

微生物検査成績

1. 細菌同定 (3株)
2. 感受性検査 (2株)
3. グラム染色 (1検体)
4. フォトサーベイ (2題)
5. 新型コロナウイルス遺伝子検査 (2検体)

微生物検査担当

石黒 千晶

伊勢赤十字病院

山田 里子

市立伊勢総合病院

令和4年度 微生物精度管理 評価基準

- ・同定検査は、【設問1（試料1）】*Neisseria gonorrhoeae*、【設問2（試料2）】*Staphylococcus lugdunensis*、【設問3（試料3）】*Escherichia coli*（ESBLs）の臨床由来株を用いました。

試料1は、正解菌名、属名までの回答を評価A、菌の発育不良を許容範囲正解とし、それ以外を評価Dとしました。試料2および試料3は正解菌名の回答を評価Aとし、それ以外を評価Dとしました。

- ・【設問2（試料2）】の薬剤感受性試験はCLSIドキュメントM100-ED32:2022を基準にMIPIC S（感性）、VCM S（感性）と判定した施設を評価A、それ以外を評価Dとしました。

CEZの判定については、M100-ED23以降MIPICまたはCFXの結果に準じることになっており削除されています。M100-ED22を採用した場合はS（感性）となります。よってCEZ S（感性）と判定した施設を評価A、それ以外を評価Dとしました。

- ・【設問3（試料3）】の薬剤感受性試験はCLSIドキュメントM100-ED32:2022を基準にABPC、CTXともにS（耐性）、MEPM（感性）と判定した施設を評価A、それ以外は評価Dとしました。

- ・【設問4（試料4）】のグラム染色は、*Escherichia coli* ATCC 25922を用いました。グラム陰性桿菌と回答した施設を評価A、それ以外を評価Dとしました。

- ・【設問5（試料5）】フォトサーベイには、フォト1 *Vibrio vulnificus*、フォト2 *Fusarium solani* の臨床由来株を用いました。フォト1は、正解菌の推定菌名の回答を評価A、それ以外を評価Dとしました。フォト2は、正解菌の推定菌属までの回答を評価A、それ以外を評価Dとしました。

- ・【設問6（試料5、6）】新型コロナウイルス遺伝子検査は、試料5に陽性検体（40copy/ μ L）、試料6に陰性検体（10000コピー/mL）を使用しました。試料5は陽性と回答した施設を評価A、それ以外を評価D、試料6は陰性と回答した施設を評価A、それ以外を評価Dとしました。

【設問 1 (試料 1)】 *Neisseria gonorrhoeae* (臨床由来株)

20 歳代、男性。強い排尿時痛と尿道口から出る膿を自覚し、泌尿器科を受診した。尿道の膿性分泌物より本菌が検出された。

●この細菌の菌名を同定してください。

同定検査結果

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	18 施設
<i>Neisseria</i> sp.	3 施設
発育認めず	3 施設

回答のあった 24 施設中 21 施設が正解、発育を認めなかった 3 施設は許容範囲正解とし、正答率は 100%となりました。

【同定機種および方法別施設数】

<生化学的性状による同定>

VITEK2 シリーズ	6 施設
MicroScan WalkAway	4 施設
Phoenix	1 施設
用手法同定キット	4 施設

<質量分析による同定>

MALDI バイオタイパー	8 施設
VITEK MS	1 施設

出題菌株の解説

Neisseria gonorrhoeae (淋菌) はグラム陰性球菌で、腎臓型またはそら豆型の向かい合った双球菌をなす。至適発育温度は 35~37°C、炭酸ガスにより発育が良好となる。カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性。尿道や性器に感染し、男性は前立腺、副睾丸、女性は膣、子宮内膜、卵管、卵巣の可能性疾患を起こす。全身に播種し、菌血症、心内膜炎、関節炎を起こすこともある。ほかに、産道感染による膿漏眼(新生児)、淋菌性咽頭炎、直腸炎などがある。

<出典> 臨床微生物検査 技術教本より改変

【設問 2 (試料 2)】 *Staphylococcus lugdunensis* (臨床由来株) MSCNS

70 歳代、女性。発熱、腰痛があり近医を受診した。既往歴に糖尿病、左変形股関節炎（人工骨頭置換 術施行）あり、精査・加療のため入院。入院時採取された血液培養より本菌が検出された。

- ①この細菌の菌名を同定してください。
- ②CEZ（セファゾリン）、MPIPC（オキサシリン）、VCM（バンコマイシン）について薬剤感受性を測定してください。判定値（S, I, R）は、本菌で報告すべき判定を回答してください。

【同定結果】

<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	25 施設
-----------------------------------	-------

回答のあった 25 施設すべてが正解となり、正解率 100% で良好な結果が得られました。

【同定機種および方法別施設数】

< 生化学的性状による同定 >

Microscan Walkaway	7 施設
VITEK2 シリーズ	8 施設
Phoenix	1 施設

< 質量分析による同定 >

MALDI バイオタイパー	8 施設
VITEK MS	1 施設

【薬剤感受性結果】

MPIPC（オキサシリン）、CEZ（セファゾリン）、VCM（バンコマイシン）の 3 剤について調査しました。

表 1 .*Staphylococcus lugdunensis* に対する抗菌薬判定基準

抗菌薬		S	I	R
MPIPC	MIC 値 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	≤ 2	—	≥ 4
	阻止円直径 (mm)	—	—	—
(CFX)	MIC 値 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	≤ 4	—	≥ 8
	阻止円直径 (mm)	≥ 22	—	≤ 21

CEZ※	MIC 値 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	≤ 8	16	≥ 32
	阻止円直径 (mm)	≥ 18	15-17	≤ 14
VCM	MIC 値 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	≤ 4	8-16	≥ 32
	阻止円直径 (mm)	—	—	—

CLSI M100 – ED32 : 2022

※CLSI M100 – S22 : 2012

表 2.装置別薬剤感受性結果

抗 菌 薬 名	判 定	Microscan Walkaway		VITEK2 シリーズ		DPS		Phoenix		用手法		
		MIC値	施 設 数	MIC値	施 設 数	MIC値	施 設 数	MIC値	施 設 数	Eテスト	ディスク 阻止円	施 設 数
										MIC	(mm)	
MPIPC	S	≤ 0.25	1									
				$=0.5$	1	$=0.5$	1	$=0.5$	1			
		$=1.00$	4							$=1.00$		1
		$=2.00$	7	$=2.00$	4	$=2.00$	1					
	R			≥ 4.00	4							
CEZ	S					≤ 0.5	1					
		≤ 2.00	5					≤ 2.00	1			
				≤ 4.00	5	≤ 4.00	1					
		≤ 8.00	7									
										39	1	
		R			≤ 4.00	3						
				≥ 4.00	1							
VCM	S	≤ 0.5	12	≤ 0.5	7	≤ 0.5	1					
				$=1.00$	2	≤ 1.00	1	$=1.00$	1	$=1.00$		1

MPIPC、CEZ ともに感性「S」が 21 施設、耐性「R」が 4 施設ありました。正解率は 84% でした。VCM は、大変良好な結果が得られました。

【出題菌株の解説】

Staphylococcus lugdunensis は、皮膚に存在するコアグララーゼ試験陰性ブドウ球菌 (coagulase negative staphylococci : CNS)ともされるグラム陽性球菌です。近年、感染性心内膜炎、骨軟部組織感染症、皮膚感染症などを起こすことが報告されており、他の CNS とは区別されています。本菌のメチシリン耐性試験の判定基準は、MPIPC では微量液体希釈法のみですが、CFX では微量液体希釈法とディスク拡散法があります。出題菌は MPIPC が感性「S」を示し、MSCNS となります。また、 β ラクタム系薬 (ペニシリン以外) の CLSI

判定基準が M100-S23 以降は MPIPC または CFX の結果に準じることになっており削除されています。(日本で使用されている基準は、M100-S22 が使用されていると思われます。) 本菌はクラumping因子陽性、PYR 陽性です。クラumping因子を検出することで *S. aureus* を簡易的に同定するラテックス試薬を用いる場合は、本菌も凝集を認める可能性があります。本菌は、感染症法に該当する感染症ではありません。

表 3. *Staphylococcus* 属のコアグララーゼおよび Clumping factor

	生化学的性状	
	コアグララーゼ (遊離型コアグララーゼ)	Clumping factor (結合型コアグララーゼ)
<i>S. aureus</i>	+	+
<i>S. lugdunensis</i>	-	(+)

+ : 90%陽性、 - : 90%以上陰性、 (+) : 菌株により陽性

〈出典〉 臨床微生物検査 技術教本より改変

【設問 3 (試料 3)】 *Escherichia coli* (臨床由来株) ESBL_S 産生株

80 歳代、男性。38°Cの発熱、上腹部痛、吐き気を訴え緊急入院した。入院時採取された血液培養 2 セットから本菌が検出された。

- ①この細菌の菌名を同定してください。
- ②ABPC (アンピシリン)、CTX (セフォタキシム)、MEPM (メロペネム) について薬剤感受性を測定してください。

【同定結果】

<i>Escherichia coli</i>	25 施設
-------------------------	-------

回答のあった 25 施設すべてが正解となり、正解率 100%で良好な結果が得られました。

【同定機種および方法別施設数】

<生化学的性状による同定>

Microscan Walkaway	7 施設
VITEK2 シリーズ	8 施設
Phoenix	1 施設

<質量分析による同定>

MALDI バイオタイパー	8 施設
VITEK MS	1 施設

【薬剤感受性結果】

ABPC (アンピシリン)、CTX (セフォタキシム)、MEPM (メロペネム) の 3 剤について調査しました。

表 4. Enterobacterales に対する抗菌薬判定基準

抗菌薬		S	I	R
ABPC	MIC 値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 8	16	≥ 32
	阻止円直径 (mm)	≥ 17	14 - 16	≤ 13
CTX	MIC 値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 1	2	≥ 4
	阻止円直径 (mm)	≥ 26	23 - 25	≤ 22

MEPM	MIC 値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 1	2	≥ 4
	阻止円直径 (mm)	≥ 23	20 - 22	≤ 19

CLSI M100 – ED32 : 2022

表 5.装置別薬剤感受性結果

抗 菌 薬 名	判 定	Microscan Walkaway		VITEK2 シリーズ		DPS		Phoenix		ディスク法	
		MIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	施 設 数	MIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	施 設 数	MIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	施 設 数	MIC値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	施 設 数	阻止円径 (mm)	施 設 数
ABPC	R	>16	12			>16	2			0	1
				≥ 32	9			≥ 32	1		
CTX	R	>2	12			>2	1			7	1
								≥ 8	1		
						$=32$	1				
				≥ 64	4						
MEPM	S					≤ 0.12	1	≤ 0.13	1	30	1
		≤ 0.25	5	≤ 0.25	9	≤ 0.25	1				
		≤ 1	7								

回答は表 5 に示すとおりであり、微量液体希釈法、ディスク拡散法共に良好な結果が得られました。

【出題菌株の解説】

Escherichia coli は、ヒトの腸管内、河川や土壌など自然界に広く分布する通性嫌気性グラム陰性桿菌です。尿路感染症、血流感染症、腹腔内感染症、また新生児における細菌性髄膜炎など様々な感染症の起炎菌になることがあります。今回の調査では、基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生株を使用しました。そのため菌名報告に加えて耐性菌であることを記載することが望まれます。ESBL 産生遺伝子は、プラスミドを介して伝播することが知られており、本菌が検出された場合は、標準予防策に接触感染防止対策を追加した感染対策をとることが重要です。近年市中感染症においても検出されています。また、健常人の糞便にも保菌され、食肉、愛玩動物からも多く検出されています。

〈出典〉臨床微生物検査 技術教本より改変

【設問 4 (試料 4)】

グラム陰性桿菌

Escherichia coli ATCC 25922

試料 4 のスライドをグラム染色し、グラム染色性と形態を選択肢の中から解答して下さい

<回答>

グラム陰性桿菌 26 施設

グラム陽性桿菌 2 施設

回答のあった 28 施設のうち 26 施設が正解となり、正解率 93%と良好な結果が得られました。染色試薬は、neo-B&M ワコー (11 施設)、バーミーM 染色キット (11 施設)、フェイバーG セット F (5 施設)、B&M ワコー (1 施設) でした。

【設問 5】 フォトサーベイ

フォト 1 *Vibrio vulnificus* (臨床由来株)

60 歳代、男性。前日より 39°C 台の発熱あり、四肢に痛みを伴う発赤、意識レベルの低下を認め、緊急搬送された。既往歴に高血圧、2 型糖尿病、アルコール性肝障害あり。入院時血液培養を採取、8 時間後に 2 セットすべてのボトルが陽転化し、本菌が検出された。推定される微生物名もしくは属名を回答してください。

- フォト 1-1 ヒツジ血液寒天培地上コロニー 35°C 24 時間
- フォト 1-2 TCBS 寒天培地上コロニー 35°C 24 時間
- フォト 1-3 耐塩性試験
- フォト 1-4 グラム染色 (1000 倍)

【回答結果】

Vibrio vulnificus.

26 施設

Vibrio fluvialis

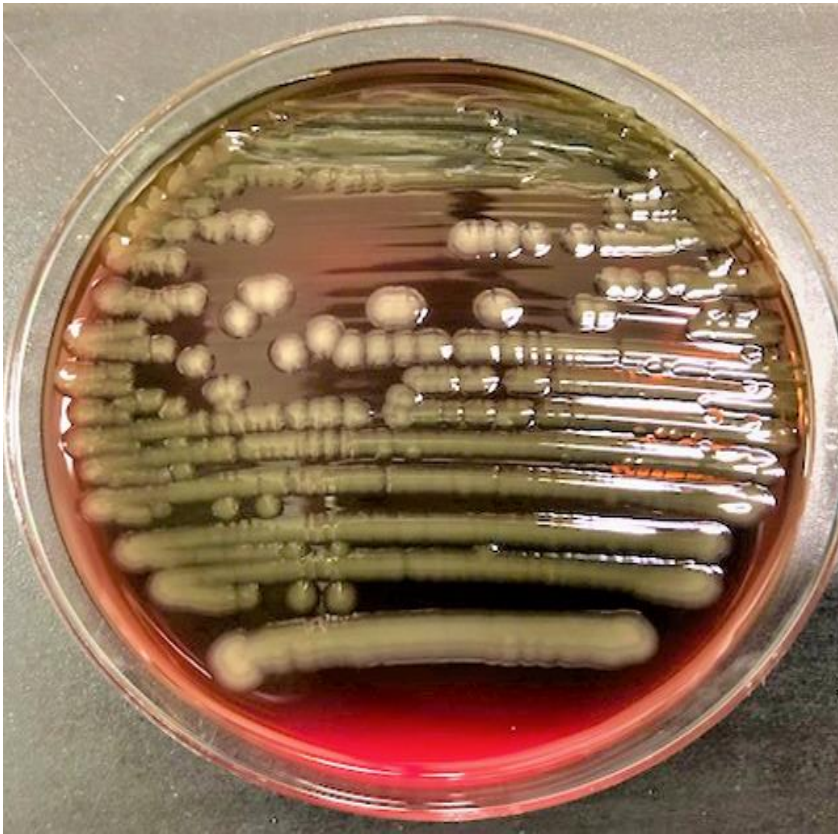
1 施設

27 施設中 26 施設が正解で、正答率は 96.3% と良好な結果が得られました。

Vibrio vulnificus は、沿岸海水や海泥、とくに塩分の低い汽水域に生育する魚介類に分布する。感染経路は生魚介類の摂取による経口感染と海水や海泥への接触による創傷感染がある。夏季に感染例が多い。おもに肝硬変などの基礎疾患をもつ患者に四肢から壊死性筋膜炎などを生じ、急激に敗血症やショックなど重篤な経過をとる場合が多い。本菌感染には肝障害などによる鉄代謝異常の要因が関与している。菌体はやや湾曲した短いバナナ状あるいはコンマ状である。TCBS 寒天培地では緑色集落を形成する。食塩加ペプトン水(食塩濃度 0, 3, 8, 10%)では 3% のみに発育を認める。

(出典) 臨床微生物検査 技術教本より改変

フォト1-1



フォト1-2



フォト1-3



0%

3%

8%

10%

発育：

-

+

-

-

フォト1-4



フォト 2 *Fusarium solani* (臨床由来株)

50 歳代、女性。急性骨髄性白血病と診断され抗癌剤治療のため入院中であった。今回全身に皮疹が出現し、 β -D グルカンの上昇を認めた。また、同日採取された血液培養より本菌が検出された。

フォト 2-1 は血液培養陽性ボトルのグラム染色 (1000 倍)、2-2 は発育コロニーのラクトフェノールコットンブルー染色 (400 倍) の鏡検像である。

推定される微生物名もしくは属名を入力してください。

【回答結果】

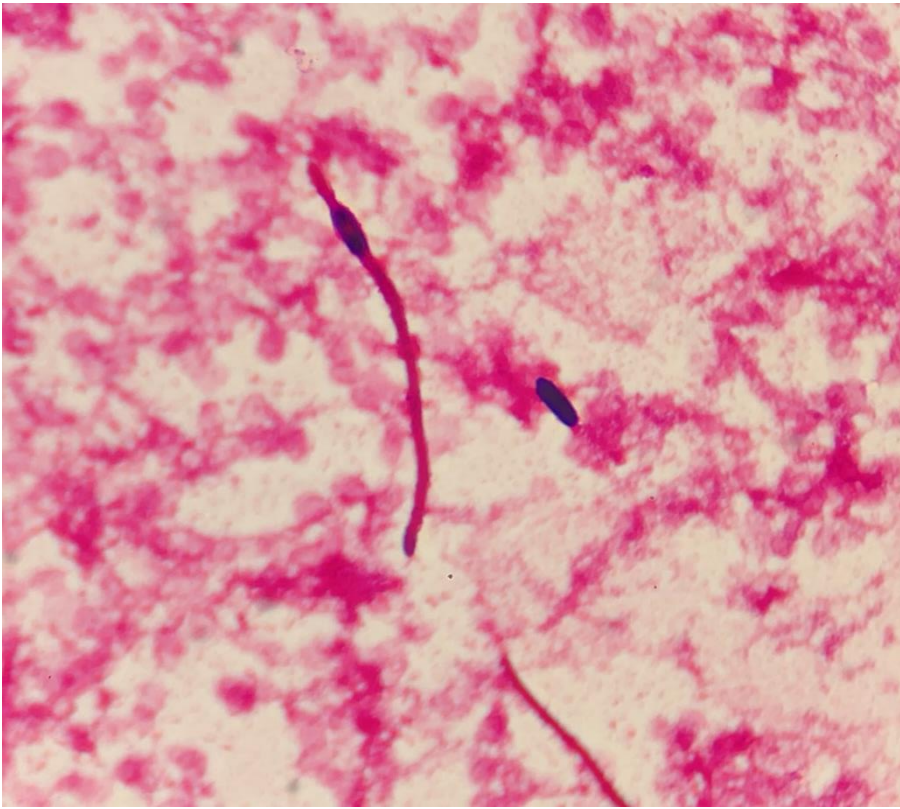
<i>Fusarium</i> sp.	23 施設
<i>Trichophyton</i> sp.	2 施設
<i>Trichophyton rubrum</i>	1 施設
<i>Candida parapsilosis</i>	1 施設

27 施設中 23 施設が正解で、正答率は 85.1%となりました。

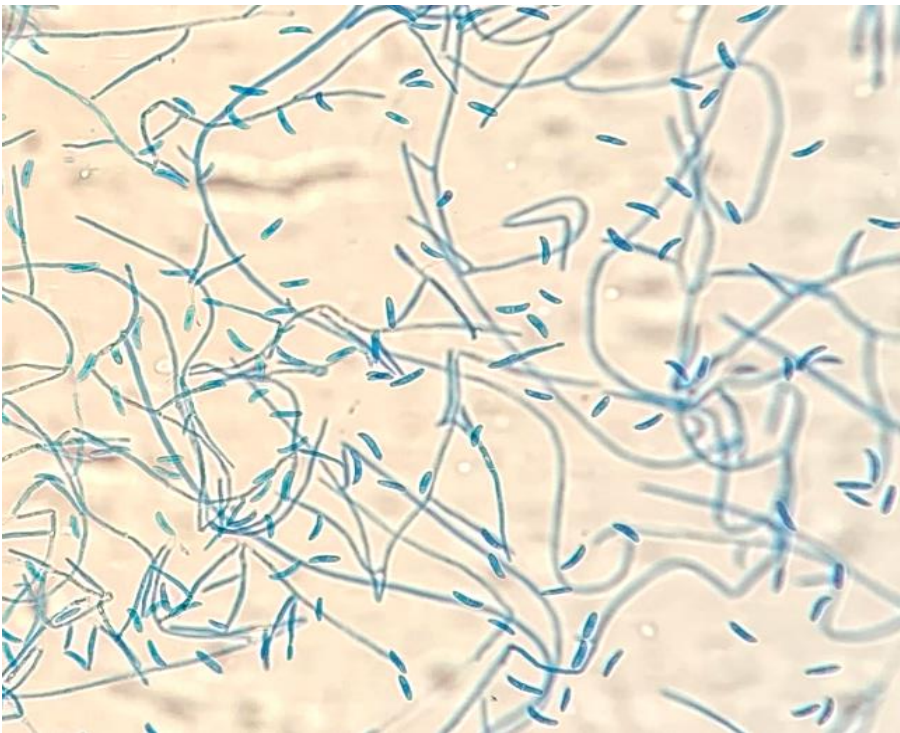
Fusarium 属菌は、環境中に生育する糸状菌 (植物病原菌) である。なかでも *F. solani*、*F. oxysporum* などはヒトに病原性を示し、健常者において角膜真菌症や爪真菌症に続発する深部表在真菌症を生じる。易感染性宿主では、血行播種による深在性真菌症をきたしやすやすい。SDA 培地で 5~6 日で速やかに羊毛状から綿毛状の白色の巨大集落を作る。顕微鏡的形態は、大分生子が三日月型で湾曲しており、数個の隔壁を持っているのが特徴である。多くの抗真菌薬に耐性だが、菌株によって VLCZ、AMPH-B に感受性を示す。

(出典) 標準微生物学 第 14 版 より改変

フォト 2-1



フォト 2-2



【設問 6（試料 5、6）】新型コロナウイルス遺伝子

今回の新型コロナウイルス遺伝子検査サーベイランスは、核酸抽出・増幅検出の全行程を評価するフルプロセスサーベイランス（全行程サーベイランス）として実施しました。

複数台の装置、試薬を所有している施設もありますが、本サーベイは 1 装置での参加としました。

試料 5 には、SARS-CoV-2 遺伝子検査精度管理コントロール（Microbiologocs 社）を使用しました。本コントロールには 40000 コピー/ml（40 コピー/ μ l）の不活化 SARSCoV2 ウイルスが含まれており、12000 コピー/300 μ l を試料として配布しました。試料 6 には、Negative Control（プレシジョン・システム・サイエンス社）を使用しました。

得られた結果は下記の通りです。

[結果]

試料 5 は 28 施設中すべての施設が陽性判定となり正解率 100% の良好な結果でした。

試料 6 は 28 施設中すべての施設が陽性判定となり正解率 100% の良好な結果でした。

《検査方法・試薬・装置の内訳》

①PCR 法（RT-PCR 法）

◆リアルタイム PCR 装置（汎用装置）を用いた方法

〈精製 RNA を用いる RT-PCR 法〉

核酸抽出・精製試薬 (装置名)	検出試薬名	装置名	施設数
magDEA Dx SV (magLEAD12gC)	LightMix Moduler SARS-CoV(COVID-19)E-gene	Cobas4800system z480	1 施設

〈粗抽出 RNA を用いる（ダイレクト PCR）RT-PCR 法〉

核酸抽出・増幅・検出試薬名	(核酸抽出) 増幅・検出装置名	施設数
Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出 キット	Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System	1 施設
	QuantiStudio 5 Dx	1 施設
SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	QuantiStudio 5 Dx	1 施設

◆全自動核酸増幅装置を用いた RT-PCR 法

専用試薬	装置名	施設数
スマートジーン SARS-CoV-2 テストカートリッジ	Smart Gene®	5 施設
LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 PCR Kit	geneLEADVIII	4 施設
Xpert Xpress SARS-COV-2	Gene Xpert	2 施設
コバス SARS-CoV2&FLU A/B	コバス 6800	1 施設
Ampdirect 2019-nCoV 検出キット	Auto Amp	1 施設
BioFire 呼吸器パネル 2.1	FilmArray Torch	1 施設
SARS-CoV-2 GeneSoc N2	Genosoc mini	1 施設

②等温増幅法

専用試薬	装置名	施設数
TRCReady SARS-CoV-2 i	TRCReady-80	3 施設
Abbott IDNOW COVID-19	Abbott IDNOW	2 施設

SARSCOV2 遺伝子検査に関するアンケート結果

1) 結果報告はどのようにされていますか？報告している結果を選択してください

(複数回答可)

報告内容	施設数
判定結果のみ	13
判定結果 + Ct 値を報告	10
判定結果 + Ct 値 + 変異情報	1

* サイクル数と回答の施設は Ct 値として扱いました。

* 結果入力しない場合であっても、臨床側に Ct 値が伝わる形があれば、『Ct 値を報告』に含めました。

2) 陰性結果の報告形式はどうしていますか

報告形式	施設数
陰性	22
『測定限界以下』もしくはそれに準ずる表記 * 『検出せず』と回答の 2 施設を含みます	2

3) 検査材料として使用しているものを選択してください (複数回答可)

検査材料	施設数
鼻咽頭拭い液のみ	14
鼻腔拭い液 + 唾液	6
鼻咽頭拭い液 + 唾液 + 鼻腔拭い液	3
鼻咽頭拭い液 + 唾液 + 鼻腔拭い液 + 喀痰 + 肺胞洗浄液 + 気管支洗浄液	1

4) 測定標準作業書は作成されていますか

作成の有無	施設数
作成している	22
作成していない	2

5) 内部精度管理を実施していますか

実施の有無	施設数
実施している	18
実施していない	6

(内部精度管理について)

内部精度管理実施施設では、定期的にコントロール検体の測定が行われている状況が分かった。

頻度は、測定毎、ロット毎、週1回、2週間に1回、月1回、6か月に1回の回答あり
陽性コントロールのみ測定、陽性コントロールと陰性コントロールの両方を測定のパターンがあった。

使用コントロールは、メーカー指定のもの、試薬附属のものを使用しているケースが多いが、中には別売品を使用し、陽性コントロールについては平均値、標準偏差を計算し、統計学的に管理しているとの回答もあった。

今回、フリー入力で回答を得たため、詳細な集計は出来なかった。

6) 性能評価を実施していますか

実施の有無	施設数
実施している	3
実施していない	20
未回答	1

*コントロール測定と回答された施設は性能評価としては『実施していない』として扱いました。

(具体例)

- ・同一検体を"lightMix"で測定し評価。
- ・直線性試験、同時再現性確認、日差再現性確認、最小検出感度確認
- ・体外診断薬について、試薬添付文書に記載されている性能（感度、正確性、同時再現性、最小検出感度）を満たしているかを確認している。