

[総 説]

グラム染色から得られる情報の活用～培養や遺伝子検査につなげるポイント～

永田邦昭

地方独立行政法人くまもと県北病院機構くまもと県北病院教育研修部

(令和3年11月8日受付)

グラム染色は問診や身体所見、画像所見等によって想定された感染病巣に潜む菌の存在を速やかに検知して原因微生物を絞り込み、感染症診断に導く基本的な検査法である。患者材料の検鏡は病巣内を顕微鏡でのぞくと言える検査であり、背景細胞も併せて観察することにより今現在の患者の病態、治療経過を反映するさまざまな情報を引き出すことが可能であるが、一方で個人差や感度など染色法ゆへの限界も存在する。染色に限らず本稿の副題である培養検査、遺伝子検査にもそれぞれ有用性と限界があり、それぞれの限界を相補うことによって感染症診断の精度を向上させることが大切である。本稿ではグラム染色観察が起点となって他の検査法に枝葉が広がる実症例を提示しながら、グラム染色所見の解釈法および活用法等について紹介する。

Key words: グラム染色, 誤嚥, 培養検査, 遺伝子検査, 抗原検査

はじめに

グラム染色は安価で特別な器具や装置を必要としないため、施設の規模を問わず実施可能な迅速検査法である。中でも患者材料の直接塗抹標本中には多くの患者情報が含まれており、感染症の診断・治療には欠くことのできない検査法である。しかしながら塗抹標本から得られる情報の質と量は担当者の知識と経験に左右されることも事実である。本稿では第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会における教育講演の内容をもとに本学会の感染症認定医などの研修資料として再編集したスライドなどを提示し、解説する形式でグラム染色所見の解釈法と培養、遺伝子検査への活用法等を紹介する。

グラム染色の有用性と限界¹⁾²⁾

有用性

(1) 観察された菌が原因菌か(抗菌薬治療の対象となるか)否かの判断 (2) 原因菌の推定 (3) 炎症の度合いや種類の評価 (4) 誤嚥による炎症の評価 (5) 抗菌薬治療効果判定等。

限界

(1) グラム染色の感度は 10^4 ~ 10^5 cfu/ml程度とされ、培養検査や遺伝子検査に劣る (2) グラム染色に染まりにくい菌が存在する (3) マイコプラズマやウイルスの確認はできない (4) 染色標本から得られる情報の質と量は担当者の経験や知識に左右される等。

これらグラム染色の有用性と限界を理解したうえで、他の

染色法、抗原検査、培養検査、質量分析、遺伝子検査等につなげて行くことが大切である。

常在性菌と原因菌¹⁾²⁾

喀痰などの常在菌混入頻度の高い材料では、まず肉眼的に検査材料の質を評価(Miller & Jones 分類³⁾)して診断に適する良質な痰を選択し塗抹染色する。次いで顕微鏡にて感染に伴う炎症の指標となる白血球数と常在菌混入の指標となる扁平上皮細胞数を基準に、喀痰の品質を評価(Geckler 分類⁴⁾)し、白血球に富む膿性部分に選択的に存在する菌を原因菌として検索する。白血球などの炎症細胞は病原菌を攻撃するために浸潤してることが多く、原因菌の居どころを突き止める重要な指標となるが、喀痰に限らず免疫不全患者あるいは劇症型感染症などでは感染局所に白血球が認められにくいことがあり、逆に白血球が観察されないことが危険な指標であることも念頭に置く必要がある。

図1 唾液中の口腔内常在性菌と膿性痰中の原因菌

唾液中には図1上段のように口腔内の扁平上皮とともに複数の常在菌が存在し共存している。原因菌推定において常在菌を知ることは重要で、誤嚥の解釈にも役立つ所見である。図1下段は肺炎を発症した際の膿性痰とそのグラム染色所見である。染色写真の中心部に原因菌である *Haemophilus influenzae* (グラム陰性短桿菌)の貪食像が観察される。痰中の黄色みがあった膿性部のみの塗抹では写真のように原因菌のみが観察されることもあるが、実際には下気道で生成された痰は口腔を経由して喀出されるため、唾液成分の混入は避けられない(図1下段左下:泡立った部分)。

図2 痰中に混在する原因菌と常在菌

図上段左には *H. influenzae* が観察されるが、同右には喀出時に付着した唾液中の扁平上皮と常在菌が確認される。原因菌検索時には扁平上皮の多い視野は避け、白血球に富む視野に選択的に存在する菌をターゲットにして探すことが推奨

著者連絡先: (〒865-0005) 熊本県玉名市玉名 550 番地
地方独立行政法人くまもと県北病院機構くまもと県北病院教育研修部
永田邦昭
TEL: 0968-73-5000
FAX: 0968-73-2867
E-mail: saikin@kumakenhoku-hp.jp

される。図下段は喀痰洗浄前後の培養所見である。喀出時に付着しただけの常在菌であれば滅菌生理食塩水にて洗浄すると洗い落とされ、白血球によって取り囲まれた原因菌のみが残って選択的に培養される。

誤嚥による炎症の評価¹⁾²⁾

図3 誤嚥による炎症の特徴

喀痰洗浄後も常在菌が洗い落とされなかった症例である。グラム染色で観察すると多数の白血球とともに扁平上皮が観察される中にグラム陽性球菌、グラム陰性桿菌、グラム陰性球菌、グラム陽性桿菌等、種々雑多な菌の活発な貪食像が観察される。これが誤嚥初期の炎症の特徴であり、誤って下気道に落ち込んだ常在菌排除の過程と考えられ、この時点ではこれらすべての常在菌が炎症の原因と推測される。したがって喀痰を洗浄しても常在菌が洗い落とされにくい。

図4 誤嚥後の炎症の流れ(フェーズ1~4)

①フェーズ1(誤嚥初期の異物排除の段階)

通常は食道に入るべき唾液成分が誤って気道に吸引された場合、生体細胞は下気道に落ち込んだ口腔内細菌、扁平上皮などの全てを「異物」として排除しようとする。その結果、白血球が浸潤し膿性の痰が生成される。つまり誤嚥の初期は「異物排除」の段階で、常在性の連鎖球菌、ナイセリア、あるいは嫌気性菌などを区別なく貪食し種々雑多な菌の貪食像が観察される。この時点ではこれらの菌全てが炎症の原因ではあるが、まだ特定の原因菌が選択された訳ではない。膿性痰であるものの培養では常在菌しか分離されない段階である。

②フェーズ2(気道に吸引された常在菌や扁平上皮の排除が進んだ段階)

誤って吸引された常在菌は自然免疫や初期の経験的治療によって治癒することが多いが、排除が進み菌量は減少しても痰は持続し、扁平上皮が排除されることによりむしろ Geckler 分類¹⁾では4群、5群の膿性痰が増加する。しかし培養では常在菌のみで有意な菌は分離されない。

③フェーズ3(吸引された常在菌や扁平上皮が排除され細菌が観察されない段階)

吸引された常在菌や上皮細胞が排除されグラム染色では菌が観察されない時期が存在するが、炎症そのものはしばらく引き続くため膿性痰は持続する。このまま新たな誤嚥が起きなければ治癒に向かうものと推測されるが、誤嚥を起こす基礎疾患や口腔内の衛生状態が改善されない限り、排除と新たな誤嚥を繰り返すことになる。但しフェーズ3は誤嚥性肺炎に限定されるものではなく感染の回復期などに一般的に認められやすい所見でもある。

図5 フェーズ1~3(異物排除の段階のイメージ図)

誤嚥によって侵入した常在菌や扁平上皮は生体の免疫細胞によって取り囲まれ、貪食も受けて喀痰として徐々に体外へ排除される。誤嚥で観察される扁平上皮は膿性痰の上に付着した状態ではなく、膿性痰に埋まり込んだ状態で粘液や白血球に取り囲まれていることが多い。今どのフェーズにある痰を見ているのかを想像しながら観察すると誤嚥による炎症が理解しやすくなる。

排除から免れ生き残った菌が増殖した状態が次のフェーズ4である。

④フェーズ4(特定の原因菌が増殖し、原因菌が選択された段階)

図6 フェーズ4(原因菌が選択された段階)

誤嚥により吸引された菌が排除できずに増殖し感染症に至った場合、一般的な呼吸器病原菌(*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.)に因るものもあれば、入院加療中で特に人工呼吸器を装着されているような患者であれば、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) や *Pseudomonas aeruginosa* などの耐性菌が原因菌となることもある。しかしながら誤嚥性肺炎において特徴的な感染は口腔内に常在する嫌気性菌を中心とした複数菌に因る肺炎や肺化膿症である。染色では誤嚥初期の種々雑多な複数菌貪食像は消え、インフルエンザ菌に似たグラム陰性小桿菌(*Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp.)とグラム陽性小球菌(*Streptococcus anginosus* group)が選択され、混合して増加することが多い。同じ複数菌(polymicrobial)でも菌叢が異なる。嫌気性菌の単独感染は稀で二相性感染のパターンを取ることが多いとされる。まず *S. anginosus* group などの連鎖球菌が発育して病巣中の酸素を消費し、嫌気性が発育しやすい環境を提供するものと推測される。ブドウ球菌より小さなグラム陽性球菌の貪食像は *S. anginosus* group を疑い、さらには嫌気性菌感染を疑う指標ともなる。また嫌気性グラム陰性桿菌が多数発育した喀痰は膿性であるにも関わらず、粘性が少なく「サラサラ」した外観であることも嫌気性菌感染を疑う重要な所見である。喀痰の嫌気培養は通常は実施されないことが多く、実施されたとしても結果報告までは時間を要するため、グラム染色にて嫌気性菌感染が疑われた際には直ちに「嫌気性菌感染が疑われる」旨の中間報告を出すことが重要である。

グラム染色の情報を培養検査につなげる^{1)2)5)~8)}

図7 *Legionella* spp. の推定と選択培地

cefazopran (CZOP) で肺炎が改善せず緊急入院となった症例で、β-ラクタム系薬が無効で温泉好きという背景もあったため、レジオネラ肺炎を疑い尿中抗原検査を実施したところ *Legionella pneumophila* serogroup 1 の抗原が陽性となった。レジオネラは細胞内寄生菌であり、生体内では細胞内移行性の悪いβ-ラクタム系の抗菌薬は無効である。グラム染色では全視野を観察してもレジオネラ菌らしき菌体は確認されず、ヒメネス染色を追加して貪食像らしき所見がごく少数確認できた。ヒメネス染色はレジオネラ菌に特異的な染色法ではないため、形態が桿菌であることとグラム染色で確認できない桿菌がヒメネス染色で観察されるという両者の比較が重要である。レジオネラ菌は通常的一般細菌分離培地には発育できないため、グラム染色で有意な菌が観察されなくとも、症状や患者背景などで感染が疑われる際にはレジオネラ菌用の選択培地の追加は必須である。本症例では WYO 寒天培地にて分離しえた。また本症例は *L. pneumophila* serogroup 1 用の抗原キットで診断可能であったが、現在は血清型にかかわらず *L. pneumophila* 全般に反応するキットが市販されており検出感度は向上している。*L. pneumophila* 以外の菌種が原因となる場合には遺伝子検査が有用である。

図8 *Nocardia* spp. の推定と選択培地

特徴的な分岐を示すフィラメント状のグラム陽性桿菌で、単独で菌集塊を形成する好氣的放線菌である。弱抗酸性あるいは部分抗酸性と呼ばれる性質を持ち、同じ放線菌の一種である *Actinomyces* spp. などとの鑑別に用いられる。染色で確認されても本菌は発育が遅いため、血液寒天培地を用いた喀痰培養では多数の常在細菌の集落にマスクされ分離できないことがあるため、本菌が疑われる際にはレジオネラ菌用の WYO 寒天培地の使用が勧められる。真菌以外の常在菌の多くは発育が抑制されるため、*Nocardia* spp. の微小集落の分離には効果的である。

図9 *Actinomyces* spp. の推定と選択培地

Actinomyces spp. はヒトの口腔内等に常在する放線菌の一種である。*Nocardia* spp. が好気性放線菌、本菌は嫌気性放線菌とされているが、発育は遅いものの、実際には炭酸ガス培養で発育する菌種も多い。分岐するフィラメント状のグラム陽性桿菌で単独感染はまれであり、多くの場合複数菌感染である。プルセラ HK 寒天培地にて嫌気培養すると共存菌の発育にマスクされ、*Actinomyces* spp. は分離されず、グラム陰性菌の発育を抑制するコロンビア CNA 培地を用いて嫌気培養すると *Actinomyces* spp. の分離が可能となった。共存菌がグラム陰性菌のみの場合には特に効果的である。

図10 ムコイド (M) 型 *Pseudomonas aeruginosa* の推定と培養時間延長

バイオフィーム感染症の代表的な菌種であり、菌集塊全体がピンク色の粘膜で覆われたグラム陰性桿菌が認められる。M 型 *P. aeruginosa* の発育は菌株により様々で、本症例では培養 1 日目には常在菌のみで *P. aeruginosa* の集落は全く認められず、培養 2 日目に光沢のあるムコイド型集落が出現した。さらに発育が遅い菌株も存在するため、グラム染色にて M 型 *P. aeruginosa* が推定された場合には培養時間の延長を考慮する必要がある。

図11 ラセン菌の推定と培養条件

3 菌株はすべて血液培養ボトル中のラセン菌である。左から *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter cinaedi*, *Desulfobivrio* sp. である。いずれも細く繊細なグラム陰性桿菌であり、菌発育陽性ボトルを染色しても染まりが薄く見つけにくい菌である。染色だけでははっきりしない場合には、生鮮標本で観察すると 3 菌とも鞭毛をもって動きまわるため、菌体の確認が容易である。*C. jejuni* と *H. cinaedi* の推定ができれば、サブカルチャーの培養条件は両菌とも微好気かつ湿潤環境を選択することができ、遅滞なく同定・感受性検査に移行できる。加えて *H. cinaedi* は水素の存在下で発育が促進されるため、水素が発生しない微好気培養システムを使用する際には水素発生剤などの追加が勧められる。*Desulfobivrio* sp. はわずかな湾曲から S 字状の形態の嫌気性ラセン菌であり、サブカルチャーは嫌気培養を実施する。

グラム染色の情報を遺伝子検査につなげる¹⁾²⁾⁷⁾⁸⁾

図12 抗酸菌の推定と結核の遺伝子診断

抗酸菌はグラム陽性桿菌に属するが実際には染まりにくく、温度によって染色性が変化し、温度が高いほどグラム陽性の染まりが強くなる傾向がある。グラム陽性にも陰性にも染ま

らず、ガラス傷のように白く透けて見えるため「ゴーストマイコバクテリア」と表現されることもあり、抗酸菌を推定する際のポイントになる。このような染色所見が認められた際には、抗酸染色を追加して抗酸菌であることを確認した後、直ちに結核菌か否かを遺伝子検査にて鑑別する必要がある。本症例はグラム染色にて推定後、Ziehl-Neelsen 染色を追加して抗酸性を確認し、LAMP 法 (Loopamp[®] 結核菌群検出試薬キット：栄研化学) にて非結核性抗酸菌と判定された。

図13 *Staphylococcus aureus* の推定と MRSA の遺伝子診断

図13 上段は血液培養ボトル中でクラスターを形成するグラム陽性球菌でブドウ球菌が疑われるが、菌体周囲には薄く「赤いにじみ」(皮膜：フィブリン膜)が観察され *S. aureus* が疑われる。*S. aureus* に常に「赤いにじみ」が認められるわけではないが、観察されれば *S. aureus* である可能性は高い。主治医に連絡後直ちに PCR 法 (GeneXpert[®] MRSA/SA BC 「セフィエド」：ベックマン・コールター) にて遺伝子 (*mecA*, *spa*, *SCCmec*) を確認し、MRSA と判定された。

図14 多項目遺伝子検査 Verigene[®] システム (日立ハイテック)

遺伝子解析技術であるマイクロアレイ法を採用し、検体中の細菌や薬剤耐性遺伝子を同時に検出する機器で、Verigene[®] 血液培養グラム陽性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GP) は血液培養試験陽性培養液を用いてグラム陽性菌 12 項目と薬剤耐性遺伝子 3 項目 (*mecA*, *vanA*, *vanB*) を約 2 時間 30 分で同時に検出し、Verigene[®] 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN) はグラム陰性菌 9 項目と薬剤耐性遺伝子 6 項目 (CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA) を約 2 時間で同時に検出する。グラム染色後にそれぞれの菌に対応するテスト試薬を選択して試験する。

図15 Verigene[®] 症例 1-1 (血液培養グラム陽性菌テスト (BC-GP))

血液培養陽性ボトルのグラム染色にてブドウ球菌が疑われる集塊状のグラム陽性球菌が観察されたため、BC-GP にて検査し、*Staphylococcus* spp., *S. aureus* および *mecA* の遺伝子が検出された。グラム染色も含め約 3 時間で MRSA と同定され、直ちに daptomycin が投与開始された。

図16 Verigene[®] 症例 1-2 (血液培養グラム陽性菌テスト (BC-GP))

症例 1 のサブカルチャー 1 日目の血液寒天培地、X-SA 寒天培地および MRSA-CI 寒天培地すべてに発育し、陽性の発色が認められた。従来はスクリーニング培地を使用しても翌日^{*)}に MRSA の推定報告が可能になるところを、Verigene[®] システムでは約 3 時間で報告できていた。

※) スクリーニング培地上のマイクロコロニーを顕微鏡で確認できれば発育確認当日に報告可能なこともある。

図17 Verigene[®] 症例 1-3 菌交代 (血液培養グラム陰性菌テスト (BC-GN))

患者は daptomycin にて一旦症状が改善したが、同薬投与中に再び熱発し、採取された血液培養よりグラム陰性桿菌が確認され、BC-GN にて検査した結果、*Escherichia coli*, CTX-M の遺伝子が検出された。グラム染色も含め約 2 時間 30 分で ESBL 産生 *E. coli* に菌交代したことが判明し、直ちに

meropenem に投薬変更となった。

図 18 Verigene[®]症例 1-4 菌交代 (血液培養グラム陰性菌テスト (BC-GN))

サブカルチャー 1 日目のドリガルスキー改良培地とクロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地に発育が確認され、従来法では菌交代の菌が ESBL 産生菌と判明するまでに 1 日^{*}を要したが、Verigene[®]システムではグラム染色も含め約 2 時間 30 分で報告でき、迅速な抗菌薬変更が可能であった。

図 19 Verigene[®]症例 2-1 (血液培養グラム陽性菌テスト (BC-GP))

グラム染色にてグラム陰性桿菌とグラム陽性球菌が観察され、2 菌種による複数菌感染が疑われた。まず BC-GP にて検査すると、*Enterococcus faecalis* の遺伝子が検出された。

図 20 Verigene[®]症例 2-2 (血液培養グラム陰性菌テスト (BC-GN))

次いで BC-GN にて検査すると、予想に反し *E. coli*, *K. pneumoniae* および *Acinetobacter* spp. 3 菌種の遺伝子が検出された。染色では腸内細菌目細菌と腸球菌疑いの 2 菌種を想定していたが、Verigene[®]システムにて短時間で正確に 4 菌種を鑑別同定でき、多項目遺伝子検査装置の有効性が示唆された。サブカルチャーにて上記 4 菌種の発育が確認された。

図 21 Verigene[®]症例 3 (血液培養グラム陽性菌テスト (BC-GP))

グラム染色にて双球状および連鎖状のグラム陽性球菌が観察され、ボトルには溶血がなく腸球菌も推定されるような所見であるが菌種までの推定はむづかしい。BC-GP にて *Enterococcus faecium* の遺伝子が確認され、この同定結果をもとに菌名とともにペニシリンが有効でないことをコメントできた症例である。

図 22 FilmAray[®] multiplex PCR system

FilmAray[®]血液培養パネルはマルチプレックス PCR システムを用いて血液培養液中のグラム陽性菌 8 項目、グラム陰性菌 11 項目、酵母様真菌 5 項目および薬剤耐性遺伝子 3 項目 (*mecA*, *vanA/B*, *KPC*) を同時に約 1 時間で検出する。

図 23 FilmAray[®]症例 1-1 (血液培養パネル)

ガス産生を伴う血液培養陽性ボトル中に少し太めのグラム陰性桿菌が観察され、腸内細菌目細菌を疑う所見である。培養液を血液培養パネルで検査すると *Enterobacteriaceae* (腸内細菌群) だけでなくグラム染色では見えていなかった *Enterococcus* (腸球菌) の遺伝子まで検出された。

図 24 FilmAray[®]症例 1-2 (血液培養パネル)

血液培養陽性ボトルの培養液を遠心集菌後に再度グラム染色して複数視野を確認すると、ごくわずかにグラム陽性球菌が観察された。陰性菌に対して陽性菌の菌量が明らかに少なかったことから、サブカルチャーにグラム陽性菌の選択培地である CA 血液寒天培地を追加した。FilmAray[®]ではごく少数の菌まで PCR 法にて高感度に検出することができた症例である。

図 25 FilmAray[®]症例 1-3 (血液培養パネル)

血液寒天培地では腸内細菌目細菌の旺盛な発育により腸球菌は発育せず陽性菌選択培地 CA 血液寒天培地でのみ分離し得た。FilmAray[®]血液培養パネルで *Enterobacteriaceae* (腸

内細菌群) とされた菌は *Klebsiella aerogenes*, *Enterococcus* (腸球菌) とされた菌は *E. faecium* とそれぞれ同定された。

図 26 FilmAray[®]症例 2 (血液培養パネル)

血液培養液のグラム染色にて酵母様真菌が観察され、血液培養パネルにて *Candida glabrata* の遺伝子が検出された。本パネルには臨床材料から分離されやすい *Candida* 属が 5 菌種網羅されており、機器にセットしてから約 1 時間で結果が得られ、抗真菌薬の選択の有用な情報となった。

図 27 FilmAray[®]症例 3 (血液培養パネル)

強い溶血が認められる血液培養液のグラム染色にて大きめの形態の連鎖球菌が観察され、 β 溶血連鎖球菌が推定された。FilmAray[®]血液培養パネルでは *Streptococcus* (連鎖球菌) の遺伝子が検出された。本パネルには溶連菌では A 群の *Streptococcus pyogenes* と B 群の *Streptococcus agalactiae* しか網羅されておらず、連鎖球菌という同定結果であったため培養ボトル中の Lancefield 群特異抗原を検索すると G 群抗原が検出され、G 群溶血連鎖球菌として中間報告を行った。サブカルチャー後に分離菌は *Streptococcus dysgalactiae* susp. *equisimilis* と同定された。検査パネルに網羅されていない菌種も存在するためグラム染色や溶血性あるいは抗原検査等を活用して補うことも大切である。

おわりに

第 32 回日本臨床微生物学会総会・学術集会における教育講演の内容を再編集し、解説を加えるという形式でグラム染色所見の解釈法と培養、遺伝子検査への活用法について紹介した。日常検査や感染症診療に役立つヒントになれば幸いである。

利益相反：申告すべき利益相反はなし

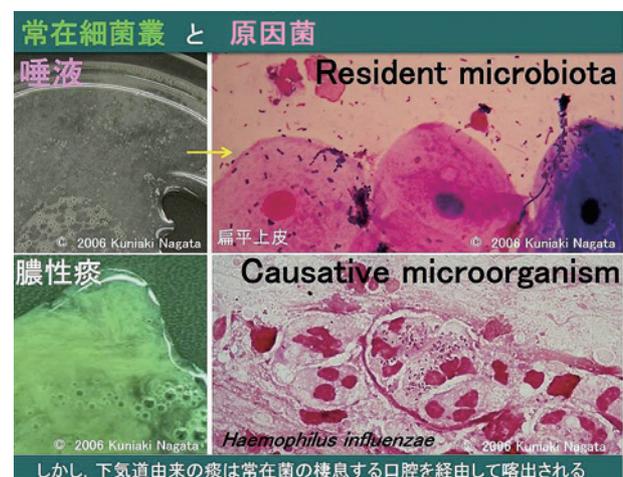


図 1. 唾液中の常在菌と膿性痰中の原因菌 (文献 1) より改変

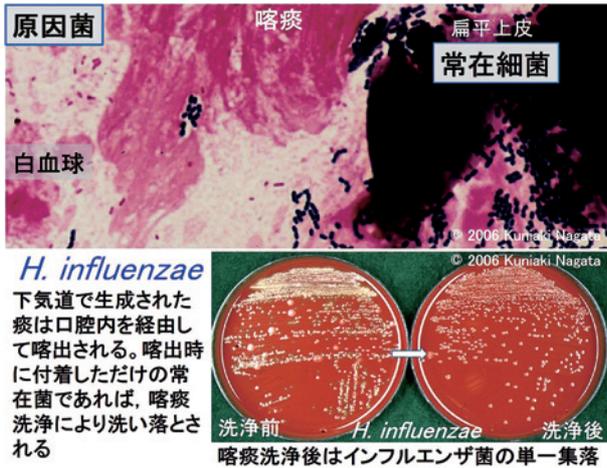


図2. 痰中に混在する原因菌と常在菌
文献1)より改変



下気道に落ち込んだ菌や上皮の排除過程で、常在菌が炎症の原因

図3. 誤嚥による炎症の特徴
文献1)より改変

誤嚥性肺炎: 誤嚥後のフェーズ

誤嚥後の一連の炎症の流れとして解釈する

フェーズ1	誤嚥初期の異物排除の段階 (種々雑多な菌の活発な貪食像)
フェーズ2	常在菌や上皮細胞の排除が進んだ段階 (菌量は減少するも炎症は持続)
フェーズ3	常在菌や上皮細胞が排除され細菌は観察されないが炎症反応は持続している段階
フェーズ4	特定の病原菌が増殖し原因菌が選択された段階 (嫌気性菌を含む複数菌感染が多い)

誤嚥後のフェーズ1~3: 誤嚥された常在菌や上皮細胞排除の段階 (異物排除とも言える)

図4. 誤嚥後の炎症の流れ (フェーズ1-4)
文献2)より改変

誤嚥性肺炎: 誤嚥後のフェーズ

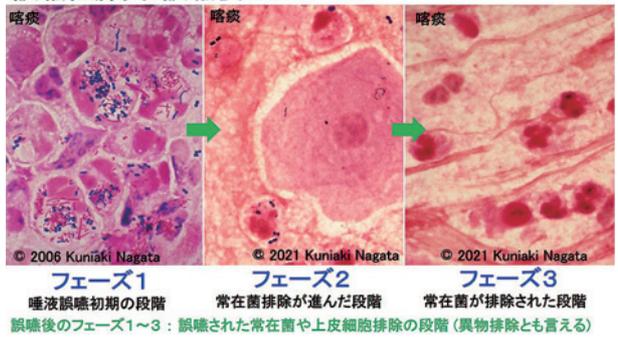


図5. フェーズ1~3 (異物排除の段階)
文献1) 2)より改変

誤嚥性肺炎: 特定の病原菌が増殖し原因菌が選択された段階

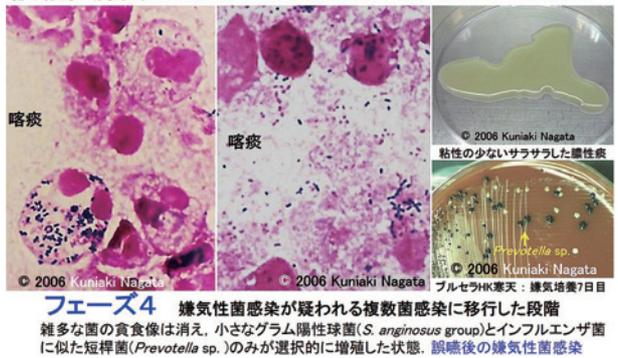
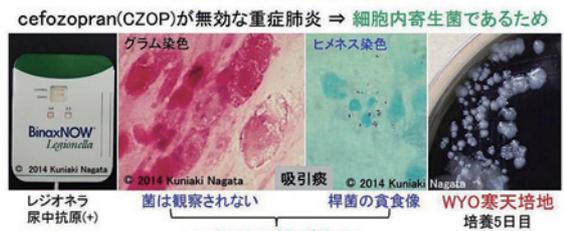


図6. フェーズ4 (原因菌が選択された段階)
文献1) 2)より改変

**Legionella spp.分離のための咳痰培養法
選択培地の追加は必須**



Legionella pneumophila serogroup 1

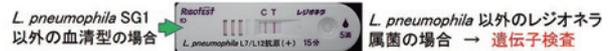


図7. Legionella spp. の推定と選択培地
文献1)より改変

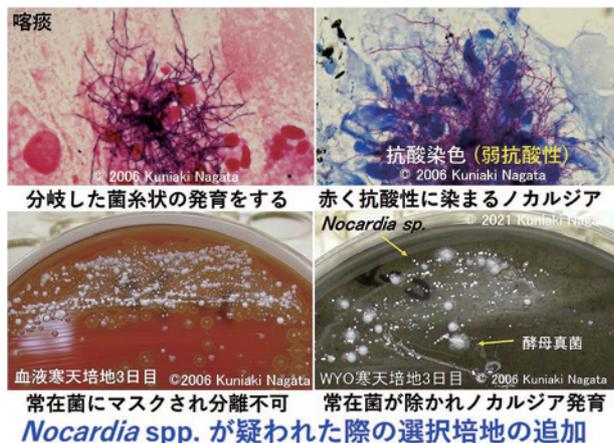


図8. *Nocardia* spp. の推定と選択培地
文献1) より改変

ラセン菌が発育した際のサブカルチャーの培養条件

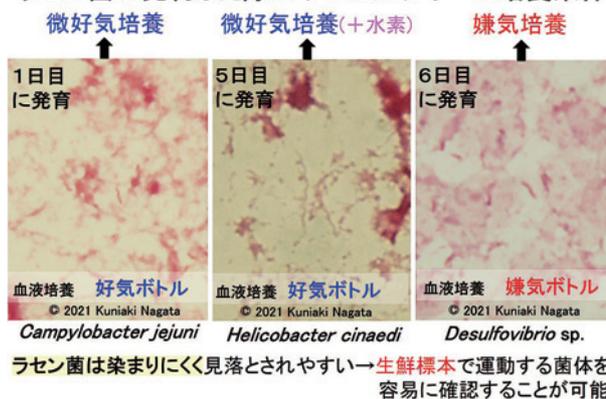


図11. ラセン菌の推定と培養条件
文献1) 2) より改変

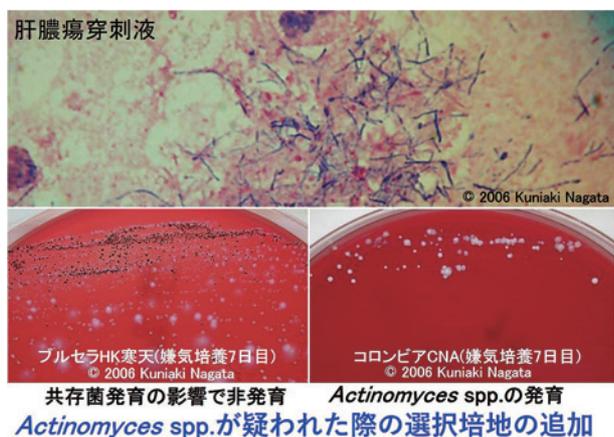


図9. *Actinomyces* spp. の推定と選択培地
文献1) より改変

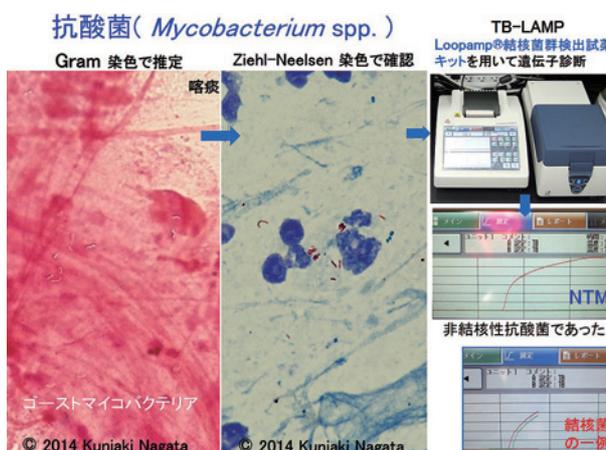


図12. 抗酸菌の推定と結核の遺伝子診断
文献1) より改変

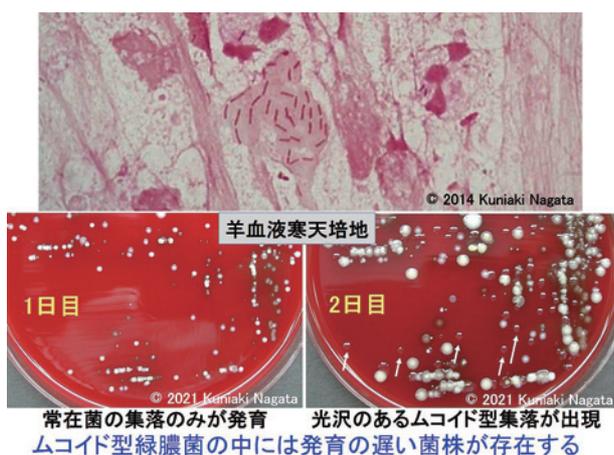


図10. ムコイド型 *Pseudomonas aeruginosa* 推定と培養時間延長
文献1) より改変

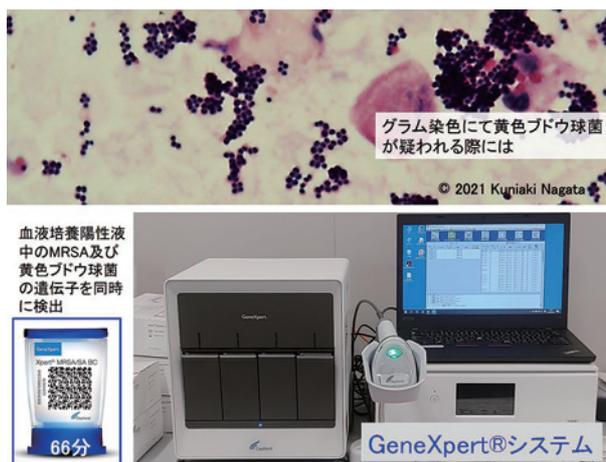


図13. *Staphylococcus aureus* の推定とMRSAの遺伝子診断



図 14. 多項目遺伝子検査 Verigene® システム

Verigene システム Case 1 菌交代

MRSAに対しdaptomycin投与中に再び熱発

血液培養 © 2021 Kuniaki Nagata

Acinetobacter	Not Detected	Citrobacter	Not Detected
Enterobacter	Not Detected	Proteus	Not Detected
* E. coli	Detected	P. aeruginosa	Not Detected
K. oxyloca	Not Detected	K. pneumoniae+	Not Detected
S. marcescens	Not Detected	OXA	Not Detected
* CTX-M	Detected	KPC	Not Detected
NDM	Not Detected	IMP	Not Detected
VIM	Not Detected		

ESBL産生 *Escherichia coli* ⇒ 直ちにmeropenemに変更

図 17. Verigene® 症例 1-3 (血液培養テスト)

Verigene システム Case 1

血液培養 © 2021 Kuniaki Nagata

* Staphylococcus	1.00 Detected	* S. aureus	1.00 Detected
S. epidermidis	Not Detected	S. lugdunensis	Not Detected
* mecA	1.00 Detected	Streptococcus	Not Detected
S. agalactiae	Not Detected	S. pyogenes	Not Detected
S. pneumoniae	Not Detected	S. anginosus gp.	Not Detected
E. faecalis	Not Detected	E. faecium	Not Detected
vanA	N/A	vanB	N/A
Listeria	Not Detected		

Staphylococcus aureus (MRSA) ⇒ 直ちにdaptomycin使用開始

図 15. Verigene® 症例 1-1 (血液培養テスト)

Verigeneシステム Case 1 菌交代

オリエンタシオン ESBL

ドリガルスキー改良培地 1日 クロモアガー寒天培地 1日

ESBL産 *Escherichia coli*

© 2021 Kuniaki Nagata

図 18. Verigene® 症例 1-4 (血液培養テスト)

Verigeneシステム Case 1

ヒツジ血液寒天培地 1日 X-SA寒天培地 1日 MRSA-CI寒天培地 1日

© 2021 Kuniaki Nagata

Staphylococcus aureus (MRSA)

図 16. Verigene® 症例 1-2 (血液培養テスト)

Verigene システム Case 2

グラム陽性菌 および グラム陰性菌 の混合感染?

血液培養 © 2021 Kuniaki Nagata

Staphylococcus	Not Detected	S. aureus	Not Detected
S. epidermidis	Not Detected	S. lugdunensis	Not Detected
mecA	N/A	Streptococcus	Not Detected
S. agalactiae	Not Detected	S. pyogenes	Not Detected
S. pneumoniae	Not Detected	S. anginosus gp.	Not Detected
E. faecalis	0.98 Detected	E. faecium	Not Detected
vanA	Not Detected	vanB	Not Detected
Listeria	Not Detected		

BC-GP 血液培養グラム陽性菌-薬剤耐性核酸テスト

図 19. Verigene® 症例 2-1 (血液培養テスト)

Verigene システム Case 2

多項目遺伝子検査にて3種類のグラム陰性菌の存在が判明
グラム陽性菌と合わせて4種類の菌を確認

血液培養

※ <i>Acinetobacter</i>	Detected	<i>Citrobacter</i>	Not Detected
<i>Enterobacter</i>	Not Detected	<i>Proteus</i>	Not Detected
※ <i>E. coli</i>	Detected	<i>P. aeruginosa</i>	Not Detected
<i>K. oxytoca</i>	Not Detected	※ <i>K. pneumoniae</i>	Detected
<i>S. marcescens</i>	Not Detected	OXA	Not Detected
CTX-M	Not Detected	KPC	Not Detected
NDM	Not Detected	IMP	Not Detected
VIM	Not Detected		

BC-GN 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト

© 2021 Kuniaki Nagata

図 20. Verigene® 症例 2-2 (血液培養テスト)

FilmArray Case 1

✓ Detected	<i>Enterococcus</i>
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>
Not Detected	<i>Staphylococcus</i>
Not Detected	<i>Staphylococcus aureus</i>
Not Detected	<i>Streptococcus</i>
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B)
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Not Detected	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A)
	Gram Negative Bact
Not Detected	<i>Acinetobacter baumannii</i>
✓ Detected	<i>Enterobacteriaceae</i>
Not Detected	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
Not Detected	<i>Escherichia coli</i>
Not Detected	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Not Detected	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Not Detected	<i>Proteus</i>
Not Detected	<i>Serratia marcescens</i>
Not Detected	<i>Haemophilus influenzae</i>
Not Detected	<i>Neisseria meningitidis</i>
Not Detected	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yeast
Not Detected	<i>Candida albicans</i>
Not Detected	<i>Candida glabrata</i>
Not Detected	<i>Candida krusei</i>
Not Detected	<i>Candida parapsilosis</i>
Not Detected	<i>Candida tropicalis</i>

血液培養

染色では見えていなかったGPCを検出
腸球菌属(*Enterococcus*)と腸内細菌科(目)細菌(*Enterobacteriaceae*)

© 2021 Kuniaki Nagata

図 23. FilmArray® 症例 1-1 (血液培養パネル)

Verigene システム Case 3

少し大きめのグラム陽性菌
双球状または連鎖状

血液培養

<i>Staphylococcus</i>	Not Detected	<i>S. aureus</i>	Not Detected
<i>S. epidermidis</i>	Not Detected	<i>S. lugdunensis</i>	Not Detected
mecA	N/A	<i>Streptococcus</i>	Not Detected
<i>S. agalactiae</i>	Not Detected	<i>S. pyogenes</i>	Not Detected
<i>S. pneumoniae</i>	Not Detected	<i>S. anginosus</i> gp.	Not Detected
<i>E. faecalis</i>	Not Detected	※ <i>E. faecium</i>	1.00 Detected
vanA	Not Detected	vanB	Not Detected
<i>Listeria</i>	Not Detected		

Enterococcus faecium ⇒ ペニシリン系薬は不可

© 2021 Kuniaki Nagata

図 21. Verigene® 症例 3 (血液培養テスト)

FilmArray Case 1

無遠心

遠心集菌後

血液培養

FilmArrayとグラム染色の成績より、グラム陽性菌の選択培地を追加

© 2021 Kuniaki Nagata

図 24. FilmArray® 症例 1-2 (血液培養パネル)

FilmArray® multiplex PCR system

バイオメュー・ジャパン

血液培養パネル

グラム陽性細菌

- Enterococcus* (腸球菌)
- Listeria monocytogenes*
- Staphylococcus* (ブドウ球菌)
- Staphylococcus aureus*
- Streptococcus* (連鎖球菌)
- Streptococcus agalactiae*
- Streptococcus pneumoniae*
- Streptococcus pyogenes*

酵母様真菌

- Candida albicans*
- Candida blabrata*
- Candida krusei*
- Candida parapsilosis*
- Candida tropicalis*

薬剤耐性遺伝子

- mecA
- vanA/B
- KPC

27 項目

感度 97.5%

特異度 99.8%

グラム陰性細菌

- Acinetobacter baumannii*
- Haemophilus influenzae*
- Neisseria meningitidis*
- Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacteriaceae (腸内細菌群)
- Enterobacter cloacae* complex
- Escherichia coli*
- Klebsiella oxytoca*
- Klebsiella pneumoniae*
- Proteus*
- Serratia marcescens*

図 22. FilmArray® multiplex PCR system

FilmArray Case 1

血液寒天培地: 1日目

CA血液寒天培地: 1日目

Klebsiella aerogenes

*E. faecium*の集落は確認できない

Enterococcus faecium

グラム陽性菌選択培地にて集落を確認

© 2021 Kuniaki Nagata

図 25. FilmArray® 症例 1-3 (血液培養パネル)

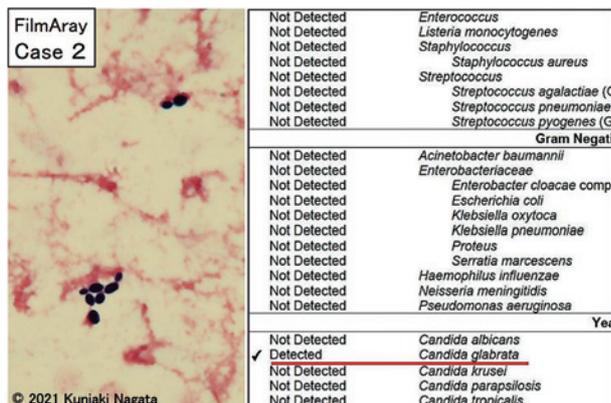
*Candida glabrata*

図 26. FilmArray® 症例 2 (血液培養パネル)

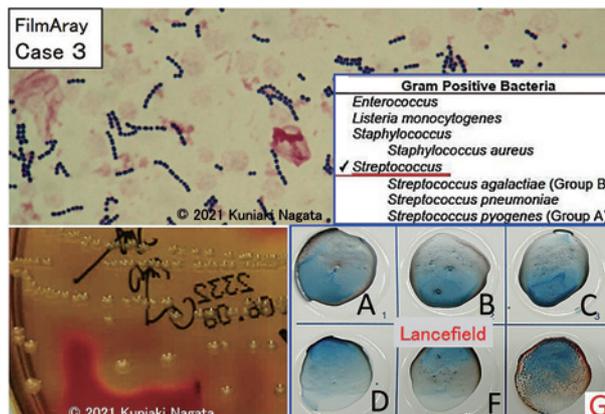
*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

図 27. FilmArray® 症例 3 (血液培養パネル)

文 献

- 1) 永田邦昭. 2014. 感染症診断に役立つグラム染色—実践永田邦昭のグラム染色カラーアトラス (第2版), シーニュ, 東京.
- 2) 永田邦昭. 2021 (刊行予定). 感染症診断に役立つグラム染色—実践永田邦昭のグラム染色カラーアトラス (第3版), シーニュ, 東京.
- 3) Miller, D. L., R. Jones. 1963. A study of techniques for the examination of sputum in a field survey of chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 88: 473-483.
- 4) Geckler, R.W., et al. 1977. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J. Clin. Microbiol.* 6: 396-399.
- 5) 永田邦昭. 2019. 一般細菌を目的とした検体別塗抹検査法・喀痰, 気管支洗浄液, 胸水. *臨床と微生物* 46 (増刊号): 533-540.
- 6) 永田邦昭. 2016. 見て学ぶグラム染色の手技と評価: 2.グラム染色の手技と注意点 3) 標本の観察・評価. *Medical Technology* 44 (特集): 462-468.
- 7) 永田邦昭. 2017. 初心者でもこれだけは習得しておきたい微生物検査の基礎技術. *臨床と微生物* 44 (増刊号): 515-524.
- 8) 永田邦昭. 2021. 微生物検査サポートブック 総論—基本的な技術と操作法 塗抹検査. *検査と技術* 49 (増刊号): 197-205.
- 9) 永田邦昭. 2021. 学びなおそう! グラム染色 総論—グラム染色を理解する. *Medical Technology* 49 (特集): 1124-1128.

Utilization of information obtained from gram staining
—Points for connecting staining findings to culture and genetic testing—

Kuniaki Nagata

Department of Education and Training, Kumamoto Kenhoku Hospital

Gram staining is a basic inspection method which quickly detects the existence of bacteria lurking in infected lesions, narrows down causal microorganisms, and leads to infectious disease diagnosis. The microscopic examination of the patient material is a test which can be said to look in the lesion with a microscope, and it is possible to draw out various information reflecting the disease state and treatment progress of the present patient, but on the other hand, there is a limit in the staining method. Not only staining but also culture method and genetic testing method have usefulness and limit respectively, and it is important to improve the accuracy of infectious disease diagnosis by complementary each limit. In this paper, we present a real case in which gram staining observation is the starting point and leads to other test methods, and introduces the interpretation method and utilization method of gram staining findings.