

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



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]

株式会社メディック 長島 敏之

はじめに

令和4年度の微生物サーベイは、試料問題2題、Photo Survey 5題を出題した。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できているかを確認する意味で出題した。また、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った。また菌種推定だけでなく、バイオハザードマークについての設問も出題した。

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。

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。

※希釈法でのMIC値の不等号の向きについては、不等号を左側、MIC値を右側に配した場合で回答してください。（例：4 µg/mL 以下→≤4 µg/mL）

※ディスク拡散法で阻止円が認められない場合は、すべて0 mmとしてください。

同定検査評価

評価	菌名	施設数
A	<i>Enterococcus faecalis</i>	26

薬剤感受性検査評価

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

*Enterococcus faecalis*の同定のポイントを以下に示す。

・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1mm～2mm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

	同定	感受性	選択問題
試料問題 (試料41)	◎	◎	
試料問題 (試料42)	◎		
Photo Survey 5問			◎

実施項目

◎：評価対象問題

参加施設数

試料問題（同定）	26施設
薬剤感受性検査	26施設
Photo Survey	26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。

試料問題

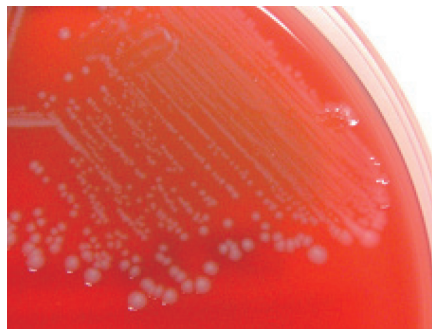
試料 41

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。

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。

Enterococcus faecalis : 5 %ヒツジ血液寒天

35℃ 24時間 好気培養



・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。

薬剤感受性については、*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 $\mu\text{g/mL}$ 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 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。

同定検査評価

評価	菌名	施設数	
		1次評価後	2次評価後
A	<i>Candida glabrata</i>	24	24
B	<i>Candida</i> sp.	1	2
D	<i>Candida parapsilosis</i>	1	

Candida glabrata の同定のポイントを以下に示す。

・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℃~37℃、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℃～37℃、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℃ 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

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、感染性廃棄物容器の写真です。

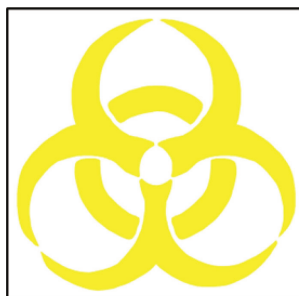
写真 1-1

感染性廃棄物容器



写真 1-2

バイオハザードマーク



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
- 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

設問 1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	①使用済み注射針	26

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。

Photo Survey 設問 2

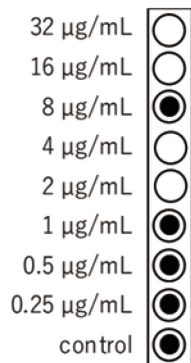
写真 2 は、ある細菌の薬剤感受性試験を微量液体希釈法で実施した初回時のパネルの写真です。

写真 2 : 微量液体希釈法による薬剤感受性結果
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 µg/mL
- ② 4 µg/mL
- ③ 8 µg/mL
- ④ 16 µg/mL
- ⑤ 判定不能とし、再検する

写真 2

微量液体希釈法による薬剤感受性結果



設問 2 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	⑤判定不能とし、再検する	26

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。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 ≥ 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。

Photo Survey 設問 3

患者背景 : 25 歳女性。体温 37.6 °C、咳はなし、咽頭痛の症状にて受診した。両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。

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。

写真 3-1

検体のグラム染色 (B&M 法 : 1000 倍)

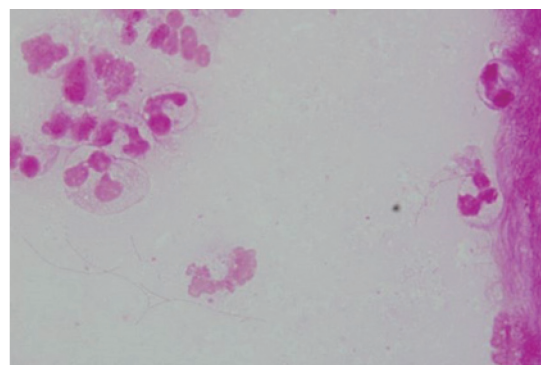


写真 3-2

ブルセラ HK 寒天培地 嫌気培養 35 °C、48 時間培養

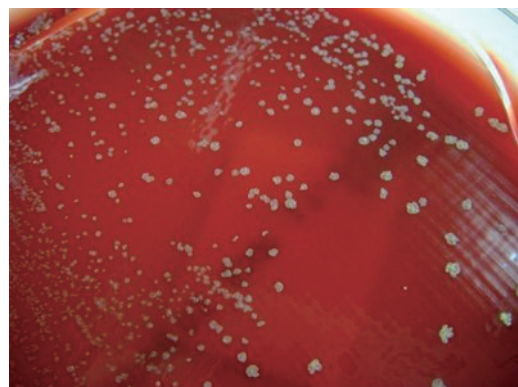


写真 3-3

BBE 寒天培地 嫌気培養 35 °C、48 時間培養

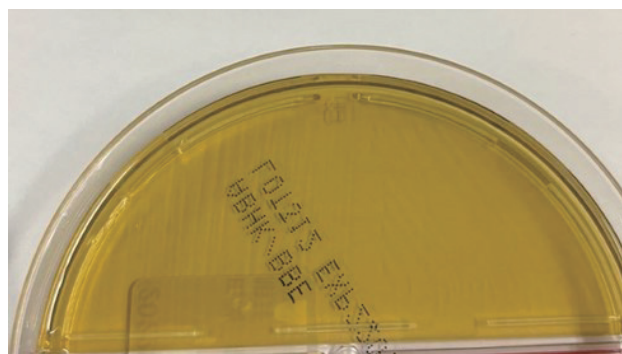
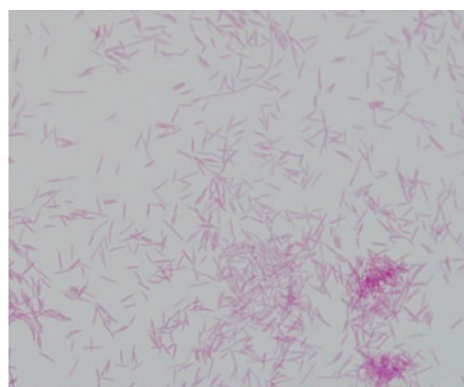


写真 3-4

発育したコロニーのグラム染色 (B&M 法 : 1000 倍)



設問 3 回答評価

評価	菌名	施設数	
		1次評価後	2次評価後
A	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	20	21
B	<i>Fusobacterium</i> sp.	5	5
D	<i>Porphyromonas</i> sp.	1	

Fusobacterium nucleatum はヒトの口腔などに常在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であるが、呼吸器に限らず全身の感染巣から分離される菌種である。

染色性は特徴的な両端が尖った細長い紡錘形のグラム陰性桿菌である。嫌気培養すると特徴的なパンくず様の乾燥したラフ型集落を形成する。

「臨床嫌気性菌検査法 '97」にて、検体は常に嫌気培養の対象となる検体 (カテゴリーA) と、通常は検査を省略するが場合によって嫌気培養を行う検体 (カテゴリーB) に分けられており、カテゴリーA については、さらに常在菌が混入しうる程度によっ

て A1~A3 に分けられている。

A1: 常在菌の汚染を最小限にできる検体 無菌材料から分離された嫌気性菌は病原的意義が大きいので詳細な同定検査をする。
A2: 常在菌の汚染は避けられないが嫌気培養の価値が高い検体 嫌気性菌感染症の有無は報告するが、複数菌感染が多いため重症例からの分離以外は同定検査をある程度簡略化する。
A3: 常在菌が多数存在する口腔内や下部消化管粘膜の破綻などが原因となった病巣からの検体 常在菌が多数存在する部位に膿瘍形成などをした感染症で、病原細菌は嫌気性菌である可能性が高く非常に多くの細菌が分離される。そのため、同定検査を簡略化 (推定同定) し、必要な細菌のみ詳細な同定を行う。
B: 常在菌の汚染が避けられず、分離菌の病原的意義の解釈が極めて困難な検体 通常は嫌気培養を必要としないが、嫌気性感染症を疑い、医師から強い要望のある場合は嫌気培養を行う。その場合、分離された嫌気性菌の病原的意義の解釈は非常に難しいため、嫌気性菌の有無を確認する程度にとどめる。

また、分離培養後、発育した嫌気性菌が 3 種類以内であれば菌種まで同定を行い、4 種類以上発育した場合は、検体カテゴリー (A-1、A-2、A-3) に応じて集落数が多い順に菌種レベルまで同定をし、それ以下は簡略化した同定を行うとされている。

同定レベルとして同定キットを使用しない (レベル 1a、1b)、同定キットを使用する (レベル 2)、遺伝子解析をする (レベル 3) があるが、同定キットや遺伝子解析は高価であるため、高い頻度で分離される偏性嫌気性菌については集落およびグラム染色性・菌形の特徴、選択確認培地での発育性状、特徴的な生化学的性状等を熟知することによって、同定キットに頼らずにある程度の同定結果を得る方法を併用していくことも肝要である。

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。

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 4-1

DHL 寒天培地 35 °C、24 時間 好気培養

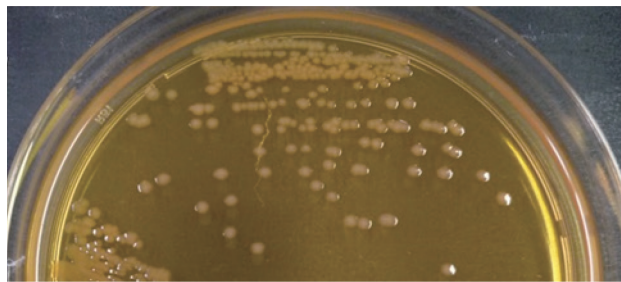


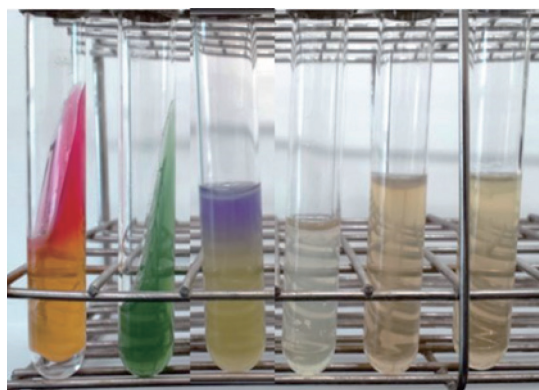
写真 4-2

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
 写真左から TSI、シモンズ・クエン酸培地、LIM 培地、
 VP、SIM、SIM（インドール試薬添加後）。
 運動性の判定は（+）であり、追加試験でオキシダーゼ試
 験（-）であった。



設問 4 回答評価

評価	菌名	施設数	
		1次 評価後	2次 評価後
A	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	24	25
B	<i>Salmonella sp.</i>	1	1
D	腸管病原性 <i>Escherichia coli</i>	1	

Salmonella Paratyphi A の推定には、海外旅行から帰国後に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る。また、以下の生化学的性状により推察される。

【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、紡錘形の大分子子が認められた。

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 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 回答評価

評価	菌名	施設数	
		1次 評価後	2次 評価後
A	<i>Microsporium</i> sp. <i>Microsporium canis</i> <i>Microsporium gypseum</i>	25	26
D	<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i>	1	

Microsporium 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する。*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ある。

M. gypseum のコロニーの発育速度は中程度で、6日以内で成熟する。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する。裏面はオレンジ色～黄褐色、赤褐色になる。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る。大分生子は内部が6区画以下で表面は粗く、細胞外壁と隔壁が薄く、大きさは6.0～18.0×22.0～80.0 μmで、先端は丸く、左右対称である。小分生子は1細胞性で棍棒形で、大きさは4.0～6.0×2.5～3.0 μm、菌糸側壁に着生している。

M. canis のコロニーの発育速度は中程度で、6～10日以内で成熟する。表面は綿毛状で、白色、黄色～黄褐色を呈する。裏面は濃黄色を呈す。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る。大分生子は内部が6～15区画で表面は粗く、細胞外壁が厚く、隔壁はやや薄く、大きさは6.0～25.0×30.0～150.0 μmで、先端は鋭く、左右非対称である。小分生子は1細胞性で洋梨形または棍棒形で、大きさは4.0～7.0×2.5～3.5 μm、菌糸側壁に着生している。

今回の写真の菌種は *M. gypseum* であるが、*M. canis*、*Microsporium* sp. も正解とした。

考察

各設問の正解率を表に示す。(評価対象外となった施設は除く。)

試料問題	正解率	
	1次 評価後	2次 評価後
設問 41 同定	100 %	100 %
設問 41 薬剤感受性 (ABPC)	100 %	100 %
設問 41 薬剤感受性(VCM)	100 %	100 %
設問 41 薬剤感受性(TEIC)	100 %	100 %
設問 42 同定	96.2%	100 %
Photo 設問	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 %

試料問題では設問 41 の薬剤感受性検査において、MIC 値の結果が入力されていたが判定が未入力で 1 次評価にて評価対象外となった施設があった。

1 次評価で D となった設問は試料問題の設問 42、フォト設問の設問 3、設問 4、設問 5 であり、それぞれ 1 施設ずつであった。設問 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。フォト設問においては、各施設とも再度、フォト設問と写真の内容を確認することにより正解となった。

まとめ

1 次評価にて D 判定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。

文献

- 堀井俊伸ほか：微生物検査ナビ 第 2 版 栄研化学 2016
- 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
- 松本竹久ほか：検査と技術増刊号 Vol.49 No.3 医学書院 2021
- Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition (M100-ED30) CLSI 2020
- 岐阜県ホームページ 届出基準 <https://www.pref.gifu.lg.jp/page/3796.html>
- 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
- 岡秀明：感染症プラチナマニュアル Ver.7 2021-2022 Grande メディカル・サイエンス・インターナショナル 2021
- 侵襲性カンジダ症に対するマネジメントのための臨床実践ガイドライン 日本医真菌学会 2021
- 松本哲哉 (編)：最新臨床検査学講座 臨床微生物学 医歯薬出版株式会社 2017
- 永田邦昭：感染症診断に役立つグラム染色 実践永田邦昭のグラム染色カラーアトラス 日水製薬 2006
- 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：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