

# 微 生 物

⑩微生物檢査

⑪微生物塗抹鏡檢

## ⑩微生物検査

### 【はじめに】

今年度の微生物検査は、腸管内常在菌であり、色素産生性を有するグラム陽性レンサ球菌、日常的に検出されるブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、検出が比較的稀で菌種の推定に注意が必要なグラム陰性球桿菌を同定の試料とした。また薬剤感受性検査では、結果から適切な追加試験を実施し、正確な判定がおこなえるかを確認する目的で出題した。

### 【試料】

試料 M1、M2、M3 は試料発送日に十分量が送付できるよう、前日に純培養を行い新鮮な菌株を送付試料として用意した。それぞれの菌種については各試料の解析文面を参照頂きたい。

### 【参加施設数】

微生物検査:51 施設(設問ごとに有効回答数は異なる)

### 【解析方法】

正解を評価 A, 許容正解を評価 B, 誤りを評価 C もしくは不正解と設定し、設問ごとに解析を実施した。

### 【評価基準、解析結果、まとめ】

各試料の解析文面を参照

## 試料 M1 同定 *Enterococcus casseliflavus* 【評価対象】

### 【評価基準・解析結果】

#### 1. 同定菌名

参加 51 施設における同定菌名の回答状況を表 1 に示した。*Enterococcus casseliflavus* の回答のみを評価 A とし、それ以外の回答を評価 C とした。51 施設(100%)全てが *E. casseliflavus* の回答であった。

#### 2. 同定機器/方法別の同定成績

同定機器/方法別の成績と用手法の内訳を表 2、3 に示した。自動分析装置での同定はマイクロスキャン Walk Away(ベックマン・コールター社)が 23 施設(45.1%)と最も多く、次いで、バイテック 2(ビオメリュー社)が 8 施設(15.7%)、BD フェニックス M50(日本 BD 社)とライサス S4(島津ダイアグノスティクス社)が各 3 施設(5.9%)。質量分析装置での同定はバイテック MS(ビオメリュー社)と MALDI バイオタイパー(Bruker 社)が各 5 施設(9.8%)、用手法が 4 施設(7.8%)であった。

### 【まとめ】

#### 1. 同定結果

今回使用した菌株は *E. casseliflavus*(臨床分離株)である。

*Enterococcus* 属は、短いレンサ状の形態を示す通性嫌気性グラム陽性球菌で、ヒトや動物の腸管内、泌尿生殖器粘膜の常在細菌叢を形成している。病原性が低いため健常者での感染症はまれであるが、免疫不全や慢性疾患の患者に対し、内因性感染としての尿路感染症、胆道感染症、菌血症などを引き起こす。

*E. casseliflavus* は、*E. faecalis* や *E. faecium* と比べ、臨床検体から分離される頻度は低いが、染色体性にバンコマイシン耐性遺伝子(*vanC*)を保有している点で、鑑別が重要となる菌種である。

微生物学的検査では、ヒツジ血液寒天培地上で  $\alpha$  溶血を示す集落を形成し、カタラーゼ試験陰性、PYR 試験陽性、運動性陽性、黄色色素産生性等の性状から *E. casseliflavus* と同定できる。

全施設が評価 A であり、極めて良好な結果であった。

#### 2. 同定方法、付加コメント

同定方法は、37 施設(72.5%)が各種自動分析装置、10 施設(19.6%)が質量分析装置、4 施設(7.8%)が用手法であり、いずれの方法でも正確に同定されていた。

また、付加コメントでは、半数以上の施設が起炎性の可能性を指摘していた。

本設問は同定結果のみを評価の対象としているが、無菌材料から分離された株や起因菌と判定された株の薬剤感受性試験で、バンコマイシンの MIC 値が  $16 \mu\text{g/mL}$  以上であれば、感染症法におけるバンコマイシン耐性腸球菌感染症(5 類感染症、全数把握)として届け出が必要なことにも留意する必要がある。

表 1 同定菌名の回答状況 (試料 M1)

評価	同定菌名	回答数	(%)	計(%)
A	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	51	100	51(100)
合計		51	100	51(100)

表 2 同定機器/方法別の回答状況(試料 M1)

評価	同定菌名	マイクロスキヤン Walk Away	バイテック 2	BD フェニックス M50	ライサス S4	MALDI バイオタイパー/sirius/sirius one	バイテック MS / PRIME	用手法	合計
A	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	23	8	3	3	5	5	4	51
合計		23	8	3	3	5	5	4	51
正解(評価 A)率(%)		100	100	100	100	100	100	100	51

表 3 用手法の内訳と回答状況(試料 M1)

評価	同定菌名	ラピッド ID32 ストレップアピ	その他の日水製薬製品	合計
A	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3	1	4
合計		3	1	4
正解(評価 A)率(%)		100	100	100

## 試料 M2 同定 *Pseudomonas aeruginosa* 【評価対象】

### 【評価基準・解析結果】

#### 1. 同定菌名

参加 51 施設における同定菌名の回答状況を表 4 に示した。*Pseudomonas aeruginosa* の回答のみを評価 A とし、それ以外の回答を評価 C とした。51 施設(100%)全てが *P. aeruginosa* の回答であった。

#### 2. 同定機器/方法別の同定成績

同定機器/方法別の成績と用手法の内訳を表 5 に示した。自動分析装置での同定はマイクロスキャン Walk Away(ベックマン・コールター社)が 26 施設(51.0%)と最も多く、次いでバイテック 2(バイオメリュー社)が 8 施設(15.7%)、BD フェニックス M50(日本 BD 社)とライサス S4(島津ダイアグノスティクス社)が各 3 施設。質量分析装置での同定は 9 施設(17.6%)で、うちバイテック MS(バイオメリュー社)が 5 施設(9.8%)、MALDI バイオタイパー(Bruker 社)が 4 施設(7.8%)。用手法が 2 施設(3.9%)であった(表 5)。菌種名としてはすべての機器、方法で *P. aeruginosa* と同定されていた。

### 【まとめ】

#### 1. 同定結果

今回使用した菌株は *P. aeruginosa*(臨床分離株)である。

*P. aeruginosa* は、偏性好気性のグラム陰性桿菌であり、易感染性患者や慢性消耗性疾患の患者に高い病原性を示す。さらに、環境中の様々な場所で生息することができるため、院内感染における重要な原因菌として知られている。

グラム染色では腸内細菌目細菌に比べてやや先細りで、オキシダーゼ陽性、緑色で金属光沢のあるコロニー、アセトアミド分解などの特徴がある。51 施設すべてが A 評価であり、極めて良好な結果であった。

#### 2. 同定方法、附加コメント

同定については質量分析装置および各種分析装置などの自動同定機器が用いられており、用手法による同定はわずかであった。自動同定機器を用いた施設においても、多くの施設でグラム染色、オキシダーゼ試験を実施し、機器の同定のみではなく、結果の裏付けが適切に行われており、同定手順に問題は認められなかった。

緑膿菌は人工呼吸器関連肺炎(VAP)の起因菌として代表的な菌であり、VAP を疑う場合、そのほかに MRSA、*Acinetobacter baumannii* および *Stenotrophomonas maltophilia* なども想定される。今回、半数以上の 32 施設が「起因菌の可能性はある」または「起炎菌の可能性がきわめて高いと考えられる」とコメントしており、その判断も適切であった。

表 4 同定菌名の回答状況(試料 M2)

評価	同定菌名	回答数	(%)	計(%)
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51	100	51(100)
合計		51	100	51(100)

表 5 同定機器/方法別の回答状況(試料 M2)

評価	同定菌名	マイクロスキヤン Walk Away	バイテック 2	BD フェニックス M50	ライサス S4	バイテック MS/PRIME	MALDI バイオタイパー/sirius/sirius one	手法	合計
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	8	3	3	5	4	2	51
合計		26	8	3	3	5	4	2	51
正解(評価 A)率(%)		100	100	100	100	100	100	100	100

## 試料 M2 薬剤感受性検査 *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) 【評価対象】

### 【評価基準・解析結果】

#### 1. 回答状況

薬剤感受性検査サーベイ参加 50 施設について、抗菌薬回答状況を指定抗菌薬別、方法別に表 6 に示した。Ceftazidime (CAZ) は 50 施設、Meropenem (MEPM)、Amikacin (AMK)、Ciprofloxacin (CPFX) は 49 施設の回答となった。

#### 2. 検査方法

感受性検査機器、方法別に参加 50 施設の回答状況を表 7 に示した。内訳はマイクロスキャン Walk Away (ベックマン・コールター社) が 28 施設 (56%) で最も多く、次いでバイテック 2 (ビオメリュー社) が 10 施設 (20%)、フェニックス M50 (日本 BD 社) が 5 施設 (10%)、ライサス S4 (島津ダイアグノスティクス社) が 3 施設 (6%)、用手法 (CLSI ディスク法) が 2 施設 (4%)、IA20 MIC Pro (栄研化学) が 1 施設 (2%)、DPS192iX (栄研化学) が 1 施設 (2%) であった。

#### 3. 感受性成績

参加 50 施設の感受性結果状況について、微量液体希釈法および CLSI ディスク法の結果を表 8、表 9 に示した。

今回使用した菌株は、臨床材料から分離されたカルバペネマーゼ非産生の *P. aeruginosa* (MDRP) であった。この菌株について正確に感受性結果およびカテゴリー判定を行えるかを確認するために実施した。

微量液体希釈法、CLSI ディスク法での薬剤感受性のカテゴリー判定は、CAZ、MEPM、CPFX すべてが R (耐性) であり、これらの回答を評価 A とし、それ以外の回答を評価 C とした。これら 3 薬剤の正解率は微量液体希釈法、CLSI ディスク法ともにすべて 100% であり、極めて良好な成績であった。

また AMK は、R (耐性) と回答した施設が 32 施設 (65.3%)、S (感性) と回答した施設が 17 施設 (34.7%) であった。今回使用した菌株においては、正解と異なる結果を示す株が存在する可能性が認められたため、評価対象外とした。

### 【まとめ】

*P. aeruginosa* は淡水、海水、土壌など生活環境中に広く常在し、健常者には通常、病原性を示さない弱毒菌の一つである。染色体上に Class C  $\beta$  ラクタマーゼ (AmpC 型セファロスポリナーゼ) を保有するためペニシリン系抗菌薬や第一世代セファロスポリン系抗菌薬に自然耐性を示し、テトラサイクリン系やマクロライド系抗菌薬にも耐性を示す傾向が強く、術後患者など易感染性宿主の日和見感染症や人工呼吸器関連肺炎 (VAP) の原因菌となっている。

薬剤感受性検査の結果、カルバペネム系薬、アミノ配糖体、フルオロキノロン系薬の 3 系統の抗菌薬に耐性を獲得した株を「多剤耐性緑膿菌 (MDRP)」とし、感染症法では Imipenem (IPM) の MIC 値  $16 \mu\text{g/mL}$  以上 (阻止円径 13mm 以下)、AMK の MIC 値  $32 \mu\text{g/mL}$  以上 (阻止円径 14mm 以下)、CPFX の MIC 値  $4 \mu\text{g/mL}$  以上 (阻止円径 15mm 以下) の条件を満たす場合に、薬剤耐性緑膿菌感染症として五類定点把握の対象疾患となっている。基幹定点医療機関に該当する施設は保健所に届出が必要であり、これらに関してコメントを

回答している施設も認められた。入院患者から MDRP が検出された場合は、感染対策として標準予防策に加えて接触感染予防策を講じる必要があることも留意する必要がある。

本邦で分離される MDRP の多くはカルバペネマーゼを産生することが知られており、カルバペネマーゼ産生菌は耐性遺伝子をプラスミド上に持つことが多いため、感染対策上極めて重要である。カルバペネム系薬に非感受性を示した際には、カルバペネマーゼ産生を疑い追加試験を実施することが望ましい。今回、42 施設(84%)がカルバペネマーゼ産生の有無を確認するための追加試験を実施していた(表 10)。メタロ-β-ラクタマーゼ検出法としてメルカプト(チオール)化合物(SMA)による酵素阻害試験を実施している施設が最も多く、各種 CIM 法や CARBA 5 のようなカルバペネマーゼ迅速検出キットを実施している施設もあり、半数近くの施設で複数の検出方法を組み合わせて実施していた。

カルバペネマーゼ産生の確認には多くの検出方法が存在するが、いずれの方法も偽陰性や偽陽性を示すことがあるため、各検出方法の特性を理解し、複数の検出方法を組み合わせて実施することが望ましい。今回、追加試験や耐性菌検出に関する回答がなかった、あるいは実施していない施設が 8 施設みられたが、これらの施設では運用方法を再度確認していただきたい。

また、1 施設でメタロ-β-ラクタマーゼ検出法の他にニトロセフィン法を実施していた。ニトロセフィン法はβ-ラクタマーゼ検査に用いられているが、*P. aeruginosa* は染色体性に AmpC を有しているため基本的にニトロセフィン法は陽性になり、本法の対象菌種ではない。当該施設は *P. aeruginosa* のカルバペネマーゼ検出方法について再度確認していただきたい。

今回の出題菌株は本来 AMK 耐性の MDRP 株であったが、19 施設(38.8%)で同一菌種だが異なる集落性状を示す複数の株が認められており、これらが AMK 耐性株と AMK 感性株であった。また、17 施設(34.7%)では AMK 感性株のみが発育していた。出題菌株は、AMK 耐性を確認した株を純培養し配布用の輸送スワブに塗布、各施設に配送した。しかしながら、本菌株は継代を繰り返すことで AMK 耐性株の中に AMK 感性株の集落が発育してくることが確認されており、さらに輸送スワブでの配送による環境の変化によって AMK の感受性が一層進んだ可能性がある。耐性因子の発現量の違いにより AMK の感受性結果が異なる株が存在したと推測されるが、明確な原因は究明できていない。

表 6 指定抗菌薬別・方法別の回答状況(試料 M2)

検査方法	抗菌薬別回答数(%)			
	CAZ	MEPM	AMK	CPFX
微量液体希釈法	48(96)	48(98)	48(98)	48(98)
CLSI ディスク法	2(4)	1(2)	1(2)	1(2)
合計	50(100)	49(100)	49(100)	49(100)



表 7 方法別/感受性検査機器等の回答状況

検査方法	測定機器	回答数		%
微量液体希釈法	マイクロスキャン Walk Away	28	28	56
	バイテック 2, バイテック 2 XL	2	10	20
	バイテック 2 ブルー	5		
	バイテック 2 コンパクト	3		
	フェニックス M50	5	5	10
	ライサス S4	3	3	6
	IA20 MIC Pro	1	1	2
	DPS192iX	1	1	2
CLSI ディスク法	KB ディスク	2	2	4
合計		50		100

表 8 微量液体希釈法(試料 M2)

測定薬 剤	MIC 符号	MIC 値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	判定	機器名称	回答数 (%)	評価
CAZ	>	64	R	バイテック 2 IA20 MIC Pro	2(4.2)	A
	$\geq$	64	R	バイテック 2	9(18.8)	
	>	32	R	Walk Away DPS192iX	3(6.3)	
	>	16	R	Walk Away フェニックス ライサス	34(70.8)	
合計					48(100)	
MEPM	>	16	R	バイテック DPS192iX	2(4.2)	A
	$\geq$	16	R	バイテック	9(18.8)	
	>	8	R	Walk Away フェニックス ライサス IA20 MIC Pro	37(77.1)	
合計					48(100)	
AMK	>	64	R	バイテック	1(2.1)	評価外
	$\geq$	64	R	バイテック	4(8.3)	
	>	32	R	Walk Away	26(54.2)	

				フェニックス ライサス IA20 MIC Pro DPS192iX		
	=	8	S	WalkAway バイテック	2(4.2)	
	≤	8	S	Walk Away ライサス	8(16.7)	
	=	4	S	バイテック	4(8.3)	
	≤	3	S	フェニックス	3(6.3)	
合計					48(100)	
CPFX	>	4	R	WalkAway バイテック フェニックス	8(16.7)	A
	≥	4	R	バイテック	9(18.8)	
	>	2	R	Walk Away フェニックス ライサス IA20 MIC Pro DPS192iX	31(64.6)	
合計					48(100)	

表 9 ディスク拡散法(試料 M2)

測定薬剤	阻止円径 (mm)	判定	ディスク拡散法: CLSI 標準法	回答数(%)	評価
CAZ	6	R	栄研	2(100)	A
合計				2(100)	
MEPM	6	R	栄研	1(100)	A
合計				1(100)	
AMK	6	R	栄研	1(100)	評価外
合計				1(100)	
CPFX	6	R	栄研	1(100)	A
合計				1(100)	

表 10 附加試験(試料 M2)

附加試験	施設数
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験のみ	16
mCIM のみ	6
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、mCIM	6
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、CIM Tris	2
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、CIM Tris、その他の遺伝学的検査	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、CIM Tris、CARBA5	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、EDTA による酵素阻害試験	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、改良 Hodge test	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、クラブラン酸添加による $\beta$ -ラクタム薬の感受性(ダブルディスク法)、ディスク法(TEM、FRPM)、mCIM、imCIM	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、クラブラン酸添加による $\beta$ -ラクタム薬の感受性(ダブルディスク法)、ボロン酸による酵素阻害試験	1
メルカプト(チオール)化合物による酵素阻害試験、 $\beta$ -ラクタマーゼ試験(ニトロセフィン法)、改良 Hodge test	1
mCIM、EDTA による酵素阻害試験	1
mCIM、SMA-CIM	1
mCIM、CARBA5、Carba-R(Gene Xpert)	1
mCIM、ダブルディスク法(CAZ、IPM、MEPM、DRPM)	1
CARBA 5 のみ	1
実施せず/記載なし	8

## 試料 M3 同定 *Moraxella osloensis* 【教育問題】【評価対象外】

### 【評価基準・解析結果】

#### 1. 同定菌名

参加 51 施設における同定菌名の回答状況を表 11 に示した。*Moraxella osloensis*、*Moraxella* sp.の回答を正解とし、それ以外の回答は不正解とした。回答の内訳は、*Moraxella* sp.が 21 施設(41.2%)、*Moraxella osloensis* が 15 施設(29.4%)、*Acinetobacter lwoffii* が 4 施設(7.8%)、*Bordetella bronchiseptica* が 2 施設(3.9%)、*Moraxella catarrhalis* が 2 施設(3.9%)、*Acinetobacter* sp.が 1 施設(2.0%)、*Bordetella holmesii* が 1 施設(2.0%)、*Bordetella* sp.が 1 施設(2.0%)、*Kingella* sp. が 1 施設(2.0%)、*Pseudomonas* sp. が 1 施設(2.0%)、回答不能が 2 施設(3.9%)であった。

#### 2. 同定機器/方法別の同定成績

同定機器/方法別の成績を表 12、用手法の内訳を表 13 に示した。用手法が 26 施設(51%)と最も多く、MALDI バイオタイパー(Bruker 社)が 6 施設(11.8%)、バイテック MS(バイオメリュ社)が 5 施設(9.8%)、マイクロスキューン Walk Away(ベックマン・コールター社)が 5 施設(9.8%)、バイテック 2(バイオメリュ社)が 7 施設(13.7%)、BD フェニックス M50(日本 BD 社)が 1 施設(2.0%)、ライサス S4(島津ダイアグノスティクス社)が 1 施設(2.0%)であった。

### 【まとめ】

#### 1. 同定結果

今回使用した菌株は *Moraxella osloensis*(臨床分離株)である。

*M. osloensis* は非運動性、ブドウ糖非発酵の好気性グラム陰性球桿菌である。口腔内などの上気道の常在菌として知られているが、免疫不全患者の日和見感染の原因菌として、敗血症、髄膜炎、骨髄炎、感染性心内膜炎などを引き起こすことが報告されている。また、免疫低下を伴わない小児においても、まれに感染症を引き起こすことがある。

本菌はグラム染色でグラム陰性球桿菌として観察されるが、不定形に観察されることもある。血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BTB 寒天培地に発育し、35℃、24 時間好気培養にて非溶血の白色スムーズ型コロニーを形成する。本菌の性状の特徴として、オキシダーゼ試験陽性、カタラーゼ試験陽性、酢酸アルカリ化試験陽性が挙げられる。酢酸アルカリ化試験は、本来大腸菌と赤痢菌の鑑別に用いられるが、*Moraxella* 属において陽性を示す菌種は少ないため本菌の同定には有用な性状試験である。*M. catarrhalis* と回答があった 2 施設については、*M. catarrhalis* はグラム染色像が異なることと hockey puck test が陽性であることから本菌との鑑別ができることを確認していただきたい。

51 施設中、36 施設(70.6%)が正解であった。本菌の菌種同定には 16S rRNA 遺伝子配列解析、MALDI バイオタイパーが有用であるが、患者背景、グラム染色像、生化学的性状などを理解しておくことで属レベルでの同定は可能である。

## 2) 同定方法、付加コメント

同定方法は、26 施設(51%)が用手法、14 施設(27.5%)がマイクロスキャン Walk Away などの各種自動分析装置、11 施設(21.6%)がバイテック MS、MALDI バイオタイパーといった質量分析装置で実施されていた。用手法では同定キットの ID テスト HN-20 ラピッド(島津ダイアグノスティクス社)が 17 施設(65.4%)と最も多く、アピ NH (バイオメリュー社)が 3 施設(11.5%)、BD BBL CRYSTAL E/NF 同定検査試薬(日本 BD 社)が 1 施設(3.8%)、ID テスト NF-18(島津ダイアグノスティクス社)が 1 施設(3.8%)、その他の日水製薬(島津ダイアグノスティクス社)製品が 1 施設(3.8%)、グラム染色像やオキシダーゼ試験などの従来法での同定が 3 施設(11.5%)であった。

各種自動分析装置で同定している施設での不正解が多くみられた。本菌は患者背景、グラム染色像、コロニー性状、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験より属レベルでの菌名推定は可能であるため、各種自動分析装置の同定結果とグラム染色像やオキシダーゼ試験など、従来法での結果が一致しない場合は同定手順を再度確認していただきたい。

表 11 同定菌名の回答状況 (試料 M3)

評価	同定菌名	回答数	(%)	計(%)
正解	<i>Moraxella</i> sp.	21	41.2	21(41.2)
	<i>Moraxella osloensis</i>	15	29.4	15(29.4)
不正解	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	7.8	4(7.8)
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	3.9	2(3.9)
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	3.9	2(3.9)
	<i>Acinetobacter</i> sp.	1	2.0	1(2.0)
	<i>Bordetella holmesii</i>	1	2.0	1(2.0)
	<i>Bordetella</i> sp.	1	2.0	1(2.0)
	<i>Kingella</i> sp.	1	2.0	1(2.0)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2.0	1(2.0)
	回答不能	2	3.9	2(3.9)
合計		51	100	51

表 12 同定機器/方法別の回答状況（試料 M3）

評価	同定菌名	MALDI バイオタイパー/sirius/sirius one	バイテック MS / PRIME	マイクロスキヤン Walk Away 96, 96Si, 96Plus, 40, 40Si, 40Plus, DxM 1040, DxM 1096	バイテック 2 ブルー	バイテック 2 コンパクト	バイテック 2, 2 XL	BD フェニックス M50	ライサス S4	用手法	合計
正解	<i>Moraxella</i> sp.			1				1		19	21
	<i>M. osloensis</i>	6	5							4	15
不正解	<i>A. Iwoffii</i>				2	1	1				4
	<i>B. bronchiseptica</i>			1	1						2
	<i>M. catarrhalis</i>					1				1	2
	<i>Acinetobacter</i> sp.								1		1
	<i>B. holmesii</i>			1							1
	<i>Bordetella</i> sp.					1					1
	<i>Kingella</i> sp.									1	1
	<i>Pseudomonas</i> sp.									1	1
	回答不能			2							2
合計		6	5	5	3	3	1	1	1	26	51
正解率(%)		100	100	20	0	0	0	100	0	88.5	70.6

表 13 用手法の内訳と回答状況(試料 M3)

評価	同定菌名	同定キット ID テスト HN-20 ラピッド	アピ NH	BD BBL CRYSTAL E/NF 同定検査試薬	同定キット ID テスト NF-18	その他の日水製薬製品	その他	合計
正解	<i>Moraxella</i> sp.	14	2	1		1	1	19
	<i>M. osloensis</i>	3					1	4
不正解	<i>Kingella</i> sp.						1	1
	<i>M. catarrhalis</i>		1					1
	<i>Pseudomonas</i> sp.				1			1
合計		17	3	1	1	1	3	26
正解率(%)		100	66.7	100	0	100	66.7	88.5

## ⑪微生物塗抹鏡検(フォトサーベイ)

### 【はじめに】

フォトサーベイでは、患者背景に加え微生物検査の各種染色所見、選択分離培地および確認培地など各種培地の発育状況、また設問中の生化学性状などから菌種を推定する、これまで同様の典型的な形式での出題となった。腸内細菌目細菌に属し、特徴のひとつに硫化水素産生性を有する、通性嫌気性グラム陰性桿菌、性感染症の代表的な菌といえるグラム陰性双球菌、深部皮膚真菌症の原因菌である真菌を設問とした。

### 【資料】

設問 1、2、3 について菌種同定のポイントとなる、設問での患者背景に加え、染色所見、培地の発育状況および確認試験による生化学性状などを資料として提示した。それぞれの菌種については各設問の解析文面を参照頂きたい。

### 【参加施設数】

フォトサーベイ:57 施設

### 【解析方法】

正解を評価 A, 許容正解を評価 B, 誤りを評価 C もしくは不正解と設定し、設問ごとに解析を実施した。

### 【評価基準、解析結果、まとめ】

各設問の解析文面を参照



## 設問1: *Edwardsiella tarda* 【評価対象】

### 【評価基準・解析結果】

推定微生物の回答成績を表1に示した。*Edwardsiella tarda* を評価 A とし、*Edwardsiella* sp.を評価 B、それ以外を評価 C とした。

本設問へ回答した 57 施設中、55 施設(96.6%)が *Edwardsiella tarda* と回答し、良好な成績であった。*Salmonella* sp.と回答した施設は *E. tarda* の生化学的性状を再度確認していただきたい。

表1 推定微生物名の回答

評価	同定菌名	回答数	(%)	計(%)
A	<i>Edwardsiella tarda</i>	55	96.6	55(96.6)
B	<i>Edwardsiella</i> sp.	1	1.7	1(1.7)
C	<i>Salmonella</i> sp.	1	1.7	1(1.7)
合計		57	100	57(100)

### 【まとめ】

設問1は、80 歳代男性の胆管炎の症例であった。検体材料は胆汁で硫化水素産生の腸内細菌目細菌を疑うコロニーの発育を認めた。試験管培地の判定結果から TSI 培地は(－)／(＋)、硫化水素(＋)、IPA(－)、インドール(＋)、VP(－)、リジン(＋)、シモンズクエン酸(－)の生化学的性状が確認でき、*Edwardsiella tarda* と推定できる。

本菌は主に水系環境に生育する腸内細菌目細菌に属するグラム陰性桿菌であり、ヒトへの感染症として腸管感染症、胆嚢炎、胆管炎、肝膿瘍、蜂窩織炎、壊死性筋膜炎等が報告されている。本菌の特徴の一つとして硫化水素産生があげられ、同様の特性を持つ腸内細菌目細菌には *Proteus* sp.や *Citrobacter freundii*、*Salmonella* sp.等があるが、IPA、インドール、リジン、シモンズクエン酸の生化学的性状の違いで鑑別が可能である。

## 設問 2: *Neisseria gonorrhoeae* 【評価対象】

### 【評価基準・解析結果】

推定微生物名の回答成績を表 2 に示した。*Neisseria gonorrhoeae* を評価 A とし、それ以外を評価 C とした。  
本設問へ回答した総施設は 57 施設であり、全施設が正しく回答し、きわめて良好な成績であった。

表 2 推定微生物名の回答

評価	推定微生物名	回答数	(%)	計(%)
A	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	57	100	57(100)
合計		57	100	57(100)

### 【まとめ】

設問 2 は 20 歳代男性の尿道炎の症例であった。

検体は膿性の尿道分泌物で、グラム染色にて白血球に貪食されたグラム陰性の双球菌が観察された。35℃、48 時間の炭酸ガス培養にてチョコレート寒天培地及びサイアー・マーチン寒天培地にコロニーの発育を認め、カタラーゼ、オキシダーゼ試験共に陽性を示し、糖の分解試験ではグルコースのみ分解であることから、*N. gonorrhoeae* が推定される。

本菌は、性行為により感染し、尿道炎、前立腺炎、子宮頸管炎、子宮内膜炎を引き起こす。ときには心内膜炎、関節炎などの生殖器以外の感染も引き起こすことがある。尿道分泌物のグラム染色で白血球に貪食されたグラム陰性双球菌が多数認められた場合は、本菌の可能性を臨床に伝えることが重要である。

### 設問 3: *Sporothrix schenckii* 【評価対象】

#### 【評価基準・解析結果】

推定微生物名の回答成績を表 3 に示した。*Sporothrix schenckii*、*Sporothrix* sp.を評価 A とし、それ以外を評価 C とした。

本設問へ回答した 57 施設中、56 施設 (98.2%) が *Sporothrix schenckii*、1 施設 (1.8%) が *Sporothrix* sp.と回答し、極めて良好な成績であった。

表 3 推定微生物名の回答

評価	推定微生物名	回答数	(%)	計 (%)
A	<i>Sporothrix schenckii</i>	56	98.2	56 (98.2)
	<i>Sporothrix</i> sp.	1	1.8	1 (1.8)
合計		57	100	57 (100)

#### 【まとめ】

設問 3 は、70 歳代の皮膚糸状菌症の症例であった。

提出された皮膚生検組織を、サブローデキストロース寒天培地を用いて 25℃、12 日間培養したところ、湿潤性で皺のあるベルベット状の集落を形成した。スライドカルチャーでは、菌糸はきわめて細く、分岐性で直角に伸びた先細りの分生子柄が認められた。先端には小菌突起があり、ロゼット状の集簇を形成していることから *Sporothrix schenckii* と推定される。

*S. schenckii* はスポロトリコーシスと呼ばれる深部皮膚真菌症の原因菌である。土壌や木材などに生息しており、菌は外傷などを介し皮膚から浸入し、2～8 週間の潜伏期を経て発症する。病型は主に皮膚固定型と皮膚リンパ管型があり、前者は感染局所に肉芽腫性病変を生じ、後者はリンパ行性に点々と転移病変を形成する。小児と中高年に多く、成人では特に自然界との接触機会が多い農業・園芸業従事者に好発する。

本菌は温度依存性二形成真菌であり、発育速度は速く、4 日以内に成熟する。

25～30℃では最初小さく白色のコロニーを形成し、その後湿潤性の褐色・黒色で皺のあるベルベット状・なめし革状のコロニーとなる。分離株によっては、最初から黒色のものもみられる。

35～37℃では、クリーム色・黄褐色で平滑なコロニーを形成する。酵母形から菌糸形への転換は容易であるが、菌糸形から酵母形への転換は起こりにくい。分離直後は比較的容易に転換しやすく、ブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地による数回の継代培養を行うことで転換が起こりやすいとされる。顕微鏡所見は 25～30℃培養では、隔壁のある繊細な菌糸 (直径 1～2 μm) で、分散性に分岐し、数本の束になっている。楕円形・卵円形または洋梨形でほぼ透明な分生子 (2～3×3～6 μm) を形成する。分生子は、菌糸から直角に伸びた先細りの細い分生子柄の先端に小菌突起があり、そこでロゼット状の集簇を形成するか、直接菌糸側壁から生じる。

35～37℃では、種々の大きさ (1～3×3～10 μm) で円形・卵円形または紡錘状の出芽細胞がみられる。

## 【総評】

今年度の精度管理調査では、同定検査の試料 M1、M2 および試料 M2 の薬剤感受性検査で評価対象とした 3 薬剤において、全ての施設が正しい回答であった。教育問題の試料 M3 については 70%を超える正解率であった。フォトサーベイに関しても多くの施設が各設問の意図を理解し、正しい回答を導き出すことができており、同定検査、薬剤感受性検査、フォトサーベイ全てにおいて概ね良好な結果であった。

薬剤感受性検査に関しては、前述の解析にもあるように、*P. aeruginosa* の異なる集落性状を示す株が複数認められ、それらが AMK 耐性株と感受性株であった。今回、複数の菌株が発育したことにより、結果判定に苦慮されたご施設もあったかと思われる。図らずも、このような菌株を送付する結果となってしまう、この場をお借りして謝罪させていただきたい。今回の事象は、我々、出題者側にとっても不本意なことであり、未だ明確な原因は解っていないが、可能な限り原因究明していきたいと考えている。

教育問題の *M. osloensis* に関しては、兵庫県下の施設で、属または種レベルで、菌名をどこまで正しく報告できているかを確認する目的で出題させていただいた。上記の解析結果から約 7 割の施設が正しく報告できていることが明らかになった。本菌の菌種確定には、遺伝子配列解析や質量分析装置での測定が有用とされているが、これらの検査体制が整っている施設は少なく、多くの施設で本菌を検出可能な各種同定キット使用して同定を実施していた。同定キットを保有している施設では、属レベルまでの同定が可能となる。また、前述の装置や同定キットを持たず *Moraxella* sp.を同定するすべのない施設も少なからず存在すると思われるが、患者背景、グラム染所見、培地の発育状況などから属レベルでの菌種の推定は可能であると考え、検出頻度の少ない比較的稀な菌ではあるが、日頃から念頭に置いて検査を実施することが重要であると思われる。

同定検査、感受性検査およびフォトサーベイのいずれかで評価 B、評価 C、および不正解となった施設においては、正確な菌種同定および薬剤感受性結果を評価し判定できる検査体制の構築を目指していただきたい。

文責：姫路赤十字病院 大石 博一

## 微生物検査 【 M4 】フォトサーベイ

### 【設問 1】



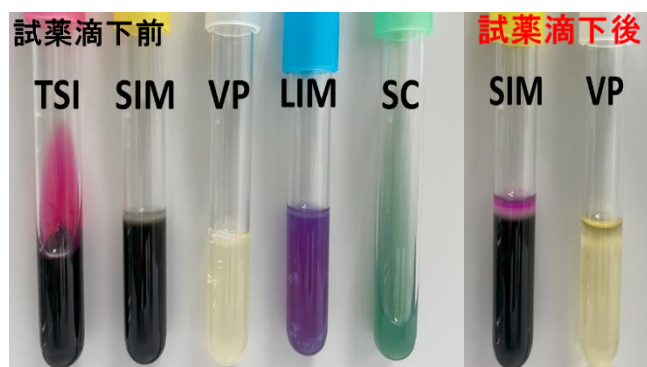
(フォト1-A ヒツジ血液寒天培地)

### 【設問 1】



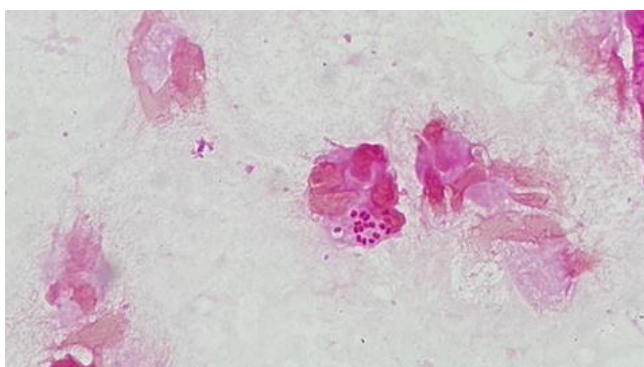
(フォト1-B DHL 寒天培地)

### 【設問 1】



(フォト1-C 試験管培地)

### 【設問 2】



(フォト2-A グラム染色 ×1,000)

### 【設問 2】



(フォト2-B サイアー・マーチン寒天培地)

【設問 3】



(フォト3-A SDA 25℃ 14日培養)

【設問 3】



(フォト3-B スライドカルチャー ×400)