

千葉県微生物検査研究班研修会

「最近話題の細菌 TOP12 プラスα」

岐阜大学大学院 医学系研究科
病原体制御学分野

大楠 清文

E-mail: ohkusu@gifu-u.ac.jp

2011年9月3日

臨床微生物検査 by Kiyo

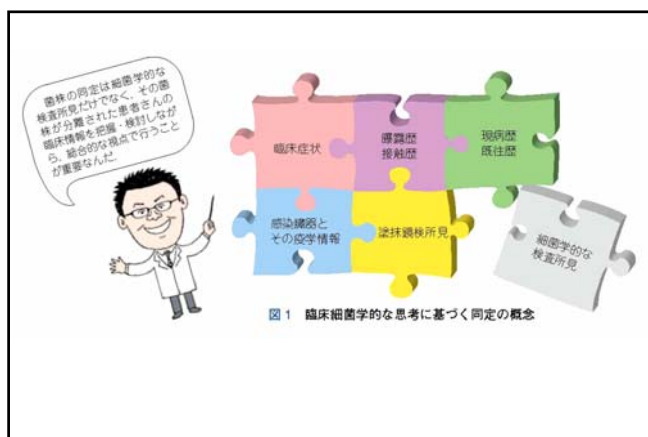


1. 菌は生き物である。
2. 菌は嘘つかない。
3. 臨床情報から菌名を想定する訓練が大切。
4. 我々は時々自分の目標を見失う。
5. そんなとき、その検体が自分の最も大切な人から採取されたものだったら・・・。
6. 前向きな失敗は、次の挑戦への勇気とバネを与えてくれる「何事も経験！」。
7. 臨床微生物検査でしか得られない喜びとやりがいがある。
8. 患者診療に貢献するべく知識、経験、そして“匠”の技を融合「実践臨床微生物学」。

連載を始めるにあたって

臨床微生物検査に携わっている検査技師は、慌ただしい日常業務の中で、心ときめくステキな瞬間を味わうことができます。その瞬間とは、これまで分離・同定したことのない「細菌」とのはじめての出会いです。しかしながら、珍しい細菌との出会いは、恋人のような「運命の出会い」とはいいません。なぜなら、「私は○○菌です。よろしくね!」と細菌の方から声をかけながら、我々の前に顔を出してくれることがないからです。まだ会ったことのない細菌や症例との出会いは、偶然にやってきます。その出会いに「ひらめく」ためには、細菌学的な特徴のみならず、臨床的な視点からその細菌を熟知しておくことが大切です。すなわち、臨床情報から起炎菌を想定する訓練を積み重ねながら、言葉ではなかなか表現することがむずかしいスキル、テクニク、コツ、ノウハウとよばれる「臨床細菌学的な智慧」を身につけることが重要です（図1）。

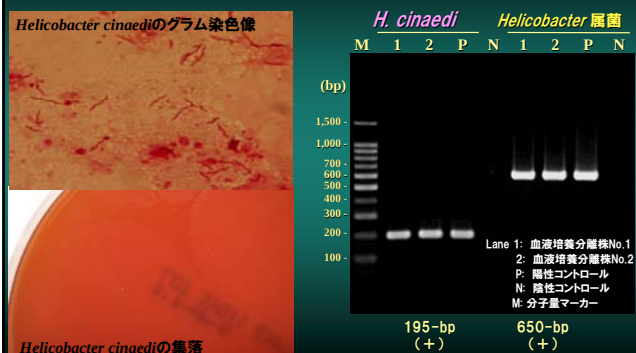
そこで、本連載では今回から12回にわたって、最近、話題となっている細菌を毎号1菌種取り上げ、それらの細菌が原因となる感染症の特徴をご紹介します。本連載を通して、臨床微生物検査のひらめきとドキドキを実感してもらえれば幸いです。



No.1 *Helicobacter cinaedi*

- ✓グラム陰性らせん菌
- ✓血液培養（発育に4～10日間）、糞便
- ✓フィルム状の発育あるいは発育不能
- ✓敗血症(悪性腫瘍の化学療法中ほか)
- ✓蜂窩織炎が特徴、院内感染の事例あり
- ✓各種抗菌薬に対する感受性は良好

PCR法による*Helicobacter cinaedi*の同定





アウトブレイク認知後の検査対応と結果

血液培養検査 (BACTEC9120システム:BD)

- ・培養期間:10日間培養へ延長 好気ボトル(92F)・嫌気ボトル(93F)
- ・結果:陽性患者数 9名、陽性検体数 21件(全て好気ボトル)

陽性時期	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目	9日目
件数(n=21)	4	4	7	3	1	1	1

便培養検査(変法スキロー-寒天培地EX:日水)

- ・35℃微好気培養 7日間へ変更 (従来:42℃ 2日間)
- ・結果:陽性患者数 9名 (便塗抹グラム染色陽性 5件)

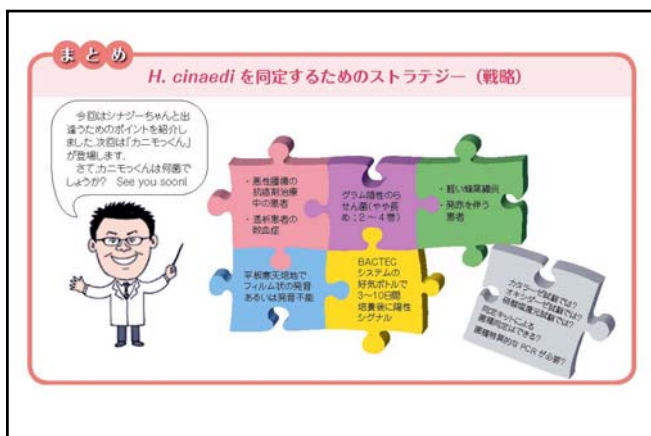


H. cinaedi菌株の塩基配列による相同性

方法と結果:

H. cinaedi 16株について23S rRNAの遺伝子の一部をPCRで増幅、塩基配列を決定(約1,700塩基)して株間で比較した。

症例(菌株)No ■女性 ■男性	塩基			
	44番目	145番目	647番目	1497番目
1, 3, 5, 13	G	T	T	G
7	A	T	T	A
2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16	G	C	C	G



No.2

Campylobacter fetus subsp. fetus

- ✓グラム陰性らせん菌
- ✓血液、髄液、膿汁(腹腔内、卵巣、肺など)
- ✓42℃で発育する株が多い
- ✓CET(S), NA(R)の例外あり
- ✓敗血症、髄膜炎、大動脈瘤、蜂窩織炎
- ✓妊婦が生レバー摂食の数日後に早産、新生児髄膜炎発症。ステロイド服用中にユッケ摂食で髄膜炎発症の例あり。

症例(日齢12 男児)

主訴 発熱 哺乳力低下

妊娠分娩歴 在胎36週5日 正常経産分娩

妊娠・分娩経過は特に問題なし 出生体重2315g

家族歴 特記事項なし

現病歴

産院退院後の日齢12に39度台の発熱、哺乳力低下を認め前医を紹介受診。細菌性髄膜炎(WBC31,300/ μ l, CRP4.74mg/ml, 髄液細胞数18,816/mm³, 蛋白数685mg/dl, 糖3mg/dl)と診断され、抗菌薬(ABPC・CTX・MEPM)、デキサメタゾン、免疫グロブリン製剤による治療を開始された。日齢13より解熱し全身状態・検査所見ともに改善傾向認めた。

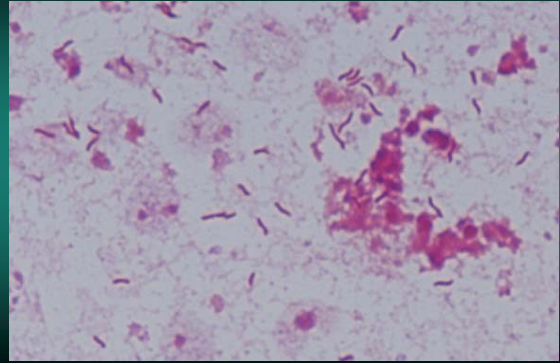
しかし、日齢17に施行された頭部MRIで左前頭葉に膿瘍形成を認めた。内科的治療を継続されるも膿瘍拡大傾向であったため、日齢24に外科的治療も含めた加療目的で当院へ転院となった。



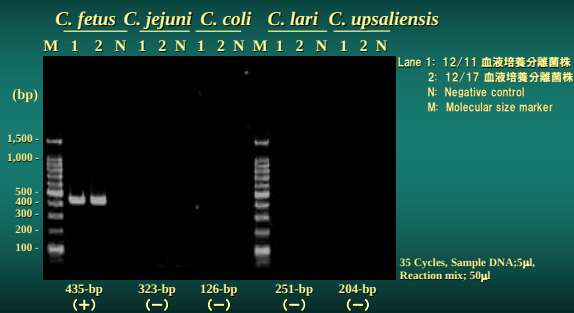
日齢23前医頭部MRI T1 sense Gd造影

スライド提供: 聖マリアンナ医科大学病院小児科

C. fetus subsp. *fetus* のグラム染色像



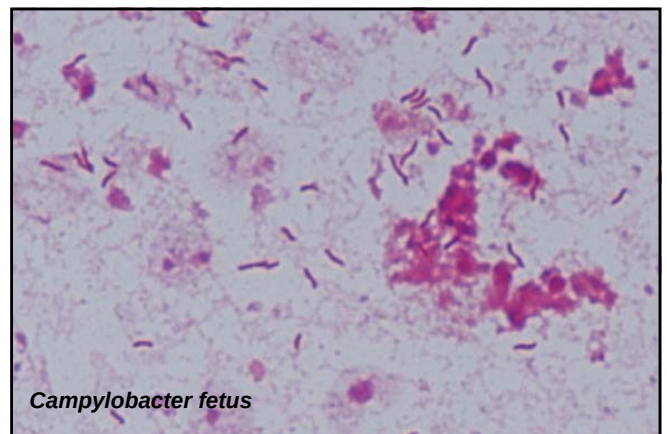
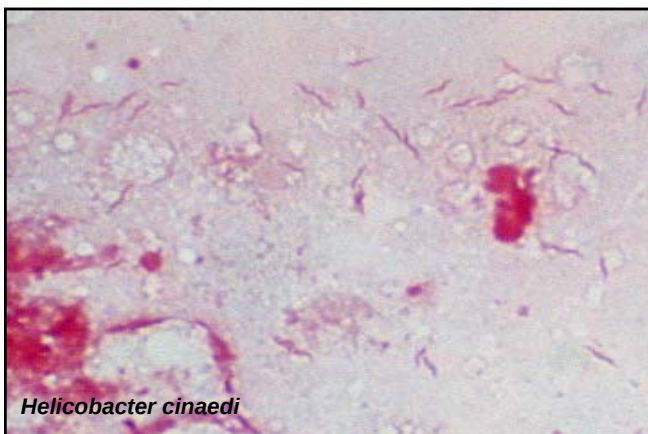
PCR法によるCampylobacter属の菌種同定

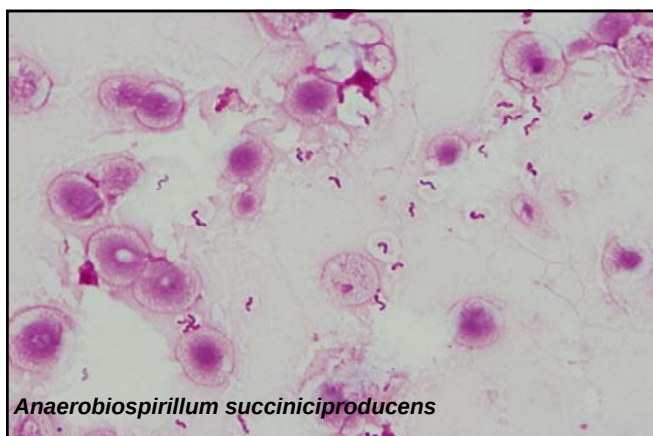
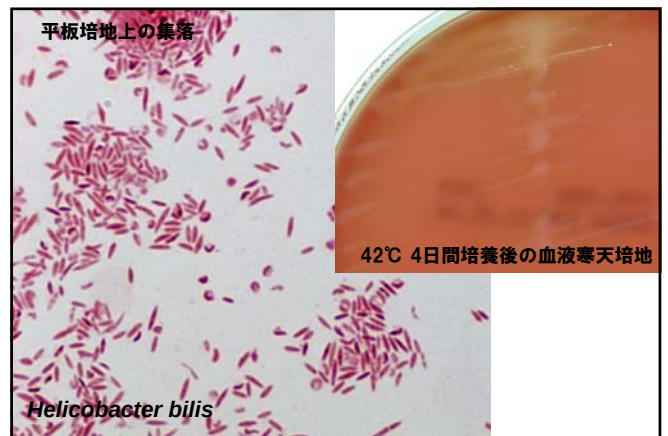
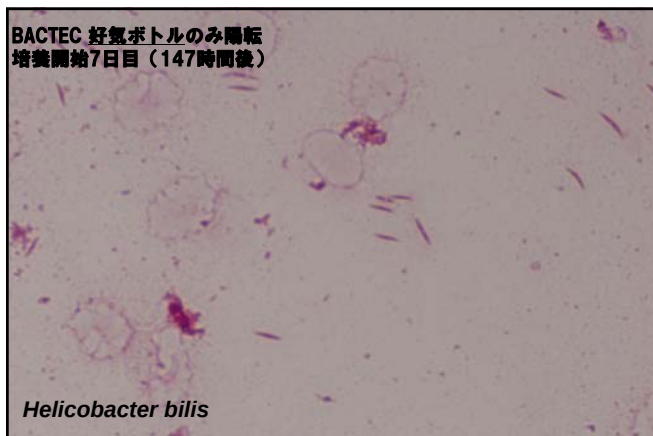


「血液培養から分離されたらせん菌」

ーグラム染色像と患者情報から推察する細菌ー

- ✓ *Helicobacter cinaedi*
- ✓ *Campylobacter fetus*
- ✓ *Campylobacter lari*
- ✓ *Helicobacter bilis*
- ✓ *Anaerobiospirillum succiniciproducens*
- ✓ *Desulfovibrio desulfuricans*
- ✓ *Brachyspira pilosicoli*





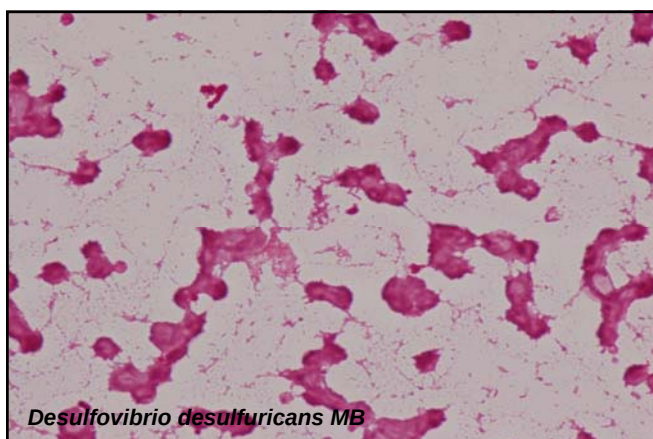
鞭毛染色（レイフソン法）



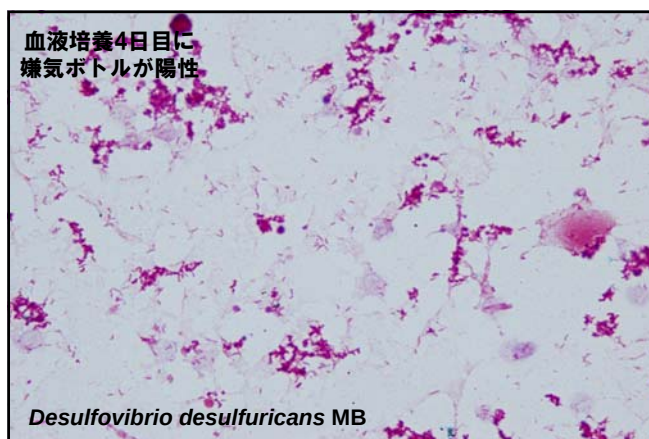
Anaerobiospirillum succiniciproducens



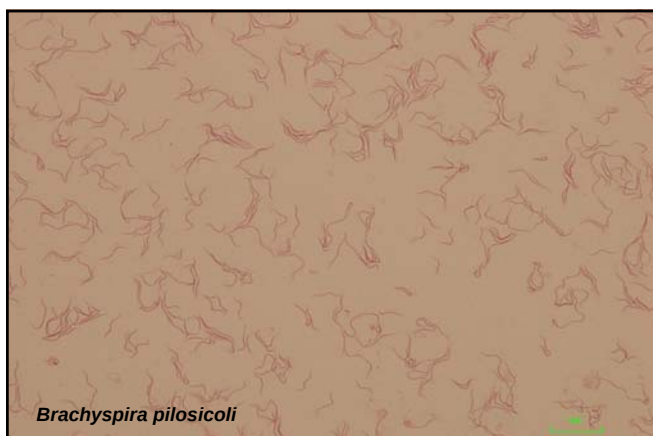
Desulfovibrio desulfuricans MB



Desulfovibrio desulfuricans MB



Desulfovibrio desulfuricans MB

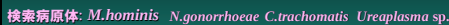


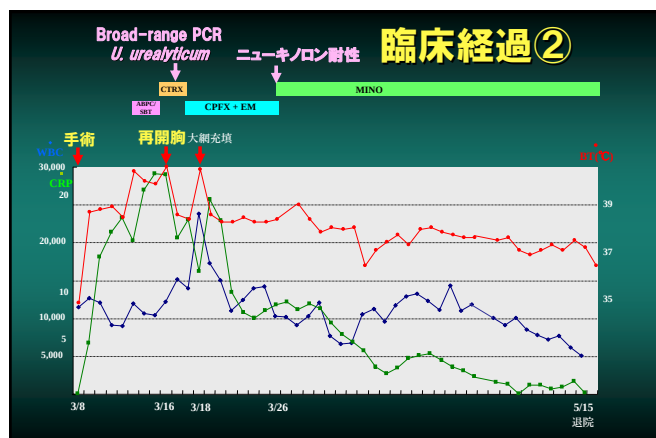
Brachyspira pilosicoli

No.3

Mycoplasma hominis

- ✓グラム染色に染まらない（細胞壁なし）
- ✓血液寒天培地に微小集落形成（2～4日）
- ✓膿汁（子宮，卵巣，帝王切開創部ほか），
関節液，髄液，羊水など
- ✓初代は嫌気培養が発育良好
- ✓術後感染症；腹部，胸部（縦隔炎），PID，
関節炎，髄膜炎のケースもあり
- ✓EM (R)，CLDM (S)





54歳男性、大動脈瘤術後の縦隔炎

2) Subtypeの決定 (Subtype 1) 3) キノロン耐性遺伝子

Ureaplasma urealyticum

serovar 2, 5, 8, 9
multiple banded antigen gene, partial cds
Identities = 448/449 (99%)

Ureaplasma urealyticum
isolate CM239/2004(ciprofloxacin;MIC, >2)
gyrase subunit A (gyrA) gene,
Identities = 298/299 (99%)

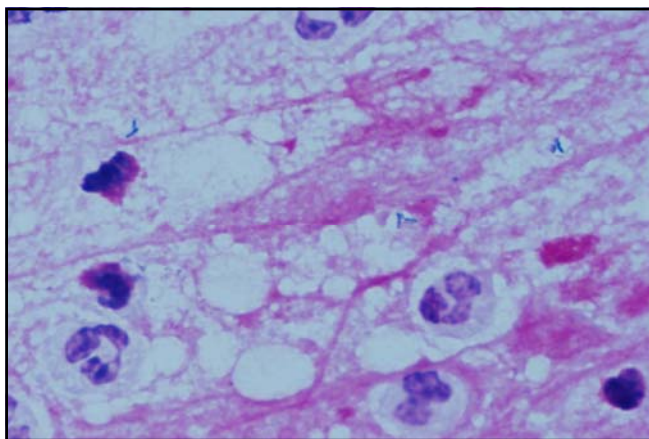
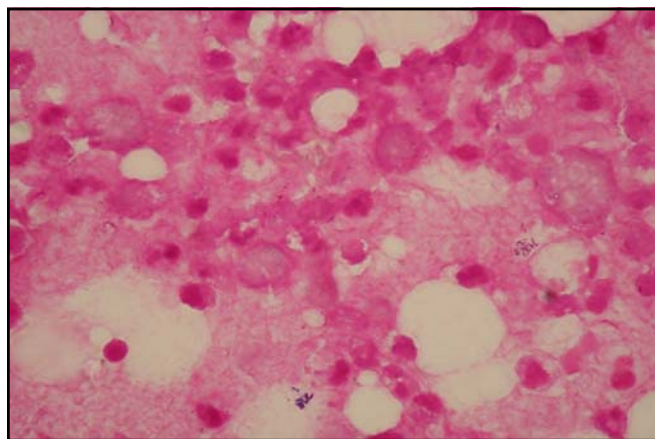
Ureaplasma urealyticum
isolate CM239/2004 topoisomerase IV (parC) gene
Identities = 269/269 (100%)

Review of published cases of post-operative mediastinitis due to *Ureaplasma* infection

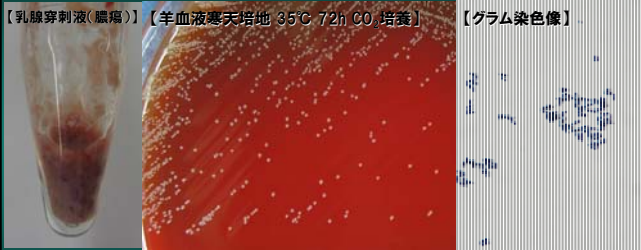
Case	Age/Sex	PH	Previous Surgery	Organisms	Diagnostic tool	Outcome	
①	1995	63/M	HT, DM	CABG	<i>U. urealyticum</i> , <i>M. hominis</i>	Culture	Resolved
②	1999	43/M	HT, DM	CABG	<i>U. urealyticum</i>	Culture	Resolved
③	2008	77/F	HT, COPD + hemi-arch	AVR	<i>U. urealyticum</i> , <i>M. hominis</i>	Culture	Died
④	2009	66/M	HT, HL, DM	CABG	<i>U. parvum</i>	Culture	Resolved
Present case	54/M	HT	Total-arch	<i>U. urealyticum</i>	PCR	Resolved	

No.4
Corynebacterium kroppenstedtii

- ✓グラム陽性桿菌(1998年に記載)
- ✓血液寒天培地で2~4日培養
- ✓膿汁(乳腺炎)
- ✓キット・自動機器では同定できない
- ✓脂質好性(1% Tween20添加)
- ✓肉芽腫性乳腺炎(乳癌疑いの症例あり)
- ✓各種薬剤感受性は良好



Corynebacterium kroppenstedtii ；肉芽腫性乳腺炎の起炎菌



API Coryne V3.0 のコードは、2040104
(*C. argenteorotense*, % ID 87.1, T 0.49)

スライド提供: 聖マリアンナ医科大学病院 臨床検査部

No.5

Neisseria meningitidis

- ✓ グラム陰性球菌
- ✓ 血液寒天培地にも発育良好
- ✓ 血液, 髄液, 尿道分泌物, 関節液
- ✓ 本邦では血清型Yが大半 (近年はY >> B)
- ✓ 敗血症, 髄膜炎, 尿道炎, 関節炎
- ✓ 薬剤感受性良好; 海外ではPCG耐性株出現
- ✓ MLST解析 (感染研の高橋英之先生へ依頼)
- ✓ 患者との濃厚接触者には予防内服

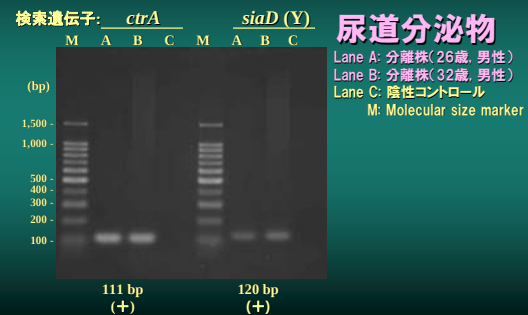
尿沈渣の培養 (髄膜炎菌)



チョコレート寒天培地

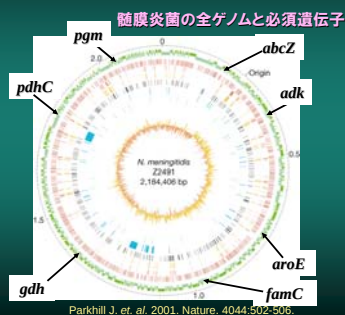
血液寒天培地

髄膜炎菌の同定と血清型Yの決定; *ctrA*, *siaD* (serogroup Y) 遺伝子検索

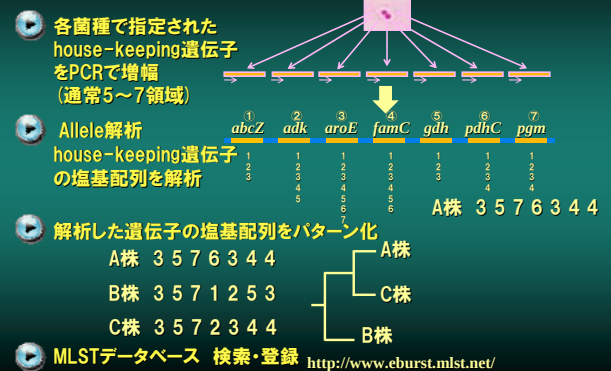


MLST解析 (Multi Locus Sequence Typing)

- 7つの必須遺伝子(house-keeping遺伝子)の塩基配列を解析し, その塩基配列の相違をデータベースで照合することにより分類する方法である。
- このデータベースはインターネットを介し, 世界とオンラインで結ばれているため, 分離株を国内はもちろんのこと, 海外分離株と照合・比較することが可能である。



MLST解析の手順



海外渡航先での感染/保菌が 示唆された髄膜炎菌感染症の1例

- 1) 藤田保健衛生大学病院 臨床検査部
 - 2) 岐阜大学大学院医学系研究科 病原制御学分野
 - 3) 国立感染症研究所 細菌第一部
- 中山 麻美¹⁾, 早川 敏¹⁾, 濱岸 真奈美¹⁾,
池田 貴和子¹⁾, 新谷 知世¹⁾, 大楠 清文²⁾,
高橋 英之³⁾, 渡邊 治雄³⁾

スライド提供: 藤田保健衛生大学病院 臨床検査部

MLST解析の結果

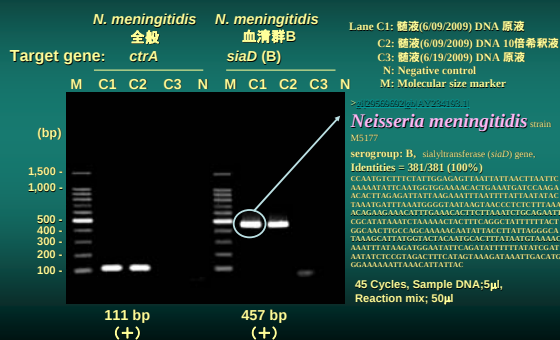
ST (遺伝子型)	4893
clonal complex	ST41/44complex/Lineage 3
allelic profile	abcZ 3 adk 6 aroE 9 fumC 350 gdh 9 pdhC 6 pgm 9
分離国	France
地域	38
登録日	2005-06-27
年齢	15歳
性別	女性
疾患	髄膜炎
分離検体	髄液
菌種	<i>Neisseria meningitidis</i>
血清群	B

分離株はST-4893と同定。
ST-4893は過去にフランスで分離
されていた。
また、日本で分離された
ST-41/44complexとは7つの遺伝子
の中で3つしか同一でないことが判明。

フランスからの輸入例
である可能性が高い!

スライド提供: 藤田保健衛生大学病院 臨床検査部

髄液からの髄膜炎菌DNAの検出



No.6

Aggregatibacter aphrophilus

- ✓ グラム陰性小桿菌
- ✓ *Haemophilus*属から移籍 (2006年)
- ✓ 血液寒天培地にも発育 (CO₂環境が良好)
- ✓ 血液, 膿瘍 (脳, 脊椎, 肺)
- ✓ 感染性心内膜炎 (IE), 脊椎炎, 脳膿瘍, 膿胸
- ✓ 薬剤感受性良好
- ✓ 液体培養で凝集塊 (ST実施: 超音波破碎)



HACEKグループ

H; *Haemophilus*属菌

H. aphrophilus, *H. parainfluenzae*

A; *Actinobacillus*属菌

A. actinomycetemcomitans

A; *Aggregatibacter*属菌

A. aphrophilus, *A. actinomycetemcomitans*

C; *Cardiobacterium*属菌

C. hominis, *C. valvarum* (2005年)

E; *Eikenella* *corrodens*

K; *Kingella* *kingae*

「血液培養から分離された 特徴的な形態の細菌」

—グラム染色像と患者情報から推察する細菌—

- ✓ *Leptotrichia trevisanii*
- ✓ NVS / NDS
- ✓ *Clostridium tertium*
- ✓ *Neisseria elongata*
- ✓ *Streptobacillus moniliformis*

BacT/Alert SNボトル（嫌気）
38h陽性

Leptotrichia trevisanii

平板培地状の集落

Leptotrichia trevisanii

血液培養液

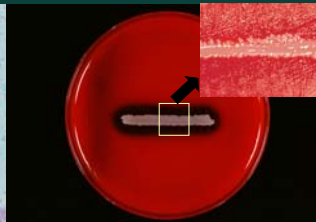
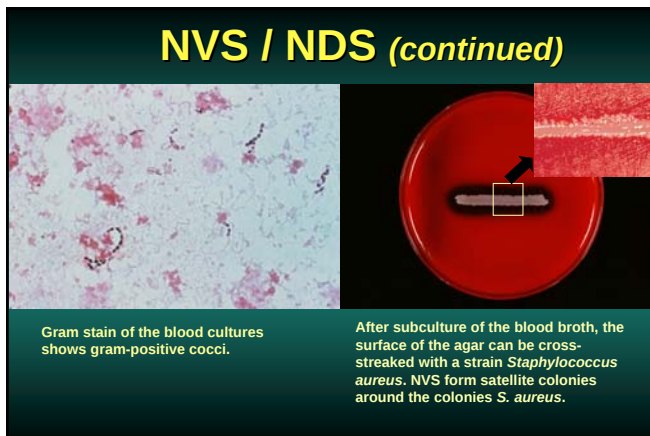
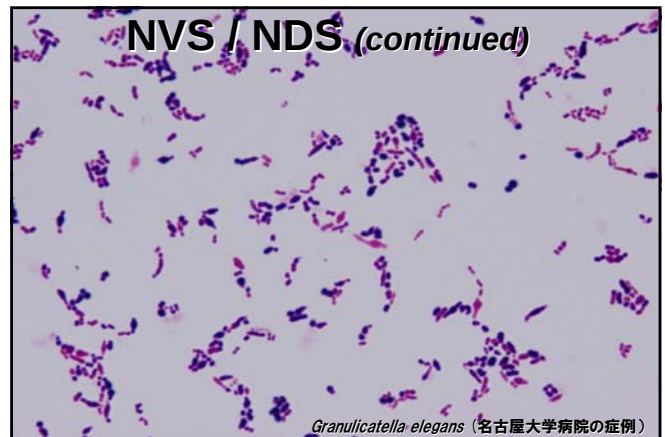
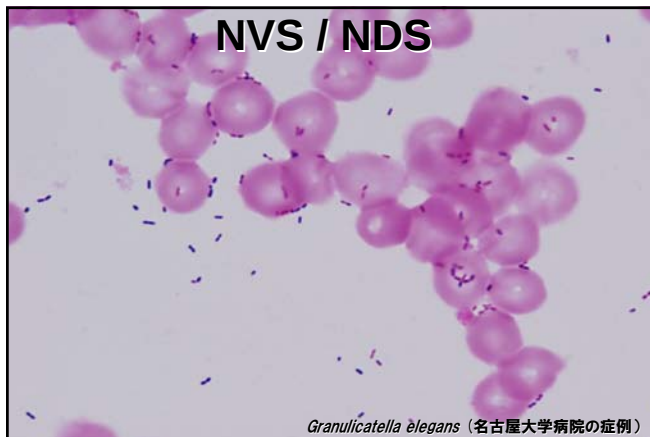
Leptotrichia trevisanii

平板上の集落

Leptotrichia trevisanii

血液培養液

Leptotrichia sp. 新菌種



NVS / NDS

**Nutritionally Variant Streptococci /
Nutritionally Deficient Streptococci**

- ✓ グラム陽性球菌；集落はグラム多型・多染色性
- ✓ *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella* spp.
- ✓ L-システインやビタミンB6要求性（衛星現象）
- ✓ チョコレート寒天培地/ブルセラ培地に発育
- ✓ 血液, 膿瘍（脳, 耳）
- ✓ 感染性心内膜炎（IE；連鎖球菌の約5%）, 脳膿瘍
- ✓ 薬剤感受性良好（PCGのMIC値がやや高い株あり；GMを併用）

Abiotrophia

Kawamura et al. 1995, gen. nov.

Type species: *Abiotrophia defectiva* (Bouvet et al. 1989) Kawamura et al. 1995.

Reference: KAWAMURA (Y.), HOU (X.G.), SULTANA (F.), LIU (S.), YAMAMOTO (H.) and EZAKI (T.): Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adjacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, 45, 798-803.

Abiotrophia defectiva

(Bouvet et al. 1989) Kawamura et al. 1995, comb. nov. (Type species of the genus).

Type strain: strain SC10 = ATCC 49176 = CIP 103242 = CCUG 27639 = CCUG 27804 = DSM 9849 = LMG 14740.

旧名称 Basonym: *Streptococcus defectivus* Bouvet et al. 1989.

Reference: KAWAMURA (Y.), HOU (X.G.), SULTANA (F.), LIU (S.), YAMAMOTO (H.) and EZAKI (T.): Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adjacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, 45, 798-803.

Granulicatella

Collins and Lawson 2000, gen. nov.

Type species: *Granulicatella adiacens* (Bouvet et al. 1989) Collins and Lawson 2000.

Granulicatella adiacens

(Bouvet et al. 1989) Collins and Lawson 2000, comb. nov. (Type species of the genus).

Type strain: strain GaD = ATCC 49175 = CCUG 27637 A = CCUG 27809 = CIP 103243 = DSM 9848 = LMG 14496 = NCTC 13000.

Basonym: *Streptococcus adjacens* Bouvet et al. 1989.

Other synonym: *Abiotrophia adiacens* (Bouvet et al. 1989) Kawamura et al. 1995.

Granulicatella balaenopterae

(Lawson et al. 1999) Collins and Lawson 2000, comb. nov.

Type strain: strain M1975/96/1 = ATCC 700813 = CCUG 37380 = CIP 105938.

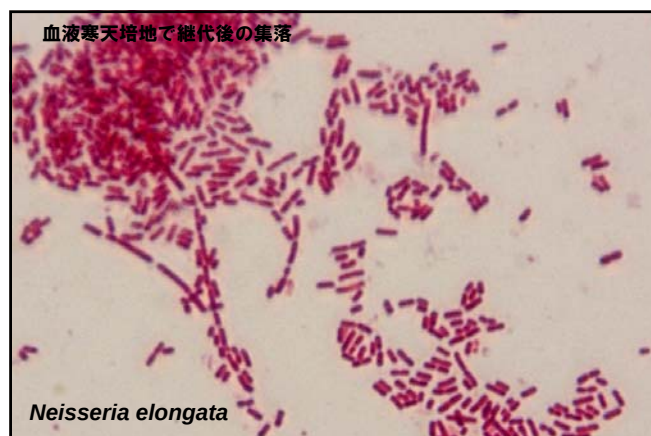
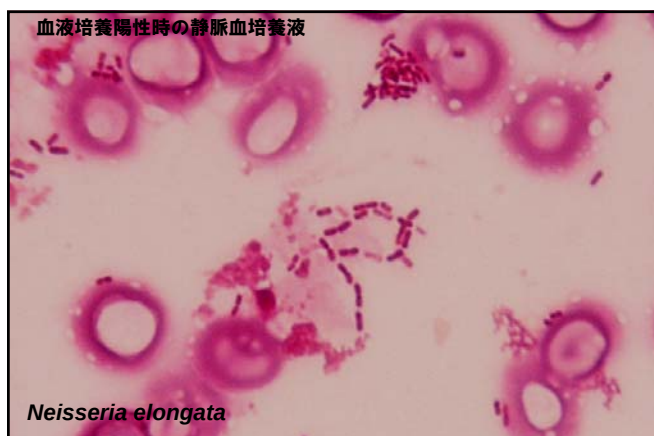
Basonym: *Abiotrophia balaenopterae* Lawson et al. 1999.

Granulicatella elegans

(Roggenkamp et al. 1999) Collins and Lawson 2000, comb. nov.

Type strain: strain B1333 = ATCC 700633 = CCUG 38949 = CIP 105513 = DSM 11693.

Basonym: *Abiotrophia elegans* Roggenkamp et al. 1999.



The Pediatric Infectious Disease Journal • Volume 24, Number 4, April 2005 Letters to the Editors

***Neisseria elongata* Subsp. *nitroreducens* Endocarditis in a Seven-Year-Old Boy**

To the Editors:

Neisseria elongata subsp. *nitroreducens*, a commensal organism found in the human oropharynx, is closely related to *Kingella* and *Moraxella* spp. It was formerly known as CDC group M-6.¹ It has recently been recognized as a rare cause of infective endocarditis (IE) in adults.

echocardiogram revealed no vegetation or valvular regurgitation but did show a thick and echolucent PTFE pulmonary valve.

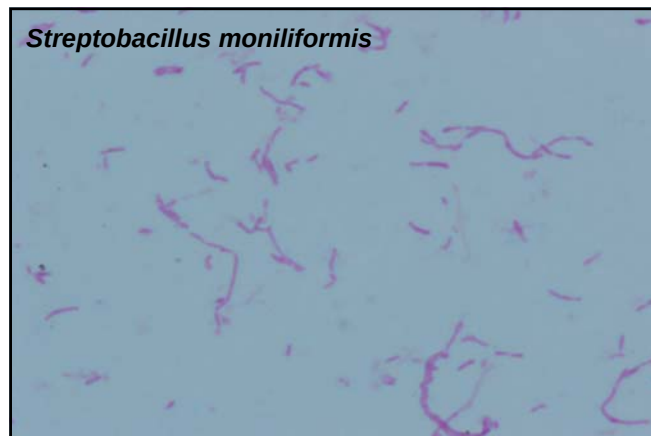
Because IE was suspected, 4 blood cultures were performed at the time of admission. Empiric antimicrobial therapy was then started with intravenous ampicillin/cloxacillin (170 mg/kg/d) plus gentamicin (5 mg/kg/d).

Within 24 hours, five bacilli were seen in blood cultures; they were assessed by method according to the National Clinical Laboratory Standards (NCCLS) inhibitory concentration (MIC) of 0.5 µg/mL; ceftazidime, 1 µg; gentamicin, 1 µg. Attempts to identify the organism by means of 2 different systems

was concluded to be *N. elongata* subsp. *nitroreducens* on the basis of the 16S rRNA gene sequencing data in conjunction with biochemical characteristics including catalase negativity, acid production, glucose negativity, nitrate reduction and nitrite reduction.

A definitive diagnosis of IE was made according to the modified Duke criteria:² 1 major and 3 minor criteria.

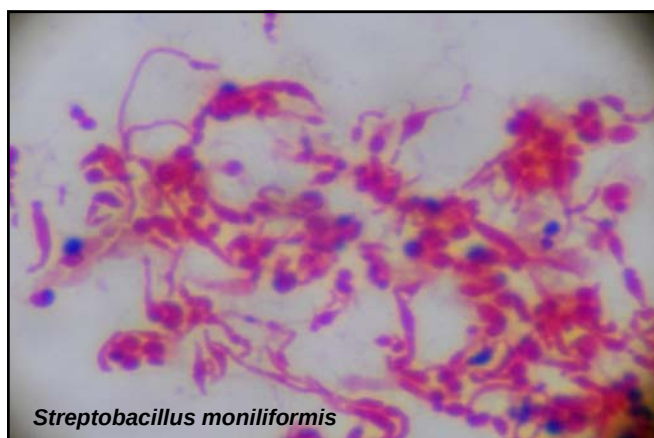
**Tadashi Hoshino, MD
Kiyofumi Ohkusu, PhD
Fusayo Sudo, MD
Hiromichi Nakajima, MD, PhD
Naruhiko Ishiwada, MD, PhD
Takayuki Ezaki, MD, PhD
Yoichi Kohno, MD, PhD**
Division of Infectious Diseases
Chiba Children's Hospital
Chiba City, Japan



69歳、男性。路上生活歴20年、妻と別れてから初めは日比谷公園で火をおこし生活。コンビニの賞味期限切れの品がごみ箱に捨てられたのを拾って食べていた。当初、収入は一日3000円ほどあり。数年前より新橋駅近く居酒屋（養老の滝）裏、ガード下で生活、今日に至る。雨は防げる場所。個人個人、毛布は持参。日中は干す。身体に痒みを感じたことはないとの事。水はペットボトルに汲んで飲む。この場所は火はおこせない。コンビニのゴミ箱は鍵がかけれ手が出ず、食糧調達には銀座へと足を運ぶ。場所は博品館の1本裏通りを縄張りとし、仲間3人で22時から23時ハケツに捨てられた食べ物を拾って来る。拾い方はビニール手袋をはめ、食べ物をくるむようにする。店とはんかつや、やきとり、中華料理店など。余談ですが、中華料理店のごみ箱で肉まんなど、しっかりした物があつたらニコニコだそうです。この患者様、もと神田のすし職人、拾ったもので残ったものは次の朝ゴミ箱に捨てるのが鉄則と言っていました。収入は雑誌拾いと自動販売機の釣銭の小銭探し。一日400円程度。

今回入院となったきっかけは、テリトリーの自動販売機によそ者が手をつっ込んでいるのを見て、すぐさま怒鳴り、追っかけた途中、乳母車に足を引っ掛けて転倒。本人さほどの痛みを感じなかったものの、仲間が手、肩の動作が変なので救急車を呼び当院へ搬送。

ネズミに対するエピソードは、寝泊まりしていた養老の滝そばで大きいねずみが子猫を襲っていたのを見たことが一度。仲間もこのあたりはネズミが出ると言っていたが、噛まれた気配、傷口は分らず。（医師確認）



No.7 *Capnocytophaga canimorsus*

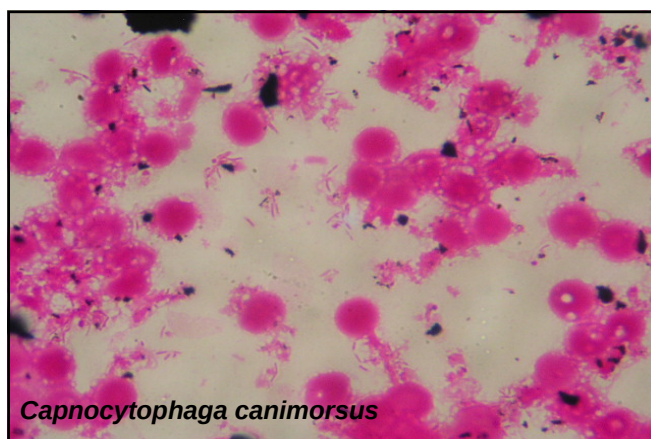
- ✓ グラム陰性桿菌 (CO₂要求性)
- ✓ 鞭毛は持たないが平板で滑走能あり
- ✓ 血液寒天培地に発育, ときにSC不能
- ✓ イヌ・ネコの口腔内常在菌
- ✓ 咬傷/搔傷後の敗血症 (致死率約30%)
- ✓ 糖尿病, アルコール依存症, 摘脾, 高齢者
- ✓ 各種抗菌薬の感受性は良好
- ✓ 分離菌株は感染研の鈴木道雄先生へ

国立感染症研究所獣医科学部第一室(03-5285-1111 内線2622)

Capnocytophaga canimorsus

炭酸ガス培養

微好気培養



大阪府三島救命救急センター症例

患者様は64歳の男性です。通院歴はありませんが、数十年前に胃潰瘍を指摘されたことがあります。また大酒家(毎日3合ほど日本酒を飲まれる)であり、数年前にアルコール離脱症状にて入院されたことがあるとのことです。
2009/11/13から全身倦怠感があり、11/14に39℃の発熱と下痢がはじまり、近医を受診されました。抗生剤と解熱剤を処方され、一旦帰宅されました。11/15に自転車で転倒して顔面・両膝を打撲されました。11/17頃から打撲部を中心とした紫斑が目立つようになり、11/18の夜からは無尿となりました。この間、倦怠感・発熱・下痢も改善なく、11/19にこれまでに違う病院を受診され、血液検査にてCK、BUN、Crの異常高値、血小板の減少を認めました。緊急血液浄化を含めた加療が必要と判断されたため当センターへ転院となりました。転送前に頭部CTを施行されましたが、明らかな異常はありませんでした。



顔面・左前胸部・両上下肢に紫斑を認め、特に両下肢先端は冷たく、疼痛を訴えておられました。

当初はfocus不明ながらSepsisから多臓器不全に陥ったと考え、MEPMとγ-glbの投与を開始した。

当初はfocus不明ながらSepsisから多臓器不全に陥ったと考え、MEPMとγ-glbの投与を開始し、CHFにて血液浄化を開始しました。その後は38℃程度の発熱はあるものの比較的全身状態良好に経過しました
起因菌の検索を行ったところ、入院時の血液培養より*Capnocytophaga* sp. が検出されました。改めて問診しますと、今年の9月から11月初旬までの間、歯肉に膿が貯留して歯科医に通院されていたとのことでした。また11/14頃に飼っている犬に左手を噛まれたとの事ですが、家庭でイソジン消毒・バンドエイド貼付をされただけでした。四肢の症状とエピソードより*Capnocytophaga*感染症から電撃性紫斑病を発症したと考えられました。
現時点では*Capnocytophaga*感染症の可能性が高いものの、感染源が歯肉か犬咬傷によるものかが判然としません。診断には細菌の遺伝子検査による同定が必要と考えました。ご多忙の中とは思いますが、細菌の遺伝子検査につき、宜しくお願い申し上げます。

佐世保共済病院の症例

患者:44歳, 男性

主訴:敗血症性ショック

現病歴:2008年11月3日, 飼いイヌに右示指を咬まれ当院受診した。右示指末節開放骨折を認めたため, 手術目的で入院となる。



右示指咬傷部所見



右示指咬傷部X線画像

Case Report

Capnocytophaga canimorsus: infection, septicæmia, recovery and reconstruction

Stephanie Chiang-Mei Low and John Edward Greenwood

Burns Unit, Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia 5000, Australia



2007年6月下旬にオーストラリアのビクトリア州で報告された*C. canimorsus*感染症患者(48歳女性)は, 敗血症性ショックで緊急入院する3~4週間ほど前に左脚に熱湯で直径33mm程の火傷を負っていた。適切な清濁を保てずに, 抗菌薬の投与も受けていなかった。

この火傷の部位を飼犬のフォックステリアの子犬になめられていて, *C. canimorsus*に感染した。

J Med Microbiol 57 (2008), 901-903

Column 「こんな事例がありました！」—血液検査室と細菌検査室の素晴らしき連携—

血液検査室の技師(A子):

「さっき救急外来から入院になった患者さんの血液像で, 面白いもののが好中球に貪食されて見えただけだ……(図9-上段)。B子さん, 一緒に見てくれない?」

細菌検査室の技師(B子):

「えっ! 何だろう, 今行こね」

A子:「ブドウ球菌みたいなのものが貪食されていることは時々あるんだけど, 今回は針みだいに長いんだよね。アツェル小体とは違うんだよ」

B子:「グラム染色してみようか」→グラム染色してみると……

B子:「グラム陰性菌だね(図9-下段)。どんな患者さんがしら, 主治医に電話してみるか」

主治医(C先生):「2日前に飼い犬に右指を咬まれたようで……, ショック状態で搬送されてきたんだ」

B子:「先生, この患者さんの服

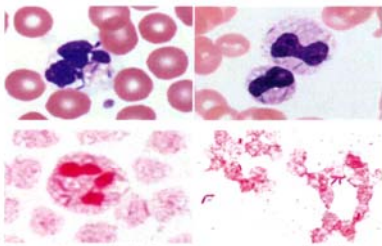


図9 血液像の検査時に観察された*C. canimorsus*のギムザ染色像(上段)とグラム染色像(下段)

血症は「カニモックン」が起原菌かも! 先生:「あ! ごめんなさい, *Capnocytophaga canimorsus*というイヌの口腔内にいる菌です」

B子:「あ! 先生, この患者さんの服

まとめ

*C. canimorsus*を同定するためのストラテジー(戦略)



Capnocytophaga 属の8菌種

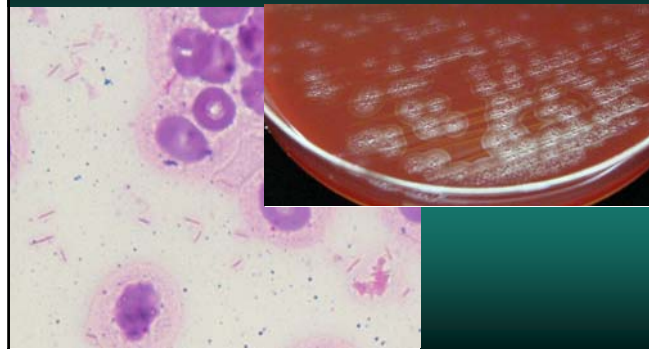
- C. canimorsus*
- C. cynodegmi*
- C. ochracea*
- C. sputigena*
- C. gingivalis*
- C. granulosa*
- C. haemolytica*
- C. leadbetteri*

イヌ・ネコの
口腔内常在菌 陽性

オキシダーゼ
& カタラーゼ

ヒトの
口腔内常在菌 陰性

Capnocytophaga sputigena



スライド提供: 藤田保健衛生大学病院

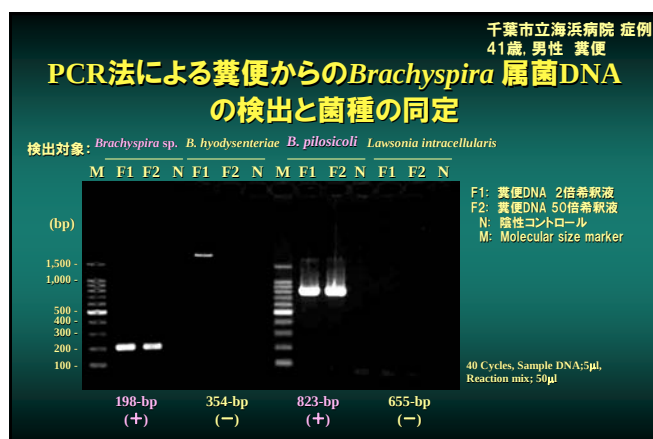
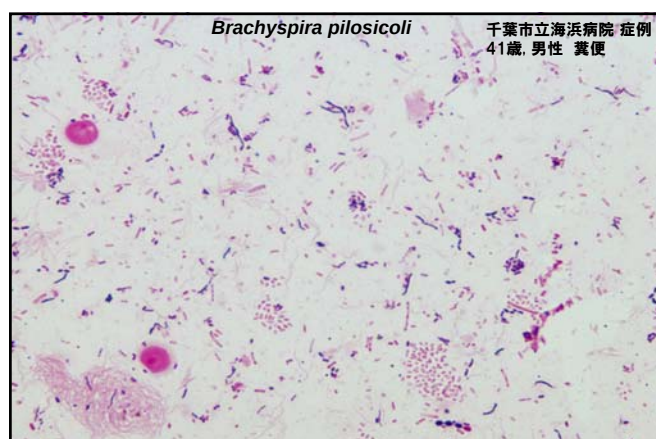
イヌ・ネコ咬傷後に 感染症を惹起する微生物

- ✓ *Capnocytophaga canimorsus*
- ✓ *Pasturella multocida*
- ✓ *Bartonella henselae*
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Streptococcus* spp.
- ✓ *Eikenella corrodens*
- ✓ *Neisseria* spp.
- ✓ *Clostridium tetani* (破傷風)
- ✓ Rabies virus (狂犬病); 恐水発作

No.8

Brachyspira pilosicoli

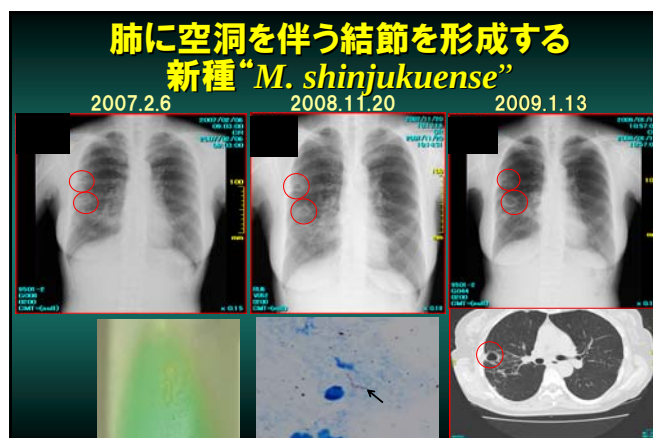
- ✓ 嫌気性のスピロヘータ
- ✓ ブタの結腸炎や慢性下痢症の原因菌
- ✓ キット・自動機器による同定不能
- ✓ フィルム状発育, β 溶血, 馬尿酸水解 (+)
- ✓ 糞便, 血液 (本邦で千田らが初症例報告)
- ✓ 嫌気ボトルで約6~15日を要する
- ✓ 東南アジアへの旅行, 動物との接触
- ✓ ペニシリン系抗菌薬に耐性の株あり



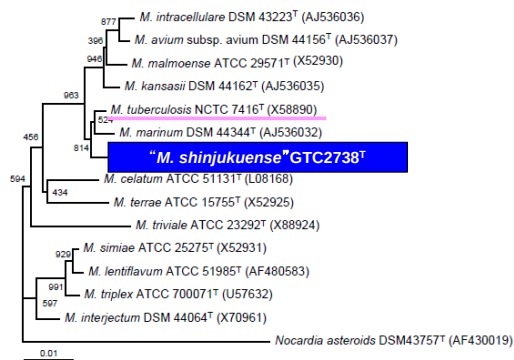
No.9

Mycobacterium shinjukuense

- ✓ 遅発育性の抗酸菌 (発育が遅い)
- ✓ 2004年に社会保険中央病院 (新宿) で分離
- ✓ 先月, 正式に新種記載
- ✓ 喀痰, BAL (非定型抗酸菌症)
- ✓ 空洞を伴う結節性病変 (空洞形成に2~10年)
- ✓ 系統学的に結核菌と類縁
- ✓ MTD&TRC陽性 (偽陽性; 結核菌とのクロス反応)
- アンプリコアは陰性, DDHも陰性



16S rRNA遺伝子配列による系統解析



No.10

Mycobacterium ulcerans

- ✓遅発育性の抗酸菌(発育に6~10W)
- ✓発育至適温度:25~30℃
- ✓皮膚潰瘍(Buruli潰瘍)
- ✓日本では"*M. shinshuense*"あるいは"*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*"
- ✓無痛性結節から深部潰瘍へ進行;
組織破壊:マイコラクトン(毒素)が関与
- ✓治療は外科処置とCAM+REP+LVFX?

症例(73歳 男性)

初診:2007年5月9日

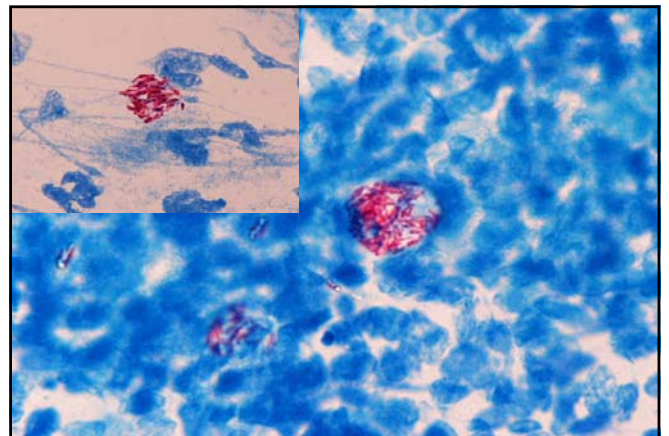
主訴:右耳介の結節

家族歴:特記すべきことなし

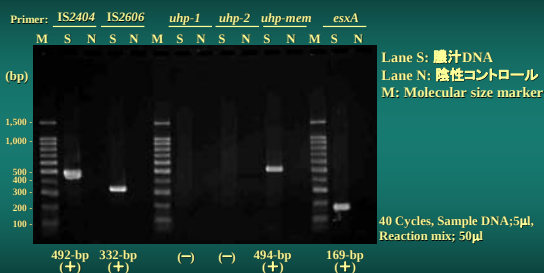
既往歴:2003年より塵肺, 混合性換気障害で当院呼吸器科に通院

熱帯魚飼育経験, 海外渡航歴なし

現病歴:2007年5月初めより右耳介と耳介後部に強い疼痛を伴う結節が出現。結節が増加し, 中央が潰瘍化した。



*Mycobacterium ulcerans*が保有する遺伝子の検索 (IS2404, IS2606, uhp-1, uhp-2, uhp-mem, esxA 遺伝子)

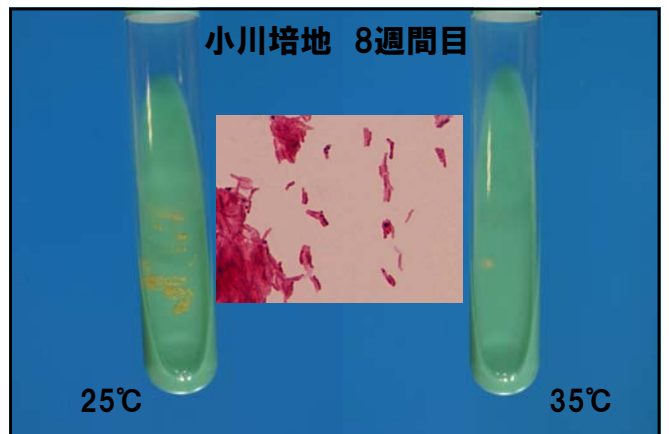


→ "*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*"

小川培地 8週間目

25℃

35℃





No.11

Archanobacterium haemolyticum

- ✓ グラム陽性桿菌 (Coryneform; 不規則)
- ✓ カタラーゼ陰性 (*Corynebacterium* 属菌と鑑別)
- ✓ 逆CAMP試験陽性, キシロース陰性
- ✓ 本属には9菌種が記載されている。本菌種その他 *A. pyogenes*, *A. bernardiae* が重要である
- ✓ 系統学的には *Actinomyces* 属菌に類縁
- ✓ β 溶血; 2日間以上培養 (炭酸ガス)
- ✓ 咽頭炎, 扁桃周囲膿瘍, 創部感染症, 皮膚潰瘍
- ✓ 各種抗菌薬に対する感受性は良好

症例 79歳 女性

主 訴: 微熱, 呼吸困難

既往歴: 1976年右乳癌・右卵巢膿瘍で摘出手術施行。その際、輸血を実施され、後日、輸血後C型肝炎を指摘されたが未治療。

1987年縦隔リンパ節転移のため、放射線療法施行。

2004年肝硬変と診断され、現在治療中。

現病歴: 2006年1月より、微熱、呼吸困難が出現。

2月25日肺炎、貧血、低アルブミン血症と診断され入院。CTにて右肺に胸水貯留を確認。

検体の外観とグラム染色所見

(Bartholomew&Mittwer変法)

胸水の外観

胸水 (×1000)

スライド提供: 福岡大学病院 臨床検査部

細菌学的な検査所見①

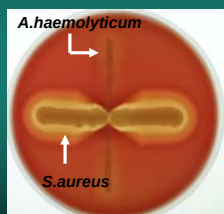


Rap ANA: *Actinomyces meyeri*
(97.8%)

炭酸ガス培養 1日目(保存株)



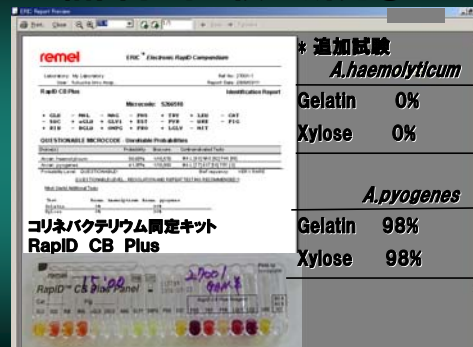
炭酸ガス培養 4日目(保存株)



Reverse CAMP test

スライド提供: 福岡大学病院 臨床検査部

細菌学的な検査所見②



* 追加試験

A. haemolyticum

Gelatin 0%

Xylose 0%

A. pyogenes

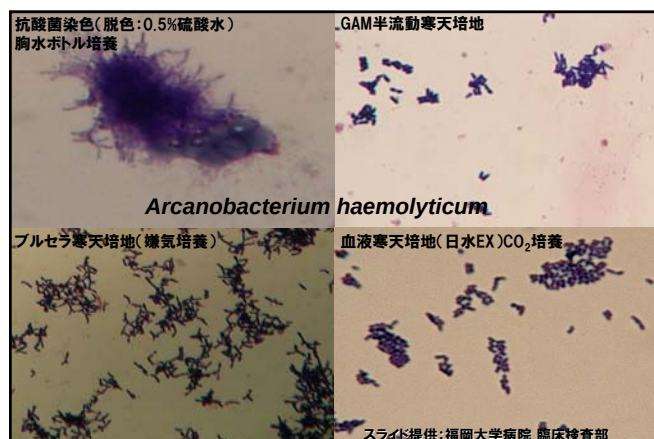
Gelatin 98%

Xylose 98%

コリネバクテリウム同定キット
Rapid CB Plus



スライド提供: 福岡大学病院 臨床検査部



Arcanobacterium haemolyticum

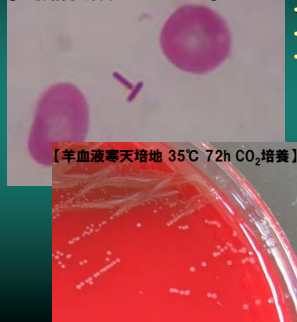
スライド提供: 福岡大学病院 臨床検査部

No.12 *Clostridium tertium*

- ✓グラム陽性桿菌(陰性に染まりやすい)
- ✓酸素耐性(好気培養で発育; 血液培養で好気ボトルに発育)
- ✓腸内細菌, *Bacillus*属菌, *Lactobacillus*属菌として検査を進める可能性がある
- ✓嫌気培養では芽胞(卵円形端在性)を形成
- ✓ガス産生性
- ✓敗血症, 壊死性筋膜炎, 外傷後の膿瘍, 内因性感染症
- ✓CLDM, 第3世代セフェム系薬に耐性株あり

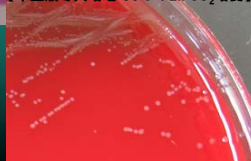
Clostridium tertium; グラム陰性に染まり, 好気発育

【血液培養 好気ボトル ×1000】



- 患者: 80歳代, 女性
- 主訴: 下腹部痛
- 既往歴: 脳動脈瘤, 甲状腺腫瘍
- 現病歴: 2009年2月9日下腹部痛持続により当院受診。腹水貯留を認め消化管穿孔が疑われたため消化器外科で緊急手術となる。小腸穿孔による急性汎発性腹膜炎と診断。

【羊血液寒天培地 35℃ 72h CO₂培養】



嫌気培養からのコロニーを染色
有芽胞桿菌

スライド提供: 聖マリアンナ医科大学病院

症例 65歳 女性

主訴 : 吐気, 頸部痛
既往歴 : 特記なし
現病歴 : 2008年6月26日交通事故による多発外傷にて, 当院に救急搬送された。顔面多発骨折, 頸椎損傷, 右上下肢骨折。7月8日 尺骨, 大腿骨整復術施行。17日 頸椎C1-3固定術施行。帰室後より吐気, 頸部痛を訴えた。19日より発熱及び頭痛があり, 髄膜炎が疑われた。髄液よりグラム陽性桿菌が分離されたが, 当初は汚染の可能性もあると疑い, *Bacillus* sp. として報告した。その後も髄液および術創部より断続的に同じ菌が分離されたため, 起因菌と判断し, 精査を行った。頸椎創部に感染巣のある可能性がある, 難治性髄膜炎として, 1月5日に再度開創し, 頸椎硬膜を切開し, くも膜癒着を剥離した。その後, 頭痛吐気は軽減し, 培養も陰性化した

Multiplex PCRによる呼吸器病原体の検出キット

商品名	CycleavePCR™ 呼吸器系感染症 起因ウイルス	Seeplex® RV15 OneStep ACE Detection	xTAG™ respiratory Viral panel
販売元	TaKaRa	Seegene(島津製作所)	Luminex
検出原理	サイクリング プローブ法	マイクロチップ法 (MultiNA)	蛍光マイクロビーズアレイ法
検出数	11	15	20
病原体名	RSV Type A RSV Type B Influenza A Influenza B Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Matapneumovirus Bocavirus Adenovirus Rinovirus	RSV Type A RSV Type B Influenza A Influenza B Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4 Enterovirus Matapneumovirus Bocavirus 1/2/3/4 Adenovirus Rinovirus A/B/C CoV OC43/HKU1 CoV 229E/NL63	RSV Type A RSV Type B Influenza A Influenza A(H1) Influenza A(H3) Influenza B Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Matapneumovirus Rinovirus Adenovirus Influenza A(H5) Parainfluenza 4 Enterovirus SARS CoV CoV NL63 CoV 229E CoV OC43 CoV HKU1

呼吸器感染症の起因病原体遺伝子同時検出

A procedure for molecular detection in nasal swab (1)



Nasal swab were taken from patients for rapid diagnostic influenza test



Magratron® 6GC system
(Precision System Science co. Ltd)



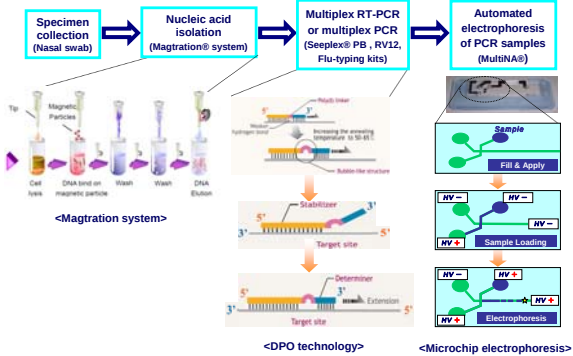
Seeplex® Sepsis Kits (Seegene Inc.)
Thermal cycler (ABI 9700)



Microchip electrophoresis
MCE-202 MultiNA® (SHIMADZU Corp.)

呼吸器感染症の起因病原体遺伝子同時検出

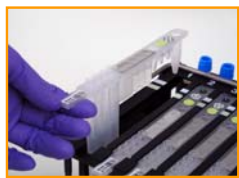
A procedure for molecular detection in nasal swab (2)



BD MAX™ Systemの外観とワークフロー



BD MAX™ SystemのReagent Strips



ヒト呼吸器系ウイルスの検出における呼吸器系ウイルス多項目同時

解析アッセイ (Luminex xTAG Respiratory Viral Panel FAST Assay)

の有用性の検討

〃 広島県立総合技術研究所健康環境センター、〃 熊本県立総合技術研究所健康環境センター、〃 熊本県立総合技術研究所健康環境センター、〃 熊本県立総合技術研究所健康環境センター

高尾 信一、〃 三十九 岡崎 富男、〃 鈴木 和男

(平成 22 年 8 月 20 日受付)

(平成 22 年 10 月 5 日受理)

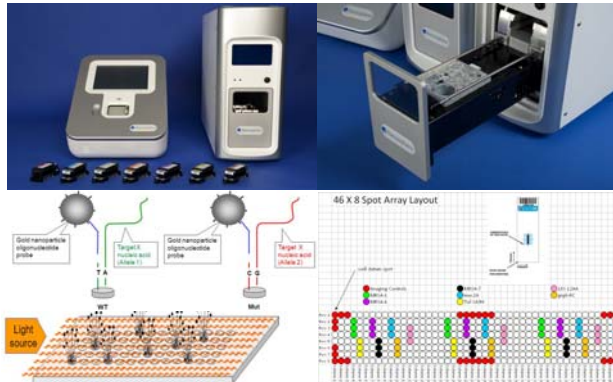
Key words: respiratory virus, multiplex PCR, rapid diagnosis

要 旨

米国ルミナックス社 xTAG Respiratory Viral Panel FAST (RVP FAST) アッセイは、ヒトの主要な呼吸器系ウイルス 17 種を、一度の測定で同時に検出するシステムである。今回我々は、小児の急性呼吸器感染症から採取された鼻拭き液 67 検体を対象として、RVP により得られた成績をリアルタイム PCR などの従来の検査と比較している 8 種類のウイルスをターゲットとした遺伝子増幅検査 (NAT) で得られた成績と比較すること、呼吸器系ウイルス検出における RVP FAST アッセイの有用性について検討した。RVP FAST アッセイでは、67 検体中 59 検体から 13 種類の、58 件のウイルスが検出された。そのうち、NAT の成績と比較できたインフルエンザウイルス (InflV-AH1, InflV-AH3, 新型 InflV-AH1, InflV-B, アデノウイルス, RSウイルス, メタニューモウイルス, ボカウイルスの 8 種類のウイルスについては、NAT の成績と一致すると、RVP FAST アッセイの感度は 83.3%~100%、特異性は 98.2%~100% であった。RVP FAST アッセイでは、それらのウイルスに加えて、コロナウイルス (CoV) 229E, OC43, NL63, HKU1 の各ウイルス型が合計 10 検体から、またエンテロウイルスおよびノロウイルスも 35 検体から検出された。RVP FAST アッセイは、臨床重要な呼吸器系ウイルスを、一度の測定で網羅的に検出できることから、呼吸器感染症患者の起因ウイルスの検査には有用な検査法と見られた。

(原稿受付 第 10 頁 - 2014)

Verigene® System (Nanosphere社) の装置と原理

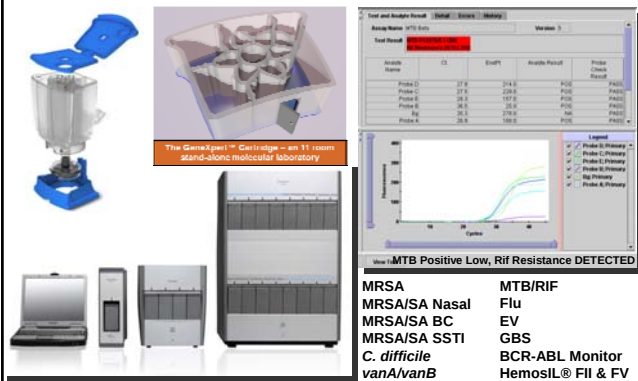


Verigene® Respiratory Virus Plus Nucleic Acid Test (RV+)

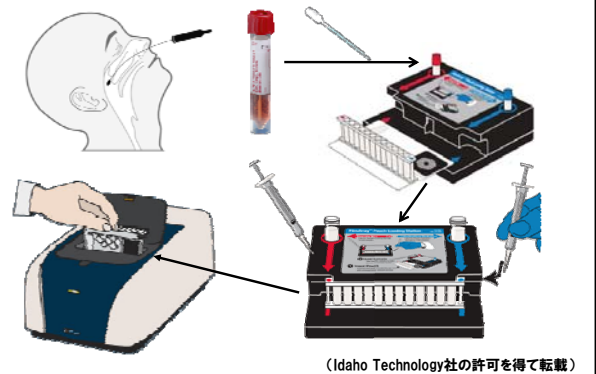
Verigene® CBS Overview			
Targets	Viruses	Influenza A Subtypes	Oseltamivir Resistance
	• Influenza A • Influenza B • RSV A • RSV B	• 2009 H1N1 • H1 • H3	• 2009-H1 H275Y • H1 H275Y
Sample Type	Nasopharyngeal Swab Specimen		
Automation	Sample-to-Result		
Workflow	Random Access		
On-Demand	Yes		
Testing			
Pipetting Steps	1		
Hands-On Time	~5 minutes		
Run Time	<2.5 hours		
Regulatory	FDA Cleared – 510(k); CE-IVD (expected 02-2011)		
Status			

(フィンガリンク社の許可を得て転載)

GenXpert™ (Cepheid社) のカートリッジと装置

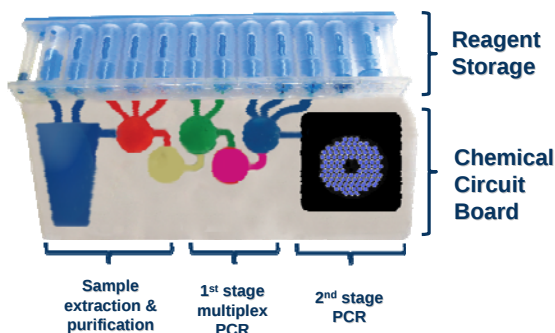


FilmArray® (Idaho Technology社)

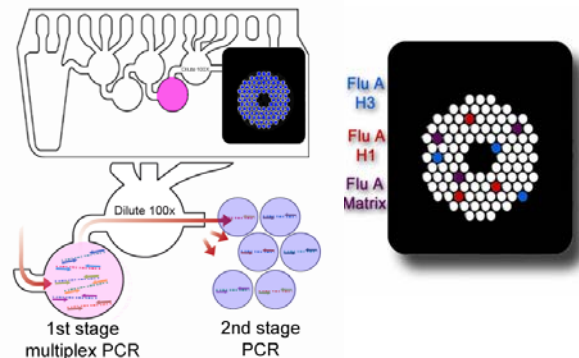


(Idaho Technology社の許可を得て転載)

FilmArray® パウチの構造



FilmArray® の遺伝子増幅系と検出システム



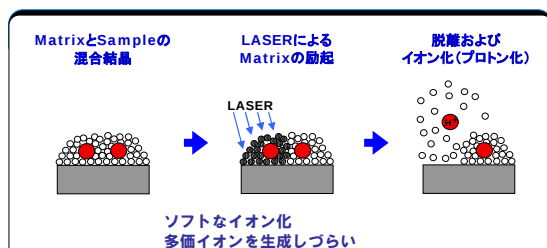
Comparison: FilmArray vs. Luminex xTAG RVP, beta study Children's Mercy Hospital. Selvarangan et. al

Respiratory Pathogen	Luminex xTAG®	FilmArray® RP
Influenza A	10	10
Influenza B	11	11
Respiratory syncytial virus	11	15
Human Metapneumovirus	12	13
Parainfluenza 1	10	10
Parainfluenza 2	7	5
Parainfluenza 3	11	13
Parainfluenza 4*	Not reportable	1
Adenovirus	10	11
Rhinovirus/Enterovirus	24	30
Bocavirus	Not on Panel	6
Corona Virus NL63*	Not reportable	4
Corona Virus 229E*	Not reportable	1
Corona Virus OC43*	Not reportable	0
Corona Virus HKU1*	Not reportable	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Not on Panel	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Not on Panel	1
Total	106	132

**LAMP法（栄研化学）
結核菌群検出のための操作手順**



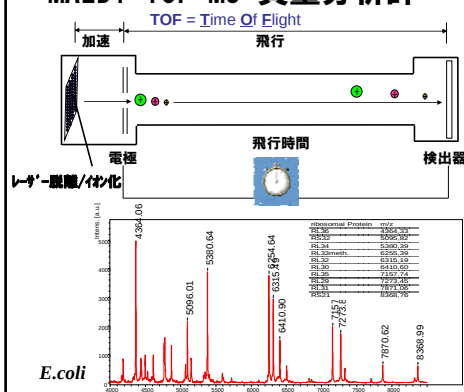
**マトリックス支援レーザー脱離イオン化
質量分析計 (MALDI-TOF MS) による微生物同定法**
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization
マトリックス支援レーザー脱離イオン化



ブルカー・ダルトニクス社の許可を得て転載

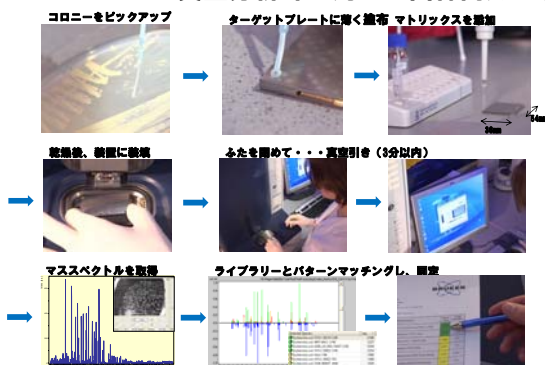
MALDI-TOF MS 質量分析計

シスメックス・バイオメリュース



ブルカー・ダルトニクス社

MALDI-TOF MS 質量分析計を用いた菌株同定の手順



ブルカー・ダルトニクス社の許可を得て転載

臨床微生物検査の学際領域の拡大

- ✓細菌学
- ✓ウイルス学
- ✓真菌学
- ✓原虫・寄生虫学
- ✓臨床感染症学



- ✓分子生物学
- ✓分子系統学（分類学）
- ✓分子疫学（臨床疫学）
- ✓バイオインフォマティクス
- ✓ゲノム解析学
- ✓分析化学