

# 12 薬剤感受性試験の平準化へ向けての取組み

中央家畜保健衛生所  
浦川 了

薬剤感受性試験は細菌感染症治療のための薬剤選択、薬剤耐性菌の調査等を目的として日常的に実施される。

定法では臨床・検査標準協会指針<sup>1)</sup>に従い、目視で濁度を確認、菌液調整するが検査者により調整濃度の誤差が大きくなり、検査結果に差が生じ誤判定を生む可能性がある。また、家保職員の薬剤感受性試験の技術精度について把握されておらず、適切な方法で実施しているか不明である。

今回、薬剤感受性試験技術の現状把握及び平準化へ向けた取組みを実施した。

## 1 試験実施職員

6家保15名の職員を対象とし、各職員の勤続年数は1年未満から36年と幅広くなるよう抽出した。

## 2 材料及び方法

供試菌株は *Escherichia coli* ATCC25922 (Ec)、*Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Sa) を用いた。

薬剤感受性ディスクはベクトンディッキンソンのBDセンシディスクを用いた。薬剤はアンピシリン、セファゾリン、カナマイシン、ドキシサイクリン、ノルフロキサシン、ST合剤を使用した。

薬剤感受性試験は1濃度ディスク拡散法で実施し、3つの条件のもと実施し、それぞれを試験1、2、3とした。

また、菌液調整の精度確認のため、Ecの菌数測定を実施した。

## 3 薬剤感受性試験実施状況調査

試験実施職員に対し、菌希釈液の種類、菌液濁度、濁度確認方法、培地の種類、培地の添加量、ディスクの保管方法、阻止円測定器具について調査を実施した結果、菌液濁度は一部が定法よりも濃い濁度で実施していた。

培地の厚さは一部が4mm以上であり、培地の種類は一部でハートインフュージョンアガーを使用していた。

ディスクの保管方法は全て冷蔵保存であったが、乾燥剤を使用している職員は1名だけであった(表-1)。

表-1 実施状況調査

職員	希釈液	菌液濁度 (McF)	菌液濁度 確認方法	薬剤感受性試験用 培地の厚さ(mm)	培地の種類	保管方法	測定器具
a	減菌生食	1	目視法	4	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	デジタルノギス
b	減菌生食	6	確認未実施	6	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	デジタルノギス
c	減菌生食	1	目視法	6	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	デジタルノギス
d	減菌生食	0.5	目視法	5	MHA+イースト	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
e	減菌生食	1	目視法	5	MHA+イースト	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
f	減菌生食	1	確認未実施	4	MHA+イースト	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
g	減菌PBS	0.5	目視法	5	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
h	減菌PBS	0.5	目視法	4	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
i	減菌生食	1	目視法	4	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	デジタルノギス
j	減菌PBS	1~2	目視法	6	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	デジタルノギス
k	減菌生食	1	目視法	6	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
l	減菌生食	1	目視法	6	MHA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
m	減菌生食	3	確認未実施	5	HIA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
n	減菌生食	0.5	目視法	6	HIA	冷蔵 (乾燥剤なし)	ノギス
o	減菌生食	0.5	目視法	6	HIA	冷蔵 (乾燥剤あり)	ノギス

※MHA: Mueller Hinton Agar HIA: Heart Infusion Agar

## 4 薬剤感受性試験

### (1) 試験1

各家畜保健衛生所で用いるディスク及び培地を用いて各職員が日頃実施している方法で実施した。

その結果、Ecについては精度管理限界値外れ値(外れ値)は24項目で確認され、複数薬剤が外れ値であった職員は6名確認された。標準偏差は2.64~4.64であった(表-2)。

Saについては、外れ値は31項目で確認され、複数薬剤が外れ値であった職員は8名確認され

た。標準偏差は 3.59 から 4.66 であった (表-3)。

表-2 試験1結果 (Ec)

精度管理 限界値	阻止円直径 (mm)						菌液の濁度 (McF)
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST	
a	21	25	22	22	33	28	1
b	19	24	24	23	31	24	6
c	20	25	21	22	25	25	1
d	19	23	17	21	29	25	0.5
e	18	19	15	18	26	21	1
f	18	21	16	21	27	23	1
g	10	14	10	14	24	14	0.5
h	22	27	23	25	34	30	0.5
i	21	24	22	22	34	28	1
j	18	20	18	18	29	22	1~2
k	19	23	24	20	32	25	1
l	21	25	27	24	33	29	1
m	16	21	19	20	29	16	3
n	20	24	22	21	32	18	0.5
o	17	17	16	23	22	19	0.5
標準偏差	2.8	3.36	4.27	2.64	3.7	4.64	

表-3 試験1結果 (Sa)

精度管理 限界値	阻止円直径 (mm)					
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST
a	28	28	23	34	24	26
b	42	40	21	32	27	34
c	27	26	21	25	20	26
d	30	28	19	28	21	22
e	27	27	18	26	19	23
f	28	28	18	25	19	22
g	28	22	12	20	14	16
h	32	35	24	30	24	30
i	32	34	24	31	24	29
j	27	27	16	24	19	20
k	29	26	23	26	19	25
l	31	32	24	30	25	30
m	28	27	21	23	21	24
n	34	34	25	28	23	25
o	27	29	15	27	14	18
標準偏差	3.85	4.43	3.71	3.59	3.63	4.66

### (2) 試験 2

同一ロットの薬剤感受性試験用培地、ディスクで実施し、培地の厚さは 4 mm、菌液の濁度はマクファーランド (McF) 0.5 に調整するよう統一した。さらに、各自で作成した McF0.5 の Ec 菌液の菌数を定法により測定した。

その結果、Ec については、試験 1 と比較して外れ値であった項目は 16 項目と減少したが、複数薬剤が外れ値であった職員が確認された。

標準偏差は 1.89 から 5.29 であり、試験 1 と比較して阻止円直径のばらつきはあまり改善されなかった。

McF0.5 菌液の菌数は多くの職員が基準値である  $1 \sim 2 \times 10^8$  CFU/ml を満たしていないことが判明した (表-4)。

Sa については、Ec と同様試験 1 と比較して外れ値であった項目は 24 項目と減少したが、複数薬剤が外れ値であった職員が確認された。

標準偏差は 3~4.6 であり、阻止円直径のばらつきはあまり改善されなかった。(表-5)

表-4 試験2結果 (Ec)

精度管理 限界値	阻止円直径 (mm)						McF0.5の菌数 (CFU/ml)
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST	
a	24	27	22	24	31	29	$2.5 \times 10^6$
b	21	27	23	23	35	28	$4.4 \times 10^7$
c	21	26	25	23	36	29	$2.3 \times 10^6$
d	22	25	21	21	30	25	$1.2 \times 10^8$
e	18	23	19	20	29	25	$2.8 \times 10^7$
f	19	23	19	20	29	25	$2.1 \times 10^7$
g	10	14	12	20	14	14	$2.1 \times 10^7$
h	22	28	23	25	33	30	$4.6 \times 10^6$
i	22	25	23	22	35	29	$9.6 \times 10^7$
j	17	20	18	18	31	24	$6.2 \times 10^6$
k	18	24	23	21	33	26	$1.7 \times 10^6$
l	21	25	27	24	32	29	$1.2 \times 10^6$
m	16	27	23	23	32	29	失敗
n	23	27	23	21	34	28	失敗
o	14	18	18	20	24	21	$1.3 \times 10^8$
標準偏差	3.66	3.77	3.49	1.89	5.29	4.04	

表-5 試験2結果 (Sa)

精度管理 限界値	阻止円直径 (mm)					
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST
a	31	30	24	35	23	31
b	32	33	24	27	22	28
c	35	31	27	30	22	29
d	29	28	22	26	20	24
e	26	28	22	26	20	24
f	30	30	21	27	20	24
g	24	22	12	20	14	18
h	32	34	24	30	23	31
i	34	35	26	29	26	30
j	24	26	17	23	18	22
k	28	26	23	25	18	27
l	31	32	24	30	25	30
m	32	34	23	23	23	26
n	34	34	28	29	22	29
o	25	27	17	25	18	15
標準偏差	3.54	3.65	4.04	3.56	3	4.6

### (3) 試験 3

試験 2 の結果において外れ値が 2 薬剤以上または菌液の菌数が  $10^7$  CFU/ml 未満及び菌数測定失敗であった職員を対象に実施した。

実施方法は基本試験 2 と同様で、菌液調整方法をチップ法<sup>2)</sup>に変更して実施した。

また、チップ法により調整された McF0.5Ec 菌液について菌数測定を実施した。

その結果、Ec では外れ値が 1 項目のみであり、McF0.5 菌液の菌数は 1 名を除いて  $1 \times 10^8$  CFU/ml に近い値となった。

標準偏差は ST 合剤が 1 名大幅な外れ値であったため 4.03 となったが、他の薬剤は 1.27~2.06 となり、試験 1、2 と比較して阻止円の直径のばらつきは大幅に改善された (表-6)。

Sa についても、外れ値は 1 項目のみであり、標準偏差は 1.37~2.61 であったことから、阻止円直径のばらつきは大幅に改善された (表-7)。

表一六 試験3結果(Ec)

	阻止円直径(mm)						McF0.5の菌数 (CFU/ml)
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST	
精度管理 限界値	16-22	21-27	17-25	18-24	28-35	23-29	
a	22	26	22	23	30	27	2.5×10 <sup>8</sup>
c	20	27	23	22	29	27	3.9×10 <sup>8</sup>
g	18	21	20	20	31	25	2.1×10 <sup>7</sup>
h	21	26	21	23	32	28	6.4×10 <sup>7</sup>
j	19	21	18	20	28	23	1.1×10 <sup>8</sup>
k	18	24	22	21	32	25	6.4×10 <sup>7</sup>
l	17	22	20	21	29	25	2.7×10 <sup>8</sup>
m	18	23	17	22	29	25	3.3×10 <sup>7</sup>
n	17	22	19	19	28	13	1.1×10 <sup>10</sup>
o	20	23	23	22	34	26	1.1×10 <sup>8</sup>
標準偏差	1.61	2.06	1.96	1.27	1.89	4.03	

表一七 試験3結果(Sa)

	阻止円直径(mm)					
	ABPC	CEZ	KM	DOXY	NFLX	ST
精度管理 限界値	27-35	29-35	19-26	23-29	17-28	24-32
a	34	33	26	31	23	29
c	27	30	23	25	22	24
g	30	32	23	27	21	27
h	30	32	24	25	21	26
j	27	30	19	25	19	24
k	27	30	21	26	19	24
l	34	30	20	26	22	26
m	27	30	19	26	17	25
n	28	29	20	25	20	26
o	29	33	25	25	24	29
標準偏差	2.61	1.37	2.4	1.76	1.99	1.79

## 5 まとめ及び考察

試験1では各職員で菌液濁度や培地の厚さ等検査方法が統一されておらず、試験の結果、外れ値の項目が多く、阻止円直径のばらつきも大きい状況であった。試験2では検査資材と菌液濃度を統一して実施したがあまり改善が確認されず、原因として菌液調整方法に不備があると思われた。試験3では検査資材、菌液濃度、菌液調整方法をチップ法に統一して実施した結果、阻止円のばらつきは大幅に改善された。

以上のことから、薬剤感受性試験を適正に実施するためには、菌液調整が最も重要であると考えられた。

## 7 参考文献

(1) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24 (2014)

(2) 船守: 薬剤感受性試験におけるマイクロチップを用いた菌液調整方法の検討, 広島県畜