

【原著・臨床】

菌血症患者から分離された *Stenotrophomonas maltophilia* に対する
sulfamethoxazole-trimethoprim の薬剤感受性検査の検討岩崎 教子¹⁾・三宅 典子¹⁾・斧沢 京子¹⁾・西田留梨子¹⁾
門脇 雅子²⁾・清祐麻紀子^{2,3)}・下野 信行^{1,3)}¹⁾九州大学大学院医学研究院病態修復内科学*²⁾九州大学病院検査部³⁾九州大学病院グローバル感染症センター

(平成 26 年 1 月 6 日受付・平成 26 年 10 月 1 日受理)

Stenotrophomonas maltophilia の病原性は低いが、免疫抑制状態の患者に菌血症を起こすと致死的になる。治療薬は sulfamethoxazole-trimethoprim (ST 合剤) が標準的であるが、過去 6 年間に当院で分離された *S. maltophilia* の約 90% が薬剤感受性検査で ST 合剤耐性と報告されていた。当院で *S. maltophilia* に対し行っている薬剤感受性検査は微量液体希釈法 (BMD) だが、判定は必ずしも容易ではない。そこで、2005 年 4 月から 2011 年 3 月までに九州大学病院において血液培養から分離された *S. maltophilia* 22 株を用いて、単独技師による目視判定を追加した BMD (BMD 単独判定)、複数技師による目視判定を追加した BMD (BMD 複数判定)、E test (ET)、寒天平板希釈法 (AD) による薬剤感受性検査を行い、比較検討した。その結果 ST 合剤に対する薬剤感受性は、BMD 単独判定で 90.9%、BMD 複数判定で 54.5%、ET で 27.3%、AD で 31.8% が耐性を示し、BMD の判定の難しさが明らかとなった。標準法である AD との比較では ET で 4.5%、BMD 単独判定では 49.0% に、BMD 複数判定で 13.7% に major error (ME) を認めた。BMD 単独判定で ME が多かった原因としては、判定における目視過程の影響が考えられた。

BMD 単独判定で ME を生じた症例に関しては、予後に影響していた可能性もあり、その臨床背景や治療、転帰について電子カルテ上で後ろ向きに調査した。ME を認めた 13 症例を検討すると、3 例に ST 合剤が投与されており、投与群での死亡率は 33.3% であったのに対し、非投与群では 30% であった。

今回の検討では、幸い ST 合剤投与の有無による死亡率に及ぼす影響を認めなかったが、*S. maltophilia* は ST 合剤に対する BMD による薬剤感受性判定が困難であることを考えると、判定困難な場合には ET を併せて判断することが望ましいと考えられた。

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*, sulfamethoxazole-trimethoprim, broth microdilution method, E test, agar dilution method

Stenotrophomonas maltophilia は環境中に生息する好気性グラム陰性桿菌である。*S. maltophilia* は病原性は低いものの免疫抑制状態の患者に菌血症を起こすと致死的となるため、易感染宿主の多い病棟では院内感染対策も重要である¹⁾。また、わが国で使用頻度の高いカルバペネム系薬をはじめとする多くの抗菌薬に対して耐性であり、感染症を発症した場合には難治性である²⁾。中心静脈カテーテルの存在も予後不良となり、カテーテル関連血流感染と診断された場合には早期のカテーテル抜去が重要である³⁾。治療は ST 合剤が推奨されているものの⁴⁾、当院において過去 6 年間に血液培養から分離された *S. maltophilia* は今回の検討以前の方法、つまり 1 名の微生物検査技師による目視で最終判定を行った微量液体希釈法で約 90% が ST 合剤耐性と報告され、他のこれまでの報告と比

較し高い耐性率を示していたこともあり、必ずしも治療薬として選択されていなかった。当院で *S. maltophilia* に行っている薬剤感受性検査は微量液体希釈法だが、判定が必ずしも容易ではないことが当院で ST 合剤耐性率が高い一因となっている可能性があった。そこで当院の血液培養から分離された *S. maltophilia* 株を用いて複数の微生物検査技師による目視判定を追加した微量液体希釈法の再検査に加えて、寒天平板希釈法、E test を行い、ST 合剤に対する薬剤感受性を比較した。また、すべての株の分離された症例の臨床背景、治療、転帰を電子カルテ上で調査した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

使用菌株は、2005 年 4 月から 2011 年 3 月までに九州

Table 1. Comparison of antimicrobial susceptibility of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Stenotrophomonas maltophilia* by the agar dilution method, E test and broth microdilution method

	Susceptible (n)	Resistant (n)	Percentage susceptibility
Agar dilution (AD)	15	7	68.2%
E test (ET)	16	6	72.7%
Broth microdilution method (BMD pl) ^{*1}	12	10 ^{*2}	54.5%

*1: Assessment by multiple medical technologists with gross observation

*2: Susceptibility of 3 strains in broth microdilution method were pended as they were difficult to determine by visual judgment.

大学病院において、血液培養 23,384 検体から分離された *S. maltophilia* 22 株を用いた。同一症例からの 1 カ月以内に分離された株は 1 検体とみなし、最初の分離株を用いた。また、微量液体希釈法 (以下 BMD) では精度管理株として *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を用いた。

2. 薬剤感受性検査

BMD は、一晚培養した菌株を用いて McFarland No.1.0 に調整した菌液をドライプレート (栄研化学) に接種した。35°C 24 時間静置培養したプレートを IA20 MICmkII (KODEN) で 3 次元画像情報として取り入れ、自動読み取りを行った。そのうえで ST 合剤の感受性に関しては、自動読み取り後、全株に対して目視を追加し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁵⁾ の標準法に従って 80% 以上の発育阻止を MIC 値として決定した。今回の検討以前の BMD では、目視による追加判定は 1 名の微生物検査技師が行った (以下 BMD 単独判定)。この目視過程で菌の 80% 以上の発育阻止を判定する際に、技師間で差が出るのが予想された。そのため、今回の再検査では目視による追加判定は 2 名の技師、うち 1 名は十分な経験を有する微生物検査技師で行った (以下 BMD 複数判定)。

寒天平板希釈法 (以下 AD) は、力価の明確な sulfamethoxazole と trimethoprim (塩野義製薬) の各原末を用い CLSI⁵⁾ の標準法に従って、MIC 値を決定した。

E test (以下 ET) は、シスメックス・ビオメリューの添付文書に従って検査し、MIC 値の判定を行った。AD, ET 感受性検査の培地はすべて Mueller-Hinton 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を使用した。すべての検査法において感受性の判定は CLSI に準じて行った。

3. Error 分類

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M23-A2⁶⁾, FDA⁷⁾ の手順に従い Error 分類を行った。すなわち、AD で耐性、他法で感性の場合を very major error (VME), AD で感性、他法で耐性の場合を major error (ME), AD で耐性または感性、他法で中間、または AD で中間、他法で耐性または感性を mi-

nor error (mE) と分類した。なお、CLSI 標準法による ST 合剤感受性の解釈には中間が設定されていないため本検査における mE は認めなかった。

4. 臨床背景

臨床背景の検討は、今回用いた 22 株が分離された 22 症例を対象とし、その臨床背景、治療、転帰、予後について電子カルテ上で後ろ向きに調査した。また、Error 分類で ME と判定された症例については、その後の ST 合剤投与の有無、転帰について調査し臨床への影響を検討した。

II. 成績

1. 薬剤感受性検査結果

BMD で行った精度管理株の MIC 値はすべて精度管理の範囲内であった。BMD 単独判定および BMD 複数判定、AD, ET の 3 種類の薬剤感受性検査により得られた結果を Table 1 に示した。AD と ET, BMD 複数判定では感性率はほぼ同等の結果となったのに対し、BMD 単独判定では感性率 9.1% と大きな差異がみられた。BMD による *S. maltophilia* に対する ST 合剤の感受性検査では目視判定による影響が大きいと考えられる結果となった。

薬剤感受性検査 3 法すべてにおいて感性和判定された株は Fig. 1a に示すように、BMD の目視で完全に発育阻止されていた。同様に 3 法すべてで耐性と判定された株は Fig. 1c で示したように BMD のプレートの目視で完全な発育を認めた。一方で、Fig. 1b のようにウェル全体に薄く発育を認めている株が、BMD での目視判定の問題となるのが本検討の結果からわかった。

使用菌株のすべてについて、十分な経験を有する微生物検査技師 1 名以上を加えた 2 名以上の技師による目視判定を追加し再検査 (BMD 複数判定) したところ、BMD 単独判定では全 22 株中 20 株が BMD で耐性と判定されていたが、BMD 複数判定では耐性 20 株のうち 10 株は感性に変更となり、22 株中 7 株は BMD 単独判定と同じく耐性の判定であった。Fig. 1b に示したようにわずかな発育を判定する株で 80% 以上の発育阻止と判定することが困難な株では、検査技師ごとに判定が異なり、判定保留 (Pending) となった。

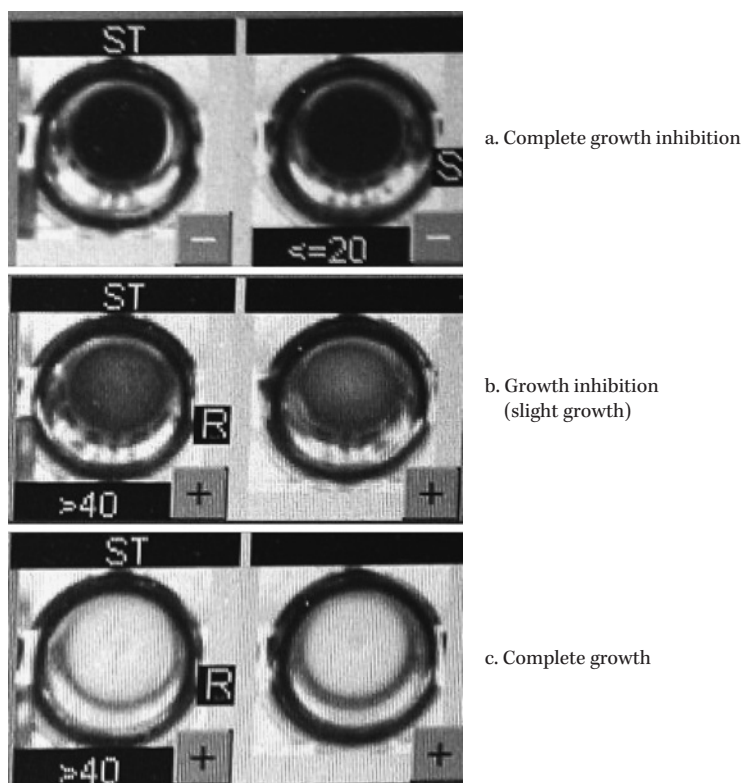


Fig. 1. Growth patterns of *Stenotrophomonas maltophilia* in the broth microdilution method.

Table 2. Discordant results among the susceptibility tests of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Stenotrophomonas maltophilia* (number and category of errors of broth microdilution method and E test compared with agar dilution method)

Susceptibility Methods	Number of errors (%)		
	VME ^{*2} n (%)	ME ^{*3} n (%)	mE ^{*4} n (%)
Broth microdilution method (BMD pl) ^{*1}	0 (0)	3 (13.7)	—
E test (ET)	1 (4.5)	0 (0)	—

*1: Assessment by multiple medical technologists with gross observation

*2: very major error, *3: major error, *4: minor error

2. Error 分類

Table 2 に AD を基準とした、ET と BMD の Error 分類の結果を示した。VME は BMD との比較においては検出されなかったが、ET では 4.5% に検出された。ME は ET との比較では検出されなかったが、BMD との比較で BMD 単独判定で 49.0% に、BMD 複数判定で 13.7% に検出された。

3. 臨床背景

Table 3 に今回使用した 22 株が検出された患者の臨床背景を示した。男性 14 症例、女性 8 症例で、年齢は 1 歳から 82 歳で、中央値は 50.3 歳であった。1 カ月以内に *S. maltophilia* が関与したと思われる死亡例は 8 症例 (36.4%) であった。最も頻度の高い基礎疾患は血液疾患 10 症例 (45.5%) で、次いで肝・胆道・膵疾患 5 症例 (22.7%)、肝移植施行後の症例 4 症例 (18.1%) であった。

循環器疾患 2 症例はいずれも左室補助人工心臓装着中の患者で、基礎疾患のない患者は 1 症例であった。治療量以上と考えられる ST 合剤を投与されていた患者は全体の 4 症例 (18.1%) にすぎず、それ以外は minocycline や ciprofloxacin など治療が行われていた。

Table 4 に ST 合剤投与の有無とその転帰について示した。22 症例のうち ST 合剤を投与されていた患者の生存率は 75% (3/4 症例) であるのに対し、ST 合剤を投与されていない患者の生存率は 61.1% (11/18 症例) であった。

4. ME 症例における治療と転帰

Table 5 に、Error 分類で ME と判定した 13 症例の ST 合剤治療の有無による転帰を示した。ST 合剤投与群は 3 症例 (23.1%) で、そのうち死亡したのは 1 症例 (33.3%) であった。投与されなかった群での死亡率は

Table 3. Clinical features of 22 patients with bacteremia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*

Characteristics	Cases (%)
Sex: male/female	14/8
Age: mean (range) years	50.3 (1-82)
Number of death caused by bacteremia of <i>S. maltophilia</i>	8 (36.4%)
Underlying diseases:	
Hematological disease	10 (45.5%)
Hepatobiliary and pancreatic disease	5 (22.7%)
Liver transplant	4 (18.1%)
Cardiac disease	2 (9.0%)
Infectious disease	1 (4.5%)
Treatment:	
Sulfamethoxazole-trimethoprim	4 (18.1%)
Prior antibiotic therapy with carbapenem	20 (90.1%)
Prior isolation of <i>S. maltophilia</i> from other sites	19 (86.3%)
Presence of central venous catheter	17 (74.0%)
Concurrent neutropenia	10 (45.0%)
Steroid therapy	10 (45.0%)
Immunosuppressive agents	10 (45.0%)

Table 4. Prognosis of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia patients with and without sulfamethoxazole-trimethoprim administration

Sulfamethoxazole-trimethoprim administration	Survivors (%)	Non survivors (%)
Yes	3 (75%)	1 (25%)
No	11 (61.1%)	7 (38.9%)
Total (%)	14 (63.6%)	8 (36.4%)

Table 5. Prognosis of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia patients with and without sulfamethoxazole-trimethoprim administration with major error

Sulfamethoxazole-trimethoprim administration	Survivors (%)	Non survivors (%)
Yes	2 (66.6%)	1 (33.3%)
No	7 (70.0%)	3 (30.0%)
Total (%)	9 (69.2%)	4 (30.8%)

30% (3/10 症例) であった。

III. 考 察

過去6年間に当院の血液培養から分離された *S. maltophilia* に対する ST 合剤の感受性結果は、BMD 単独判定では約 90% が耐性と報告されていた。Farrell らの 2010 年の報告⁸⁾では、北米で 2.4%、ヨーロッパで 1.1%、ラテンアメリカで 4.5% が ST 合剤に耐性を示していたのに対し、アジア大西洋地域では 9.2% が耐性である。他にも中国で 30.4%⁹⁾、トルコで 28.3%¹⁰⁾、台湾で 31.4%¹¹⁾ と ST 合剤の耐性率が報告され、特にアジアでの ST 合剤耐性株の増加が注目されている¹²⁾。患者背景に関連して耐性率が高いことも考えられ¹²⁾、嚢胞性線維症患者における検討では、ST 合剤の耐性率は、76~84% との報告がある¹³⁾。当院での ST 合剤に対する耐性率が高かった原因として、地域的なものや患者背景として易感染宿主が多く、ST 合剤による予防の機会が多かったことなどが考えられた。しかしながら、耐性率が異常に高いことを再検討する過程で、感受性試験の過程をも見直す必要があると考えられた。特に日常の検査で用いる BMD による判定は、IA20MICmkII の自動読み取りに加えて 80% 以上の発育阻止の有無を目視で追加確認し最終判定を行っ

ているが、この過程が判定者による差異を生みやすいと考えられ、本研究を行うにいたった。

S. maltophilia における ST 合剤の感受性検査の場合、培地内の拮抗物質がわずかな菌の発育を引き起こすため、CLSI や EUCAST では、20% 以下の発育は無視する、すなわち 80% 以上の発育阻止を感性とすると定められているが、自動読み取りや目視での 80% という数値化は困難で、これまでも BMD と他法の正確性やそれぞれの相関について検討されている¹⁴⁾。ST 合剤に対する AD と ET による薬剤感受性検査は正確性に富み、両者間においては良好な相関関係が認められている。われわれの結果でも、AD の感性率は 68.2% であったのに対し、ET では 72.7%、BMD 単独判定では 9.1%、BMD 複数判定では、54.5% であった。ET と AD では同様の傾向を示すものの、BMD では単独判定のように結果が乖離しやすい。AD を基準とした BMD 単独判定で ME を認めた株のドライプレートを再評価したところ、ウェル全体に薄い発育を認めていた。これらに対し、BMD 単独判定で 80% 以上の発育阻止の判定に厳しい判定を行っていた可能性が高い。これをふまえ、微生物検査技師複数名による再

検査を行ったが、それでも3株は判定保留であった。この3株はAD, ETでは感性であった。

今回の検討からS. maltophiliaに対するST合剤の感受性検査はADやETが正確性に優れていると思われたが、ADは正確性が高いものの日常検査として行うには煩雑であり、ETは正確性も高く再現性にも富み簡便な検査法であるが、日常検査として行うにはコスト面での問題が生じる。

この検討後当院ではBMDにて薬剤感受性検査を行い、複数名の微生物検査技師の目視追加判定を行い、それでも判定が困難である場合はETを追加することとした。

S. maltophilia 感染症の治療においては、これまで臨床試験による検討は行われていないが、ST合剤による治療が標準とされているものの、*in vitro*での感性率と治療成績は必ずしも一致しないとされている^{10,14}。さらにこれまで、分離された菌株に対し感性を示す抗菌薬を治療初期から投与した症例では、死亡率が減少していたという報告¹⁵がある一方、ST合剤は転帰に影響しなかったとの報告¹⁶がある。今回の検討以前の検査報告でMEと判定された、すなわちBMD単独判定で耐性、ADで感性の症例において、薬剤選択および治療成績に及ぼす影響が懸念されたために、臨床的検討も行った。幸いST合剤投与の有無による予後に差は認めなかった。全22症例でST合剤投与と転帰を検討した結果でも、予後に差は認めなかった。

今回の検討では基礎疾患として、血液疾患や肝移植後の症例が半数以上を占め、血液疾患10例のうち、移植後の症例は8例を占め、そのうち5例は再発、1例は移植直後より感染を合併、1例はGVHDを合併していた。肝移植後の4症例は、いずれも術後感染コントロールに難渋した症例であった。Paezらも初期の状態が予後に影響すると報告¹⁷していたが、原疾患のコントロールが不良な症例が多かったことが転帰に影響していたと考えられた。また、中心静脈カテーテル(CVC)を抜去できなかった症例は、その80% (5症例のうち4症例)が死亡しており、CVCの抜去の有無は予後を左右していたと考えられた。幸い当院での治療薬としてST合剤の選択の有無は予後に影響を与えていなかったが、BMDによる検査での判定には注意し、ETでも再検討する必要があると考えられた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Palleroni J N, Bradbury J F: *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 606-9
- 2) Spencer R C: The emergence of epidemic, multiple-antibiotic-resistant *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* and *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *J Hosp Infect* 1995; 30 (Suppl): 453-64
- 3) Hampton A A, Sherertz R J: Vascular-access infections in hospitalized patients. *Surg Clin North Am* 1988; 68: 57-71
- 4) Denton M, Kerr K G: Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 57-80
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22, CLSI, Wayne, Pa, USA, 2012
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved standards M23-A2, NCCLS, Wayne, 2000
- 7) FDA: Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health, 2007
- 8) Farrell D J, Sader H S, Jones R N: Antimicrobial susceptibilities of worldwide collection of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates tested against tigecycline and agents commonly used for *S. maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2735-7
- 9) Hu L F, Chang X, Ye Y, Wang Z X, Shao Y B, Shi W, et al: *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfr* genes in a plasmid-mediated class I integron. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 230-4
- 10) Gulmez D, Hascelik G: *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 880-6
- 11) Wang C H, Lin J C, Lin H A, Wang N C, Chiu S K, Lin T Y, et al: Comparisons between patients with trimethoprim-sulfamethoxazole-susceptible and trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* monomicrobial bacteremia: A 10-year retrospective study. *J Microbiol Immunol Infect* 2014 doi: 10.1016/j.jmii.2014.06.005 [Epub ahead of print]
- 12) Looney W J, Narita M, Muhlemann K: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 312-23
- 13) Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, Konig C, Hebestreit H, et al: Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 123-7
- 14) Nicodemo A C, Araujo M R, Ruiz A S, Gales A C: In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, E-test and dilution methods. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 604-8
- 15) Senol E, DesJardin J, Stark P C, Barefoot L, Snyderman D R: Attributable mortality of *Stenotrophomonas mal-*

- 16) Garazi M, Singer C, Tai J, Ginocchio C C: Blood-stream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review. J Hosp Infect 2012; 81: 114-8
- 17) Paez J I, Costa S F: Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. J Hosp Infect 2008; 70: 101-8

A study on the antimicrobial susceptibility testing of trimethoprim-sulfamethoxazole against *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from bacteremia patients

Noriko Iwasaki¹⁾, Noriko Miyake¹⁾, Kyoko Onozawa¹⁾, Ruriko Nishida¹⁾,
Masako Kadowaki²⁾, Makiko Kiyosuke^{2,3)} and Nobuyuki Shimono^{1,3)}

¹⁾ Faculty of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

²⁾ Faculty of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

³⁾ Center for the Study of Global Infection, Kyushu University Hospital

The virulence of *Stenotrophomonas maltophilia* is low, but once it causes bacteremia in immunocompromised patients, the course sometimes becomes fatal. Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST) is the standard antimicrobial agents for the treatment of *S. maltophilia*. In our hospital, the resistance rate of *S. maltophilia* against ST had been reported at around 90%.

Our institution uses the broth microdilution method in antimicrobial susceptibility testing (AST) for *S. maltophilia*, but assessment of the result is not always easy. From April 2005 through March 2011, 22 clinical strains of *S. maltophilia* were isolated from bacteremia patients in Kyushu University Hospital in Japan. Using these strains, we compared the results of 4 different AST methods; the broth microdilution method (BMD) combined with visual judgment by a single medical technologist (BMD sgl) and BMD judged by two or more experienced medical technologists (BMD pl), an E test (ET) and the agar dilution method (AD).

The results demonstrated the following AST resistance: 90.9% with BMD sgl, 54.5% with BMD pl, 27.3% with ET, and 31.8% with AD. From these results, it has become apparent the difficulty of visual assessment in BMD. Compared to AD, which is regarded as a standard method, we detected major errors (ME) in 4.5% with ET, 49.0% with BMD sgl and 13.7% with BMD pl. The reason why we observed more ME cases in BMD was judged to be the influence of the gross visual assessment process. With regard to the adverse effects of ME cases in BMD sgl, we studied the clinical and laboratory information by extracting digital medical records. In 13 cases with ME, in BMD sgl, ST was administered in 3 cases, and the mortality rate was 33.3%, whereas the mortality rate of the cases without administration of ST was 30%.

Fortunately, there was no significant adverse difference between the groups with or without administration of ST. However, considering the difficulty in evaluating the AST results of ST against *S. maltophilia* with BMD, we should try ET for confirmation of the results.