

特別寄稿

米国における感染防止に関する勧告—1

日本外科感染症学会 教育委員会委員長

大久保 憲

はじめに

Infection Control and Hospital Epidemiology 2008 Oct. ; 29 Supplement : S51-61. に Supplement article : SHEA/IDSA Practice recommendation (米国ヘルスケア疫学学会 / 米国感染症学会の実施勧告) が掲載された。この著作権は米国 The Society for Healthcare Epidemiology of America に帰属しているため、直訳版ではなく内容を要約してシリーズとして数編に分け掲載することとする。本稿では SSI に関して、「急性期病院における手術部位感染 (以下, SSI) 防止の戦略」(Deverick J. Anderson, MD, MPH; Keith S. Kaye, MD; David Classen, MD, MS ほか) の要約を行う。

1999 年に発行された CDC の「SSI 防止のガイドライン」は現在も有効であるが、今回の実施勧告は、急性期病院が SSI 防止を有効に実施するための支援を、簡潔な書式で提供するためのものである。

セクション 1 : SSI 発生状況と転帰

- a. SSI は米国で入院手術を受ける患者の 2 ~ 5% で発生している。
- b. 毎年全米で約 50 万件の SSI が発生する。
- c. SSI 1 件につき、約 7 ~ 10 日の術後入院日数が増加する。
- d. SSI 罹患患者は、SSI 非罹患の手術患者と較べ、死亡リスクが 2 ~ 11 倍高く、SSI 罹患患者で死亡例の 77% の死因が SSI であった。
- e. SSI が発生するとそのコストは、術式および起炎菌の種類によって異なるが、おおむね \$ 3,000 ~ 29,000 の範囲である。

セクション 2 : SSI の診断

1. 定義

CDC の National Nosocomial Infections Surveil-

lance System (NNIS) および National Healthcare Safety Network (以下, NHSN) による SSI の定義が広く用いられている。

2. SSI サーベイランスの方法

- a. 術後 24 ~ 48 時間から開始する。
- b. 感染管理専門家 (Infection Control Professional) が手術部位を毎日観察するという直接的方法が最も正確とされているが、臨床現場では各種の制約があり実際的ではないとされているためまれな方法となっている。
- c. 間接的方法は、以下の組み合わせからできている。
 - i. 微生物検査報告および患者カルテの再検討
 - ii. 外科医または患者調査または両者
 - iii. 外科患者の再入院時のスクリーニング
 - iv. コード化した診断または手術報告書などの他の情報

この方法は、サーベイランスのための回診で感染管理担当者 (Infection Control Personnel) が短時間で容易に実行できる。

3. 退院後のサーベイランス

- a. 術後の外科的処置は、外来で行われることが多い。
- b. 術後入院日数は短縮している。
- c. 退院後の標準化されたサーベイランス方法は確立されていない。
- d. 退院後の外来での SSI サーベイランス方法はまちまちである。
- e. 外科医および患者アンケートに基づく退院後のサーベイランスは不確実である。
- f. 医療機関での SSI の全体的な発生率は、退院後にサーベイランスが有効に実施された場合には、総じて上昇する。
- g. 外来診療の場で発生し、管理される SSI は、通

常切開部表層 SSI である。

- h. 切開部深層および臓器/腔 SSI の場合は、その管理のため再入院が必要となる。

セクション 3：SSI 防止のための現行のガイドライン、勧告および要求事項

- a. Hospital Infection Control Practice Advisory Committee (HICPAC) による SSI 防止のためのガイドライン (1999) が最も新しい。
- b. 手術感染防止共同研究計画 (Surgical Infection Prevention Collaborative：以下, SIPC)：メディケア・メディケイド・サービスセンター (CMS) が 2002 年に手術感染防止共同研究計画として創設した。予防的抗菌薬についての以下の 3 つの提案がなされている。

- ① 執刀前 1 時間以内に予防的抗菌薬を静脈投与する (バンコマイシンおよびフルオロキノロン投与の場合は、2 時間でよい)
- ② ガイドラインに基づいて抗菌薬を選択する
- ③ 術後 24 時間以内に予防的抗菌薬の投与を中止する (成人で心臓胸部手術を行った場合、中止は 48 時間以内でも可)

SIPC は、腹式子宮摘出術、膣式子宮摘出術、股関節形成術、膝関節形成術、心臓手術、血管手術、結腸直腸手術に焦点を絞っており、SIPC による提案を遵守し、改善できた病院の多くで、SSI 発生率が低下した。

- c. 外科的ケア改善プロジェクト (Surgical Care Improvement Project：以下, SCIP) 2003 年に創設された多施設共同研究プロジェクトであり、SIPC の拡張活動である。

SSI を予防するため以下の 3 つの項目を推奨している：

- ① 除毛しないこと、必要時にハサミや除毛剤使用は適切であるが、カミソリの使用は不適切である。
- ② 心臓手術では、術後 day 1 および術後 day 2 の午前 6 時の血糖値を管理する。この場合手術当日の術後は day 0 とする。
- ③ 結腸直腸手術を受ける患者の場合、周術期で正常体温を維持する。

- d. ヘルスケア改善研究所 (Institute for Healthcare Improvement：以下, IHI)

IHI は、全米医療水準改善プロジェクトを創設し、SCIP が推薦する項目を勧告し、これらの項目を 10 万人および 500 万人生命キャンペーンに含めた。

セクション 4：SSI 防止のモニター

I. すべての急性期病院のための勧告

1. SSI サーベイランスの実施 (A-II)。
2. 予防的抗菌薬の正しい投与 (A-I)。
3. 毛が手術の邪魔にならない限り、除毛しない：カミソリを使用しないこと。除毛が必要であれば、ハサミで切るか、または除毛剤を用いる (A-II)。
4. 心臓手術では手術後の血糖値を管理する (A-I)。
術中の血糖値コントロールは、術後の血糖値管理と比べて SSI リスク低下は確認されていない。最近の RCT では、心臓手術中に血糖値のコントロールを開始した場合、発作および死亡も含め、実際に有害転帰が高率で発生する可能性のあることが確認された。

II. SSI 防止のための特別な取り組み

SSI のリスク評価を行う。できればすべての NHSN の手順にまでサーベイランスを拡大する。なお、拡大サーベイランスは病院の戦略計画に沿うようにしなければならない。

III. SSI 防止のルーチンとしてはならない事項

1. 予防的抗菌薬としてルーチンにバンコマイシンを使用してはならない (B-II)。
- a. 特定の場合には適切な薬剤であることがある：MRSA が原因の SSI のアウトブレイク時、MRSA が原因の SSI 発生のハイリスク患者 (心臓胸部手術患者および糖尿病のある高齢者を含む)、およびインプラント器材のあるハイリスク患者の場合。
- b. MRSA が原因の SSI の多発の定義は確立されていない。
- c. バンコマイシンの予防的投与の効果に関する研究は、市井感染型 MRSA の出現前に発表されたものである。
- d. 心臓胸部手術前のグリコペプチド系薬剤と、 β -ラクタム系薬剤との最近のメタ分析により、両者間には SSI 発生率の差はなかったことが確認された。
- e. 術前の予防的抗菌薬投与として、グリコペプチド系薬剤と β -ラクタム系薬剤併用投与効果について、前向きに分析した研究はない：バンコマイシンが適応の場合、標準的に推奨される薬

剤の代わりに、バンコマイシン単独投与すべきかどうかについては明らかではない。バンコマイシンはグラム陰性菌に対しては感受性がないため、特定の臨床状況の場合に標準的な予防的抗菌薬に加えてバンコマイシン治療を行うことが一部の専門家によって推奨されている。

2. 非経口的栄養を与えるという理由で予定手術を遅らせてはならない (A-I)。

IV. 未解決事項

1. クロルヘキシジン含有製品による術前シャワー浴
クロルヘキシジンなどの薬剤で術前シャワー浴を行うことにより、皮膚の細菌コロニー数の減少が確認されているが、SSI のリスクが低減したことをはっきり証明したものはない。最近の Cochrane のレビューは、SSI 防止に消毒薬で術前に入浴またはシャワー浴をした場合のエビデンスを評価している。4%クロルヘキシジングルコン酸塩の使用を評価した6件のRCTがその評価分析に含まれているが、明らかな結果は確認されていない。クロルヘキシジンの最大消毒効果を得るには、完全にその薬剤が乾燥し、洗い流されないようにしなければならない。

2. MRSA に対するルーチンのスクリーニング (監視培養) を実施し、術前に抗ブドウ球菌製剤を用いて手術患者に細菌定着を阻止する試み

- a. 4,000 名以上の患者を対象にした二重盲検 RCT によって、ムピロシンの鼻腔内塗布は、*Staphylococcus aureus* による SSI 発生率を有意に低下させなかったことが確認された。しかし、これらのデータの二次的な分析では鼻腔内ムピロシンの使用は、*S. aureus* 保菌者で *S. aureus* の院内感染の全般的な低下との関連性が認められた。
- b. 他の研究ではムピロシンが整形外科または心臓胸部の手術を受けた患者を含め、特定の患者群で有効であると考えられると示唆されている。しかしながら、これらの研究は RCT ではなかった。

3. 結腸直腸手術中および術後の酸素投与について

a. 術中および術後に FiO_2 (吸気酸素濃度) 80% と 30 ~ 35% の濃度で比較した3つのRCTが発表されている。

- ① 2つの試験は、より高い FiO_2 値で SSI 発生率が有意な減少を示し、1つの試験は、SSI 発生率で有意な増加をはっきりと示してい

る。

- ② 酸素補充の有益な効果を示した2つの試験には、結腸直腸手術を受けた患者が含まれているのに対し、酸素補充の負の効果を示した試験には、すべての種類の患者が含まれていた。
- ③ これら3つの試験の結果をプールすると、SSI 発生率は、30 ~ 35% FiO_2 を受けた患者では 15.2% に低下し、術中に 80% FiO_2 を受けた患者では 11.5% に低下した (3.7% absolute risk reduction ; $p = 0.10$)。

4. 結腸直腸手術直後に正常体温 (36.0°C よりも高い体温) の維持

- a. 結腸直腸手術を受けた 200 名の患者を対象とした RCT によると、感染率は術中正常体温を維持させた無作為化患者で有意に低下したことが確認されている。
- b. このような勧告については以下のためにいまだ議論のあるところである：

- ① 試験は、術中の正常体温の影響について調べたものであり、術後の正常体温についてではない。また手術の種類に応じたリスク調整は含まれていない。
- ② Observation study では、正常体温は感染率に何ら影響を与えないことが確認された。

5. 心臓胸部手術を受ける患者での術前鼻腔内および咽頭のクロルヘキシジン処置

試験データは、その使用を裏付けるため RCT から得られていたが、クロルヘキシジンの鼻腔用クリームは、FDA によって承認されたものでもなく、また米国で市販されているものでもない (日本ではクロルヘキシジン製剤の鼻腔への使用は承認されていない)。

V. SSI 防止のための主要リスクファクターに対する勧告

1. 年齢：SSI のリスク増大との関連性は併存疾患と免疫の老化に関連する。
2. 血糖コントロール：血清中の血糖濃度を管理する。ヘモグロビン A1c 濃度を術前に 7% 以下に低下させる (A-II)。
3. 肥満：病的肥満患者に予防的抗菌薬の投与量を増量する (A-II)。
4. 喫煙：術前 30 日間禁煙する (A-II)。
5. 免疫抑制剤の投薬：正式勧告はない。一般的に、

- 可能であれば周術期間中の免疫抑制剤の投薬は避ける (C-II)。
6. 除毛：毛が手術の障害にならない限り，除毛しない。除毛が必要な場合は，はさみで刈り込む。カミソリは使用しない (A-I)。
 7. 術前の感染症：待機的手術前に手術部位から遠位の感染（例，尿路感染）を確認し，治療する (A-II)。
 8. 手術時手洗い：消毒薬を用いて2～5分間の手術時手洗いの実施，または速乾性擦式アルコール製剤の使用 (A-II)。
 9. 術野皮膚消毒：切開部位周辺の皮膚を適当な消毒薬により清潔にする (A-II)。
 10. 予防的抗菌薬：適応がある場合にのみ投与する (A-I)。
 11. 抗菌薬投与のタイミング：執刀前1時間以内に投与する (A-I)。
 12. 抗菌薬の選択：該当手術のSSIの最も一般的な病原体に対して適正な薬剤を選択する (A-I)。
 13. 抗菌薬の投与期間：術後24時間以内に予防的抗菌薬の投与を中止する。心臓手術の場合は，投与を48時間以内とする (A-I)。
 14. 手術手技：組織を慎重に取り扱い，死腔をなくす (A-III)。
 15. 無菌性：手術室の無菌に関する標準原則を遵守する (A-III)。
 16. 手術時間：正式の勧告はない。可能な限り手術時間を短縮する (A-III)。
 17. 手術室の換気：米国建築家協会 (American Institute of Architect : AIA) の勧告に従う (C-I)。
 18. 人の動き：手術室内の人の動きは最小限にする (B-II)。
 19. 環境表面：米国環境保護局 (EPA) 承認の薬剤を環境および器材の清浄化に使用する (B-III)。
 20. 手術器械の滅菌：ガイドラインに従いすべての手術器械を滅菌する。フラッシュ滅菌器の使用は最小限にする (B-I)。

特別寄稿

米国における感染防止に関する勧告—2 急性期病院における中心静脈ライン関連血流感染の予防戦略

日本外科感染症学会 教育委員会委員長

大久保 憲

はじめに

Infection Control and Hospital Epidemiology 2008 Oct. ; 29 Supplement S22-30. に, Supplement article : SHEA/IDSA Practice recommendation (米国ヘルスケア疫学学会 / 米国感染症学会の実施勧告) が掲載された。この著作権は米国 The Society for Healthcare Epidemiology of America に帰属しているため, 直訳版ではなく内容を要約して掲載する。

急性期病院での中心静脈ライン関連血流感染 (central line-associated bloodstream infection : 以下, CLABSI) 予防を目的としたものである。さらなる詳細については Society for Healthcare Epidemiology of America/Infectious Diseases Society of America 発表の "Compendium of Strategies to Prevent Healthcare-Associated Infections" Executive Summary および Introduction を参照されたい。

セクション1: 根拠および懸念事項

1. CLABSI リスクがある患者とは
 - a. 集中治療室 (以下, ICU) 患者: ICU 患者でリスクが高い。カテーテルが頻繁に挿入され, 付随リスクが大きく, 緊急の状況下で頻繁にカテーテルが挿入され, 長期間にわたることが多いためである
 - b. 非 ICU 患者: 中心静脈ライン留置患者が最も多いのは ICU 以外の場合もある
2. CLABSI の影響
 - a. 入院の長期化
 - b. コストの増加
3. CLABSI の独立危険因子
 - a. リスク増加に関連する因子

- i. 長期入院後のカテーテル挿入
- ii. 長期のカテーテル留置
- iii. 挿入部位における微生物大量定着
- iv. カテーテルハブにおける微生物大量定着
- v. 内頸静脈カテーテル挿入
- vi. 好中球減少症
- vii. 未熟児 (在胎期間の短い早産児)
- viii. 完全静脈栄養
- ix. カテーテルのケア不良
- b. リスク減少に関連する因子
 - i. 女性

セクション2: CLABSI 発見のために

1. サーベイランスプロトコールおよび定義
 - a. 基準データと比較できるようなサーベイランスを行う
 - b. CLABSI のサーベイランスは *NHSN (National Healthcare Safety Network) Manual : Patient Safety Component Protocol* を参照する。

セクション3: CLABSI 予防戦略

1. 既存のガイドラインおよび勧告
 - a. 以下のようなものがある
 - i. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee
 - ii. The Institute for Healthcare Improvement
 - iii. Making Health Care Safer, Agency for Healthcare Research and Quality
 - b. これらの勧告には, カテーテルのタイプ (トンネル, 埋め込み, カフ, カフなしカテーテルまたは透析カテーテルなど) に基づく層別化が行われていない

2. インフラストラクチャー要件
 - a. CLABSI を有する患者を特定するための、感染予防管理プログラム
 - b. 発生率算出の分母となるカテーテル・日 (catheter-day) および CVC 利用率を算出するための患者・日 (patient-day) を収集、算出する
 - c. 教育および訓練の実施
 - d. 適切な臨床検査施設の支援
3. 実際に行うこと
 - a. 医師、看護師に対し、CLABSI 予防ガイドラインについて教育する
 - b. カテーテル挿入チェックリストを作成し実践する
 - c. 医療従事者にカテーテルの挿入および維持について教育する
 - d. カテーテル挿入キット/カートを用意する

セクション 4: 感染防止・モニタリング戦略

I. CLABSI 防止・モニタリングのための基本実践事項

A. 挿入前

1. 感染防止について教育する A-II

B. 挿入時

1. カテーテルチェックリストを利用して、感染防止実践事項を遵守する B-II
 - a. 無菌の手技実践の遵守を確認する
 - b. 手技における無菌性の破たんが認められた際に挿入を中止させる
2. カテーテルの挿入前または操作前に手指衛生を行う B-II
 - a. アルコール製剤または抗菌石鹸と水を使う
 - b. 手袋を使用する場合でも手指衛生は必要である
3. 成人患者では大腿静脈の利用を避ける A-I
 - a. 小児では、全身麻酔なしに大腿静脈カテーテル挿入が可能で、感染リスク増加を伴わない
 - b. 鎖骨下静脈への挿入に伴う CLABSI リスクは内頸静脈よりも低い、危険性と有益性を個別に考慮して挿入部位を決める
 - c. 末梢静脈からの挿入 CVC の利用は、ICU 患者では、感染リスクが鎖骨下静脈または内頸静脈挿入 CVC に伴う感染リスクに迫る
4. カテーテルセットまたはキットを利用する B-II

5. CVC 挿入中は、マキシマルバリアプリコーションをする A-I

- a. マスク、キャップ、滅菌ガウンおよび滅菌手袋を着用する。カテーテル挿入中は、患者を滅菌覆布で覆う

6. 生後 2 ヶ月超の患者では、皮膚消毒にクロルヘキシジン製剤を使用する A-I

カテーテル挿入前に、0.5%以上のクロルヘキシジンアルコールにて皮膚消毒をする。この消毒薬が乾くのを待って皮膚穿刺を行う。米国 FDA は、生後 2 ヶ月未満の小児へはクロルヘキシジン製剤の使用を承認していない。この場合には、ポビドンヨードを使用する。

C. 挿入後

1. カテーテルを利用する前に、カテーテルハブ、ニードルレスコネクタ、および注入ポートを消毒する B-II。

- a. クロルヘキシジンアルコール製剤または 70% アルコールで消毒する

2. 不必要なカテーテルを抜去する A-II

- a. 患者ケアに不必要なカテーテルを抜去する

3. カテーテル皮膚刺入部は、透明なドレッシングを 5~7 日おきに交換し、汚れ、弛みまたは湿り気があるときはもっと頻繁に交換してクロルヘキシジン製剤で挿入部を消毒する。ガーゼ包帯の場合は 2 日おきに交換し、汚れ、弛みまたは湿り気があるときはもっと頻繁に交換する A-I

4. 血液、血液製剤または脂肪乳剤に使用しなかった投与セットは、96 時間以内の間隔で交換する A-II

5. CLABSI についてのサーベイランスを実施する B-II

- a. 病棟特異的な CLABSI 発生率 (1,000 カテーテル・日あたりの CLABSI 発生件数) を調べ、定期的にデータを報告する

- b. CLABSI 発生率を公式なデータ (すなわち NHSN のデータ) と比較する

6. 血液透析カテーテル挿入部位には抗微生物軟膏を使用する A-I

- a. 再発性 *Staphylococcus aureus* CLABSI の既往がある患者には、血液透析カテーテル挿入部位にポビドンヨード軟膏などを塗布する

- b. 耐性およびポリウレタンカテーテル素材の損傷のリスクがあるため、カテーテル挿入部位にムピロシン軟膏を塗布すべきでない

D. 説明責任 (省略)

II. CLABSI 予防のための特殊なアプローチ

CLABSI リスクアセスメントを実施し、CLABSI 発生率が特に高い領域では、以下に示す特殊な対応を行うことが推奨される。

1. 生後2ヵ月超のICU患者については、毎日クロルヘキシジン製剤で挿入部位を処理するB-II
 - a. FDAは、生後2ヵ月未満の小児に対するクロルヘキシジン製剤の使用を承認していない
 - b. 生後2ヵ月未満の小児、特に出生時低体重の新生児におけるCVC挿入部位の清浄化にはポビドンヨード製剤を使用すべきである
2. 成人患者には、抗菌薬または抗微生物薬充填CVCを使用するA-I
 - a. 現在市販されている一部の抗菌薬(クロルヘキシジン-スルファジアジン銀など)または抗微生物薬(ミノサイクリン-リファンピンなど)充填カテーテルではCLABSIリスクが低下するため、こうしたカテーテルの利用を考慮する
 - b. FDAは、小児に対する抗菌薬充填カテーテルの使用を承認していない
3. 生後2ヵ月超の患者のCVCにはクロルヘキシジン含浸スポンジ包帯を使用するB-I

出生時低体重の新生児にクロルヘキシジン含浸スポンジ包帯を使用しない
4. 抗微生物薬によるCVCロックを用いるA-I
 - a. カテーテルハブを次に利用する時まで、超生理学的濃度の抗微生物薬溶液をカテーテル内腔に満たしたままにすることによって、抗生物質ロックを行う。耐性発現の可能性およびロック液が血流に入り込むことによる全身毒性の可能性が懸念されるため、抗微生物薬ロックは以下の場合に限る
 - i. 静脈アクセスが限定的で、再発性CLABSIの既往がある患者のための予防
 - ii. CLABSI重度続発症リスクが高い患者(人工弁や大動脈グラフトなどの血管内デバイスが最近移植された患者など)

III. ルーチンのCLABSI予防対策とみなすべきでないアプローチ

1. 抗微生物薬投与によるカテーテル感染予防を行わないA-I
 - a. 抗微生物薬の予防的な全身投与は推奨されな

い

2. CVCまたは動脈カテーテルをルーチンで交換しないA-I
3. 機械弁を備えた陽圧ニードルレスコネクタをルーチンで使用しないB-II

IV. 未解決事項

1. 患者に対する看護師の人数比およびICUにおけるヘルプ看護師(float nurses)
 - a. CVC挿入患者を管理するICUでは看護師対患者の比を少なくとも2:1にすべきである。ICUで働くヘルプ看護師の数は最小限にすべきであることを示唆している。正式な勧告は、介入試験の結果待ちである
2. CLABSI発生率抑制のための静脈内療法チーム
 - a. 末梢静脈カテーテルの挿入および維持において静脈内療法チームの設置は血流感染リスクを減少させるが、静脈内療法チームがCLABSI発生率に及ぼす影響についての研究はほとんど行われていない
3. 末梢動脈カテーテルなどについてのサーベイランス
 - a. これからは血流感染サーベイランスシステムにおいて、末梢動脈カテーテルを含める必要があるかもしれない
4. CLABSIのカテーテル・日を推定することにより、サーベイランスを促進することができる可能性がある

セクション5: 状況評価

I. 内部報告

病院の責任者、看護師責任者およびCLABSIリスクのある患者のケアにあたる臨床医に、プロセスおよび成果の数値を報告する。

A. プロセス測定値(優先順位の高いものから順に提示)

1. CVC挿入ガイドラインの遵守率
 - a. CVC挿入が行われるICU、救急部、手術室、放射線科、一般病棟などにおけるチェックリストの遵守率を評価する
 - b. 手指衛生、マキシマルバリアアプリケーションの実施、挿入部位へのクロルヘキシジン製剤の使用の遵守率を求める
 - i. 分子:CVC挿入時に3つの介入(手指衛生、マキシマルバリアアプリケーション、皮膚消毒へのクロルヘキシジン製剤の使

- 用)すべてが実行されたことが記録された CVC 挿入の件数
- ii. 分母: CVC 挿入の総実施件数
 - iii. 商に 100 を乗じて測定値をパーセンテージで表す
2. CVC アクセスの必要性に関する毎日の評価の記録の遵守率
- a. 毎日の評価が記録されている CVC 留置患者のパーセンテージを調べる
 - i. 分子: 毎日の評価が記録されている CVC 留置患者の数
 - ii. 分母: CVC 留置患者の総数
 - iii. 商に 100 を乗じて測定値をパーセンテージで表す
3. カテーテルハブおよび注入ポートの利用前清浄化の遵守率
- a. 実践の観察を通じて遵守率を評価する
 - i. 分子: カテーテルハブまたはポートの利用前清浄化が観察された回数
 - ii. 分母: カテーテルハブまたはポートの利用が観察された回数
 - iii. 商に 100 を乗じて測定値をパーセンテージで表す
4. 成人患者における大腿静脈からの CVC 挿入回

避の遵守率

- a. CVC が鎖骨下静脈または内頸静脈ではなく大腿静脈に挿入された患者のパーセンテージを求める
- b. 大腿静脈カテーテル挿入患者のパーセンテージを算出する
 - i. 分子: CVC が大腿静脈に挿入された患者の数
 - ii. 分母: 評価したユニットにおいて CVC が挿入された患者の総数
 - iii. 商に 100 を乗じて測定値をパーセンテージで表す

B. 成果測定値

1. CLABSI 発生率

- a. NHSN の定義を使用する
 - i. 分子: 評価した各ユニットにおける CLABSI 発生件数 (NHSN の定義を使用)
 - ii. 分母: 評価した各ユニットにおけるカテーテル・日の総数 (NHSN の定義を使用)
 - iii. 商に 1,000 を乗じて, 測定値を 1,000 カテーテル・日あたりの CLABSI 発生件数で表す
 - iv. リスク調整: 患者ケアユニットのタイプで CLABSI 発生率を層別化する

日本病院薬剤師会雑誌 別刷

日本病院薬剤師会雑誌

*JOURNAL OF JAPANESE SOCIETY
OF HOSPITAL PHARMACISTS*

Vol.45. No.7. 2009



社 団 法 人
日 本 病 院 薬 剤 師 会

Clostridium difficile感染症について

国立感染症研究所 細菌第二部
加藤 はる Haru KATO

Clostridium difficile感染症 (Clostridium difficile infection : 以下CDI) について

*C. difficile*は偏性嫌気性グラム陽性桿菌で、酸素の存在下では増殖しない。本菌は芽胞を形成し、芽胞のかたちでは酸素、消毒薬、乾燥に耐性で、医療スタッフの手指を含む医療環境に長期間生存し続け、医療関連感染の原因となる。本感染症はそのほとんどが消化管感染症で、症状としては、下痢、腹痛、粘液便、血便等が認められ、症例によっては発熱や白血球増多を伴う。さらに、重症例ではイレウス、toxic megacolon、さらに消化管穿孔になり、ICU入院や緊急手術が必要な症例や死亡例も認められ、症状の幅の広い感染症である。偽膜性大腸炎は病理学的診断名で、内視鏡、術中所見あるいは剖検により偽膜形成が認められた場合に診断される。消化管に偽膜形成が認められればCDIと考えられるが、偽膜形成の認められないCDI症例は多いため、診断には細菌学的検査が必要である。

CDIは、抗菌薬等の使用により腸内フローラが攪乱された際に発症することが多い。一方、抗菌薬関連下痢症・腸炎では、*C. difficile*が関与する場合と関与しない場合がある。*C. difficile*が原因となる抗菌薬関連下痢症・腸炎では、症状が重篤になる傾向があること、バンコマイシン等による抗菌薬治療が可能であること、医療関連感染の原因となるため予防対策が必要であることから診断検査が必須である。バンコマイシンも含めてすべての抗菌薬が誘因となり得る¹⁾。古典的には、クリンダマイシン、第二世代第三世代セファロスポリンおよびペニシリン系抗菌薬が誘因となりやすいとされているが、近年の流行では、フルオロキノロン系抗菌薬がリスクの高い薬剤として報告されている。理論的には、腸内フローラを攪乱しやすい薬剤、すなわち、抗嫌気性菌作用のある薬剤、胆汁排泄型の薬剤がハイリスクとなるが、臨床的な検討結果と必ずしも一致しない場合もある。一方、最近症例数の増加が報告されている*C. difficile*市中感染においては、抗菌薬使用歴が認められない症例が少なくないことが注目されている²⁾。

また、CDIは再発率が高く、治療を困難なものにして

いる。一度腸内フローラが攪乱されると、回復するのに2~3ヵ月必要な場合もあり、その間は再発しやすいために、CDI回復後2ヵ月間はほかの感染症を対象とした抗菌薬の使用と選択には注意が必要である。

C. difficile感染症の診断検査

内視鏡検査では、前述のように偽膜形成が認められれば細菌学的検査を行わなくてもCDIと診断できるが、偽膜形成が認められなくてもCDIは否定できない。イレウス症状がある場合は細菌学的検査や内視鏡検査が困難な場合が多いが、特異的ではないものの、CT検査が有用であったという報告がある。血液検査では、白血球増多および低アルブミン血症が重症度の指標になる。

細菌学的検査のポイントを表1にまとめた。第一に、臨床的にCDIを疑って適切な検体を採取することが最も重要な点である。無症候性に*C. difficile*を消化管保有している症例は、特に抗菌薬を処方されている入院症例では多いので、消化管症状が認められない症例では*C. difficile*の検査は行わないことが基本である。また、2歳以下の小児においては*C. difficile*が検出されても消化管疾患の原因とは積極的に考えられないとされているので³⁾、基本的に検査は行わない。バンコマイシンやメトロニダゾール等の抗菌薬治療開始前に検体採取を行う。また、治療経過をチェックする目的や、治療後の隔離解除の指標のためには検査を行わない。その理由は、バンコマイシンやメトロニダゾール内服中は培養検査は難しくなり、反対に回復後も糞便から毒素検出が認められる症例が少なくないことから、検査を行う意義がないからである。糞便検体は採取が容易ではない場合も多いが、なるべく十分量(5 mL以上)の検体を採取する。嫌気培養用の輸送容器である必要はなく、同じ検査室で検査を行うのであれば毒素検出用と培養用に容器を分ける必要もない。十分量の検体が採取されていれば、週末に採取された検体において月曜日に分離培養検査を開始することに関しては大きな問題とならないと思われる。

細菌学的検査には、糞便中の毒素検出検査(toxin Aのみ検出、toxin Aおよびtoxin Bの同時検出)、*C. difficile*分離培養検査、さらに、グルタメートデヒドロゲナーゼ

表1 *C. difficile*感染症の細菌学的診断検査のポイント

1. 検体採取
 - (1) *C. difficile*感染症が臨床的に疑われた症例から、検体を採取する
 - (2) 基本的に、消化管症状のない症例においては検査を行わない
 - (3) バンコマイシンやメトロニダゾール等の抗菌薬治療開始前に検体採取を行う
 - (4) 基本的に、治療経過をチェックする目的や、治療後の隔離解除の指標のために検査を行わない
 - (5) 十分量（5mL以上）の糞便検体を採取する（綿棒の使用による検体採取は極力避ける）
 - (6) 輸送容器は、嫌気培養用の輸送容器である必要はない
 - (7) 検体採取後は2～8℃で保存し、できれば採取24時間以内に検査室に輸送する
2. 糞便中毒素検出検査
 - (1) Toxin Aおよびtoxin Bの両毒素を検出する酵素抗体法による市販キットを使用する
 - (2) 市販キットによる毒素検出は、検査依頼当日中に検査結果が出る
 - (3) 酵素抗体法による毒素検出は、毒素産生性*C. difficile*の分離培養と比較すると感度が低い
 - (4) *C. difficile*感染症、抗菌薬関連下痢症・腸炎を疑っていない症例から（別の検査目的で）採取された糞便検体において、検査を行うべきではない
 - (5) C.D.チェックD-1に代表されるグルタメートデヒドロゲナーゼ検出は毒素検出ではないので、単独では検査法として不適当
3. *C. difficile*分離培養検査
 - (1) 検査依頼の際に、検査室に*C. difficile*感染症、抗菌薬関連下痢症・腸炎症例を疑っている症例からの検体であることを明確に伝える必要がある
 - (2) 芽胞処理と選択培地の使用により、感度良く分離培養が可能である
 - (3) 多くの陽性検体では培養開始24～48時間後にコロニーが認められるので、検査翌日あるいは翌々日に培養陽性の速報が可能であるが、培養陰性と判定するには5日間以上の培養が必要である
 - (4) 酵素抗体法による毒素検出と比較して、感度が良好である
 - (5) 分離された菌株が、toxin A陰性toxin B陰性である可能性がある
 - (6) *C. difficile*感染症、抗菌薬関連下痢症・腸炎を疑っていない症例から（別の検査目的で）採取された糞便検体において、検査を行うべきではない

検出検査がある。以前、多くの日本の医療施設で用いられていたC.D.チェックD-1はグルタメートデヒドロゲナーゼを検出する検査であり、毒素の検出ではない。感度も特異度も良好ではないので、CDIの細菌学的検査に単独で用いることは不適當である。

*C. difficile*の産生する毒素には、toxin A, toxin B, さらにbinary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase : CDT) がある。Toxin Aとtoxin Bは本菌の病原性に大きな役割を果たしているが、toxin A陰性toxin B陽性株が、toxin A陽性toxin B陽性株と同様に消化管感染症を引き起こし、施設内アウトブレイクの原因ともなるので、toxin Aのみでなく、toxin Aとtoxin Bを同時に検出する迅速診断キットの使用が勧められる。日本で承認認可されたtoxin Aとtoxin Bを同時に検出する酵素抗体法による診断キットには、TOX A/B QUIK CHEK（日水製薬㈱）、イムノカードCDトキシンA & B（㈱テイエフビー）、バイダスアッセ

イキットCDAB（シスメックス・ビオメリュール）がある。バイダスアッセイキットCDABでは定量が可能であるが、使用には専用の自動免疫蛍光測定装置設置が必要である。どのキットを使用しても、検体依頼日当日に検査結果が得られる。施行が迅速・簡便であるが、分離培養検査と比較すると感度が低いことを念頭に入れて検査結果を読まなければならない。検体採取に関しては、TOX A/B QUIK CHEKでは糞便検体を採取したら、できれば2～8℃で保存し24時間以内に検査することが勧められているが、72時間までの冷蔵保存であれば結果に影響しないというデータが示されている。

可能であれば、毒素検出検査と併用して*C. difficile*分離培養検査を行うことが勧められる。CDI疑い症例全症例で検査を施行することが難しい場合は、毒素検出検査が陰性であった検体および施設内感染が疑われる事例やハイリスク症例、重症例などからの検体についてのみ培養検査を併用することも一案である。*C. difficile*分離培養には、芽胞選択のための処理、選択培地の使用、嫌気培養などの特別なステップが必要なので、細菌検査室にCDIを疑っている症例からの検体であることを伝えない限り、*C. difficile*分離培養は行われぬ。培養検査は、酵素抗体法による毒素検出と比較して感度が高いうえに、得られた菌株は疫学的調査に有用であるが、toxin A陰性toxin B陰性株の分離もあり得ることを考慮しなければならない。糞便中毒素陰性で培養陽性であった場合は、臨床症状と総合して判断して治療や予防対策の方針を決めるのが実際的と考えられるが、必要であれば、上記酵素抗体法による毒素検出キットにより得られた菌株におけるtoxin Aおよび/あるいはtoxin Bの産生性が検討可能である。

*C. difficile*感染症の治療

CDIの治療について、図1にフローチャートをまとめた。抗菌薬関連下痢症・腸炎が疑われた時点で、誘因と考えられた抗菌薬を中止、あるいは腸内フローラを攪乱しにくい抗菌薬に変更する。塩酸ロペラミドのような消化管蠕動を抑制する薬剤の使用は、中毒性巨大結腸の誘因となるので禁忌である。

CDIと診断されてもバンコマイシンあるいはメトロニダゾールを内服せずに回復する症例は少なくないので、症状が重症でない場合、そのまま2～3日経過をみる。回復傾向が認められないあるいは症状が増悪する場合には、バンコマイシンあるいはメトロニダゾール内服を開始する。米国では、CDIの治療薬として米国Food and Drug

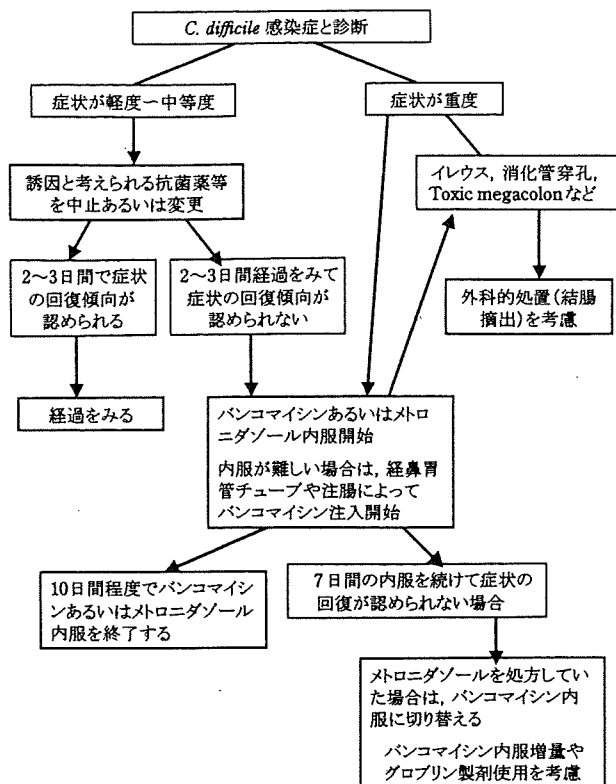


図1 C. difficile感染症の治療のフローチャート

Administrationに認可されているのは経口バンコマイシンだけであるが、バンコマイシンと比較して安価であること、バンコマイシンとほぼ同等の治療効果が報告されていることから、軽度および中等度の下痢・腸炎の場合はメトロニダゾールが頻繁に使用されている。日本においてもメトロニダゾールは嫌気性菌感染症の治療薬としては認可されていないが、現在は多くの医療施設でCDI症例に処方されている。バンコマイシンの代わりにメトロニダゾールを処方する理由の1つに、バンコマイシン耐性腸球菌（以下、VRE）の消化管での増殖・定着の助長が挙げられることがあるが、腸内フローラを乱しVREの消化管内での増殖・定着を促進するのは、どちらの薬剤も同様であるとされる⁹⁾。一方、最近、C. difficile臨床分離株において認められたメトロニダゾール耐性が不安定およびheterogenousであり、*in vitro*での長期のメトロニダゾール曝露により薬剤耐性が誘導されることが報告された⁹⁾。この検討では、メトロニダゾール耐性株が分離された症例14症例中10症例でメトロニダゾールにより治療後再発していると報告されている。現在、ルーチンにC. difficile分離菌株の薬剤感受性は検査しないが、今後必要になる可能性も否定できない。

経口バンコマイシンあるいはメトロニダゾール内服（7～10日間）を開始し、治療が奏効すれば通常1～2日

で症状の改善傾向が認められる。メトロニダゾールによる治療で症状が回復してこない、あるいは増悪するようであればバンコマイシン内服に切り替える。前述のように、治療経過中に細菌学的検査治療を行い、その結果を治療を終了するか続けるかの指標にするのは、意味がない。また、バンコマイシンにしてもメトロニダゾールにしても、この薬剤自体も腸内フローラにダメージを与えるので、長期間の内服は意味がないばかりか、再発を助長することにつながる。バンコマイシンは静注投与では消化管内で十分な薬剤濃度が得られないので、内服できない場合は、経鼻チューブや注腸、あるいは消化管に直接挿入したカテーテルによって消化管内に薬剤を到達させる必要がある⁶⁾。症状が重篤である場合には、細菌学的検査結果報告を待たずにバンコマイシンによる治療を開始する。イレウス、中毒性巨大結腸、消化管穿孔、昇圧剤に反応しない血圧低下、ショックなどの合併症を伴う劇症腸炎では、緊急手術が必要になる症例がある。C. difficileによる劇症腸炎は稀ではあるが、欧米ではhyper virulent株（PCR ribotype 027株）の流行に伴い（後述）重症症例の増加が報告されており、緊急手術施行に関しては迅速な判断が必要である⁷⁾。

CDIの治療薬として、バンコマイシンやメトロニダゾール以外の抗菌薬や、毒素吸着薬などについて欧米で臨床試験がなされつつある。プロバイオティクスによる治療効果については様々な報告があるものの、現在のところ、CDI感染症の治療や再発予防にルーチンに使用できることを示唆する十分なエビデンスはないと考えられている⁹⁾。

C. difficileによる医療関連感染の感染予防対策

CDIの予防対策は、宿主側のリスクの軽減と感染経路の遮断の2つに分けられる（表2）。宿主側のリスクの軽減としては、医療施設全体での抗菌薬適正使用が有効である。カナダからは、感染症医と薬剤師が、よく認められる感染症における経験的抗菌薬治療についてポケットサイズのガイドブックを作成し、施設内に配布して抗菌薬適正使用に成功した事例が報告された⁹⁾。特定の抗菌薬の使用を制限するものではなく、アウトブレイク時にこの医療施設でCDIのリスクとなった抗菌薬“targeted antibiotics”をリストアップし、これらの薬剤が処方された場合は薬剤師から、処方した医師に“代わりに選択すべき薬剤”を電話で示唆する方法をとったところ、結果的に医療施設全体で“targeted antibiotics”の使用量とともに抗菌薬全体の使用量も減り、CDI発症数も劇的に

表2 C. difficile感染症の予防対策のポイント

1. 抗菌薬適正使用
 - (1) すべての抗菌薬使用が、C. difficile感染症の誘因となり得る
 - (2) 腸内フローラを攪乱しやすい薬剤が誘因となりやすい
 - ① 抗嫌気性菌作用のある薬剤
 - ② クリンダマイシン、第二世代第三世代セファロスポリン、ペニシリンに加え、最近ではフルオロキノロン系抗菌薬の関与が報告されている
 - ③胆汁に排泄される薬剤
 - (3) C. difficile感染症回復後は腸内フローラが回復するまでに約2ヵ月間かかることもあるので、その間は抗菌薬使用に留意する
2. プロトン・ポンプ阻害剤やヒスタミン₂受容体拮抗剤、消化管蠕動を抑制する薬剤、経管栄養などのリスクファクターの見直し
3. 手指衛生
 - (1) 石けんと流水によって手洗いを行う（アルコールは芽胞に無効なので、速乾性擦り込み式アルコール製剤による手指消毒だけでは不十分であることに注意）
 - (2) 患者本人および家族にも石けんと流水による手洗いを実行してもらうよう説明する
4. 個室隔離あるいはコーホーティング
 - (1) 特にトイレは個別使用が望ましい
 - (2) 隔離解除は、基本的には消化管症状の回復時を基準とする
5. 接触予防対策
 - ・排泄物（特に糞便）を扱うケアの見直し、確認、徹底
 - ① 処置ごとに、使い捨て手袋および使い捨てエプロンの着脱を徹底
 - ② 使用後のオムツは病室の床に置かず、ただちに排便処理袋などに密封して廃棄
 - ③ 使用後の便器や陰部洗浄ボトルなどは、ベッドバンウォッシュャー使用による洗浄を行うか、0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムに30分浸漬
6. 環境の清拭
 - ・糞便で汚染されやすいところ、頻繁に接触するところを中心に清拭する
 - ① ベッド柵やコールボタンなど頻繁に触るところは、1日1回消毒薬で清拭する
 - ② 病室やトイレ、汚物室の清掃を業者に委託する場合は、清掃方法について確認する
 - ③ 各医療施設で購入している次亜塩素酸ナトリウムの濃度を確認し、使用時に適切に希釈できるように希釈早見表を作成し、汚物処理室などに掲示する

減少した⁹⁾。抗菌薬適正使用を医療施設全体で進めていくには、まず各々の施設においてどのような薬剤が頻繁に使用され、どのような薬剤がCDIの誘因となっているか調べる必要がある。

プロトン・ポンプ阻害剤およびヒスタミン₂受容体拮抗剤の使用がCDI発症と関連があるという報告がなされているが²⁾、関係がなかったという報告もあり、議論の残るところである。

手指衛生は、CDIだけではなくほかの感染症においても予防対策の基本である。C. difficileの芽胞はアルコールが無効なので、速乾性擦り込み式アルコール製剤の使用だけでは不相当であることを、医療スタッフだけでなく、患者本人および患者の家族にも認識してもらう必要がある。

基本的にCDIが疑われた症例は、可能であれば、個室で隔離あるいはコーホーティングを行う。個室隔離は、

下痢症状がなくなった時に解除するのが基本とされるが、下痢症状回復後2～3日経過をみて解除することもよく行われる。また、バンコマイシン（あるいはメトロニダゾール）による治療が必要であった症例では、治療終了時あるいは治療終了2～3日後に再燃症状がないことを確認してから解除するという基準を設けている施設もある。症状が回復した後もC. difficileを消化管保有していることが少なくないという理由から、個室隔離および接触予防策を退院時まで続けたほうがよいのではないかという意見もあるが、発症せずに無症候に消化管保有している症例も含めて、入院症例全例において標準予防策（特に、排泄物を扱うケア）の見直し、確認、徹底を行うことが現実的かと考えられる。

CDI症例の病室やトイレにおいて、糞便で汚染されやすいところ、頻繁に患者や医療スタッフが接触するところを中心に清拭を行う。ベッド柵、コールボタン、枕灯のスイッチ等によく触るところは、1日1回以上消毒薬を用いて清拭する。病室やトイレの清掃を外部業者に委託している場合は、業者スタッフと、どこを、どのような方法で、どのような頻度で清掃を行うか、現場で十分に打ち合わせる必要がある。消毒薬は、現在のところ次亜塩素酸ナトリウムが使用される。C. difficileの芽胞を不活化するには、0.5% (5,000ppm) の次亜塩素酸ナトリウムを用いると10分以内であるが、0.1% (1,000ppm) の次亜塩素酸ナトリウムでは30分の浸漬が必要であると報告されている¹⁰⁾。各々の医療施設で購入している次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度を確認し、適切な濃度と浸漬時間で消毒が行われているか確認が必要である。

C. difficileの近年の疫学的変化

CDIに関しては、菌株のタイピング解析による疫学的検討が進んでいる。国内外で臨床的に問題となっているC. difficile菌株タイプを表3にまとめた。2004年のカナダからの報告を皮切りに¹¹⁾、CDIの疫学的変化について相次いで報告され、世界中で注目されている。Pepinらの報告では、カナダ・ケベック州で1991年と2003年を比較すると、2003年ではCDI症例数が大幅に増加し、特に高齢者における増加が著しかった。また、重症症例やCDIと診断されてから30日以内に死亡する症例が増加した。カナダに続いて米国や欧州の国々で似たような報告がなされ、分離菌株が検討された結果、1990年代には頻繁に分離されることのなかったタイプの菌株が優勢になっていることがわかった。この株は、英国BrazierらのPCR ribotypingではtype 027と同定され、toxin Aおよび

表3 国内外で注目されている主な*C. difficile*菌株タイプ

PCR ribotype by Brazier <i>et al.</i>	<i>slpA</i> sequence type by Kato <i>et al.</i>	Toxinotype by Rupnik <i>et al.</i>	Toxin production*	報告されている菌株タイプの 特徴と臨床背景
001	gr	0	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	1990年代に北米および英国の多くの医療施設で優勢であり、クリンダマイシンによる選択圧が示唆された。現在も欧米では頻繁に分離されている。芽胞形成能が高いことが報告されている。
017	fr	VIII	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	カナダ、オランダ、日本などで集団発生報告あり。日本、韓国、ポーランド、アイルランドでは分離率が高い。
027	gc8	III	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	2000年頃より米国、カナダ、欧州の一部の国で流行が始まる。毒素産生能が高いことが報告されている。フルオロキノロン系抗菌薬による選択圧が示唆されている。
078	078	V	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	動物からの分離は知られていたが、最近ではヒト感染症においての分離が注目されている。
ND**	smz	0	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	日本の多くの医療施設で優勢。

*A⁺B⁺CDT⁻ : toxin A陽性toxin B陽性binary toxin陰性,
 A⁻B⁺CDT⁻ : toxin A陰性toxin B陽性binary toxin陰性,
 A⁺B⁺CDT⁺ : toxin A陽性toxin B陽性binary toxin陽性
 **ND : not determined

toxin Bのほかに、前述のbinary toxinを産生する株であった。PCR ribotype 027株は、toxin A遺伝子とtoxin B遺伝子が位置するpathogenicity locusにおいて変異株であり(toxinotype III)¹²⁾、毒素産生に負の調節をする遺伝子*tcdC*においても変異が認められ、さらに、*in vitro*でtoxin Aおよびtoxin Bを多量に産生すると報告された^{13,14)}。さらに、1990年代に分離されたtype 027株 (historic isolate) はガチフロキサシンやモキシフロキサシン等の新しいフルオロキノロン系抗菌薬に感性であるのに対し、近年のアウトブレイクから分離された菌株は耐性であり、フルオロキノロン系抗菌薬使用の選択圧が本タイプ流行の原因の1つである可能性が示唆された¹⁵⁾。PCR ribotype 027は日本でも分離されているが、現在のところ散発例からの分離であり、検討した限りではhistoric isolateであった¹⁵⁾。

PCR ribotype 027とともに、現在も欧米で優勢株の1つであるPCR ribotype 001は、1990年代は最優勢株であった。米国におけるアウトブレイク株はクリンダマイシン耐性であり、クリンダマイシン使用が本タイプ流行のリスクファクターであることが示唆された¹⁶⁾。また、PCR ribotype 001は芽胞形成能力が高いことが報告されている¹⁷⁾。

日本の複数の医療施設で優勢となることの多いタイプは、*slpA* sequence type smzと命名されたタイプである¹⁸⁾。本タイプは、toxin A陽性toxin B陽性binary toxin陰性、toxinotype 0であり、特別な病原性や日本以外での分離状況は不明である。Type smzとともに日本の医療施設でよく分離されるのは、toxin A陰性toxin B陽性binary

toxin陰性、toxinotype VIII、*slpA* sequence type fr株である。日本での分離が多いことは以前より報告されていたが、最近では欧州でも分離の増加が注目されている。

PCR ribotype 078株は、PCR ribotype 027と同様に以前からウシやブタといった食用動物からの分離が報告されていた。最近ではヒトのCDIにおいても分離され、特に市中感染例が多いということから¹⁹⁾、動物からヒトへの伝播、特に、食肉を介する感染の可能性が検討されている²⁰⁾。

引用文献

- 1) R.C. Owens Jr., C.J. Donskey, R.P. Gaynes, V.G. Loo, and C.A. Muto : Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection, *Clin. Infect. Dis.*, **46** (Suppl 1), S19-31 (2008).
- 2) S. Dial, J.A. Delaney, V. Schneider, and S. Suissa : Proton pump inhibitor use and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease defined by prescription for oral vancomycin therapy, *CMAJ*, **175**, 745-748 (2006).
- 3) L.V. McFarland, S.A. Brandmarker, and S. Guandalini : Pediatric *Clostridium difficile* : a phantom menace or clinical reality?, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **31**, 220-231 (2000).
- 4) W.N. Al-Nassir, A.K. Sethi, Y. Li, M.J. Pultz, M.M. Riggs, and C.J. Donskey : Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 2403-2406 (2008).
- 5) T. Pelaez, E. Cercenado, L. Alcala, M. Marin, A. Martin-Lopez, J. Martinez-Alarcon, P. Catalan, M. Sanchez-Somolinos, and E. Bouza : Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3028-3032 (2008).
- 6) D.N. Gerding, C.A. Muto, and R.C. Owens Jr. : Treatment of *Clostridium difficile* infection, *Clin. Infect. Dis.*, **46** (Suppl 1), S32-42 (2008).
- 7) F. Lamontagne, A.C. Labbe, O. Haecck, O. Lesur, M. Lalancette, C. Patino, M. Leblanc, M. Laverdiere, and J. Pepin : Impact of emergency colectomy on survival of patients with fulminant *Clostridium difficile* colitis during an epidemic caused by a hypervirulent strain, *Ann. Surg.*, **245**, 267-272 (2007).
- 8) N. Dendukuri, V. Costa, M. McGregor, and J.M. Brophy : Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea : a systematic review, *CMAJ*, **173**, 167-170 (2005).
- 9) L. Valiquette, B. Cossette, M.P. Garant, H. Diab, and

- J. Pepin : Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain, *Clin. Infect. Dis.*, **45** (Suppl 2), S112-121 (2007).
- 10) J. Perez, V.S. Springthorpe, and S.A. Sattar : Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile* : relevance to environmental control, *Am. J. Infect. Control.*, **33**, 320-325 (2005).
- 11) J. Pepin, L. Valiquette, M.E. Alary, P. Villemure, A. Pelletier, K. Forget, K. Pepin, and D. Chouinard : *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003 : a changing pattern of disease severity, *CMAJ*, **171**, 466-472 (2004).
- 12) M. Rupnik, N. Kato, M. Grabnar, and H. Kato : New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1118-1125 (2003).
- 13) L.C. McDonald, G.E. Killgore, A. Thompson, R.C. Owens, Jr., S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson, and D.N. Gerding : An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2433-2441 (2005).
- 14) M. Warny, J. Pepin, A. Fang, G. Killgore, A. Thompson, J. Brazier, E. Frost, and L.C. McDonald : Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe, *Lancet*, **366**, 1079-1084 (2005).
- 15) H. Kato, Y. Ito, R.J. van den Berg, E.J. Kuijper, and Y. Arakawa : First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan Euro Surveill, **12**, E070111, 070113 (2007).
- 16) S. Johnson, M.H. Samore, K.A. Farrow, G.E. Killgore, F.C. Tenover, D. Lyras, J.I. Rood, P. DeGirolami, A.L. Baltch, M.E. Rafferty, S.M. Pear, and D.N. Gerding : Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1645-1651 (1999).
- 17) W.N. Fawley, S. Underwood, J. Freeman, S.D. Baines, K. Saxton, K. Stephenson, R.C. Owens, Jr., and M.H. Wilcox : Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains, *Infect Control Hosp Epidemiol*, **28**, 920-925 (2007).
- 18) H. Kato, T. Yokoyama, and Y. Arakawa : Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan, *J. Med. Microbiol.*, **54**, 167-171 (2005).
- 19) A. Goorhuis, D. Bakker, J. Corver, S.B. Debast, C. Harmanus, D.W. Notermans, A.A. Bergwerff, F.W. Dekker, and E.J. Kuijper : Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078, *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 1162-1170 (2008).
- 20) J.G. Songer, H.T. Trinh, G.E. Killgore, A.D. Thompson, L.C. McDonald, and B.M. Limbago : *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007, *Emerg. Infect. Dis.*, **15**, 819-821 (2009).

Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing *slpA* and application to direct typing

Haru Kato,^{1*} Hideaki Kato,² Yoichiro Ito,³ Takayuki Akahane,⁴ Sayuri Izumida,² Toshiyuki Yokoyama,⁵ Chiharu Kaji,¹ and Yoshichika Arakawa,¹

¹Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo,

²Toyokawa City Hospital, Aichi, ³Gifu Red Cross Hospital, Gifu,

⁴Azumino Red Cross Hospital, Nagano, ⁵Kumiai Kosei Hospital, Gifu, Japan

*Corresponding author.

Present address: Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan.

Phone: +81-42-561-0771. Fax: +81-42-561-7173. E-mail: cato@nih.go.jp

Running title: Typing of *C. difficile* by sequencing *slpA*

Abbreviations: *slpA*, surface layer protein A gene; REA, restriction endonuclease analysis; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; *tcdB*, toxin B gene; *tcdA*, toxin A gene; CDI, *Clostridium difficile* infection.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers (*slpA* sequence type) for the *slpA* genes identified in this study are AB259785 (ar-02), AB258978 (cr-01), AB258979 (cr-02), AB258980 (cr-03), AB236153 (fr-01), AB249984 (gr-01), AB231583 (hr-01), AB258982 (kr-02), AB258981 (kr-03), AB239686 (xr-01), AB239685 (xr-02), AB261625 (xr-03), AB180242 (smz-01), AB181350 (smz-02), AB256018 (smz-04), AB240196 (yok-01), AB257283 (yok-02), AB236725 (hj2-01), AB236726 (j41-01), AB258983 (gc11-01), AB259787 (og39-01), AB538230 (y05-01), AB259786 (t25-01), AB269265 (g13-01), AB249986 (gc8-01), AB470267 (078-01).

SUMMARY

A typing system for *Clostridium difficile* by sequencing the surface layer protein A gene (*slpA*) was evaluated, and clinical isolates in Japan were analyzed by this method. A total of 160 stool specimens from symptomatic patients in Japan were examined and 87 isolates of *C. difficile* were recovered. *slpA* sequence typing was found to have reliable typability and discriminatory power in comparison with PCR ribotyping, and the typing results were highly reproducible and comparable. The *slpA* sequence typing was applied to type *C. difficile* in DNA extracted directly from stool specimens. Among the 90 stool specimens in which direct typing results were obtained, 77 specimens were positive for *C. difficile*-culture, and typing results from isolated strains agreed with those from direct typing in all 77 specimens. The *slpA* sequence type smz was dominant at all four hospitals examined, and this endemic type was detected by culture and/or direct typing in 61 (62%) of 99 stool specimens positive for toxic culture and/or direct *slpA* sequence typing. Comparison of epidemic strains reported throughout the world revealed one isolate identified as *slpA* sequence type gc8 which was found to correspond to PCR ribotype 027 (BI/NAP1/027), whereas no isolates were found with the *slpA* gene identical with that of PCR ribotype 078 strain. *slpA* sequencing typing is valuable for the comparison of *C. difficile* strains epidemic in diverse areas because typing results are reproducible and can be easily shared. In addition, *slpA* sequence typing could be applied to direct typing without culture.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is one of the important organisms that cause health-care associated infections. Specific strains have been documented to cause multiple outbreaks (Kato *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2005; Samore *et al.*, 1997), and patients infected with particular strains were more likely to develop severe disease (Barbut *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2008), suggesting that strain differences play some role in the pathogenicity of this organism. Recent reports have documented that a variant strain, characterized as restriction endonuclease analysis (REA) type BI, as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type NAP1, and as PCR ribotype 027, caused a high number of outbreaks in North America and Europe (Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; Warny *et al.*, 2005). In addition, PCR ribotype 078 has been noted as another hyper virulent strain, which has been recovered not only from calves and pigs (Keel *et al.*, 2007) but also from humans (Goorhuis *et al.*, 2008). Among numerous schemes for typing *C. difficile*, PCR ribotyping and PFGE typing are widely

used in Europe and North America to identify epidemic strains. However, it is not easy to share typing results by these schemes, which depend on banding-pattern analysis among multiple laboratories. In the present study, a typing method by sequencing the gene encoding a surface layer protein (*slpA*) was evaluated. Previous reports have documented that the low molecular weight peptide of the S-layer protein varies among *C. difficile* isolates (Calabi *et al.*, 2002; Eidhin *et al.*, 2006), and a variation of the gene was used for typing *C. difficile* (Karjalainen *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2005a). In this study, clinical isolates from Japan were analyzed by sequencing *slpA*, and the method was applied to type *C. difficile* on DNA directly extracted from stool specimens.

METHODS

Bacterial strains and stool specimens. The reference strains of F (ATCC 43598), G (ATCC 43599), H (ATCC 43600) (Delmee *et al.*, 1986) were obtained from the American Type Culture Collection. The GAI 97660 strain was used as the reference strain for the PCR ribotype smz, *slpA* sequence type smz and serogroup JP (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005a). Included in the present study were strains US36 (REA type J / PCR ribotype 001), NL8 (REA type Y / PCR ribotype 014), US37 (REA type G / PCR ribotype 002), US42 (REA type BI / PFGE type NAP1 / PCR ribotype 027) (Killgore *et al.*, 2008) and UMCG12(3) strain (PCR ribotype 078) (Goorhuis *et al.*, 2008). Stool specimens were obtained with the informed consent of patients who were hospitalized from 2003 to 2007 with a diagnosis of antibiotic-associated diarrhea or colitis. A total of 147 stool specimens from patients admitted to four hospitals (A, B, C, and D) and 13 specimens from sporadic cases from six other hospitals in Japan were tested. Hospitals A and D are located in different cities of the same prefecture (Gifu), while the hospitals B and C are in different prefectures, Aichi and Nagano, respectively. The stool specimens were frozen at -80°C until transported and tested at the National Institute of Infectious Diseases.

Culture. *C. difficile* was isolated on cycloserine-cefoxitin-mannitol agar (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) from stool specimens, which were treated with alcohol for spore selection, and identified as previously described (Kato *et al.*, 1998). The presence of the non-repeating sequences of the toxin B gene (*tcdB*) and the repeating sequences of the toxin A gene (*tcdA*) was examined by PCRs as previously described (Kato *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999). PCR detection of the gene encoding the binding component of binary toxin was performed as previously described (Stubbs *et al.*, 2000).

DNA extraction. DNA extraction from cultured isolates for PCR ribotyping and *slpA*

sequence typing was performed using a High Pure PCR template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was directly extracted from stool specimens using the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions (Kato *et al.*, 2005a; Kato *et al.*, 2005b).

Typing of isolates. Typing of isolates by sequencing *slpA* was done with the primer set *slpAcom19* and *slpAcom22* as previously described (Kato *et al.*, 2005a). Both strands of the amplified products were sequenced. Isolates were assigned to different major types when they had 20 or more amino acid differences, and to subtypes (01, 02, 03, and 04) when they had less than 20 such differences. PCR ribotyping of isolates was performed by the modified methods described by Stubbs *et al.* (Stubbs *et al.*, 1999). Briefly, the reaction volume for PCR was scaled down to 30 μ l, and 1 μ l of DNA extracted by the method described above was used. The thermal profile was 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 120 s, followed by incubation at 75°C for 5 min., and resultant PCR products were separated in 2.5% agarose gel at a constant voltage of 125 V for 3.5 h. A new PCR ribotype was identified when a banding pattern showed two or more band differences from previously identified patterns.

Detection of *tcdB* by nested PCR in stool specimens. *tcdB* was detected by the nested PCR on DNA extracted from stool specimens as described previously (Kato *et al.*, 2005b).

Direct typing by sequencing *slpA* in stool specimen. Amplification of *slpA* by a nested PCR was performed on DNA extracted from stool specimens that were PCR-positive for *tcdB* by the nested PCR. A primer pair used for the 1st PCR was *slpAcom19*-*slpAcom22*, which were used for typing of isolates. The *slpA* sequences of the 17 isolates representing different *slpA* sequence types were compared, and 5 forward primers (*slpAcom33*, *slpAy32-1*, *slpAxr-1*, *slpAyok-9*, and *slpAog39-3*) and 2 reverse primers (*slpAcom30* and *slpAog39-6*) were selected for the 2nd PCR of direct typing (Table 1). The primer pair, *slpAcom33*-*slpAcom30* was selected from the *slpA* sequences of 8 isolates (the GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers are AB180242, AB258978, AB258979, AB236153, AB249984, AB231583, AB236725, and AB236726); *slpAy32-1* was from those of 2 isolates (AB258981 and AB258983); *slpAxr-1* was from 2 isolates (AB239686 and AB239685); *slpAyok-9* was from 2 isolates (AB240196 and AB257283); primers, *slpAog39-3* and *slpAog39-6* were from 3 isolates (AB259787, AB538230, and AF458880). The *slpA* sequences (AF458880) of ATCC 43597 (the reference strain of serogroup D) were available from the database. The thermal profiles were 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 180 s,

followed by incubation at 75°C for 5 min for the 1st PCR, and 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 120 s, followed by incubation at 75°C for the 2nd PCRs. After the first PCR with the primer pair, slpAcom19-slpAcom22, the 2nd PCR was performed by a primer set, slpAcom33-slpAcom30, which was designated as primer set-A. When no amplification was produced by the PCR with the primer set-A, the 2nd PCRs were performed separately by primer set-B consisting of primers, slpAy32-1, slpAxr-1, slpAyok-9 and slpAcom30, and set-C consisting of primers slpAog39-3 and slpAog39-6. The PCR product was purified and sequenced with the same primers used for the 2nd PCR in the same manner described for the *slpA* sequence typing on DNA extracted from isolates. Both strands of the amplified products were sequenced.

RESULTS

Typing of the reference strains

Typing analysis was performed on some epidemic strains, which have been reported around the world. ATCC 43598 strain, which was previously characterized as toxin A-negative and toxin B-positive (A⁻B⁺) and serogroup F/PCR ribotype 017 ((Delmee *et al.*, 1986; Stubbs *et al.*, 1999), was typed as *slpA* sequence type fr-01 (DDBJ accession no. AB236153). The US36 strain (REA type J / PCR ribotype 001) (Killgore *et al.*, 2008) and ATCC 43599 strain had the same *slpA* sequences of type gr-01 (DDBJ accession no. AB249984); NL8 strain (REA type Y / PCR ribotype 014) (Killgore *et al.*, 2008) and ATCC 43600 strain were identical by both *slpA* sequence typing (type hr-01, DDBJ accession no. AB231583) and PCR ribotyping. The *slpA* sequences of US37 strain (REA type G / PCR ribotype 002), US42 strain (REA type BI / PFGE type NAP1 / PCR ribotype 027) (Killgore *et al.*, 2008) and UMC12(3) strain (PCR ribotype 078)(Goorhuis *et al.*, 2008) were examined and registered as type yok-01 (DDBJ accession no. AB240196), type gc8-01 (AB249986), and type 078-01 (AB470267), respectively.

Typing analysis of recovered isolates

A total of 160 stool specimens were examined and 87 *C. difficile* isolates were recovered. Of the 87 isolates, 75 were toxin A-positive and toxin B-positive (A⁺B⁺), and 12 were A⁻B⁺. Three of the A⁺B⁺ isolates were positive for PCR detecting the binary toxin gene (A⁺B⁺ CDT⁺). By *slpA* sequence typing, the 87 isolates were typed into 14 major types and further into 18 subtypes (Table 2). In one isolate, DJNS 0403, the *slpA* gene could not be amplified by the primer set, slpAcom19-slpAcom22, but was sequenced using slpAcom19 and a reverse primer (5'-GCTGTTTGTATTCTGTCATCACC-3'). This isolate was typed as *slpA* sequence