

FIG. 1. Comparison of the amino acid sequence of GES-3 with those of the GES-1, GES-2, and IBC-1 β -lactamases. Only the substituted amino acid residues are indicated by the single-letter amino acid code. Dashes represent positions where no amino acid substitution was observed among the four enzymes. The amino acid residues conserved among class A β -lactamases are indicated with asterisks.

Genetic environment of bla_{GES-3} . Two distinct BamHI fragments carrying the bla_{GES-3} gene were cloned; their sizes were approximately 6.7 and 11.6 kb, respectively, and pKGB525 had the 6.7-kb fragment. Sequencing analysis of the entire insert on pKGB525 revealed that the bla_{GES-3} gene was located as a gene cassette within a class 1 integron structure, as was observed in the other GES-type β -lactamase genes, bla_{GES-1} , bla_{GES-2} , and bla_{IBC-1} (Fig. 2). The 59-base element downstream of the bla_{GES-3} gene was made up of 110 bp and was different from that of the truncated 59-base element of bla_{GES-1} on pTK1 (GenBank accession number AF156486), but shared it 99% nucleotide identity with those of bla_{GES-2} on pLAP-1 (GenBank accession number AF326355) and bla_{IBC-1} on pHT9-2 (GenBank accession number AF208529).

The second gene cassette adjacent to the bla_{GES-3} gene was a fused *aacA1-orfG* gene cassette. The results of the disk diffusion test indicated that the presence of an *aacA1* component, which encodes aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase, conferred kanamycin resistance to the transformant *E. coli* XL1-Blue(pKGB525) (data not shown). The nucleotide sequence of this fused gene cassette shared 100% identity with that in a class 1 integron on plasmid pCMXR1 (GenBank accession number AB061794). The function of the product encoded by *orfG* has not been characterized in detail. The third gene cassette is 327 bp and was named *orfA*. The *orfA* gene was

suggested to be a gene cassette by recognition of the features typical of these elements: (i) the presence at the cassette boundaries of 7-bp core site sequences that completely fit the consensus sequence and (ii) the presence of a 59-base element of 78 bp downstream of the *orfA* gene. However, no remarkable similarity between the hypothetical protein encoded by *orfA* and any other known protein sequences was detected in a search performed with the BLAST program. The 3' conserved segment of this integron showed a characteristic organization. The *qacE Δ 1* gene was truncated at nucleotide position 114 by the insertion sequence IS26. In the region downstream of IS26, an IS6100 element and two ORFs of unknown function, i.e., *orf5* and *orf6*, were found. The nucleotide sequence of the 1.4-kb region containing IS6100, *orf5*, and *orf6* was identical to that seen downstream of the *sull* gene of the class 1 integron in the chromosomal multidrug resistance locus of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (GenBank accession number AF261825). Sequencing analysis of pKGM525 carrying the second bla_{GES-3} gene on an 11.6-kb fragment was also done, and the bla_{GES-3} gene was also found in a class 1 integron structure with the same gene cassette configuration as in pKGB525. The nucleotide sequence of the region from *int1* to IS26 was the same as that found in pKGB525 carrying a 6.7-kb BamHI fragment.

Construction of IBC-1 by site-directed mutagenesis. Only one amino acid substitution, M62T, was found between the sequences of GES-3 and IBC-1 (Fig. 1). Therefore, to examine whether this amino acid substitution affects the MICs of β -lactams for the *E. coli* clones producing each enzyme, we constructed plasmid pIBC1, which encodes the IBC-1 enzyme under the same promoter as that for GES-3, by site-directed mutagenesis of the bla_{GES-3} gene within the parental plasmid, pGES3. However, this single substitution did not markedly influence the MICs for the *E. coli* clones (data not shown).

PCR detection and genotypic comparison. The remaining five nonrepetitive ceftazidime-resistant *K. pneumoniae* strains, strains KG914, KG1116, KG545, KG502, and KG827, were all found to be bla_{GES} positive by PCR. The results of PFGE analysis of all six isolates are shown in Fig. 3. Their fingerprinting patterns were very similar but in some cases were distinct. We examined the fingerprinting patterns from 48.5 to 194 kb in detail under other conditions (data not shown). Overall, there were from three to seven band differences among the six strains examined. The ERIC-PCR patterns amplified with the ERIC-2 primer were indistinguishable from one another (data not shown). Taken together with the fact that these isolates were collected over a 1-year period, we speculate that they were genetically related and had probably spread via nosocomial transmission of an endemic clone.

Plasmid profiles and Southern hybridization. The plasmid profiles of the six bla_{GES} -positive strains showed the presence of a large plasmid of approximately similar size in five of the six strains (Fig. 4A), while some of them possessed additional plasmids which were smaller and more diverse in size. Hybridization analyses with the probe specific for the GES-type β -lactamase genes, including bla_{IBC-1} , revealed that the location of this gene varied among the strains tested. Hybridization signals for large plasmids were detected for strains KG914, KG1116, and KG502 (Fig. 4B). Hybridization signals for both plasmids and chromosomal positions were observed for

TABLE 3. MICs of antimicrobial agents for the parental strain, transconjugant, and transformant

β -Lactam ^a	MIC (μ g/ml)				
	<i>K. pneumoniae</i> KG525	<i>E. coli</i> CSH-2(pKGC525) ^b	<i>E. coli</i> CSH-2	<i>E. coli</i> XL1-Blue(pKGB525) ^c	<i>E. coli</i> XL1-Blue(pBCSK+)
Ampicillin	>128	>128	4	>128	4
Ampicillin + sulbactam	>128	2	2	2	2
Amoxicillin	>128	>128	8	>128	4
Amoxicillin + clavulanate	>128	32	4	32	4
Piperacillin	128	16	1	16	1
Piperacillin + tazobactam	128	0.5	1	0.5	0.5
Cefotaxime	64	2	0.13	2	0.13
Cefotaxime + clavulanate	8	0.06	0.06	0.06	0.06
Cefotaxime + sulbactam	32	0.06	0.06	0.06	0.06
Cefotaxime + tazobactam	64	0.06	0.06	0.06	0.06
Ceftazidime	>1,024	128	0.13	128	0.13
Ceftazidime + clavulanate	256	4	0.13	4	0.06
Ceftazidime + sulbactam	>128	0.25	0.13	0.5	0.13
Ceftazidime + tazobactam	>128	0.5	0.13	0.5	0.13
Cephaloridine	>128	16	2	16	2
Cefminox	8	0.5	0.5	1	0.5
Moxalactam	4	0.25	0.13	0.5	0.13
Cefpirome	>128	1	0.06	2	0.06
Cefepime	16	0.13	0.06	0.25	0.06
Aztreonam	64	4	0.06	4	0.06
Imipenem	0.25	0.5	0.25	0.13	0.13
Gentamicin	2	0.13	0.13	<0.06	<0.06
Amikacin	64	2	0.25	4	0.25
Levofloxacin	<0.06	0.13	0.13	<0.06	<0.06
Ciprofloxacin	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06

^a Clavulanate, tazobactam, and sulbactam were used at a fixed concentration of 4 μ g/ml each.

^b pKGC525 is a resident plasmid found in *K. pneumoniae* strain KG525, and it carries the *bla*_{GES-3} gene.

^c pKGB525 is a recombinant plasmid that carries a 6.7-kb BamHI insert that mediates the *bla*_{GES-3} gene.

KG525. One of the hybridized plasmids from each of KG914, KG1116, and KG525 were similar in size. A single hybridization signal corresponding to the chromosomal position was detected for each of the strains KG545 and KG827 (Fig. 4C).

pIs of β -lactamases. The pI value of the purified GES-3 enzyme was determined to be 7.0 (Fig. 5A). IEF of crude extracts from six GES-type β -lactamase-producing clinical strains revealed two bands with pIs of 7.6 and 7.0 (Fig. 5B). The band with pI 7.0 was also detected in a GES-3-producing

E. coli transformant which harbored the *bla*_{GES-3} gene of *K. pneumoniae* strain KG525. The band with a pI of 7.6 corresponds to the chromosomally encoded LEN-1 (1) or SHV-type penicillinase of *K. pneumoniae*.

DISCUSSION

Considerable differences in the levels of resistance to various cephalosporins were observed among the *E. coli* clones pro-

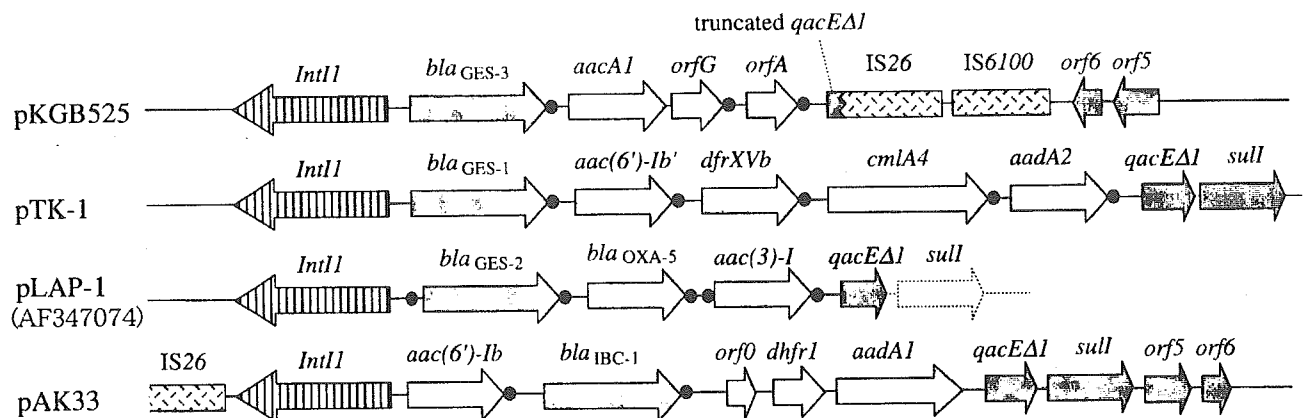


FIG. 2. Schematic comparison of the class 1 integron on pKGB525 with those on pTK1 (GenBank accession number AF156486), pLAP-1 (GenBank accession number AF326355), and pAK33 (34). Filled circles indicate the positions of GTTTRRRY (core site) or the 59-base elements around the gene cassettes. pKGM525, which carries the 11.6-kb BamHI insert, was also sequenced; and the nucleotide sequence from *int11* to IS26 was the same as that found in pKGB525.

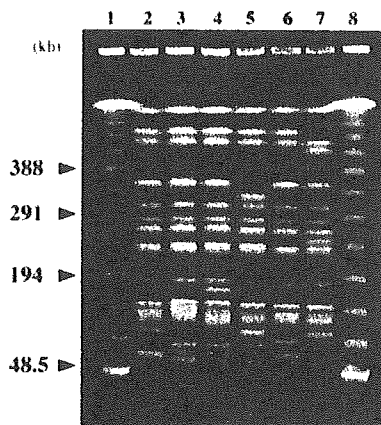


FIG. 3. PFGE analysis of *K. pneumoniae* isolates. Lanes: 1 and 8, PFGE marker; 2, *K. pneumoniae* KG914; 3, *K. pneumoniae* KG1116; 4, *K. pneumoniae* KG525; 5, *K. pneumoniae* KG545; 6, *K. pneumoniae* KG502; 7, *K. pneumoniae* KG827.

ducing GES-1, GES-2, and IBC-1, although the level of production of each enzyme may differ in individual clones. For instance, the MIC of ceftazidime for an *E. coli* clone producing GES-1 was 128 $\mu\text{g/ml}$ (24), while that for an *E. coli* clone producing GES-2 was 8 $\mu\text{g/ml}$ (28). The single amino acid substitution in the Ω loop observed between GES-1 and GES-2, G170N, may well contribute to the difference in the

substrate specificities of these enzymes. On the other hand, the MIC of ceftazidime for an *E. coli* clone producing IBC-1 was $>256 \mu\text{g/ml}$ (11). The only amino acid substitution observed between GES-1 and IBC-1, E104K, might well also be attributed to a higher level of resistance of IBC-1 than that of GES-1 to ceftazidime, cefotaxime, and aztreonam (11, 19, 24). The MIC of ceftazidime for an *E. coli* clone producing GES-3 was 128 $\mu\text{g/ml}$, and GES-3 has a single M62T substitution compared with the sequence of IBC-1, which also confers high-level resistance to ceftazidime in an *E. coli* clone (MIC, $>256 \mu\text{g/ml}$). We investigated whether this one amino acid substitution observed between GES-3 and IBC-1 affects the MICs for *E. coli* clones expressing each enzyme. However, this substitution did not result in significant changes in the MICs for the *E. coli* clones. This finding suggests that the amino acid substitution at position 62 may not play a crucial role in the extended substrate specificity of GES-3 against ceftazidime and that those at positions 104 and 170 would be crucial for extended-spectrum enzyme activity.

In the present study, we also isolated a novel GES-type class A enzyme, GES-3, from *K. pneumoniae* strains which caused neonatal nosocomial infections in 2002 in Japan. Sequence analysis of the genetic environments of the $bla_{\text{GES-3}}$ genes on pKGB525 carrying a 6.7-kb insert and pKGM525 carrying a 11.6-kb insert revealed that the $bla_{\text{GES-3}}$ genes were located as gene cassettes in class 1 integrons, as observed in other GES-type β -lactamase genes, including $bla_{\text{IBC-1}}$ (Fig. 2). Integrons are very sophisticated site-specific recombination systems that capture various gene cassettes, including antibiotic resistance genes, between their 5' and 3' conserved segments (14, 15, 22). The gene cassettes for the GES-type enzymes with a very close phylogenetic relationship might have originated as a single clone and then disseminated worldwide with the help of class 1 integrons possessing very similar genetic organizations. These integrons are mediated by self-transmissible plasmids with a wide host range. Since very similar GES enzymes have so far been found in French Guiana, Greece, South Africa, Portugal, and Japan, these GES-type β -lactamase-producing strains might have been scattered globally by the recent extensive international travel or dissemination of humans, foods, and animals.

In the present study, we analyzed genetic relatedness using PFGE and ERIC-PCR of all six GES-type β -lactamase-producing *K. pneumoniae* strains isolated in a NICU over a 1-year period. Since the fingerprinting patterns obtained by PFGE and ERIC-PCR were very similar, these isolates were suggested to belong to the same genetic lineage that caused the nosocomial spread. The minor differences in the fingerprinting patterns obtained by PFGE might be due to the occurrence of genetic rearrangements over the course of the nosocomial spread. Interestingly, the results of Southern hybridization suggested that the locations of the bla_{GES} genes were multiple and diverse among the six strains studied. By consideration of the results of PFGE, ERIC-PCR, and Southern hybridization, it can be speculated that an endemic strain containing the bla_{GES} genes might have spread within the NICU setting over the 1-year period and might have undergone genetic rearrangements, including translocation and multiplication of the bla_{GES} gene.

The presence of multiple $bla_{\text{GES-3}}$ genes in strain KG525 is

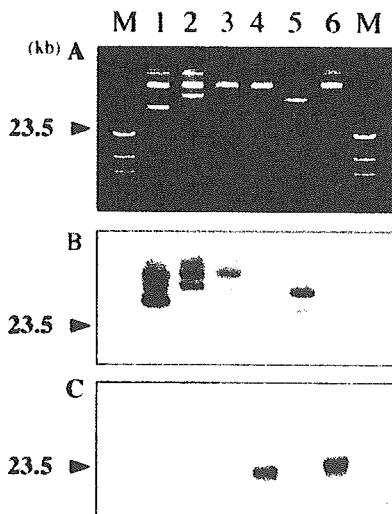


FIG. 4. Plasmid profiles and Southern hybridization analysis. (A) Plasmid profiles of each strain prepared by the method of Kado and Liu (16); (B) hybridization to large plasmids harbored by each strain; (C) hybridization to the chromosomal position of each strain. The photograph of the results of gel electrophoresis of chromosomal DNAs prepared by the method of Stauffer et al. (35) was omitted. The large plasmids and chromosomal DNA were separately extracted by using freshly prepared reagents to avoid cross contamination of nicked or physicochemically amputated DNA fragments. For strains KG545 and KG827, the bla_{GES} gene was suggested to be encoded by the chromosome. In strain KG525, the bla_{GES} gene was suggested to be encoded by both the plasmid and the chromosome. Lanes: M, HindIII-digested DNA marker; 1, *K. pneumoniae* KG914; 2, *K. pneumoniae* KG1116; 3, *K. pneumoniae* KG525; 4, *K. pneumoniae* KG545; 5, *K. pneumoniae* KG502; 6, *K. pneumoniae* KG827.

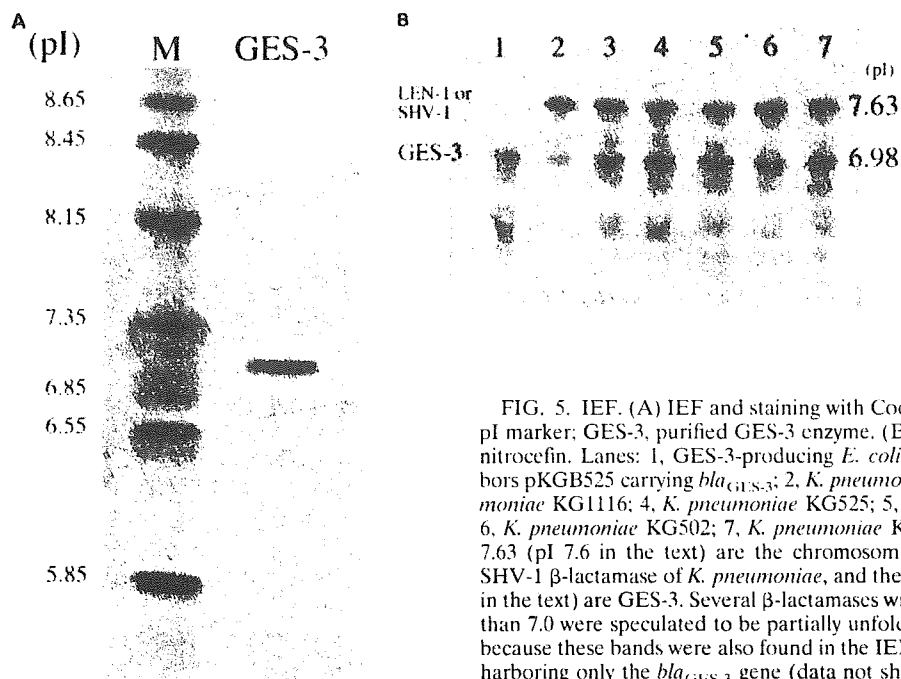


FIG. 5. IEF. (A) IEF and staining with Coomassie blue. Lanes: M, pI marker; GES-3, purified GES-3 enzyme. (B) IEF and staining with nitrocefin. Lanes: 1, GES-3-producing *E. coli* transformant that harbors pKGB525 carrying $bla_{\text{GES-3}}$; 2, *K. pneumoniae* KG914; 3, *K. pneumoniae* KG1116; 4, *K. pneumoniae* KG525; 5, *K. pneumoniae* KG545; 6, *K. pneumoniae* KG502; 7, *K. pneumoniae* KG827. The bands of pI 7.63 (pI 7.6 in the text) are the chromosomally encoded LEN-1 or SHV-1 β -lactamase of *K. pneumoniae*, and the bands at pI 6.98 (pI 7.0 in the text) are GES-3. Several β -lactamases with activities at pIs lower than 7.0 were speculated to be partially unfolded GES-3 β -lactamase, because these bands were also found in the IEF gels of an *E. coli* clone harboring only the $bla_{\text{GES-3}}$ gene (data not shown).

probably the result of these genetic rearrangements. Translocation and multiplication of the bla_{GES} gene might be facilitated by mediation of a site-specific recombination system of an integron or a transposon. A similar example of multiple locations of the same antibiotic resistance gene has been reported by Yagi et al. (38). In their study, a single clinical *E. coli* isolate was found to carry three distinguishable Toho-1-like β -lactamase genes, which were later identified as $bla_{\text{CTX-M-2}}$ by their restriction digestion patterns on the chromosome. These multiple locations of the same β -lactamase gene would be beneficial to bacteria, since they increase the chance of amino acid substitutions necessary for extension of the substrate profiles of β -lactamases as well as the multicopy effect of gene expression. Bradford et al. (3) reported that point mutations leading to ESBLs (ESBLs TEM-1 to TEM-10 and TEM-12) occurred on the plasmids of a single *K. pneumoniae* clinical isolate. A notable finding presented in that report was the distinct hydrolyzing activity between TEM-10 and TEM-12. TEM-10 had hydrolyzing activity against ceftazidime, while TEM-12 also hydrolyzed cefotaxime and aztreonam, in addition to ceftazidime. A variety of susceptibility profiles for cephamycins were also observed among the six *K. pneumoniae* strains in the present study. For instance, strains KG914, KG1116, and KG525 were susceptible to cefmetazole (MICs, 16 $\mu\text{g/ml}$), whereas strains KG545, KG502, and KG827 were resistant to this agent (MICs, $\geq 128 \mu\text{g/ml}$). In particular, strain KG502 showed high-level resistance to other cephamycins, such as ceftaxime (MIC, $>128 \mu\text{g/ml}$), cefminox (MIC, $>128 \mu\text{g/ml}$), and moxalactam (MIC, 128 $\mu\text{g/ml}$). An evolutionary event similar to that observed in the TEM enzymes (3) might have occurred in these *K. pneumoniae* strains to give them further resistance to a broad range of antibiotics. The MIC of imipenem for strain KG502 was 8 $\mu\text{g/ml}$, and this might be due to the hyperproduction of some β -lactamase with an extended

substrate specificity as well as the loss of some outer membrane protein, as reported by Bradford et al. (4). Further molecular characterization of the cephamycin resistance observed in strain KG502 will be undertaken in the next study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Leonidas S. Tzouveleakis, Laboratory of Bacteriology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, for kindly providing *E. cloacae* HT9-producing IBC-1 and *E. coli* DH5 α containing pHT9-2 and to Kumiko Kai for technical help.

This work was supported by grants H12-Shinko-19 and H12-Shinko-20 from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

1. Arakawa, Y., M. Ohta, N. Kido, Y. Fujii, T. Komatsu, and N. Kato. 1986. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R-plasmids. *FEBS Lett.* 207:69-74.
2. Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujiwara, and M. Goto. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38:40-43.
3. Bradford, P. A., C. E. Cherubin, V. Idemyor, B. A. Rasmussen, and K. Bush. 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:761-766.
4. Bradford, P. A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush. 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:563-569.
5. Burwen, D. R., S. N. Banerjee, R. P. Gaynes, et al. 1994. Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. *J. Infect. Dis.* 170:1622-1625.
6. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.
7. Chaves, J., M. G. Ladona, C. Segura, A. Coira, R. Reig, and C. Ampurdanes. 2001. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2856-2861.

8. Doi, Y., N. Shibata, K. Shibayama, K. Kamachi, H. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Yagi, and Y. Arakawa. 2002. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2427-2434.
9. Duarte, A., F. Boavida, F. Grosso, M. Correia, L. M. Lito, J. M. Cristino, and M. J. Salgado. 2003. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1481-1482.
10. Dubois, V., L. Poirel, C. Marie, C. Arpin, P. Nordmann, and C. Quentin. 2002. Molecular characterization of a novel class I integron containing *bla_{GES-1}* and a fused product of *aac3-Iblaac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:638-645.
11. Giakkoupi, P., L. S. Tzouvelekis, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou, and E. Tzelepi. 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2247-2253.
12. Girlich, D., L. Poirel, A. Leelaporn, A. Karim, C. Tribuddharat, M. Fennewald, and P. Nordmann. 2001. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**:175-182.
13. Gniadkowski, M., J. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, and A. Bauernfeind. 1998. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:827-832.
14. Hall, R. M., D. E. Brookes, and H. W. Stokes. 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **5**:1941-1959.
15. Hall, R. M., and C. M. Collis. 1995. Site-specific insertion of genes into integrons: role of 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **15**:593-600.
16. Kado, C. I., and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
17. Kartali, G., E. Tzelepi, S. Pournaras, C. Kontopoulou, F. Kontos, D. Sofianou, A. N. Maniatis, and A. Tsakris. 2002. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated β -lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1577-1580.
18. Matsumoto, Y., and M. Inoue. 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:307-313.
19. Mavroidi, A., E. Tzelepi, A. Tsakris, V. Miriagou, D. Sofianou, and L. S. Tzouvelekis. 2001. An integron-associated β -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum β -lactamase IBC-1. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:627-630.
20. Naas, T., F. Benaoudia, S. Massuard, and P. Nordmann. 2000. Integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:703-711.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
22. Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Radstrom, L. Sundstrom, O. Skold, G. Swedberg, and R. A. Skurray. 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:761-768.
23. Petit, A., D. L. Siro, C. M. Chanal, J. L. Siro, R. Labia, G. Gerbaud, and R. A. Cluzel. 1988. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:626-630.
24. Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class I integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:622-632.
25. Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E. B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:573-581.
26. Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J. D. Cavallo, and P. Nordmann. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:891-897.
27. Poirel, L., G. F. Weldhagen, C. De Champs, and P. Nordmann. 2002. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:561-565.
28. Poirel, L., G. F. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M. G. Dove, and P. Nordmann. 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2598-2603.
29. Rasheed, J. K., C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Weigel, J. Crellin, C. Steward, B. Hill, A. A. Medeiros, and F. C. Tenover. 1997. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:647-653.
30. Riccio, M. L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2000. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla_{IMP}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1229-1235.
31. Sabate, M., R. Tarrago, F. Navarro, E. Miro, C. Verges, J. Barbe, and G. Prats. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1970-1973.
32. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
33. Senda, K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato, and M. Ohta. 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2909-2913.
34. Shi, Z. Y., P. Y. Liu, Y. J. Lau, Y. H. Lin, and B. S. Hu. 1996. Epidemiological typing of isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2784-2790.
35. Stauffer, G. V., M. D. Plamann, and L. T. Stauffer. 1981. Construction and expression of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli* *glyA* genes. *Gene* **14**:63-72.
36. van der Zee, A., N. Steer, E. Thijssen, J. Nelson, A. van't Veen, and A. Buiting. 2003. Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **42**:798-802.
37. Vourli, S., L. S. Tzouvelekis, E. Tzelepi, E. Lebesi, N. J. Legakis, and V. Miriagou. 2003. Characterization of In11, a class I integron that carries the extended-spectrum β -lactamase gene *bla_{IMP-1}*. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**: 149-153.
38. Yagi, T., H. Kurokawa, K. Senda, S. Ichiyama, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shibayama, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta, and Y. Arakawa. 1997. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2606-2611.
39. Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:53-56.
40. Yan, J. J., W. C. Ko, Y. C. Jung, C. L. Chuang, and J. J. Wu. 2002. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3121-3126.
41. Yan, J. J., W. C. Ko, S. H. Tsai, H. M. Wu, Y. T. Jin, and J. J. Wu. 2000. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4320-4325.

Where has vancomycin-
heterogeneously resistant
Staphylococcus
aureus gone?

Yoshichika Arakawa
Yasuyoshi Ike
Mitsuaki Nagasawa

Reprinted from THE LANCET
24 April 2004 Vol. 363
No. 9418 Page 1401

Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone?

Sir—7 years have passed since a strain of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin was first identified in a Japanese hospital in 1996.¹ The strain was initially characterised as containing a small number of vancomycin-intermediately resistant subpopulations (vancomycin minimum inhibitory concentration [MIC], ≥ 8 mg/L), such as Mu50, at a frequency of 1 per 1 000 000. Warnings were sent out that such strains had already been disseminated in several Japanese medical institutions, despite the fact that they would hardly be detected by routine antimicrobial susceptibility testing recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards, since only around 1000 colony forming units of bacterial cells undergo testing.

The US Centers for Disease Control and Prevention issued a prompt alert for the detection of vancomycin-intermediately resistant *S aureus* (GISA),² selected by vancomycin use from the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* Mu3-like strain.¹ Many clinicians and microbiologists were perplexed by the further proliferation of such hazardous bacteria worldwide.

Although we had growing suspicions, after the first report,¹ regarding microbial genetics, in 1997 we did nationwide surveillance on the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* and GISA strains. As we expected, no such strain, as designated in the first report,¹ has been detected.³ Furthermore, if the genetically definable vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* had been widely distributed in Japanese clinical settings in 1996,¹ as reported, GISA strains should have been selected and widely proliferated in Japanese clinical environments due to substantial use of vancomycin over the past 7 years. No such phenomenon has been ascertained in Japan to date, despite many clinical microbiologists' attempts to isolate unique strains that show heterogeneous vancomycin resistance. Indeed, the GISA strain can be isolated after persistent passages of *S aureus* on brain heart infusion agar plates supplemented with sub-MIC of vancomycin. However, as far as we know few GISA strains, such as Mu50, that show an intermediately vancomycin-resistant profile, have been directly isolated from clinical specimens in Japan.

Bacteria have an innate ability to adapt to environmental stress or hazardous conditions by changing their metabolic pathways. Tomasz and colleagues have elucidated the molecular

mechanisms underlying the vancomycin-resistant phenotype in *S aureus* through a series of studies.⁴ Furthermore, involvement of the multiple molecular mechanisms responsible for the GISA phenotype has been elucidated.⁵ However, the genetic context of the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* containing a small number of GISA subpopulations has not been solved, although the total genomic sequence of a GISA strain, Mu50, has been disentangled.

The emergence of vancomycin-resistant *S aureus* harbouring the *van* gene cluster, such as the Michigan strain, is a serious clinical matter. However, a large amount of medical resources, including Mu3 medium, and special efforts by clinical microbiologists have been wasted thus far in the detection of the scientifically incomprehensible vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus*. Therefore, investigators¹ who earlier reported the dissemination of the illusory strain should perhaps provide a detailed supplementary update report on why it has vanished from Japan.

*Yoshichika Arakawa, Yasuyoshi Ike, Mitsuaki Nagasawa

*Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan (YA); Department of Bacteriology and Bacterial Infection Control, Graduate School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Gunma, Japan (YI); and Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan (MN) (e-mail: yarakawa@nih.go.jp)

- 1 Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; **350**: 1670–73.
- 2 Anon. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; **46**: 765–66.
- 3 Ike Y, Arakawa Y, Ma X, et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4445–51.
- 4 Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003; **185**: 7103–10.
- 5 Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 2002; **56**: 657–75.

The Lancet is a weekly subscription journal. For further information on how to subscribe please contact our Subscription Department
Tel: +44 (0) 20 7611 4102 Fax: +44 (0) 20 7611 4479
North America Tel: +1 (800) 462 6198 Fax: +1 (212) 633 3974

〈原 著〉

手術部位感染(SSI)サーベイランスとそのリスク要因の検討

大城 知子・橋本 丈代・向野 賢治・畝 博

An Epidemiological Study on Risk Factors for Surgical Site Infections

別 刷

環境感染

Vol. 19 no. 3, 2004

〈原著〉

手術部位感染(SSI)サーベイランスとそのリスク要因の検討

大城 知子¹⁾・橋本 丈代²⁾・向野 賢治³⁾・畝 博⁴⁾*An Epidemiological Study on Risk Factors for Surgical Site Infections*Tomoko OHSHIRO¹⁾, Takeyo HASHIMOTO²⁾, Kenji KONO³⁾ and Hiroshi UNE⁴⁾¹⁾Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Fukuoka University,²⁾Fukuoka University Hospital, ³⁾Fukuoka Wajinkai Hospital,⁴⁾Department of Hygiene and Preventive Medicine, School of Medicine, Fukuoka University

要 旨

病院感染サーベイランスとして実施している Surgical Site Infections (SSI) のリスク要因について検討した。対象は 1999 年 4 月から 2001 年 8 月までの手術例 649 例であった。

手術部位別の SSI 発生率をみると、食道の手術と大腸の手術での発生率が高く、それぞれ 11.6%、8.8% であった。その他、胃の手術が 2.2%、胸部の手術が 1.5%、胆嚢・肝臓の手術が 2.5% であった。胃の手術を Reference とした時、食道の手術はオッズ比が 5.86、大腸の手術はオッズ比が 4.68 と有意なリスクの上昇が認められた。

手術部位別以外で、有意なリスクの上昇が認められたのは、創の汚染度が汚染・不潔のもの(オッズ比 = 31.99)、手術時間が 3 時間以上と長いもの(オッズ比 = 3.21)、American Society of Anesthesiologists Physical Status (ASA PS) Score が 2 以上のもの(オッズ比 = 2.92)、緊急手術(オッズ比 = 14.22)、イレウス(オッズ比 = 3.04)および手術中出血量が 500 mL 以上のもの(オッズ比 = 2.90)であった。

本研究では、年齢、性別、貧血、低アルブミン血症、悪性新生物の手術などは、SSI 発生のリスク要因になっていなかった。

Key words : 手術部位感染(SSI), サーベイランス, リスク要因

はじめに

SSI は、血流感染、尿路感染に続いて、病院感染の第 3 位であり、入院患者の病状悪化や死亡の重要な原因となっている^{1,2)}。なかでも、消化器外科における SSI は、その部位的な特徴から発生率が高い³⁾。手術後の患者では、SSI が病院感染の 38% を占め、患者の負担増加、在院日数の延長、病院経営などに大きなマイナスの要因として働いている⁴⁾。

最近では、手術患者には重篤な基礎疾患や免疫が低下した高齢者が多く、MRSA や緑膿菌などの多剤耐性菌感染も起こし易い。今日、SSI を始めとする病院感染防止対策が焦眉の課題となっている。

病院感染防止には病院感染症サーベイランスが必須で

あるといわれている⁵⁾。病院感染サーベイランスのデータを分析することにより、感染のリスク要因を明らかにし、感染対策を実行し評価するシステムを確立することが、病院感染を防止し、医療サービスの質向上にも繋がることが報告されている^{6,7)}。

しかし、本邦において SSI 発生率やそのリスク要因を疫学的に検討した研究はまだ少ない。そこで、著者らは病院感染サーベイランスのデータを用いて、SSI 発生率とそのリスク要因について検討を行ったので報告する。

対象と方法

ベッド数 850 の特定機能病院の外科病棟 48 床を対象として SSI のサーベイランスを行った。本病棟の入院患者は消化器系疾患中心であるが、その他に、胸部疾患患者も含まれている。対象としたのは、1999 年 4 月から 2001 年 8 月までの手術例 656 例で、そのうちカルテ

¹⁾福岡大学大学院医学研究科感染生物系専攻, ²⁾福岡大学病院看護部, ³⁾福岡和仁会病院, ⁴⁾福岡大学医学部衛生学教室

調査ができた 649 例(男性 366 人, 女性 283 人)を分析対象とした。

SSI は, 全米病院感染サーベイランスシステム(National Nosocomial Infection Surveillance System; NNIS)の定義に従った⁸⁾。サーベイランスは, 病棟の感染対策担当ナースが行い, 手術部位感染の判定は主治医と共に行った。手術部位感染サーベイランスの調査項目は, 手術部位, 手術時間, 創分類, ASA PS, 麻酔方法, 緊急手術の有無, 内視鏡手術の有無, 合併手術の有無などである。本研究では, これらサーベイランスのデータに加え, カルテ調査を実施し, 体格, 既往歴, 現病歴, 疾病の状況, 手術前の血液生化学データ, 手術前の処置, 輸血の有無, 抗生剤予防投与の有無, 手術中出血量, リンパ郭清の有無などの情報を得た。解析には Statistical Analysis System を用いて Logistic Regression Analyses を行い, リスクの評価を実施した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. 対象者の年齢構成(表 1)

対象者の性別は, 男が 366 人(56.4%), 女が 283 人(43.6%)であった。年齢構成は, 男女ともほぼ同様な分布であり, 60 歳代が 29.7%, 70 歳代が 26.8%で, 60 歳代と 70 歳代で 56.7%を占めていた。

2. 手術部位(表 2)

手術部位は, 大腸と胃の手術が多く, 両者で約半数を占めていた。男女別にみると, 男性は女性より, 胃の手術は多く, 胆嚢・肝臓の手術が少ない傾向がみられた。胆嚢・肝臓の手術は 77.6%が腹腔鏡による胆嚢摘出術であった。

3. 性別 SSI 発生率(表 3)

SSI が認められた者は, 男性 21 例(5.7%), 女性 12 例(4.2%), 全体で 33 例(5.1%)であり, 男女間には大きな差を認めなかった。

4. 部位別 SSI 発生率(表 4)

SSI 発生率が最も高かったのは, 食道の手術で 11.6%, 次いで大腸の手術が 8.8%, その他が 5.1%, 胆嚢・肝臓の手術が 2.5%, 胃の手術が 2.2%, 胸部の手術が 1.5%の順であった。

5. SSI に対するリスク要因(表 5)

SSI に対するオッズ比は, 性別(女:男)では 0.72, 年齢(10 歳間隔)では 0.99 であり, 性別, 年齢は SSI のリスク要因ではなかった。

手術部位別についてみると, 胃の手術を Reference とした時, 食道の手術はオッズ比が 5.86, 大腸の手術はオッズ比が 4.68 と, 有意なリスクの上昇が認められた。胆嚢・肝臓の手術, 胸部の手術, およびその他の手術のオッズ比は, それぞれ 1.21, 0.66, 2.67 で有意では

表 1 対象者の年齢構成

年齢階級	男(%)	女(%)	全体(%)
50 歳未満	52(14.2)	65(23.0)	117(18.0)
50 歳代	68(18.6)	49(17.3)	117(18.0)
60 歳代	125(34.2)	68(24.0)	193(29.7)
70 歳代	95(26.0)	79(27.9)	174(26.8)
80 歳以上	26(7.1)	22(7.8)	48(7.4)
合 計	366(100)	283(100)	649(100)

表 2 手術部位

手術部位	男(%)	女(%)	全体(%)
食道の手術	31(8.5)	12(4.2)	43(6.6)
胃の手術	95(26.0)	42(14.8)	137(21.1)
大腸の手術	104(28.4)	78(27.6)	182(28.0)
胸部の手術	45(12.3)	22(7.8)	67(10.3)
胆嚢・肝臓の手術	54(14.8)	67(23.7)	121(18.6)
その他の手術	37(10.1)	62(21.9)	99(15.3)
合 計	366(100)	283(100)	649(100)

表 3 性別手術部位感染率

手術部位感染	男(%)	女(%)	全体(%)
あり	21(5.7)	12(4.2)	33(5.1)
なし	345(94.3)	271(95.8)	616(94.9)
合計	366(100)	283(100)	649(100)

表 4 手術部位別感染率

手術部位	感染率
食道の手術	5/43(11.6)
胃の手術	3/137(2.2)
大腸の手術	17/182(9.3)
胸部の手術	1/ 67(1.5)
胆嚢・肝臓の手術	3/121(2.5)
その他の手術	4/ 99(4.0)
合 計	33/649(5.1)

なかった。

手術部位別以外で, 有意な SSI のリスクの上昇が認められたのは, 創の汚染度が汚染・不潔のもの(オッズ比=31.99), 手術時間が 3 時間以上と長いもの(オッズ比=3.21), ASA PS Score が 2 以上のもの(オッズ比=2.92), 緊急手術(オッズ=14.22), イレウス(オッズ比=3.04)および手術中出血量が 500 mL 以上のもの(オッズ比=2.90)であった。

年齢, 性別, 肥満度, 貧血, 低アルブミン血症, 高血圧症, および糖尿病では, SSI の有意なリスクの上昇は認められなかった。また, 悪性疾患と良性疾患の間に

表5 手術部位感染に対するリスク要因

要 因	Odds Ratios (95% Confidence Interval)
性別(女:男)	0.72(0.34-1.53)
年齢(10歳間隔)	0.99(0.97-1.02)
手術部位	
胃の手術	1.00(reference)
食道の手術	5.86(1.74-25.72)
大腸の手術	4.68(1.33-16.47)
胸部の手術	0.66(0.07-6.53)
胆嚢・肝臓の手術	1.21(0.24-6.26)
その他	2.67(0.60-11.94)
創分類	
清潔・準清潔	1.00(reference)
汚染・不潔	31.99(8.79-116.37)
手術時間	
3時間未満	1.00(reference)
3時間以上	3.21(1.30-7.95)
ASA PS Score	
ASA PS Score 1	1.00(reference)
ASA PS Score 2以上	2.92(0.35-24.48)
麻酔方法	
全身麻酔以外	1.00(reference)
全身麻酔	1.65(0.21-13.16)
緊急手術(緊急手術:待機手術)	
待機手術	1.00(reference)
緊急手術	14.22(3.92-61.41)
現病歴	
糖尿病	1.51(0.94-2.42)
高血圧症	0.71(0.28-1.77)
イレウス	3.04(1.11-8.32)
術前の状態	
やせ(BMI 20未満:以上)	1.62(0.79-3.33)
貧血	0.55(0.22-1.37)
低アルブミン血症	1.09(0.47-2.52)
悪性新生物の有無	
がん以外の疾患	1.00(reference)
がん	0.60(0.22-1.65)
リンパ節郭清	
無	1.00(reference)
有	1.32(0.36-4.80)
出血量	
500 ml 未満	1.00(reference)
500 ml 以上	2.90(1.29-6.52)
抗生剤の予防投与	
術前投与(有:無)	0.85(0.30-2.38)
術中投与(有:無)	0.93(0.39-2.19)

注) 性別, 年齢, 手術部位は, 各々他の2要因に対して補正した。

注) 創分類以下の要因については, 性別, 年齢, および手術部位で補正した。

注) 貧血は, 男ではヘモグロビン値が11 g/dL 未満, 女では12 g/dL 未満とした。

注) 低アルブミン血症は血清アルブミン値が3 g/dL 未満とした。

も, リンパ節郭清のある群とない群の間にも SSI リスクの大きな差は認めなかった。

術前抗生剤予防投与はオッズ比が0.85, 術中抗生剤予防投与はオッズ比が0.93であり, ともに有意な SSI リスクの低下は認められなかった。なお, 術後抗生剤の予防投与はほとんどの症例に行われており, リスクの評価はできなかった。

考 察

米国では, 1970年代から疾病対策予防センター(Centers for Disease Control and Prevention; CDC)が主体となり, NNIS が開始された。当初は, NNIS の疾患定義に合致するすべての病院感染症を収集する Hospital-Wide Surveillance であった⁹⁾。しかし, 膨大なデータを集めても解析困難で, 業務改善につながる結論を導き出すことがなかなかできなかった。労多くして, 成果が少ない全病院的サーベイランスに代わり, 1990年代からターゲット・サーベイランス(Target surveillance)が実施されるようになった。ターゲット・サーベイランスは, 特定の感染症, 病原体, 患者集団に限定して調査する方法で, 主な対象疾患として人工呼吸器関連肺炎, カテーテル関連血流感染症, カテーテル関連尿路感染症, そして SSI がある。

本邦では 1990年代後半より環境感染学会が主体となって SSI のサーベイランスが開始され, 2003年より, 対象施設を増やし, 厚生労働省の事業になっている。著者らも 1990年代後半からサーベイランスを始めている¹⁰⁾。

NNIS システムの SSI の評価は, NNIS Risk Index を基に行われる。しかし, Risk Index の調整に関しては問題点も生じている¹¹⁾。西岡らは, 日本の消化器外科症例に対して Risk Index の妥当性を評価し, SSI 発生と「創分類の汚染・不潔」は有意に関連していたが, 「手術時間」と「ASA PS Score」は関連がなかったと報告している¹²⁾。著者らの結果でも, 「創分類の汚染・不潔」はオッズ比が31.99と高く, SSI のリスク要因であった。しかし, 西岡ら結果とは異なり, 手術時間と ASA PS Score は創分類と同様に, SSI の有意なリスク要因となっていた。

NNIS の SSI 発生率をみると, 胃の手術が0%(Risk Index 0)~3.87%(Risk Index 2, 3), 大腸の手術が4.02%(Risk Index 0)~11.6%(Risk Index 3)であった。本サーベイランスでは, T 時間が未設定であったため, Risk Index の調整がされておらず, NNIS の成績と直接比較することは出来ないが, SSI 発生率は NNIS のそれと大きな差はないと考えられた。

食道の手術と大腸の手術における SSI 発生率はそれぞれ 11.6%と 9.3%と, 他の手術と比較して高く, ま

た、オッズ比もそれぞれ 5.86 と 4.68 と有意に高かった。日本病院感染サーベイランスでも食道の手術と大腸の手術における SSI 発生率が高いことが報告されており、著者らの成績と一致していた¹³⁾。

緊急手術、イレウス、および不潔・汚染の手術は、オッズ比がそれぞれ 14.22, 3.04, 31.99 と高く、SSI のリスク要因であった。これら 3 要因は相互に密接に関連し合っており、イレウスでは緊急手術になるケースが多く、イレウスの緊急手術では創が汚染・不潔になり易くなると考えられた。

やせ、貧血、低アルブミン血症などの手術前の患者状態や悪性新生物の手術では、SSI のリスクの上昇はなく、従来報告されている成績とは異なる結果であった。しかし、手術中出血量では 500 mL 以上で有意なリスクの上昇がみられ、出血量が多くなると、それだけ手術の操作も増え、汚染も進行すると考えられた。

予防抗菌薬投与については、術前、術中、および術後 24 時間以内の投与は有効であると報告されているが^{14,15)}、本研究では、術前および術中の予防投与は感染リスクの有意な低下に繋がっていなかった。しかしながら、術前あるいは術中に予防投与される患者は感染を起こし易いケースが多く、こうしたセレクションバイアスのために、SSI のリスクの低下が見かけ上みられなかった可能性がある。予防抗菌薬投与の効果については、将来、ランダム化比較研究を行って評価する必要がある。

本研究は、平成 12~14 年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)による「薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究」の一環として実施した。

文 献

- 1) Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML: Guideline for prevention of surgical site infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999; 20: 247-78.
- 2) Emori TG, Gaynes RP: An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 428-42.
- 3) 炭山嘉伸, 草地信也. 急性腹膜炎周術期の抗菌薬療法—II 治療薬の選択とタイミング. *臨床外科* 1998; 53: 1125-8.
- 4) Hospital Infections Program, Centers for Disease Control and Prevention (NNIS) system report, data summary from January 1992–April 2000, Issued June 2000. *Am J Infect Control.* 2000; 28: 426-9.
- 5) 森兼啓太. エビデンスに基づいた病院感染サーベイランス. *環境感染* 2003; 18: 265-70.
- 6) Condon RE, Schulte WJ, Malangoni MA: Effectiveness of a surgical wound surveillance program. *Arch Surg.* 1983; 118: 303-7.
- 7) Olson MM, Lee JT: Continuous 10-year wound infection surveillance. *Arch Surg.* 1990; 125: 794-803.
- 8) Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG: CDC definitions of nosocomial surgical site infection, 1992: A modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992; 13: 606-8.
- 9) Pottinger JM, Herwaldt LA, Perl TM: Basic of surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18: 513-27.
- 10) Kono K, Takeda S, Ando C, Tatara I, Arakawa K, Takada T, *et al.*: Epidemiology of nosocomial infection at Fukuoka University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000; 21: 304-5.
- 11) Roy MC, Herwaldt LA, Embrey R, Kuhns K, Wenzel RP, Perl TM: Dose the Center for Disease Control's NNIS system risk index stratify patients undergoing cardiothoracic operations by their risk of surgical-site infection? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000; 21: 186-90.
- 12) 西岡みどり, 森兼啓太, 小西敏郎, 小林寛伊, 埋田聖子, 大久保憲他, 他. 消化器外科における手術部位感染リスク調整手法 NNIS SSI Risk Index の妥当性についての評価研究. *医療マネジメント* 2002; 1: 219-22.
- 13) 森兼啓太, 小西敏郎, 西岡みどり, 埋田聖子, 大久保憲, 岡裕爾, 他. JNIS 委員会報告(2) 日本病院感染サーベイランスの現状. *環境感染* 2002; 17: 289-93.
- 14) Classen DC, Evans RS, Pestotnik SL, Horn SD, Menlove RL, Burke JP, *et al.*: The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical-wound infection. *N Engl J Med.* 1992; 326: 281-6.
- 15) Nichols RL: Surgical antibiotic prophylaxis. *Med Clin North Am.* 1995; 79: 509-22.

[連絡先: 〒814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1
福岡大学医学部免疫微生物学教室 大城知子]

小児科診療〔第67巻・第3号〕別刷

2004年3月1日発行

発行所 株式会社 診断と治療社

I. 総論

NICU 院内感染対策

きた しま ひる ゆき 北島 博之 大阪府立母子保健総合医療センター新生児科

要旨

NICU 入院児における感染予防の原則は、正常皮膚および口腔内・腸内細菌叢（ビフィズス菌叢）の早期確立と、医療者の介助による院内感染原因菌による汚染（水平感染）の排除にある。後者の実施のためには、厳密な手洗いと入院児に使用する物品を個別にしなければならない。とくに感染をおこしやすい部位（気管吸引物、便、皮膚病変）のグラム染色と、日常的に細菌の監視をすることが予測的診断・治療に結びつく。

はじめに

分娩室で問題のない正常新生児には、母親固有の正常菌叢を新生児に積極的に定着させることである。そして正常細菌叢の定着により、病原性細菌の定着を防ぐ。そのためには以下の5項目を遂行することで、かなりの院内感染予防の効果がある。NICU 入室の新生児は②が実施できないだけで基本的には変りがない。

①分娩後早期からのだっこ・カンガルーケア（皮膚へ）と早期授乳（口腔内・腸管内）。

②母児同室・同床の徹底（他者の介助による水平感染を排除する）。

③母乳哺育でビフィズス菌の腸内での定着をはかること。

④新生児に触れる前後の消毒薬による手洗いと沐浴の個別化（1回ごとに浴槽の消毒）。

⑤計測器具の個別化や消毒（体温計・聴診器などを個人別にする）。

NICU 入院児においては、上述した出生時の母子の濃厚接触がないだけでなく、さまざまな感染ルートになるラインを伴って入院してくる。感染をおこしやすい部位のグラム染色を行うことで、日常的に細菌の監視をすることが予測的診断ならびに治療に結びつく。もちろん監視培養データも重要である。さらに院内感染原因菌株の保存という重要な役割が細菌検査室にあり、

Key Words

院内感染
NICU
常在細菌叢
MRSA
緑膿菌
カンジダ

院内感染予防対策の基本的な解析手順が決まる。NICUにおける院内感染症の監視が効果的な部位は、気管吸引物、便、皮膚病変である。また対象菌は、MRSA、緑膿菌その他の腸内細菌群、カンジダなどである。すべて病棟内ですすでよく分離されている菌群で、グラム染色により判別が容易である。

一方、新生児側からみると無菌的な皮膚で母親以外の他者にケアされることは、細菌学的には、もっとも危険なことであり、できるだけ正常細菌叢を定着させながら、他者のケアを受けることがもっとも望ましい。

本稿では、以上のような観点から感染予防対策を述べることにする。

NICUにおける院内感染症の最近の傾向¹⁾²⁾

2001年1月に、新生児医療連絡会会員施設169施設にアンケート調査用紙を送り、90施設から回答を得た。そのうち超低出生体重児（以下、ELBWと略す）の年間入院数が5名以上、極低出生体重児（以下、VLBWと略す）が20名以上の施設72のうち、回答項目が満たされている60施設におけるVLBWの感染症例の解析データを示す。2000年の1年間における各施設のVLBW平均入院数は 48.9 ± 21.7 (SD)、院内感染症の平均発症率は $12.4 \pm 9.7\%$ で平均MRSA感染症発症率は $5.1 \pm 5.7\%$ であった。

感染症のもっとも多い起炎菌はMRSAで150例(150/358:41.9%)、ついでコアグラゼ陰性ブドウ球菌(CNS)19例(CNS感染症例は同一施設で11例もあった)(5.3%)、カンジダ17例(4.7%)、緑膿菌13例(3.6%)、その他の菌によるもの30例(8.4%)、不明94例(26.3%)であった。一方、感染部位別数と死亡率をともにみると、敗血症45例(死亡率22.2%)、軽症も含む肺炎50例(2.0%)、壊死性腸炎を含む腸炎

14例(35.7%)、皮膚病変6例(0%)、関節炎/骨髓炎3例(0%)、膿瘍1例(0%)、髄膜炎/脳室炎3(33.3%)、その他5例(0%)、そしてNTEDが31例(0%)であった。VLBWの全院内感染による平均死亡率は 17.6 ± 26.7 (SD) %、MRSA感染による平均死亡率は $14.9 \pm 24.5\%$ であった。死亡例の89%をELBWが占めており、起炎菌別の死亡率はMRSA 19%・コアグラゼ陰性ブドウ球菌(CNS) 21%・カンジダ 53%・緑膿菌 46%であった。

院内感染症への予防対策

院内感染の原因となる菌群は、病棟での予防的管理がもっとも重要である。とくに在胎26週未満の超早産児やELBWは、重症化しやすいのでとくに予防的管理が必須となる。前述したように、対象となる菌は黄色ブドウ球菌(とくにMRSA)、グラム陰性桿菌(とくに緑膿菌)、カンジダである。

1. MRSA対策²⁾³⁾

1) 母親の正常細菌叢による新生児へのMRSA定着阻止

MRSAに対抗するためには、より分裂の早い代謝経路の近似した、そして定着力の強い同種の細菌を正常細菌として定着させることがもっとも肝要である⁴⁾。

まず口腔内では、産道通過時に母親の膣内の菌叢に曝露される。出生後口腔には母親の乳房を早期に含むことで、母親の皮膚の菌をもらい、その中でもっとも繁殖しやすい *Streptococcus* や *Neisseria*、各種の嫌気性細菌が増える。福田らのデータ⁵⁾によると、出生後早期より母子同室で瀬回授乳を行った正常新生児では、母乳中そして口腔内で同じように α あるいは γ -*streptococcus* などの常在菌が急速に増加していた。また中村らの報告⁶⁾では、 α あるいは γ -*streptococcus* などの常在菌が定着していると、その菌

により MRSA などの定着が阻止されることが証明されている。さらに中村らは、NICU に入院した超低出生体重児に積極的に母親の搾母乳を早期に口腔内に塗布をして、口腔内の MRSA の定着率を下げたことを報告している⁷⁾。

MRSA の定着は、皮膚や臍帯が無菌的であるほど容易になる。新生児発疹性疾患 (NTED) の報告では、発症時期は帝王切開児のほうが経膈分娩児に比べると早く、発症率も高い。この場合、MRSA の保菌者は医療従事者であり、それによる水平感染と考えられる。皮膚おける正常細菌叢とは、*Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌) である。この菌はすべてのおとながもっている。MRSA や MSSA は毛嚢内に定着するので、毒性のない表皮ブドウ球菌と競合関係にあるため、この菌でその生息部位を占拠してもらうことが、もっとも効率的である。つまり生後すぐに新生児の皮膚と母親の皮膚を直接接触させて、母親のもっているよい表皮ブドウ球菌を移せばよい。これは生れてすぐからの『カンガルーケア』あるいは『タッチケア』ともよぶことができる。これは新生児皮膚における感染防止の第一段階である。

2) 新生児に触る前後の厳密な手洗い

これはなかなか実施できない項目であるが、基本的にはこれがもっとも大切なポイントである。流水であれば、消毒薬は使わなくともかなりきれいになる。MRSA の多くは、グルコン酸クロルヘキシジンや、その他逆性石鹸にはほとんど耐性になっているので、それを手洗いに使用している施設は、流水でよく流しているだけの効果しかないと知るべきである。

3) 手袋の着用

手袋も使用始めると、MRSA 検出頻度が下がり、一定の効果がもたらされることが多い⁸⁾。ただ、後に述べる予防対策項目がともに行われない限り、病棟からの一時的な駆逐 (MRSA が検出されなくなることも困難であろう。長谷

表 バクトロバン鼻腔および耳腔消毒と気管チューブの周りの消毒・皮膚消毒

- 鼻腔塗布は1日3回3日間から最長1日3回7日間まで (平均: 1日2回7日間)
- 耳腔塗布は1日1回7日間
- 気管チューブは交換時に挿入部位の周囲に薄く軟膏を塗り挿入
- 皮膚消毒は1日1回沐浴後に酸性水シャワーを7日間

川先生の保菌予防の稿を参照されたい。

4) MRSA 除菌はどうするか²⁾

一度保菌してしまうと、新生児は長期保菌者になりやすい。それは MRSA に対抗するべき一般細菌が、児の周りにいないからだといえる。以下の四つを同時に行うと、70%以上が除菌できる。とくに気管チューブの周りの消毒は、気管切開児の除菌にかなり効果がある。

気管内の抗生物質トイレットリングも一部効果があるが、カニューレの真下の菌は粘膜内に隠れて消毒しえない。気管チューブの挿入される部分の外側に薄くバクトロバン軟膏を付けて入れ替えるだけでよい。当 NICU で出生後2年以上気管切開していた小児2名が、この方法を他の部位の消毒と併用することで除菌ができた。ただし、バクトロバンで常時消毒を行っている耐性菌が出現することが、すでにわが国の NICU でいくつか報告されているので、前回の消毒から2カ月以上間隔をあけて1クールだけ保菌者全員を除菌する (表)。もちろん、親からの承諾を得る必要がある。

5) 職員が保菌しないこと

職員が保菌することで、ケア中に患児に移すことがあるので、その背景を調べると、MRSA 保菌児やその保育器周りの物品の汚染から移される。この場合には、職員がケア中にマスク (きちっと鼻をおおう必要あり) を着用することが、移されない一つの方法である⁹⁾。また保菌をしやすいのは、新しい NICU の勤務者であり、まだ厳密な手洗いが体得できていないうち

に、感染を受けて保菌者になることが多い。とくに自分の癖をよくわきまえないで、保菌患児のケア中に、自分の顔・髪の毛・メガネを触って移される。

6) 保菌職員がケアしないこと

職員の保菌状態をチェックするには、MRSAスクリーニング用の簡易培養キット〔マーサチェック（鼻腔用）：日研生物医学研究所〕が市販されているので、それを利用する。新しい勤務者は、入室前に1回は保菌状態のチェックをされることがすすめられる。ついで職員の保菌状態をなくすには、バクトロバン軟膏を鼻腔に1日2回7日間朝夕で塗布すると、消毒可能である。以後、本人の自覚もあるせいか再度検出されることはほとんどない¹⁰⁾。

7) 環境の汚染監視

環境を清潔に保つ第一は、基本的に患児個人に日常使うものは、すべて個別化することである。聴診器・体温計・メジャー・はさみ・テープ・ワセリン・グリセリン・ $\text{TcPO}_2/\text{CO}_2$ のゲル・センサーのテープなど。またフローシート記載用のボールペンなどの個別化も必要である。

ついで、保育器を含めた器具類の汚染のチェックが必要である。保育器の汚染は、毎日の清拭前後に保育器の各個所あるいは、数本のswabで保育器全体を拭き取る。前後で、菌の種類あるいは陽性個所の減少が見られなければ、消毒薬は効果なしと判定できる。とくに保育器の終末消毒は大切である。保育器交換後に、上と同様にして菌の減少がなければ、この消毒も効果がない。ホルマリンガスで終末消毒を行って無菌的にする。最近発売のガス滅菌器（メディアート社やその他）は、消毒後にホルマリンガスを熱によって水と炭酸ガスまで分解してしまうので、環境汚染の心配はなくなった。2001年度に厚生科学研究で行った全国NICUのアンケート調査によると、病院間のMRSA感染症発症率の高低で、その背景因子を探ると、保

菌患児を予防治療すること・保育器の終末消毒をすること、の2点がMRSA感染症率を低下させる因子として働いていることがわかった¹¹⁾。

2. 緑膿菌対策¹¹⁾

簡単に以下にまとめる。

1) 母親からの垂直感染予防

重症児の多くは母親からの垂直感染であり早産で生れる。予防には産科の協力（たとえば腔内の保菌検査と予防的消毒など）が必要である。

2) 病原緑膿菌を病棟から駆逐する

院内感染で強毒菌の場合には、特別の看護体制が必要となり、ゾーンで隔離体制を取らざるをえない。MRSA対策ができていない病棟では基本的に手洗いはできていることが多いので、菌を病棟から追い出すことが最終目標となる。

3) 皮膚消毒と臍帯の乾燥

皮膚は早期に消毒薬で清拭し、臍帯はできるだけ早く乾燥させる。

4) ビフィズス菌の早期投与

ビフィズス菌の早期投与により、腸内細菌叢を安定させる。

3. カンジダ対策¹²⁾

1) 腔でのカンジダ保菌阻止とハイリスク新生児の把握

経腔分娩症例では、必ず問題となるため、分娩前に腔錠などで除菌をしてもらう。また妊娠中期であっても、母親が排便後に陰部を後ろ前に拭くと保菌率が上昇するので注意が必要¹³⁾。

超低出生体重児を対象として、以下の新生児にはとくに注意が必要である。

①腔培養でカンジダが検出されている母親から出生した新生児（とくに経腔分娩例）。

②一度でも身体の一部からカンジダが検出されたことのある新生児。

③ステロイド投与中の新生児（生後早期の低血圧症や慢性肺疾患に対する）。

④各種のカニューレを挿入しており、一般の抗生物質投与期間の長い新生児。

2) 腸管カンジダ症を疑わせるもの

まずカンジダをグラム染色で早期に見つけることが大切である。皮膚塗末や胃内容のグラム染色で芽胞を確認すれば、早期から抗真菌薬を経口投与して腸管カンジダ症を予防する。

ついで臨床上治療を必要とする所見を上げる。

① 高血糖がみられる（一定のブドウ糖の輸注速度で栄養しているのに）。

② 腸管の動きが低下し、ミルクが停滞。腸内ガスの消失もみられることが多い。

③ 血小板数の低下（ 10 万/ mm^3 を少し下回る程度で維持される）。

④ オロソムコイドは軽度上昇することが多い。

⑤ CRP やハプトグロビンは上昇しないか、一部で軽度上昇のみ。

⑥ 白血球は正常あるいは低下。好酸球の上昇がよくみられる。

⑦ 低ナトリウム血症を認めることもある。

以上のように、それほど激的な症状も明らかに敗血症や菌血症を疑わせる所見もない。腹部の症状とそれに付随する検査上の変化を細かく捉えていくと、明らかになってくる。血小板や白血球のさらなる低下とともに CRP やハプトグロビンが急上昇すれば、菌が流血中に入り菌血症がおこっていることを示唆する。さらに、 β -グルカン テストワコーという比濁時間分析法リムルステストが、カンジダ由来の血中 β グルカン測定するのに開発され、カンジダの体表、腸管などへの早期定着の有無を評価するのに意味があると考えている¹⁴⁾。

26 週未満の超低出生体重児の便からカンジダが分離され早期に治療しないで放置しておくと、壊死性腸炎のようになる可能性がある。予防的治療としては硝酸ミコナゾール（注射薬を $6 \sim 10$ mg/kg/日、分 $3 \sim 6$ ）、あるいはファンギゾン（注射薬 $0.25 \sim 1$ mg/kg/日、分 $3 \sim 6$ ）を 3 週間経鼻カテーテルより胃内投与すればカンジダは

ほぼ消失する。これらの薬剤は腸管からの吸収が悪く、また耐性菌が少ない。ただ 22 週出生の 400 g の新生児に 1 mg/kg/日のファンギゾンの胃内投与を 4 日以上続行すると、 1.2 $\mu\text{g/ml}$ の血中濃度にまで上昇したので、吸収率はかなり高いと考えられるので注意を要する。効果判定は常に便でのモニタリングを行い、芽胞の消失を培養検査と共に確認していくことが大切である。

また肛門からの上行性のカンジダ増殖も便の排泄の悪い小児ではおこりうる。この場合には、ミコナゾールやファンギゾンを $10 \sim 50$ 倍に希釈した生理食塩水による注腸が効果的と考える。

3) 気道の管理

気管の培養検査陽性例やグラム染色で芽胞が確認されれば、硝酸ミコナゾールを約 $50 \sim 200$ に希釈して 0.2 ml（1 回 $10 \sim 40$ $\mu\text{g/dose}$ 1 日 3 回）で、約 1 週間トイレットイングを行っている。これも予防的治療として効果的である。

4) 早期の保育器加湿を下げる

保育器内加湿を $70 \sim 80\%$ ぐらいに下げて、皮膚を乾燥させることにより皮膚病変を減らす。

おわりに

新生児感染症予防においては、無菌の新生児に正常な菌叢を定着させることが、早期新生児期の一番自然な、そして強力な感染予防となり、それが院内感染を未然に防ぐ最良の策であることが自覚されるようになる。病原性細菌に対抗するためには、人間が太古から伝えてきた共生菌としての、皮膚の表皮ブドウ球菌、そして腸内のビフィズス菌などを活用することである。

しかし今の NICU 入院児は、病棟で待ち受けている菌（とくに MRSA）に容易に汚染される。この状態をひきおこすのは、NICU へ MRSA を導入した職員の手である。しかしその背景には大病院における成人病棟の MRSA の蔓延と、職員の定期的な交代により、その伝播がおこった

と考えるのが、もっとも妥当である。

今後、NICU内でいかに対策を図ろうとも、同じ病院の他病棟でMRSAが蔓延している状態では、手術部や放射線部などの共通部門における職員間、あるいは看護職員の勤務交代による伝播を防ぐことは不可能であり、全病院的な予防対策を考える必要がある。

●文 献

- 1) 北島博之：新生児集中治療室 (NICU) における院内感染対策サーベイランスシステム構築。「新生児及び乳幼児のMRSA感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」, 平成13年度報告書, 35-39, 2002
- 2) Hiroyuki Kitajima: Prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in neonates. *Pediatrics International* 45:238-245, 2003
- 3) 北島博之：新生児病棟/NICU - MRSA感染症の予防と対策. *周産期医学* 32:967-973, 2002
- 4) 北島博之：感染予防の基本. 特集正常新生児のケア. *ペリネイタルケア* 21:300-306, 2002
- 5) 福田雅文, 松尾孝司, 江頭昌典・他：母乳, 授乳, 母と子のスキンシップが感染症に及ぼす影響 (第2報) 授乳による母乳中細菌と口腔内細菌の相互作用. *未熟児新生児誌* 9:369, 1997
- 6) Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T et al.: Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci. *Clin Infect Dis* 15:1399-1407, 2001
- 7) 中村友彦：超低出生体重児の上気道常在細菌叢の獲得とMRSA保菌に関する検討。「新生児及び乳幼児のMRSA感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」, 平成13年度報告書, 27-30, 2002
- 8) 大城 誠, 高橋理栄子, 西川 浩・他：新生児集中治療室におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌保菌児の減少—手袋着用の効果—. *日児誌* 102:1171-1175, 1998
- 9) 北島博之：院内感染コントロール. シンポジウム周産期感染症, *新生児誌* 29:77-82, 1993
- 10) 側島久典：医療従事者の鼻腔MRSAと陽性者へのムピロシン軟膏塗布後の追跡に関する研究。「新生児及び乳幼児のMRSA感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」, 平成13年度報告書, 31-33, 2002
- 11) 北島博之：超低出生体重児と緑膿菌, 院内感染の落とし穴. *Neonatal Care* 10:1040-1048, 1997
- 12) 北島博之：超低出生体重児のカンジダ症, 院内感染の落とし穴. *Neonatal Care* 10:928-934, 1997
- 13) 横尾さち子, 沖井 幸, 田中加世・他：臍内微生物と妊婦生活—助産婦としての援助を考える—。大阪府立助産婦生研究業績集, 283-286, 1997
- 14) 北島康司, 岡部仁美, 住田 裕・他：超低出生体重児における真菌のcolonizationの迅速診断—リムルステストによる β -D-グルカン測定の有効性について—. *未熟児新生児誌* 10:376, 1998

著者連絡先

〒594-1101 大阪府和泉市室堂町 840
大阪府立母子保健総合医療センター
新生児科
北島博之

Neonatal Care

2004年第17卷第6号（通巻第222号）

MC メディカ出版