く9薬剤でみられ、CFPM (6.8%) 等のβ-ラクタム系抗菌薬で多くみられた (Table 2)。血液培養検体が陽転してから菌液調整、VITEK® 2搭載までに要した時間 (中央値) は3.1時間 (最短: 0.5時間, 最長: 27.1時間) であった。VMEやD-ASTの結果が参照法よりも低い値となるようなMiE (参照法: RかつD-AST: Iもしくは参照法: IかつD-AST: S) を認めた検体では血液培養陽転後、菌液調整・VITEK® 2搭載までに要した時間 (中央値) は1.0時間 (最短: 0.6時間, 最長: 27.2時間) と短かったのに対し、D-ASTの結果が参照法よりも高い値となるようなMiE (参照法: IかつD-AST: R) を認めた検体では9.2時間 (最短: 1.0時間, 最長: 23.3時間) であった (Table 3, 4)。また、VITEK® 2搭載から直接薬剤感受性検査の結果判定までに要した時間 (中央値) は10.9時間 (最短: 6.0時間, 最長: 18.7時間) であった。

VITEK® 2 Advanced Expert System™ (AES) による薬剤耐性機序の推定ではESBL産生全12株に「ESBL」のコメントが、AmpC β-lactamase 産生全6株に「セファロsporinaゼ高度耐性 (AmpC)」のコメントが付記され、カルバペネマーゼ産生株においても全11株に「カルバペネマーゼ」のコメントが付記されていた。

考 察

我々は夜間・休日における血液培養検査の運用変更や質量分析装置を用いた血液培養ボトルからの直接菌種同定を実施することで、グラム染色や菌種同定のTurn Around Time (TAT) が有意に短縮することを報告した¹²⁾。今回、さらに血液培養検査の結果を抗菌薬適正使用に繋げるために薬剤感受性検査のTATを短縮させることを目的に検討を行った。

Jorgensenらは薬剤感受性装置を選択する際、薬剤感受性試験全体の一致率>90%, VME ≤3% およびMEとMiEの合計が7% 以下を満たすことが必要としている¹³⁾。今回検討したD-ASTのEAは97.8%, CAは97.5%, VME 0.5%, MiE 2.0% であり、Jorgensenらの基準を満たしていることから、血液培養陽性ボトルから調整した菌液を用いた場合であっても、精度良く、迅速に薬剤感受性結果を報告することが可能と考えられた (Table 2)。しかしながら、VMEに関しては感染症治療において患者の不利益に繋がる恐れもあることから、可能な限り回避する事が望まれる。本検討におけるVMEはβ-ラクタム系抗菌薬で6例みられた (Table 3)。腸内細菌目細菌におけるVMEのうち3例 (CTRX 1例およびCAZ 1例, CFPM 1例) はESBL産生もしくはAmpC β-lactamase

Table 4. Summary of cases showing minor errors (MiE)

	Species	Antimicrobials	MIC (Ref./D-AST) ($\mu\text{g/mL}$)	Required times ^{*1}
I/R (n=4)				
BC	ESBL- <i>E. coli</i>	CFPM	4/16	23.33
	ESBL- <i>K. pneumoniae</i>	CFPM and CPFX	8/ ≥ 32 and 0.5/1	12.13
	ESBL- <i>K. pneumoniae</i>	SBT/ABPC	16/ ≥ 32	6.18
SS	IMP-1 MBL- <i>E. cloacae</i> complex	CFPM	4/ ≥ 32	1.0
Total (Median)				9.16
R/I (n=5)				
BC	<i>S. marcescens</i>	CTRX	4/2	8.35
	ESBL- <i>E. coli</i>	CFPM	16/8	1.18
SS	ESBL- <i>K. pneumoniae</i>	CMZ	$\geq 64/32$	1.0
	IMP-6 MBL- <i>P. aeruginosa</i> (MDRP)	AMK	$\geq 64/32$	1.0
	OXA-23 carbapenemase- <i>A. baumannii</i>	SBT/ABPC	$\geq 32/16$	1.0
I/S (n=9)				
BC	<i>K. oxytoca</i>	SBT/ABPC	16/4	27.17
	<i>K. pneumoniae</i>	SBT/ABPC	16/4	1.08
	<i>P. mirabilis</i>	IPM	2/ ≤ 0.25	0.62
SS	<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	IPM and CPFX	2/ ≤ 0.25 and 0.5/0.12	1.0
	ESBL- <i>K. pneumoniae</i>	TAZ/PIPC and CPFX	32/16 and 0.5/0.12	1.0
	GES-5 carbapenemase- <i>S. marcescens</i>	CAZ	8/4	1.0
	OXA-23 carbapenemase- <i>A. baumannii</i>	CFPM	16/8	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	CFPM	16/4	1.0
	GES-5 carbapenemase- <i>P. aeruginosa</i> (MDRP)	CAZ and CFPM	16/8 and 16/8	1.0
Total (Median)				1.0

S: susceptible, I: intermediate, R: resistant, Ref.: reference method, BC: clinical blood culture samples, SS: storage strains

^{*1} Median times (minutes) from the identification of samples as blood culture positive to applying the samples to VITEK[®] 2.

の過剰産生株によるものであり、D-AST 実施時に Double-disk synergy test を併用し、酵素産生を考慮したカテゴリー判定を行うことで回避可能である。また、AES のコメントを活用することによってもセファロsporin 系抗菌薬における VME を回避可能である。しかし、カルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性腸内細菌目細菌と *P. aeruginosa* における IPM の VME および *P. aeruginosa* における CFPM の VME は菌集落からの薬剤感受性検査を実施していなければ気付くことはできず、真の VME であった (Table 3)。また、MiE を示した症例も同様で、ESBL やカルバペネマーゼ産生株における CAZ や CFPM、SBT/ABPC の MiE は DDST 等の確認試験を実施、もしくは AES のコメントを活用することで回避可能であったが、上記以外の MiE を回避するためにはコロニーからの薬剤感受性検査が必要であると考え。薬剤感受性検査結果には温度等の培養環境や接種菌量が大きく影響する。本検討における VME や MiE (D-AST の結果が参照法よりも低い値の場合) の要因としては、1) 前処理した菌液中に血液培養ボトルの夾雑物が残っていたことで D-AST 実施時の実際の接種菌量が少なかった、2) 血液培養陽転後、菌液調整・VITEK[®] 2 搭載までに要した時間が短かったことにより血液培養ボトル中の菌量が十分ではなかったことが考えられ、既報の報告においても同様の考察がされていた⁶⁾。しかし、D-AST 実施時の生菌数を測定していなかつ

たこと、また、VME や MiE (D-AST の結果が参照法よりも低い値の場合) を示した症例の中にも菌液調整・VITEK[®] 2 搭載までに要した時間が長い症例が含まれていることから、本検討における VME や MiE の要因を明らかにすることはできなかった。

血液培養液からの菌液調整法には 10% ドデシル硫酸ナトリウム⁵⁾、塩化アンモニウム緩衝液⁶⁾ やセミアルカリプロテアーゼ¹⁴⁾ 等を用いた前処理法が報告されている。当院では質量分析法を用いた直接菌種同定の前処理に rapid BACpro[®] II キットを使用していることから血液培養液からの菌液調整に rapid BACpro[®] II キットの Reagent 1 を用いた。血液培養液の処理手順の初期段階を同じとすることで効率性の向上とワークフローの最適化に繋がると考えられるが、今後はより適切な前処理法を模索する必要があると考える。

本邦では夜間・休日の細菌検査体制は日頃細菌検査に従事していない臨床検査技師が時間外業務として従事していることも多い。そのため、平日午後には陽転した血液培養検体は翌朝までサブカルチャーされ、さらに 1 日かけて薬剤感受性検査が行われるため、結果報告が遅延する可能性がある。サブカルチャーが不要な D-AST を実施することで翌朝には薬剤感受性結果が報告されることで AST の迅速介入も可能になると考えられる。しかし、ESBL 等の β -ラクタマーゼ産生腸内細菌目細菌や耐性緑膿菌等が得られた場合、最終的な薬

剤感受性検査結果として菌集落からの薬剤感受性検査が必要となることから労力やコストの増加も考えなければならない。よって、実際に D-AST を日常検査に導入する際は血液培養が陽性となった症例すべてに D-AST を実施すべきではなく、患者の状態や使用抗菌薬、血液培養が陽性となった時間帯等を考慮すべきである。

本検討の制限事項として、第一に単施設のみでの検討であることから検討菌株数が、菌種ごとまたは薬剤耐性菌ごとの D-AST の一致率を解析するには十分でない事が挙げられる。さらに、複数菌種による D-AST への影響も、該当検体が得られなかった事より評価できていない。第二に本検討では D-AST の結果を臨床に報告していないことから、BSI 診療に及ぼす効果、即ち、患者の予後改善への効果が評価不可能である。D-AST の実施によって薬剤感受性検査の TAT は短縮され、これらの結果を基に AST の早期介入が可能となれば、狭域抗菌薬を用いた標的治療への以降、いわゆるデ・エスカレーションが早期に導入され、抗菌薬適正使用に繋がると推察される。しかしながら、直接薬剤感受性検査は抗菌薬適正使用には繋がるものの、入院期間等の患者の転帰を有意に改善させるものではなかったとの報告もなされている¹⁵⁾。今後は、D-AST の臨床的有用性を長期的に評価することが重要と考えられる。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Kumar, A, D Roberts, KE Wood, et al. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34 (6): 1589-1596.
- 2) Khan, ZA, MF Siddiqui, S Park, et al. 2019. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel)* 9 (2): 49.
- 3) Timbrook, TT, JB Morton, KW McConeghy, et al. 2017. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 64 (1): 15-23.
- 4) AlQahtani, H, FY Alqahtani, FS Aleanizy, et al. 2021. Impact of rapid identification of *Staphylococcus* species in positive blood culture using GeneXpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus aureus* blood culture assay combined with antibiotic stewardship. *Microb Drug Resist* 27 (8): 1037-1043.
- 5) Hogan, CA, N Watz, I Budvytiene, et al. 2019. Rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from blood cultures in patients with Gram-negative rod bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 94 (2): 116-121.
- 6) Pan, HW, W Li, RG Ri, et al. 2018. Simple sample preparation method for direct microbial identification and susceptibility testing from positive blood cultures. *Front Microbiol* 20: 481.
- 7) Sze, DTT, CCY Lau, TM Chan, et al. 2021. Comparison of novel rapid diagnostic of blood culture identification and antimicrobial susceptibility testing by Accelerate Pheno system and BioFire FilmArray Blood Culture Identification and BioFire FilmArray Blood Culture Identification 2 panels. *BMC Microbiol* 21 (1): 350.
- 8) Ling, TK, ZK Liu, AFB Cheng, et al. 2003. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 41 (10): 4705-4707.
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th ed, informational supplement. CLSI M100-S30, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 10) 2017. 耐性菌検査法ガイド. 第九章 各種薬剤耐性菌の検査法. *日臨微誌* 27 Supplement 3: 81-130.
- 11) Uechi, K, T Tada, K Shimada, et al. 2017. A modified carbapenem inactivation method, CIMTris, for carbapenemase production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *J Clin Microbiol* 55 (12): 3405-3410.
- 12) 上地幸平, 仲松正司, 山内 恵, 他. 2020. 血液培養検査の運用変更が Turnaround time (TAT) 短縮と抗菌薬適正使用に及ぼす効果. *臨床病理* 68 (12): 966-972.
- 13) Jorgensen, JH. 1993. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *J Clin Microbiol* 31 (11): 2841-2844.
- 14) 馬場康次, 辻 智美, 福田 峻, 他. 2018. 我々が考案した血液培養陽性ボトルからの直接同定を目的とした簡便な前処理方法の評価. *医学検査* 67 (5): 623-630.
- 15) Hogan, CA, B Ebunji, N Watz, et al. 2020. Impact of rapid antimicrobial susceptibility testing in Gram-negative rod bacteremia: a quasi-experimental study. *J Clin Microbiol* 58 (9): e00360-20.

Evaluation of the antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative organisms in positive blood culture specimens

Kohei Uechi, Ami Takahashi, Maria Shimoji, Shohei Yogi, Ayumi Uechi, Shiro Maeda
Division of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, University of the Ryukyus Hospital

A rapid report for the antimicrobial susceptibility testing (AST) is required for the treatment of patients with bloodstream infections (BSI), but it takes more than 48 hours for obtaining the results of standard ASTs. In this study, we performed the D-ASTs using positive blood culture specimens to know the clinical usefulness of these rapid tests by evaluating concordance rates with the standard tests or required times for reporting their results. A total of 103 specimens, 28 blood samples inoculated with storage organisms (20 Gram-negative rods with/without known drug resistance genes, 8 ATCC strains), and 75 clinical specimens, were used for this study. Positive blood culture specimens were pretreated with erythrocyte lysis buffers and after centrifugation, pellets were dissolved in sterile saline, and applied to VITEK[®] 2 for the AST. Regarding D-AST, rates of essential agreement within ± 1 tube difference, category agreement, very major error, and minor error were 97.8%, 97.5%, 0.5% and 2.0%, respectively. The required times were 10.9, 6.0, 18.7 hours, median, shortest and longest, respectively. These results indicate that the D-AST using VITEK[®] 2 are rapid and accurate methods, and may contribute to the improvement of the treatment of patients with BSI by combining the antimicrobial stewardship program.