

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

令和2年度の微生物サーベイは、試料問題2題、Photo Survey5題を出題しました。試料問題は薬剤感受性を踏まえて菌種が正しく推定できるかを確認する設問を1題出題しました。また、試料問題1題とPhoto Surveyは、近く東京オリンピックが開催されることを考え、海外渡航が原因となったり、海外より持ち込まれたりする恐れのある感染症を中心に
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	22 施設
Photo Survey	22 施設

試料の取り扱い

- カルチャースwab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：90歳 女性 食欲不振、歩行困難があり、近医に入院、精査をしたが異常を認めず、ステロイド剤の内服にて食欲が改善したために長期投与にて経過観察していた。また、神経因性膀胱のため、尿道カテーテル挿入にて長期管理をされていた。2か月後、発熱が出現し、近医を再度受診。尿検査にて白血球の増多とグラム陰性桿菌の貪食像を認めた。尿培養検査の為、尿検体が微生物検査室に提出された。

問：培養を行い、分離・同定した菌種を薬剤感受性試験の結果も踏まえてコード表より選択してください。

問：AMK（アミカシン）、IPM（イミペネム）、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	菌名	施設数
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDRP)	17
B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5

薬剤感受性検査

薬剤	評価	判定	施設数
AMK	A	R	21
	B	I	1
IPM	A	S	22
LVFX	A	S	22

Pseudomonas aeruginosa は自然界の水系に広く存在するブドウ糖非発酵のグラム陰性桿菌です。医

療機関において高頻度で検出される代表的な日和見病原体の1つであり、白血球減少患者、免疫抑制剤投与患者、熱傷患者、挿管・カテーテル留置患者、慢性呼吸器疾患患者などにおいて本菌感染症がみられることが多いです。

35～37℃、24時間培養で血液寒天培地、BTB乳糖加寒天培地に、扁平、辺縁不整で時間が経過すると金属光沢をともなったコロニーを形成し、特有の臭気があります。またヒツジ血液寒天培地上では弱いβ溶血を示します。ムコイド株は水滴を垂らしたような透明で露滴状コロニーを形成します。ムコイド株では初期の発育が遅いことに注意する必要があります。

本菌はオキシダーゼ活性が陽性であり、このことと、コロニーの金属光沢、特有の臭気により本菌を疑うことができます。

本菌の薬剤感受性結果で以下のすべての基準を満たす場合の場合は多剤耐性緑膿菌（MDRP）となります。

- ① イミペネム（IPM）のMIC値が16μg/mL以上又は、感受性ディスク（KB）の阻止円の直径が13mm以下
- ② アミカシン（AMK）のMIC値が32μg/mL以上又は、感受性ディスク（KB）の阻止円の直径が14mm以下
- ③ シプロフロキサシンのMIC値が4μg/mL以上、又は、感受性ディスク（KB）の阻止円の直径が15mm以下

ただし、イミペネム以外のカルバペネム系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性の結果が得られた場合も判断基準の①を満たすものとなっています。また、シプロフロキサシン以外のフルオロキノロン系薬剤により検査を実施した場合は、その検査により耐性が得られた場合も判断基準③を満たすものとなっています。

今回の菌株は3つすべての判断基準を満たしているためMDRPとなります。

今回の設問では薬剤感受性試験の結果も踏まえて回答していただくよう記載があったため、MDRPではない *Pseudomonas aeruginosa* の方を回答された施設は許容正解とさせていただきます。また、今回の薬剤感受性結果でAMKの判定カテゴリーをIと回答された施設が1施設のみございましたが、菌名をMDRPと回答されていることから正しく判定されていると考え、こちらも許容正解とさせていただきます。

試料 42

患者背景：40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。

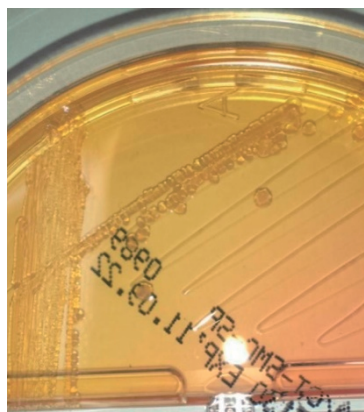
同定検査評価

評価	微生物名	施設数
A	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	23

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℃、24時間 好気培養



生化学的鑑別性状試験 35℃、24時間 好気培養



チトクロムオキシダーゼ試験

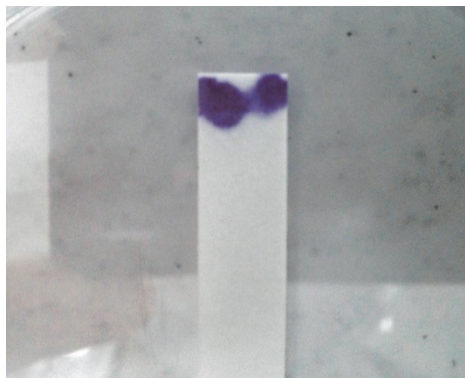


Photo Survey

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

患者背景：78歳男性。発熱、腹痛にて受診。腹部圧痛があり、CT検査を実施したところ、胆嚢と胆管に結石を認めた。来院時に採取した血液培養から写真1-1のごとくコロニーが発育し、カタラーゼ試験陰性、β溶連菌群別試験ではD群と判定された。本菌は写真1-2のごとく黄色色素を産生し、PYR試験は写真1-3のごとくであった。また、運動性は陽性であった。

写真 1-1

5%羊血液寒天培地 35℃、24時間培養



写真 1-2

色素

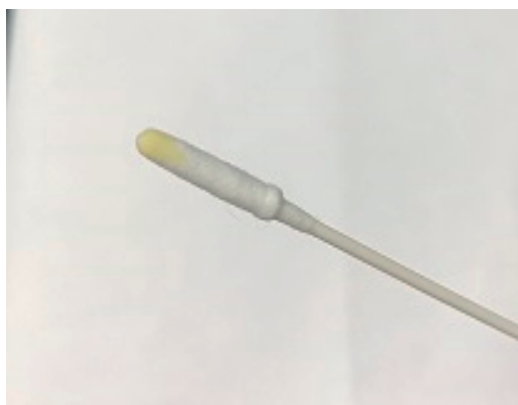
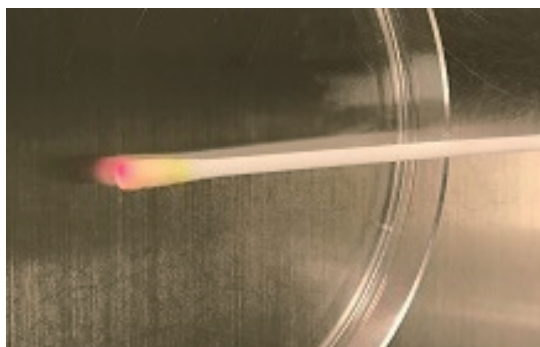


写真 1-3

PYR 試験



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 1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	22

Enterococcus 属（腸球菌）は健常者の腸管に常在する菌であり、ときに尿路感染症、心内膜炎、菌血症の起炎菌となります。

腸球菌の主な性状は、カタラーゼ陰性、Lancefield抗原による分類のための群別ラテックス凝集反応でD群に凝集、PYR試験陽性があります。

菌種の同定にはアラビノースなどが用いられますが、バンコマイシン（VCM）に自然耐性を示す *E. gallinarum* と *E. casseliflavus* は運動性陽性です。 *E. gallinarum* と *E. casseliflavus* の鑑別には黄色色素産生が用いられます。

また、VCMのMIC値が $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ であるバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）は5類全数届出感染症の対象菌です。VCMの薬剤耐性試験はCLSIではデ

ISK法・微量液体希釈法ともに、35 ± 2℃、好気環境 24時間で判定を実施することとなっています。感染症法の届出には検査材料の確認と感染症の起因菌である判定が必要となります。

Photo Survey 設問 2

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 2-1、2-2 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 2-3 のごとくであった。

写真 2-1

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間好気培養

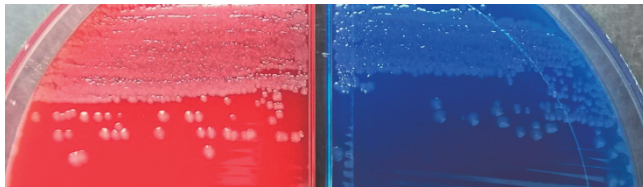


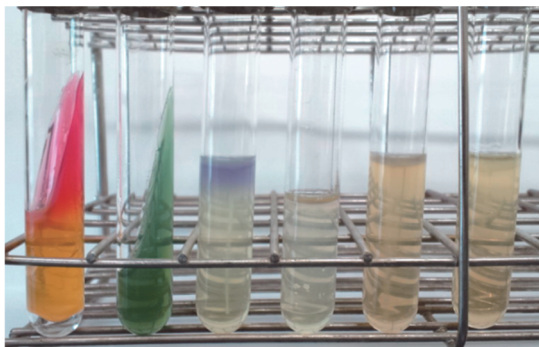
写真 2-2

SS 寒天培地 35℃、24 時間 好気培養



写真 2-3

生化学的鑑別性状試験 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 2 回答評価

評価	菌名	施設数
評価対象外	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	15
	<i>Shigella sp.</i>	3
	<i>Shigella flexneri</i>	4

Salmonella Paratyphi A の推定には、海外旅行から帰国後、発熱と腹痛を発症していること、SS 寒天培地上での透明なコロニーが重要な点となります。また、以下の生化学的性状により推察されます

【TSI 寒天培地】

斜面部：乳糖および白糖非分解のため赤色を示す。
高層部：黒変ないが、ガス産生が認められる。（稀に黒変する株あり）

【LIM 寒天培地】

リジン陰性（黄色）。インドールは陰性、運動性は陽性である。

【シモンズ・クエン酸培地】

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。（緑色）

また、確認検査として行われる O 血清を用いたスライド凝集反応では O2 群に凝集します。

パラ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。

今回、この設問の試験管培地の写真において、運動性の有無が非常にわかりにくく、菌種の推定に影響を与えるものであったため、評価対象外とさせていただきます。

Photo Survey 設問 3

患者背景：40代男性。東南アジア出張から帰国の1週間後、38℃以上の高熱が続いた。比較的徐脈で、脾腫、便秘の症状を呈していた。血液検査と便検査を実施したところ便から写真 3-1、3-2 の菌が発育した。生化学的鑑別性状試験は、写真 3-3 のごとくであった。

写真 3-1

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間 好気培養

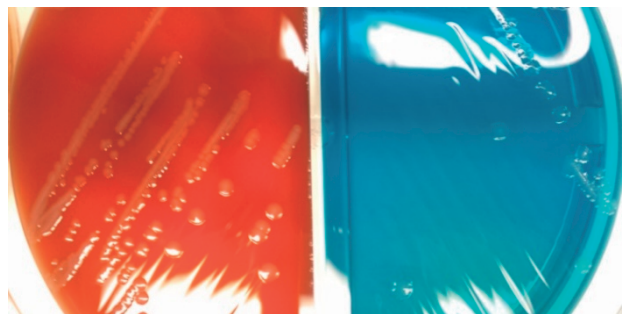


写真 3-2

SS 寒天培地 35℃、24 時間 好気培養

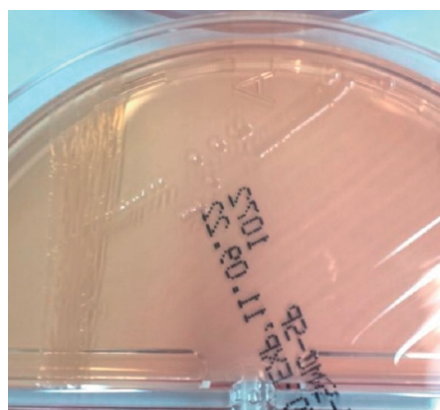
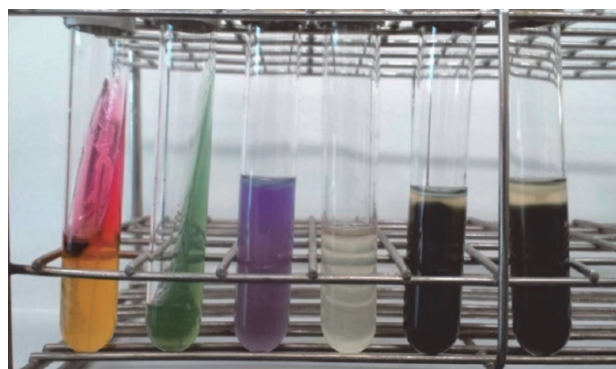


写真 3-3

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	菌名	施設数
A	<i>Salmonella Typhi</i>	22

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/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(-)	+	+(-)	-	-	+(-)	-	+
パラチフス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いません。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: 30 代男性。10 日間のカンボジア旅行から帰国後、39℃の発熱を発症し近医を受診。末梢血塗抹標本より写真 4-1 のごとく赤血球中に輪状体が認められた。また、写真 4-2 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 4-1

末梢血ギムザ染色像 ×1000



写真 4-2

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 4 回答評価

評価	菌名	施設数
A	<i>Plasmodium falciparum</i> (熱帯熱マラリア原虫)	22

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出现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。

Photo Survey 設問 5

患者背景：70 代男性。腎盂腎炎の診断にて入院。前医にて LVFX が投与され、当院、救急外来にて CTRX が使用され、入院となった。CTRX 投与前の血液と尿の細菌培養からは、翌日、*Klebsiella pneumoniae* が分離された。本菌の薬剤感受性試験を行ったところ、下記の表のような結果になった。本菌に対して CIM 法を実施したところ、結果は写真 5-1 のごとくであった。また本菌に対して SMA ディスク

を用いた確認試験を実施したところ、結果は写真 5-2 のごとくであった。

抗菌薬 (略号)	MIC 値	抗菌薬 (略号)	MIC 値
ABPC	>16	CMZ	>32
PIPC	>64	LMOX	>32
CTX	>64	IPM	1
CTRX	>32	MEPM	1
CAZ	8	FRPM	>2

写真 5-1

CIM 法

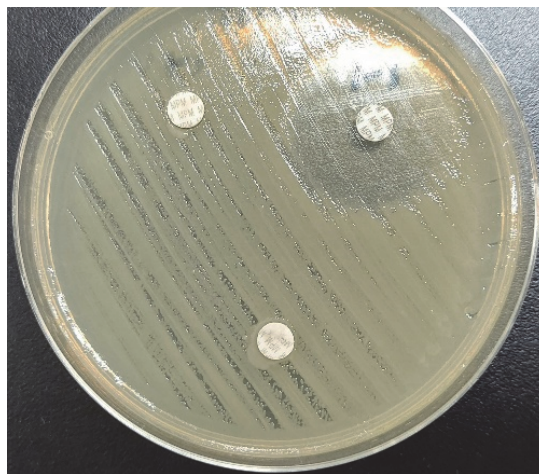
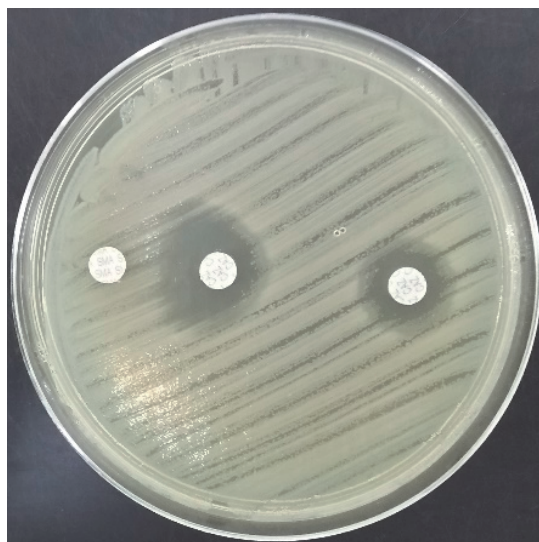


写真 5-2

SMA ディスクを用いた確認試験



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 CRE(カルバペネム耐性腸内細菌科細菌)であり、CPE(カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌)である。
- ② CRE であるが、CPE ではない。
- ③ CREではないが、CPEである。
- ④ CREでもなく、CPEでもない。
- ⑤ KPC産生菌である。

設問 5 回答評価

評価	菌名	施設数	
		1次評価後	2次評価後
A	③ CREではないが、CPEである。	19	22
C	① CREであり、CPEである。	2	
	④ CREでもなく、CPEでもない。	1	

イミペネム (IPM) やメロペネム (MEPM) などのカルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科細菌はカルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症と呼ばれ、感染症法で 5 類感染症 (全数把握) に指定されています。判定基準は以下の通りです。

分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認

- ア メロペネムの MIC 値が 2μg/mL 以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 22 mm以下であること
- イ 次のいずれにも該当することの確認
 - (ア) イミペネム MIC 値が 2μg/mL 以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 22 mm以下であること
 - (イ) セフメタゾールの MIC 値が 64μg/mL 以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 12 mm以下であること

今回の *Klebsiella pneumoniae* は IPM、MEPM の MIC 値がともに 1μg/mL であり、この判定基準に該当しないことになります。

CIM 法はカルバペネマーゼ産生菌を検出する方法の 1 つであり、原理は、MEPM ディスクと菌を接触させ、カルバペネマーゼ産生菌であればディスク中の MEPM が分解され、消失します。そのディスクを、MEPM 感性の大腸菌に作用させ、その反応(阻止円の形成)により判定する方法です。CarbaNP と

比較して簡便で低コスト実施でき、特別な試薬を必要としないため一般的な検査室でも実施可能とされています。またカルバペネマーゼ活性の弱い菌株に対しても反応が良好とされています。方法は以下の通りです。

- ① マイクロチューブ等に 400μL の精製水を準備する。
- ② ミュラーヒントン寒天培地 (MHA) または血液寒天培地から 10μL 白金耳いっぱいにとった対象となる菌を 400μL の精製水に懸濁させる。
- ③ 10μg の MEPM を含むディスクを懸濁液中に浸漬し、35℃で 2 時間以上インキュベートする。
- ④ *E. coli* ATCC25922 の MF0.5 菌液を作成し、MHA にディスク拡散法の要領で塗布する。
- ⑤ ③のインキュベートの時間が経過した後、浸漬した MEPM ディスクを取り出し、余分な液をおとし、④で作成した培地上に設置する。
- ⑥ 35℃、16~20 時間好気培養する。

カルバペネマーゼを産生している場合、MEPM が不活性化されるため、浸漬した MEPM ディスクは阻止円が形成されません。カルバペネマーゼを産生しない菌株では、明確な阻止円を形成します。菌種や遺伝子型によっては検出が困難な場合があったため、CLSI では精製水の代わりにトリプチケースソイブロス(TSB)を使用することで感度を向上させた modified CIM test(mCIM)が推奨されています。

今回の菌株では浸漬した MEPM ディスク (写真 5-1 左上) は阻止円が形成されなかったため、カルバペネマーゼ産生菌であることがわかります。また SMA ディスクを用いた確認試験でも SMA ディスク側の阻止帯が拡大していることから、本菌がメタロβラクタマーゼ産生菌であることがわかります。このようなカルバペネマーゼを産生しているにも関わらず、薬剤感受性検査ではカルバペネム感性と判定されてしまう CPE はステルス型 CPE と呼ばれており、このタイプの CPE は検査の網をくぐり抜けてしまう可能性があるため、院内感染対策上、重要な耐性菌と位置づけられています。

・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(AMK)	100 %
設問 41 感受性試験(IPM)	100 %
設問 41 感受性試験(LVFX)	100 %
設問 42 同定	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	評価対象外	
設問 3	100 %	100 %
設問 4	100 %	100 %
設問 5	86.3 %	100 %

今回、試料問題では薬剤感受性を踏まえた菌名の回答を求めましたが、一部の施設でMDRPという回答がいただけませんでした。菌名としては間違っておりませんので許容正解とさせていただきましたが、問題文をよく確認し、それを踏まえた上で菌名コードを確認し、回答していただく必要があると思われまます。

フォト設問においては、今回設問2において写真の見にくさが回答に影響を与えてしまったと思われる回答がありました。問題作成において、この写真で正しく回答してもらえるか、誤回答を招く恐れはないかをよく確認し、場合によっては写真を撮り直す、写真に補足説明をつけるなどの必要があると考えられました。また薬剤耐性菌については、その定義となる判断基準をよく確認しておいた方がよいと思われました。

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8割、2次評価ですべて正解となりました。今回、フォトサーベイにおいて写真の不備により評価対象外となった設問が1問あり、出題者としては見やすい写真を提供していかなければならないと痛感いたしました。

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)国立国際医療研究センター・国際感染症センター：グローバル感染症マニュアル 南江堂 2015
- 5) James Versalovic *et al.* : Manual of Clinical Microbiology 10th Edition ASM PRESS 2011
- 6) 館田一博：緑膿菌 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
- 7) 厚生労働省：感染症法に基づく医師の届出のお願い http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_u_iryuu/kenkou/kekkaku-kansenshou/kekkaku-kansenshou11/01.html
- 8) 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
- 9) 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
- 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) 上村清ほか：寄生虫学テキスト 第3版 光文堂 2008
- 12) 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
- 13) 第31回日本臨床微生物学会総会 ワークショップ 関西チーム:薬剤耐性菌の検査法 ~日常検査でここまでできる~ https://www.c-linkage.co.jp/jscm2020/program/data/ws_kansai.pdf