

平成26年度 第31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	静岡富士病院
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、顕微鏡検査、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）

試料No.（31）が明示されたチューブに液状試料として分注されています。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ミキサー等で十分に混合してください。残った試料は検査終了まで冷蔵（4℃）しておいてください。

2-2. 同定検査用試料（試料32, 33）

試料No.（32, 33）が明示されたスワブに、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℃）しておいてください。

2-3. 同定検査および薬剤感受性検査用試料（試料34）

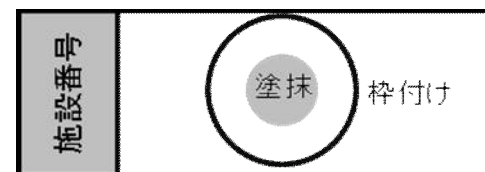
試料No.（34）が明示されたスワブに、濃度調整した菌液を吸収させてあります。速やかに適切な培地を用いて培養してください。スワブは検査終了まで冷蔵（4℃）しておいてください。

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。

II. サーベイ実施内容

塗抹検査サーベイ (試料31)



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、塗抹部をマーカー等で枠付けおよび施設番号を記載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：妊娠後期の34歳女性。

微生物検査：本菌は、膣分泌物から分離された。

問題：貴施設の日常検査法によって菌を分離し、同定検査のみを実施してください。

(試料33) 全施設対象

患者・現病歴：65歳の男性。インドネシア旅行帰国翌日より、下痢や腹痛が発生。

翌日も同様の症状が続くため消化器内科受診

微生物検査：本菌は、軟性糞便から分離された。

問題：貴施設の日常検査法によって菌を分離し、同定検査のみを実施してください。

同定・薬剤感受性サーベイ

(試料34)

患者・現病歴：45歳の女性。2日前より排尿痛を訴え、症状が悪化したため泌尿器科受診。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。

検査抗菌薬：アンピシリン（ABPC），セフトキシム（CTX），レボフロキサシン（LVFX）

薬剤感受性（フォト）サーベイ

(試料35：フォト)

*Pseudomonas aeruginosa*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（図1）の写真です。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：赤枠で囲んだレボフロキサシン（LVFX），シプロフロキサシン（CPF）のMIC値（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）および判定（S,I,R）を求めてください。

試料35

図1

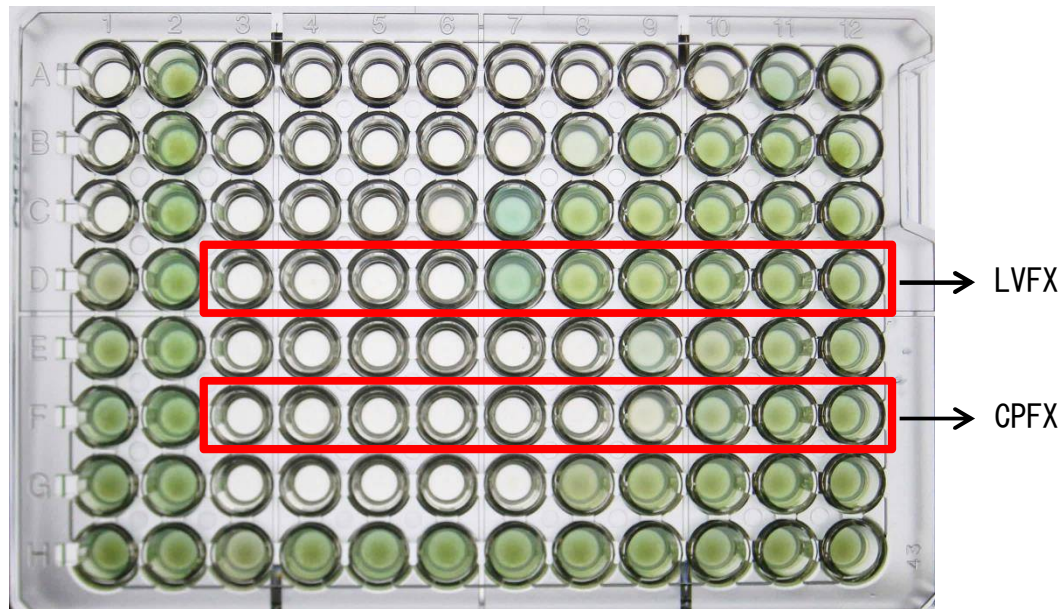


図2

単位: (μg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>TBPM</i> 4	<i>FRPM</i> 4	<i>STFX</i> 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
B	2	2	<i>GRNX</i> 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
C	1	1	<i>MFLX</i> 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
D	0.5	0.5	LVFX 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
E	0.25	0.25	<i>TFLX</i> 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
F	0.125	0.125	CPFX 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
G	0.06	0.06	<i>PZFX</i> 8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
H	0.03	0.03	<i>NA</i> 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	Control

IV.結果報告書

試料31 塗抹検査サーベイ

Escherichia coli 標準菌株(ATCC 25922)をMcF 0.5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
グラム陰性桿菌	43	93.5	正解	A
グラム陽性桿菌	3	6.5	不正解	C
合計	46			

グラム陰性桿菌 正解 : 評価A
グラム陽性桿菌 不正解 : 評価C

試料31 塗抹検査サーベイ 評価

- グラム陰性桿菌と回答された施設は、43/46施設（93.5%）と高率であった。
- グラム陽性桿菌と回答した3/46施設（6.5%）は、返却された標本を見直した結果、後染色（フクシンまたはサフラニン）が若干弱かったと見受けられ、陰性菌を陽性菌と判断されたと推察される。
- これら3施設の返却された標本を再度グラム染色した結果、明らかにグラム陰性桿菌と判断できた。
- 試料31塗抹鏡検の正解率は93.5%と高率であったが、グラム染色は微生物検査の基本であり正解率が100%となることを期待したい。

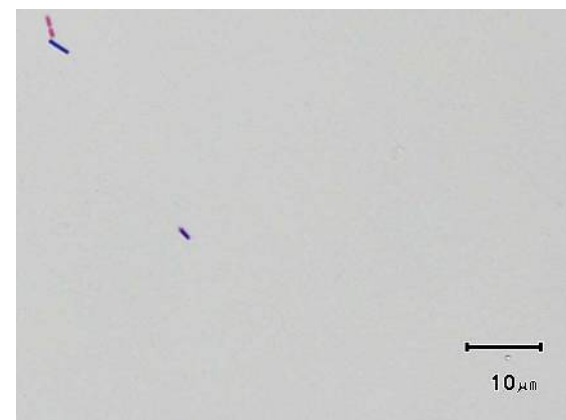
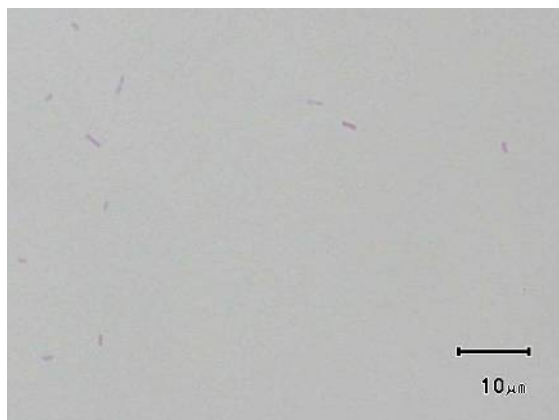
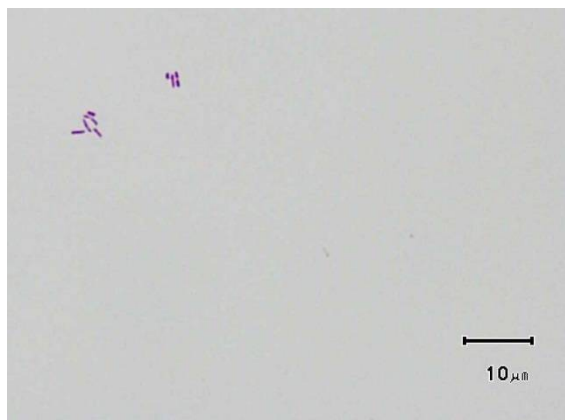
グラム陽性桿菌と回答された3施設の返却標本染色像および再染色像

施設A

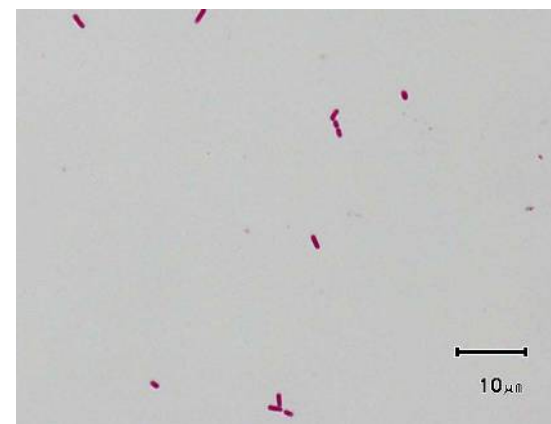
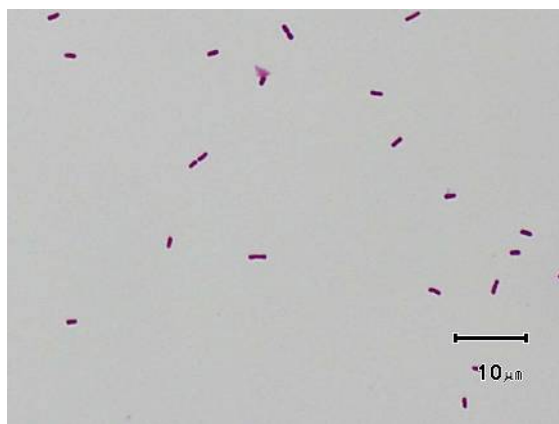
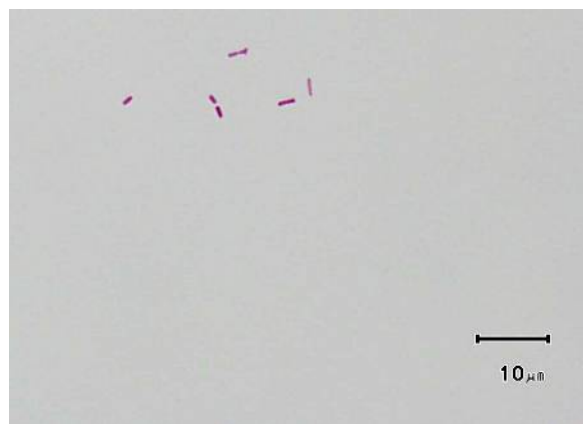
施設B

施設C

返却標本染色像



再染色像



試料32 同定検査サーベイ

妊娠後期34歳女性。妊婦健診時（妊娠35週）の膣分泌物より分離培養された*Streptococcus agalactiae*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>Streptococcus agalactiae</i>	32	94.1	正解	A
G群β- <i>streptococcus</i>	1	2.9	不正解	C
<i>Lactobacillus</i> sp.	1	2.9	不正解	C
合計	34			

S. agalactiae

G群β-*streptococcus*

Lactobacillus sp.

正解：評価A

不正解：評価C

不正解：評価C

S. agalactiae と回答された施設は、[32/34施設（94.1%）](#) と高率であった。G群β-*streptococcus* と回答された施設は、付加試験および従来法確認試験結果から判断すると回答結果の入力ミスが強く疑われるが、実際の検査業務において結果入力ミスは許されないため評価“C”とした。

Lactobacillus sp.と回答された施設は、従来法によるグラム染色でグラム陽性桿菌と判断されたにもかかわらずグラム陽性連鎖球菌用の同定キットを使用され矛盾が生じていた。

S. agalactiae は、新生児に重篤な感染症を発症させる極めて重要な細菌である。

新生児B群溶血性レンサ球菌感染症に関連する垂直感染の予防のため、近年は国内においても[妊娠33～37週に膣周辺の培養検査を行うことが推奨](#)されている。

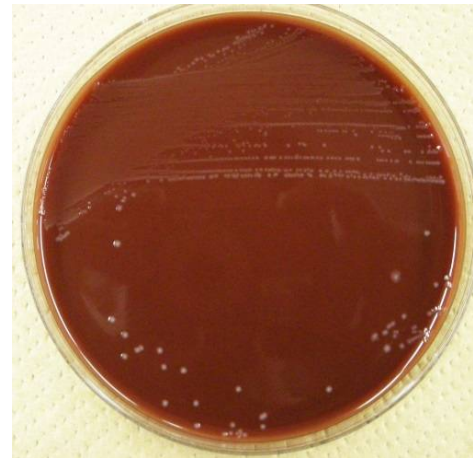
また、成人では、皮膚・軟部組織感染症、感染性心内膜炎、肺炎、尿路感染症など引き起こす。

今回試料とした株は、*S. agalactiae* の特徴的な性状である血液寒天培地上での β 溶血を示さない非溶血 (γ 溶血) の株である。このような非溶血株は稀に検出されているのが現状である。

特に妊婦における本菌のスクリーニングにおいて見逃すことはできないと考えられ、*S. agalactiae* は β 溶血であるという先入観にとらわれないことが重要と考える。



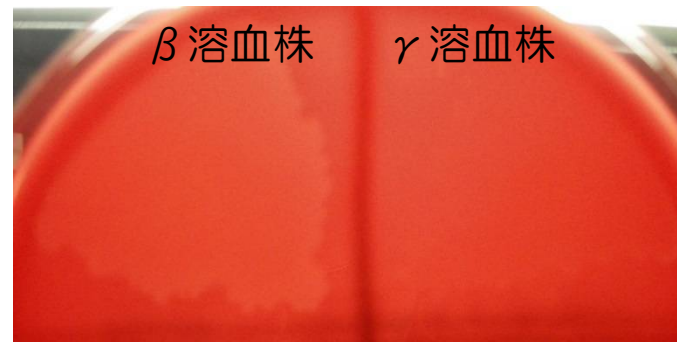
血液寒天培地



チョコレート寒天培地



BTB乳糖加寒天培地



羊血液寒天培地

しかしながら、少量の非溶血性*S. agalactiae*を常在菌叢の中から確認検出するのは困難な場合が多く、 γ 溶血株（非溶血株）の検出が未経験の技師および経験の浅い技師はなおさら困難と思われる。対応策として、色素産生培地や発色基質培地の使用も一つの方法と考える。

非 β 溶血型*S. agalactiae*の発色基質培地上のコロニー



試料33 同定検査サーベイ

65歳の男性。インドネシア旅行帰国翌日より下痢や腹痛が発生。翌日も同様の症状が続くため消化器内科受診。軟便から分離された *Plesiomonas shigelloides* 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>Plesiomonas shigelloides</i>	39	100	正解	A
合計	39			

P. shigelloides 正解：評価A

*P. shigelloides*と回答した施設は、39/39施設（100%）と全施設正解であり、極めて良好な結果が得られた。

本菌は、淡水中に広く棲息し、1983年に食中毒起因菌として指定された。

わが国での分離頻度は低く、東南アジアからの旅行者の下痢症状患者から検出される。汚染された水や魚介類を接種し経口感染する。

臨床症状としては、潜伏期間は10～20時間、下痢、腹痛が主症状でありまれに発熱、血流感染がある。

予後は極めて良好で、2～3日間で回復するとされる。糞便性状としては、多くは軟性もしくは水様便。

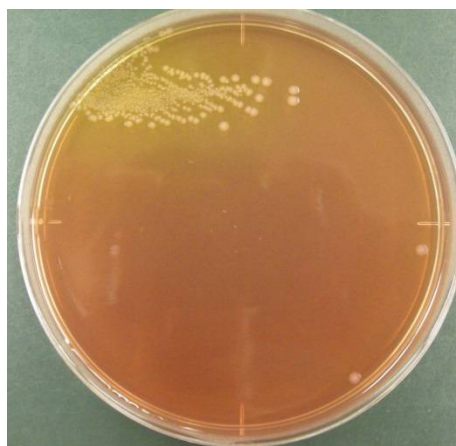
糞便培養により本菌を検出することが診断につながる。

「微生物学的特徴」

糞便からの検出には、通常SS寒天培地やDHL寒天培地を用いる。
*P. shigelloides*は、乳糖を分解しないため白糖加SSS寒天培地上では無色透明～半透明、直径1～2mm程度のコロニーを形成する。
1次同定にはオキシダーゼ試験を行い“陽性”であることを確認する。



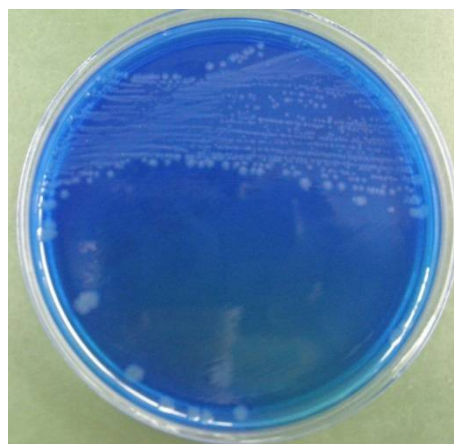
TCBS寒天培地



白糖加SSS寒天培地



マッコンキー寒天培地

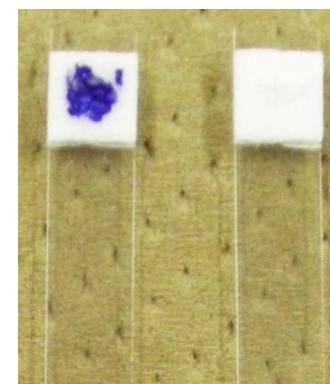


BTB乳糖加寒天培地



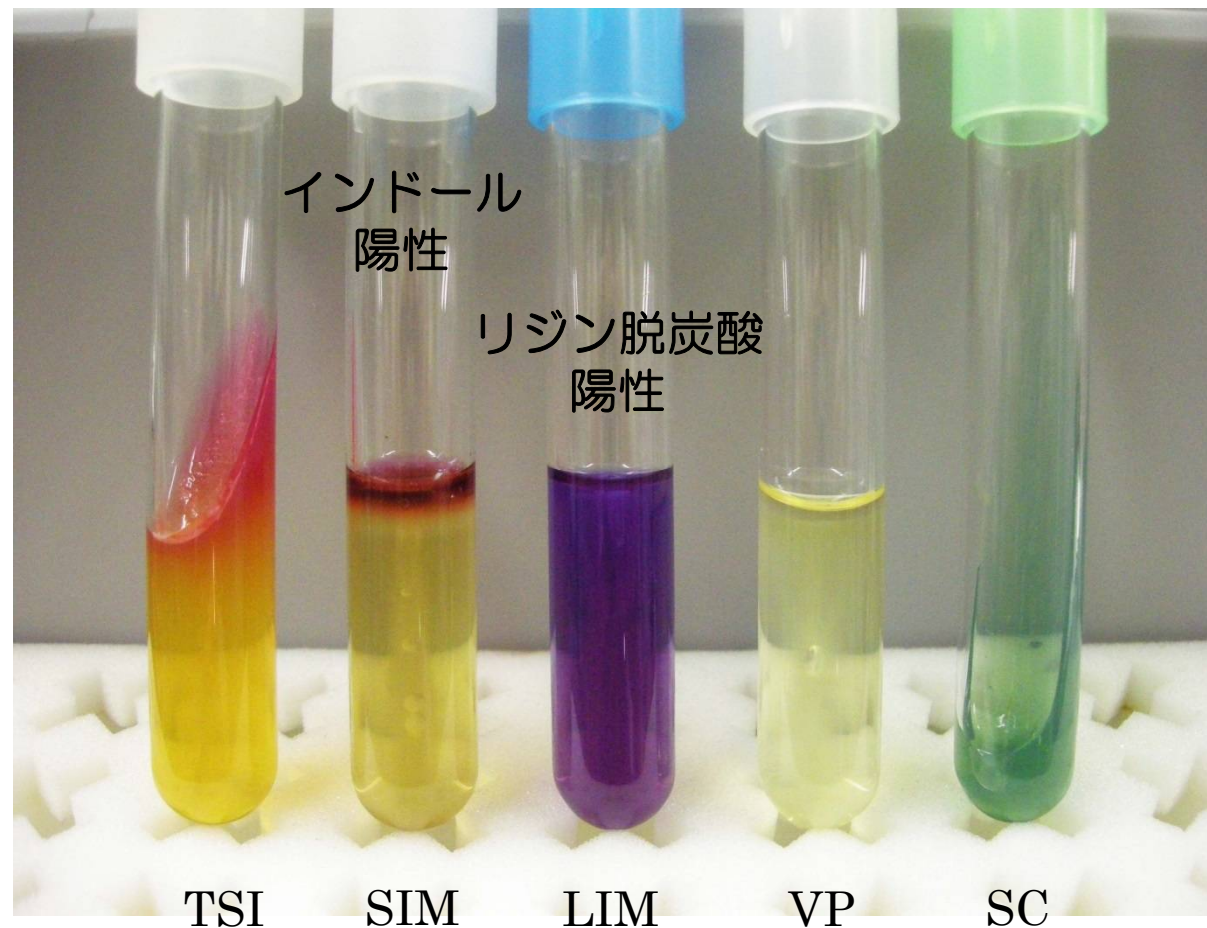
羊血液寒天培地

陽性 陰性対象



オキシダーゼ試験

Plesiomonas 属菌と *Shigella* 属菌を区別するには、オキシダーゼ試験が容易であり陽性であることを確認する。
また、LIM培地により、リジン脱炭酸“陽性”、インドール“陽性”であることから区別が可能である。



試料34 同定・薬剤感受性検査サーベイ

45歳の女性。2日前より排尿痛を訴え、症状が悪化し泌尿器科受診。尿より分離培養された *Eschericia coli* 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。

同定検査

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>Eschericia coli</i>	33	100	正解	A
合計	33			

E. coli 正解：評価A

*E. coli*と回答した施設は、33/33施設（100%）と全施設正解であり、極めて良好な結果が得られた。

*E. coli*によって引き起こされる疾病は、腸管感染症と腸管外感染症に大別される。腸管外感染症である急性単純性膀胱炎や急性腎盂腎炎の起炎菌の大半は*E. coli*が占める。

「微生物学的特徴」

大多数の菌株は乳糖を分解する。したがって、乳糖を含有するBTB乳糖加寒天培地では黄色のコロニーを形成する。

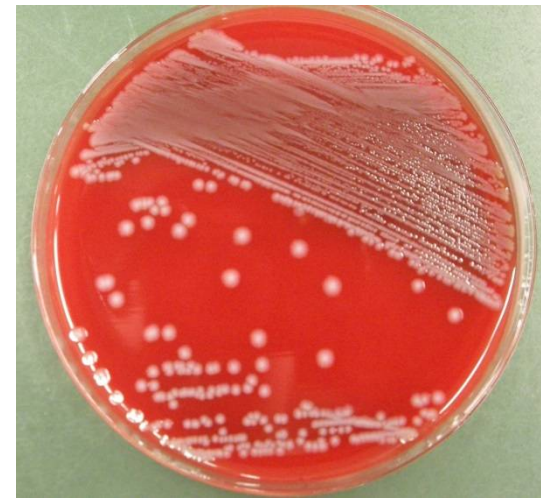
マッコンキー寒天培地では赤色コロニーを形成し、胆汁酸を析出するためコロニーが混濁する。



BTB乳糖加寒天培地

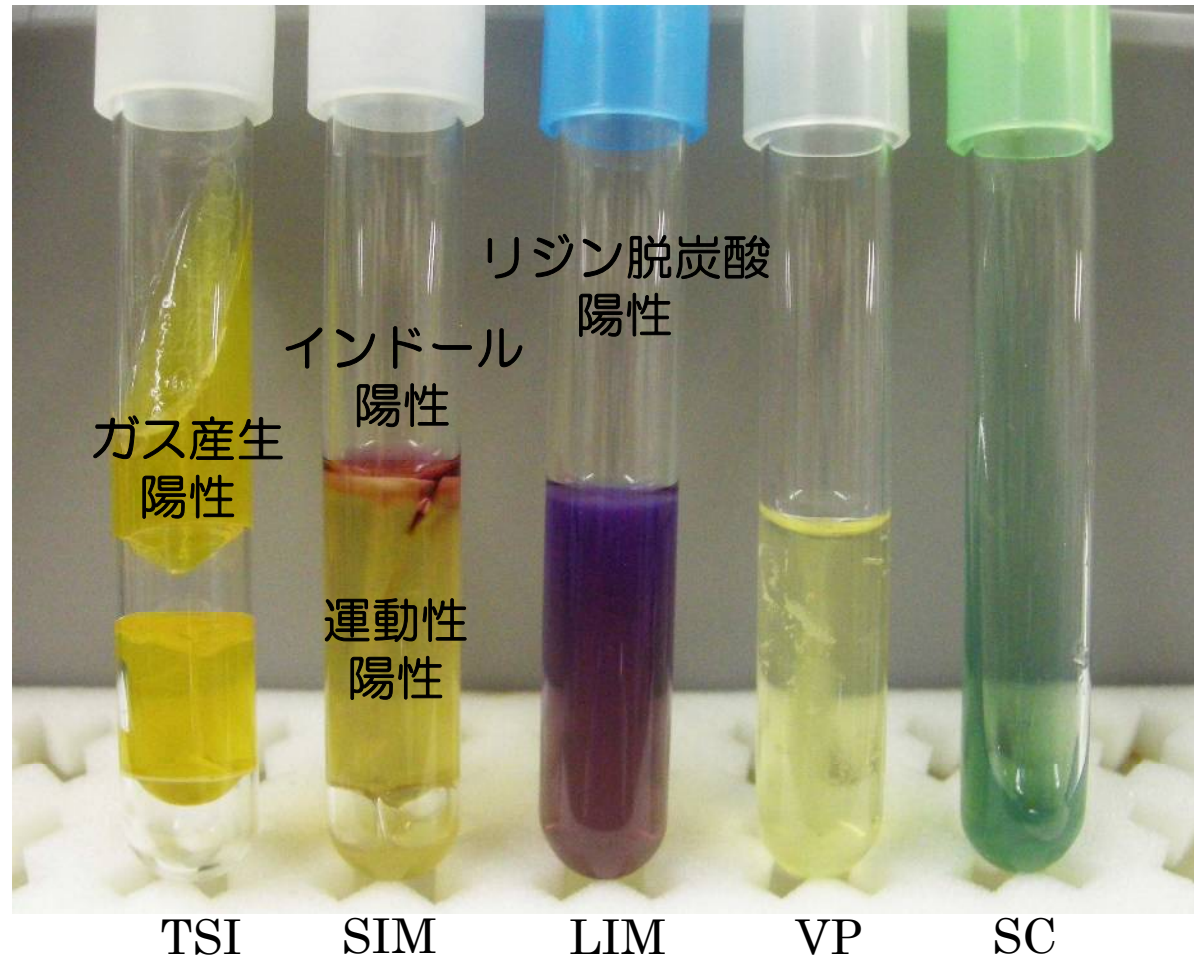


マッコンキー寒天培地



羊血液寒天培地

一般的には、ブドウ糖を発酵的に分解し、ガス産生“陽性”で、乳糖・白糖を発酵的に分解する。
インドール産生“陽性”、リジン脱炭酸“陽性”、運動性“陽性”である。



試料34 同定・薬剤感受性検査サーベイ

薬剤感受性検査

試料33 薬剤感受性検査 各薬剤判定値回答一覧表

抗菌薬	件数	(%)	判定	正解	評価
ABPC	30	96.8	S	正解	A
	1	3.2	I	不正解	C
CTX	31	100	S	正解	A
LVFX	31	100	R	正解	A

ABPCの判定“S”を正解：評価A
“I”を不正解：評価C

CTXの判定“S”を正解：評価A

LVFXの判定“R”を正解：評価A

各抗菌薬の判定値は、ABPCが**96.8%**、CTXが**100%**、LVFXが**100%**の正解率であり、極めて良好な結果が得られた。

各抗菌薬の測定方法は、ABPCおよびLVFXは全施設（100%）が微量液体希釈法を、CTXは2施設（6.1%）がディスク法、29施設（93.9%）が微量液体希釈法を採用していた。

今回試料とした *E. coli*（臨床分離株）は、ドライプレート“栄研”を用いて薬剤感受性検査を4日間二重測定（合計8回測定）した結果、MICはABPC：4 µg/mL、CTX：≤0.12 µg/mL、LVFX：>8 µg/mLと判断され、**レボフロキサシン耐性 *E. coli***であることを確認した。

薬剤感受性検査は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の基準に準拠した方法が多く、の微生物検査室で採用されている。CLSI基準の内容は頻回に更新され常に最新の基準を用いることが求められている。

しかしながら、システム化された微生物同定・薬剤感受性測定装置において常に最新の基準を採用することは困難であることは周知のごとくである。

そこで今回、MIC値から最新の基準CLSIドキュメントM100-S22に準拠した判定および抗菌薬測定濃度を採用しているか判断した。

（現在M100-S24が最新）

CLSIドキュメントM100-S22における*E. coli*の薬剤感受性判定基準を表1に、M100-S19からM100-S20の変更に伴う大きな改正を表2に示す。

表1

抗菌薬名	S (感性)	I (中等度耐性)	R (耐性)
ABPC	≤ 8	16	≥ 32
CTX	≤ 1	2	≥ 4
LVFX	≤ 2	4	≥ 8

単位：μg/mL

表2

	M100-S19			M100-S20		
	S	I	R	S	I	R
ABPC	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32
CTX	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4
LVFX	≤ 2	4	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8

単位：μg/mL

各抗菌薬のMIC分布

【ABPC】

ABPC	≤2	≤4	4	≤8	8	16
件数	1	6	7	11	5	1
(%)	3.2	19.4	22.6	35.5	16.1	3.2

単位：μg/mL

CLSIにおける感性（S）基準である ≤ 8 μg/mLと32施設（96.8%）が回答した。

また、今回ABPC 4 μg/mLの株であるため、±1管差に収まり非常に安定した結果が得られた。

16μg/mL（I）と回答した1施設は、MIC値2管の差を生じているため、総合的に判定（I）は不正解とした。

【CTX】

ディスク法（2施設）

阻止円28mm、29mmの計測でS（感性）判定であった。

微量液体希釈法（29施設）

CTX	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	≤ 8
件数	3	18	5	3
(%)	10.3	62.1	17.2	10.3

単位： $\mu\text{g}/\text{mL}$

CLSIにおける感性（S）基準は $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。

微量液体希釈法で実施した29施設は全てS（感性）判定を回答し100%の正解率であった。

しかし、 $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ と回答した5施設（同一分析器）および $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ と回答した3施設（同一分析器の薬剤感受性パネル使用）は、CLSIドキュメントM100-S20以降のブレイクポイントへの変更や低濃度領域測定可能な薬剤パネルへの変更など改善が望まれる。

【LVFX】

微量液体希釈法（31施設）

LVFX	>2	>4	≧8	>8
件数	1	18	8	4
(%)	3.2	58.1	25.8	12.9

単位：μg/mL

CLSIにおける感性（S）基準は ≤ 2 μg/mL、中等度耐性（I）基準は4μg/mL、耐性（R）基準は ≥ 8 μg/mLである。

31施設は全て（R）判定を回答し100%の正解率であった。

しかし、 >2 μg/mLと（I）およびRの判断ができない濃度測定施設があった。この施設はディスク法で追加試験を実施し、（R）であることを確認しており、CLSI判定基準を理解した上での追加試験と判断できた。

市中尿路感染症の主な起炎菌である*E. coli*におけるLVFX耐性はどの施設でも検出され、経験済みと思われる。自施設における経年的耐性率を算出し、動向確認や現状を把握することも微生物検査室の重要な業務であると考えられる。

試料35 薬剤感受性（フォト）サーベイ

Pseudomonas aeruginosa 標準菌株(ATCC 27853)を用いて薬剤感受性検査（微量液体希釈法）を実施し、マイクロプレート写真を写真撮影し、マイクロプレートの実寸大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、LVFX：（＝）1 μ g/mL（S）、
CPFX：（＝）0.25 μ g/mL（S）である。

試料35 薬剤感受性検査 各薬剤判定値回答一覧表

抗菌薬	件数	(%)	判定	正解	評価
LVFX	33	100	S	正解	A
CPFX	33	100	S	正解	A

LVFXおよびCPFXの判定値は両者ともに、33/33施設（100%）が正解であり、極めて良好な結果が得られた。

各抗菌薬のMIC値（読み取り値）を示す

【LVFX】

LVFX	件数	(%)	正解	評価
1 µg/mL	33	100	正解	A

【CPFX】

CPFX	件数	(%)	正解	評価
0.125 µg/mL	1	3	許容範囲	B
0.25 µg/mL	31	96	正解	A
0.5 µg/mL	1	3	許容範囲	B

LVFXのMICは、**33/33（100%）**が真値である1µg/mLと読み取り、極めて良好な結果が得られた。

CPFXのMICは、**31/33（94%）**が0.25µg/mL、**1/33（4%）**が0.125µg/mLおよび**1/33（4%）**が0.5µg/mLと回答した。真値は0.25µg/mLであるが、フォト印刷の影響およびMIC値は±1管差は誤差範囲であり、極めて良好な結果が得られたと判断できる。

各抗菌薬の符号を以下に示す

【LVFX】

LVFX	件数	(%)	正解	評価
=	28	84.9	正解	なし
≦	4	12.1	不正解	なし
≧	1	3	不正解	なし

【CPFX】

CPFX	件数	(%)	正解	評価
=	26	78.8	正解	なし
≦	6	18.2	不正解	なし
≧	1	3	不正解	なし

LVFXおよびCPFXともに “=” を正解、それ以外を不正解とした。

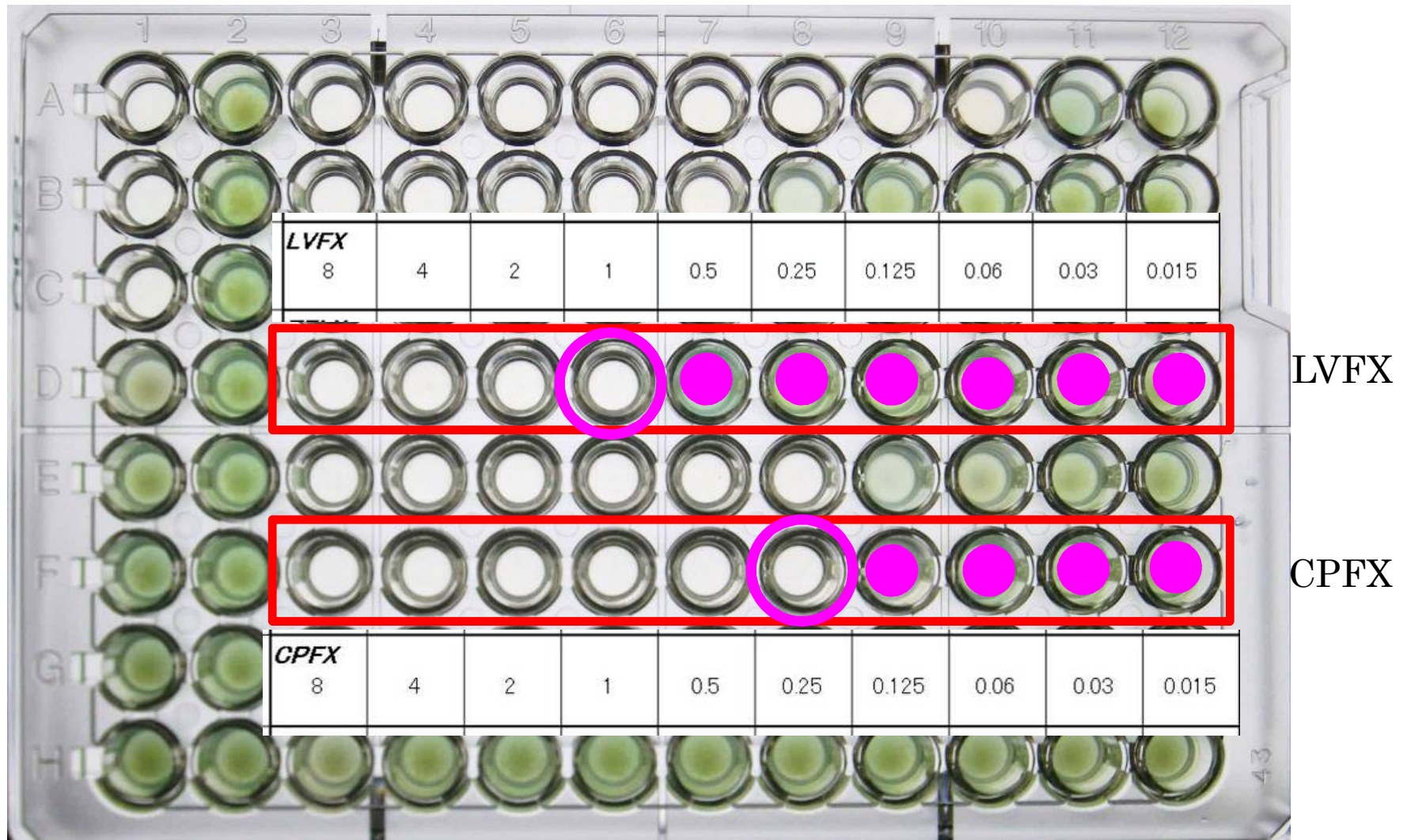
今回提示したものは、LVFXおよびCPFXともに0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の10段階希釈濃度を測定可能範囲としたマイクロプレートを使用している。

最低濃度である0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウェルに菌の発育を認めなければ、MIC（最小発育阻止濃度）は、0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度となり、表現方法は、 $\leq 0.015\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

また、最高濃度である8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウェルに菌の発育を認めた場合は、MIC（最小発育阻止濃度）は、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含めず8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度となり、表現方法は、 $> 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ または $\geq 16\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

最低濃度以外のウェルでMIC（最小発育阻止濃度）判定をした場合の符号は全て“=”となる。

今回、出題者のJAMT-QCシステム設定不備により、符号回答における評価が不能であるが、不正解である施設は評価Cと同等である。不正解の施設は、MIC値判定における符号の表現を、再度確認していただきたい。



LVFX (=) 1 μ g/mL

CPFX (=) 0.25 μ g/mL

MIC値判定における符号の付け方



- ✓ 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウエル全て発育を認めない

MIC値は、 $\leq 0.015\mu\text{g}/\text{mL}$

- ✓ 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウエルに発育を認め、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウエルは発育を認めない

MIC値は、(=) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- ✓ 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウエルに発育を認める場合

MIC値は、 $> 8\mu\text{g}/\text{mL}$ または $\geq 16\mu\text{g}/\text{mL}$

V. 総評

- ① 塗抹鏡検サーベイにおいてグラム陰性桿菌の正解率は93.5%と良好な結果が得られた。
- ② 同定サーベイにおいて*S. agalactiae* の正解率は94.1%、*P. shigelloides* の正解率は100%、*E. coli* の正解率は100%と極めて良好な結果が得られた。
- ③ 薬剤感受性サーベイにおいて*E. coli* におけるABPC “S” 判定96.8%の正解率、CTX “S” 判定100%の正解率、LVFX “R” 判定100%の正解率と極めて良好な結果が得られた。
- ④ 薬剤感受性（フォト）サーベイにおいてLVFXおよびCPFXともに “S” 判定100%の正解率、LVFX のMIC値 1 μ g/mLは100%の正解率、CPFXのMIC値 0.25 μ g/mLは許容範囲も含め100%であり極めて良好な結果が得られた。
しかし、MIC値に付ける符号の設問では、LVFXは84.9%、CPFXでは78.8%の正解率であった。薬剤感受性プレートを目視判定したことが無い、あるいは経験が少ないことによる影響も考えられるが、不正解の施設は符号表現方法を再度確認していただきたい。

⑤ 今回微生物検査部門の精度管理に49施設参加いただき、全施設合計379問の回答をいただいた。

このうち373問が評価A+Bであり、**373/379 (98.4%)**が良好な結果であった。

評価C判定をしたものは6問であり、**6/379 (1.6%)**と僅かであった。

参加49施設における評価A+Bの占める割合は**97.96%**と極めて高率であり、総合的に非常に正解率の高い精度管理であった。