

令和4年度 社団法人
岐阜県臨床検査技師会 精度管理報告会

各研究班精度管理調査結果報告

微生物検査

八島 繁子 (岐阜県立多治見病院)

長島 敏之 (株式会社 メディック)



参加施設数 ():前年比

| | | |
|--------------|------|------|
| 試料問題(同定) | 26施設 | (±0) |
| 薬剤感受性検査 | 26施設 | (+3) |
| Photo Survey | 26施設 | (+1) |

設問内容

- ・試料問題:2題

設問41 臨床分離株同定・感受性

設問42 臨床分離株同定

- ・ Photo Survey:5題



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

| 試料問題 | 正解率 | |
|------------------|-------|-------|
| | 1次評価後 | 2次評価後 |
| 試料41 同定検査 | 100 % | 100 % |
| 試料41 感受性検査(ABPC) | 100 % | 100 % |
| 試料41 感受性検査(VCM) | 100% | 100 % |
| 試料41 感受性検査(TEIC) | 100 % | 100 % |
| 試料42 同定検査 | 96.2% | 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 | 96.2% | 100 % |
| 設問 4 | 96.2% | 100 % |
| 設問 5 | 96.2% | 100 % |

* 評価 Aと評価 Bを正解とする



試料問題

試料 41

患者背景:78歳、女性。37.5℃の発熱と腰背部痛を認め、当医を受診。腎盂腎炎を疑い、尿培養が微生物検査室に提出された。

問:培養を行い、分離・同定した菌種をコード表より選択してください。

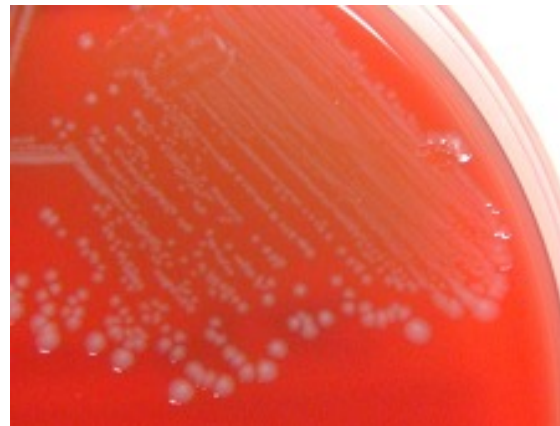
***Enterococcus faecalis* 評価 A 26施設(100%)**



*Enterococcus faecalis*の同定のポイント

- ・染色性はグラム陽性球菌で、長い連鎖を示すものや双球菌状のもの、あるいは集塊を形成するものまで配列は様々で、無芽胞、莢膜はなし。
- ・ヒツジ血液寒天培地で35℃～37℃、24時間培養すると大きさが1 mm～2 mm程度の灰白色半透明、扁平、正円コロニーを形成する。BTB乳糖寒天培地上には1 mm以下の黄色コロニーを形成するが、DHL寒天培地、マッコンキー寒天培地には発育しない。

5%ヒツジ血液寒天35℃ 24時間 好気培養



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

- ・生化学的性状は、カタラーゼ試験陰性、PYR(L-pyrrolidonyl peptidase)テスト陽性である点でα-streptococci と鑑別することができる。
- ・多くは耐塩性、胆汁酸抵抗性、アジ化ナトリウム耐性、エスクリン耐性。
- ・各種糖分解性、色素産生性、運動性を表に示す。

| 菌種 | 運動性 | 色素産生性 | ソルビット | アラビノース | ラフィノース |
|-------------------------|-----|-------|-------|--------|--------|
| <i>E. faecalis</i> | — | — | + | — | — |
| <i>E. faecium</i> | — | — | — | + | — |
| <i>E. casseliflavus</i> | + | + | — | + | + |
| <i>E. gallinarum</i> | + | — | — | + | + |
| <i>E. avium</i> | — | — | + | + | — |
| <i>E. raffinosus</i> | — | — | + | + | + |



- *Enterococcus*属は健常人の腸管内正常細菌叢を形成し、糞便から多数検出される。菌種による起因性の差異があまりみられず、尿路感染、胆道感染、消化器術後感染、心内膜炎(IE)などを引き起こす。
- 臨床材料からは*E. faecalis*が最も多く、*Enterococcus* spp.の70%~80%を占め、次いで*E. faecium*、*E. avium*、*E. durans*が分離される。



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

問: ABPC(アンピシリン)、VCM(バンコマイシン)、TEIC(テイコプラニン)の薬剤感受性試験を実施し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S30 の基準を用いてS、I、R、で判定・回答してください。

| 薬剤 | 評価 | 判定 | 施設数 | |
|------|----|----|-------|-------|
| | | | 1次評価後 | 2次評価後 |
| ABPC | A | S | 24 | 25 |
| VCM | A | S | 25 | 26 |
| TEIC | A | S | 24 | 25 |

1施設がMIC値のみの回答であったため

- ・全ての施設がVCMの測定を実施していた
- ・ABPCとTEICはそれぞれ1施設が未実施であった



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

ABPC

判定 S 評価 A 25施設(100%)

微量液体希釈法

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|----------|------------------------------|-----|
| バイテック | ≤ 2 | 6 |
| | 4 | 1 |
| BDフェニックス | 1 | 4 |
| ライサス | 1 | 3 |
| マイクロスキャン | 2 | 3 |

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|--------|------------------------------|-----|
| DPS192 | 1 | 1 |
| | 2 | 1 |
| IA40 | 1 | 1 |
| | 8 | 1 |
| 用手法 | ≤ 1 | 1 |
| | 1 | 1 |
| | ≤ 4 | 1 |

ディスク拡散法

| 阻止円径(mm) | 施設数 |
|----------|-----|
| 19 | 1 |

判定基準

- ・微量液体希釈法($\mu\text{g/mL}$)
S: ≤ 8 R: ≥ 16
- ・ディスク拡散法(mm)
S: ≥ 17 R: ≤ 16



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

VCM

判定 S 評価 A 26施設(100%)

微量液体希釈法

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|----------|------------------------------|-----|
| バイテック | 2 | 7 |
| BDフェニックス | 2 | 4 |
| ライサス | 4 | 3 |
| マイクロスキャン | 2 | 3 |

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|--------|------------------------------|-----|
| DPS192 | 2 | 2 |
| IA40 | 2 | 2 |
| 用手法 | 2 | 2 |
| | 4 | 2 |

ディスク拡散法

| 阻止円径(mm) | 施設数 |
|----------|-----|
| 19 | 1 |

判定基準

・微量液体希釈法($\mu\text{g/mL}$)

S: ≤ 4 I:8~16 R: ≥ 32

・ディスク拡散法(mm)

S: ≥ 17 I:15~16 R: ≤ 14



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

TEIC

判定 S 評価 A 25施設(100%)

微量液体希釈法

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|----------|------------------------------|-----|
| バイテック | ≤ 0.5 | 7 |
| BDフェニックス | ≤ 0.5 | 4 |
| ライサス | ≤ 0.5 | 1 |
| | ≤ 1 | 1 |
| | ≤ 4 | 1 |
| マイクロスキャン | ≤ 2 | 3 |

| 測定装置 | MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) | 施設数 |
|--------|------------------------------|-----|
| DPS192 | ≤ 0.5 | 2 |
| IA40 | ≤ 0.5 | 1 |
| | ≤ 1 | 1 |
| 用手法 | ≤ 0.5 | 1 |
| | ≤ 1 | 1 |
| | ≤ 8 | 1 |

ディスク拡散法

| 阻止円径(mm) | 施設数 |
|----------|-----|
| 18 | 1 |

判定基準

・微量液体希釈法($\mu\text{g/mL}$)

S: ≤ 8 I:16 R: ≥ 32

・ディスク拡散法(mm)

S: ≥ 14 I:11~13 R: ≤ 10



薬剤感受性について

- *Enterococcus faecalis*はAPBCに100 %感性を示す。
- 他の*Enterococcus*には耐性株が認められる。*E. casseliflavus*、*E. gallinarum*はVCM耐性遺伝子*vanC*を染色体上に有しているため、VCMに弱い耐性を示す。
- 米国ではABPC、VCM耐性の*Enterococcus*の治療に難渋している。

今回の試料に用いた菌株は耐性菌ではないが、院内感染の原因として重要なバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は*E. faecalis*、*E. faecium*のVCM耐性株である。これらは多くの場合、*vanA*または*vanB*遺伝子を有しており菌から菌に伝達されるため、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る。

*バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)感染症は5類感染症に指定されており、VCMのMIC値が16 µg/mL以上の場合をVREとし、保健所への届け出が必要である。



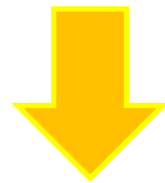
試料問題

試料 42

患者背景: 80代、ICU入院中の男性。中心静脈カテーテルが留置されており、カテーテル感染を疑い β -D-グルカンと血液培養が実施された。 β -D-グルカンは50 pg/mLであり、血液培養ボトルが30時間で陽性となった。

問: 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。

- ・ *Candida glabrata* 評価 A 24施設 (92.3%)
- ・ *Candida sp.* 評価 B 1施設 (3.8%)
- ・ *Candida parapsilosis* 評価 D 1施設 (3.8%)



評価 A 24施設 (92.3%)
評価 B 2施設 (7.7%)



*Candida glabrata*の同定のポイント

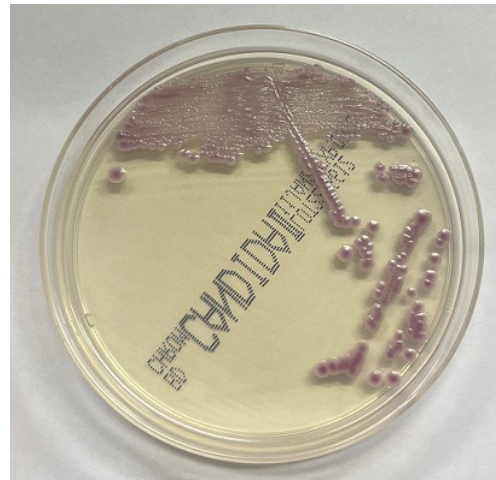
- ・染色性はグラム陽性で球形～卵円形(直径3 μm ～6 μm)の酵母細胞。また *C. glabrata* は発芽管を形成しないため、伸びた菌体が確認されないことも鑑別ポイントである。
- ・*Candida*属菌は35 $^{\circ}\text{C}$ ～37 $^{\circ}\text{C}$ 、1日～2日でほとんどが発育するが、*Candida glabrata*はヒツジ血液寒天培地では発育しないか表面は滑らかでねばねばした白色～クリーム色の微小なコロニーを形成するのみであるため、真菌用培地を用いるのが望ましい。
- ・同定方法として自動機器の導入が進んでいるが、自動機器を必要としない方法としてカンジダ属の主要菌種をコロニーの色調で鑑別可能な CHROMagar™ カンジダ培地がある。培地中のクロムペプトンをカンジダが分解し発色することを原理としており、30 $^{\circ}\text{C}$ ～37 $^{\circ}\text{C}$ 、48 時間培養における色調で判定する。



- 今回の試料に用いた菌株は*C. glabrata*であるが、CHROMagar™ カンジダ培地の本来の利用目的が *Candida*属3菌種(*C. albicans*: 緑・S型、*C. tropicalis*: 濃い青(コロニーの周りにハロー)・S型、*C. krusei*: ピンク、紫(ふちの部分広がり色が薄い)・R型)の区別が可能とされているため、*Candida* sp.も正解とした。

Candida glabrata CHROMagar™ カンジダ培地

35 °C 48時間 好気培養



- 不完全酵母最大の属 genus として知られる *Candida* 属には、*C. albicans*をはじめ、ヒトに病原性をもたらす菌種が多く含まれており、深在性(内臓)および表在性(皮膚および粘膜)真菌症の原因となる。深在性真菌症は正常菌叢の抑制や免疫低下により日和見感染症として発症する。また、播種性カンジダ症の20%~50%に眼内炎を合併するため、血液培養から酵母が検出された時には眼底検査を促すことも必要である。
- 侵襲性カンジダ症の第一選択薬としてキャンディン系が推奨されているが、*Candida* 属の菌種決定が抗真菌薬の決め手の1つになるため、誤判定にならないように注意が必要である。



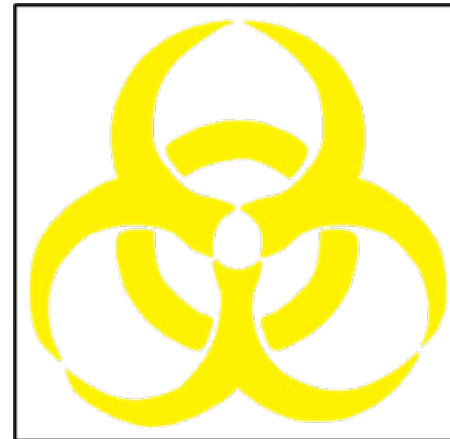
Photo Survey 設問 1

写真1は、感染性廃棄物容器の写真です。

写真1-1:感染性廃棄物容器



写真1-2:バイオハザードマーク



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

- 感染性廃棄物とは「医療関係機関等から生じ、人が感染し、若しくは感染するおそれのある病原体が含まれ、若しくは付着している廃棄物又はこれらのおそれのある廃棄物をいう」(昭和45年法律第137号)とされている。この判断基準をもとに、医療行為等によって廃棄物となった脱脂綿、ガーゼや紙おむつ、患者の生体物質検査や病原微生物関連の検査等に用いたもの、血液が付着した注射針(注射針のような鋭利なものは、血液が付着していないもの、または消毒により感染性を失わせたものも感染性廃棄物と同等の取り扱いとする)など、多種類の医療材料が該当する。
- これらの廃棄物は、中身の性状に応じて「鋭利状」(黄色)、「固形状」(橙色)および「液状または泥状」(赤色)の3種類のバイオハザードマークに区分し、適切な材質の容器に梱包し、保管、運搬および処分を行う。



この色のバイオハザードマークが貼付されている感染性廃棄物容器に廃棄するのはどれか下記選択肢より1つ選択してください。

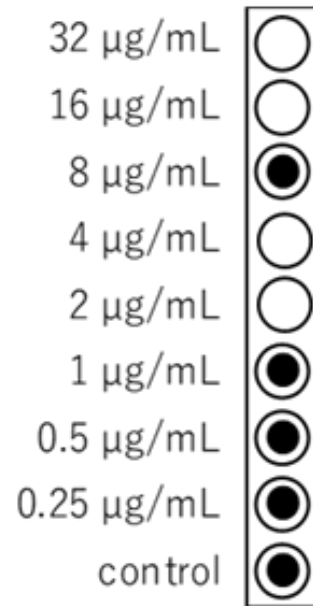
- | | | |
|---------------|------|------------|
| ① 使用済み注射針 | 評価 A | 26施設(100%) |
| ② 採血時に用いた酒精綿 | | |
| ③ 血液が入っている採血管 | | |
| ④ 痰が残っている採取容器 | | |
| ⑤ 血液が付着したガーゼ | | |



Photo Survey 設問 2

写真2は、ある細菌の薬剤感受性試験を微量液体希釈法で実施した初回時のパネルの写真です。

写真2: 微量液体希釈法による薬剤感受性結果



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

- 微量液体希釈法のMICのエンドポイントの決定は対照(菌の発育ウェル、未発育のウェル)を参考に、肉眼で観察して菌が完全に発育を阻止された最少濃度をMICとする。

ドライプレート‘栄研’用手法簡易マニュアル

極東 オプトパネルMP添付文書

発育陽性:混濁または直径1mm以上

1mm未満であっても沈殿塊が2個以上

- 発育対照のウェルは底部2 mm以上の菌発育または明瞭な混濁を認める。
- サルファ剤やTMPでは培地成分に拮抗物質が存在すると弱い発育が認められるため、発育対照ウェルに比べ $\geq 80\%$ の発育阻止が認められた場合は未発育とみなす。
- スキップ現象(発育ウェルが不連続となる現象)は1個認められた場合は高い濃度での発育阻止部分をMIC値とし、2個以上のスキップ現象は再検査する。

(臨床微生物ハンドブック第5版)



CLSIに定められている基準に従ってMICを判定し、下記選択肢より1つ選択してください。

① 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

② 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

③ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

④ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$

⑤ 判定不能とし、再検する 評価 A 26施設(100%)



Photo Survey 設問 3

患者背景:25歳女性。体温37.6℃、咳はなし、咽頭痛の症状にて受診した。扁桃炎疑いにて対症療法となったが3日後に増悪し、開口障害と左扁桃周囲の腫脹を認めた。患部から穿刺した検体が提出され、培養を実施したところ、炭酸ガス培養では細菌の発育は認められず、嫌気培養にて細菌の発育を認めた。

グラム染色標本、培養結果を写真3-1、写真3-2、写真3-3、写真3-4に示します。

写真3-1:検体のグラム染色
(B&M法:1000倍)

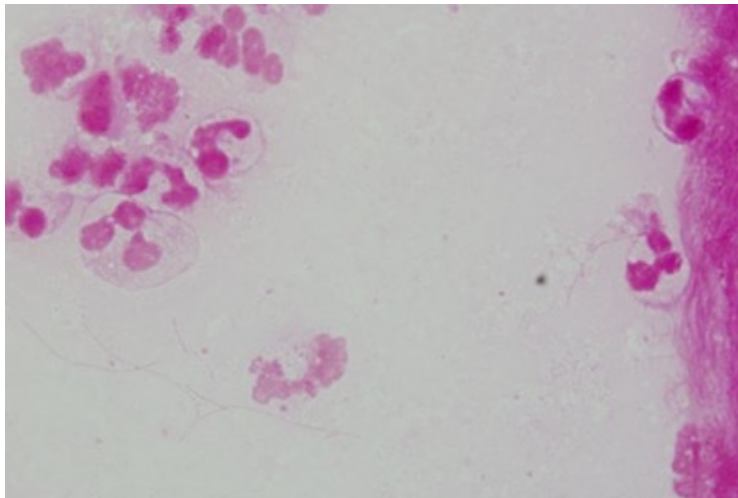
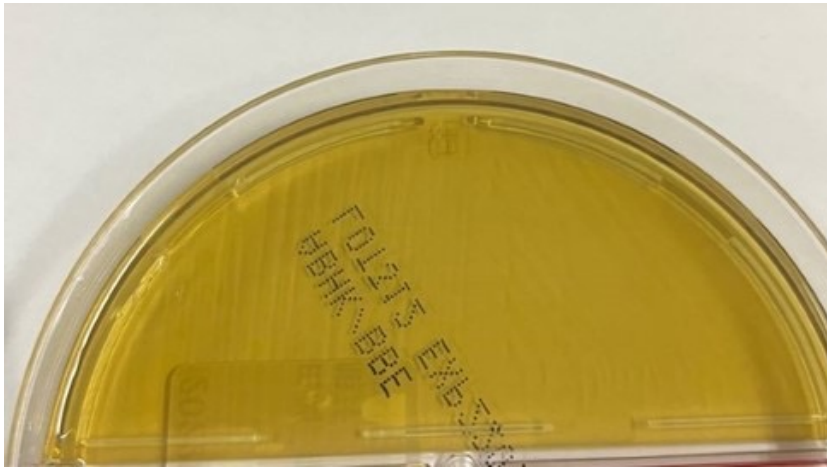


写真3-2:ブルセラHK寒天培地
嫌気培養 35℃、48時間培養

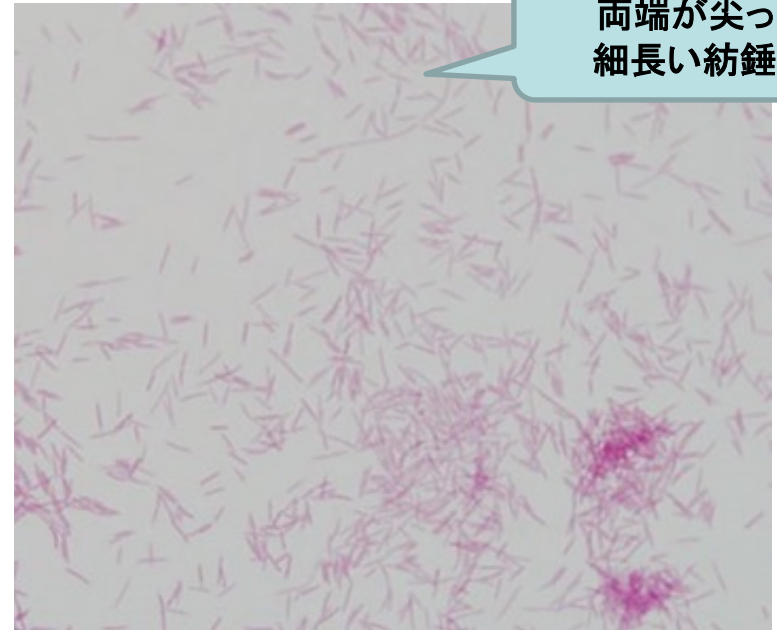


写真3-3:BBE寒天培地
嫌気培養 35℃、48時間培養



菌発育(一)

写真3-4:発育したコロニーのグラム染色
(B&M法:1000倍)

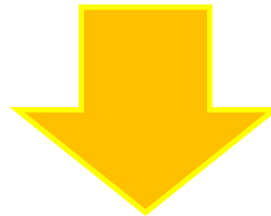


両端が尖った
細長い紡錘形



患者背景、これらの写真から、最も起因菌として推定されるものを1つ選び、その微生物名をコードより選択してください。

- *Fusobacterium nucleatum* 評価 A 20施設(76.9%)
- *Fusobacterium sp.* 評価 B 5施設(19.2%)
- *Porphyromonas sp.* 評価 D 1施設(3.8%)



評価 A 21施設(80.8%)
評価 B 5施設(19.2%)



Photo Survey 設問4

患者背景: 35歳女性。海外旅行から帰国後、38.1 °Cの発熱と腹痛を発症。血液培養と便培養が実施され、それぞれから同じ細菌の発育を認めた。

便の培養結果と生化学的鑑別性状検査を写真4-1、4-2、4-3に示します。

写真4-1: DHL寒天培地 35 °C、
24時間 好気培養

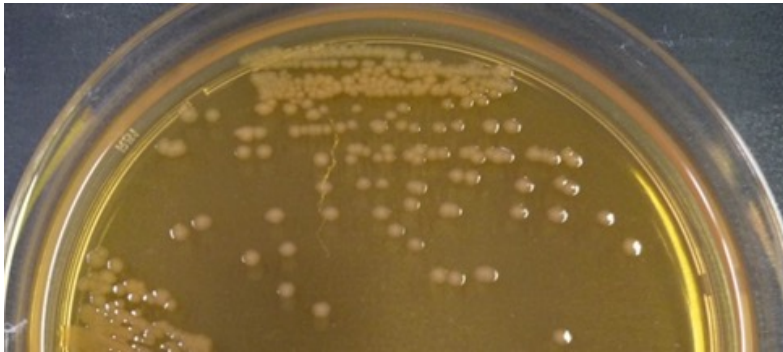
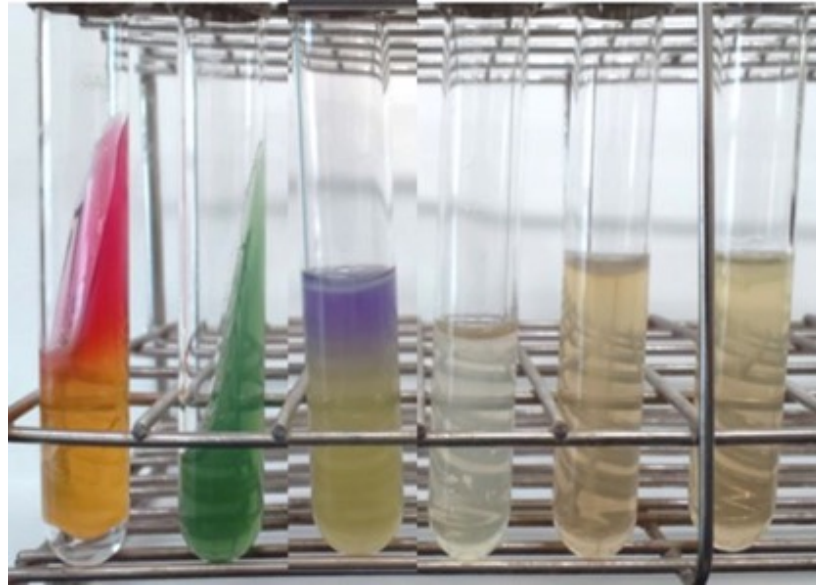


写真4-2: SS寒天培地 35 °C、
24時間 好気培養



写真4-3生化学鑑別性状試験 35 °C、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。

写真左から

・TSI

斜面/高層:陰性/陽性

=乳糖・白糖非分解

H₂S:非産生 (約90%以上)

ガス産生:(+)

・シモンズ・クエン酸培地

クエン酸利用能:(-)

・LIM 培地

リジン脱炭酸反応:(-)

・VP

VP反応:(-)

・SIM

運動性:(+)

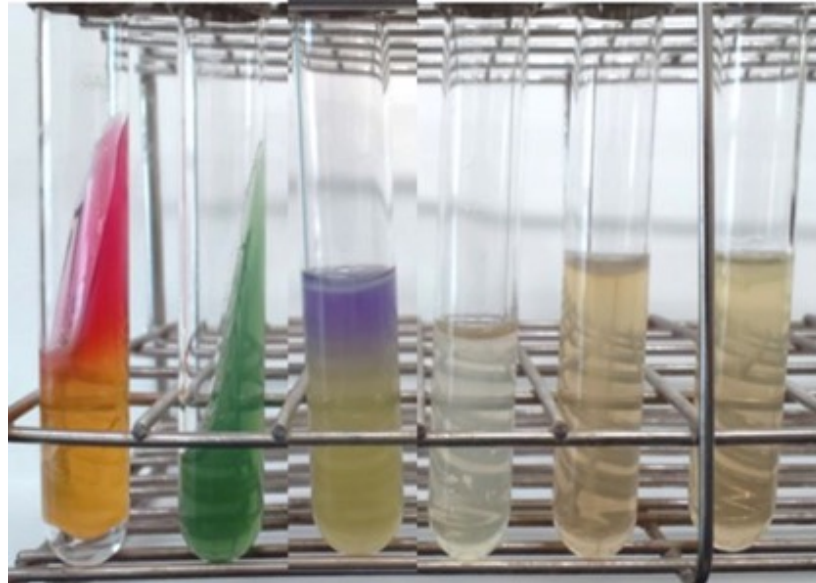
・SIM(インドール試薬添加後)

インドール反応:(-)

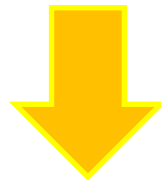


追加試験でオキシダーゼ試験:(-)

写真4-3 生化学鑑別性状試験 35℃、24時間培養



- **Salmonella Paratyphi A** 評価 A 24施設
- **Salmonella sp.** 評価 B 1施設
- 腸管病原性 *Escherichia coli* 評価 D 1施設



評価 A 25施設(96.2%)
評価 B 1施設(3.8%)

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群に凝集する。

パラチフス患者と診断した場合には、3類感染症として直ちに保健所へ届出が必要である。



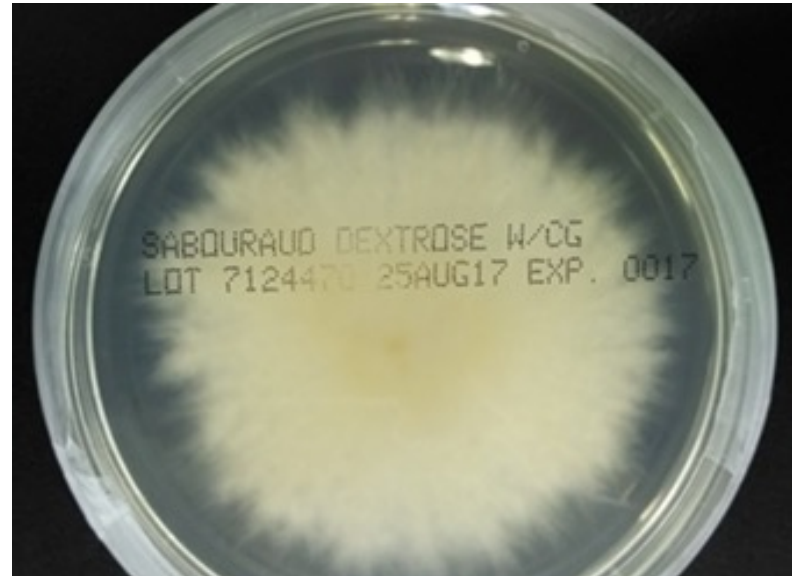
Photo Survey 設問5

患者背景:患者背景:42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°C、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°C、7日間 好気培養



各部門 精度管理調査結果報告(微生物検査)

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



紡錘形の大分生子
先端丸い
左右対称



推定される微生物名をコードより選択してください。

| | | |
|--------------------------------------|------|-------------|
| ・ <i>Microsporium sp.</i> | 評価 A | 4施設(15.4%) |
| ・ <i>Microsporium canis</i> | 評価 A | 3施設(11.5%) |
| ・ <i>Microsporium gypseum</i> | 評価 A | 18施設(69.2%) |
| ・ <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 評価 D | 1施設(3.8%) |



| | | |
|-------------------------------|------|-------------|
| ・ <i>Microsporium sp.</i> | 評価 A | 5施設(19.2%) |
| ・ <i>Microsporium canis</i> | 評価 A | 3施設(11.5%) |
| ・ <i>Microsporium gypseum</i> | 評価 A | 18施設(69.2%) |



まとめ

- 試料42において、*Candida parapsilosis*と回答した施設は同定検査に用いている培地の色調の判定に苦慮していた。同定検査は自動化がすすんでおり、従来の用手法の検査キットや培地との乖離を確認するために、同定検査実施方法の調査の必要性を感じた。
- 1次評価にて評価Dとなった施設への指導をせずとも、2次評価にて正解率100%となった。
- 今回は前回より参加施設数が増えており、精度管理への関心、必要性が高まっていると思われた。

