



微生物検査

up to date

県立宮崎病院臨床検査科

佐多 章



本日の内容

1. 感染症診療と微生物検査
2. 塗抹検査（グラム染色）
3. 培養検査（血液培養検査を中心に）
4. Antimicrobial Stewardship と Diagnostic Stewardship
5. 最新の検査技術など

COI開示：開示すべきCOIなし

感染症診療の基本

臓器

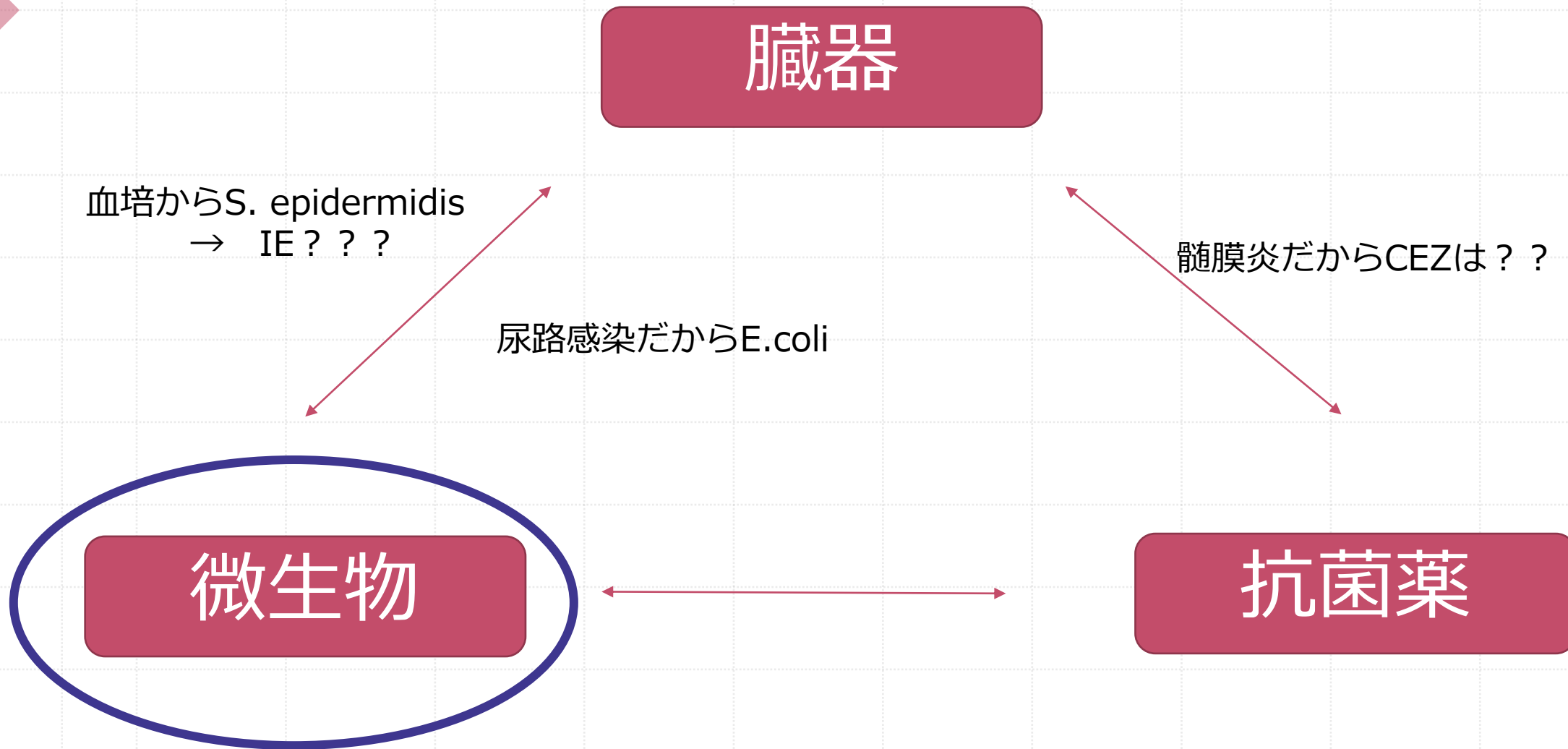
血培からS. epidermidis
→ IE ???

尿路感染だからE.coli

髄膜炎だからCEZは??

微生物

抗菌薬



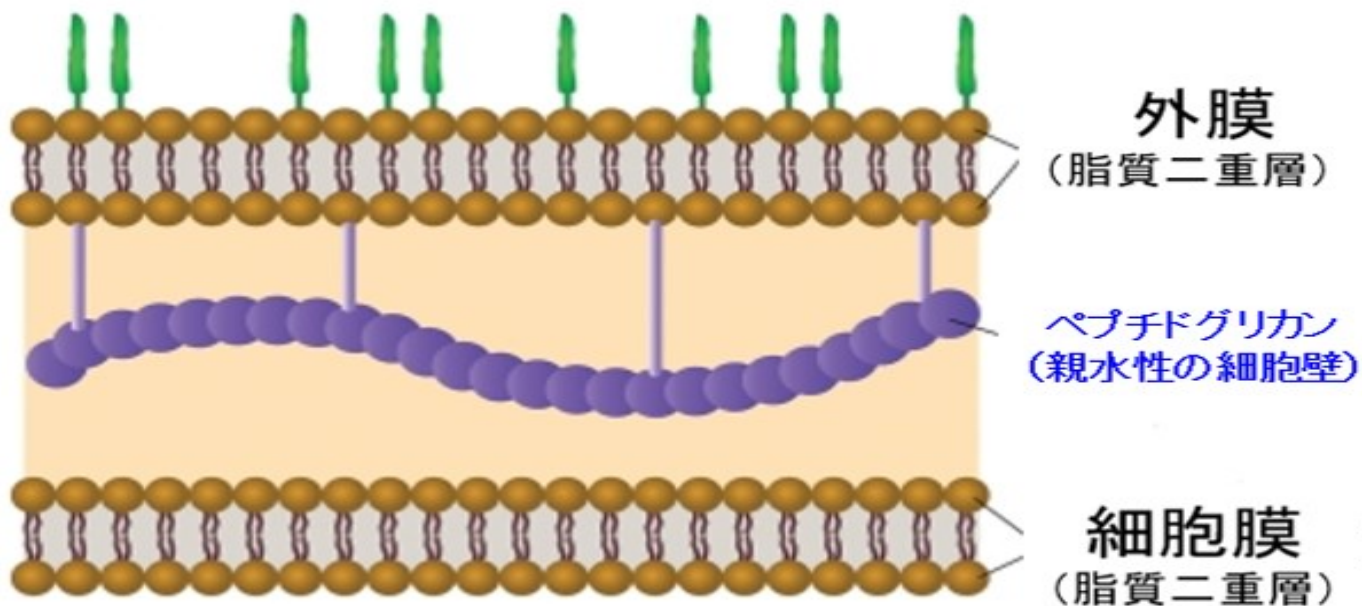
1 塗抹検査（グラム染色）

- 1884年デンマークの細菌学者Hans Christian Joachim Gramにより発明された染色法130年以上も標準的な染色法として使用されている。
- [Gimsa染色](#)・・・[マラリア](#)研究の先駆である医学者Gustav von Giemsa（[1867年](#) - [1948年](#)）
- [パパニコロウ染色](#)・・・George Nicolaus Papanicolaou（1883年 - 1962年）



グラム染色の原理

グラム陰性菌



グラム陽性菌

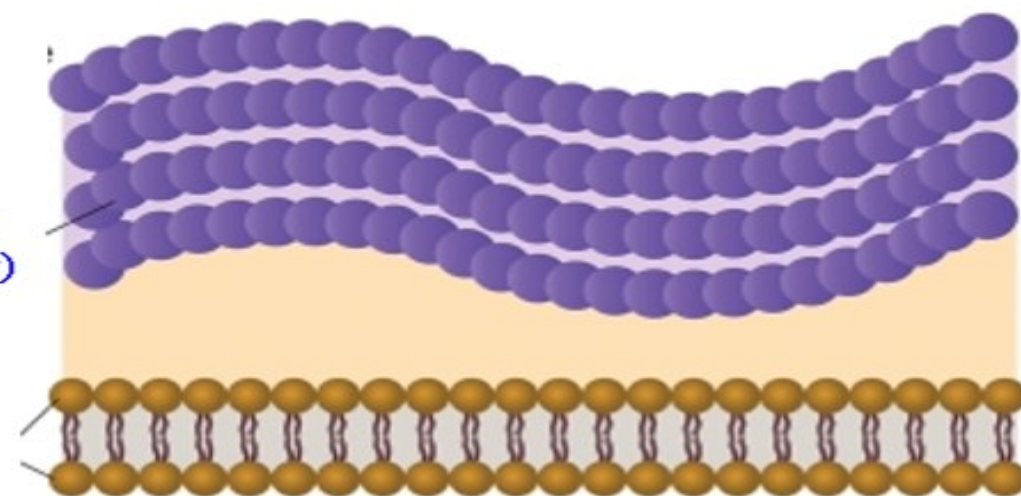


図1.グラム陽性菌と陰性菌の構造

<https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html>より引用

グラム染色の特徴

利点

- ・ 培養検査に比較して短時間で結果が得られる。
- ・ 起因菌のおおまかな推測ができる。→抗菌薬の選択可能
- ・ 特別な機器を必要としない。（試薬と顕微鏡）
- ・ 同定検査に比較して低コスト。

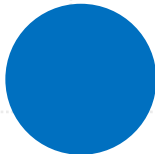
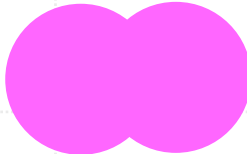
欠点

- ・ 菌数が少ないと検出できない（ 10^5 以上必要）。
- ・ 難染色性の菌種がある。
- ・ 成績にばらつきがある

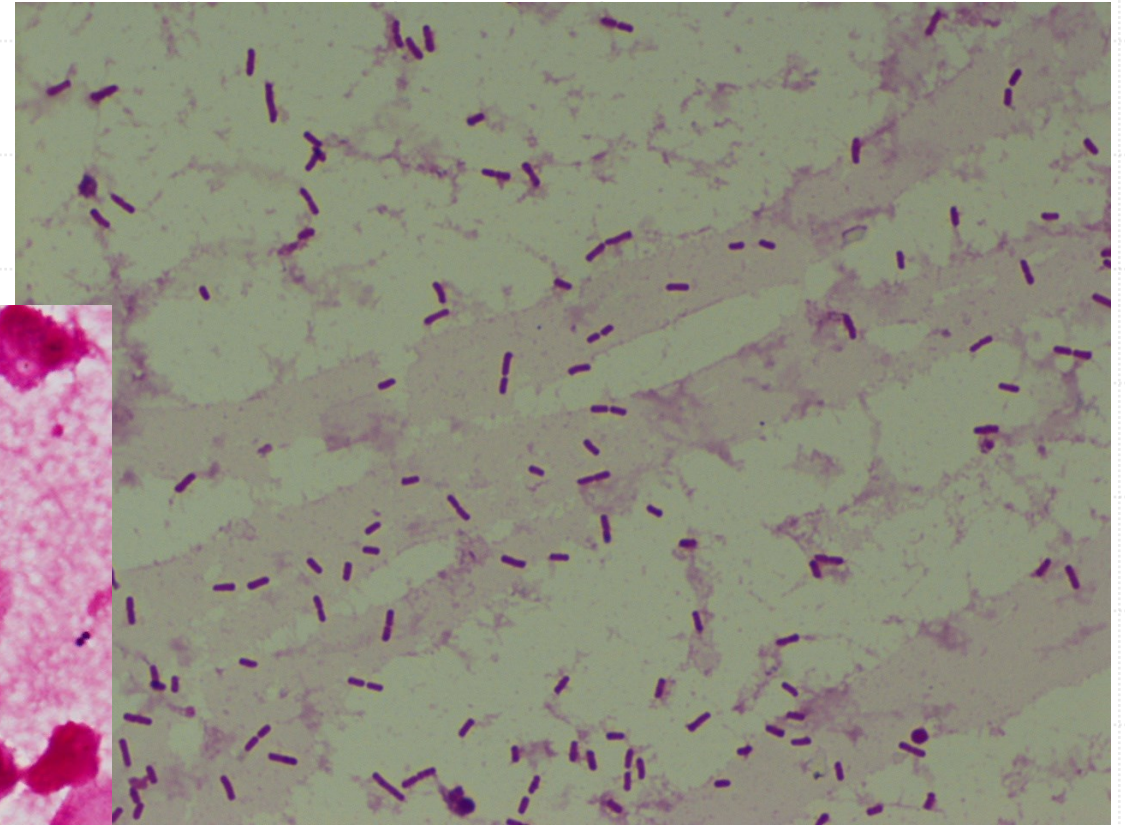
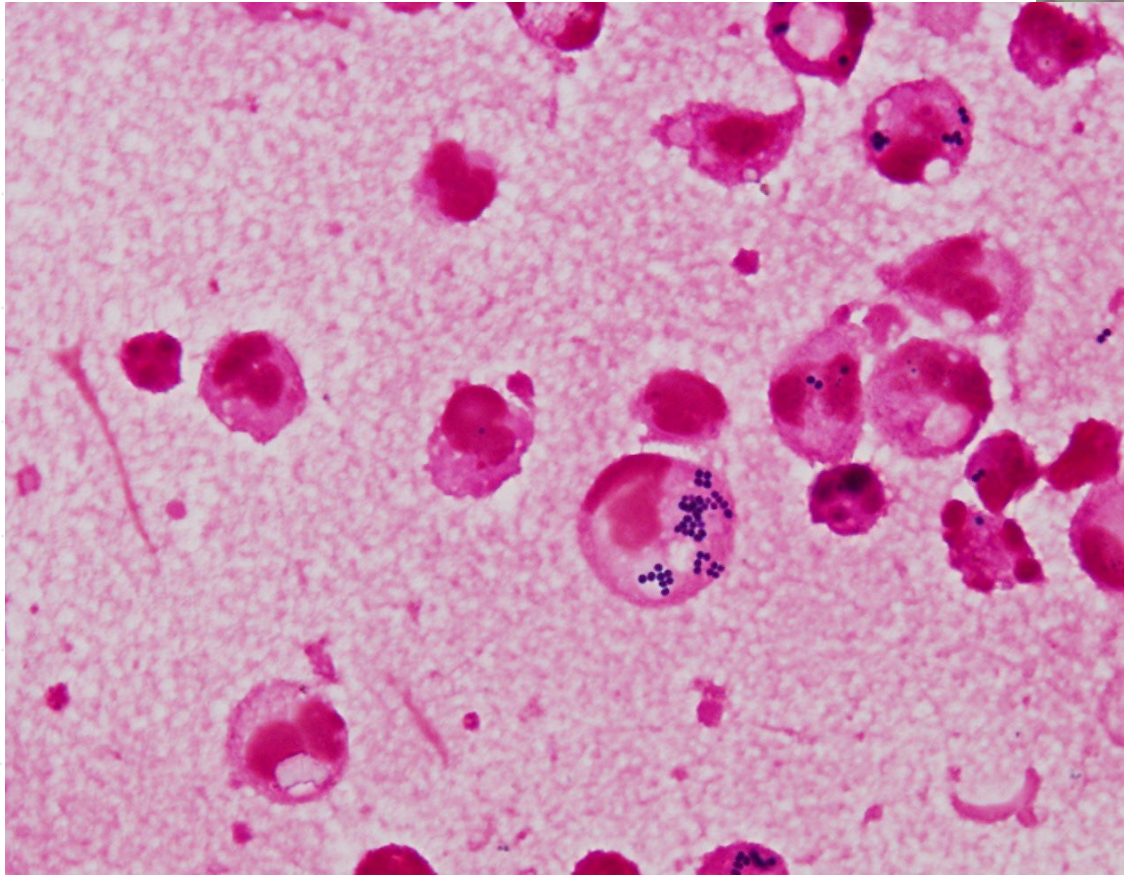
グラム染色で何がわかる？

- ① 菌の有無
- ② 炎症の有無（好中球の貪食像など）
- ③ 抗菌治療の効果判定
- ④ 結晶の有無（ピロリン酸結晶等）
- ⑤ 検体の適正判定（今回は割愛）

グラム染色での分類

	グラム陽性 <i>Gram-positive</i>	グラム陰性 <i>Gram-negative</i>
球菌 <i>coccus</i>	 ブドウ球菌、連鎖球菌	 淋菌、髄膜炎菌、 モラクセラ
桿菌 <i>bacillus</i> (<i>rod</i>)	 バシラス属 コリネバクテリウム属	 大腸菌、などの腸内細菌 緑膿菌 ヘモフィルス属、バクテロイデス属

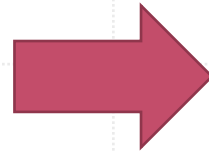
①菌の有無がわかる



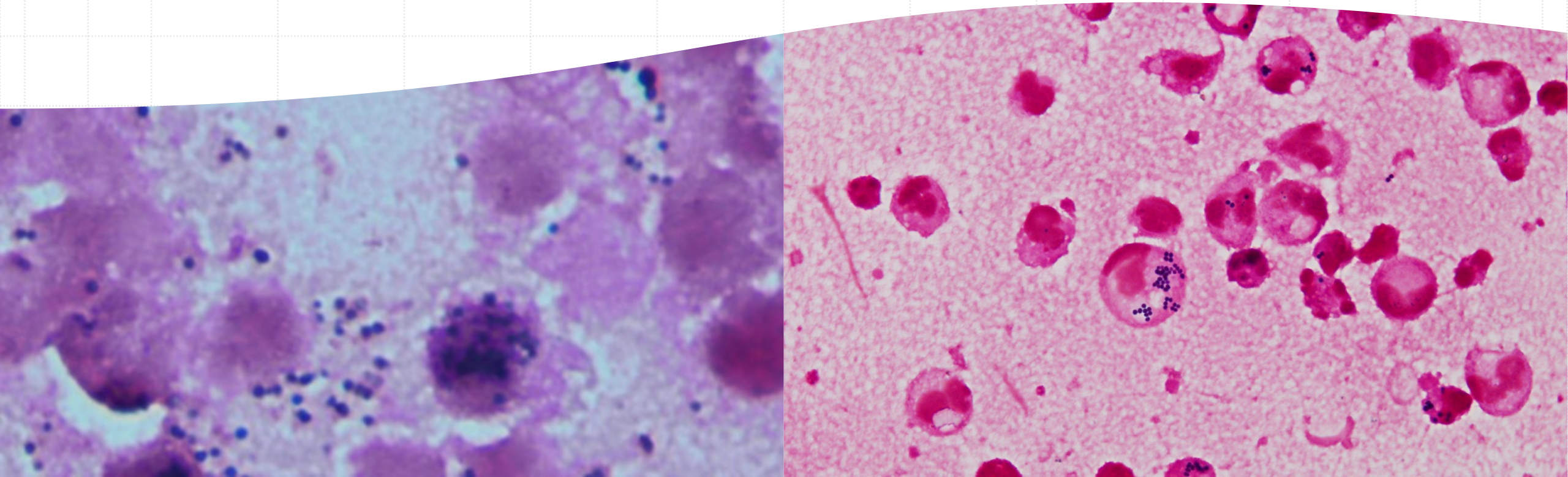
菌がいるということはBacterial infection
の可能性がある。

②炎症の有無がわかる

- 好中球の有無
- 貪食像はあるか？



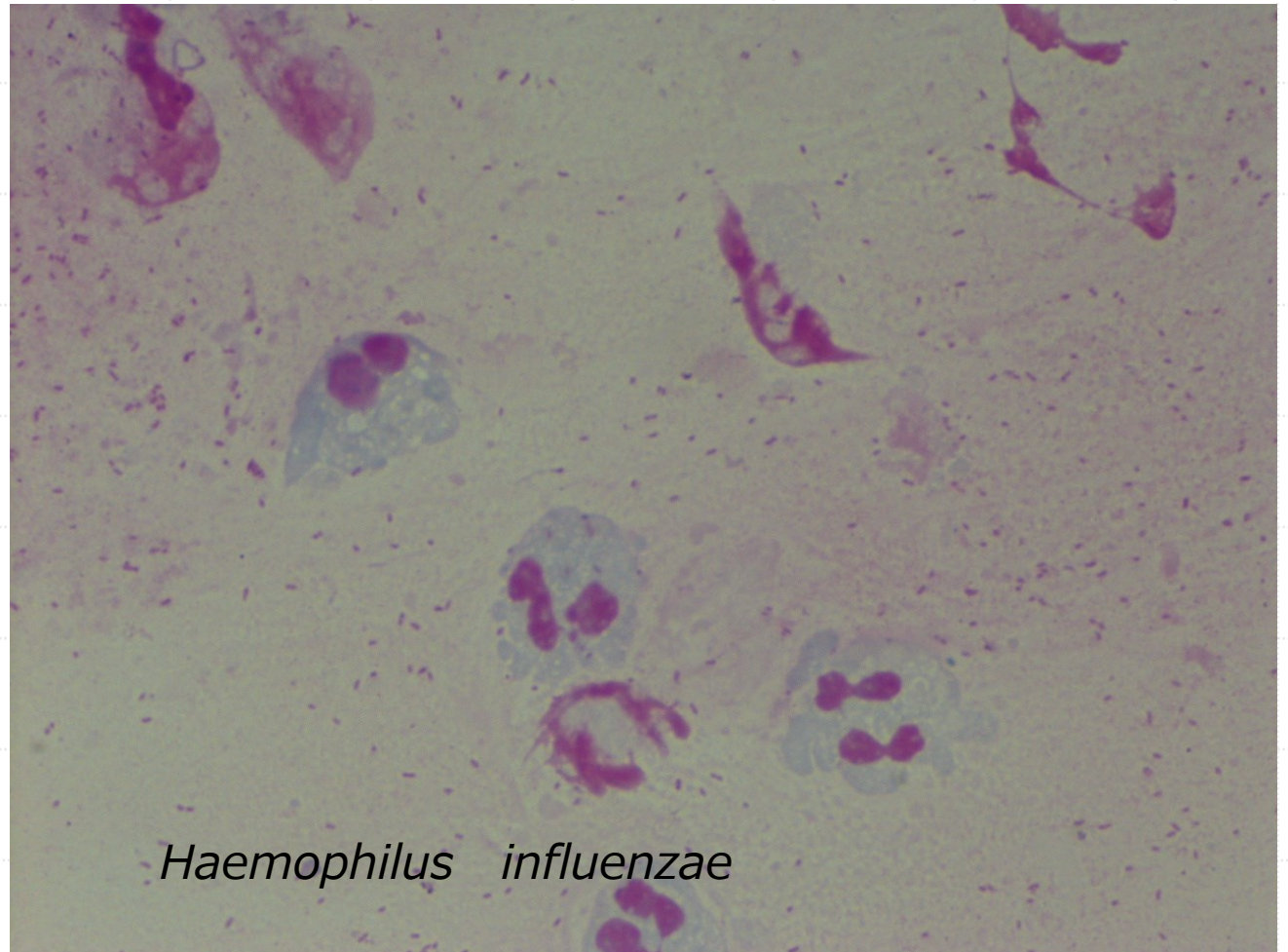
- 炎症部位の特定
- 起炎菌の推定が可能



③抗菌薬の効果判定

- ・ 50代男性
- ・ 発熱・呼吸苦にて当院紹介受診
- ・ CXPにて肺炎（+）
- ・ 入院時に喀痰培養提出
- ・ M&J分類 P3 Geckler 5

グラム染色結果からH. influenzae肺炎を疑い
ABPC/SBTで治療開始

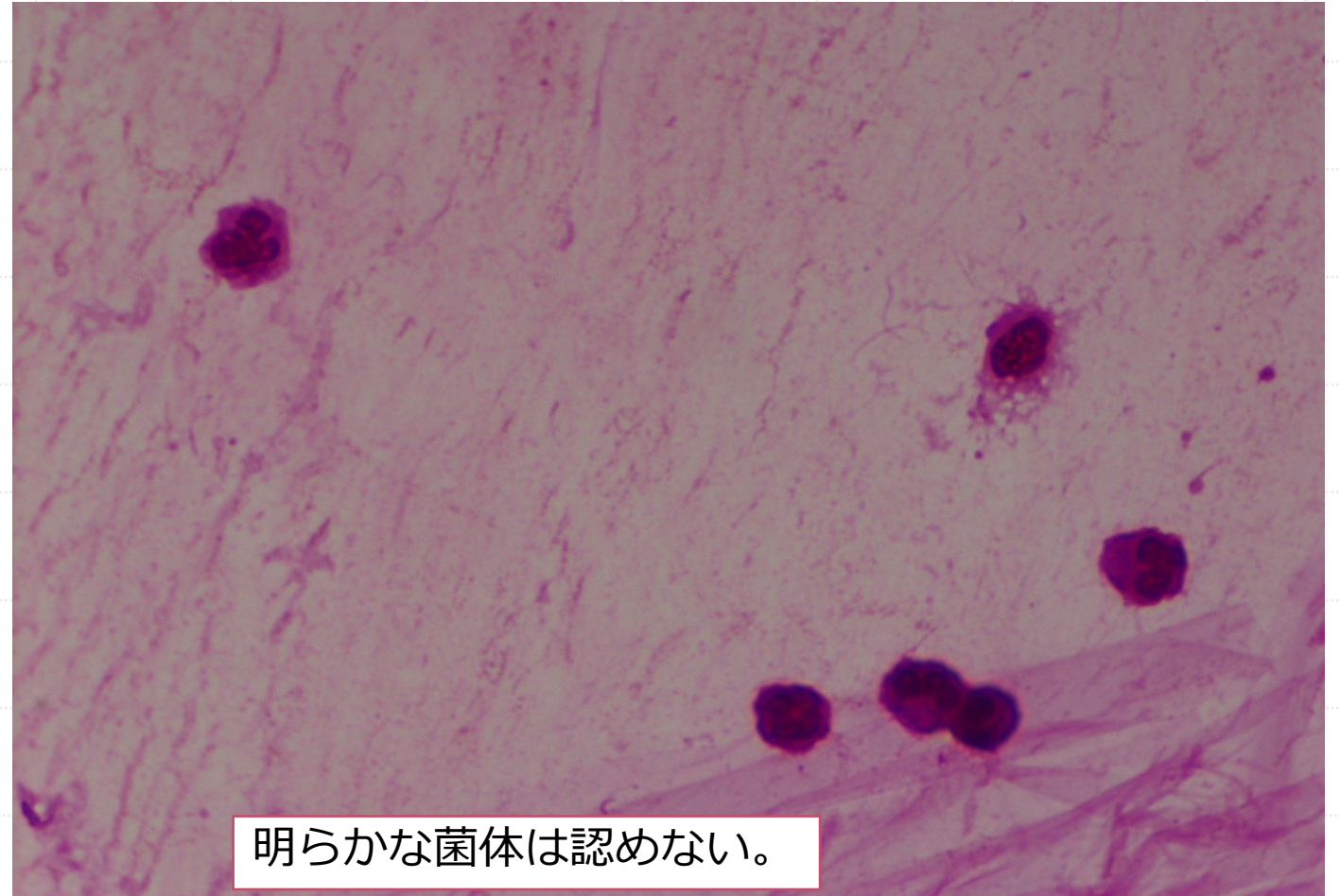


③抗菌薬の効果判定

翌日の喀痰グラム染色

・ M&J分類 P3 Geckler 5

ABPC/SBTが効果あり ???



明らかな菌体は認めない。

CTRX使用後のE. coli

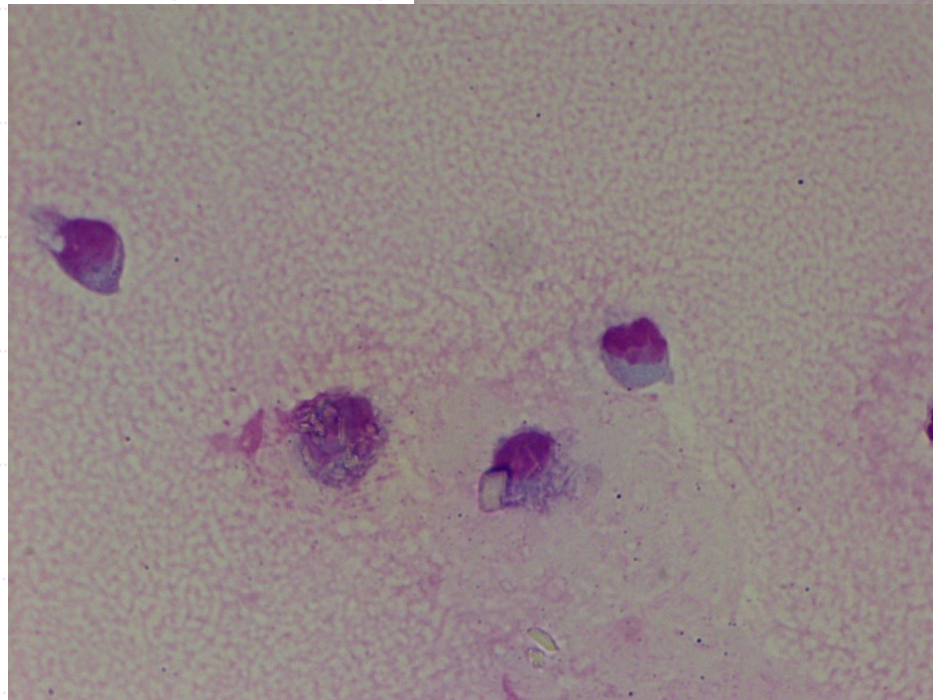
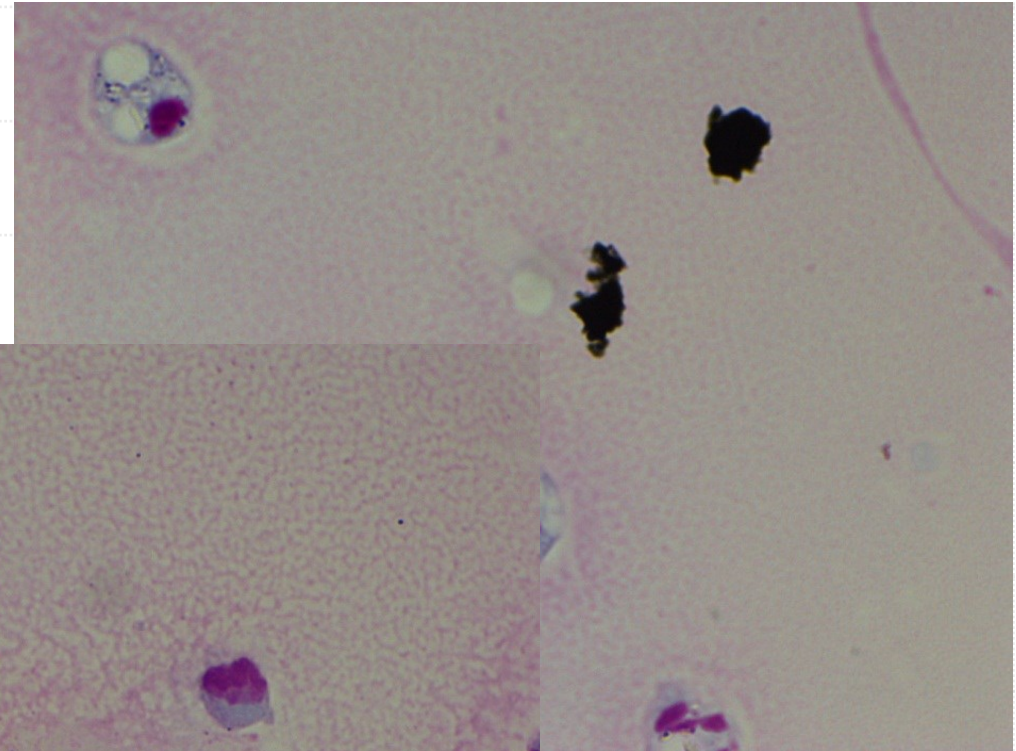


CFPM使用後のK. pneumoniae

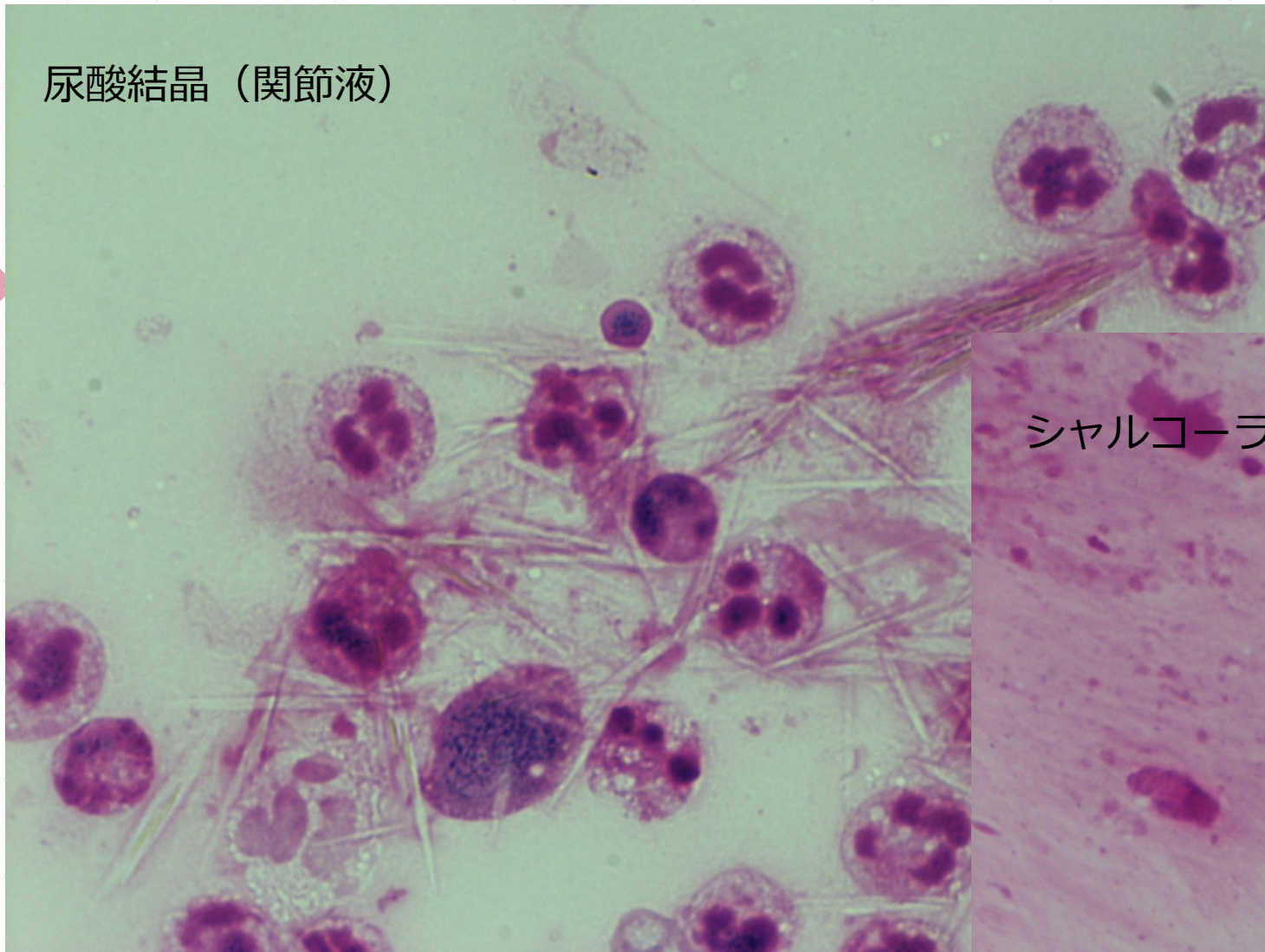


④結晶等の有無がわかる

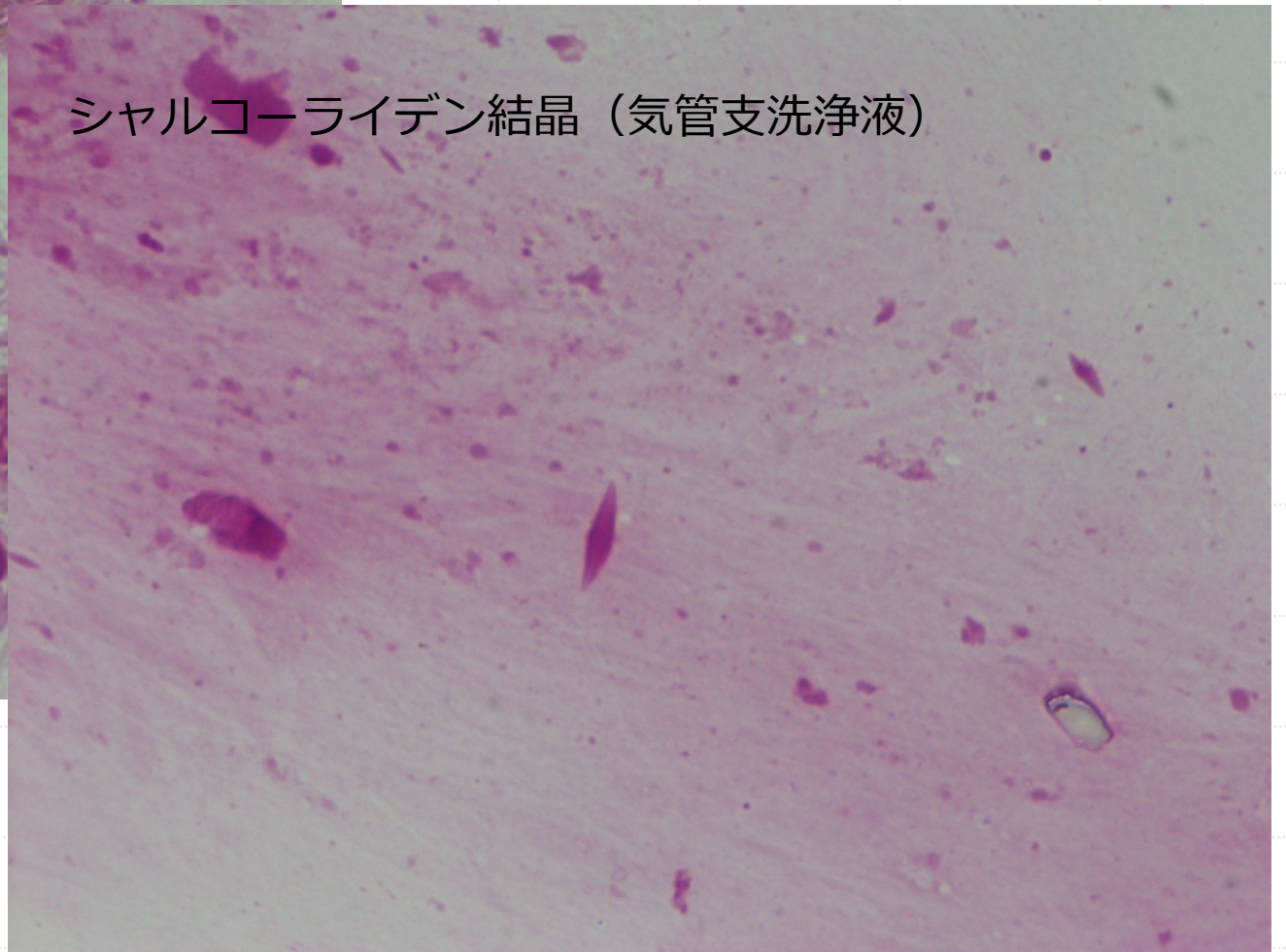
- 70代女性
- 発熱・関節痛・体動困難でQQ受診
- 両ひざ関節の腫脹を認め、関節穿刺
- 関節液培養提出



尿酸結晶（関節液）



シャルコーライデン結晶（気管支洗浄液）





では逆に

- 医者はグラム染色で何を知りたいのか？？

※当院でよく聞かれること

医師はグラム染色で何を知りたい？

この患者は感染症かどうか？ Focusはどこか（肺炎？ 尿路感染？）

陰性桿菌の場合、緑膿菌かどうか？

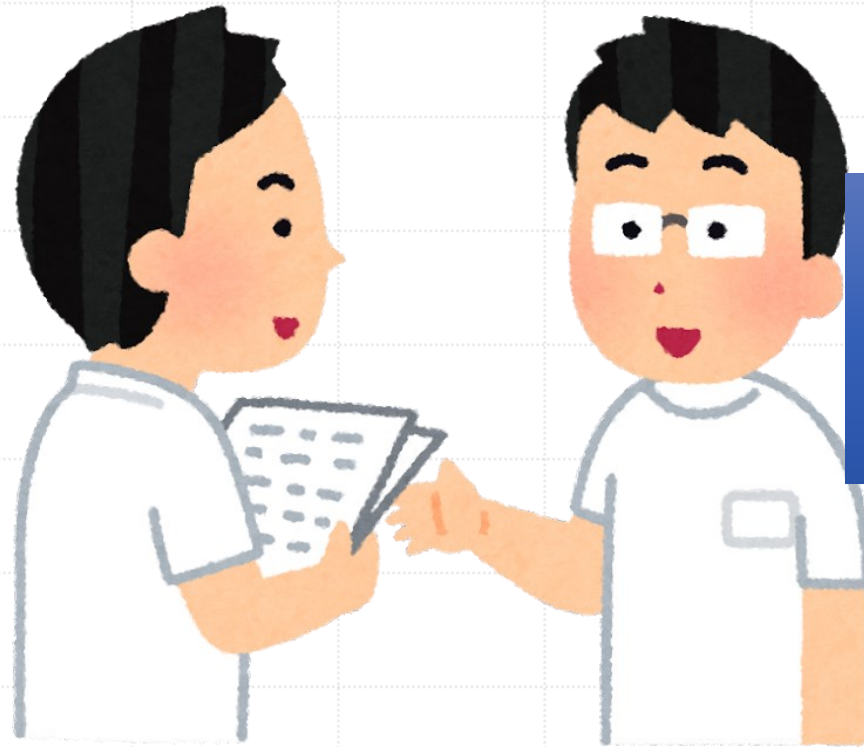
陽性球菌の場合、MRSAかどうか？

抗菌薬の変更が必要かどうか？

感染症か否か？

術後の患者さんが発熱したんだけど、尿と痰を培養に提出したけどなにか出てる？

そうか。尿カテも2週間たっているし、尿路感染かもしれないね。カテ抜去と抗菌薬を開始しよう！



尿は、グラム陰性桿菌と好中球を多数認めます。痰は膿性でもなく、常在菌のみでした。尿路感染の可能性はあるかもしれません。

GNRは緑膿菌か否か？

術後の患者さんが発熱したんだけど、尿と痰を培養に提出したけどなにか出てる？

そうか。尿カテも2週間たっているし、尿路感染かも。
尿路感染だから大腸菌かなあ。入院期間長いから緑膿菌もカバーしたほうがいいかな？
カテ抜去とセフトリアキソンを開始しようかな

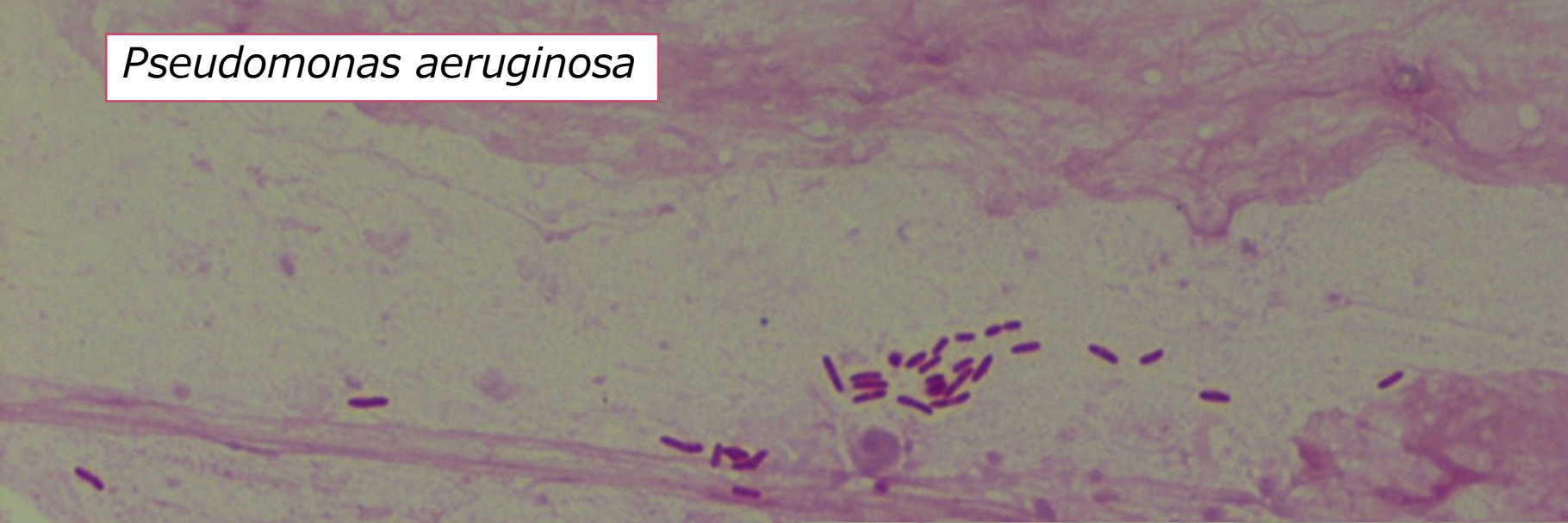
そうか、ではとりあえず
TAZ/PIPCで開始して感受性結果
をみて再検討しよう。



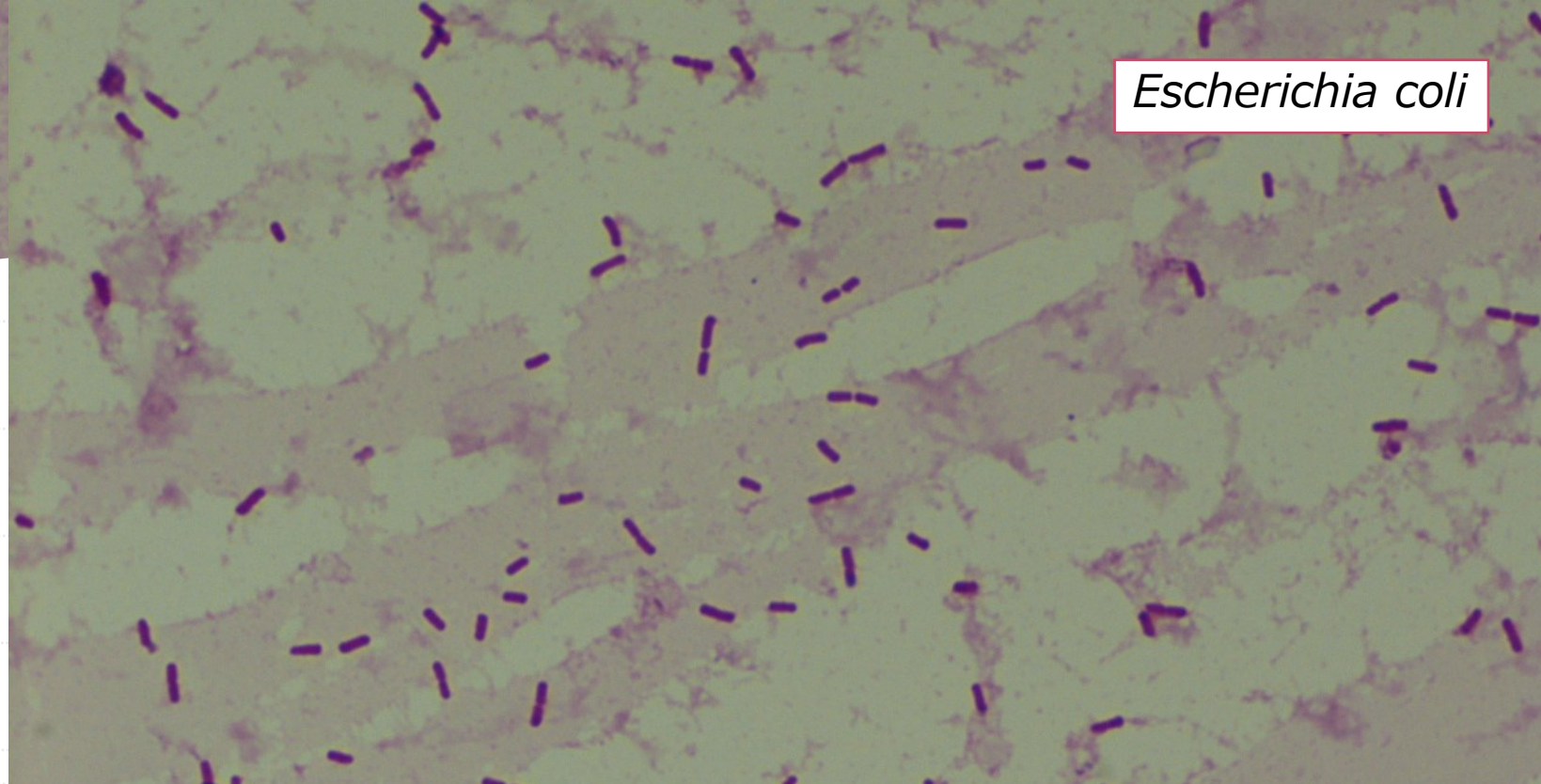
尿は、グラム陰性桿菌と好中球を多数認めます。痰は膿性でもなく、常在菌のみでした。
尿路感染の可能性はあるかもしれません。

グラム陰性桿菌はやや細めで、
緑膿菌の可能性もあるかとおもいます。

Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli

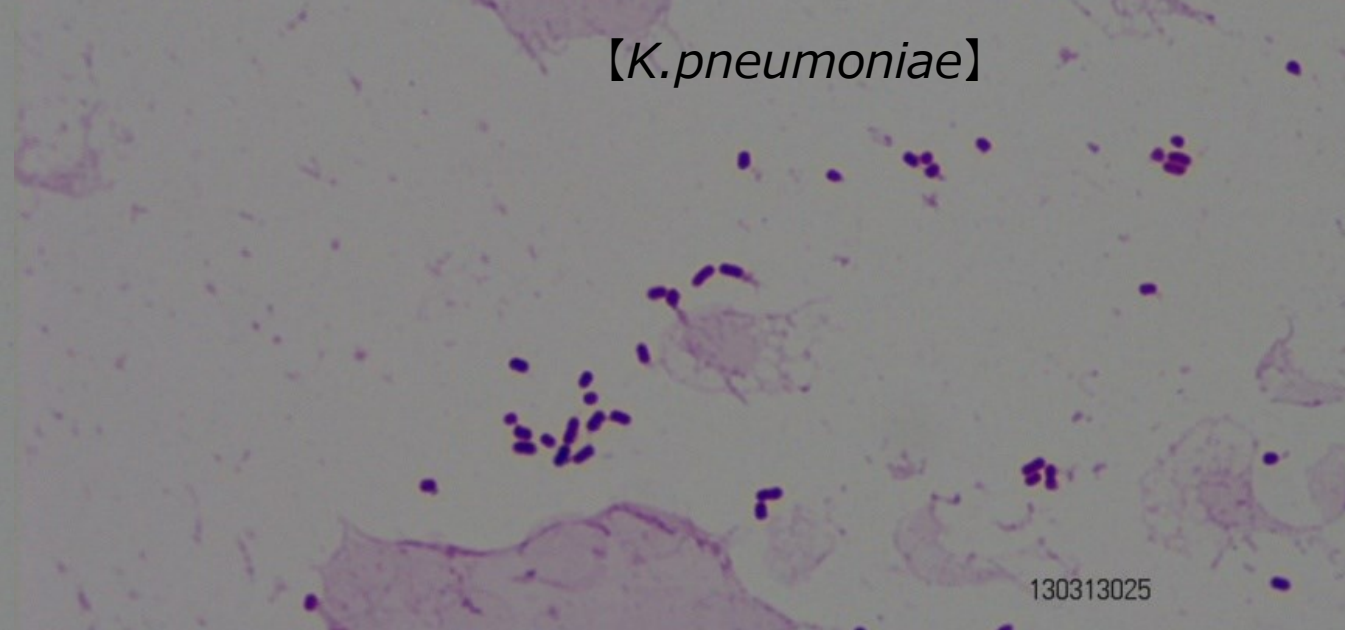


【*E.coli*】



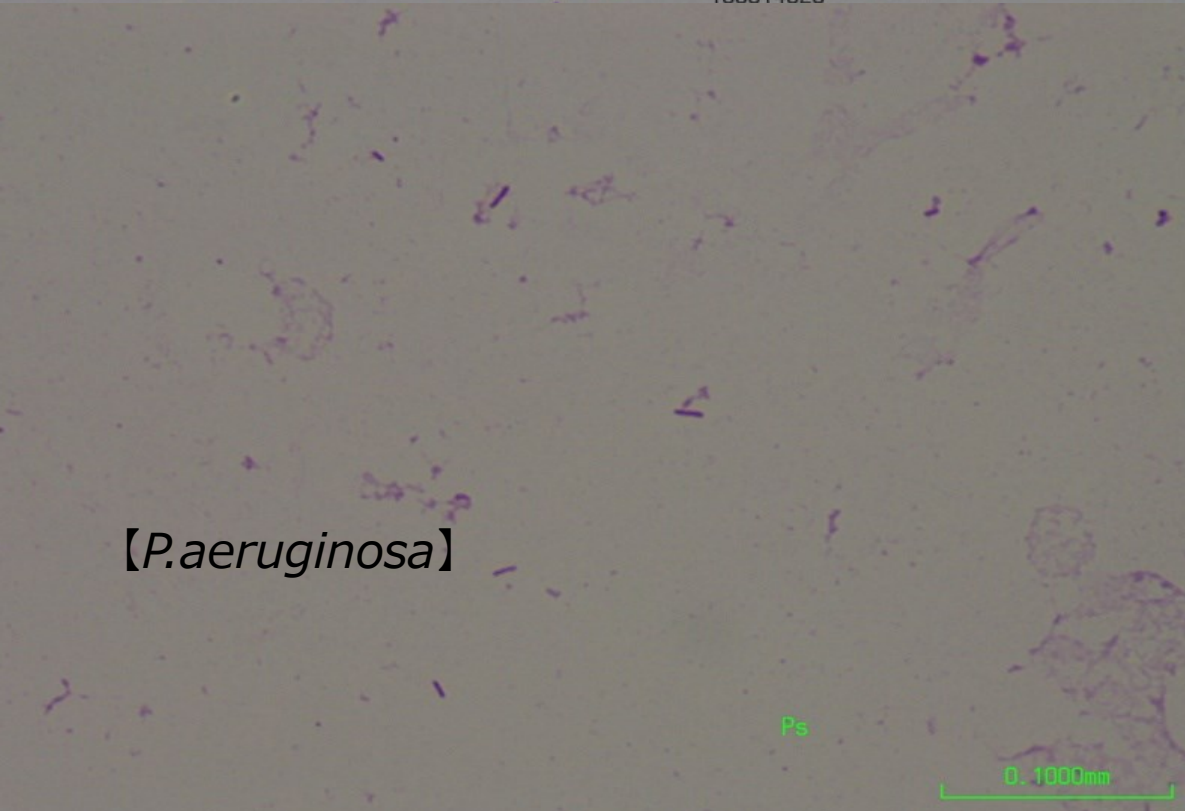
130314023

【*K.pneumoniae*】



130313025

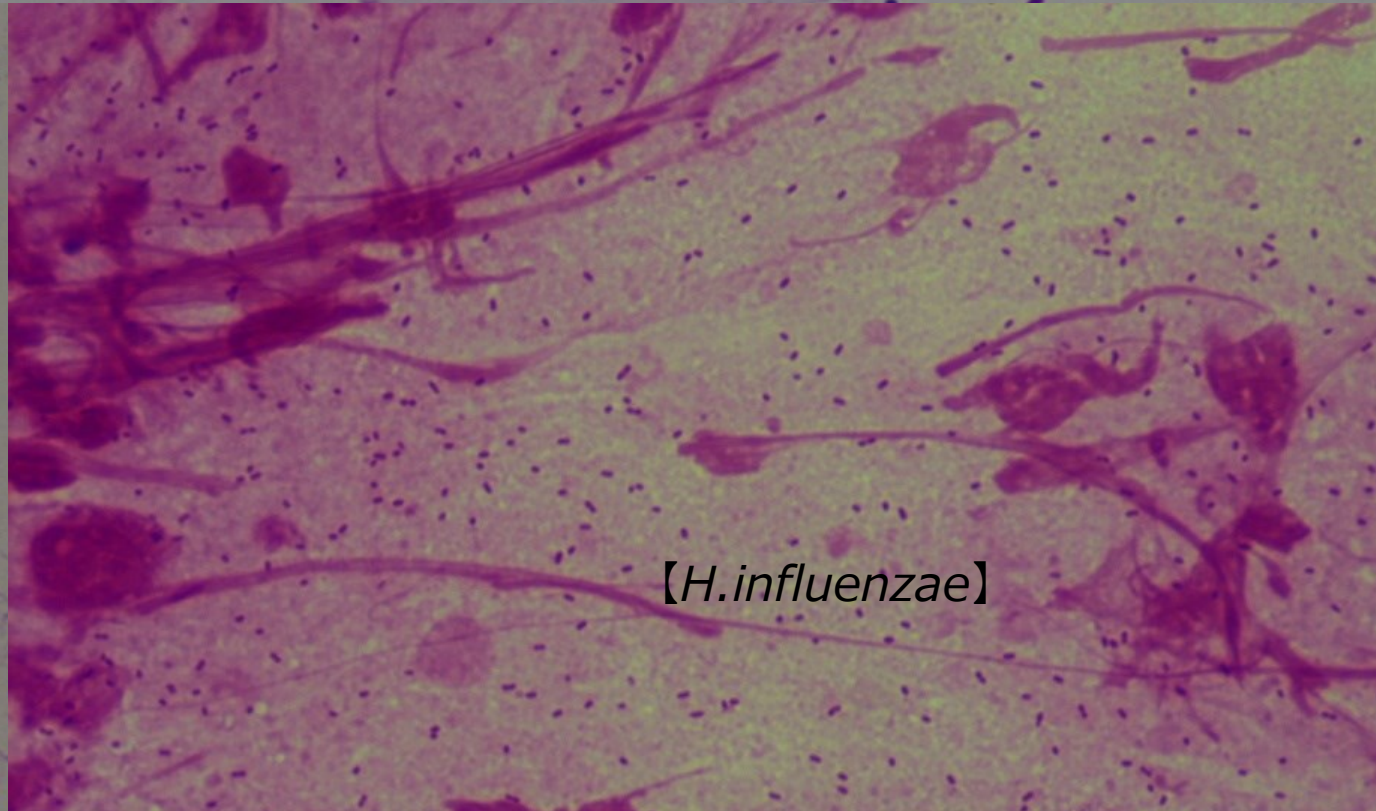
【*P.aeruginosa*】



Ps

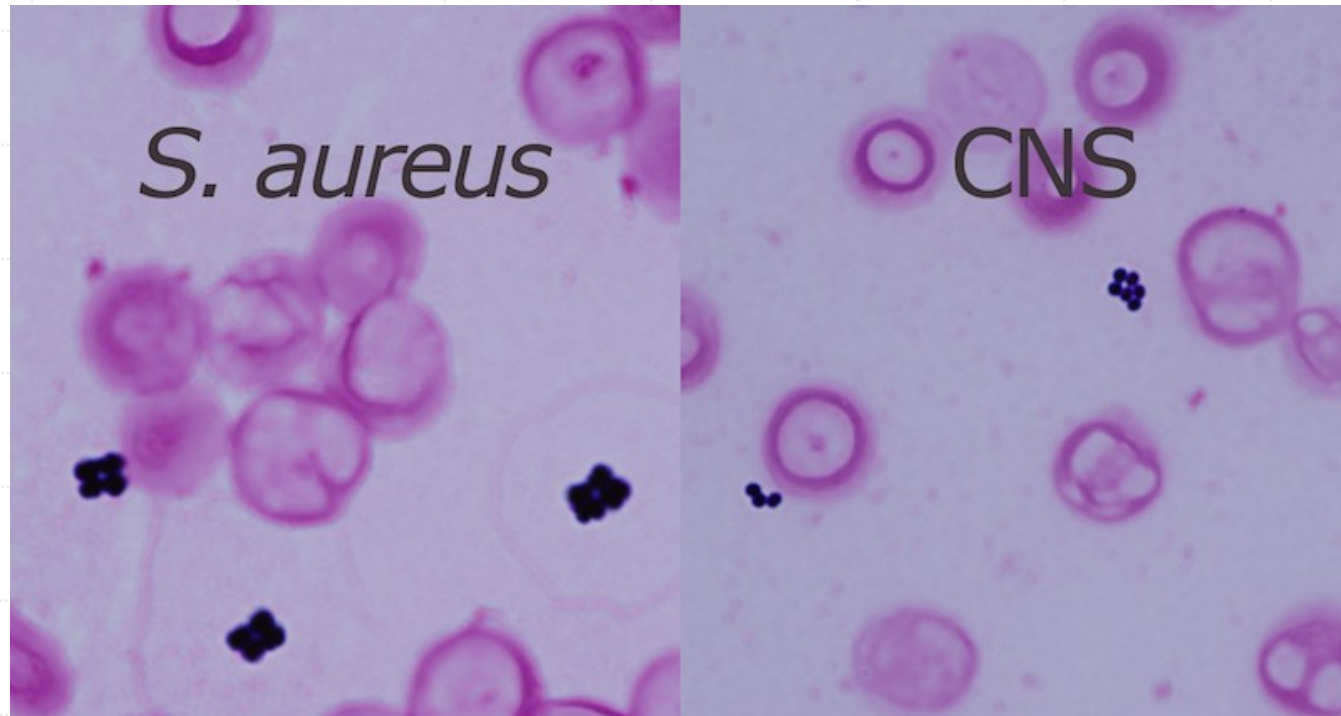
0.1000mm

【*H.influenzae*】



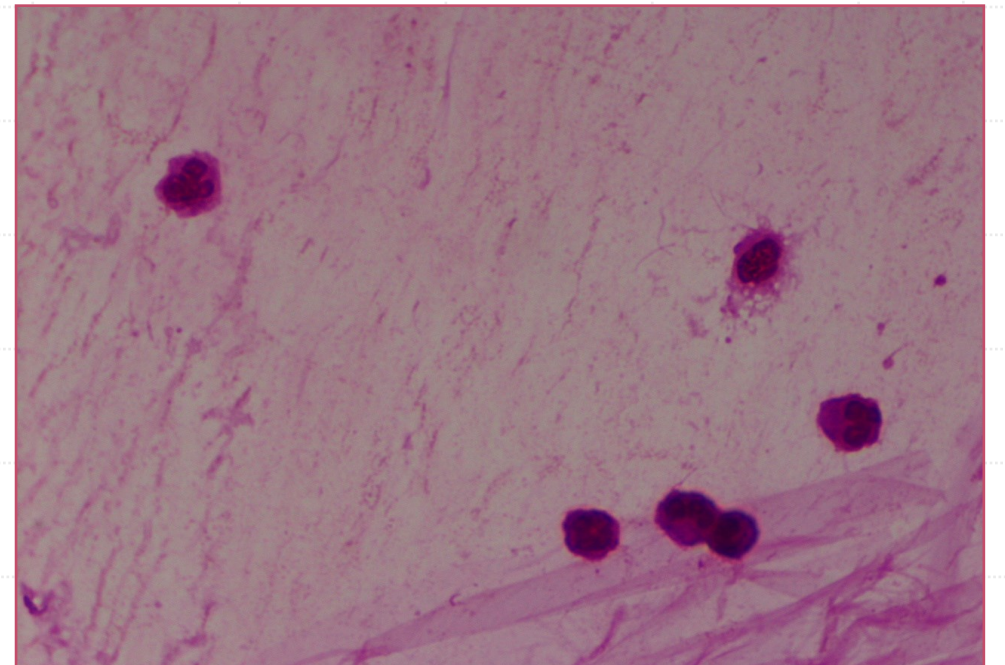
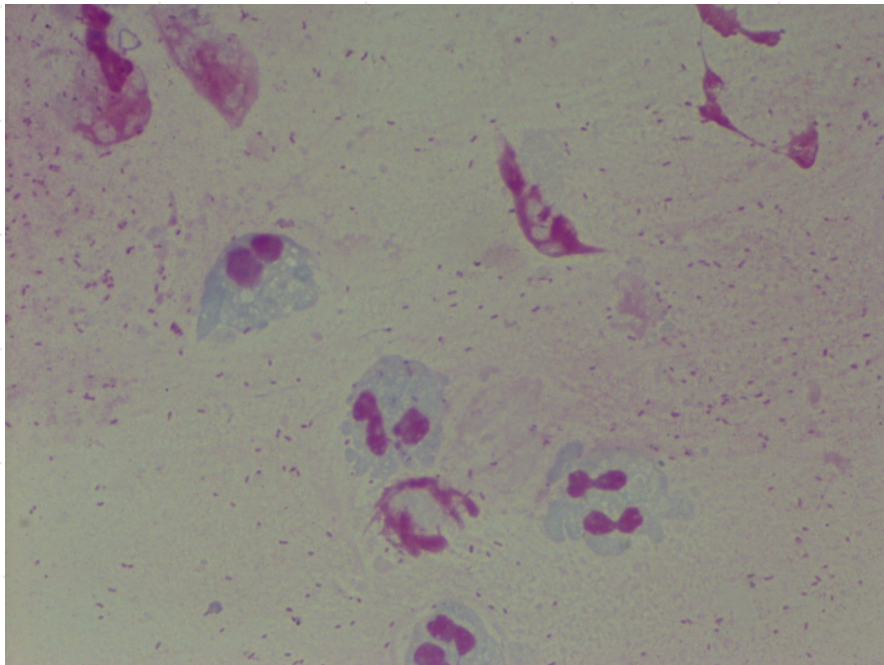
陽性球菌の場合MRSAか否か

- 黄色ブドウ球菌かどうかは推定可能かもしれない。（血液培養の場合）
- MSSAとMRSAの鑑別は不可能と思う。



抗菌薬の効果判定

- 抗菌薬使用前後のグラム染色をすることで判定可能
- 数時間から2日程度で抗菌薬の効果は確認できる。



知りたいことに応えられる？

この患者は感染症かどうか？ Focusはどこか（肺炎？ 尿路感染？）

陰性桿菌の場合、緑膿菌かどうか？

陽性球菌の場合、MRSAかどうか？

抗菌薬の変更が必要かどうか？

感染部位の推定は可能。感染症ではないことも推定できる。

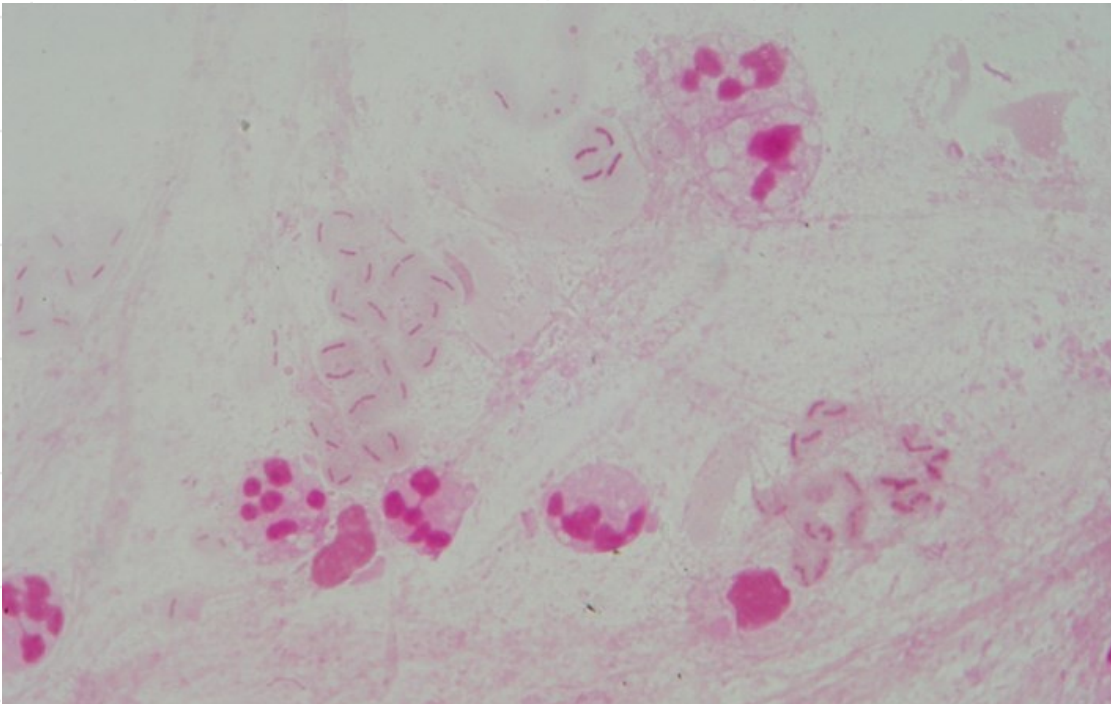
陰性桿菌の大まかな推定は可能な場合が

グラム染色では不可

抗菌薬の効果はグラム染色で判定できる。

より良い報告とは？

- 70代男性 人工呼吸器管理中
- 発熱 肺炎（+） ABPC/SBT投与中



【悪い例】
グラム陰性桿菌 （3+）
Geckler 5

以上



【ステップアップ】
グラム陰性桿菌 （3+）
Geckler 5

**ムコイドに包まれたやや細めのGNRを認めます。
形態からはムコイド型*Pseudomonas aeruginosa*を疑います。抗菌薬の変更等ご検討ください。**

2 培養検査

血液培養を中心に



培養検査はなぜ必要？

グラム染色だけでは🙅なの??

- 菌の同定（確定）が必要。
- 薬剤感受性を実施する必要がある。
- グラム染色で見えないものがある。

（抗酸菌・マイコプラズマ等）

特に血液培養は重要？

- ・ 敗血症の診断に有用
- ・ 敗血症は死亡率が高い（26－50%）¹⁾²⁾³⁾
- ・ 院内死亡原因の1位³⁾
- ・ 国内で10万／年が死亡¹⁾

1) International Forum of Acute Care Trialists : Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. Am J Respir Crit Care Med 193 : 259—272, 2016. 2) 日本救急医学会Sepsis Registry特別委員会報告：Severe sepsisに対する診療の質と死亡率の検証. 日救急医学会誌 24 : 263—269, 2013. 12) Hall MJ, et al : Inpatient care for septicemia or sepsis : a challenge for patients and hospitals. NCHS Data Brief (62) : 1—8, 2011. 13) Seymour CW, et al : Severe sepsis in pre-hospital emergency care : analysis of incidence, care, and outcome. Am J Respir Crit Care Med 186 : 1264—1271, 2012.

敗血症の診断基準

◆敗血症

定義：

感染に対する宿主生体反応の調節不全で，生命を脅かす臓器障害

診断基準：

感染症が疑われ，SOFA スコア（表 2）が 2 点以上増加したもの

◆敗血症性ショック

定義：

敗血症の部分集合であり，実質的に死亡率を上昇させる重度の循環・細胞・代謝の異常を呈するもの

診断基準：

十分な輸液負荷にもかかわらず，平均動脈圧 65 mmHg 以上を維持するために血管作動薬を必要とし，かつ血清乳酸値が 2 mmol/L を超えるもの

SOFAスコア一覧

	0 点	1 点	2 点	3 点	4 点
呼吸器 PaO ₂ /F _i O ₂ (mmHg)	≥400	<400	<300	<200 +呼吸補助	<100 +呼吸補助
凝固能 血小板数 (×10 ³ /μl)	≥150	<150	<100	<50	<20
肝臓 ビリルビン (mg/dl)	<1.2	1.2~1.9	2.0~5.9	6.0~11.9	>12
循環器	MAP≥70 mmHg	MAP<70 mmHg	DOA<5 or DOB	DOA 5.1~15 or Ad ≤0.1 or NOA ≤0.1	DOA>15 or Ad>0.1 or NOA>0.1
中枢神経 Glasgow Coma Scale	15	13~14	10~12	6~9	<6
腎 クレアチニン (mg/dl) 尿量 (ml/日)	<1.2	1.2~1.9	2.0~3.4	3.5~4.9 <500	>5.0 <200

DOA；ドパミン，DOB；ドブタミン，Ad；アドレナリン，NOA；ノルアドレナリン，いずれも μg/kg/min

MAP：平均動脈圧

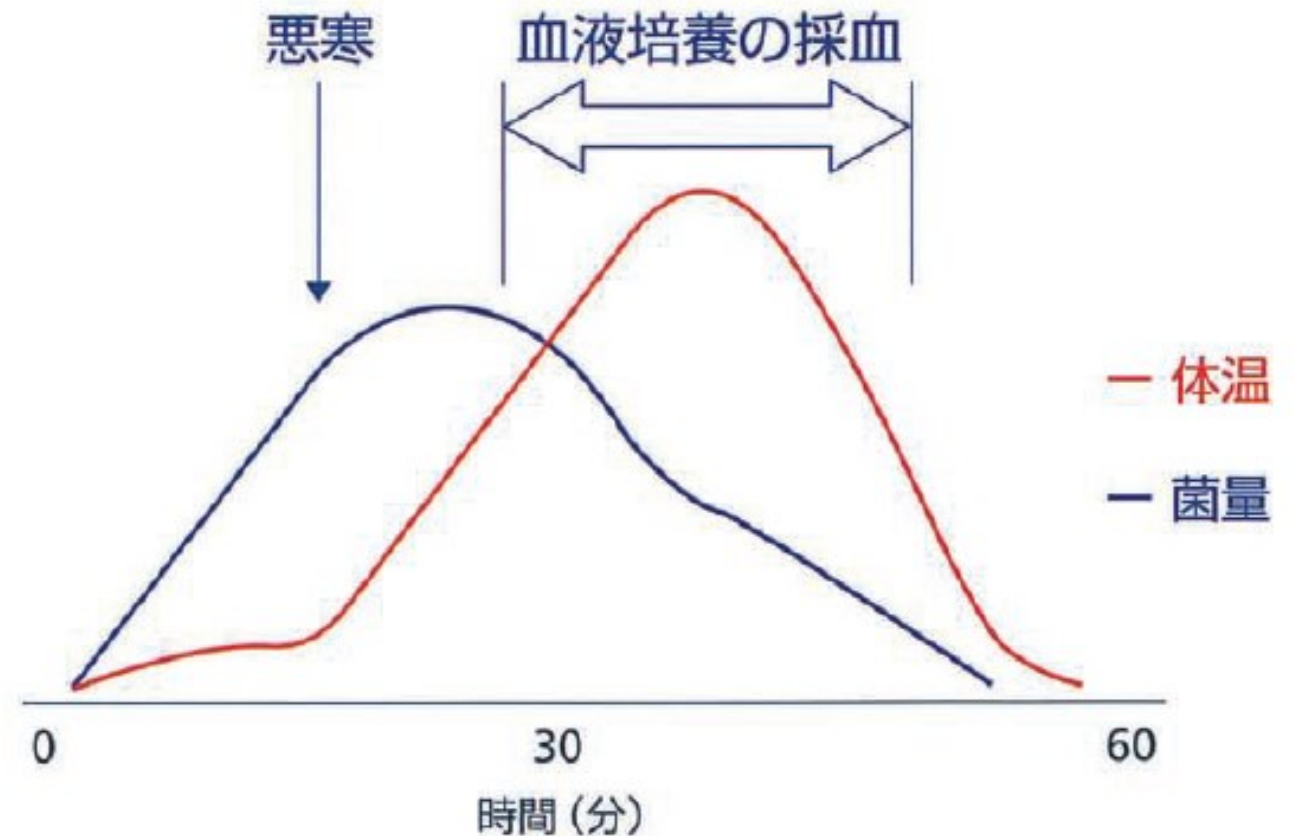
日本版敗血症診療ガイドライン2016 作成特別委員会：日本版敗血症診療ガイドライン2016. 日救急医学会誌 28：S1ー232, 2017.より引用

疑ったらすぐ血培！

- 時間とともに菌量は低下
- 悪寒戦慄時が最大
- 熱が出た後には菌量は減少している



できるだけ早く採取



血液培養は2セット採取

嫌気ボトル



好気ボトル



嫌気ボトル



好気ボトル



小児ボトル

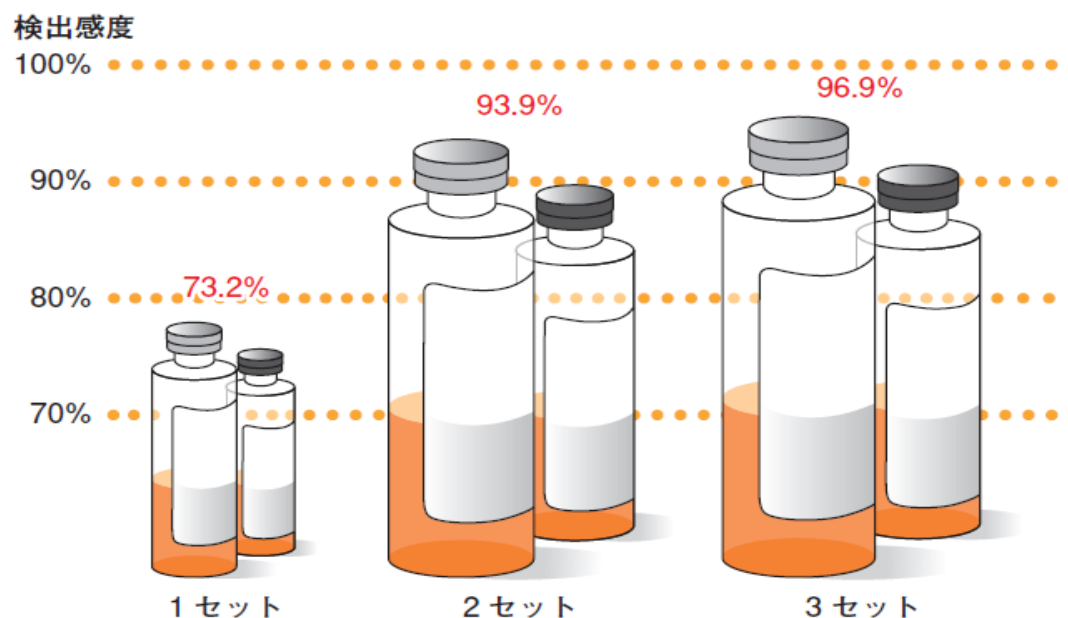


2背セット採取する理由その①

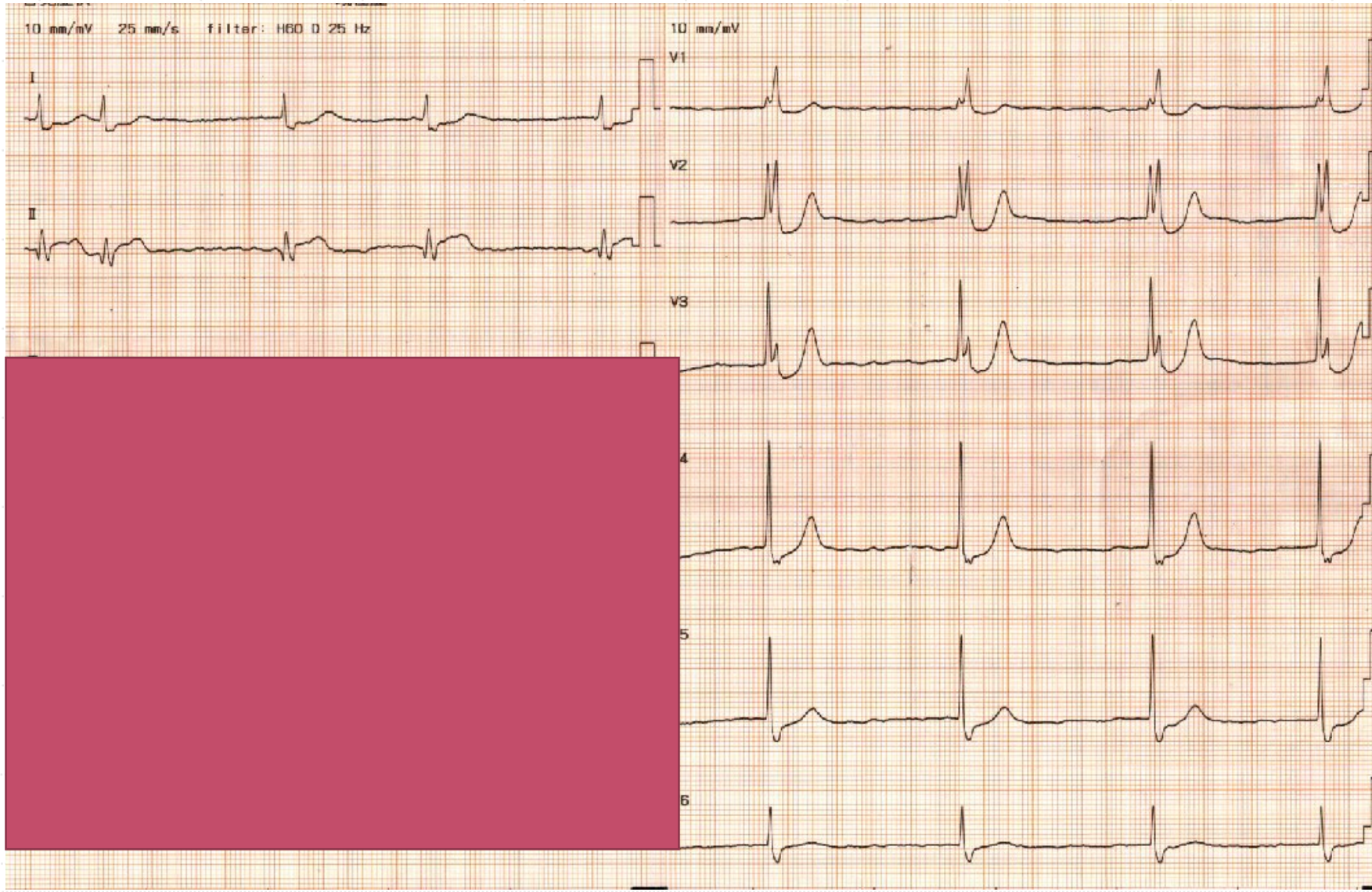
陽性率を上げる（感度を高める。）

Weinstein et al. Detection of Bloodstream Infections in Adults : How Many Blood Cultures Are Needed J Clin Microbiol. 2007 : 45 : 3546-3548

1セットでは感度
約 70 %
3割は見逃す。

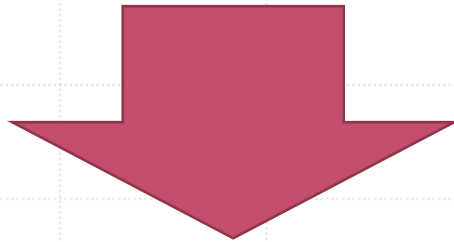


感度70%の心電図・・・。



2セット採取する理由 その②

- 検出された菌が本当に起炎菌かどうか？
- 本当に血液内にいたのか？採血時に皮膚から混入したのか？



コンタミネーションの判断

*S. epidermidis*が検出された場合

陽性/総セット数	真の起因菌 (%)	コンタミ (%)	判定困難 (%)
1/2	2	95	3
2/2	60	3	37
1/3	0	100	0
2/3	75	0	25
3/3	100	0	0

ここで、当院であった事例を・・・

Aさん敗血症疑てるんだよね。今
血培提出したけど血液を直接グラ
ム染色したいんだけど。



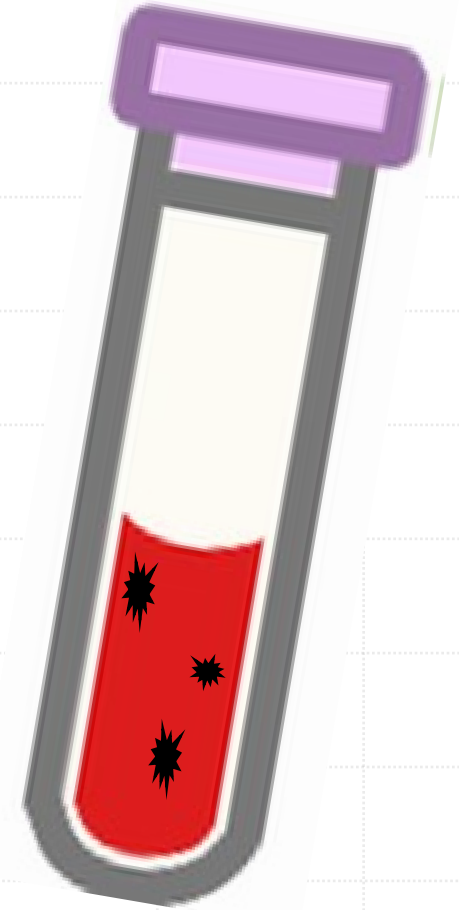
.....

菌血症の際の血液内の菌量

- ほとんどの場合

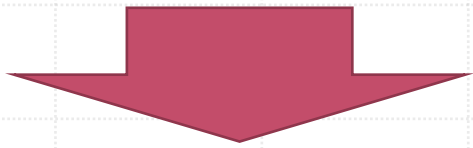
1 CFU/ml 以

- 直接塗抹で菌が見えることはごくまれ
- *S. pyogenes*や*C. perfringens*などの劇症型感染症の場合はギムザ染色で確認できることもある。

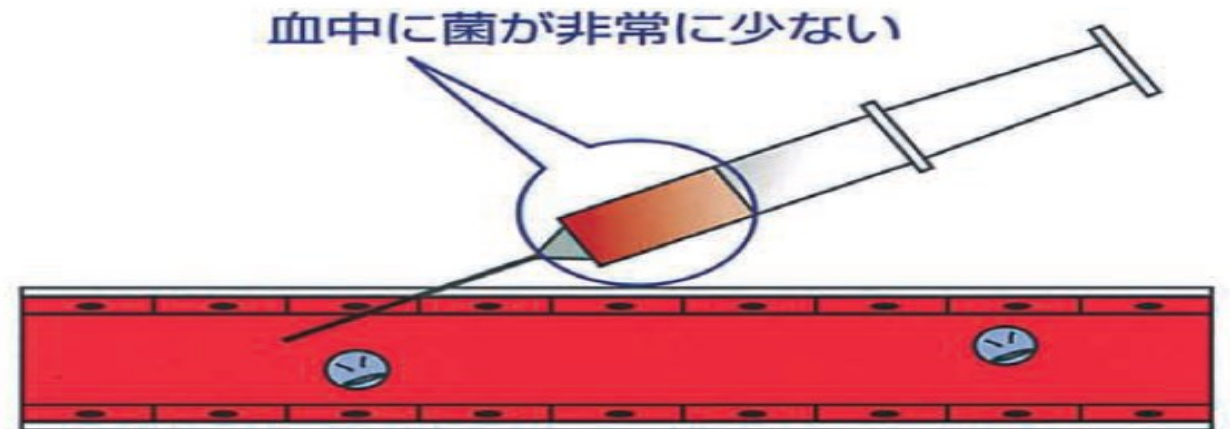
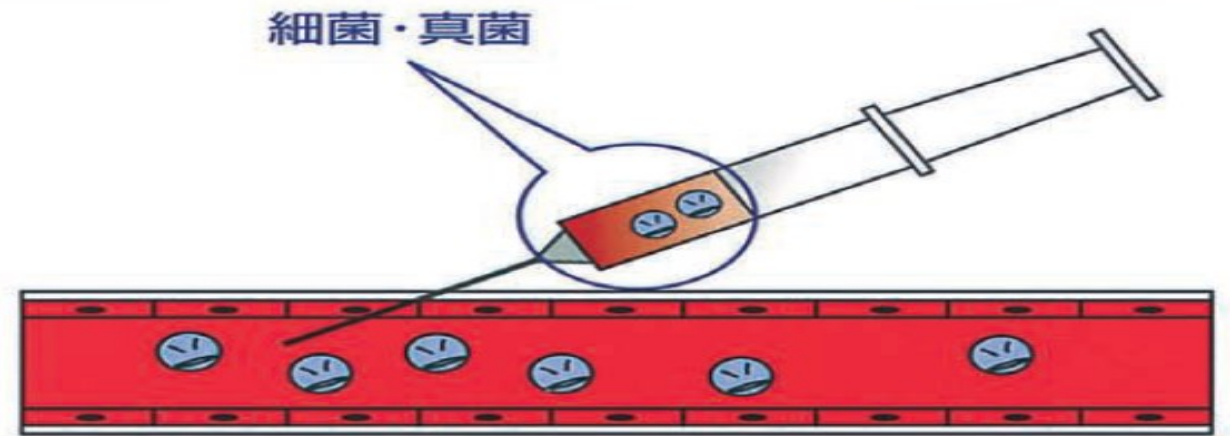


採血量はどのくらいがいいのか？

- 血液中の菌量は少ない。
- 必ずしも採血した血液に菌がふくまれるとは限らない。



可能な限り多くの検体を採取したほうがいい！？

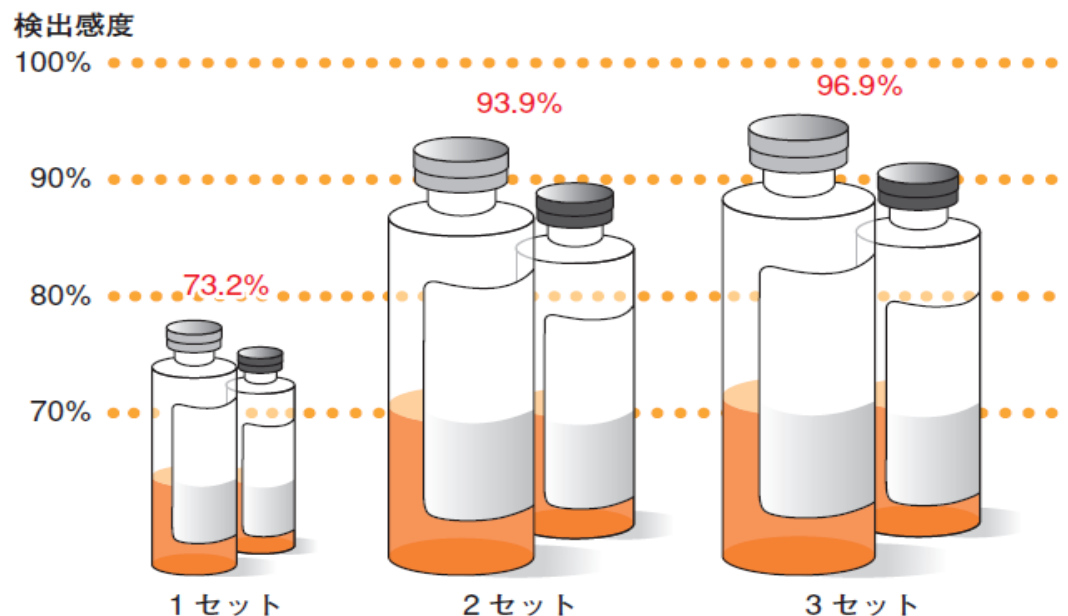


2背セット採取する理由その①

陽性率を上げる（感度を高める。）

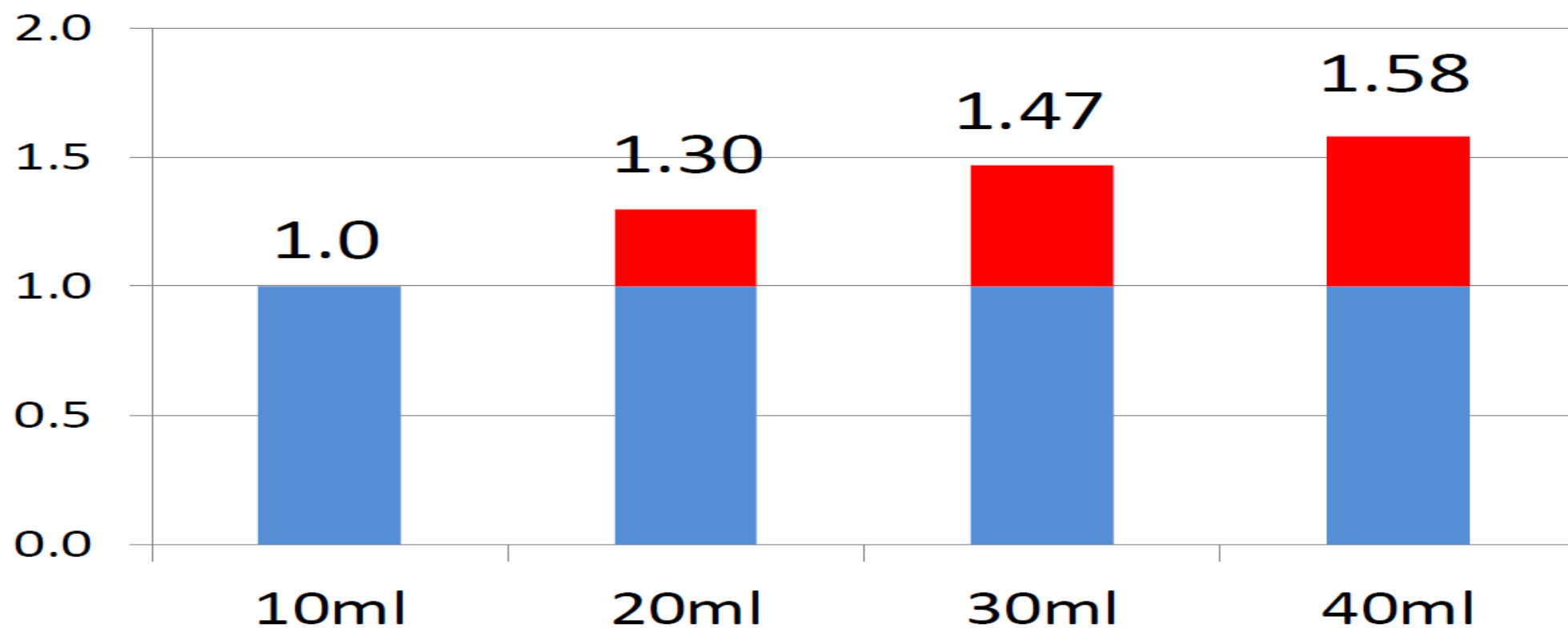
Weinstein et al. Detection of Bloodstream Infections in Adults : How Many Blood Cultures Are Needed J Clin Microbiol. 2007 : 45 : 3546-3548

1セットでは感度
約 70 %
3割は見逃す。



1セット当たりの採取量と陽性率

陽性率の比





血液培養検査のポイント

- 可能な限り2セット採取
- 規定量をしっかり採取
- 可能な限りコンタミを避ける
- 取ったらすぐ培養
- 陽性はすぐ報告（24時間報告できる体制が望ましい。）

Diagnostic Stewardship (診断支援)

What is “diagnostic stewardship”?

Diagnostic stewardship is defined in the GLASS Manual as:

“coordinated guidance and interventions to improve appropriate use of microbiological diagnostics to guide therapeutic decisions. It should promote appropriate, timely diagnostic testing, including specimen collection, and pathogen identification and accurate, timely reporting of results to guide patient treatment.”

**正しい治療に導くための微生物検査の適切な使用の改善のための指導と介入
患者の治療のために適切な検査を推進すべき
(検体採取、起炎菌の同定、治療に導く正確かつ迅速な報告)**



Diagnostic stewardship

**A guide to implementation in
antimicrobial resistance
surveillance sites**



微生物検査室における10の教義

- 1. 質の悪い検体は検査を行わない。

提出された検体について疑義がある場合、検査技師は臨床医に責任を もって問い合わせを行う。

- 2. 発育した菌の全てを報告しない。
- 3. “Background noise” を避けるよう、検体採取時に注意する。
- 4. 検体は原則として組織や体液等を用い、スワブは第二選択とする。
- 5. 検査室は明文化された手順書に沿って検査を行う。
- 6. 検体は抗菌薬投与前に採取する。
- 7. 感受性検査は、臨床的意義が明らかな株に対してのみ行う。
- 8. 検査結果は、正確、有意、臨床的意義があるものとする。
- 9. 技術的な方針は検査室が決定する。ただし、多職種とのコミュニケーションと相互の尊敬が重要である。
- 10. 検体のラベリングは適切に行う



要するに

Diagnostic Stewardship（診断支援）



- 検体採取から結果報告まで適切に行い、診療に有用な情報を提供する。



臨床検査業務の基本



5 最新の技術等



Take Home Message

- グラム染色は多くの情報を得ることができる。
 - 得られた情報を臨床に伝えることが重要
- 常日頃のコミュニケーションが微生物検査の質を高める。
- 微生物検査は時間がかかる検査だからこそ可能な限り早く情報を伝える。