

## 研究経過報告書

1. 研究課題名 本邦抗菌薬ディスクを使用した迅速薬剤感受性検査法の確立 (多施設共同研究)
2. 研究代表者氏名 上地 あゆみ
3. 研究発表

第 35 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 一般演題 (本邦抗菌薬ディスクを使用した rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) の検討～沖縄県内 11 施設による多施設共同研究～) にて発表予定 (演題登録済)

### 4. 研究実績

#### 【参加施設】

琉球大学病院、那覇市立病院、県立八重山病院、沖縄協同病院、南部徳州会病院、南部医療センター・こども医療センター、県立中部病院、浦添総合病院、中頭病院、国立沖縄病院、沖縄赤十字病院

#### 【対象】

血液培養検査において *E. coli* および *K. pneumoniae* が検出された検体を対象とした (*E. coli*: 131 件、*K. pneumoniae*: 65 件)。サブカルチャー後、保存した菌株を用いて参照法による薬剤感受性検査および薬剤耐性遺伝子を対象とした核酸増幅検査と double disk synergy test (DDST) による ESBL の確認試験を実施した。

#### 【方法】

・各施設の血液培養ボトル全自動血液培養装置で培養した血液培養検体の陽転後、グラム染色結果より腸内細菌目細菌 (*Enterobacterales*) が疑われるグラム陰性桿菌について RAST を実施した。

・RAST は EUCAST RAST に準じて行った。陽転した血液培養検体より 100  $\mu$ L をミューラーヒントン寒天に滴下し、直接ディスク拡散を行った。ディスクは Cefotaxime (CTX, 30  $\mu$ g)、Ceftazidime (CAZ, 30  $\mu$ g)、Meropenem (MEPM, 10  $\mu$ g)、Ciprofloxacin (CPFX, 5  $\mu$ g)、Cefmetazole (CMZ, 30  $\mu$ g) の 5 種類の抗菌薬について KB ディスク (栄研化学) を使用した。ディスクの配置方法を Figure 1 に示す。4、6、8 時間で判定し、阻止円直径を測定した。RAST の BP は EUCAST RAST BP ver. 5.0 および考案した修正 RAST BP (表 1)<sup>1)</sup> をそれぞれ使用した。

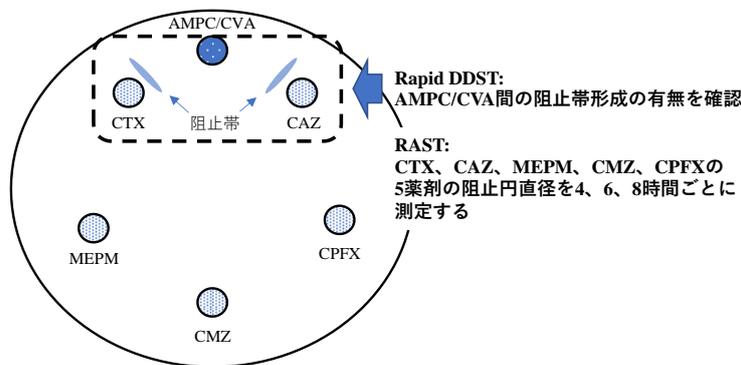


Figure 1. RAST ディスク配置方法

表 1. 日本の抗菌薬ディスクに適した修正 RAST BP (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*)

Time (h)	modified RAST BPs					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	CAZ			CTX		
	S $\geq$	ATU	R <	S $\geq$	ATU	R <
4	-	-	-	18	15-17	15
6	15	13-14	13	19	16-18	16
8	15	13-14	13	20	17-19	17

・サブカルチャー後、菌株をスキムミルクへ保存し、琉球大学病院で解析を行った。VITEK MS (バイオメュー・ジャパン) にて菌種同定検査を行い、参照法としてフローズプレート (栄研化学) により薬剤感受性検査を実施した。参照法の判定は CLSI M100 31ed に基づき行った。RAST の結果と参照法を比較し Category Agreement (CA)、Major error (ME)、Verry major error (VME)、minor error (mE)を求め、FDA の推奨事項 (CA $\geq$ 90%、VME $\leq$ 1.5%、ME  $\leq$ 3.0%、mE $<$ 10%) に基づき評価を行った。また、核酸増幅検査による ESBL および AmpC 遺伝子の保有確認と DDST による ESBL 産生確認試験を、今後実施する。

【結果】

1. 本邦の抗菌薬ディスク (CTX、CAZ、MEPM、CPFX) を使用した *E. coli* および *K. pneumoniae* の EUCAST RAST BP RAST の臨床検体による検証

表2. *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* におけるRASTと参照法との一致率

Antibiotic	Time (h)	<i>Escherichia coli</i>						<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
		readability	ATU	CA	mE	VME	ME	readability	ATU	CA	mE	VME	ME
		n (%)			n (VME rate, %)			n (%)			n (VME rate, %)		
CTX 30 $\mu$ g	4	90.8 (119/131)	2.5 (3/119)	99.1 (115/116)	0	4.3 (1/23)	0	98.5 (64/65)	1.6 (1/64)	88.9 (56/63)	1.6 (1/61)	37.5 (3/8)	0
	6	100 (130/130)	1.5 (2/130)	100 (128/128)	0	0	0	100 (63/63)	6.3 (4/63)	93.3 (56/60)	1.6 (1/61)	25.0 (2/8)	0
	8	100 (89/89)	1.1 (1/89)	100 (88/88)	0	0	0	100 (50/50)	4.0 (2/50)	93.8 (45/48)	2.1 (1/48)	25.0 (2/8)	0
CAZ 30 $\mu$ g	4	90.8 (119/131)	12.6 (15/119)	100 (104/104)	0	0	0	98.5 (64/65)	29.7 (10/64)	98.1 (53/54)	0	0	1.8 (1/55)
	6	100 (130/130)	3.1 (4/130)	99.2 (125/126)	1/126 (0.8)	0	0	100 (63/63)	14.3 (9/63)	98.1 (53/54)	0	0	1.9 (1/54)
	8	100 (89/89)	4.5 (4/89)	100 (85/85)	0	0	0	100 (50/50)	12.0 (6/50)	100 (44/44)	0	0	0
MEPM 10 $\mu$ g	4	91.6 (120/131)	10.0 (12/120)	94.4 (102/108)	0	0	5.0 (6/120)	96.9 (63/65)	7.9 (5/63)	98.3 (57/58)	0	0	1.7 (1/58)
	6	100 (130/130)	1.5 (2/130)	100 (128/128)	0	0	0	100 (63/63)	7.9 (5/63)	98.3 (57/58)	0	0	1.6 (1/63)
	8	100 (89/89)	1.1 (1/89)	100 (88/88)	0	0	0	100 (50/50)	4.0 (2/50)	100 (48/48)	0	0	0
CPFX 5 $\mu$ g	4	89.3 (117/131)	2.6 (3/117)	99.1 (113/114)	0	0	1.2 (1/82)	98.5 (64/65)	17.2 (11/64)	90.6 (48/53)	5.7 (3/53)	12.5 (1/8)	2.0 (1/50)
	6	100 (130/130)	6.2 (8/130)	97.5 (119/122)	0.8 (1/122)	0	2.2 (2/91)	100 (63/63)	11.1 (7/63)	91.1 (51/56)	5.4 (3/56)	11.1 (1/9)	2.0 (1/50)
	8	100 (89/89)	3.4 (3/89)	98.8 (85/86)	0	0	1.6 (1/61)	100 (50/50)	12.0 (6/50)	90.9 (40/44)	7.0 (3/43)	0	0

*E. coli* の RAST 結果

4 時間後、524 種類 (131 $\times$ 4) の抗菌薬ディスクのうち 475 種類 (90.6%) の結果が読み取れ、6 時間後ではすべての抗菌薬の結果が読み取れるようになった。EUCAST RAST BP による RAST と参照法との CA はすべての抗菌薬および判定時間で 90%以上であった。CTX 4 時間値で VME (1/23 4.3%) を認め、MEPM 4 時間値 (6/120 5.0%)、CPFX の 4、6、8 時間値で (1/82 1.2%、2/91 2.2%、1/61 1.6%) の ME を認め、CAZ 6 時間値、CPFX 6 時間値で mE を認めた。

*K. pneumoniae* の RAST 結果

4 時間後、260 種類 (65 $\times$ 4) の抗菌薬ディスクのうち 255 種類 (98.1%) の結果が読み取れ、6 時間後ではすべての抗菌薬の結果が読み取れるようになった。CTX 4 時間値の CA (56/63 88.9%) を除き、すべての抗菌薬および判定時間で 90%以上であった。CTX の 4、6、8 時間値で (3/8 37.5%、2/8 25.0%、2/8 25.0%)、CPFX の 4、6 時間値で (1/8 12.5%、1/9 11.1%) の VME を認め、CAZ の 4、6 時間値で (1/55 1.8%、1/54 1.9%)、MEPM の 4、6 時間値で (1/58 1.7%、1/63 1.6%)、CPFX の 4、6 時間値で (1/50 2.0%、1/50 2.0%) の ME を認めた。CTX の 4、6、8 時間値、CPFX の 4、6、8 時間値で mE を認めた。

2. 本邦の抗菌薬ディスクに適した *E. coli* および *K. pneumoniae* の修正 RAST BP (Table 1) の臨床検体による検証

表3. 修正RAST BPを用いた*Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* におけるRASTと参照法との一致率

Antibiotic	Time (h)	<i>Escherichia coli</i>						<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
		readability	ATU	CA	mE	VME	ME	readability	ATU	CA	mE	VME	ME
		n (%)			n (VME rate, %)			n (%)			n (VME rate, %)		
CTX 30 $\mu$ g	4							4.7 (3/64)	96.7 (59/61)	0	12.5 (1/8)	1.8 (1/55)	
	6							19.0 (12/63)	98.0 (50/51)	0	12.5 (1/8)	0	
	8							10.0 (5/50)	97.8 (44/45)	0	12.5 (1/8)	0	
CAZ 30 $\mu$ g	4		0	0	0	0	0						
	6		3.1 (122/126)	96.8 (122/126)	0.8 (1/126)	14.3 (3/21)	0						
	8		4.5 (82/85)	96.5 (82/85)		17.6 (3/17)	0						

我々が報告した<sup>1)</sup> 修正 RAST BP を使用した RAST と参照法との一致率は、*E. coli* の CAZ 6、8 時間値で CA は 96.8%、96.5%と 90%を超えたが VME (3/21 14.3%、3/17 17.6%) を認めた。*K. pneumoniae* の CTX 4、6、8 時間値で CA は 96.7、98.0、97.8%と改善を認め、4 時間値では 2 つの VME が、6、8 時間値では 1 つの VME が消失したが、4 時間値で 1 つの ME (1.8%) が発生した。

3. 予備研究<sup>2)</sup>により独自に設定した *E. coli* および *K. pneumoniae* の CMZ RAST BP の臨床検体による検証

表 4. 独自に設定した CMZ RAST BP

Antibiotic		4 h			6 h			8 h		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
CMZ	<i>Escherichia coli</i>	17	15-16	15	16	14-15	14	16	14-15	14
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	11-13	11	15	12-14	12	16	13-15	13

表5. 予備研究で考案したCMZ RAST BPを用いたCMZ RASTと参照法との一致率

Antibiotic	Time (h)	<i>Escherichia coli</i>						<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
		readability	ATU	CA	mE	VME	ME	readability	ATU	CA	mE	VME	ME
		n (%)				n (VME rate, %)	n (ME rate, %)	n (%)				n (VME rate, %)	n (ME rate, %)
CMZ 30 µg	4	93.1 (122/131)	9.0 (11/122)	91.9 (103/111)	0	0	6.6 (8/122)	96.9 (63/65)	1.6 (1/63)	100 (62/62)	0	0	0
	6	100 (130/130)	4.6 (6/130)	96.8 (120/124)	0	0	3.2 (4/124)	100 (63/63)	0	98.4 (62/62)	0	0	1.7 (1/59)
	8	100 (89/89)	0	96.6 (86/89)	0	0	3.4 (3/89)	100 (50/50)	0	100 (50/50)	0	0	0

*E. coli* の CMZ RAST と参照法との一致率は 4、6、8 時間値のすべての判定時間で CA が 90%を超えたが、ME (8/22 6.6%、4/124 3.2%、3/89 3.4%) を認めた。*K. pneumoniae* の CMZ RAST と参照法との一致率はすべての判定時間で CA は 90%を超えたが、6 時間値で ME (1/59 1.7%) を認めた。

4. RAST と同時に行う rapid DDST による ESBL スクリーニング検査の精度の臨床検体による検証

8 月下旬より ESBL 遺伝子、AmpC β-ラクタマーゼ産生遺伝子を確認する核酸増幅検査を行う予定である。

#### 考察

*E. coli* と *K. pneumoniae* の EUCAST RAST BP を用いた RAST と参照法との比較において *K. pneumoniae* CTX 4 時間値を除き 90%を超え、良好な一致率が得られたが、いくつかの VME や ME を認めた。過去の報告<sup>1)</sup>と同様に *K. pneumoniae* CTX RAST は VME を認め、4 時間値では CA が 90%を下回った。修正 RAST BP を用いることで CA は改善されたが、VME を認めたことより、今回の結果を解析し、修正 RAST BP の再検討を行う予定である。

我々の報告<sup>1)</sup>において *E. coli* CAZ RAST と参照法の一致率は 6、8 時間値で CA が 90%を下回り ME を認めたが、今回の検討では CA は 90%を超え良好であり、エラーは 6 時間値の mE のみであった。参照法の BP に、S の上限が EUCAST BP よりも高い CLSI BP を用いたため、EUCAST より高い濃度の本邦抗菌薬ディスクを用いた RAST と参照法との一致率において VME が発生しなかったと考えられる。今回 *E. coli* の修正 RAST BP は、VME が発生したことより、今回の結果を解析し、修正 RAST BP の再検討を行う予定である。

予備研究<sup>2)</sup>で設定した CMZ RAST BP を用いた RAST と参照法との一致率は *E. coli* と *K. pneumoniae* ともにすべての時間で CA が 90%以上と良好な結果であった。CMZ RAST の臨床への導入を考えた場合、我々が予備研究で設定した CMZ RAST BP は、S の上限が MIC 値: 16 である CLSI の BP を参照法として用いているため、臨床で有効だと考えられる MIC 値を上限として RAST BP を設定する必要があると考えられる。

#### 謝辞

研究に協力頂いた、沖縄協同病院 平敷義隆氏、那覇市立病院 大城健哉氏、沖縄県立中部病院 仲間美香氏、沖縄県立八重山病院 八幡照幸氏、南部徳州会病院 久保田匠氏、沖縄県立南部医療センター・こども医療センター 宮里博子氏、浦添総合病院 大城春奈氏、中頭病院 金城正樹氏、沖縄赤十字病院 曲瀬川裕子氏、国立病院機構沖縄病院 花木祐介氏に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Uechi A, Uechi K, Nakano A, Yogi, Shimoji M, Maeda S. Evaluation of the feasibility of EUCAST RAST using antimicrobial disks available in Japan. *J. Infect. Chemother.* in press.
- 2) 上地あゆみ、上地幸平、中野安実、与儀翔平、下地真里有、前田士郎. 第 34 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 プログラム・抄録集. 2023; 33: 266.