

## 研究

## 自動血液培養検査装置における陽性化日数の検討

池田紀男、井戸向昌哉、吉内光夫

日本赤十字社和歌山医療センター 検査部

## The bacterial detection time in automated blood culture system

## 要旨

2004年9月から2006年8月までの2年間の血液培養検体のうち、菌が発育した521本(352例)を対象に、自動血液培養検査装置バクテアラート3Dにセットしてから陽性化するまでの日数を検出菌別に集計した。

陽性化までに要した日数は、24時間未満(1日目)56.8%、24時間以上48時間未満(2日目)26.3%、48時間以上72時間未満(3日目)8.4%となり、累積で見ると2日目までで全体の83.1%、3日目までで91.5%が陽性化した。

菌の種類による陽性化日数を比較すると、最も速かったのはグラム陽性桿菌の0.6日、以下、腸内細菌科と複数菌検出例0.7日、*Streptococcus* spp.0.8日、*Enterococcus* spp.1.1日、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌1.2日、*Staphylococcus* spp.1.5日、酵母様真菌2.3日、嫌気性菌2.7日と続いた。

好気用、嫌気用ボトル2本セットで採取した場合の発育状況をみると、好気用ボトルだけに発育したのは酵母様真菌が100%、グラム陽性桿菌とブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌が90%となった。嫌気性菌は100%が嫌気用ボトルだけの発育となった。また、好気用ボトルが先に陽性化したのは*Streptococcus* spp.と*Staphylococcus* spp.で多く(55~73%)、逆に嫌気用ボトルが先に陽性化したのは腸内細菌科と複数菌検出例で多かった(75~76%)。

陽性化日数や発育状況を注意深く観察することは、早期に菌を推定する重要な手がかりとなる。

Norio Ikeda, et al: ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 41:11-15,2008 (2007.11.30 受理)

## KEYWORDS

血液培養、自動血液培養検査装置、バクテアラート3D、菌血症、陽性化日数

## 【はじめに】

血液中の菌の存在は、他の組織における感染巣の存在と進行しつつある病勢を示し、迅速で適切な治療を必要とするサインと考えられる。このため、当細菌検査室では従来法(肉眼判定する用手法)と比べ、検出感度・速度ともに優れた自動血液培養検査装置バクテアラート3D(日本ビオメリュー社)を2004年9月より導入し、より速い結果報告を心がけている。

今回、2年間のデータを基に自動血液培養

検査装置にセットしてから陽性化(発育)するまでの期間を、菌の種類別に検討したので報告する。

## 1. 対象および方法

2004年9月から2006年8月までの2年間に日勤時間帯に受け付けた血液培養検体のうち、陽性化した521本(352例)について、検出菌別に陽性化時間(日数)を集計した。血液を接種した培養ボトルは直ちに自動血液培養検査装置バクテアラート3Dにセットし、最長7日間培養を行った。培養ボトルは、大

人が好気用 (FA) ボトルと嫌気用 (FN) ボトルの2本、小児は小児用 (PF) ボトル1本を使用した。同一患者の好気・嫌気用ボトル2本セットから同一菌が検出された場合であっても、発育時間に差が認められたため別々に集計した。ただし、1週間以内に同一患者から同一菌が検出された場合は、初回検出例だけを対象とした。

## 2. 結果

### 1. 陽性化までに要した日数

陽性化した521本(352例)について、血液培養ボトルを装置にセットしてから菌発育までに要した日数を図1に示す。24時間未満(1日目)で陽性化したのは56.8%(296本)、24時間以上48時間未満(2日目)が26.3%(137本)、48時間以上72時間未満(3日目)8.4%(44本)、72時間以上96時間未満(4日目)5.8%(30本)、96時間以上120時間未満(5日目)1.3%(7本)、120時間以上144時間未満(6日目)1.2%(6本)、そして144時間以上168時間未満(7日目)が0.2%(1本)となった。累積で見ると2日目までで全体の83.1%が陽性化し、3日目までで91.5%が陽性化した。

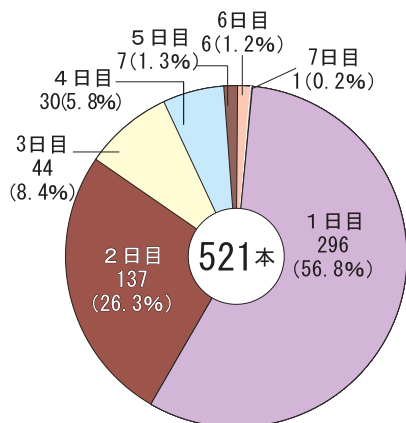


図1 陽性化までに要した日数

### 2. 菌の種類による陽性化日数の比較

大まかな菌の分類で、陽性化した日数を比較した(図2)。平均陽性日数の最も速い菌は、*Bacillus cereus* を主としたグラム陽性桿菌であり0.6日(最短発育0日~最長発育1日目)であった。以下、腸内細菌科0.7日(0~3日目)、複数菌検出例0.7日(0~4日目)、*Streptococcus* spp.0.8日(0~3日目)、

*Enterococcus* spp.1.1日(0~4日目)、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌1.2日(0~4日目)、*Staphylococcus* spp.1.5日(0~6日目)[*S.aureus* 1.2日(0~4日目)、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌(CNS)1.7日(0~6日目)]、酵母様真菌2.3日(0~7日目)、嫌気性菌2.7日(0~6日目)と続いた。なお、複数菌検出例の内訳は腸内細菌科が関与した例が最も多く、続いて*Staphylococcus* spp. 関与例であった。

### 3. 主要5菌種における陽性化日数の比較

血液から検出される頻度の高い代表的な5菌種(*S.aureus*, CNS, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*)について、陽性化日数を比較した(図3)。24時間未満の発育をそれぞれの菌種で見ると、*E.coli* の頻度が最も高く81.4%、続いて*P.aeruginosa* 69.2%、*S.aureus* 55.5%、CNS 31.3%、*C. albicans* 10.0%となった。累積2日目までの発育を比較すると、*C. albicans*は100%発育し、続いて*E.coli* 97.7%、*S.aureus* 85.5%、*P.aeruginosa* 84.6%、CNS72.2%となった。これらの菌種のうち、4日目以降でも発育が認められたのはCNSのみであった。

次に、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA:29株)とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA:81株)では、陽性化日数に差があるのかについて検討した。24時間未満の発育ではMSSAが19株・MRSAが42株であり、2日目までの累積発育をみるとMSSA25株・MRSA69株となった。この結果、MSSAとMRSAでは陽性化日数に有意差は認められなかった( $p > 0.05$ )。

### 4. 感染例と汚染例別にみたCNSの陽性化日数の比較

CNSが検出された144本(96例)のうち、敗血症症状を伴った感染例から検出された59本と、明らかに汚染と判断された例から検出された21本について、陽性化日数を比較した(残り64本は感染か汚染かは不明)。図4の通り、2日目までの発育は感染例で47本、汚染例で12本であった。発育に2日目以上を要したものは、感染例で12本、汚染例で9本となった。この結果、感染例は汚染例に比べ2日目までに発育する例が有意に多かった( $p < 0.05$ )。

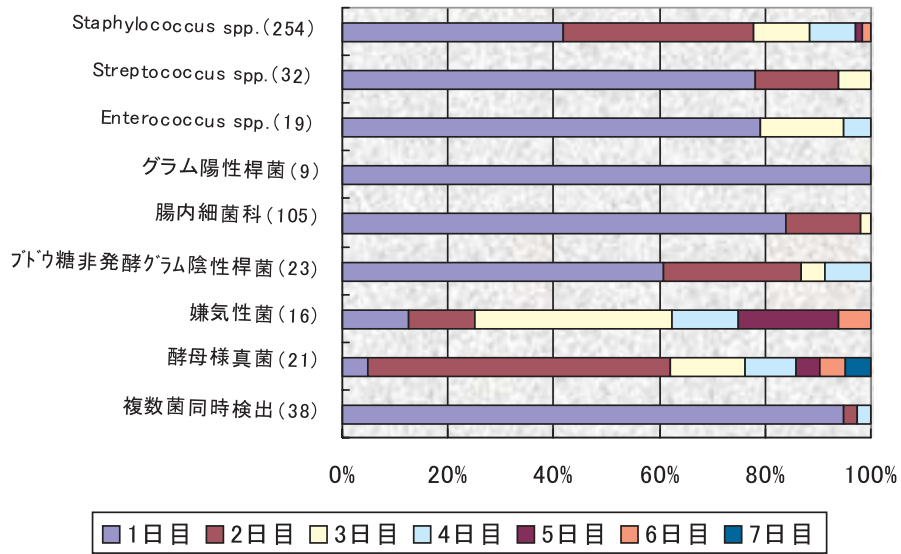


図2 菌の種類による陽性化日数の比較

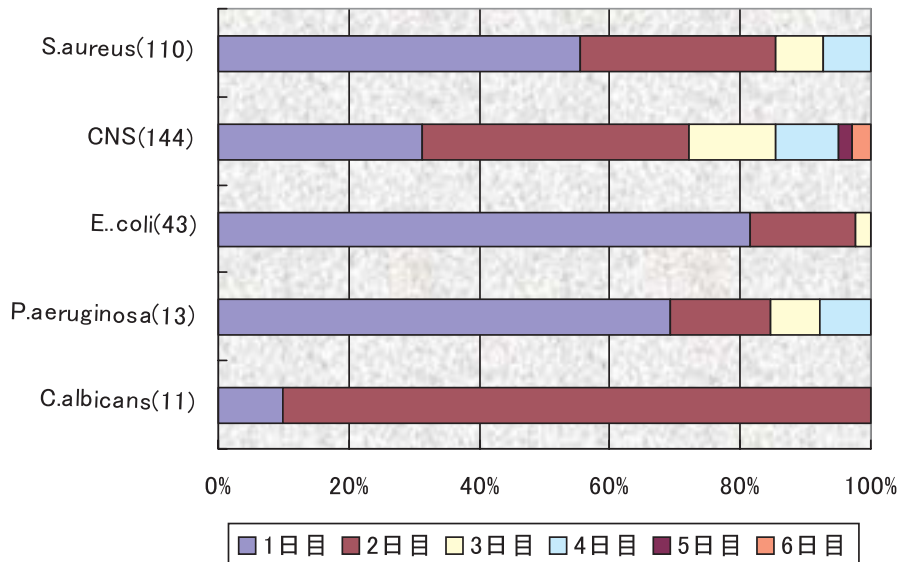


図3 主要5菌種における陽性化日数の比較

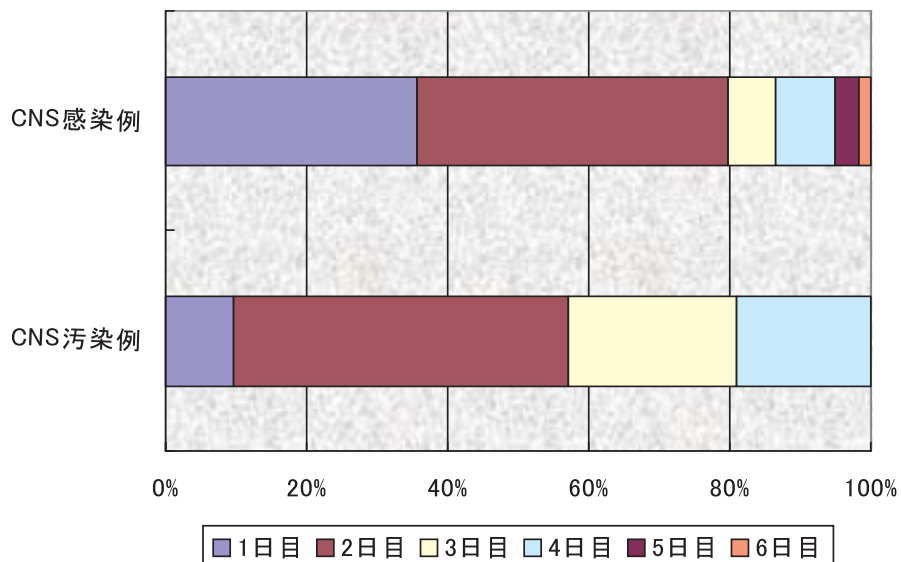


図4 感染例と汚染例別に見た CNS の陽性化日数の比較

表 菌の種類による好気・嫌気用ボトルでの発育状況

平均発育日数	菌の種類	好気のみ発育 (%)	嫌気のみ発育 (%)	ともに発育 (%)	特徴	好気先発育 / 嫌気先発育
0.6	グラム陽性桿菌 (8)	7 (87.5)	0	1 (12.5)	約90%好気のみ	—
0.7	腸内細菌科 (63)	13 (20.6)	9 (14.3)	41 (65.1)	約35%どちらか1本	9/28 (約76%嫌気が先)
0.7	複数菌同時検出 (19)	1 (5.3)	0	18 (94.7)	約95%2本から	4/12 (75%嫌気が先)
0.8	<i>Streptococcus</i> spp. (18)	4 (22.2)	3 (16.7)	11 (61.1)	約40%どちらか1本	8/3 (約73%好気が先)
1.1	<i>Enterococcus</i> spp. (10)	1 (10)	0	9 (90)	90%2本から	4/4 (好気, 嫌気同じ)
1.2	ブドウ糖非発酵 グラム陰性桿菌 (21)	19 (90.5)	0	2 (9.5)	約90%好気のみ	—
1.2	<i>S.aureus</i> (66)	9 (13.6)	15 (22.7)	42 (63.7)	約36%どちらか1本	25/17 (約60%好気が先)
1.7	CNS (96)	40 (41.7)	15 (15.6)	41 (42.7)	約57%どちらか1本	22/18 (55%好気が先)
2.3	酵母様真菌 (21)	21 (100)	0	0	100%好気のみ	—
2.7	嫌気性菌 (16)	0	16 (100)	0	100%嫌気のみ	—

### 5. 好気用・嫌気用ボトル2本セットで採取した場合の発育状況

好気用ボトル、嫌気用ボトルを同時に2本セットで採取した場合の発育状況を表に示す。酵母様真菌はすべて好気用ボトルだけの発育となり、グラム陽性桿菌とブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は90%が好気用ボトルだけの発育であった。逆に、嫌気性菌はすべてが嫌気用ボトルだけの発育となった。残る腸内細菌科、*Streptococcus* spp.、*Staphylococcus* spp. は35~57%がどちらか1本の発育であり、*Enterococcus* spp.、複数菌検出例では90~95%が2本から発育が認められた。

次に2本から発育した場合、好気用ボトルと嫌気用ボトルではどちらが先に陽性化するのかをみた。腸内細菌科と複数菌検出例では嫌気ボトルが先に陽性化することが多く(75~76%)、逆に、*Streptococcus* spp.、*Staphylococcus* spp.では好気ボトルから先に陽性となるが多かった(55~73%)。

### 3. 考察

自動血液培養検査装置バクテアラート3Dは、二酸化炭素センサーと反射光検出器を利用して微生物の増殖により培地中に発生した

二酸化炭素の量を連続的にモニターし、検体中の微生物の有無を判定するものである。この変化は10分ごとに自動測定するため、肉眼的に菌の発育を判定していた従来法と比べ、迅速に陽性化する時点を捉えることが可能となった<sup>1)</sup>。

本装置にセットしてから陽性化までに要した日数は、1日目が最も多く、過半数を占めた。次いで2日目、3日目の順となり、3日目までの累積は90%を超えた。本装置の導入により、いかに速くなったのかを著者が1992年に報告した従来法の陽性化日数と比較した<sup>2)</sup>。Vacutainer Culture Tube (BD)を使用した従来法と本装置では、1日目に陽性化したのが22.1%から56.8%(34.7%増加)と著増し、2日目までの累積が53.6%から83.1%(29.5%増加)、3日目までの累積が80.0%から91.5%(11.5%増加)、4日目累積88.6%が97.3%(8.7%増加)、5日目累積92.1%が98.6%(6.5%増加)、6日目累積97.1%が99.8%(2.7%増加)、7日目とともに100%となった。このように、自動機器による判定は従来法に比べて1日以上速く陽性化し、特に2日目までの累積陽性率で顕著となった。自施設のデータを基に、何日目で約何パーセントが陽性化するかという情報を臨床サイドにアナウン

スしておくことは重要である。また、従来法との比較を菌別にみたところ、すべての菌で短縮された。すなわち、グラム陽性球菌で0.9日(2.3日から1.4日へ短縮)速くなり、腸内細菌科0.7日(1.4日から0.7日)、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌2.1日(3.3日から1.2日)、嫌気性菌1.8日(4.5日から2.7日)、酵母様真菌で0.8日(3.1日から2.3日)が短縮となった。特にブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌と嫌気性菌において短縮が著明であった。敗血症の診断補助にはエンドトキシン、 $\beta$ -D-グルカン、そしてプロカルシトニン等があるが、どの抗菌薬に効くのかを判断するためには迅速な菌検出が昔も今も必須となる。

培養ボトルは、ベースとしてブレインハートインフュージョン・トリプケースソイブイオンを使用し、菌発育阻害物質の吸着剤である活性炭を添加したFA培養ボトル(好気用)、FN培養ボトル(嫌気用)とPF培養ボトル(小児用)の3種類を使用した。各培養ボトルは検出目的に合わせて空気成分を調整している。検出時間の短縮や検出率の向上は自動機器の性能とともにボトル内の培地成分の充実も重要であると考えられる。

起炎菌を推定するうえで、陽性化日数が大きな手がかりとなることが分かった。これに加えて、「グラム染色所見とガス発生や悪臭の有無」、「好気用ボトルだけ、または嫌気用ボトルだけの発育なのか」、あるいは両方に発育の場合は「好気用ボトルと嫌気用ボトルでどちらが先に陽性となったのか」等の情報を組み合わせることで推定菌をより詳細に絞ることが可能となる。例えば、培養ボトルが陽性化し、直ちに行ったグラム染色で、グラム陰性の細くてやや小さな桿菌が検出されたとしよう。塗抹所見だけでは、緑膿菌を代表とするブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌なのか、バクテロイデスを主とする嫌気性菌なのか、あるいはセラチアのように小さな腸内細菌科なのかの鑑別は困難である。しかし、この発育が1日目であり、かつ、好気用ボトルだけの発育の場合は、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌であろうと推定できる。同様に、グラム陽性桿菌で大型、先が角張っている菌が検出された場合、バシラス属かクロストリジウム属かを疑うが、発育が2日目以降であり、嫌気用ボトルだけの発育、さらにサブカルチャー

時にガス発生が認められた場合は後者が強く疑える。

感染例と汚染例別にみたCNSの陽性化日数を比べたところ、感染例は汚染例に比べて速く陽性化する例が有意に多かった。大城らの検討においても同様であり、臨床的に有意なCNSの検出時間(22.1時間)は汚染のCNS(45.6時間)と比較して有意に短かったと述べ、さらにCNSの有意菌診断基準を中心静脈カテーテル留置があり、かつ30時間以内に陽性検出と設定している<sup>3)</sup>。

当センターは第三次救命救急をもつ865床の中核病院であり、検査部門も24時間体制で臨んでいる(当直業務36名)<sup>4)</sup>。しかし、時間外に依頼のある血液培養については、当直者がふ卵器に入れ培養を開始するだけとなる。菌陽性時に感染防止対策を考慮し、塗抹鏡検検査、培養・同定・感受性検査へと進めていく時間的な余裕が現状ではない。さらに塗抹所見の解釈、培地選択等、臨機応変な対応をとるためには経験と微生物学知識を必要とする。このため、当直者が機器の陽性化を確認した場合、細菌検査担当技師(3名)を呼び出すという方法も一案ではあるが、年間血液培養陽性例が350例を超す当施設では現実的には不可能である。時間外の迅速対応については今後の課題である。

## 文献

- 1) 横山僚:全自動血液培養装置 BacT/ALERT システム、Medical Technology 34:485~490、2006
- 2) 池田紀男:和歌山赤十字病院における過去5年間の血中分離菌動向、和歌山医学 43:497~500、1992
- 3) 大城健哉、内間かおる、大城涼子ほか:血液培養より検出される coagulase-negative staphylococci 陽性検出時間を用いた有意菌判断基準の設定、日本臨床微生物学会雑誌 14:177~182、2004
- 4) 池田紀男:第三次救命救急をもつ日赤和歌山医療センターにおける検査当直業務の現況、和歌山県臨衛技 34:26~30、2007