

微生物検査

長島 敏之

メディック

八嶋 繁子

地方独立行政法人 岐阜県立多治見病院

微生物検査

長島 敏之 [メディック]

八嶋 繁子 [地方独立行政法人 岐阜県立多治見病院]

はじめに

平成 30 年度の微生物サーベイは、試料問題 2 問、Photo Survey 5 問を出題しました。出題者の負担を軽減するため今回より Photo Survey を 10 問から 5 問にさせていただきます。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、生化学的性状の結果からポイントを絞って推測し、推定できるようなものを中心に問題作成を行いました。また菌種推定だけでなく、消毒薬や、生化学的性状の誤反応といっ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 5 問			◎

◎：評価対象問題

参加施設数

試料問題 (同定)	24 施設
薬剤感受性検査	24 施設
Photo Survey	24 施設

試料の取り扱い

- カルチャースワブにて送付いたしました。
- 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。
- 以下の患者データを参考に同定と設問に教えてください。

* 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：25 歳、女性。3 日前より排尿痛を訴え、当日悪化したため、近医を受診。培養目的で尿が微生物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。
- ②CTX (セフトキシム)、MEPM (メロペネム)、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	<i>Escherichia coli</i>	24

薬剤感受性検査

薬剤	評価	判定	施設数
CTX	A	R	23
MEPM	A	S	24
LVFX	A	R	25

Escherichia coli (大腸菌) は患者の年齢に関係なく尿路感染の最も一般的な起炎菌であり、大学生に相当する年齢の女性において、単純性尿路感染の 90% が本菌とされています。

TSI 寒天培地

斜面部は乳糖・白糖分解の為黄色、高層部はブドウ糖分解の為黄色さらにガス産生。

シモンズクエン酸塩培地

クエン酸塩を炭素源として利用しないため、培地の色調が変化しない。

LIM 培地

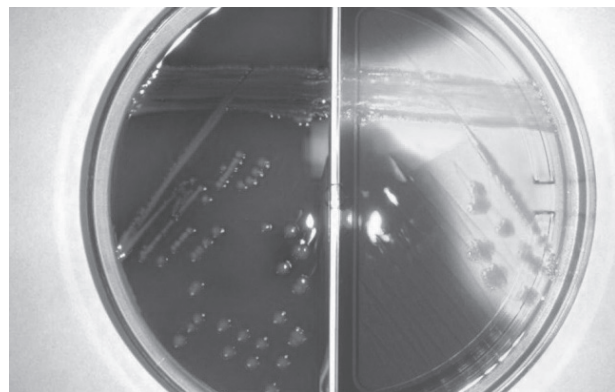
リジン脱炭酸反応陽性、運動性あり。

SIM 培地

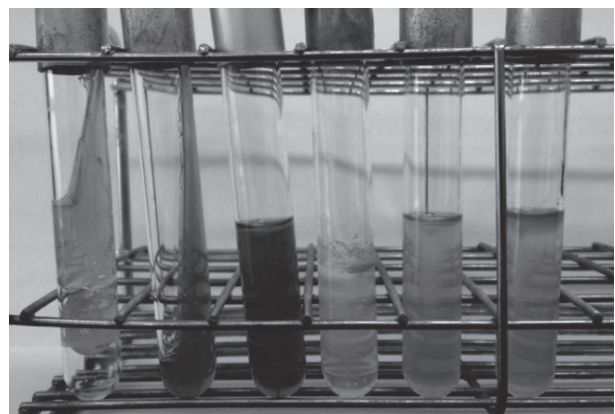
インドール反応陽性。

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



生化学的性状確認培地 35℃ 24 時間 好気培養



今回の試料問題の株は ESBL 産生菌です。

ESBL は ClassA βラクタマーゼ遺伝子のアミノ酸変異により、本来ペニシリン系薬のみしか分解できなかった酵素が、広域スペクトルを有する第3セファロスポリンやモノバクタム系をも分解する能力を獲得したものです。しかし、オキサセフェム、セファマイシン、カルバペネムは分解されにくく、安定であるとされています。我が国で検出率の高い CTX-M 型 ESBL はセフォタキシム(CTX)、セフトリアキソン(CTR)、セフェピム(CFPM)などには高度耐性を示しますが、セフトラジジム(CAZ)やアズトレオナム(AZT)は比較的感性傾向となるといわれています。

また、ESBL 産生遺伝子はプラスミド上に存在し、接合などにより菌種を越えて伝搬するため、感染対策として、標準予防策に加えて接触予防策も行うことが重要とされます。

CLSI では ESBL 産生菌の検出方法を次の表のように設定しています。

* ESBL 産生菌確認試験 (ディスク拡散法)

培地	ミュラーヒントン寒天培地
培養条件	35±2℃ 好気培養
培養時間	16~18 時間
スクリーニング基準	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> 10µg CPDX ≤17mm あるいは 30µg CAZ ≤22mm あるいは 30µg AZT ≤27mm あるいは 30µg CTX ≤27mm あるいは 30µg CTRX ≤25mm <i>P.mirabilis</i> 10µg CPDX ≤22mm あるいは 30µg CAZ ≤22mm あるいは 30µg CTX ≤27mm
確認試験	30µg CAZ と 30/10µg CAZ/CVA 30µg CTX と 30/10µg CTX/CVA 上記薬剤の阻止円直径を測定し、CAZ または CTX 単独の阻止円径より CVA 添加ディスクの阻止円径が 5mm 以上拡大した場合に ESBLs と判定する。

* ESBL 産生菌確認試験 (微量液体希釈法)

カチオン加ミュラーヒントン培地
35±2℃ 好気培養
16~20 時間
<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> CPDX ≥8µg/mL あるいは CAZ ≥2µg/mL あるいは AZT ≥2µg/mL あるいは CTX ≥2µg/mL あるいは CTRX ≥2µg/mL <i>P.mirabilis</i> CPDX ≥2µg/mL あるいは CAZ ≥2µg/mL あるいは CTX ≥2µg/mL
CAZ (0.25~128µg/mL) と CAZ/CVA (0.25/4~128/4µg/mL) CTX (0.25~64µg/mL) CTX/CVA (0.25/4~64/4µg/mL) 上記薬剤の MIC 値により、CAZ または CTX 単独の MIC より CVA の添加で 3管以上の MIC 値の低下が認められれば ESBLs と判定する。

試料 42

患者背景: 60歳男性。東南アジア出張から帰国後、下痢を発症し、近医を受診。培養目的で便が微生物検査室に提出された。

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。

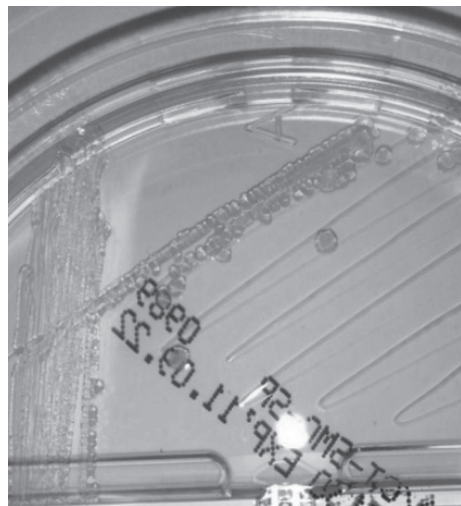
同定検査評価

評価	微生物名	施設数
A	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	24

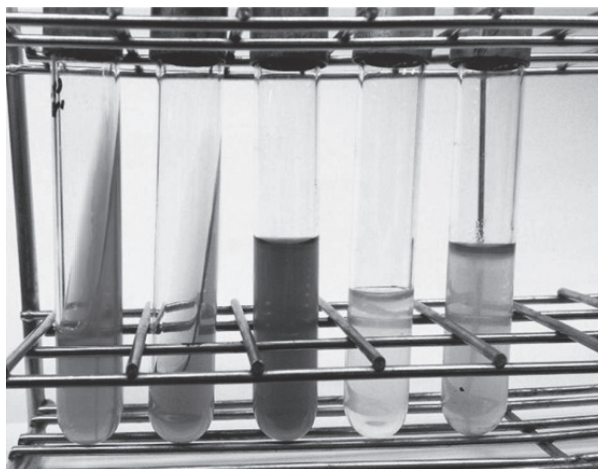
Plesiomonas shigelloides は淡水中に広く棲息しており、本菌に汚染された水や魚介類を摂取することにより食中毒を起こします。国内での感染例は少なく、旅行者下痢症の原因菌の1つとされています。

本菌は腸内細菌科のなかで唯一、チトクロムオキシダーゼ試験が陽性です。SS寒天培地上では赤痢菌とよく似た透明のコロニーを形成し、生化学的性状ではリジン脱炭酸反応陽性、インドール反応陽性といった *Escherichia coli* とよく似た性状をとりますが、両者ともチトクロムオキシダーゼ試験が陰性ですので、その点で鑑別できます。

SS寒天培地 35°C、24時間 好気培養



生化学的鑑別性状試験 35°C、24時間 好気培養



チトクロムオキシダーゼ試験

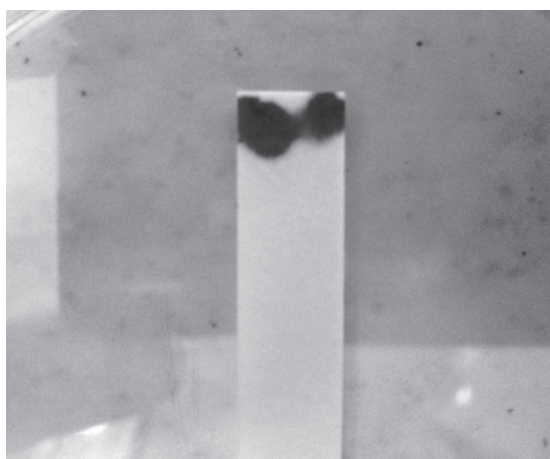


Photo Survey

5つの設問の患者背景、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。

Photo Survey 設問 1

写真1は、ある消毒薬の写真です。

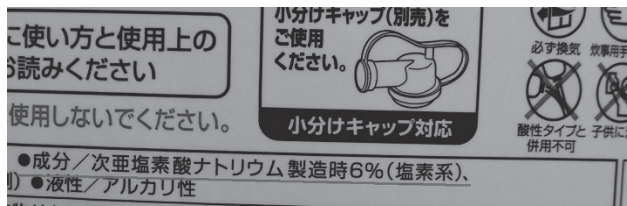
写真 1-1

消毒薬（全体像）



写真 1-2

消毒薬の成分



この消毒薬の主成分が使用に適すると思われるものを下記選択肢より1つ選択して下さい。

- ① 手指
- ② 医療器材（金属）
- ③ 医療器材（非金属）
- ④ 口腔粘膜
- ⑤ 術野皮膚

設問 1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	③ 医療器材（非金属）	24

次亜塩素酸ナトリウムは中水準の消毒薬で、細胞内の酵素反応の阻害、細胞内蛋白質の変性、核酸の不活性化が作用機序として考えられています。グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌、ウイルス、芽胞に有効ですが、大量の芽胞を殺滅することはできません。結核菌には1,000ppm（0.1%）以上の濃度で有効で、HBV、HIVに対する有効性も確認されています。有機物が存在しない条件下では、マイコプラズマに25ppm（0.0025%）で、栄養型細菌には1ppm（0.0001%）以下で殺菌効果があることが報告されています。有機物の存在によって殺菌効果が低下するため、これらが付着している医療器具等に用いる場合は、十分に洗い落としてから使用する必要があります。刺激性が強く生体には使用できません。また、金属腐食性を有するため金属製品にも使用できません。

Photo Survey 設問 2

写真2-1は慢性複雑性膀胱炎患者の自然排泄中間尿（褐色混濁）から分離されたコロニーです。そのコロニーの生化学的鑑別性状検査は、写真2-2のようになりました。

写真 2-1

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

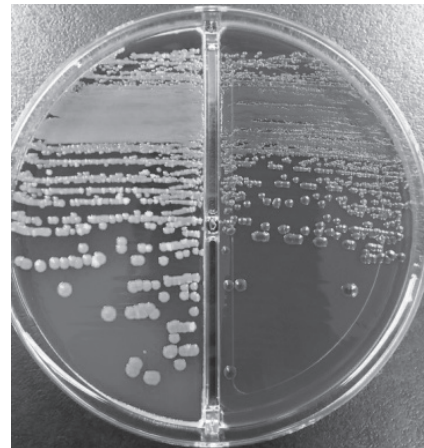
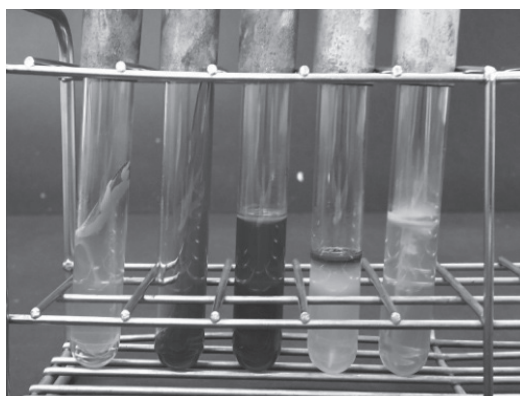


写真 2-2

生化学鑑別性状試験 35℃、24 時間培養



この菌種の生化学的性状について正しくないと思われる反応を、下記選択肢より 1 つ選択してください。

- ① TSI 培地：高層黄色
- ② クエン酸利用能：陽性
- ③ リジン脱炭酸反応：陽性
- ④ VP 反応：陽性
- ⑤ インドール反応：陽性

設問 2 回答評価

評価	微生物名	施設数
A	⑤ インドール反応：陽性	24

Serratia marcescens には赤色色素（プロキジオン）を産生する株が存在し（10%以下）、赤色コロニーを形成することがあります。*Serratia marcescens* は本来インドール反応が陰性ですが、こういう株を生化学的鑑別性状培地に培養すると、赤色色素の為に SIM 培地でインドール反応が陽性的のように見えます。色素が判定に誤同定を与えることがありますので、このような菌については平板培地に発育したコロニーの色調や形状のみで菌を推定することも重要です。

Photo Survey 設問 3

患者背景：35 歳女性。海外旅行から帰国後、発熱と腹痛を発症。便培養をしたところ写真 3-1、3-2 のごとくコロニーが発育した。生化学的鑑別性状検査は、写真 3-3 のごとくであった。

写真 3-1

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

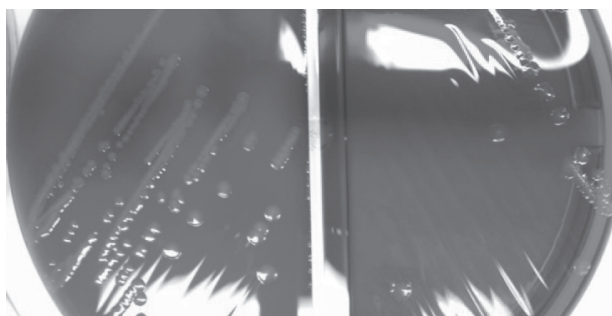


写真 3-2

SS 寒天培地 35℃、24 時間 好気培養

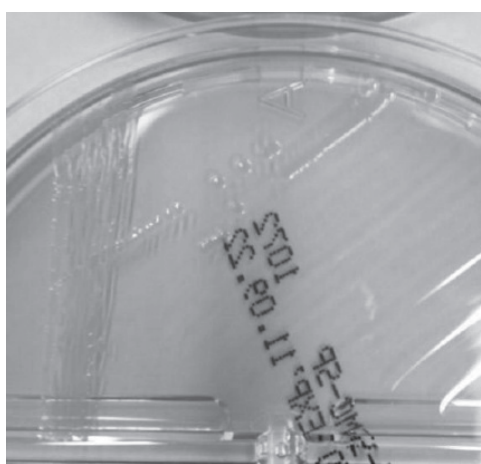
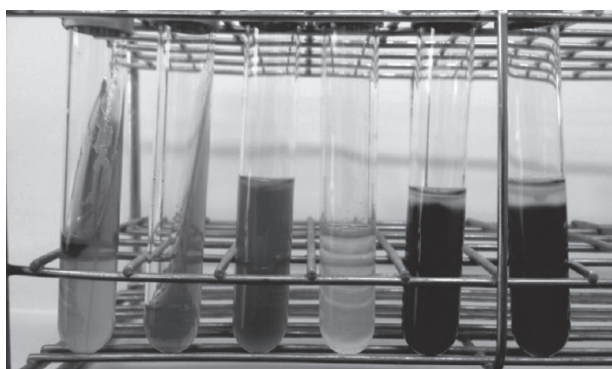


写真 3-3

生化学鑑別性状試験 35℃、24 時間培養



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 3 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar Typhi	24

Salmonella Typhi の推定には、海外出張から帰国後、発熱と腹痛を認めていることや、SS 寒天培地上、中心部が極わずかに黒色化（24 時間では黒色が見えず、コロニーの色が無色透明なこともあります）及び、TSI 寒天培地での凝固水部分の僅かな黒色化が重要なポイントとして挙げられます。主な *Salmonella* 属菌の生化学的性状は表のとおりです。

表3 鑑別培地の性状一覧

	TSI		LIM		アミノ酸		血清							
	斜面	高層	ガス	H ₂ S	リジン	運動性	インドール	Vi	O2	O9				
チフス菌	-	+	-	w(-)	+	+	(-)	-	-	+	(-)	-	+	
バチルスA菌	-	+	+	-	w	-	+	-	-	-	-	-	+	-
他のチフス菌	-	+	+	+	+	+	-	+	-	*	*	*	*	

確認検査として Vi 血清、O 血清を用いてスライド凝集反応を行ないます。Vi 血清にのみ凝集するかあるいは Vi 血清に凝集し、しかも O 因子血清 (O9) にも凝集するときは、被検菌は Vi 抗原を持つ菌であると判定します。Vi 抗原は易熱性抗原であるので、121℃、20～30 分加熱後、加熱死菌が Vi 血清に凝集しなくなることを確認します。加熱死菌は O9 には凝集します。稀に Vi 抗原を持たない株があることに注意してください。

腸チフス患者と診断した場合には、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 12 条第 1 項の規定による届出を直ちに行わなければなりません。

Photo Survey 設問 4

患者背景:65歳男性。腹痛にて救急搬送された。来院時に採取された胆汁から写真4-1のごとくグラム陰性桿菌が検出された。また本菌のスポットインドルテストは写真4-3のごとく陽性であった。

写真 4-1

左：BHK 培地 右：BBE 培地
35℃、72 時間嫌気培養

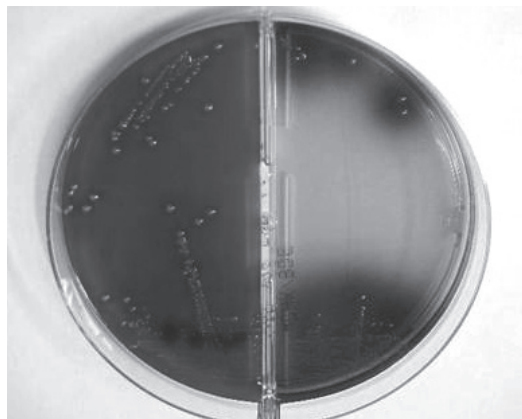


写真 4-2

4-1 の拡大写真

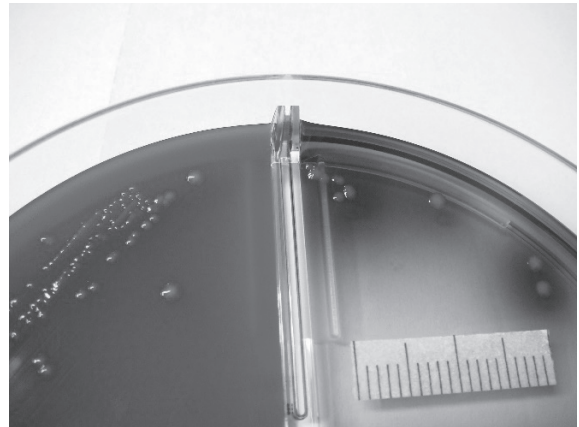
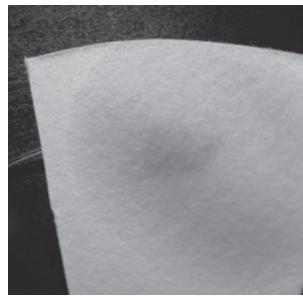


写真 4-3

スポットインドルテスト



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 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides fragilis</i> group	22
B	<i>Bacteroides</i> sp.	2

Bacteroides thetaiotaomicron は *Bacteroides* 属に属する偏性嫌気性無芽胞グラム陰性桿菌で、*Bacteroides fragilis* group の 1 つです。*Bacteroides* 属は消化管の常在菌であり、ときに腹腔・骨盤内、皮膚軟部組織などに感染を起こします。菌血症を起こした場合には死亡率が高く、16～43%と報告されています。*B. thetaiotaomicron* は、臨床からの分離頻度が *B. fragilis* に次いで高いといわれています。

本菌は 20%ウシ胆汁に耐性であり、エスクリンを加水分解するため、BBE 培地にて 24 時間培養で 1mm 以上のコロニーを形成し、コロニーの周囲が

褐色になります。またインドール反応が陽性であるため、*B. fragilis*との区別できます。

Photo Survey 設問 5

患者背景：40代女性。10日間のアフリカ旅行から帰国後、39℃の発熱を発症し近医を受診。末梢血塗抹標本より写真5-1のごとく赤血球中に輪状体が認められた。また、写真5-2の矢印のごとく1個の赤血球中に複数の輪状体が認められる部分も存在した。

写真 5-1

末梢血ギムザ染色像 ×1000

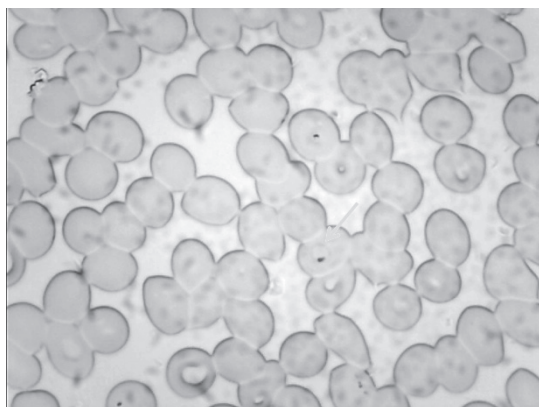
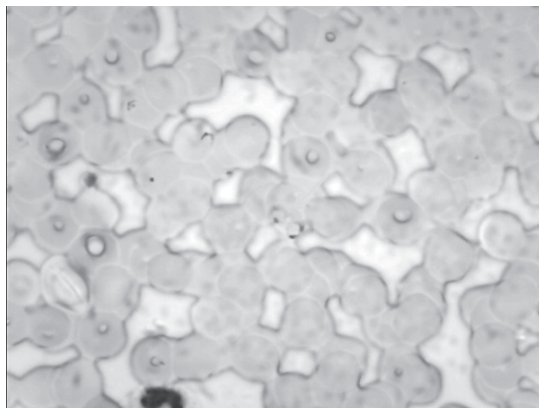


写真 5-2

末梢血ギムザ染色像 ×1000



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	<i>Plasmodium falciparum</i> (熱帯熱マラリア原虫)	24

Plasmodium falciparum (熱帯熱マラリア原虫)

ハマダラカの吸血によりヒトに感染し、マラリアを起こします。潜伏期間は5～10日、大半は1か月以内に発病します。主症状は発熱、貧血、脾腫で、発熱周期は48時間後とですが不規則です。

検査では末梢血のギムザ染色標本の検鏡での原虫の検出が重要となりますが、熱帯熱マラリア原虫は、アメーバ体と分裂体が末梢血中に出現することがほとんどないため、輪状体、または生殖母体を確認することが重要となります。輪状体は他のマラリア原虫に比べて小さく、赤血球の1/5 (1.5μm) くらい、しばしば2核のものがみられます。また、1個の赤血球にしばしば2虫以上が寄生します。生殖母体は特徴的で、鎌状(半月型)を示します。

考察

各設問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)。

試料問題	正解率
設問 41 同定・感受性試験	100 %
設問 41 感受性試験(CTX)	100 %
設問 41 感受性試験(MEPM)	100 %
設問 41 感受性試験(LVFX)	100 %
設問 42 同定	100 %

Photo 設問	正解率
設問 1	100 %
設問 2	100 %
設問 3	100 %
設問 4	100 %
設問 5	100 %

今回はすべての設問において正解率が100%でした。試料の不備も特になく、またフォトサーベイにおいても写真の不備や設問に対する指摘などありませんでした。

また今回、試料 41 の薬剤感受性試験において 3 割ぐらいの施設がフリーコメントで ESBL 産生菌である、とのコメントをいただきました。評価には影響しませんが、各施設が普段から薬剤耐性菌の検出に対するきちんとした取り組みをされていることがうかがえました。

まとめ

今回のサーベイでは 1 次評価の段階で、すべての設問で正解率が 100% という素晴らしい結果となりました。今回のように不備の無いような問題作成に心がけていきたいと思えます。

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 5 版 三輪書店 2017
- 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) 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
- 5) 二本柳伸 花木英明：腸球菌 臨床微生物検査イェローページ 臨床 検査増刊号 Vol.58 No.11 : 1333-1336 2014
- 6) 検査法ガイド等作成委員会・耐性菌検査法ガイド作成作業部会：日本臨床微生物学雑誌 耐性菌検査法ガイド 日本臨床微生物学会 Vol.27 2017
- 7) 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
- 8) 吉田製薬株式会社：V 各種消毒薬の特性 2 中水準消毒薬 3) 次亜塩素系 Y' s Square
- 9) 杉本直樹：保健所への届け出基準 Medical Technology Vol.39 No.11 : 1134-1137 2011
- 10) 上村清ほか：寄生虫学テキスト 第 3 版 光文堂 2008
- 11) 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
- 12) 検査法マニュアル作成委員会・嫌気性菌検査ガイドライン委員会：日本臨床微生物学雑誌 嫌気性菌検査ガイドライン 2012 日本臨床微生物学会 Vol.22 2012