

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]

はじめに

令和5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、感染対策についての設問も出題した。

実施項目 ◎：評価対象問題

	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			◎

参加施設数

試料問題 (同定) 27 施設
 薬剤感受性検査 25 施設
 Photo Survey 25 施設

試料問題

試料 41

患者背景：58歳、男性。胆道感染症にてICU入院中であり、ドレーン留置中。MEPM使用中であるが37.5℃の発熱を認めたため血液培養が提出され、好気ボトルのみから細菌の発育を認めた。

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：ST合剤（スルファメトキサゾール・トリメトプリム）、LVFX（レボフロキサシン）、MINO（ミノサイクリン）の薬剤感受性試験を実施し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

M100-S33の基準（S24から基準変更なし）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）

※ST合剤のMIC値はトリメトプリムとスルファメトキサゾールの値を足し合わせた値（2/38の場合は40）を回答してください。

※ディスク拡散法で阻止円が認められない場合は、すべて6mmとしてください。

※貴施設で未実施の薬剤は空欄のまま登録してください。

同定検査評価

評価	菌名	施設数
A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	25

薬剤感受性検査評価

薬剤	評価	判定	施設数
ST合剤	A	R	23
LVFX	A	S	23
	B	I	2
MINO	A	S	22

*Stenotrophomonas maltophilia*の同定のポイントを以下に示す。

・染色性は、細く小型のグラム陰性桿菌で、2本以上の極多毛鞭毛を有する。

・ヒツジ血液寒天培地で発育はやや遅く、35℃～37℃、24時間培養では0.2mm程度の微小コロニーを形成するが、さらに培養を継続するとサイズが拡大し、黄色味を帯びたコロニーとなる。

・生化学的性状は、ブドウ糖を好氣的にのみ分解するブドウ糖非発酵菌であり、シュエドモナス (*Pseudomonas*) 属菌に非常に近い菌種であるが、

オキシダーゼ試験は陰性であり、DNase 産生、リジン脱炭酸反応陽性である。マルトースを速やかに分解する。

- ・低水準消毒薬である塩化ベンザルコニウムに耐性を示す場合がある。

- ・河川や土壌など自然界に広く分布し、医療施設のシンクなどの水回りや人工呼吸器などの湿潤環境を好んで生息する。また、バイオフィームを形成するため、体内のデバイスなどに付着した場合には生体防御機構や抗菌薬に抵抗性を示すことなど医療関連感染として問題になる菌である。

- ・日和見病原菌であるが、生じうる代表的感染症として、肺炎、カテーテル血流感染、菌血症があるが、定着菌であることも多く、治療対象になるか慎重に判断する。

- ・幅広い薬剤に対して耐性を示す菌である。β-ラクタム系薬剤に対する耐性は、本菌が 2 種類の β-ラクタマーゼを産生することによる。1 つは染色体性メタロ-β-ラクタマーゼであり、カルバペネム系薬剤を含め β-ラクタム系薬剤に広く耐性を示す。また、アミノグリコシド系薬剤やキノロン系薬剤に対する耐性は、主に外膜変異による。

- ・治療は、第 1 選択薬は ST 合剤、第 2 選択はニューキノロン系やテトラサイクリン系、またはそれらを併用する。

今回の試料に用いた菌株の LVFX において、判定 S (感性) が 23 件、判定 I (中間) が 2 件であったが、判定 I (中間) の MIC 値は 4 であり最も多かった MIC 値 2 の 1 管差であるため評価 B とした。

試料 42

患者背景：50 歳、女性。体温 38.0 °C、血圧 94/47 mmHg、脈拍 72 回/分、呼吸数 22 回/分。左下腿が赤く腫れあがり水泡があり、圧痛および皮膚壊死を認める。来院時の主な血液生化学検査は、白血球数 25000 /μL、Hb11.0 g/dL、CRP30.00 mg/dL。

血液培養と創部培養から同じ細菌の発育を認めた。

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
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25

Streptococcus pyogenes の同定のポイントを以下に示す。

- ・染色性はグラム陽性の連鎖状球菌であるが、短いレンサ状に見えたり、不染性となったりすることがある。芽胞および鞭毛は有さない。

- ・血液寒天培地上で 35 °C、24 時間培養後に β-溶血性を示す直径 5 mm 以上のコロニーを形成する。

- ・生化学的性状は、カタラーゼ試験陰性、Lancefield 分類により A 群に分類される。血清型別に利用される M 蛋白および T 蛋白が存在する。

- ・ *S. dysgalactiae* subsp. *equisilimilis* (SDSE) であっても Lancefield 分類が A 群である場合があるが、バシトラシン感受性テストや PYR テストで鑑別可能である。

	バシトラシン	PYR テスト
<i>Streptococcus pyogenes</i>	感性	+
SDSE	耐性	-

- ・複数の菌体外毒素を産生して溶血性疾患や発熱性疾患を起こす。

- ・皮膚、口腔内に定着して原因菌となる。

- ・生じうる代表的感染症として、咽頭炎、皮膚感染症 (丹毒、蜂窩織炎、膿痂疹など)、壊死性筋膜炎、猩紅熱、TSS、感染性心内膜炎、肺炎があり、感染後に溶連菌性糸球体腎炎を発症する場合がある。壊死性筋膜炎や敗血症に起因する劇症型溶血レンサ球菌感染症は五類感染症 (全数把握) に指定されている。

- ・咽頭ぬぐい液から直接 A 群抗原を検出する POCT (point of care testing) によって確認が可能である。

- ・治療は、第 1 選択薬は PCG であるが、ペニシリンアレルギーの場合は第 1 世代セフェム系、CLDM、VCM を使用する。壊死性筋膜炎や TSS では毒素産生を抑制する効果を期待して CLDM を併用する。

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、高圧蒸気滅菌器を稼働する際に、滅菌包装やコンテナに貼り付けて使用する包装外部用インジケーターの写真です。

写真 1-1：滅菌前

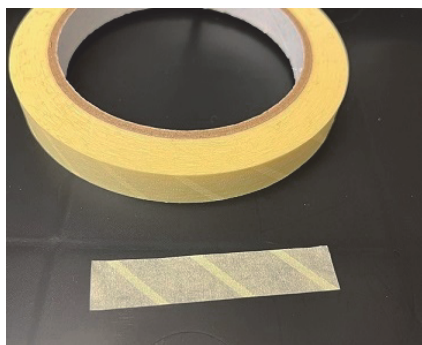


写真 1-2：滅菌後



このインジケータの種類はどれか、下記選択肢より1つ選択してください。

- ① 物理的インジケータ
- ② 化学的インジケータ
- ③ 生物学的インジケータ
- ④ ガス濃度インジケータ
- ⑤ クリニカルインジケータ

設問 1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	②化学的インジケータ	25

高圧蒸気滅菌器の滅菌保証に使用するインジケータには、滅菌器・付随設備の動作確認を目的とする物理学的インジケータ、化学的または物理的变化にて確認する化学的インジケータ (CI)、抵抗性のある微生物を使用して確認する生物学的インジケータ(BI)がある。写真のインジケータは温度変化を確認する化学的インジケータである。なお、クリニカルインジケータとは、Quality Indicator (医療の質指標) と Quality Improvement (医療の質改善) の2つの関連した意味をもつ略語であり、医療の質の改善を医療の質指標を用いて可視化する取り組みである。

Photo Survey 設問 2

写真 2 は、ある施設、ある一定期間において分離された微生物の各種抗菌薬への感性率 (%S, percent susceptible) を表形式にしたアンチバイオグラムです。

写真 2：X 病院の感性率表

X病院 ○○○年1月～12月 アンチバイオグラム

菌名	結核菌	X病院AST ○○○○.○○.○○																
		ペニシリン	セフェム	カルバペナム	他ラクト	アミノグリコシド	キノロン	糖MRSA	マクロライド	その他	その他							
		AMP	AMPC	AMPC/CLAV	AMPC/CLAV	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX
Staphylococcus aureus (MSSA)	280	-	100	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Staphylococcus aureus (MRSA)	220	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coagulase-negative Staphylococci	272	-	22	-	22	-	22	-	22	38	-	32	99	99	99	99	99	99
Streptococcus pneumoniae*	53	98	-	-	100	98	-	89	R	R	-	98	100	100	100	100	100	100
Enterococcus spp.	336	72	75	-	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R
Enterococcus faecalis	216	69	69	-	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R
Enterococcus faecium	95	3	11	-	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R
Escherichia coli	584	51	62	96	67	77	65	79	86	99	99	79	90	98	84	R	R	R
Escherichia coli (ESBL)	120	0	43	90	0	0	54	3	95	99	99	5	78	98	14	R	R	R
Klebsiella pneumoniae	314	4	81	96	73	93	96	94	98	99	94	97	97	98	98	R	R	R
Enterobacter cloacae complex	105	R	R	R	R	56	62	64	86	99	84	84	94	94	R	R	R	R
Pseudomonas aeruginosa	240	R	R	R	R	R	95	93	R	86	92	87	87	96	97	99	99	R
Haemophilus influenzae	38	30	58	85	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

自然耐性 [R] 未検査あるいは臨床的に無効 [] ~80% 80~89 90~100

感性率(%S)は、各薬剤につき回菌数を出しのみを用いて計算。
 *S. pneumoniae：薬中PCG/CTX/CFPMは非臨床的基準、臨床的基準では、PCG 50%/CTX 65%/CFPM 72%。
 MRSA検出率：43%、E. coli ESBL産生率：21%。
 表作成基準：アンチバイオグラム作成ガイドライン version 1. 感受性判定基準：CLSI M100-S26

この表の作成法を標準化することを目的としている「アンチバイオグラム作成ガイドライン」に記載されている内容と異なるものを、下記選択肢より1つ選択してください。

- ① 1年に1回作成する。
- ② それぞれの菌種において対象期間中に、患者1人に対して最初に分離された株(初回分離株)のみを対象とする。
- ③ 対象1菌種あたり50株以上の分離がある場合のみ解析に含める。
- ④ Streptococcus pneumoniae のペニシリン、セフトキサキム、セフトリアキソン、セフェムに関しては、検体材料に関わらず全株について髄膜炎と髄膜炎以外の両方の基準で算出する。
- ⑤ Staphylococcus aureus は、MRSA、MSSA の2群に分ける。

設問 2 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	③対象1菌種あたり50株以上の分離がある場合のみ解析に含める。	25

「アンチバイオグラム作成ガイドライン」は、アンチバイオグラムは集計法の違いで感性率が異なってしまうため作成法を標準化することを目的に作成された。本ガイドライン内の2.作成に関する推奨事項の2.1.経験的治療のためのアンチバイオグラムの全般に・1年に1回作成する。菌株に・検出部位や感受性パターンと関係なく、それぞれの菌種にお

いて対象期間（通常は1年）中に、患者1人に対して最初に分離された株（初回分離株）のみを対象とする。・対象1菌種あたり30株以上の分離がある場合のみ解析に含める。菌種ごとの追加解析の *Streptococcus pneumoniae* に・ペニシリン、セフトキシム、セフトリアキソン、セフェピムに関しては、検体材料に関わらず全株について髄膜炎と髄膜炎以外の両方の基準で算出する。*Staphylococcus aureus* に・MRSA、MSSAの2群に分ける。と記載されている。したがって、③の株数が間違いである。

Photo Survey 設問 3

患者背景：39歳男性。体温36.5℃、腹痛があり、3日～4日前から1日10回以上の水様性の下痢を認める。CT所見にて軽度脂肪肝を認めるものの小腸に液体貯留が目立ち、小腸炎を疑われた。来院時の採血結果は、Na 137 mmol/L、K 3.8 mmol/L、Cl 105 mmol/L、CRP 1.85 mg/dL、WBC 4800 /μL (Neut48.0%)、RBC 5.46 /μL、Hb 17.1 g/dL、Hct 48.8%であった。便が提出された。

検体の外観、各種標本を写真3-1、写真3-2、写真3-3、写真3-4に示します。

写真3-1：便の外観



写真3-2：検体のグラム染色（B&M法：1000倍）

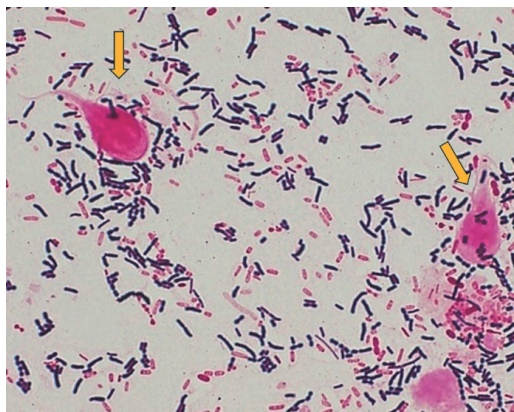


写真3-3：検体の鏡検（無染色：400倍）

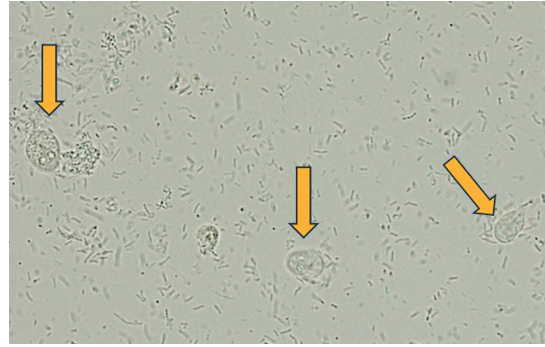
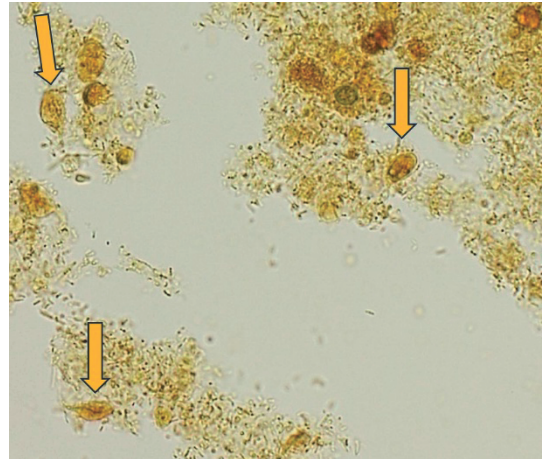


写真3-4：検体の鏡検（ヨウ素染色：400倍）



患者背景、これらの写真から、最も原因と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>Giardia lamblia</i>	22
A	<i>Giardia sp.</i>	3

泥状・水様の下痢から、正面からはフクロウ様、側面からはスプーン様の外観であり、4対8本の鞭毛を有し、腹部に吸着円盤を認める栄養型から *Giardia lamblia* が推定される。日本寄生虫学会の和名表では“ランブル鞭毛虫”とされているが、感染症法では“ジアルジア症”とされ、五類感染症（全数把握）に指定されている。本邦における感染のリスク要因は、発展途上国への旅行と男性同性愛者間の性行為とされる。また、イヌ、ネコ、ウシにも感染するとされ、これらの動物からヒトへの感染事例も報告されており、人畜共通感染症の側面もある。胆管炎・胆嚢炎や膵炎を発症したとする報告もある。治療は、ニトロイミダゾール系薬剤（メトロニダゾール）が用いられる。

Photo Survey 設問 4

患者背景：80歳男性。体温 37.4℃、間欠的な水様下痢を発症。便培養が実施され、以下のような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℃、24 時間 好気培養



写真 4-2：SS 寒天培地 35℃、24 時間 好気培養

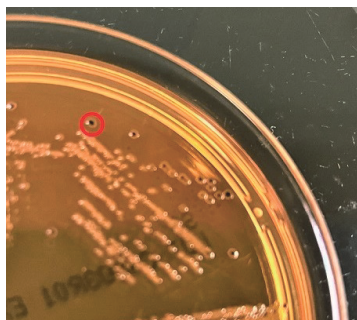
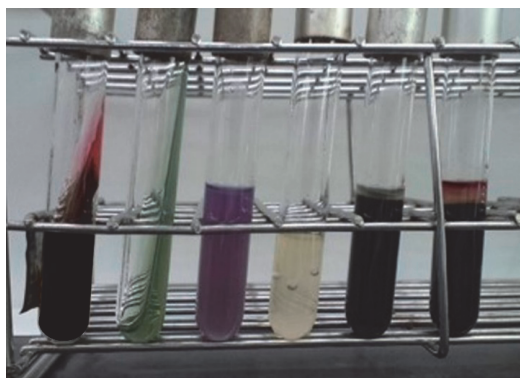


写真 4-3：写真 4-1、4-2 の赤丸のコロニーの生化学的鑑別性状試験結果 35℃、24 時間培養



写真左から TSI、シモンズ・クエン酸培地、LIM 培地、VP（試薬添加後）、SIM、SIM（インドール試薬添加後）。

IPA の判定は（-）であり、追加試験でオキシダーゼ試験（-）であった。

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>Edwardsiella tarda</i>	25

DHL 寒天培地、SS 寒天培地に透明で中心部が黒いコロニーを形成し、*Salmonella* 属菌と酷似している。生化学的性状は、【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：黒変あり、ガス産生が認められる。【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）。【LIM 寒天培地】リジン陽性（紫色）【SIM 寒天培地】IPA 陰性、運動性は陽性、インドールは陽性である。これらの性状より、*Edwardsiella tarda* と推定される。

Edwardsiella 属は、水辺に生息する哺乳類、鳥類、爬虫類などの腸管内、湖沼、河川水などに分布する。ヒトの感染症に関連する菌種は *Edwardsiella tarda* で下痢症の原因菌となる。まれに日和見感染症を起こし、壊死性菌膜炎や血流感染症は肝硬変や糖尿病などの基礎疾患をもつ患者に発症することがある。治療は、アンピシリン、セファロスポリン、アミノグリコシド、キノロン、ST 合剤などが有効である。

Photo Survey 設問 5

患者背景：35歳男性。幼少期から気管支喘息を患っている。1週間前より発熱、咳、痰といった感冒症状あり。体温 37.8℃、SpO₂ 94%（酸素 3L 投与中）、CRP 11.20 mg/dL、WBC 11700 /μL（Neut85.4%）、尿中肺炎球菌抗原（-）、マイコプラズマ抗原（-）、胸部レントゲンにて両葉に浸潤影を認めた。

提出された喀痰の細菌検査の判定結果を示します。『写真 1 に示す染色像より、この喀痰の①Geckler 分類は 5 群と評価した。さらに詳しく観察すると、写真 2 のごとく多数の②グラム陰性桿菌が認められた。また、培養後は写真 3 のごとく③チョコレート寒天培地のみコロニーが発育した。XV 鑑別培地上では写真 4 のごとく XV とウマ血液に発育を認め、ウマ血液には溶血が認められないため、④ *Haemophilus influenzae* と同定された。また本菌の薬剤感受性結果は表に示す結果であったため、⑤ *BLNAR* と判定した。』

写真 5-1：生食洗浄後の喀痰のグラム染色
(B&M 法：100 倍)

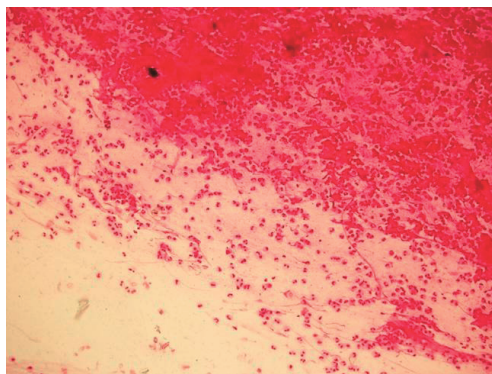


写真 5-2：生食洗浄後の喀痰のグラム染色
(B&M 法：1000 倍)

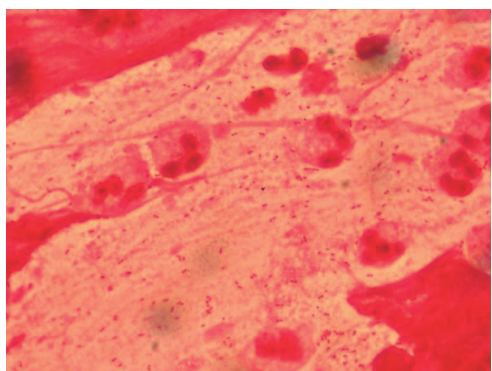
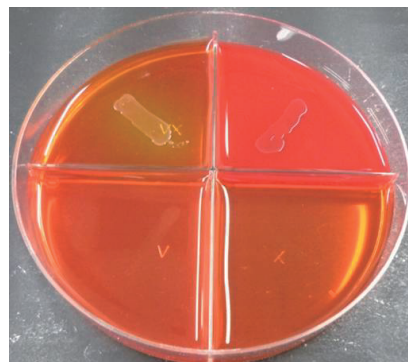


写真 5-3：左、5 %羊血液寒天培地
右、チョコレート寒天培地 35℃、24 時間培養



写真 5-4：XV 鑑別培地（右上より時計回りに
ウマ血液、X、V、XV 培地）



表：薬剤感受性結果

抗菌薬 (略号)	MIC 値	抗菌薬 (略号)	MIC 値
ABPC	>16	MEPM	0.5
SBT/ABPC	16	CAM	8
AMPC/CVA	16	MINO	0.5
CTX	2	LVFX	≤0.5

判定結果の太字下線部の①~⑤の中で、**不適切な判定**はどれか、下記の選択肢より 1 つ選んでください。

- ① Geckler 分類は 5 群
- ② グラム陰性桿菌
- ③ チョコレート寒天培地のみコロニーが発育した
- ④ *Haemophilus influenzae*
- ⑤ BLNAR

BLNAR

設問 5 回答評価

評価	菌名	施設数
A	⑤BLNAR	25

Geckler 分類は、喀痰検体における品質管理の指標に、顕微鏡的評価としてよく用いられ、喀痰標本をグラム染色し、顕微鏡にて 100 倍で鏡検したときの 1 視野あたりの白血球（好中球）と扁平上皮細胞の数によって 6 グループに分類される。

グループ	細胞数/1 視野（100 倍）	
	白血球 (好中球)	扁平上皮細胞
Geckler1 群	< 10	> 25
Geckler2 群	10~25	> 25
Geckler3 群	> 25	> 25
Geckler4 群	> 25	10~25
Geckler5 群	> 25	< 10
Geckler6 群	< 25	< 25

喀出痰の場合、Geckler1~3 群は唾液による濃厚な汚染を受けているとされ、Geckler4、5 群が良質な喀痰とされる。写真 5-1 のグラム染色像では白血球は多数認められ、扁平上皮細胞はほとんど認められないため、Geckler5 群となる。

写真 5-2 のグラム染色像より多数の好中球とともにグラム陰性短桿菌を多数認め、*Haemophilus influenzae* が疑われる。*H. influenzae* は、喀痰からのグラム染色像では粘液質や壊死背景に菌体が紛れ込み、注意深く観察を行わないと見逃すことがあ

るため、背景が比較的クリアなところで行うとよいとされている。培養ではチョコレート寒天培地に発育し羊血液寒天培地に発育しないという点、また XV 鑑別培地にて XV 培地のみ発育を認め、ウマ血液に溶血が認められない点により、本菌と推定される。

また、薬剤感受性結果にて ABPC が耐性であり、ニトロセフィン法を実施しβラクタマーゼの検査が陰性であれば、BLNAR（βラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性インフルエンザ菌）、陽性であれば BLPACR（βラクタマーゼ陽性アモキシシリンクラブラン酸耐性インフルエンザ菌）と判定される。BLNAR の耐性機構はペニシリン結合タンパク（PBP3）の変異によるβラクタム系抗菌薬との親和性の低下とされており、この PBP3 に強く結合するセフェム系抗菌薬の感受性は、ペニシリンやカルバペネム系抗菌薬よりも顕著に影響を受けやすいことが報告されている。この耐性機構にさらにβラクタマーゼ産生が加わると BLPACR となる。設問ではβラクタマーゼ確認試験が実施されておらず、この段階では BLNAR と断定することはできない。

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
設問 41 同定	100 %
設問 41 薬剤感受性 (ST 合剤)	100 %
設問 41 薬剤感受性(LVFX)	100 %
設問 41 薬剤感受性(MINO)	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 %

試料問題における同定検査の実施方法は、自動機器が 15 施設、質量分析が 6 施設、用手法が 5 施設であった。同定検査の正解率は 100 % であり、今回用いた試料の細菌では差は認められなかった。

設問 41 の薬剤感受性検査において、施設によっては未解答の薬剤があった。全て微量液体希釈法であり、ST 合剤は 2 施設、MINO は 3 施設であった。それぞれ異なる施設であり、解答が 1 薬剤のみの施設は無かった。外部精度管理は患者検体と同様な流れで処理した結果を評価するため未解答で問題はないが、本菌の様に抗菌薬の選択肢が少ない細菌の微量液体希釈法のパネルに掲載されていない薬剤について、ディスクなどの準備があるか対応が気になる場所である。

フォト設問は、微生物の推定同定のみならず感染対策に必要な知識を問う設問を出題した。病院以外の参加施設が 3 施設あったが、正解率は 100 % であり良好な結果であった。アンチバイオグラム作成ガイドラインには今回出題した内容以外にも作成に関する推奨事項が多数記載されており、作成時に参考にしてもらいたい。また、遭遇することの少ない原虫についても正解率は 100 % であり、満足のいく結果であった。

まとめ

今回は全ての設問において正解率が 100 % であった。今後も各施設の精度管理のため、また、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランの目標達成のために、要となる同定検査と薬剤感受性検査の精度を担保する設問を出題していきたい。

文献

- 1) 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
- 2) 堀井俊伸ほか：微生物検査ナビ 第 2 版 栄研化学 2016
- 3) 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
- 4) 松本竹久ほか：検査と技術増刊号 Vol.49 No.3 医学書院 2021
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition (M100-ED33) CLSI 2023
- 6) 岐阜県ホームページ 届出基準 <https://www.pref.gifu.lg.jp/page/3796.html>

- 7) 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
- 8) 高階雅紀ほか:医療現場における滅菌保証のガイドライン 2021 一般社団法人日本医療機器協会
- 9) 厚生労働省「医療の質の評価・公表等推進事業」ホームページ
<https://www.min-iren.gr.jp/hokoku/hokoku.html>
- 10) 高橋俊司ほか:アンチバイオグラム作成ガイドライン 感染症教育コンソーシアム アンチバイオグラム作成ガイドライン作成チーム
- 11) 高橋索真ほか:胃と腸 Vol.54No.12 医学書院 2019