

# 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3年度の微生物サーベイは、試料問題2題、Photo Survey 5題を出題しました。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ました。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いました。また菌種推定だけでなく、消毒薬についての設問も出題させていただきました。

	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			◎

## 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	23 施設
Photo Survey	25 施設

## 試料の取り扱い

- 1.カルチャースワブにて送付いたしました。
- 2.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。
- 3.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:60歳男性。3日前より発熱、咳嗽、膿性痰があり近医を受診。培養目的で喀痰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。

問：PIPC（ピペラシリン）、CTRX（セフトリアキソン）、MEPM（メロペネム）の薬剤感受性試験を実施し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-30th Edition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>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	24

## 薬剤感受性検査

薬剤	評価	判定	施設数	
			1次 評価後	2次 評価後
PIPC	A	R	22	23
	C	S	1	
CTRX	A	R	19	19
LVFX	A	S	23	23

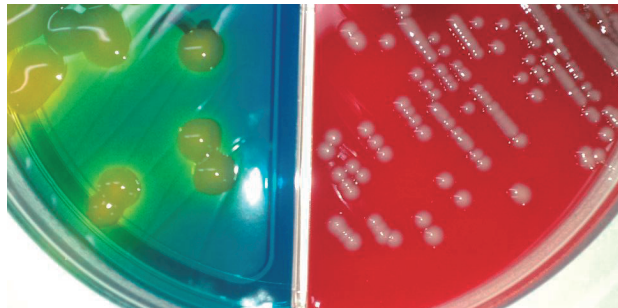
*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* の同定のポイントは以下のとおりです

・血液寒天培地、BTB 乳糖加寒天培地、マッコンキ一寒天培地での発育は良好で、35～37℃、24 時間培養では、粘稠性でムコイド状の大きなコロニーを形成します。腸内細菌科の中では最も大きく、正円、半円球状で光沢があり、著しく隆起したコロニーです。乳糖を分解するので、BTB 乳糖加寒天培地では

黄色のコロニー、マッコンキー寒天培地上ではピンク色のコロニーを形成します。

*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間 好気培養



・生化学的性状は

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、さらにガスを大量に産生。

シモンズのクエン酸塩培地

クエン酸利用能陽性

LIM 培地

リジン脱炭酸反応陽性、運動性なし

VP 半流動培地

VP 反応陽性

SIM 培地

インドール反応陰性

*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* の

生化学鑑別性状試験 35℃、24 時間培養



今回の資料問題の株は ESBL 産生菌です。ESBL は Class A 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(CTRX)、セフェピム(CFPM)などには高度耐性を示しますが、セフトジジム(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	<p><i>E.coli</i> ,<i>K.pneumoniae</i>, <i>K.oxytoca</i></p> <p>10µg CPDX ≤17mm あるいは</p> <p>30µg CAZ ≤22mm あるいは</p> <p>30µg AZT ≤27mm あるいは</p> <p>30µg CTX ≤27mm あるいは</p> <p>30µg CTRX ≤25mm</p> <p><i>P.mirabilis</i></p> <p>10µg CPDX ≤22mm あるいは</p> <p>30µg CAZ ≤22mm あるいは</p> <p>30µg CTX ≤27mm</p>
確認試験	<p>30µg CAZ と 30/10µg CAZ/CVA</p> <p>30µg CTX と 30/10µg CTX/CVA</p> <p>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。</p>

ESBL 産生菌確認試験（微量液体希釈法）

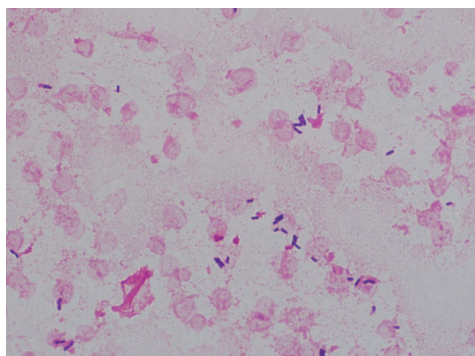
培地	カチオン加ミューラーヒントン培地
培養条件	35±2℃ 好気培養
培養時間	16～20 時間
スクリーニング基準	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> CPDX ≥8μg/mL あるいは CAZ ≥2μg/mL あるいは AZT ≥2μg/mL あるいは CTX ≥2μg/mL あるいは CTRX ≥2μg/mL <i>P. mirabilis</i> CPDX ≥2μg/mL あるいは CAZ ≥2μg/mL あるいは CTX ≥2μg/mL
確認試験	CAZ (0.25~128μg/mL) と CAZ/CVA (0.25/4~128/4μg/mL) 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。

く分布し、動物の主に糞便や乳から分離されます。ヒトに感染を起こすのは *Listeria* 属菌では本菌のみとされており、汚染された乳製品や生野菜を介して食中毒の原因となります。また細胞性免疫機能の低下した患者に敗血症や髄膜炎を生じることが一般的とされています。感染性心内膜炎を生じることもあります。妊婦の子宮内感染症は流産や死産の原因となります。

本菌の同定のポイントとしては次の点が上げられます。

- ・グラム陽性短桿菌（髄液や羊水でグラム陽性短桿菌が認められたら、本菌をまず疑う。）
- ・羊血液寒天培地上ではコロニー直下に弱いβ溶血を示す。
- ・CAMP テスト陽性
- ・BTB 乳糖加寒天培地に発育（*Streptococcus agalactiae* との鑑別）
- ・カタラーゼ活性陽性
- ・VP 反応陽性
- ・運動性陽性（SIM 培地などの半流動高層培地を用いて 25~30℃、48~72 時間培養すると、培地表面から数mm下層に雨傘状の発育が観察できる：umbrella motility）

培養液のグラム染色×1000



試料 42

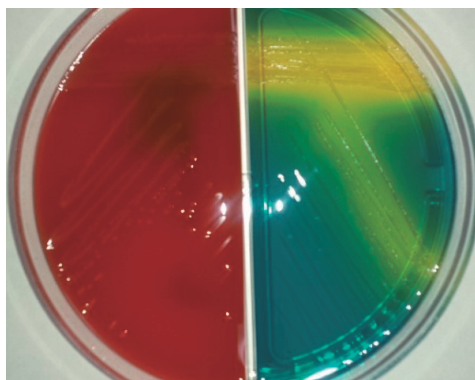
患者背景：80 歳女性。自宅で倒れているところを発見され、救急搬送された。来院時の採血データにて CRP 21.07 と高値であった。MRI と CT を実施したが、原因は特定されなかった。来院時に採取した血液培養が陽性となった。培養を行い、分離・同定した菌種をコード表より選択してください。

同定検査評価

評価	菌名	施設数	
		1次評価後	2次評価後
A	<i>Listeria monocytogenes</i>	24	26
B	<i>Listeria</i> sp.	2	2
C	<i>Corynebacterium</i> sp.	1	

*Listeria monocytogenes* は土壌などの自然界に広

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間 好気培養



VP 反応



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 1-1、1-2 は、ある消毒薬の写真です。

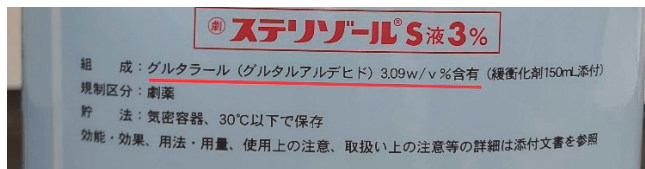
写真 1-1

消毒薬の全体像



写真 1-2

消毒薬の成分表記（拡大）



この消毒薬の写真 1-2 の赤線の成分ついて誤っている文章を下記選択肢より 1つ選んでください。

- ① 高水準消毒薬に属する。
- ② HB ウイルスに有効である。
- ③ 結核菌に有効である。
- ④ 医療器具の消毒に用いられる。
- ⑤ 手指の消毒に用いられる。

設問 1 回答評価

評価	選択肢	施設数
A	⑤ 手指の消毒に用いられる。	25

グルタラールはアルデヒド系の高水準消毒薬で、作用機序は微生物中のSH基、OH基、COOH基、NH基をアルキル化し、DNA、RNA、蛋白質合成に影響を与えます。

グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌、結核菌、芽胞、ウイルスに有効であり、HBV、HIVに対する有効性も確認されています。ただし、非定型抗酸菌の一部には抵抗性を示す株があり、長い接触時間が必要です。

セミクリティカル器具、特に軟性内視鏡の消毒に使用されています。また、歯科領域では、印象材の消毒に使用されています。金属、ゴム、プラスチックに対して腐食性がなく有機物による効力低下が小さいため、さまざまな用途において有用とされています。

グルタラール蒸気は眼、咽頭、鼻を刺激します。また、グルタラールの付着は皮膚炎を起こします。グルタラール取り扱い者では、蒸気吸入による結膜炎、鼻炎、喘息、付着による皮膚炎の副作用が報告されています。したがって、使用時は、蒸気なるべく拡散しないような容器を用い、換気を十分に行い、ゴム手袋、マスク、ゴーグル、防水エプロンを着用する必要があります。このように人体に対して非常に強い毒性があるため、手指等の消毒に用いることはできません。

Photo Survey 設問 2

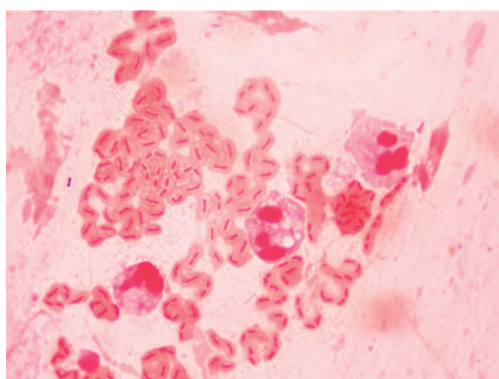
患者背景：80代女性。数十年前より続く咳、粘液性の痰を認めており、近医にて慢性気管支炎として治療を受けている。近年では労作時の息苦しさを自覚するようになった。2週間前より膿性鼻汁、膿性痰が出現し、市販の総合感冒薬を飲んで様子を見ていたが、徐々に痰の量が増加し、息苦しきの症状が強くなってきたため来院した。

検査所見：WBC 12,760 /  $\mu$ l (Neut85.4%)、CRP 1.94 mg/dl、尿中肺炎球菌抗原 (-)、マイコプラズマ抗体 (-)、動脈血 PaO<sub>2</sub> 70.0mmHg、PaCO<sub>2</sub>

65.2mmHg、胸部 CT にてびまん性の粒状影、気管支の拡張を認めた。膿性痰が採取され、微生物検査室に提出された。喀痰のグラム染色より、写真 2-1 のごとくグラム陰性桿菌が認められ、喀痰の培養では写真 2-2 のごとく菌が発育した。また本菌のチトクロムオキシダーゼ試験は陽性であった。

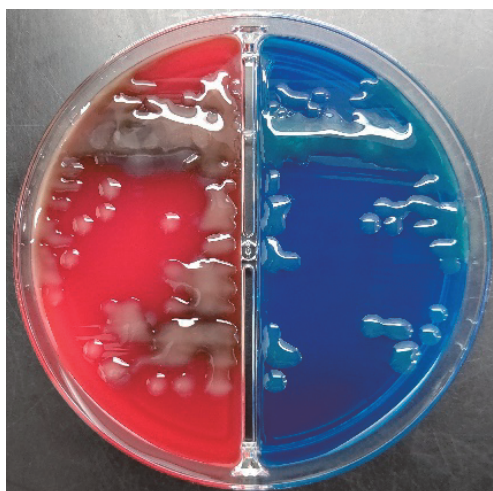
**写真 2-1**

喀痰のグラム染色×1000



**写真 2-2**

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間好気培養



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	選択肢	施設数
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25

*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。

ムコイド型の *P. aeruginosa* ではアルギン酸と呼ばれる粘性の高いムコ多糖体（粘物質）を産生し、菌体外に多く分泌します。そのためグラム染色では写真 2-1 のように菌体のまわりが薄くピンク色に染まります。また、寒天培地上で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。粘液膜に包まれた菌は抗菌薬や食食から守られた状態にあり、除菌が困難な一因となっています。

**Photo Survey 設問 3**

患者背景：70 代女性 主訴：下痢 既往歴：腓頭部癌（2 月に手術 20 日間後退院）、糖尿病  
現病歴：8 月中旬、早朝から悪心、下痢があり、全身倦怠感から夕方に救急外来を受診した。右前腕部に腫脹、右手関節から手背に掛けて著明な発赤、腫脹があった。下腿に発赤がみられた。

身体所見：体温 39℃、血圧 68/32mmHg、心拍数 120 回毎分、呼吸回数 28 回毎分、意識レベル JCS: II - 10~20. ショック状態であった。

検査所見：WBC 6890 / $\mu$ l、RBC 186 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml、Ht 19.9%、Hb 6.6g/dl、CRP 3.07mg/dl、TP 3.0g/dl、ALB1.1 g/dl、AST 94 IU/l、ALT 33 IU/l、BUN 8.8 mg/dl、CRE 1.16 mg/dl、Glu 41 mg/dl

血液培養ボトルのグラム染色より 3-1 のごとく、グラム陰性桿菌が認められ、培養液より、写真 3-2、3-3 のごとく菌の発育が認められた。本菌の生化学的性状、食塩加ペプトン水での発育は写真 3-5、3-6 のごとくであった。

**写真 3-1**

血液培養ボトルのグラム染色×1000

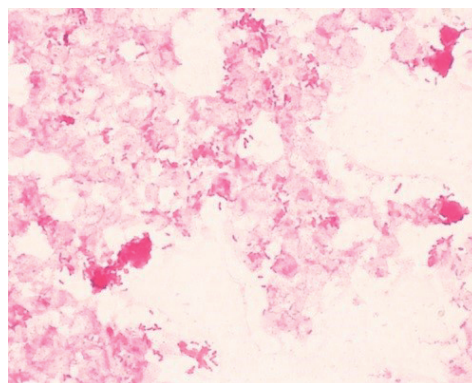


写真 3-2

5%ヒツジ血液寒天/BTB 乳糖加寒天 35℃、24 時間好気培養

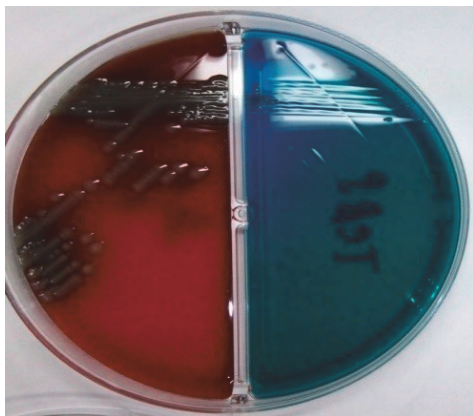


写真 3-3

TCBS 寒天培地 35℃ 24 日間培養

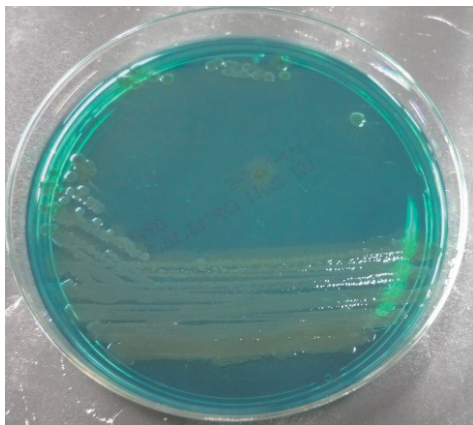


写真 3-4

発育したコロニーのグラム染色×1000

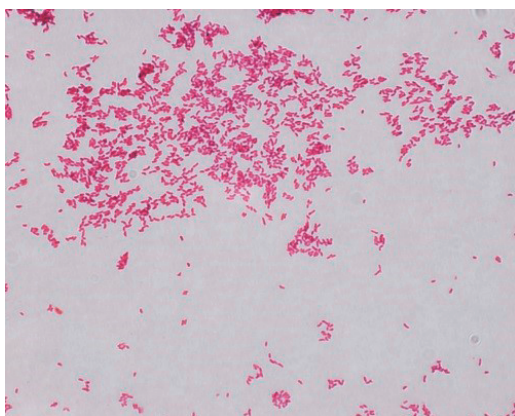


写真 3-5

生化学鑑別性状試験 35℃、24 時間培養

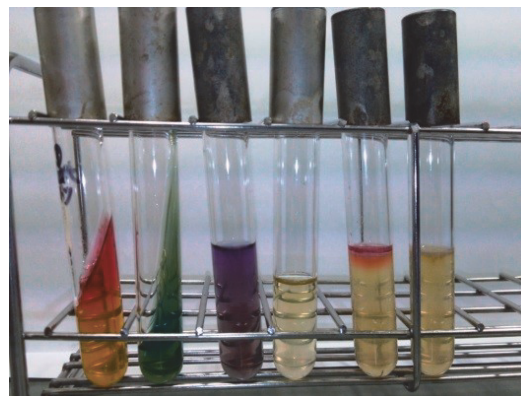


写真 3-6

食塩加ペプトン水での発育



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>Vibrio vulnificus</i>	25

*Vibrio vulnificus* は 2~3%の濃さの塩分を好み、海岸の近くの海水中や海水と淡水が混じりあうような場所に住んでいて、海水の水温が 15℃以上になると増えます。また、この菌は海水中や海の底に生きている魚や動物性のプランクトン、それに貝類、カニなどの節足動物に付着しています。

海産物の生食や創傷部位が海水に暴露されることでヒトに感染し、とくに肝硬変などの慢性疾患や糖尿病などの基礎疾患のある患者では、皮膚・軟部組織感染症や壊死性筋膜炎を引き起こします。血流感染症をとまなうことも多く、劇症型では壊死性筋膜炎から短時間でショックに至り、致死率が非常に高いとされています。まれに、健康人に軽度の下痢を



引き起こすことがあります。

*V. vulnificus* は湾曲した中等大のグラム陰性桿菌で、ヒツジ血液寒天培地に発育しますが、塩化ナトリウムを含まない BTB 乳糖加寒天培地には発育しません。TCBS 寒天培地には青緑色（培地色）のコロニーを形成しますが、まれに白糖を分解する株が存在するため、そういった株は黄色のコロニーを形成します。生化学的性状として、TSI 培地では高層は黄変、斜面は赤色、ガス産生は陰性で硫化水素は非産生です。インドール産生は陽性、リジン脱炭酸反応は陽性、運動性陽性です。NaCl 加ペプトン水には、3%のみに発育がみられ、とくに7%に発育がみられない点が、他の *Vibrio* 属菌との鑑別点になります。

**Photo Survey 設問 4**

患者背景：70代男性。3か月前から、右耳のべたつきを感じ、自分の声が聴きにくくなったことから耳鼻科を受診された。右鼓膜に黄色膿瘍の付着があり、発赤と軽度浮腫があった。提出された耳漏の培養から真菌が発育した。サブロー寒天培地に巨大集落を形成させたところ、写真4-1のごとく発育した。

写真 4-1

サブロー寒天培地 35℃、48時間培養

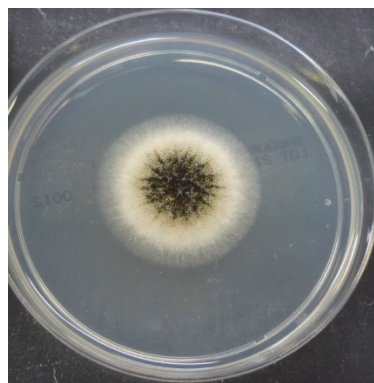
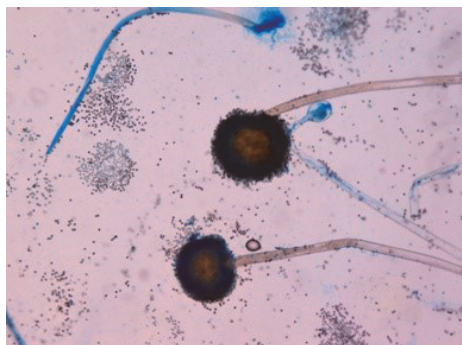


写真 4-2

ラクトフェノール・コットンブルー染色×100



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>Aspergillus niger</i>	25

*Aspergillus niger* は肺アスペルギルス症の原因菌として *Aspergillus* 属菌の中では2~3番目に多いとされ、また外耳道から分離されることが最も多く、耳真菌症の原因となります

サブロー寒天培地 35℃、2日間の培養で、表面が黒色、裏面が白色~クリーム色の巨大集落が発育は認められます。

*Aspergillus* 属は、下記の図に示すように、顕微鏡による各微細構造の形状、大きさが種の同定のための指標になっています。

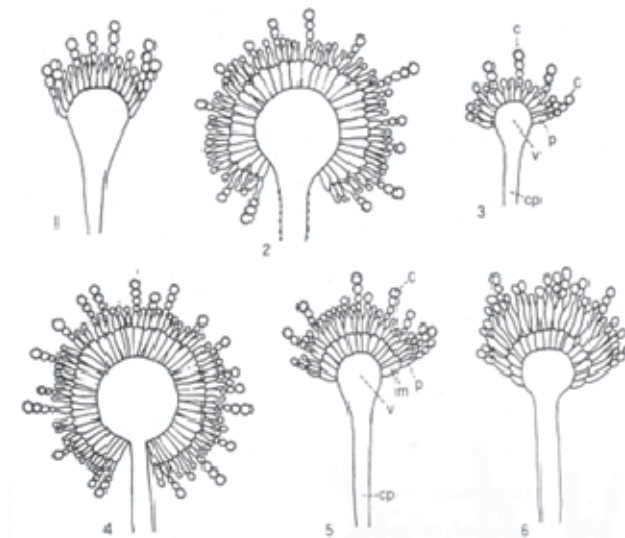


図. 病原性を示す *Aspergillus* の模式図

*Aspergillus niger* の形態的特徴は、菌糸は有隔性。分生子柄は長く (400~3000×12~17 μm)、表面は滑らかで先端に近くなると褐色がかかった色になる。頂囊の直径は 30~75 μm。フィアライドは、頂囊の全周を放射状に覆い、複列性であり、フィアライドの2倍の長さのメツラを伴っている。分生子は直径 3.5~4.5 μm で、表面が粗く暗色を呈する。以上の鑑別点から *Aspergillus niger* と推察されます。

**Photo Survey 設問 5**

患者背景：8歳、男児。顔面、腕の皮膚にかゆみ、痛みを伴う発赤、膿疱が認められ、近医を受診。翌日、膿疱の膿汁の培養から *Staphylococcus aureus* 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。本菌に対してオキサシリン (MPIPC) とセフォキシチン (CFX)

の薬剤感受性試験(ディスク法)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 D テストを実施したところ、結果は写真 5-2 のごとくであった。

表：抗菌薬感受性結果

抗菌薬 (略号)	MIC 値	カテゴリー	抗菌薬 (略号)	MIC 値	カテゴリー
PCG	>0.5	R	EM	>16	R
CEZ	≦4	S	CLDM	0.5	S
CMZ	≦4	S	MINO	≦0.5	S
IPM	≦1	S	VCM	≦0.5	S
GM	≦0.5	S	LVFX	0.25	S

写真 5-1

MPIPC と CFX の薬剤感受性試験 (ディスク法)

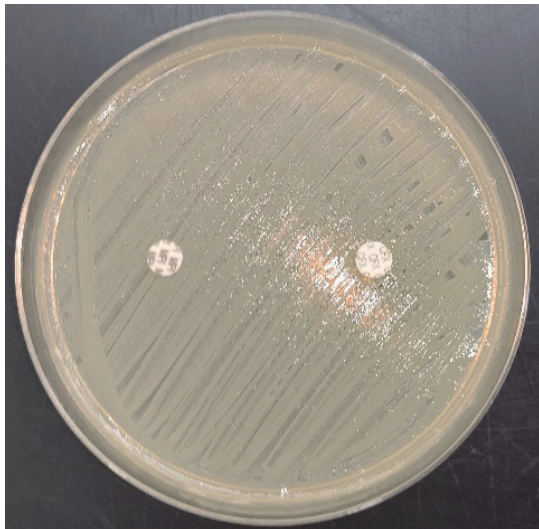
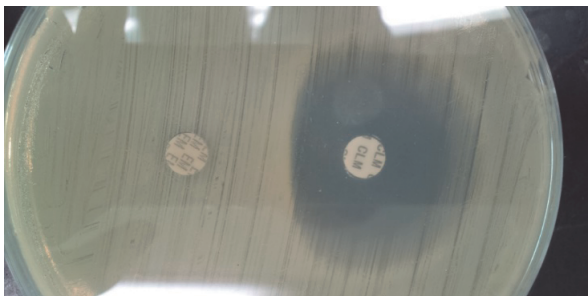


写真 5-2

D テスト



薬剤感受性結果より、Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)M100-30th Edition の基準を用いた場合、カテゴリーを感性 (S) から耐性 (R) に変換しなければならないものがい

くつあるか、下記選択肢より選択してください。

- ① なし
- ② 2つ
- ③ 3つ
- ④ 4つ
- ⑤ 5つ

設問 5 回答評価

評 価	菌 名	施設数
A	④ 4つ	25

MRSA の判定基準は以下の表の通りになります

培地	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ディスク拡散法 MHA</li> <li>・微量液体希釈法 CAMHB (MPIPC の検査には 2%NaCl を添加)</li> </ul>
培養条件	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ディスク拡散法 35±2℃、好気培養 16～18 時間 (ただし CFX は 24 時間) MPIPC は 35℃で 24 時間培養、判定は透過光にて行う。MRS 検出には 35℃をこえないようにする。</li> <li>・微量液体希釈法 35±2℃ 好気培養 16～20 時間 MPIPC と VCM は 24 時間培養 MRS の検出には 35℃をこえないようにする。</li> </ul>
判定基準	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ディスク拡散法 (mm) MPIPC : R:≦10 I:11～12 S:≧13 CFX : R:≦21 S:≧22 CFX の阻止円径が≦21mm を示す場合は MPIPC 耐性と報告</li> <li>・微量液体希釈法 (μg/ml) MPIPC : R ≧4 S ≦2 CFX : R ≧8 S ≦4 CFX の MIC が 8≧μg/ml を示す場合には MPIPC 耐性と報告</li> </ul>

写真 5-1 で MPIPC ディスクと CFX ディスクに阻止円全く認められないことから本菌が MRSA であることが分かります。メチシリン (オキサシリン) 耐性ブドウ球菌はセフトロリンを除くすべてのβラクタム系抗菌薬に耐性と報告されるべきであるとき

れ、たとえ MIC 値から感性和判定されても耐性と報告する必要があります。

また、写真 5-2 から CLDM の阻止円の EM 側が平坦になっています。このことは、CLDM が EM により耐性の性質が誘導されたことを示し、CLDM は耐性と報告します。

・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	
	1次評価後	2次評価後
設問 41 同定・感受性試験	100 %	100 %
設問 41 感受性試験(PIPC)	95.7%	100 %
設問 41 感受性試験(CTRX)	100 %	100 %
設問 41 感受性試験(MEPM)	100 %	100 %
設問 42 同定	95.7%	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、試料問題では問 41 の薬剤感受性結果において MIC 値は正しい結果が入力されていたのですが、カテゴリーの方が間違っていたために不正解となった施設がありました。

フォト設問においては、1 次評価ですべての設問において正解率が 100%でした。今回、フォト設問の写真が若干見にくいというご指摘をいただきました。写真につきましてはなるべく見やすい写真を提供するには心がけておりますが、見にくいと思

われる写真については設問の中で補足説明を入れていく必要があると感じました。

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 9 割、2 次評価ですべて正解となりました。今回、正しい結果が得られていたのに入力を間違えたために不正解となりましたものがありましたので、結果を入力する際には十分注意していただき、必ず見直しや W チェックをしていただくようお願いいたします。

文献

- 堀井俊伸ほか：微生物検査ナビ 栄研化学 2013
- 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
- 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
- Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition (M100-ED30) CLSI 2012
- 岡秀明：感染症プラチナマニュアル 2020 Grande メディカル・サイエンス・インターナショナル 2020
- 吉田製薬株式会社：V 各種消毒薬の特性 3 高水準消毒薬 1)アルデヒド系 (1)グルタラール Y's Square
- 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
- 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 第 2 版 有限会社シーニュ 2014
- 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
- 山口英世：病原真菌と真菌症 改訂 4 版 南山堂 2007
- 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

