

微生物

I.目的

尿路感染症は日常の検査の中でも遭遇頻度が高く、2018年1月～12月宮城県JANIS検査部門の集計では、入院患者検体のうち尿検体が約13%と報告されている。尿路感染症の原因菌の種類は決して多く無いが、菌種によって感受性が異なる微生物も多く、適切な抗菌薬の選択のためには原因菌の正しい同定・感受性検査が必須である。

そこで本年度は、尿路感染症の原因菌の同定検査、薬剤感受性検査およびフォトサーベイを実施し、微生物検査の精度を評価した。

II.参加施設数

申し込み施設数	解答施設数	回収率 (%)
33	33	100%

解答施設中5施設は一部の項目のみ参加

III.精度管理対象項目および試料

【項目】

微生物1：尿路感染症の原因菌同定検査

微生物2：尿路感染症の原因菌同定および薬剤感受性検査

フォトサーベイ 設問1：尿路感染症の原因菌推定

フォトサーベイ 設問2：尿路感染症の原因菌推定

【送付試料】

シードスワブに培養保存した検体2本・・・「微生物1、微生物2」

フォトサーベイ・・・「フォトサーベイ 設問1、フォトサーベイ 設問2」

【実施方法】

シードスワブは患者検体と同様に扱い、日常的に施行している方法で、培地（培地の選択は自由）に塗布し、分離培養後、同定および薬剤感受性検査を実施し、その結果を回答する。

フォトサーベイは画像と患者情報および検査データから最も可能性が高い原因菌を推定する。

IV.出題内容

【微生物1（同定）】評価対象

患者背景	90歳代の女性。膀胱癌の既往あり。デイサービス利用中。2日前に38℃台の発熱があり、近医からセファクロル（CCL）を処方されていた。セファクロル内服後も38℃台の発熱を認めたため、他院の救急外来を受診した。身体所見で肋骨脊柱角（CVA）打痛を認め、尿一般定性検査では白血球エステラーゼ（4+）、亜硝酸塩(-)であり、尿沈渣検査では細菌(+)であった。
微生物検査	本菌は救急外来受診時の尿から分離された。
問題	貴施設の日常検査法によって菌を分離し、同定検査のみ実施してください。

【微生物2（同定・薬剤感受性）】評価対象

患者背景	50歳代の女性。米国旅行中に体調不良があり、米国で治療を受けた。帰国後、発熱、腰の痛み、寒気を認めたため、かかりつけ医を受診した。その後も解熱せず歩行困難となったため、救急指定病院に救急搬送された。検査の結果腎盂腎炎と診断され、即日入院となった。
微生物検査	本菌は入院時のカテーテル尿から分離された。
問題	貴施設の日常検査法によって菌を分離し、同定検査と以下に指定した5剤について薬剤感受性検査を実施してください。 セフォタキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、イミペネム（IPM）、ゲンタマイシン（GM）、レボフロキサシン（LVFX） ※上記抗菌薬が常備されておらず回答できない場合は集計対象から除外され、評価には影響しません。 <u>※薬剤感受性の判定は、Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-30th Editionの基準を用いて下さい。</u>

【フォトサーベイ設問1】評価対象

患者背景	20歳代の男性。早朝に排尿時痛を認め、尿の中に白い分泌物が浮遊していた。翌日まで様子を見ていたが症状が改善しないため、救急外来を受診した。不特定多数との性交渉は無かった。救急外来で採取した尿道口からの白色膿汁が微生物検査室に提出された。
微生物検査	フォト1-Aは提出された白色膿汁のグラム染色所見（フェイバーG（フクシン）（西岡法）（日水製薬））である。フォト1-Bは35℃48時間炭酸ガス培養をしたチョコレート寒天培地上の集落である。同定された微生物の糖分解能は、グルコース（+）、マルトース（-）、ラクトース（-）、サッカロース（-）、フルクトース（-）であった。
問題	患者背景および微生物検査（フォト1-A、1-B、糖分解能）から最も可能性が高いと推定される原因微生物の菌種名を記入してください。

【フォトサーベイ設問2】**評価対象**

患者背景	40歳代の男性。2週間前に敗血症の診断で入院。ICUで治療中。昨日37℃台の発熱を認めたが発熱の原因が分からなかったため、喀痰培養、尿培養、血液培養が採取された。
微生物検査	発熱時に採取された尿検体のグラム染色所見（フェイバーG（フクシン）（西岡法）（日水製薬））をフォト2-Aに示す。フォト2-Bは尿検体を35℃48時間好気培養したヒツジ血液寒天培地上の集落、フォト2-Cは尿検体を35℃48時間好気培養したクロモアガーカンジダ/ポテト寒天培地（関東化学）上の集落である。
問題	患者背景および微生物検査（フォト2-A、2-B、2-C）から最も可能性が高いと推定される原因微生物の菌種名を記入してください。

V.正答

【微生物1（同定）の正答】

同定菌名	<i>Enterococcus faecium</i>
------	-----------------------------

性状

グラム陽性球菌、カタラーゼ(-)、血液寒天培地で α ~ γ 溶血、運動性(-)、黄色色素(-)、マンニット(+)、ソルビトール(-)、アラビノース(+)

【微生物2（同定）の正答】

同定菌名	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
------	---

性状

グラム陰性桿菌、オキシダーゼ(-)、TSI培地（高層部/斜面部/ガス）（黄/黄/+）、VP(+)、IPA(-)、硫化水素(-)、インドール(-)、運動性(-)、クエン酸培地への発育(+)、リジン脱炭酸反応(+)、オルニチン脱炭酸反応(-)、アルギニン加水分解反応(-)

【微生物2（感受性検査）の正答】

抗菌薬名	判定
CTX	R
MEPM	R
IPM	R
GM	S
LVFX	R

【フォトサーベイ設問の正答】

設問1 推定菌種名	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
設問2 推定菌種名	<i>Candida albicans</i>

VI.結果と評価基準

【結果】

1.微生物1：同定（29施設）

同定菌名	正解	<i>Enterococcus faecium</i>	28施設（96.6%）
	不正解	<i>Enterococcus faecalis</i>	1施設（3.4%）

同定方法	自動化機器	22施設（75.9%） Walk Away、autoScan-4（ベックマン・コールター） 9施設（31.0%） Phoenix（日本BD） 6施設（13.8%） MALDIバイオタイパー 3施設（10.3%） VITEK（ビオメリュー・ジャパン） 2施設（6.9%） VITEK MS（ビオメリュー・ジャパン） 1施設（3.4%） RAISUS（日水製薬） 1施設（3.4%）
	用手法	7施設（24.1%） クリスタル GP（日本BD） 4施設（13.8%） アピ ストレップ20（ビオメリュー・ジャパン） 2施設（6.9%） Rap ID STR（極東製薬） 1施設（3.4%）

2.微生物2：同定（29施設）

同定菌名	正解	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	29施設（100%）
------	----	---	------------

同定方法	自動化機器	23施設（79.3%） Walk Away、autoScan-4（ベックマン・コールター） 11施設（37.9%） Phoenix（日本BD） 6施設（13.8%） MALDIバイオタイパー 3施設（10.3%） VITEK（ビオメリュー・ジャパン） 2施設（6.9%） VITEK MS（ビオメリュー・ジャパン） 1施設（3.4%）
	用手法	6施設（20.7%） クリスタル E/NF（日本BD） 3施設（10.3%） アピ 20（ビオメリュー・ジャパン） 2施設（6.9%） ラピッドID32Eアピ 1施設（3.4%）

3.微生物2：感受性検査（28施設）

・判定区分（28施設）

・MIC値分布（26施設）

・阻止円直径分布（2施設）

薬剤名	判定	施設数	薬剤名	MIC値	施設数	薬剤名	阻止円直径(mm)	施設数
CTX	R	25	CTX	=32	1	CTX	18	1
MEPM	R	27		=16	1		15	1
	S	1		=8	3	MEPM	18	1
IPM	R	26		≧8	2		15	1
	I	1		>4	6	IPM	20	1
	S	1		≧2	1		14	1
GM	S	28		>2	9	GM	20	1
LVFX	R	28		MEPM	≧16		4	19
					=16	1	LVFX	0
			≧8		1			
			>8		3			
			>4		5			
			=4		1			
			≧2		1			
			>2		9			
			≧1		1			
			IPM	≧8	1			
				>8	3			
				=8	4			
				>4	6			
				=4	1			
				≧2	1			
				>2	9			
				≧1	1			
			GM	=4	8			
				≧4	4			
				≧2	12			
				=2	1			
				=1	1			
			LVFX	≧8	5			
				≧4	1			
				>4	20			

方法	微量液体希釈法	26施設 (92.9%) Walk Away、autoScan-4 (ベックマン・コールター) 14施設 (50.0%) Phoenix (日本BD) 6施設 (21.4%) VITEK (ビオメリュー・ジャパン) 3施設 (10.7%) RAISUS (日水製薬) 1施設 (3.6%) その他 2施設 (7.1%)
	ディスク拡散法	2施設 (7.1%)

4. フォトサーベイ (33施設)

設問1 推定菌種名	正解	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	32施設 (97.0%)
	不正解	<i>Haemophilus influenzae</i>	1施設 (3.0%)
設問2 推定菌種名	正解	<i>Candida albicans</i>	32施設 (97.0%)
	不正解	<i>Candida tropicalis</i>	1施設 (3.0%)

【評価項目および評価方法】

微生物1、微生物2、フォトサーベイの設問について当該施設で測定可能であった項目について下記の評価基準より A、B (正解) / C、D (不正解) の4段階で評価した。

【微生物1 (同定検査) の評価方法】

菌種名「*Enterococcus faecium*」と一致している場合を「A」、それ以外の解答を「D」と評価した。

【微生物2 (同定検査) の評価方法】

菌種名「*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*」と一致している場合を「A」、それ以外の解答を「D」と評価した。

【微生物2 (感受性検査) の評価方法】

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 CPE (Carbapenemase-producing *Enterobacterales*) と判定できることを目的に判定を評価対象とした。CLSI規格と一致した場合を「A」と評価し、感性を中間耐性、耐性を中間耐性と判定した場合を「B」、それ以外の解答を「D」と評価した。

【フォトサーベイ設問の評価法】

設問1: 「*Neisseria gonorrhoeae*」を「A」、それ以外の解答を「D」と評価した。

設問2: 「*Candida albicans*」を「A」、それ以外の解答を「D」と評価した。

VII.コメント、ご意見（原文のまま掲載）

微生物1：微量液体希釈法によるバンコマイシン MIC 1、テイコプラニン MIC 0.5以下
微生物1：処方されたセファクロルは臨床的効果はないと思われる。
微生物1：Bruker
微生物1：起炎菌の可能性がきわめて高いと考えられる
微生物1：起炎菌の可能性はある
微生物1：VRE ではない
微生物1：感染症法で規定された菌ではない
微生物2：KPC 産生菌の可能性はある
微生物2：KPC 産生菌である
微生物2：メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌ではない
微生物2：メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の可能性はある
微生物2：ESBLs 産生菌である
微生物2：病院（院内）感染防止対策上、極めて重要な菌であると考えられる
微生物2：5類感染症として取り扱う
微生物2：5類感染症の可能性はあるが、院内で対応ができないので検査を外注する
微生物2：①カルバペネム耐性腸内細菌科細菌です。感染症の起因菌と判定された場合、保健所届出疾患となります。②ESBL 産生菌否定③メタロ β ラクタマーゼ産生菌否定
微生物2：カルバペネマーゼ鑑別ディスク Plus(関東化学)で KPC 産生菌と判定、AmpC/ESBL 鑑別ディスク(関東化学)で ESBL、AmpC 以外の耐性菌と判定、ストリングステスト陽性、mCIM 法によるカルバペネマーゼ陽性
微生物2：非常に粘張度が強いコロニーであった。
微生物2：string test 陽性
微生物2：IPM と MEPM が耐性にて、MBL と KPC の確認を行った。MBL は、DDST にて検出されず。KPC は、変法ホッジテスト試験にてクローバー状の阻止円の歪が見られたので、陽性とする。
微生物2：MEPM の MIC 値が2µg/ml 以上のため、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に該当する。主治医が起炎菌と判断した場合、5類感染症として届け出が必要となる。カルバペネマーゼ鑑別ディスク Plus(関東化学)より <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase(KPC)型産生菌と判定。sodium mercaptoproionic acid(SMA)法より、メタロ-β-ラクタマーゼ産生 (-)。
微生物2：PCRによるカルバペネマーゼ遺伝子の検出
微生物2：マイクロスキャン Neg combo 3J にて生化学的性状においても <i>K.pneumoniae</i> であることを確認した。mCIM の結果は陽性で、カルバペネマーゼ産生菌だと考えられた。栄研化学の SMA ディスクを用いて検査を行った結果、メタロ β ラクタマーゼは陰性だった。

IX.総評

今年度は尿路感染症の原因菌である、*Enterococcus faecium* の同定、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* の同定および感受性検査と、*Neisseria gonorrhoeae* と *Candida albicans* のフォトサーベイを出題した。すべての設問においてA評価を得た施設がほとんどであったが、D評価の項目があった施設においては、もう一度自施設の検査方法を確認していただきたい。

まず、*Enterococcus faecium* (以下*E. faecium*) による尿路感染症が想定される設問1では、1施設を除く解答したすべての施設が正しく同定できていた。配布した菌株は臨床分離株である。*Enterococcus* sp. は尿路感染症において分離頻度が高く、その鑑別は基礎的であり重要である。*E. faecalis* と *E. faecium* は自動分析装置で検査可能な生化学的性状により容易に鑑別可能である。運動性を有する株の場合、黄色色素を産生していれば(コロニーを綿棒で釣菌した部位が黄色であれば) *E. casseliflavus*、そうでなければ *E. gallinarum* と判断できる。この2菌種は自動分析装置では鑑別が不可能なこともあるため覚えておくことが便利である。

フリーコメントにはVREではない旨や、患者背景のセファクロー(CCL) が無効である旨を記載していただき、本菌属への理解の高さが推測された。

次に、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (以下 *K. pneumoniae*) による尿路感染症が想定される設問2ではBAA-1705™由来株を配布した。本菌株はAmerican Type Culture Collection (ATCC) の参照菌株であり、KPC産生及び感受性検査結果が規定されている¹⁾。またCLSI M100 Ed30thにおいてはmodified Carbapenem Inactivation Methods(mCIM) の陽性コントロールと定められている²⁾。感染対策を厳重にすべきCPEを正しく判定できるか確認することを目的に出題した。

同定検査は参加した29施設すべてが正しく同定できていた。臨床的に頻繁に遭遇する微生物であるため、今後とも同様の精度を維持していただきたい。

感受性検査においては課題が見られた。本菌はKPCであることが確認された参照株であり、MEPM、IPMは耐性という規格であるが、IまたはSと誤判定されたケースがあった。検査手技、精度管理エラー、試薬不備などが考えられるが、耐性株を感性傾向に誤判定してしまうと、臨床的に無効な抗菌薬が投与され、患者の生命が脅かされてしまう。また院内で知らない間に多剤耐性菌が伝播しアウトブレイクを引き起こすこともありうる。IまたはSと判断してしまった施設においては検査方法の何処に問題があったかを突き止め改善をお願いしたい。

微量液体希釈法の場合、Walk Away、autoScan-4で使用するパネルの添付文書には、「*Klebsiella* spp. や *Pseudomonas* spp. のような一部のムコイド菌株は、コロニーを釣菌しようと試みてもプロンプトのワンズチップに付着しない場合があります。これは目視により明白です。これらの菌種には別の菌液調整法を利用する必要があります。」と記載があるため、本機種の使用施設では検査時にプロンプトの確認をお願いしたい³⁾。

また、検査手技が簡便で比較的安価なディスク拡散法において、事前にバリデーションを行なった際の阻止円径はIPMが13-15mmであったが、20mmという回答があった。ディスク拡散法の判定において、阻止円直径のみでSIR値を判断するのではなく、阻止円内にコ

コロニーを認める場合は、再検査を実施しなければならず、コロニーが異なればコンタミネーションを疑い、コロニーが同じならば耐性菌の可能性を考慮しなければならないため、検査方法の再確認をお願いしたい。ディスク拡散法の精度管理であるが、今回の拡大傾向と異なり、ディスクが吸湿してしまった場合、阻止円径が小さくなることもあり、β-ラクタム系抗菌薬（特にIPMとクラブラン酸）が不安定とされている²⁾。このように経時的にディスクは劣化していくため、簡易なディスク拡散法であっても精度管理の実施をお願いしたい。

コメントにおいてはESBLs産生菌、MBL産生菌といった記載が見受けられた。薬剤感受性において、ESBLs産生菌はカルバペネム系に感性であり、MBLやKPCはカルバペネム系が耐性であることが鑑別点である。またmCIM法陽性の場合SMA法陽性であればMBL、SMA法陰性であれば、MBL以外のカルバペネマーゼと鑑別が可能である。β-ラクタマーゼごとの耐性薬剤を以下に示すので理解の参考にして欲しい。

主なβ-ラクタマーゼと耐性パターン⁴⁾

産生酵素	ペニシリン系	第1世代セフェム	第2世代セフェム	第3世代セフェム	第4世代セフェム	モノバクタム系	セファマイシン系ほか	カルバペネム系
	ABPC PIPC	CEZ	CTM	CTX CAZ	CFPM	AZT	CMZ FMOX	IPM MEPM
ESBL	R	R	R	R(S)	R(I)	R	S	S
AmpC 過剰産生	R	R	R	R(I)	R(I)	R(I)	R	S(I)
MBL	R	R	R	R	R	R(I)	R	R(S)
KPC	R	R	R	R(I)	R(I)	R	R	R(I)
OXA	R	R	R	R	R	R	R	R(I)

フォトサーベイの1問目では、*Neisseria gonorrhoeae* が想定される問題を出題した。尿道分泌物でグラム陰性球菌が白血球に貪食されている場合、本菌が最も疑われる。記載した生化学的性状だけでは*Haemophilus influenzae* と鑑別はできないがグラム染色形態からの鑑別は可能である。本症例は、本人は不特定多数との性交や風俗店の利用は無かったが、パートナーが感染していた症例である。このように性感染症の検査時は本人の行動歴だけでなく、パートナーの存在も考慮しながら検査を進めることが重要である。

フォトサーベイの2問目では、*Candida albicans* が想定される問題を出題した。本菌はカンジダ症の最多原因菌である。その他の*Candia sp.* とは感受性が異なるため、正しく同定することは重要である。まずフォト2-Aではその大きさから酵母様真菌であることが推測でき、酵母形及び菌糸形が存在することが分かる。*C. glabrata* は菌糸形を作らない点の特徴であるため⁵⁾、*C. glabrata* は否定できる。フォト2-Bでは、血液寒天培地など栄養強化培地において、コロニー辺縁に「足」と呼ばれる突出物が見受けられる。これは*C. albicans* (又は*C. dubliniensis*)に特徴的な形態である⁵⁾。フォト2-Cではクロモアガーカンジダ培地上で

緑色に発育しており、*C. albicans*が推測される。このことから、グラム染色及び血液寒天培地から得られる情報が*C. albicans*の同定に寄与することを知っていただくことが本設問の意図であった。フォト2-Cでピンときた施設が多いと想定されるが、本サーベイを期にグラム染色及び血液寒天培地の発育性状をより深く観察していただければ幸いである。

(参考文献)

- 1) ATCC®KPC Strains – Antibiotic Profiles.
<https://www.atcc.org/~media/5252CD408DB54D66BB1D400B1C83583D.ashx>
- 2) CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing , 30th Edition
<http://clsi-m100.com/> 2021年1月21日現在
- 3) クラスⅢ細菌検査用シリーズ マイクロスキャン Neg シリーズ
[700016_20600AMY00147000_A_02_03 \(pmda.go.jp\)](https://www.pmda.go.jp/700016_20600AMY00147000_A_02_03)
- 4) 中村文子 他 モダンメディア 56巻10号2010
- 5) D.H.ラローン. 2013. 医真菌同定の手引き (第5版) .p.283 ,栄研化学,東京

IX.問い合わせ先

石巻赤十字病院 臨床検査課 尾池 泰典

TEL: 0225-21-7220 (内線3085)

宮城県立こども病院 検査部 須田 那津美

TEL: 022-391-5111 (内線5568)