微生物検査

長島 敏之

メディック

微生物検査

長島　敏之
［メディック］

はじめに

平成 29 年度の微生物サーベイは、資料問題 2 問、Photo Survey10 問を出題しました。試料問題は菌種が正しく推定できるかを、薬剤感受性検査は各施設が正しく測定、解釈できているかを確認する意味で出題しました。Photo Survey は患者情報、コロニー形態、生化学的性状、薬剤感受性検査の結果からポイントを絞って推測し、同定の為の検査の方向性がある程度決定できるようなものを中心に問題作成を行いました。また今回も菌種推定だけでなく、消毒薬や、感染症法といった、微生物に関連したものも出題させていただきました。

実施項目

	同定	感受性	選択問題
試料問題（資料 41）	◎	◎	
試料問題（資料 42）	◎		
Photo Survey 10 問			◎

◎：評価対象問題

参加施設数

試料問題（同定）　25 施設
薬剤感受性検査　23 施設
Photo Survey　23 施設

試料の取り扱い

1.カルチャースワブにて送付いたしました。
2.試料到着後はできるだけ速やかに適切な培地に塗り広げてください。
3.以下の患者データを参考に同定と設問に答えてください。

＊生菌ですので、感染には十分注意して下さい。

資料問題

試　料　41

患者背景：45 歳女性。吐き気、発熱、腹痛、下痢の症状にて近医を受診。夕飯に卵を生食。下痢便が検査室に提出された。

①培養を行い、分離・同定した菌種をコード表より選択してください。
②ABPC（アンピシリン）、AMK（アミカシン）、LVFX（レボフロキサシン）の薬剤感受性試験を実施し，Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）M100-S22 の基準を用いて S、I、R で判定・回答してください。

同定検査評価

評　価	微生物名	施設数
A	*Salmonella* sp. *Salmonella* Enteritidis	25

薬剤感受性検査

薬剤	評価	判定	施設数	
			1 次評価後	2 次評価後
ABPC	A	S	23	23
AMK	A	R	15	22
	C	S	8	1
LVFX	A	S	22	23
	C	R	1	

一般的な*Salmonella* 属菌の同定のポイントは以下のとおりです。

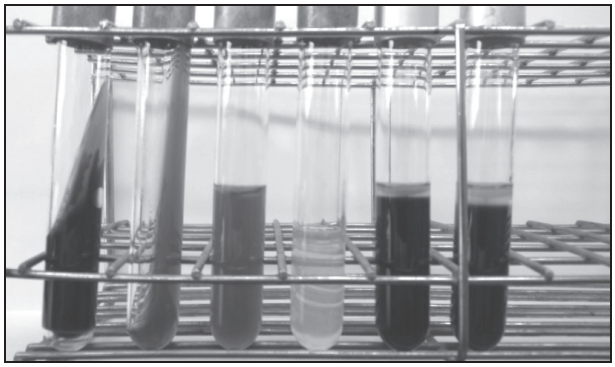
・SS寒天培地上で、乳糖非分解で中心部が黒色のコロニーを形成
・TSI培地で斜面部が赤色、高層部が黒色、ガス産生
・クエン酸利用能陽性
・リジン脱炭酸反応陽性

・SIM培地でインドール反応陰性

リジン脱炭酸反応の点で *Citrobacter freundii* と（*C. freundii* はリジン脱炭酸反応陰性）、インドール反応の点で *Edwardsiella tarda* と（*E. tarda* はインドール反応陽性）区別できます。今回用意した菌株ではサルモネラ抗血清にて O9 群に凝集を認めたため、最も考えられる菌種は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis となりますが、*Salmonella* sp. でも正解とさせていただきました。

SS 寒天培地　35℃　24 時間　好気培養

生化学的性状確認培地　35℃　24 時間　好気培養



薬剤感受性検査では、CLSI M100-S22 の中で *Salmonella* spp. および *Shigella* spp. の場合、in vitro で Aminoglycoside 薬が感性を示すことがあるかもしれないが、臨床上は効果がないので感性と報告するべきではない、と明記されています。このことから、アミカシンやゲンタマイシンなどのアミノ配糖体系抗菌薬は感受性結果が感性（S）であっても、耐性（R）や無効、非感性といった感性以外の結果を返すのが妥当であると考えられます。今回のアミカシンの薬剤感受性結果では 3 割ぐらいの施設が感性（S）と判定されていました。また、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi と腸管外 *Salmonella* spp. に関してはレボフロキサシンの薬剤感受性の判定基準がありませんので注意が必要です。（今回は腸管内 *Salmonella* spp.となります。）

試　料　42

患者背景：70 人が参加したこども会で出されたケータリング食により食中毒が発生。食事をした 30% のヒトが、食後 3 時間で吐き気をもよおし、嘔吐した。保健所は、チキンライスから、この菌を分離し、原因菌であると発表した。

培養を行い、分離・同定した菌種をコード表より選択してください。

同定検査評価

評　価	微生物名	施設数
A	*Bacillus cereus*	23
B	*Bacillus* sp.	1

「チキンライス」と「食後 3 時間で吐き気」から *Bacillus cereus* が疑われます。菌は太い GPR で連鎖を形成します。分枝はなく偏性好気性～通性嫌気性です。カタラーゼ陽性、Metronidazole 耐性のため有芽胞の *Clostridium* 属と区別がつきます。コロニーの形状と、設問で食中毒の原因菌と特定されていることより *Bacillus cereus* を正解とし、*Bacillus* sp. は許容正解としました。

Photo Survey

10 の設問の患者背景、検査データを、Photo を添えて出題します。選択問題は正解を選択肢より、その他の設問は、推定される菌種をコード表から選択してください。

1

写真①は、ある消毒薬の写真です。

写真①-1
消毒薬（全体像）

写真①-2
消毒薬の成分

設問①：この消毒薬の写真①-2 の赤線の枠内にある成分ついて正しく述べている文章を下記選択肢より1つ選んでください。

① 高水準消毒薬に属する。
② HB ウイルスに有効である。
③ 手指の消毒には 5%液が用いられる。
④ 金属の消毒に適さない。
⑤ 芽胞には効果がない。

設問①回答評価

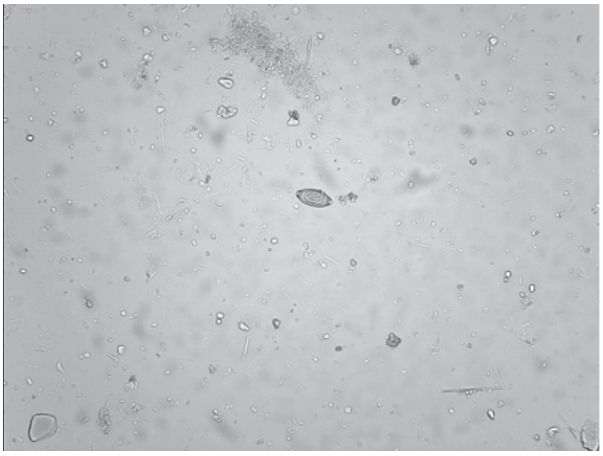
評価	選択肢	施設数
A	⑤ 芽胞には効果がない。	23

塩化ベンザルコニウムは陽イオン界面活性剤（逆性石けん）の一種で、低水準消毒薬に属します。作用機序は分子の陽イオンと疎水性基が蛋白質や脂質に結合し、蛋白変性と細胞膜の機能障害をきたすことによります。手指の消毒には 0.025～0.1%、医療器具や床など環境には 0.1～0.5%水溶液が用いられます。結核菌や芽胞、エンベロープを持たないウイルスにはほとんど効果がありません。有機物が存在すると効力が減弱するため、喀痰や汚物などには不適であり、また、陰性石けんと併用すると著しく効果が減弱します。

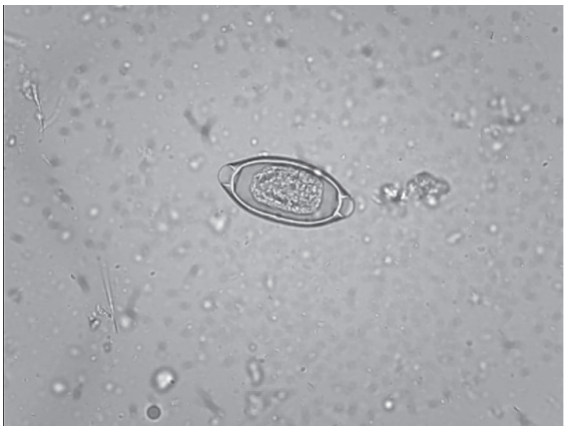
2

患者背景：67 歳女性。腹痛があり、近医を受診。大腸内視鏡で白い糸状のものがみられた。さらに便より、写真②-1、②-2 にある虫卵が認められた。

写真②-1
便の鏡検（無染色）×100



写真②-2
便の鏡検（無染色）×400



設問②：推定される微生物名をコードより選択してください。

設問②回答評価

評価	微生物名	施設数
A	*Trichuris trichiura*（鞭虫）	23

Trichuris trichiura（鞭虫）は世界に広く分布する寄生虫で、特に熱帯、亜熱帯高温多湿な地域に多く見られます。日本にも多く見られ、特に老人施設や心身障害者施設などでの濃厚感染がみられます。

固有宿主はヒトのみで、感染は幼虫包蔵卵の経口摂取によります。盲腸に寄生し、寄生虫体数が少なければほとんど症状はありませんが、数が増えると下痢、腹痛、食欲不振などの消化器症状が現れます。

成虫体の前部 3/5 は細長く、後部 2/5 は太く、鞭のようで鞭状です。

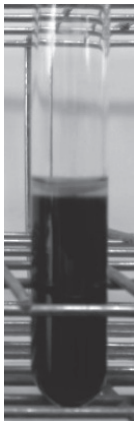
虫卵は 40～50×22～25μm で、レモン形あるいは岐阜ちょうちん形と呼ばれており、卵殻は厚く、褐色、両端に無色の栓があります。盲腸寄生であるため、虫卵は便に均一に排泄されなく、また産卵数が少ないため、虫卵の検出には集卵法を用います。遠心沈殿法、浮遊法のどちらでも検出可能です。

3

写真③は SIM 培地の写真です

写真③

SIM培地　35℃、24時間培養



設問③-1：この培地で確認できる反応の組み合わせを下の選択肢より選択してください。

a　IPA 反応
b　リジン脱炭酸反応
c　VP 反応
d　運動性
e　硫化水素産生

①a,b,c　②a,b,e　③a,d,e　④b,c,d　⑤c,d,e

設問③-2：この培地が写真の色になるような菌種を下の選択肢より 1 つ選択してください。

①　*Citrobacter koseri*
②　*Edwardsiella tarda*
③　*Providencia stuartii*
④　*Enterobacter aerogenes*
⑤　*Klebsiella oxytoca*

設問③-1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	③　a　IPA 反応 d　運動性 e　硫化水素産生	23

設問③-2 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	②　*Edwardsiella tarda*	23

SIM 培地で確認できる性状は以下の通りになります。

・硫化水素酸性

SIM における硫化水素産生は豊富なペプトン量（約 3 倍）の中の含硫アミノ酸、塩酸システインであり、形成された硫化水素は、金属（SIM ではクエン酸鉄アンモニウム）と結合して硫化物を作り、黒変させます。*Salmonella* spp.、*Proteus* spp.、*Citrobacter freundii*、*Edwardsiella tarda* などで陽性となります。

・インドール反応

多量のペプトンに含まれるトリプトファンがトリプトファナーゼに分解されインドールを形成します。このインドールと ρ - ジメチルアミノベンズアルデヒドが反応して赤色となります。*Escherichia coli*、*Klebsiella oxytoca* などで陽性になります。

・運動性

SIM 培地は培地中に寒天が 0.5%しか含まれておらず半流動であるため、運動性のない菌は発育が培地の穿刺部分にとどまりますが、運動性のある菌は穿刺部分にとどまらず周りにも発育します。

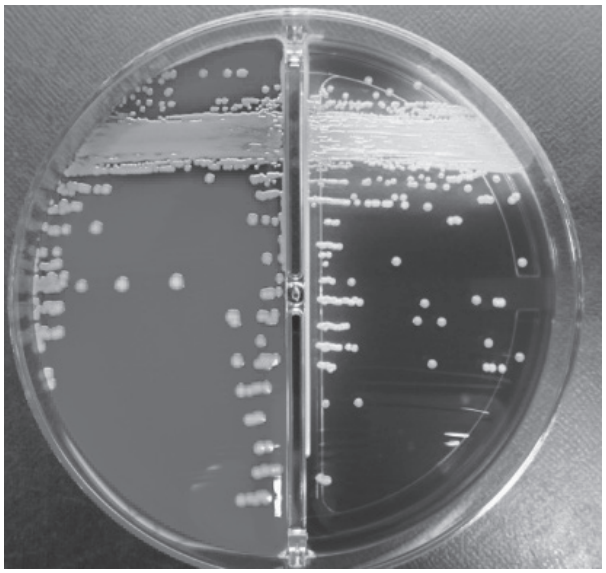
・IPA 反応

Proteus、*Providencia*、*Morganella* はトリプトファンをデアミナーゼによって IPA（インドールピルビン酸）にするため、IPA と鉄イオンと結合し、SIM 培地上層部が茶褐色になります。

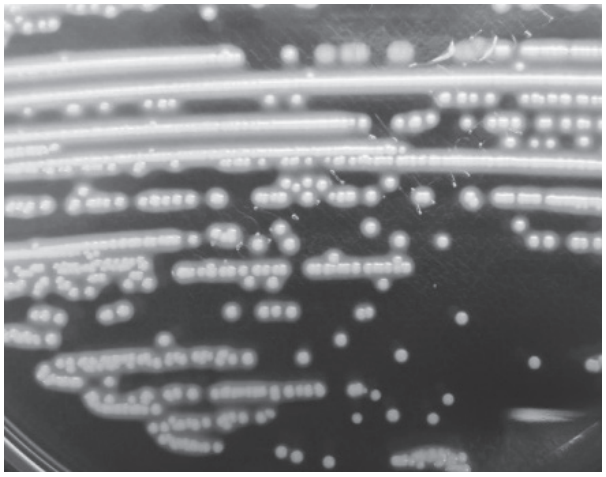
4

患者背景：80 歳代女性。咳と 38.7℃発熱があり、近医を受診された。右下肺野中心に肺炎像があり、喀痰が微生物検査室に提出された。喀痰を培養すると写真④-1、④-2 のごとくコロニーが発育した。本菌はグラム陽性球菌であり、カタラーゼ陽性、コアグラーゼ陽性であった。

写真④-1
5%ヒツジ血液寒天培地/BTB乳糖加寒天培地　35℃、24時間　好気培養



写真④-2
卵黄加マンニット食塩寒天培地　35℃、24 時間　好気培養



また、本菌の薬剤感受性試験は下の表のとおりであった。

抗菌薬（略号）	MIC 値	カテゴリー	抗菌薬（略号）	MIC 値	カテゴリー
PCG	>0.5	R	EM	>16	R
MPIPC	>4	R	CLDM	0.5	S
CEZ	≦4	S	MINO	≦0.5	S
CMZ	≦4	S	VCM	≦0.5	S
IPM	≦1	S	LVFX	0.25	S

設問④-1：推定される微生物名をコードより選択してください。

設問④-2：薬剤感受性結果より、Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）M100-S22 の基準を用いた場合、カテゴリーを感性（S）から耐性（R）に変換しなければならないものを、下記選択肢より選択してください。

a　MINO（ミノサイクリン）
b　CEZ（セファゾリン）
c　CMZ（セフメタゾール）
d　IPM（イミペネム）
e　LVFX（レボフロキサシン）

①a,b,c　②a,b,e　③a,d,e　④b,c,d　⑤c,d,e

設問④-3：薬剤感受性結果より、実施した方がよいと思われる追加検査を下記選択肢より 1 つ選択して下さい。

①　CAMP テスト
②　オプトヒンテスト
③　D テスト
④　ホッジテスト
⑤　ダブルディスクシナジーテスト

設問④-1 回答評価

評価	微生物名	施設数	
		1 次評価後	2 次評価後
A	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*（MRSA）	22	23
C	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*	1	

設問④-2 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	④　b　CEZ（セファゾリン） c　CMZ（セフメタゾール） d　IPM（イミペネム）	23

設問④-3 回答評価

評　価	選択肢	施設数
A	③　D テスト	23

ブドウ球菌は、以下の方法で同定を進めます。
①マンニット食塩培地発育
②コアグラーゼ試験（ウサギプラズマ凝集）
③MRSA 選択培地発育・卵黄反応確認
④薬剤感受性試験（微量液体希釈法）における MPIPC と CFX の MIC 値

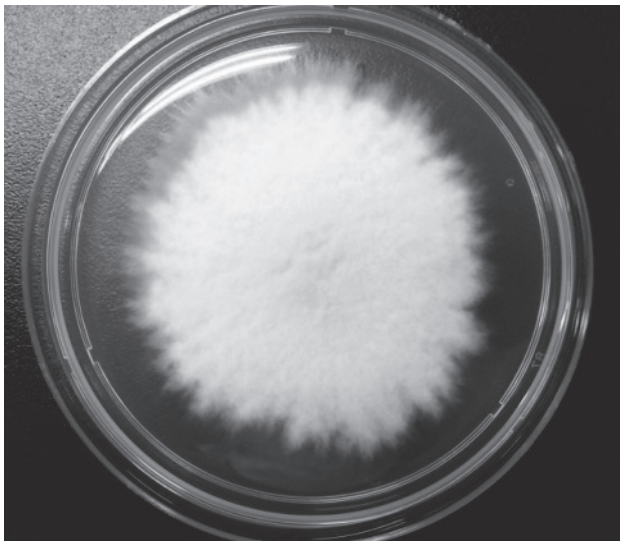
今回の設問の薬剤感受性の結果より本菌が MRSA であることが推定されます。この設問では薬剤感受性結果まで踏まえて菌種推定されるべきであると思われますので、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* のみの回答は不正解とさせていただきました。

CLSI M100-S22 では Oxacillin 耐性 *S.aureus* および coagulase 陰性 Staphylococci (MRS) の場合、その他の β-lactam 系抗菌薬（抗 MRSA 活性のある新規の Cephalosporin 薬は除く）が in vitro で活性を示すかもしれないが、臨床上は効果がない。抗 MRSA 活性のある新規の Cephalosporin 薬以外の β-lactam 薬についての結果は「耐性」と報告する、とありますので、MRSA 活性のある新規の Cephalosporin 薬以外の β-lactam 薬についての結果で感性となっているものはすべて耐性に変化して報告する必要があります。また、今回の薬剤感受性結果ではエリスロマイシン（EM）が耐性、クリンダマイシン（CLDM）感性の結果の場合 CLDM の結果は偽感性の場合がありますので、D テストで確認する必要があります。薬剤感受性検査にて EM と CLDM の 2 つのディスクの距離を約 20mm 離して置きます。陽性の場合は CLDM の阻止円の EM 側に平坦化が現れます、この阻止円の形がアルファベットの「D」の字の形態となるため、D テストと呼ばれています。D テストが陽性となった場合は臨床的に CLDM による治療は失敗する場合が多く、CLDM 耐性と報告します。

5

患者背景:30 歳男性。2 週間前より頭皮に痒みあり。患部は脱毛、落屑あり。患部の皮膚を培養したところ、7 日後、写真⑤-1、⑤-2 のごとくコロニーが発育した。このコロニーを顕微鏡で確認したところ、写真⑤-3、⑤-4 のごとく、紡錘形の大分生子が認められた。

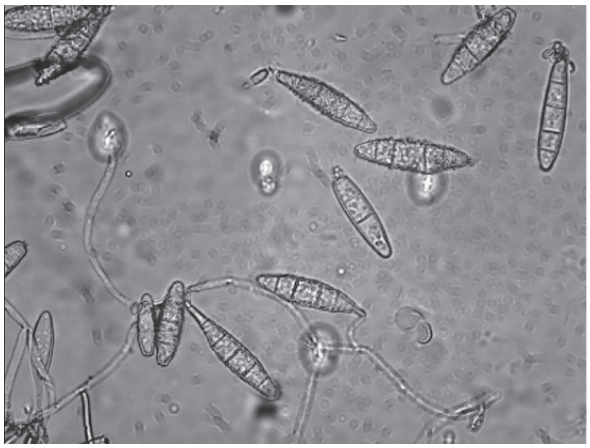
写真⑤-1
サブローデキストロース寒天培地(表面)　25℃、7 日間　好気培養



写真⑤-2
サブローデキストロース寒天培地(裏面)　25℃、7日間　好気培養

写真⑤-3
コロニーの鏡検(無染色)　×200倍

写真⑤-4
コロニーの鏡検(無染色)　×400 倍



設問⑤：推定される微生物名をコードより選択してください。

設問⑤回答評価

評　価	微生物名	施設数
A	*Microsporum* sp. *Microsporum canis* *Microsporum gypseum*	23

Microsporum 属は *Trichophyton* 属、*Epidermophyton* 属とともに、皮膚糸状菌と呼ばれ、頭皮や皮膚に感染症を起こします。*M.canis* は動物好性菌といわれ、ヒトへの感染の大部分は感染したイヌやネコからヒトにうつされたものです。*M. gypseum* は土壌好性菌といわれ、まれにヒトや動物が汚染土壌から感染します。

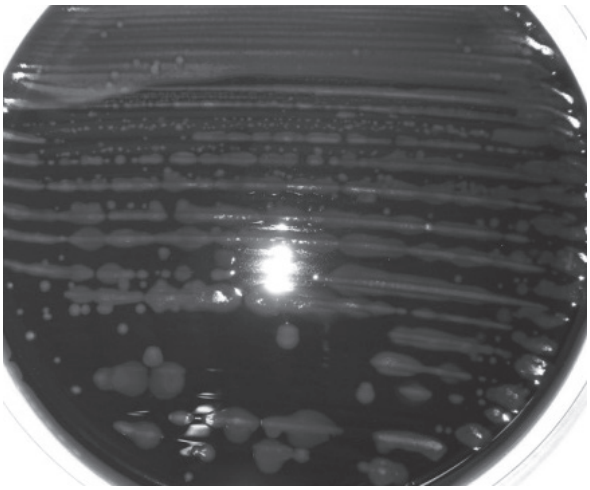
M.canis のコロニーの発育速度は中程度で、6日以内で成熟します。表面は粉状または顆粒状で、淡黄色、黄褐色またはシナモン様褐色を呈します。裏面はオレンジ色～黄褐色、赤褐色になります。顕微鏡では、菌糸は有隔性で、多数の紡錘形の大分生子がみられます。6細胞以下で表面は粗く、細胞外壁と隔壁が薄く、大きさは6.0～18.0×22.0～80.0μmで、先端は丸く、左右対称です。小分生子は1細胞性で棍棒形、大きさは4.0 ～6.0×2.5～3.0μm、菌糸側壁に着生しています。

M. gypseum のコロニーの発育速度は中程度で、6～10日以内で成熟します。表面は綿毛状で、白色、黄色～黄褐色を呈します。裏面は濃黄色を呈します。顕微鏡では、菌糸は有隔性で、多数の紡錘形の大分生子がみられます。6～15細胞性で表面は粗く、細胞外壁が厚く、隔壁はやや薄く、大きさは6.0～25.0×30.0～150.0μmで、先端は鋭く、左右非対称です。小分生子は1細胞性で洋梨形または棍棒形で、大きさは4.0～7.0×2.5～3.5μm、菌糸側壁に着生しています。今回の菌種は*M. gypseum* ですが、*M.canis* 、*Microsporum* sp. も正解としました。

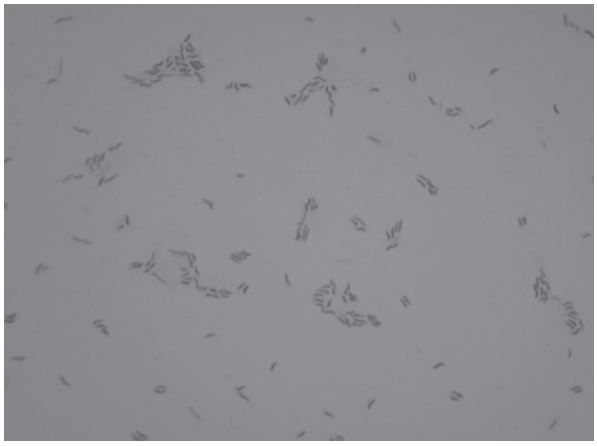
6

患者背景：7歳、女児。腹痛と下痢症状で小児科を受診。前日に生焼けの鶏肉を食したとのこと。便培養をしたところCCDA培地に写真⑥-1のごとくコロニーが発育した。このコロニーをグラム染色したところ、写真⑥-2のごとくグラム陰性のらせん状の菌であった。本菌はチトクロムオキシダーゼ試験陽性、カタラーゼ試験陽性であり、また馬尿酸加水分解試験は、写真⑥-3のごとくであった。

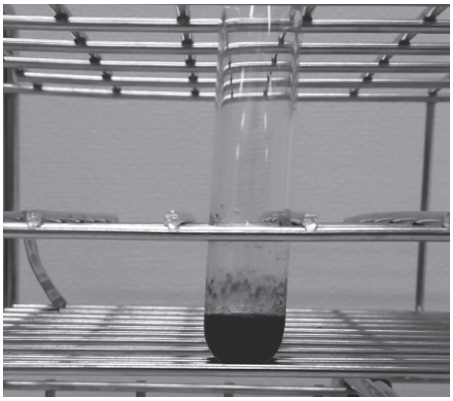
写真⑥-1
CCDA 培地　　42℃、48 時間　微好気培養



写真⑥-2
コロニーのグラム染色像（B&M 法）×1000



写真⑥-3
馬尿酸加水分解試験



設問⑥-1：推定される微生物名をコードより選択してください。

設問⑥-2：本菌について正しく述べられている文章を選択肢より 1 つ選んでください。

① 2 類感染症として届け出が必要である。
② 3 類感染症として届け出が必要である。
③ 4類感染症として届け出が必要である。
④ 5類感染症（定点把握）として届け出が必要である。
⑤ 感染症法としての届け出は必要ない。

設問⑥-1 回答評価

評価	微生物名	施設数
A	*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*	23

設問⑥-2 回答評価

評価	微生物名	施設数
A	④ 5類感染症（定点把握）として届け出が必要である。	14
B	⑤ 感染症法としての届け出は必要ない。	9

Campylobacter 属は食肉により起因する人畜共通感染症であり，食中毒の主な原因菌となっています。その特徴は季節によるピークがほとんどなく，年間を通して頻繁に検出される細菌です。食中毒を起こす *Campylobacter* のうち約 95％以上を *C.jejuni* が占めます。

ポイントとしては生焼けの鶏肉の摂食後の食中毒であること、CCDA 培地に発育し、発育したコロニーのグラム染色でグラム陰性のらせん状の菌が観察されたこと、チトクロムオキシダーゼ試験陽性、カタラーゼ試験陽性であり、さらに馬尿酸加水分解試験が陽性であることから、本菌が *Campylobacter jejuni* であることが推定されます。

患児が小児科を受診されていることから、この病院が小児科定点医療機関（全国 約 3,000 カ所の小児科医療機関）である場合、感染性胃腸炎患者と診断した場合には、感染症法で規定されている 5 類感染症の感染性胃腸炎として保健所への届け出が必要になります。

しかし、この病院が基幹定点医療機関（全国約 500 カ所の病床数 300 以上の医療機関）であった場合、感染症法で定める感染性胃腸炎としての届け出は、病原体がロタウイルスであるものに限るとされていますので、届け出の必要はなくなります。そのため今回は回答の ⑤ 感染症法としての届け出は必要ない、は許容正解とさせていただきました。

考察

試料問題	正解率	
	1次評価後	2次評価後
設問 41　同定・感受性試験	100 %	100 %
設問 41　感受性試験(ABPC)	100 %	100 %
設問 41　感受性試験(AMK)	65.2 %	95.7 %
設問 41　感受性試験(LVFX)	95.7 %	100 %
設問 42　同定	100 %	100 %

Photo 設問	正解率	
	1次評価後	2次評価後
設問 1	100 %	100 %
設問 2	100 %	100 %
設問 3-1	100 %	100 %
設問 3-2	100 %	100 %
設問 4-1	95.7 %	100 %
設問 4-2	100 %	100 %
設問 4-3	100 %	100 %
設問 5	100 %	100 %
設問 6-1	100 %	100 %
設問 6-2	100 %	100 %

各設問の1次評価と2次評価の正解率を表に示します（評価対象外となった施設は除いてあります）。資料 41 の薬剤感受性検査について、CLSI M100-S22 の中で *Salmonella* spp. および *Shigella* spp. の場合、in vitro で Aminoglycoside 薬が感性を示すことがあるかもしれないが、臨床上は効果がないので感性と報告するべきではない、と明記されています。しかし1次評価では約3割の施設が AMK の感受性のカテゴリーを S と判定していました。また CLSI で判定する薬剤感受性については、ブレイクポイントだけでなく書かれているコメントも確認しておく必要があると思われます。また今回の *Salmonella* spp. に関しては LVFX のような菌種等によってはブレイクポイントが変わったり、無くなったりする抗菌薬もありますので（*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi と腸管外 *Salmonella* spp. に関しては LVFX の薬剤感受性の判定基準がない）注意が必要です。

フォトサーベイでは、設問内の薬剤感受性の結果を踏まえずに回答された施設がありました。やはり設問内にあるすべての情報を踏まえた上で回答していただきたいと感じました。

まとめ

今回のサーベイでは正解率が1次評価で正解率が7割ぐらいの設問が1つありましたが、2次評価で正解率がすべて9割以上となりました。設問や基準とされている資料のコメントはよく確認していただくようお願い致します。

文献

1) 堀井俊伸ほか：微生物検査ナビ　栄研化学　2013

2) 小栗豊子ほか：微生物検査ハンドブック　第4版　三輪書店　2011

3) 山中喜代治ほか：新・カラーアトラス微生物検査 Medical Technology 別冊　医歯薬出版株式会社　2009

4) Davise.H.Larone（著）：山口英世ほか（訳）：医真菌同定の手引き　第5版　栄研化学　2013

5) 上村清ほか：寄生虫学テキスト　第 3 版　光文堂 2008

6) 藤田紘一郎　平山謙二：臨床検査学講座　医動物学 第2版　医歯薬出版株式会社　2010

7) 太田敏子ほか：メディカルサイエンス微生物検査学 近代出版　2008

8) 岩田健太郎　宮入烈：抗菌薬の考え方、使い方 Ver3 中外医学社　2012

9) 柳沢英二：腸内細菌科　Medical Technology Vol.39　No.11：1144-1148　2011

10) 杉本直樹：保健所への届け出基準　Medical Technology　Vol.39　No.11：1134-1137　2011

11) 二本柳伸　花木英明：腸球菌　臨床微生物検査イエローページ　臨床　検査増刊号　Vol.58 No.11：1333-1336　2014

12) 日本臨床微生物学会監修：抗菌薬感受性のための標準法　第22版　2012