

平成27年度 第32回静岡県臨床検査精度管理調査 微生物部門成績検討会

平成26・27年度微生物部門精度管理委員

栗田	泉	市立島田市民病院
塚原	美香	静岡県立静岡がんセンター
木山	有紀	静岡医療センター
池ヶ谷	佳寿子	静岡市立清水病院
渡部	友芸	静岡市立静岡病院
杉江	昌男	磐田市立総合病院
名倉	理教	浜松医科大学医学部附属病院

概要と試料の取り扱い

微生物検査部門サーベイは、塗抹検査，同定検査2種，同定・薬剤感受性検査，薬剤感受性検査(フォトサーベイ)の5設問があります。

検査を始める前に本手引をよくお読みのうえ，以下に示す実施項目，内容，注意点等を確認してください。

1.実施項目

微生物検査部門サーベイの試料番号，送付内容および実施項目（○印）は，以下の表に示したとおりです。

試料	送付内容	塗抹検査	同定検査	薬剤感受性検査
31	チューブ	○		
32	スワブ		○	
33	スワブ		○	
34	スワブ		○	○
35	フォト印刷			○

2.試料の取り扱いについて

2-1.塗抹検査用試料（試料31）

チューブに液状試料を分注してあります。試料は固定済みの菌懸濁液で菌体が沈澱しています。使用前には内容をボルテックスマキサー等で十分に攪拌してください。残った試料は検査終了まで冷蔵(4℃)保存してください。

2-2.同定検査用試料(試料32, 33)

スワブに濃度調整した菌液を吸収させてあります。速やかに適切な培地を用いて培養してください。スワブは検査終了まで冷蔵(4℃)保存してください。

2-3.同定検査および薬剤感受性検査用試料(試料34)

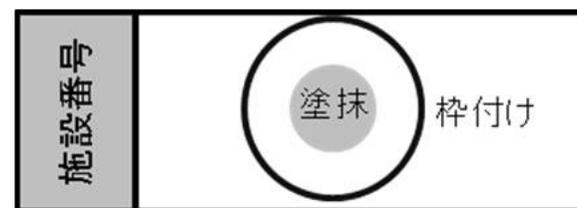
スワブに濃度調整した菌液を吸収させてあります。速やかに適切な培地を用いて培養してください。スワブは検査終了まで冷蔵(4℃)保存してください。

2-4.薬剤感受性検査用フォト(試料35)

試料No.(35)が記入されたカラー印刷用紙を参照し判定してください。

サーベイ実施内容

塗抹検査サーベイ (試料31) 全施設対象



グラム染色を実施し、染色された細菌を評価してください。
また、染色後の標本は、施設番号を記載し、塗抹部をマーカー等で枠付けし、スライドメーラーに入れ返却してください。

同定サーベイ (試料32)

患者・現病歴：65歳，女性。2日前より排尿痛を訴え，当日悪化したため泌尿器科外来受診。

微生物検査：本菌は，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，同定検査を実施してください。

(試料33) 全施設対象

患者・現病歴：45歳，男性。食品関連会社に勤務。定期検便検査を実施。

検査依頼内容は赤痢菌，サルモネラ菌，腸管出血性大腸菌の有無である。

微生物検査：糞便から本菌が分離された。

問題：貴施設の日常検査法によって菌を分離し，同定検査を実施してください。

また，分離菌に対し追加試験が必要な場合は実施してください。

同定・薬剤感受性サーベイ

(試料34)

患者・現病歴：78歳，男性．呼吸苦を主訴に救急外来受診し緊急入院となった．

微生物検査：本菌は，救急外来受診時採取した血液培養から分離された．

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の3剤について薬剤感受性検査を実施してください．

また，本菌検出に伴うコメントがあれば回答してください．

検査抗菌薬：ペニシリンG(PCG)，エリスロマイシン(EM)，セフォタキシム(CTX)，
またはセフトリアキソン(CTRX)．

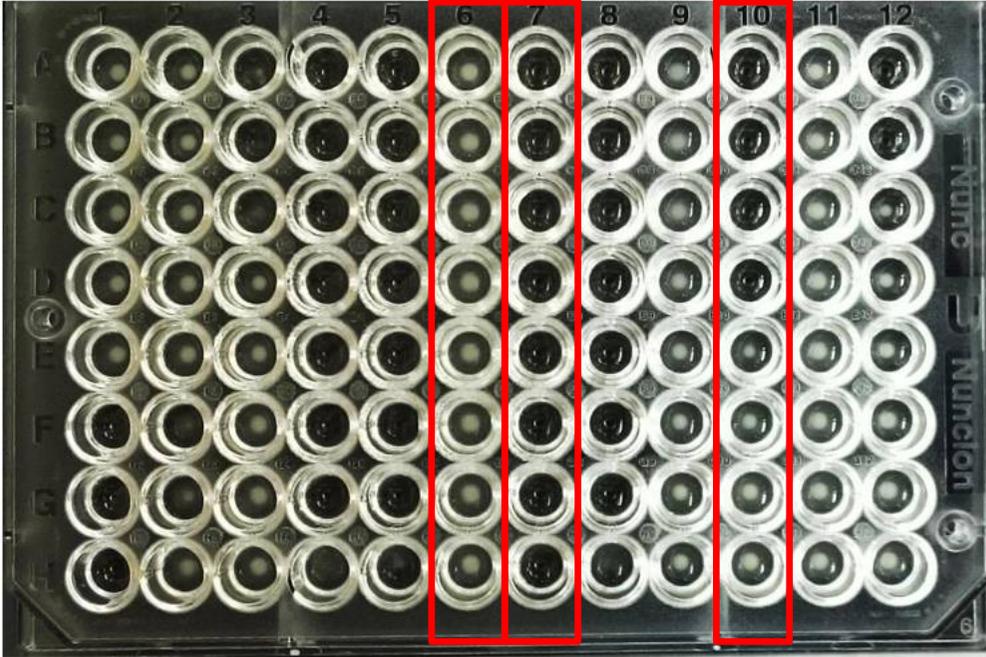
薬剤感受性（フォト）サーベイ

(試料35：フォト)

*Enterobacter cloacae*の薬剤感受性検査（微量液体希釈法）を実施したマイクロプレートの写真（図1）です．抗菌薬の濃度および配置は図2を参照してください．

問題：赤枠で囲んだセフメタゾール(CMZ)，セフォタキシム(CTX)，イミペネム(IPM)のMIC値($\mu\text{g}/\text{mL}$)，判定(S,I,R) および符号(\leq , =, $>$ または \geq)を求めてください．

☒ 1



☒ 2

単位: (μg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PGG	ABPC	ABPC/SBT	PIPC	PIPC/TAZ	CMZ	CTX	OPZ/SBT	FMOX	IPM	CLDM	MINO
A	2	2	16/8	64	64/4	32	32	16/16	32	8	8	8
B	1	1	8/4	32	32/4	16	16	8/8	16	4	4	4
C	0.5	0.5	4/2	16 S	16/4	8	8	4/4	8	2	2	2
D	0.25	0.25	2/1	8	8/4	4	4	2/2	4	1	1	1
E	0.125	0.125	1/0.5	4	4/4	2	2	1/1	2	0.5	0.5	0.5
F	GP 16	2	0.5/0.25	2	2/4	1	1	0.5/0.5	1	0.25	0.25	0.25
G	8	1	0.25/0.125	1	1/4	0.5	0.5	0.25/0.25	0.5	0.125	0.125	0.125
H	4	0.5	0.125/0.06	0.5	0.5/4	0.25	0.25	0.125/0.125	0.25	0.06	0.06	Control

結果報告

塗抹検査サーベイ(試料31)

Staphylococcus aureus 標準菌株(ATCC 29213)をMcF0.5に調整し、1%ホルマリン生理食塩液を用いて10倍希釈したものを滅菌チューブへ1mL分注し試料とした。

試料31塗抹鏡検 回答結果一覧表

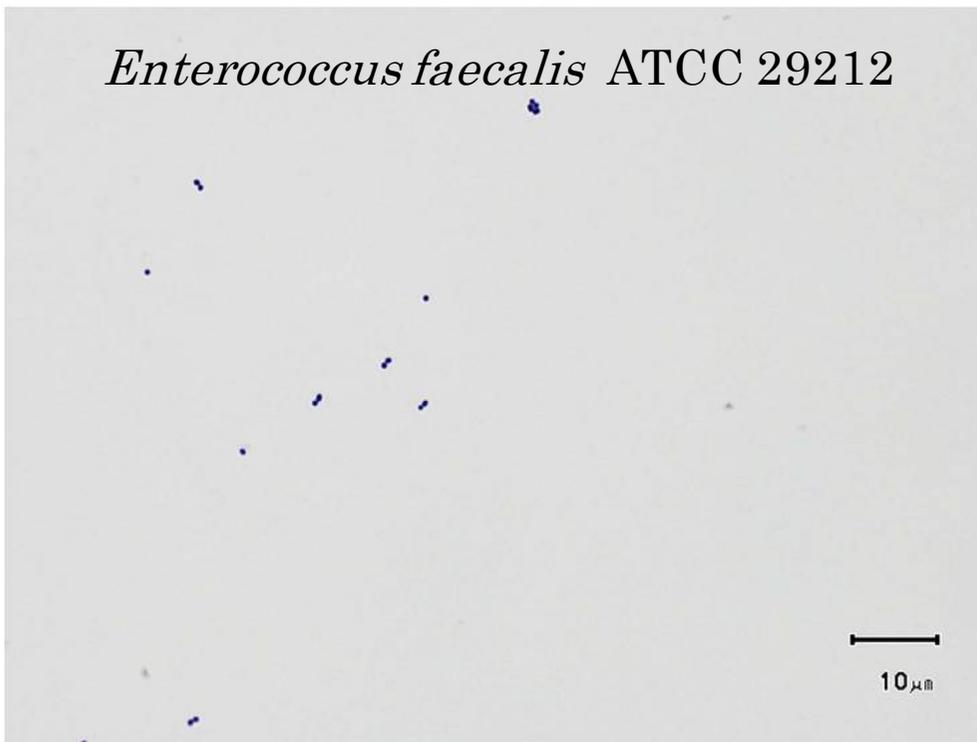
回答名称	件数	(%)	正解	評価
グラム陽性球菌	45	100	正解	A
合計	45			

グラム陽性球菌を正解；評価Aとし、それ以外を不正解；評価Cとした。

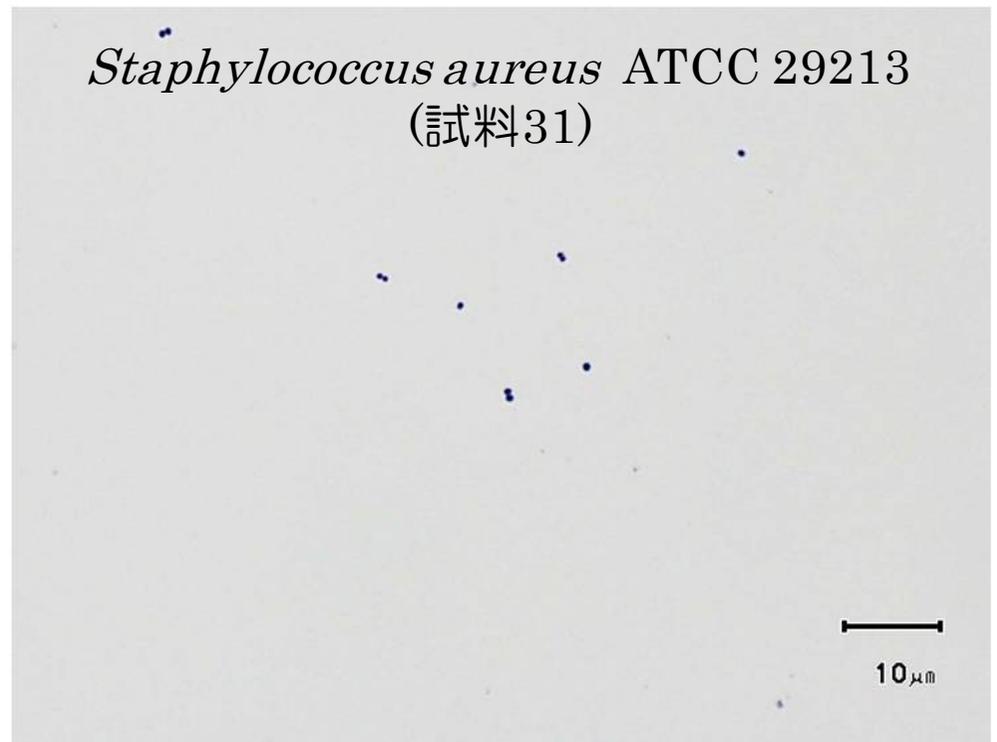
グラム陽性球菌と回答されたのは、45/45施設と100%正解であった。

昨年度の塗抹鏡検は93.5%と高い正解率であったが、今年度はさらに良好な結果であった。

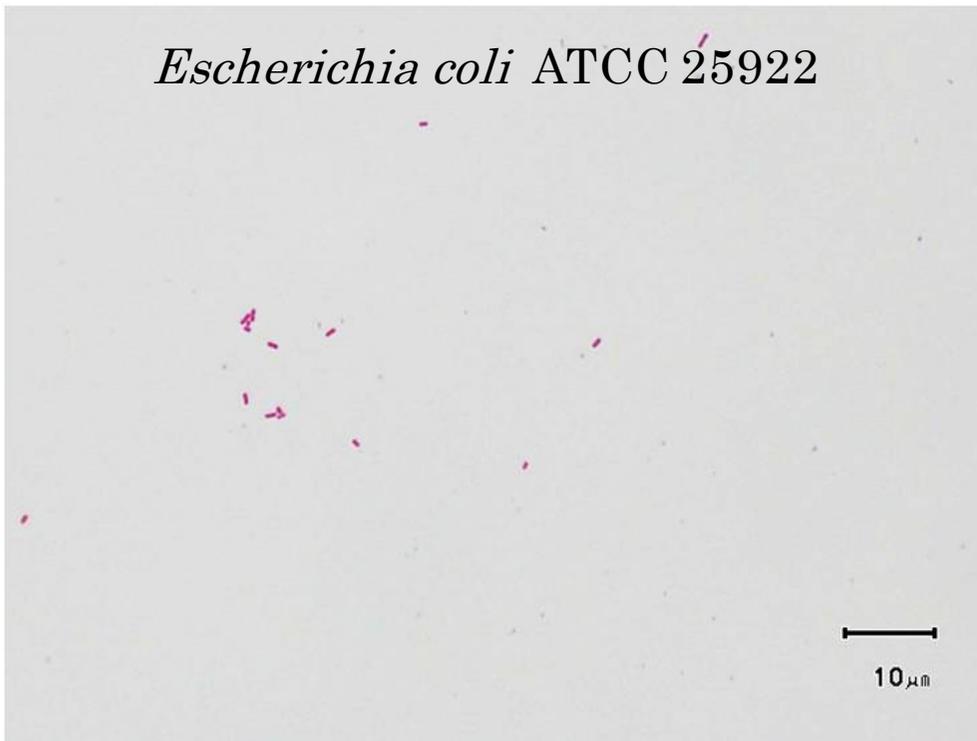
Enterococcus faecalis ATCC 29212



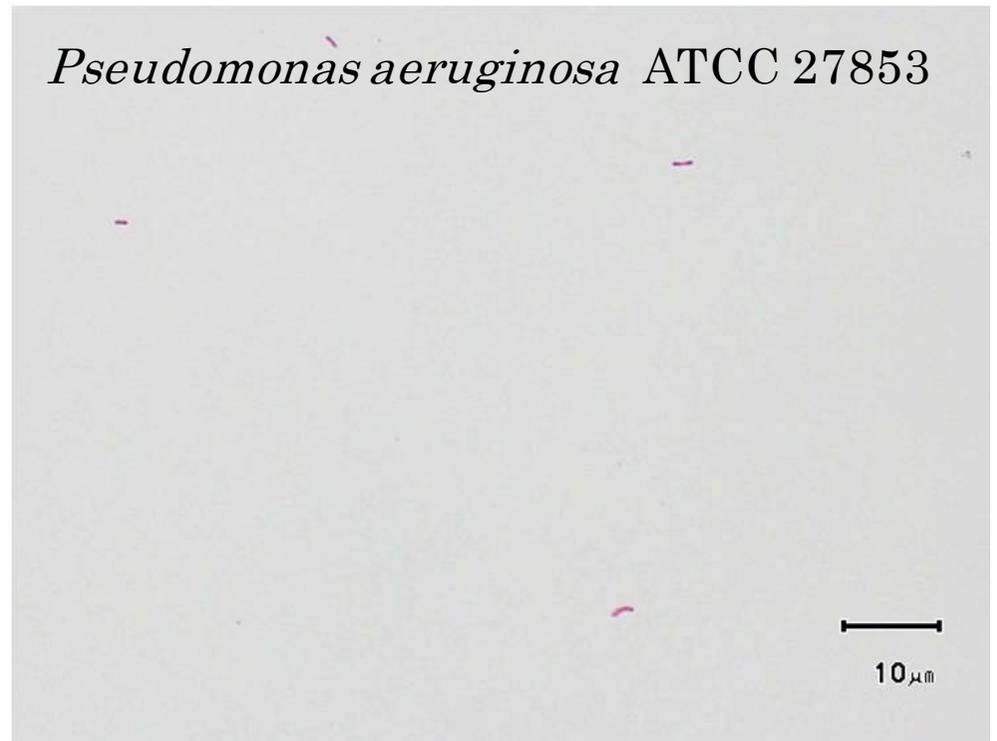
Staphylococcus aureus ATCC 29213
(試料31)



Escherichia coli ATCC 25922



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



同定検査サーベイ(試料32)

65歳、女性。泌尿器科外来受診時に採取した尿から分離培養された *Enterococcus faecalis* をMcF 0.5に調整し、滅菌生理食塩水で10倍希釈したものをシードスワブに吸収させ試料とした。

試料32同定検査 回答結果一覧表

回答名称	件数	(%)	正解	評価
<i>Enterococcus faecalis</i>	34	100	正解	A
合計	34			

E. faecalis を正解；評価Aとし、それ以外を不正解；評価Cとした。

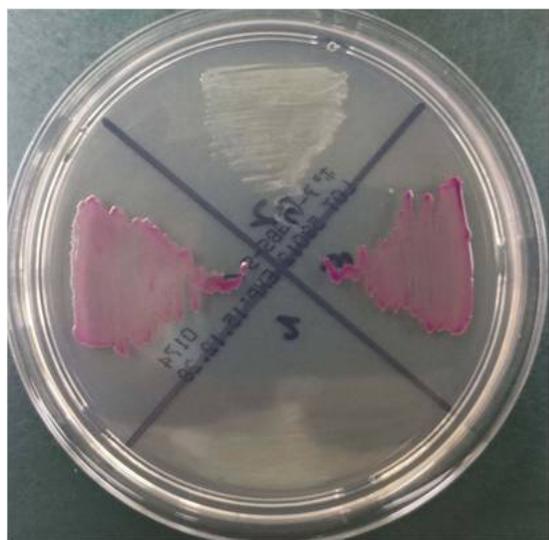
E. faecalis と回答されたのは、34/34施設と100%正解であった。

今回試料とした株は、羊血液寒天培地上で淡い β 溶血を示す *Streptococcus agalactiae* と同様に、羊血液寒天培地上で淡い β 溶血を呈する非典型的の性状を示す株である。

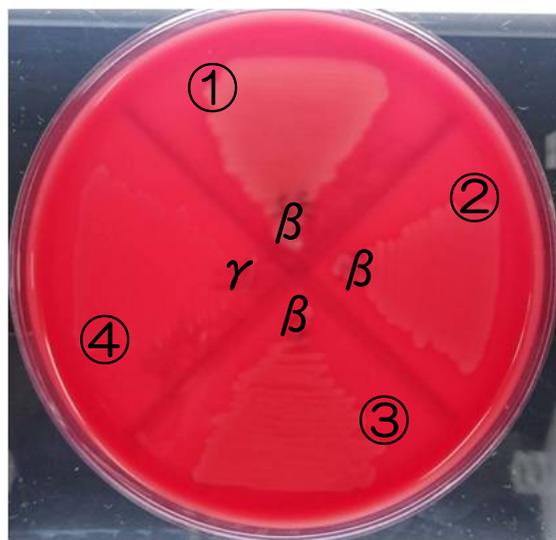
任意回答である従来法3(溶血性を問う問題)では、23施設が β 溶血、2施設が γ 溶血(非溶血)と回答した。 γ 溶血と回答した施設は、羊血液寒天培地を用いて再度分離培養し淡い β 溶血があることを確認していただくことを希望する。

また、羊血液寒天培地上で淡い β 溶血を示す*S. agalactiae*と今回出題の淡い β 溶血を示す*E. faecalis*を羊血液寒天培地上で鑑別することは困難と考えられる。

さらに、昨年度本精度管理において出題した非溶血型*S. agalactiae*と非溶血型*E. faecalis*が同時に分離培養されることも考えられるため、1種のための培地観察ではなく複数種の培地観察を常に心がけていただきたい。



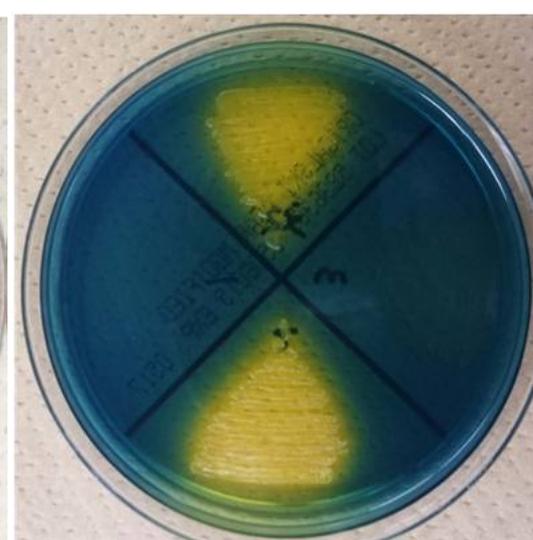
GBS選択酵素基質培地



羊血液寒天培地



チョコレート寒天培地



BTB乳糖加寒天培地

- ① : *Enterococcus faecalis* (β 溶血) 試料32
② : *Streptococcus agalactiae* (β 溶血)

- ③ : *Listeria monocytogenes* (β 溶血)
BTB乳糖加寒天培地には通常発育しない
④ : *Streptococcus agalactiae* (γ 溶血)

同定検査サーベイ(試料33)

食品関連会社に勤務する45歳男性。赤痢菌、サルモネラ菌、腸管出血性大腸菌の有無を確認するための定期検便検査で検出された *Escherichia coli* (血清O26型、Vero毒素陰性株) をMcF 0.5に調整し、滅菌生理食塩水で10倍希釈したものをシードスワブに吸収させ試料とした。

試料33同定検査 回答結果一覧表

回答名称	件数	(%)	正解	評価
<i>Escherichia coli</i>	30	78.9	正解	A
腸管病原性 <i>Escherichia coli</i>	6	15.8	正解	A
<i>Escherichia coli</i> , enteropathogenic	2	5.3	正解	A
合計	38			

E. coli、腸管病原性 *E. coli* および *E. coli*, enteropathogenic を正解；評価Aとした。

E. coli、腸管病原性*E. coli*および*E. coli*, enteropathogenicと回答されたのは、38/38施設と100%正解であった。

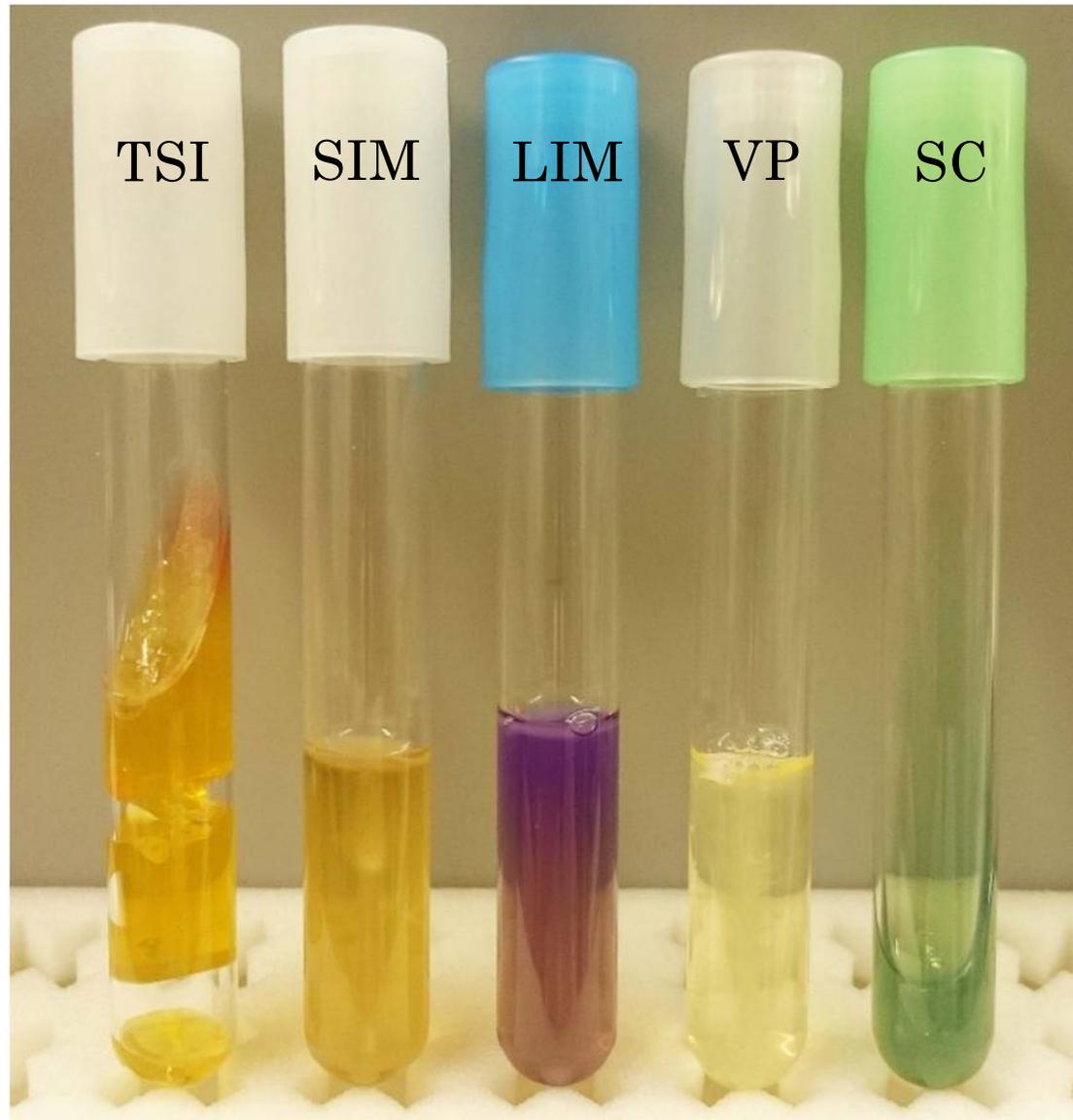
しかし、1施設が腸管病原性*E. coli*と同定されたのにもかかわらず、3類感染症として取り扱おうとコメントしている。*E. coli*において3類感染症に該当するものは、Vero毒素を産生する株であることを再認識していただきたい。

今回出題した*E. coli*は、血清型O26、Vero毒素陰性である。また、Vero毒素産生性と高い相関を示すエンテロヘモリジン確認培地での淡い溶血性を認め、複数の会社から販売している腸管出血性大腸菌の選択分離培地などに発育を認めることもある株である。

したがって、エンテロヘモリジン培地や選択分離培地での発育性状のみで腸管出血性大腸菌と判断するのではなく、**検出菌のVero毒素産生を確認**することが必須と考える。

Vero毒素産生性の確認試験を実施(外部委託検査を含む)した施設、実施していないがVero毒素産生の可能性を示唆したコメントなどを記載したのは37/38施設(97.4%)であり、非常に多くの施設が腸管出血性大腸菌感染症を念頭に置き検査を実施していることが確認された。

Escherichia coli の一般的な性状

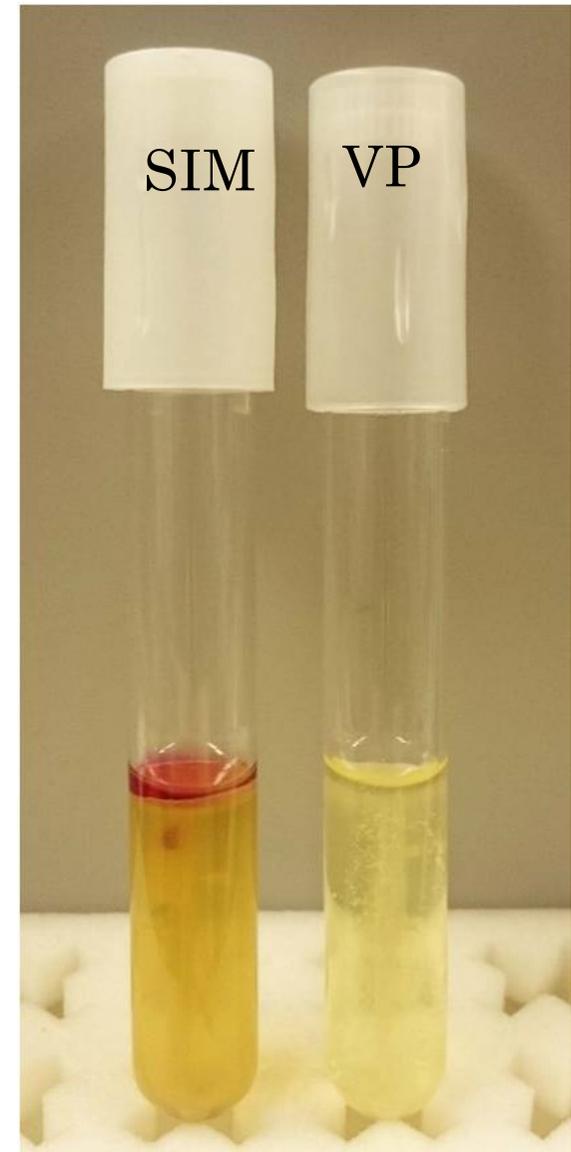


A/AG

IPA(-)
M(+)

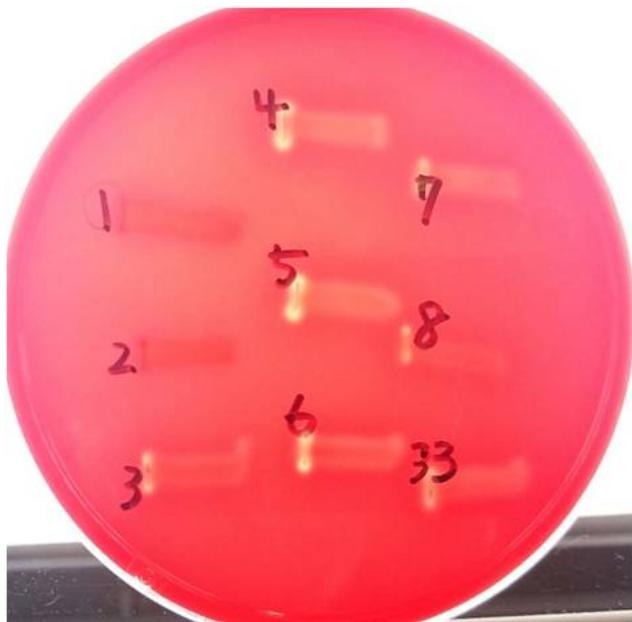
LYS(+)
M(+)

(-)



IND(+)

VP(-)



エンテロヘモリジン培地



腸管出血性大腸菌選択分離酵素基質培地

大腸菌ベロ毒素検出キット



- 1 : *E. coli* 《O111,VT(-)》
- 2 : *E. coli* 《O111,VT(-)》
- 3 : *E. coli* 《O157,VT1(+),VT2(+)》
- 4 : *E. coli* 《O26,VT1(+),VT2(-)》
- 5 : *E. coli* 《O26,VT1(+),VT2(-)》

- 6 : *E. coli* 《O157,VT1(-),VT2(+)》
- 7 : *E. coli* 《O111,VT1(+)》
- 8 : *E. coli* 《O157,VT1(+),VT2(+)》

試料33 : *E. coli* 《O26,VT(-)》

同定・薬剤感受性検査サーベイ(試料34)

78歳、男性。呼吸苦を主訴に救急外来受診し緊急入院となった。救急外来受診時採取した血液培養から分離された *Streptococcus pneumoniae* をMcF 1に調整し、滅菌生理食塩水で10倍希釈したものをシードスワブに吸収させ試料とした。

また、分離培養された菌に対しペニシリンG(PCG)、エリスロマイシン(EM)、セフトキシム(CTX) またはセフトリアキソン(CTRX) の薬剤感受性検査の実施を求めた。

試料34同定検査 回答結果一覧表

回答名称	件数	(%)	正解	評価
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	32	100	正解	A
合計	32			
菌発育せず	1		対象外	

*S. pneumoniae*を正解；評価Aとし、それ以外を不正解；評価C、菌発育せずを対象外とした。

今回出題した *S. pneumoniae* は、各施設への送付前に3回にわたりシードスワブ γ 3号への菌株接種後5日間4℃の冷蔵保存における安定性を確認していたが、実際の精度管理で送付した試料菌が非常に死滅しやすく、参加された施設に多大なるご迷惑をおかけしました。不具合のあった施設(8施設)へは再度試料を送付させていただきました。

S. pneumoniae と回答されたのは、32/32施設と100%正解であった。

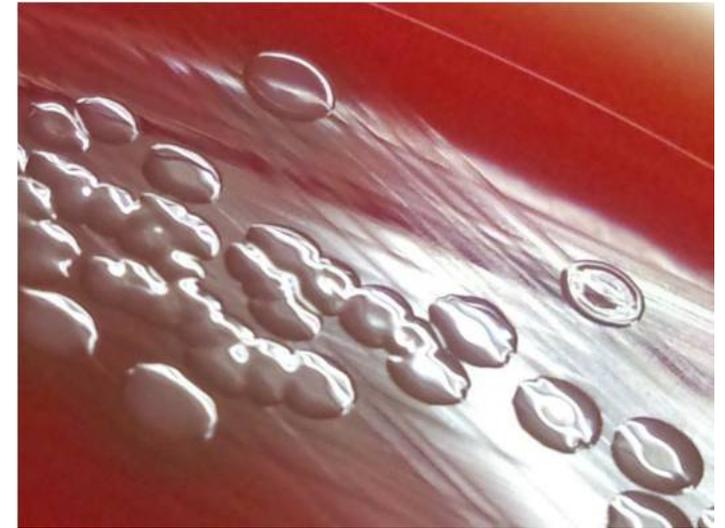
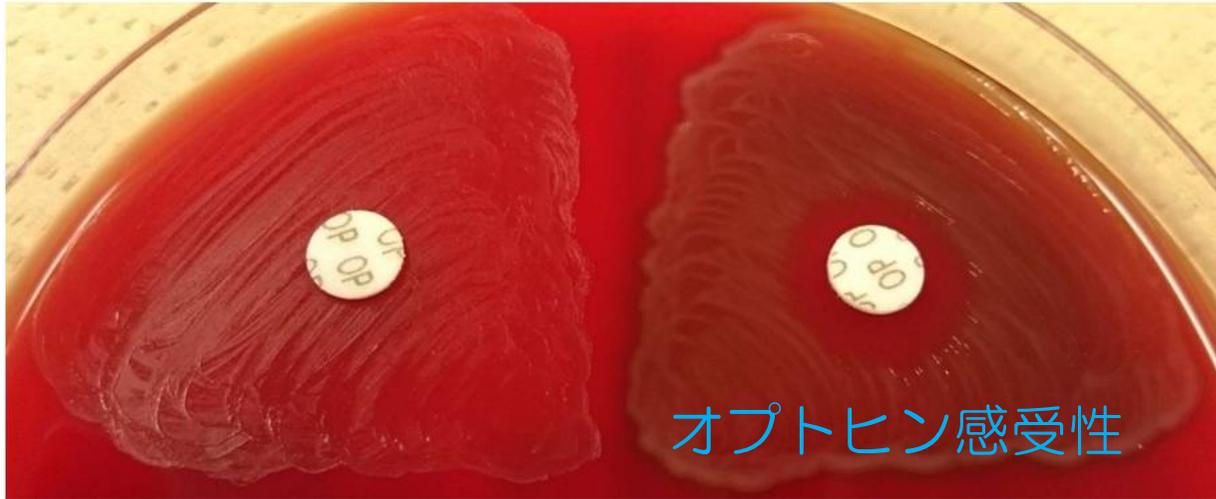
今回出題した *S. pneumoniae* は、血液培養からの検出菌であるが、本症例は喀出痰からも検出されており、肺炎および敗血症と診断された症例であり、5類感染症の対象疾病である「**侵襲性肺炎球菌感染症**」となる。

侵襲性肺炎球菌感染症は、平成25年4月1日に施行され、髄液または血液からの分離・同定による病原体の検出により対象となり、5類感染症(全数把握)として診断後7日以内に保健所を通じ県知事へ届け出が必要である。

今回、同定回答いただいた32施設のうち付加コメント(任意回答)において、5類感染症として取り扱う(侵襲性肺炎球菌感染症)と回答したのは9施設(28.1%)と少なく、1施設は感染症法で規定された菌ではないとコメントしていた。

今回の侵襲性肺炎球菌感染症と同様に、髄液または血液から *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* が検出された場合は、それぞれ侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性髄膜炎菌感染症と5類感染症対象疾病であり届け出が必要であることを再度認識いただきたい。

Streptococcus pneumoniae



試料34薬剤感受性検査 回答結果一覧表

抗菌薬¥	判定			正解率	評価	未記入 対象外
	S	I	R			
PCG	30			100%	A	1
EM			29	100%	A	2
CTXまたはCTRX	29			100%	A	2

薬剤感受性の判定は、PCG：**S**、EM：**R**、CTXまたはCTRX：**S**を正解；評価Aとした。

今回CLSIドキュメントに準拠した薬剤感受性検査の判定値を評価対象とした。

PCGの判定、EMの判定およびCTXまたはCTRXの判定においてそれぞれ1施設が判定値の回答が欠落しており評価対象外とした。また、EMにおいては2施設が検査未実施であり評価対象から除いた。

CLSIドキュメントM100-S22(表1)以降の基準では、*S. pneumoniae*におけるブレイクポイント設定は、病態(髄膜炎および非髄膜炎)により異なっている。

今回出題した株は、どちらの病態においても同じ判定となるものを選択したが、ブレイクポイントを再度確認するきっかけになったと考える。

表1 *Streptococcus pneumoniae* のためのMICの解釈基準(M100-S22)

	非髄膜炎			髄膜炎		
	S	I	R	S	I	R
PCG	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.06		≥ 0.12
EM	≤ 0.25	0.5	≥ 1	≤ 0.25	0.5	≥ 1
CTX	≤ 1	2	≥ 4	≤ 0.5	1	≥ 2
CTRX						

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

PCG、EM、CTXまたはCTRXのMIC値は、薬剤感受性検査測定装置および薬剤感受性検査使用パネルなどにより、抗菌薬測定濃度が異なるためそれぞれの比較が困難であるが、参考までに各抗菌薬のMIC値分布を示す。

MIC値分布一覧表(PCG)

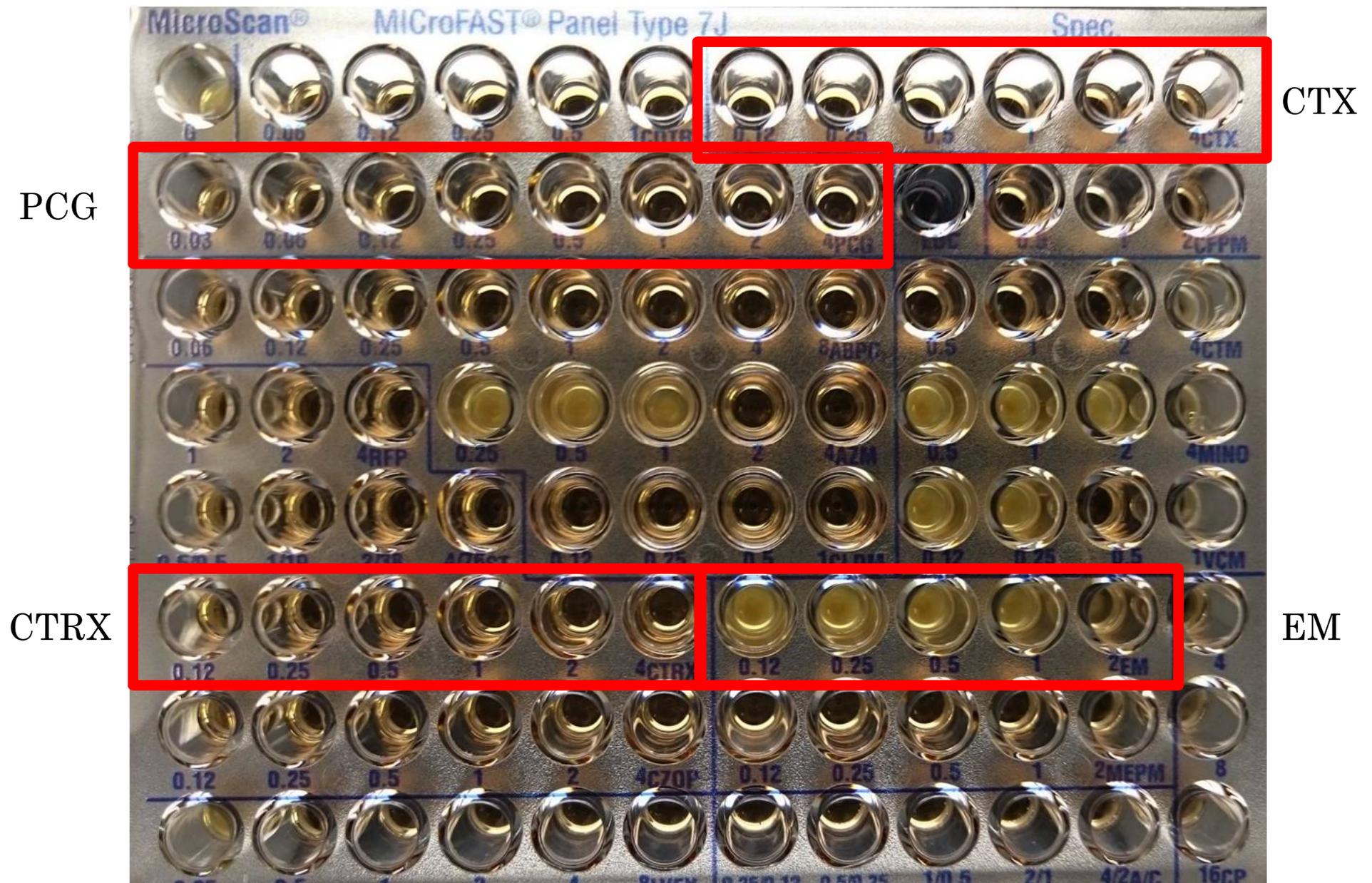
PCG	濃度 (μg/mL)		
	≤0.03	≤0.06	0.06
件数(31)	11	19	1
(%)	35.5	61.3	3.2

MIC値分布一覧表(EM)

EM	濃度 (μg/mL)						
	>0.5	1	≥1	>1	2	>2	4
件数(29)	5	4	2	1	6	6	5
(%)	17.2	13.8	6.9	3.5	20.7	20.7	17.2

MIC値分布一覧表(CTXまたはCTRX)

CTX	濃度 (μg/mL)			CTRX	濃度 (μg/mL)			
	≤0.12	≤0.25	≤0.5		≤0.03	≤0.06	≤0.12	≤0.5
件数(20)	12	5	3	件数(11)	1	3	4	3
(%)	60	25	15	(%)	9	27.3	36.4	27.3



PCG : $\leq 0.03\mu\text{g/mL}$

CTX : $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$

CTRX : $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$

EM : $> 2\mu\text{g/mL}$

薬剤感受性検査(フォト)サーベイ(試料35：フォト)

Enterobacter cloacae (臨床分離株)を用いて薬剤感受性検査(微量液体希釈法)を実施し、マイクロプレート画像を実寸代にカラー印刷したものを配布し試料(フォトサーベイ)とした。

フォトのMICの真値は、CMZ； $>32 \mu\text{g/mL}$ (R)、CTX； $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ (S)、
IPM； $=1 \mu\text{g/mL}$ (S)である。

昨年の精度管理において薬剤感受性検査(フォト)サーベイを始めて試み、2種の抗菌薬の読み取りを求める問題とした。

結果は残念ながら符号(\leq 、 \geq 、 $>$ 、 $=$)の解釈が不正解であった施設が抗菌薬1では15%、抗菌薬2では21%と予想をはるかに超えるものであった。

成績報告検討会において符号の付け方の解説をし、参加した施設は理解いただけたとともに判断した。

今回符号の付け方を再度確認する目的で、昨年同様のフォトサーベイを実施した。

図2

単位: (μg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PCG	ABPC	ABPC/SBT	PIPC	PIPC/TAZ	CMZ	CTX	CPZ/SBT	FMOX	IPM	CLDM	MINO
A	2	2	16/8	64	64/4	32	32	16/16	32	8	8	8
B	1	1	8/4	32	32/4	16	16	8/8	16	4	4	4
C	0.5	0.5	4/2	16 S	16/4	8	8	4/4	8	2	2	2
D	0.25	0.25	2/1	8	8/4	4	4	2/2	4	1	1	1
E	0.125	0.125	1/0.5	4	4/4	2	2	1/1	2	0.5	0.5	0.5
F	CP 16	2	0.5/0.25	2	2/4	1	1	0.5/0.5	1	0.25	0.25	0.25
G	8	1	0.25/0.125	1	1/4	0.5	0.5	0.25/0.25	0.5	0.125	0.125	0.125
H	4	0.5	0.125/0.06	0.5	0.5/4	0.25	0.25	0.125/0.125	0.25	0.06	0.06	Control

試料35薬剤感受性検査(フォト) 回答結果一覧表

	CMZ			CTX			IPM		
	読取り値	件数	評価	読取り値	件数	評価	読取り値	件数	評価
回答	> 32 μ g/mL (R)	30	A	\leq 0.2 μ g/mL (S)	33	A	= 1 μ g/mL (S)	31	A
回答	\geq 64 μ g/mL (R)	3	A				= 0.5 μ g/mL (S)	2	B

IPMのMIC値読取りにおいて2施設が0.5 μ g/mLと判定したが、誤差範囲である ± 1 管差であるため許容範囲内と解釈しB評価とした。

それ以外は全て正解でありA評価であった。

昨年不正解が多かった符号については全施設全て正解であり、十分理解いただけたと解釈できる。

総評

- 塗抹鏡検サーベイにおいてグラム陽性球菌の正解率は100%と良好な結果であった。
- 同定サーベイにおいて血液寒天培地上で非典型的性状である β 溶血を示す *E. faecalis* および検便からの *E. coli* の同定検査は両者とも正解率は100%と良好な結果であった。また、同定菌に対する附加試験およびコメントから、食品関連会社従業員の検便検査においての腸管出血性大腸菌を目的とした検査が十分に実施されていることが確認された。
- 薬剤感受性サーベイにおいて出題者が発育不安定な菌株を送付したにもかかわらず、全ての抗菌薬に対し正解率は100%であり、極めて良好な結果であった。
- 薬剤感受性(フォト)サーベイにおいて、IPMのMIC読取り値が1管ずれたためB評価としたが、それ以外は全てA評価であり、極めて良好な結果であった。
- 今回微生物検査部門の精度管理に49施設(1施設全問回答なし)参加いただき、全施設合わせて532問の回答をいただいた。このうち530問(99.6%)が評価A、2問(0.4%)が評価Bであり、極めて良好な結果が得られた。