

## 微生物検査部門

微生物学的検査とは、感染症を疑う患者から提出された検体(喀痰や尿、血液など)より、原因となる微生物(起炎菌)を検出し、治療に必要なデータを報告する部署です。感染症とは、起炎菌が特定の臓器に感染し、発熱や痛みなどの症状を呈する病状であり、種々の技術を駆使した起炎菌の検出及び解析が治療にとっては必要不可欠となります。また、微生物は多種多様で、薬剤耐性菌や易感染患者の増加等の背景から、治療困難な例が多くなってきています。微生物検査部門では、このような患者の身体で起こっている感染症を、採取された検体から検査する部門であり、迅速で正確なデータを医師に提供出来るように努めています。そのデータを基に、ICT(感染制御チーム)や AST(抗菌薬適正使用支援チーム)のメンバーとしても活動しています。

### 当院で行っている主な微生物検査と活動

- ①検体の肉眼的評価 ②顕微鏡学的検査 ③培養検査 ④同定感受性検査 ⑤イムノクロマト検査 ⑥核酸増幅検査
- ⑦その他 ⑧抗酸菌検査 ⑨チーム医療

#### ①検体の肉眼的評価

感染症に罹患した患者から採取される検体は、起炎菌や病状などにより、色や性状、臭気など大きく変化します。その変化を肉眼的に観察します。また、提出された検体が検査に適しているかの評価も同時に行い、検査に適していなければ再採取を依頼し、意味のあるデータ報告に努めています。



(写真)肺炎球菌性肺炎患者から採取した膿性痰



(写真)赤痢菌患者から採取された粘血便

M&J分類	
M1	唾液
M2	粘液成分の中に少量膿性痰が含まれる
P1	膿性痰で膿性部分が1/3以下
P2	膿性痰で膿性部分が1/3～2/3
P3	膿性痰で膿性部分が2/3以上

(表)喀痰が検査に適しているか評価する M&J 分類 P1～P3 痰でなければあまり検査に適していない

#### ②顕微鏡学的検査

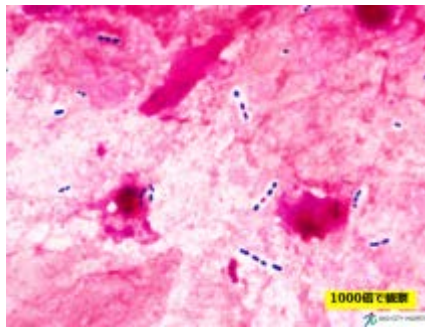
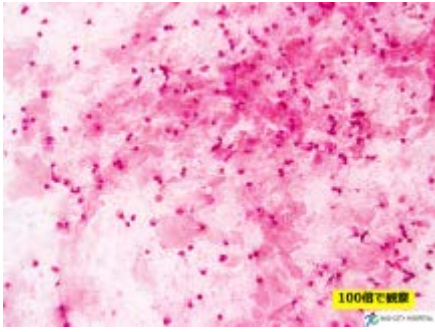
顕微鏡学的検査は、実際に採取した検体から標本を作製し、採取された検体部位(感染臓器)がどのような状態か？起炎菌は何か？を調べます。微生物(細菌)は数 $\mu\text{m}$ と非常に小さく、1000倍という高倍率で観察します。また微生物だけでなく、同時に出現している細胞や種々の成分も同時に観察し、感染臓器の状態や起炎菌推定の材料として使います。染色方法は、基本的にグラム染色や抗酸菌染色(チール染色・蛍光染色)を実施し、必要な場合はギムザ染色やヒメネス染色(レジオネラ)等を行っています。



(写真 1)検体のグラム染色

(写真 2)複数の顕微鏡を使い、医師とディスカッションを行える

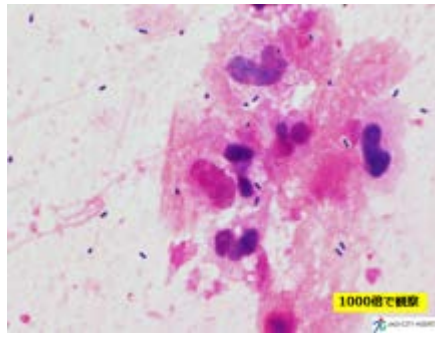
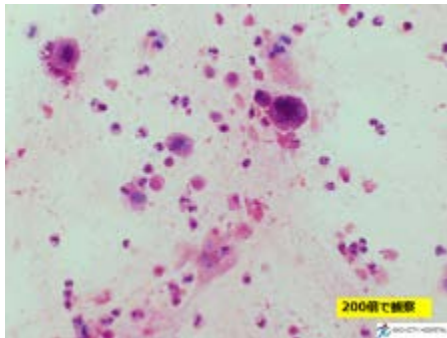
### 症例 1)



(写真1)100倍では赤みの強いフィブリンや好中球(白血球の仲間)の集積が認められ、肺胞の炎症が示唆される。(写真2)1000倍では、青く比較的球状に近い連なった(ランセット状)微生物の肺炎球菌が認められる。

(写真1) 大葉性肺炎患者から採取された喀痰グラム染色 (写真2) 同一検体を1000倍に拡大したもの

### 症例 2)

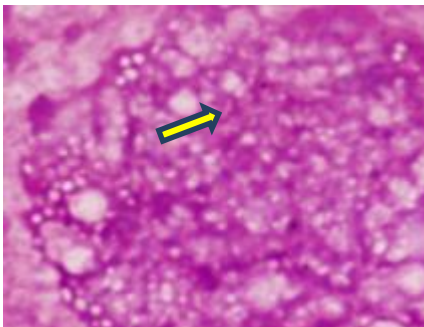


(写真3)好中球以外に、リンパ球やマクロファージ等の細胞が認められる。(写真4)肺炎球菌による感染も同時に認めるが、背景よりマイコプラズマ等の非定型性肺炎も疑う。検査の結果、マイコプラズマ肺炎罹患後の二次性肺炎球菌性肺炎であった。

(写真3)別患者の喀痰グラム染色

(写真4)同一検体を1000倍にしたもの

### 症例 3)



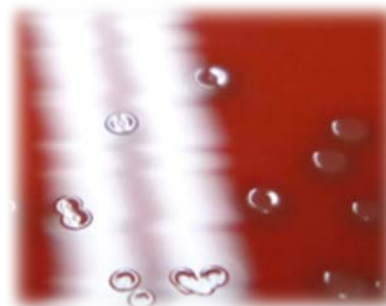
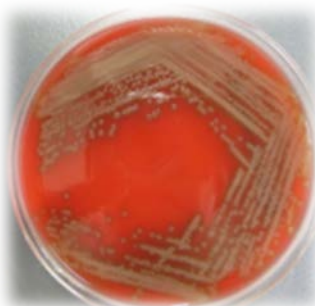
(写真5)マクロファージ内にグラム染色では染まらない抗酸菌を認める。同一検体をチール染色すると、(写真6)の中央部に赤い棒状の桿菌を認める。検査の結果、非結核性抗酸菌であった。

(写真5)喀痰グラム染色での抗酸菌

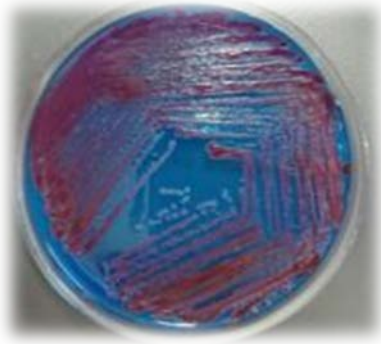
(写真6)同一検体のチール染色

## ③培養検査

検体を寒天状の培地に塗り適正温度で培養すると、培地表面では微生物が増殖しコロニーという単位を形成します。そのコロニーの性状から菌種を推定し、同定感受性検査を行います。微生物は必要な栄養素や発育温度・酸素濃度等が個々に違い、それぞれ条件にあった培地や条件で培養します。基本的な培地にヒツジ血液寒天培地があり、ブドウ糖などの発育に必要な栄養素に、ヒツジ血液を5%濃度で添加したものです。これは様々な微生物が発育するように考えられたもので、それでも発育しない場合は脱繊維処理したチョコレート寒天培地を用いたりします。培養で発育しない微生物は、その他の方法で検査します。



(写真9)炭酸ガス培養にて発育した肺炎球菌(血液寒天培地) (写真10)肺炎球菌コロニーの拡大。中央部が凹んだ特殊な形をしている



(写真)赤色色素を産生するセラチア菌(BTB 寒天培地)



(写真)緑色色素を産生する緑膿菌(ミュラーヒントン培地)

また MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)や ESBL(基質特異性拡張型βラクタマーゼ)/MBL(メタロβラクタマーゼ)等の第三世代セフェム系が耐性となる腸内細菌科グラム陰性桿菌などの薬剤耐性菌スクリーニングを行うために、種々の選択培地を取り入れています。



(写真)MRSA スクリーニング培地に発育した MRSA



(写真)基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌スクリーニング培地に発育した大腸菌  
上)MBL 産生陽性 下)ESBL 産生陽性

#### ④ 同定・薬剤感受性検査

コロニーから推定された微生物がどのような菌であるか調べる検査を『同定検査』といいます。またその微生物がどの抗菌薬にどれくらい効果があるか調べる検査を『薬剤感受性検査』といいます。この 2 種類の検査は感染症を治療する上で重要なデータとなる為、正確性と迅速性を求められます。感染症治療は特に迅速性が求められるため、これらの検査は自動機器を用いてリアルタイムに報告出来る体制にしています。また同定が難しい場合は、質量分析器による同定にも対応(外注)しています。自動機器では対応困難な菌種(赤痢菌など)は用手法での同定も行っています。従来菌による同定結果(推定を含める)は検査当日、およそ 3~8 時間以内に報告出来る様に努めています。



(写真)全自動同定感受性機器



(写真)検査用パネル 酸化還元反応を用いて同定感受性検査を行う

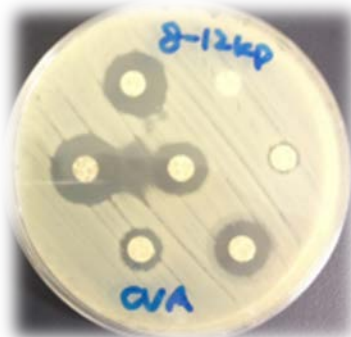


(写真)赤痢菌の用手法による同定検査

ESBL や MBL 産生腸内細菌科様グラム陰性桿菌や MRSA などの薬剤耐性菌は、判明に時間がかかると致命的になり兼ねないため、いち早い報告が必要となります。当院では、各種スクリーニング検査や感受性パターン、薬剤耐性菌精査などから、検体提出翌日には耐性菌報告をしています。また耐性結果となった薬剤に関しては、一定の精度を保ちつつリアルタイムに報告できるように努めています。通常は MIC(最小発育阻止濃度法)で報告していますが、DISK 拡散法による薬剤感受性も一部実施しています。

当院で検出された IMP 型 MBL 産生肺炎桿菌

PIPC	=>	128	R
ABPC/SBT	=>	32	R
TAZ/PIPC	=	8	R
CPZ	=>	64	R
CAZ	=>	32	R
CFR	=>	32	R
CFPM	=	16	R
CPZ/SBT	=>	32	R
LMOX	=>	64	R
AZT	=	8	R
IPM/CS	<=	1	R
MEPM	=	8	R
AMK	<=	8	S
GM	=	4	S
TOB	=	8	I
MINO	=>	16	R
LVFX	=>	8	R
CPFX	=>	4	R
GFLX	=>	8	R
ST	<=	19	S



(写真)精査にて阻止円の拡大を認める (左)ESBL 産生 (右)MBL 産生

(写真)イムノクロマト法 IMP 陽性

(写真)MBL 産生肺炎桿菌の MIC 値

## ⑤ イムノクロマト検査

培養にて検査出来ない微生物(培地に発育しない菌やウイルス)や、早期発見治療が望まれる感染症の起炎菌判別にはイムノクロマト法という検査を実施します。イムノクロマト法は目的とする微生物の抗原を検出する検査方法で、15~30 分程で結果が分かる所がメリットです。当院で実施しているイムノクロマト法は以下の様なものがあります。

ウイルスに対する検査：

インフルエンザウイルス アデノウイルス(呼吸器・消化器) RS ウイルス  
ノロウイルス ロタウイルス デング熱ウイルス

ウイルス以外の微生物に対する検査：

A 群溶血性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*) 肺炎球菌(尿・髄液)  
レジオネラ(尿) クラミジア(STD) マイコプラズマ *Clostridium difficile* 毒素  
(CD トキシン)



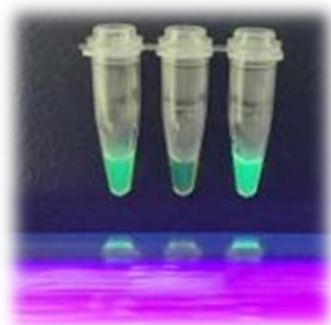
(写真)尿を使って肺炎の起炎菌(肺炎球菌とレジオネラ)を調べる検査 上)肺炎球菌 陽性 下)レジオネラ陰性

## ⑥ 核酸増幅検査

当院で行っている核酸増幅検査は LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を採用しています。項目は結核菌を実施しており、院内感染対策として迅速な結核菌検出(約 1 時間)を行っています。

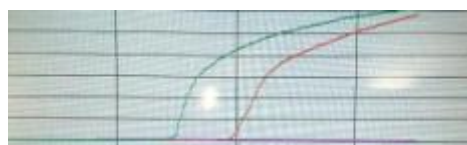


(写真)結核菌群核酸増幅検査装置



(写真)結核陽性例：左から検体・陰性コントロール・陽性コントロール

産生されるピロリン酸 Mg にて UV 下で蛍光色を発する



(写真)反応曲線 緑:陽性コントロール 赤:検体  
ピンク:陰性コントロール

## ⑦その他

真菌感染症の補助診断としてβD グルカンの院内実施もしています。全身性真菌感染は診断が難しく、培養検査でも発育しにくいいため、血清を使用した検査による迅速報告が求められます。血清中の真菌細胞壁成分を捉えて数値化し、全身性真菌感染かどうか判断します。



(写真)β-D グルカン測定装置

全身性真菌感染に対する感度に優れており、検査は約 1 時間程度

血液培養検査は 24 時間 365 日検査対応しています。自動機器とシステムを構築し、培養陰性の検体に関しては 24 時間毎にリアルタイムに自動報告しています。自動報告する事により、敗血症の除外診断が常に行える環境となっています。



(写真)全自動血液培養装置

血液培養陽性の場合には出来る限りの情報を当日に報告出来る様、時間外担当者と担当者が協力できる体制にしています。休日の陽性でも 24 時間以内に中間報告、48 時間以内には最終報告出来る様に努めています。



(写真)細菌検査管理システム 血液培養の一括管理や 24 時間自動報告が可能になる

## ⑧抗酸菌検査

抗酸菌は *Mycobacterium*(マイコバクテリウム)といい、代表的なものに結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)があります。昔の日本は結核の罹患率も高く、死亡率も高く怖い感染症でした。現在は治療の発展、検査の進歩により治らない感染症ではなくなっています。しかし、結核菌は空気感染し、ヒト-ヒト感染を起こすため、感染対策をする上では非常に重要な微生物になります。また肺だけでなく全身の臓器で感染が可能なこと、薬剤耐性結核菌が出現したこと、以前感染していた結核を再発症するなど、現在日本では感染する人が再び増加しているため、抗酸菌検査が出来る体制が院内で必要となっています。



(写真)喀痰中に認められた抗酸菌(チール染色)

抗酸菌は塗抹検査と培養検査、同定感受性検査(外注)、核酸増幅検査を実施しています。

塗抹検査は集菌法による蛍光染色を実施し検出感度を高めています。

培養検査は液体培地を用いて培養しています。抗酸菌は一般的な細菌と比べ発育が遅いために、6週間培養します。



培養後陽性となった検体は固形培地(小川培地)で培養しコロニーを発育させます。同定は質量分析で行い、正確な菌種同定に努めています。薬剤感受性も結核菌、非結核性抗酸菌ともに対応しており MIC 値にて報告しています。

(写真)抗酸菌全自動液体培養装置

### ⑨チーム医療

微生物検査は耐性菌の院内伝播を防ぐ院内感染対策チーム(ICT)や、耐性菌を生み出さないための抗菌薬適正使用

支援チーム(AST)が必要とされています。これらのチームではICD(医師)や他職種のスタッフと毎週院内ラウンドを行っています。院内で検出されている微生物や耐性菌の種類、それらの動向をデータ化し情報提供を行っています。また微生物に対する知識を深めてもらうために、院内スタッフに向けた勉強会や研修等も行っています

2019年 香川県立病院 アンチバイオグラム表(全検体)

薬剤感受性	MIC-700		MIC-80		MIC-1000		* 12種類の抗酸菌種別を区別する											
	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	
全てのStaphylococcus	103	40	15	47	47	47	47	51	47	56	51	25	100	95	100	100	100	100
MSSA	36	33	39	39				100	100	100	91	69	81	97	83	100	100	100
MSSA	74	67	41	41				100	100	100	91	74	75	99	70	100	97	100
MSSA	38	49	R	R				R	R	R	13	21	21	53	66	100	100	100
MSSA	39	51	R	R				R	R	R	31	9	18	62	36	100	100	100
Staphylococcus species(CNS)	27	48	7	4	44	44	44	44	44	44	63	33	76	100	79	85	100	100
Staphylococcus aureus	34	56	13	7	62	62	62	62	62	62	88	42	74	97	64	94	100	100

注: Staphylococcus aureus : MSSA 入院 11%, 外来 32%, Staphylococcus species : メチシリン耐性率 入院 56%, 外来 32%

薬剤感受性	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS		
全てのEnterococcus	47	55	76	77	60	21	94	100	100
Enterococcus faecalis	74		100	100	67	14	100	100	100
Enterococcus faecium	19		R	R	7	33	100	100	100

注: Enterococcus 腫瘍科(ワタリ) 10%, ワタリ科 科内ワタリ科以上薬剤耐性

薬剤感受性	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS				
Streptococcus pneumoniae	28		93		100	100	100	86	89	7	39	82	100
Streptococcus pyogenes(GAS)	30		100	100	100	100	100	97	66	93		100	
Streptococcus agalactiae(GBS)	25		100	100	100	100	67	53	70			100	
α-Streptococcus	20		90	90	100	100	100	85	61	89		100	

注: Streptococcus pneumoniae : PCG非感受性 7% (非腫瘍科由来種のみPISPのみ) PRSP検出割合

(表)当院で検出された微生物毎による各抗菌薬の感受率(アンチバイオグラム表の一部) 数字(%)が高いほど菌に対して効果が高い