

東京病院

# 第3回国臨協関信支部主催研修会

## 腸内細菌科の同定法

2016年12月3日(土)



NHO東京病院

臨床検査科 太田和 秀一

# 二級試験実技問題

1. 確認培地を見て菌名同定
2. 培地を見て起因菌を推定
3. 寄生虫検鏡
4. 培地を見て耐性菌の種類
5. スライドを見て微生物名10枚

# 二級試験

## ◆平成28年(第103回)二級臨床検査士資格認定試験

科目	東西	志願者	受験者	合格者	合格率 (%)	欠席者
微生物学	東	172	161	99	61.5	11
	西	109	101	70	69.3	8

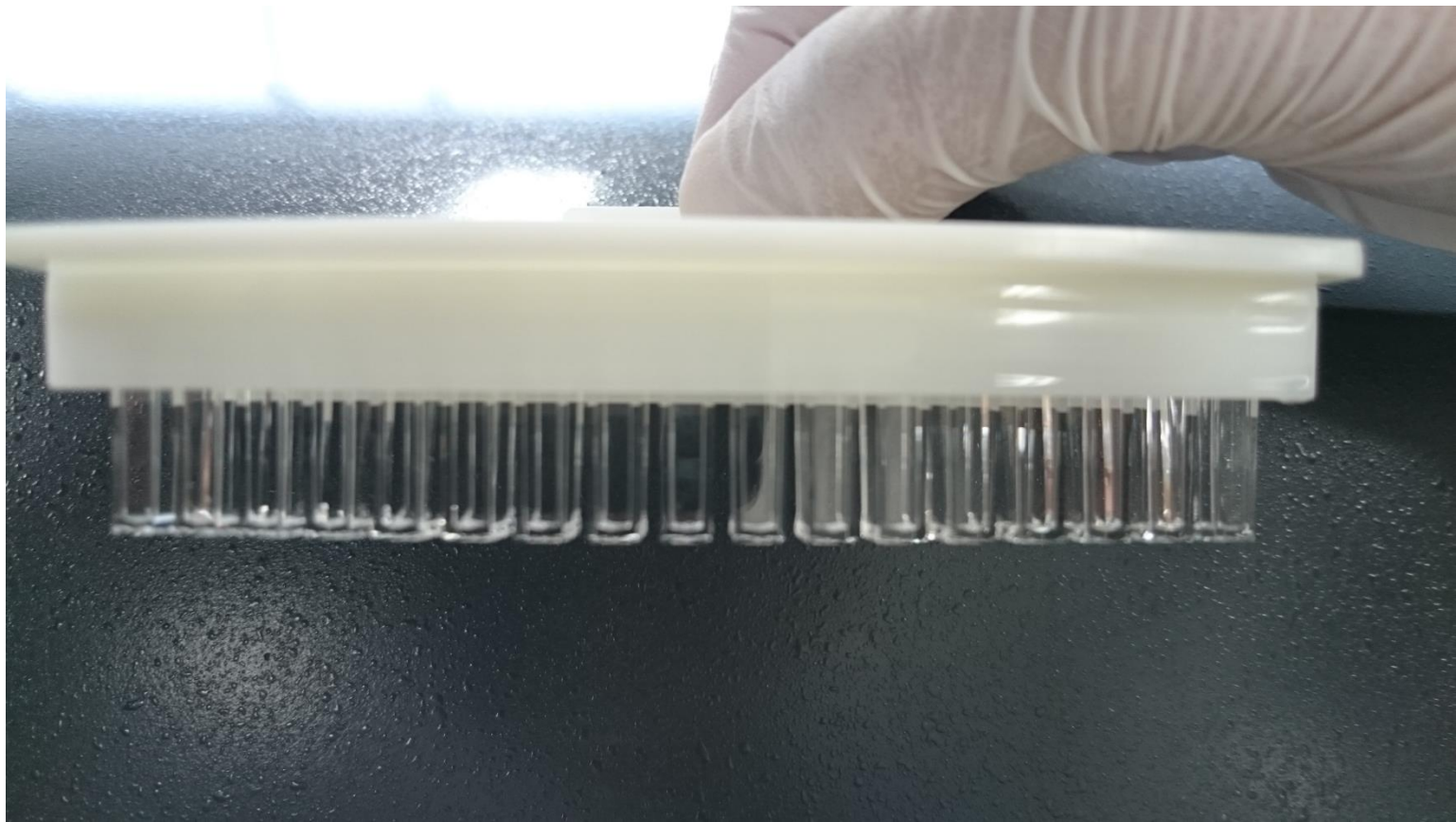
## ◆平成27年(第102回)二級臨床検査士資格認定試験

科目	東西	志願者	受験者	合格者	合格率 (%)	欠席者
微生物学	東	196	188	135	71.8	8
	西	77	68	45	66.2	9

# 細菌同定自動化の変遷

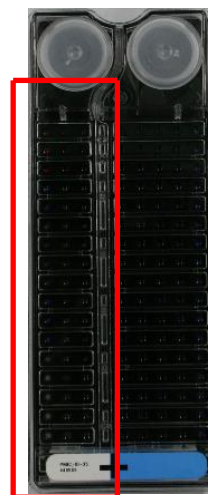
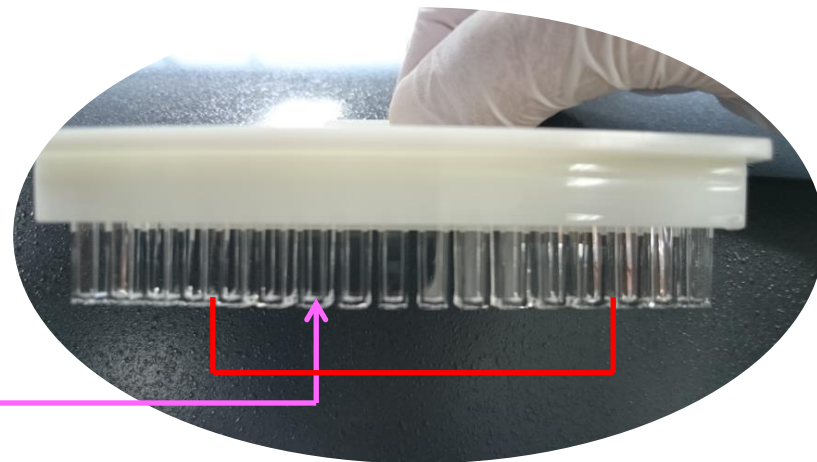
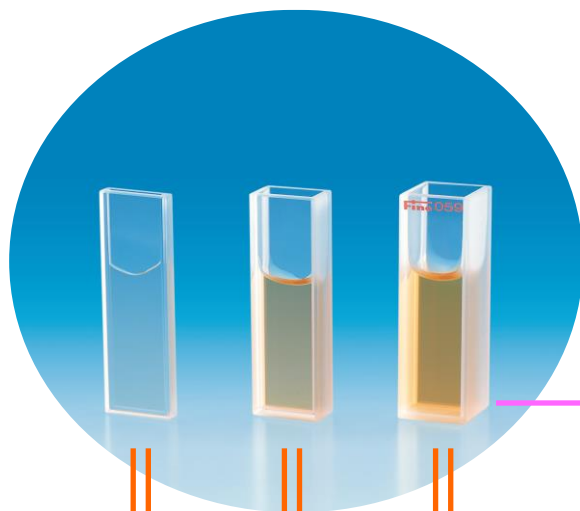
# 生化学自動分析装置







# 用手法→自動化





同定確率95.6%



# 一代目



TSI



SIM



Lys



VP

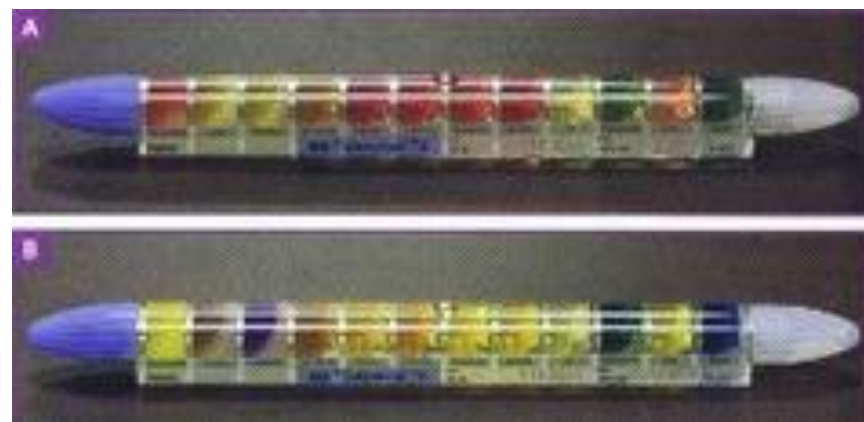
# 二代目



アピ

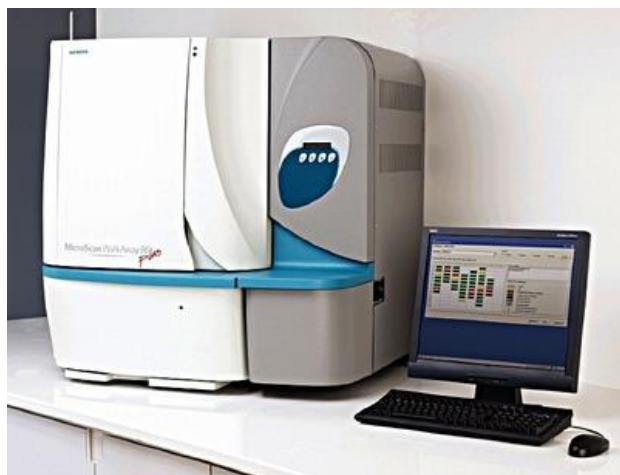


クリスタル



エンテロチューブ

# 三代目



WalkAway



Phoenix



VITEC

# 腸内細菌科について

# 腸内細菌科同定への道筋

塗抹標本見る



分離培地をよく見る



THINK

培地の種類やコロニーの性状から菌種を推定する



自動細菌同定機器や同定キットに掛ける



# 表 I -1 グラム陰性桿菌の分離培地での発育

分 離 培 地	発 育 （コロニーの形成）			
血液寒天培地	+	+	± <sup>5)</sup>	+
チョコレート寒天培地	+	+	± <sup>5)</sup>	+
BTB 乳糖寒天培地	+	± <sup>4)</sup>	—	+
MacConkey 寒天培地	+	± <sup>4)</sup>	—	±
TCBS 寒天培地	—	+	—	—
オキシダーゼ試験	— <sup>3)</sup>	+	+	± <sup>6)</sup>
運動性	±	+	—	±
菌 種	腸内細菌科	ビブリオ科 <sup>1)</sup>	パストツレラ科 <sup>2)</sup>	非発酵菌群

+:発育あり、陽性    —:発育なし、陰性

1) ビブリオ科: *Vibrio* 属、*Aeromonas* 属

2) パストツレラ科: *Pasteurella* 属

3) *Plesiomonas shigelloides* は陽性

4) *Aeromonas* 属は発育

5) 発育因子、または発育に炭酸ガスを

6) *Acinetobacter* 属, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia mallei* は陰性

# 表 I -2 腸内細菌科の定義

- 通性嫌気性のグラム陰性桿菌（無芽胞菌）
- 普通寒天培地に発育する
- ブドウ糖を24時間以内に発酵的に分解して酸を産生する  
（ガスを産生する菌と産生しない菌がある）
- ほとんどの菌種が周毛性鞭毛を有して運動性がある  
（*Klebsiella*属、*Shigella*属、*Tatumella ptyseos*、*Yersinia pestis* は非運動性）
- 硝酸塩を還元して亜硝酸塩にする
- オキシダーゼ試験が陰性である  
（*Plesiomonas shigelloides*はオキシダーゼ試験陽性）

# 腸内細菌科の菌種別の感染症と生息場所

菌種	感染症	生息・汚染物
<i>Escherichia coli</i>	腸管出血性大腸菌感染症 急性胃腸炎、食中毒、尿路感染 敗血症、髄膜炎	ヒト、動物の腸管(ウシ) 食品
<i>Shigella dysenteriae</i> <i>flexnari</i> <i>boydii</i> <i>sonnei</i>	細菌性赤痢	水系、食品
<i>Salmonella</i> Typhi Paratyphi 他の <i>Salmonella</i> spp.	腸チフス パラチフス 急性胃腸炎、食中毒	ヒト、動物の腸管(豚、 鶏)、下水、河川
<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>pestis</i>	胃腸炎、虫垂炎  ペスト	水系、食品  野生の齧歯類
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>oxytoca</i>	呼吸器・尿路・日和見感染症 出血性大腸炎	
<i>Edwardsiella tarda</i>	急性胃腸炎、日和見感染症	

# 腸内細菌科の菌種別の感染症と生息場所

菌種	感染症	生息・汚染物
<i>Presiomonas shigelloides</i>	急性胃腸炎、食中毒	河川水
<i>Providencia alcalifaciens</i> <i>rettgeri</i> <i>stuatii</i>	食中毒 日和見感染	腸管、自然界、院内環境
<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>cloacae</i>	日和見感染症	
<i>Hafnia alvei</i>		
<i>Citrobacter freundii</i> <i>koseri</i>		
<i>Morganella morganii</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Proteus mirabilis</i> <i>vulgalis</i>		

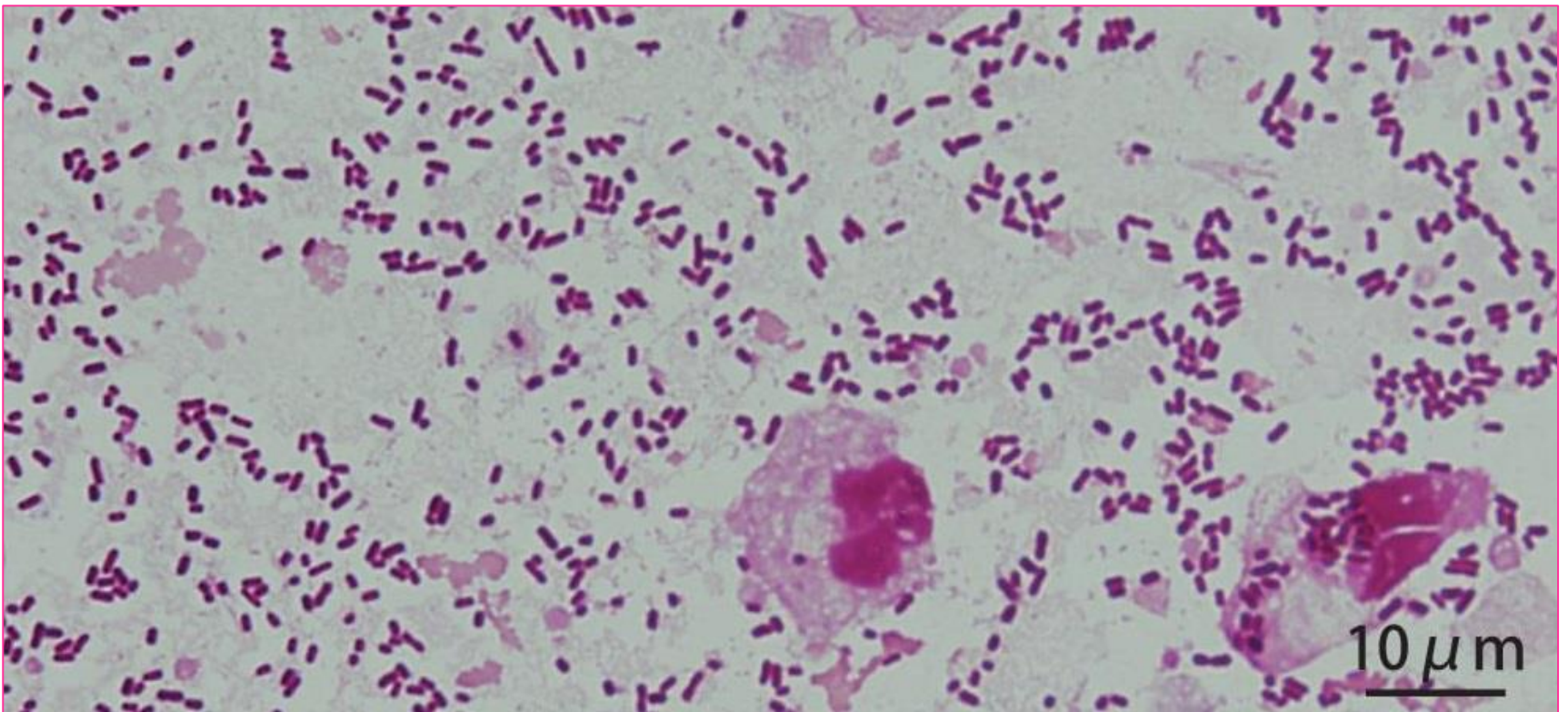
# 腸内細菌科の検体別検出菌

検体種別	検出菌
尿	<i>E.coli</i> , <i>E.cloacae</i> , <i>K.pnuemoniae</i> <i>S.marcescens</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>P.vulgalis</i> , <i>M.morganii</i> , <i>P.rettgeri</i>
糞便	<i>E.coli</i> (EHEC), <i>S.dysenteriae</i> , <i>S.flexneri</i> , <i>S.boydii</i> , <i>S.sonnei</i> , <i>S.Typhi</i> , <i>S.Paratyphi A</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>Y.pseudotuberculosis</i> , <i>P.shigelloides</i> <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i>
胆汁検体	<i>E.coli</i> , <i>S.Typhi</i> , <i>C.frendii</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>E.cloacae</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>P.vulgalis</i>
膿・分泌液・穿刺液	<i>E.coli</i> , , <i>K.pnuemoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> <i>P.mirabilis</i> , <i>P.vulgalis</i>
髄液	<i>E.coli</i> ,
咽頭・鼻腔粘膜・喀痰	<i>K.pnuemoniae</i>
血液 血管内留置カテーテル	<i>E.coli</i> , , <i>K.pnuemoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> <i>E.cloacae</i> , <i>E.aerogenes</i> , <i>C.frendii</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>E.tarde</i>

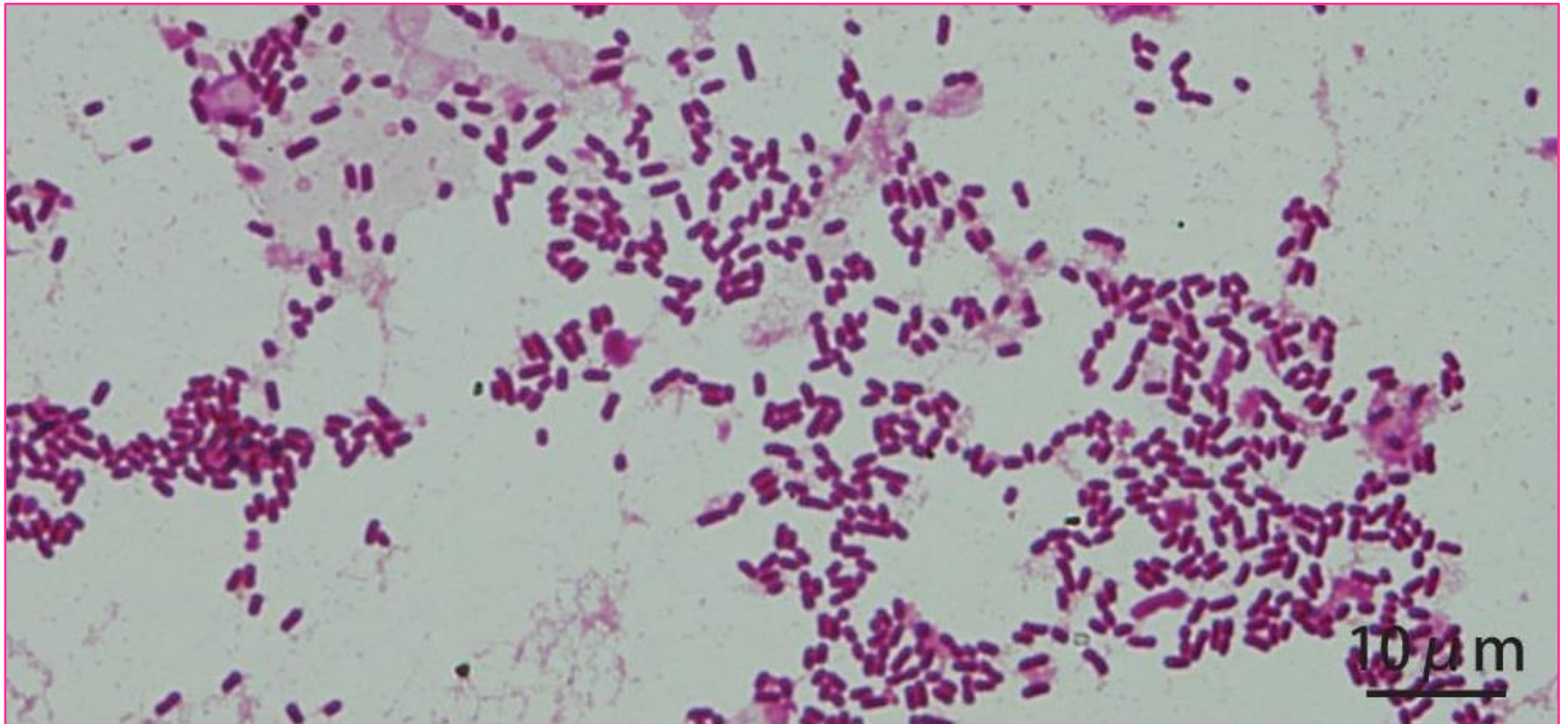


# グラム染色による推定

# *E.coli*

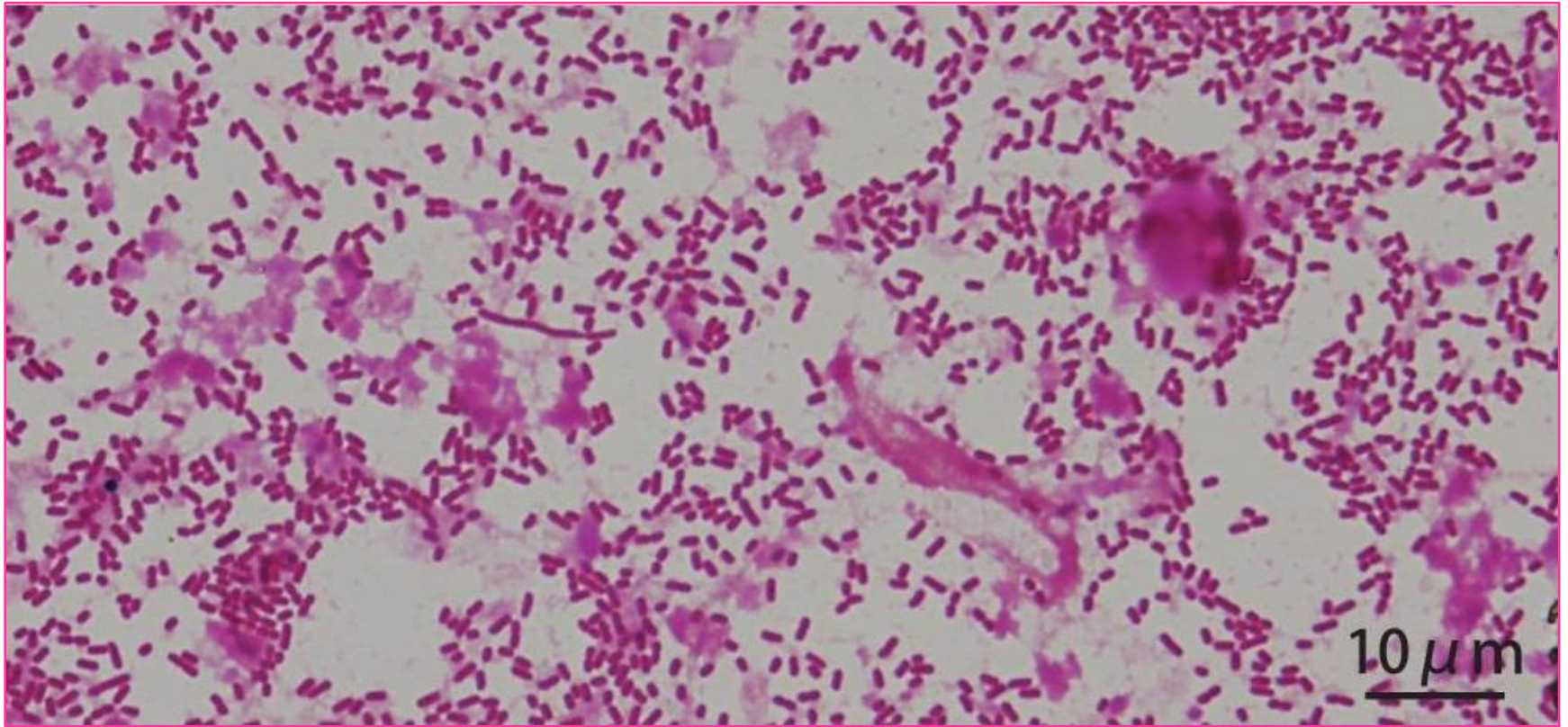


# *E.aerogenes*

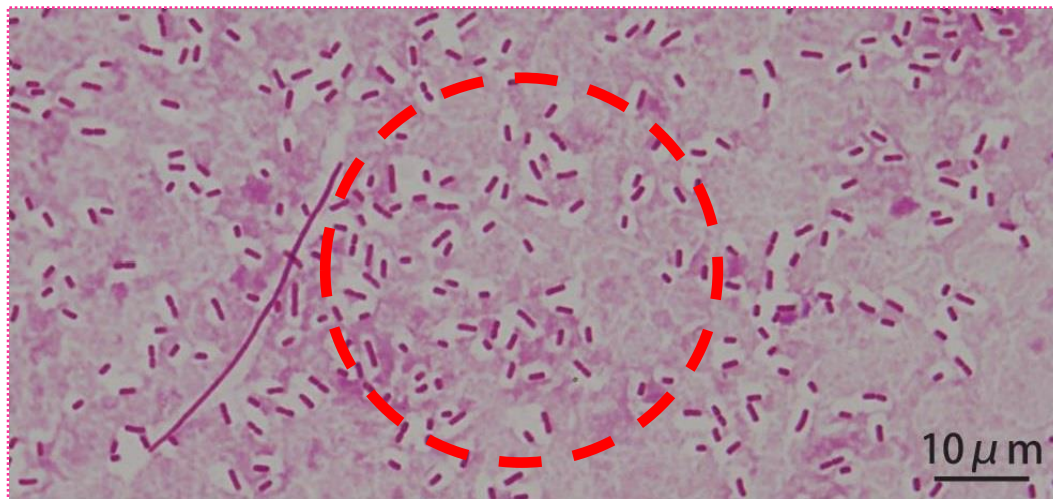
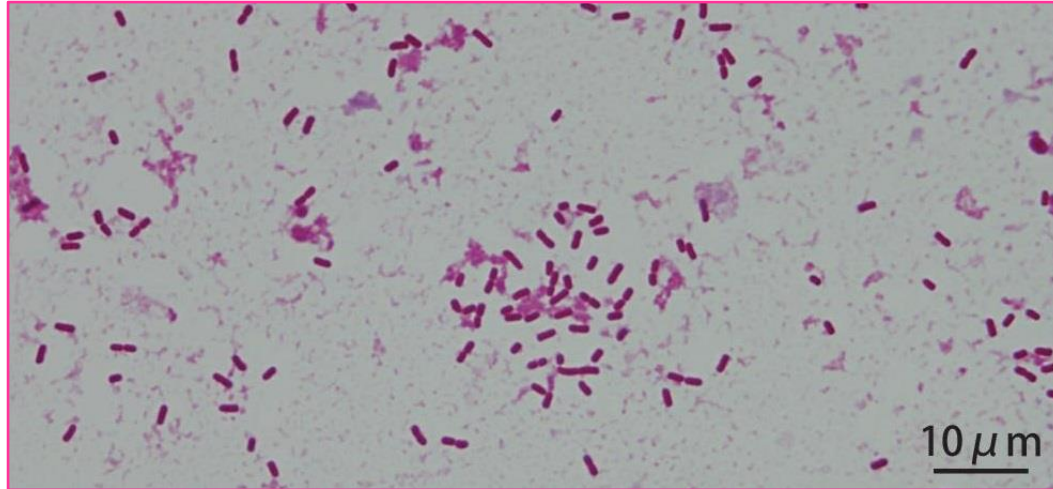




# *P.mirabilis*



# *K.pneumoniae*





# 集落(コロニー)からの菌種推定

## 一般的な培地

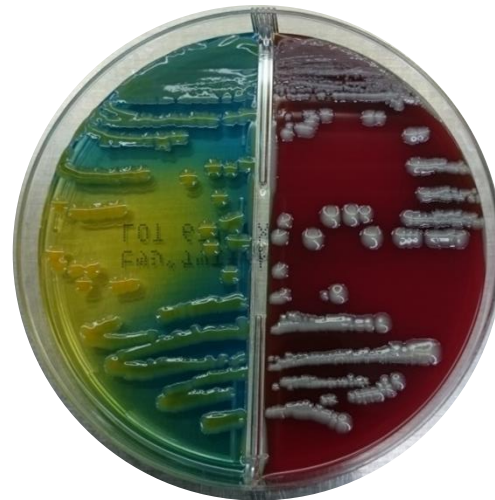
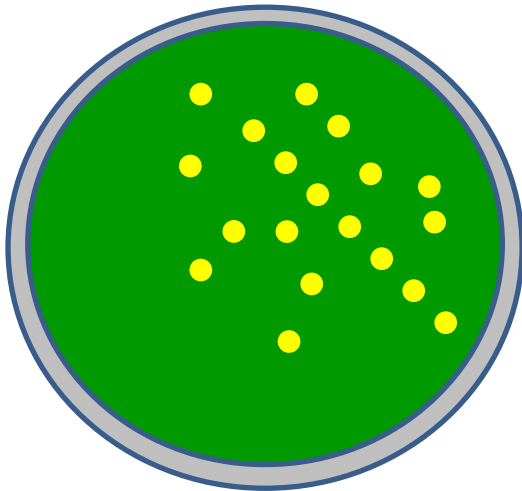
# 表Ⅱ-1 集落性状から推定可能な腸内細菌科

特徴	推定可能な菌種
乳糖分解	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E.aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i>
黒色集落(H <sub>2</sub> S:SS寒天培地)	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Citorobacter spp.</i> , <i>Proteus spp.</i>
赤色色素産生	<i>Serratia marcescens</i> (数%)
ムコイド型集落	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> (まれ)
Swarming	<i>Proteus spp.</i> (血液・チョコレート寒天培地)
アンモニア臭	<i>Proteus spp.</i> , <i>Morganella spp.</i> , <i>Providencia spp</i>

# 乳糖分解菌

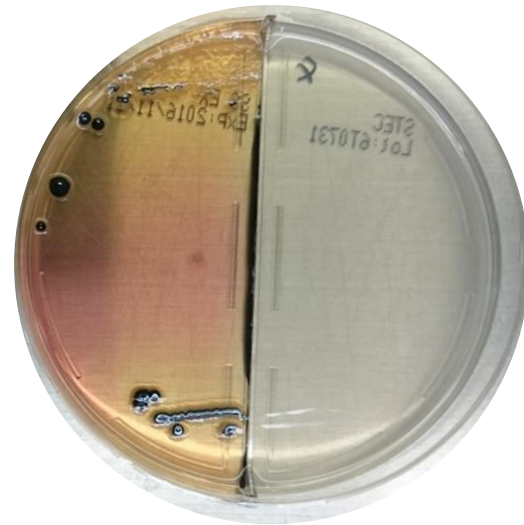
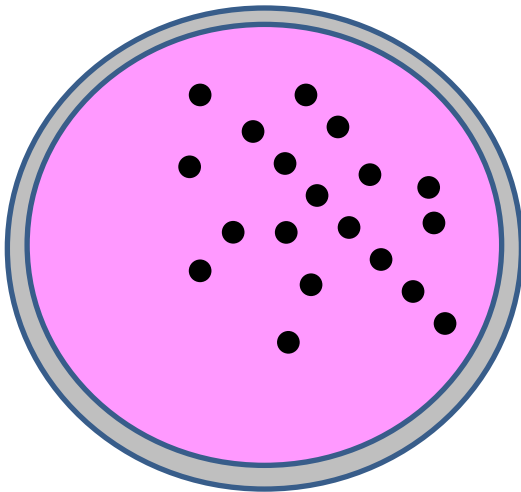
- *Klebsiella pneumoniae* , *K.oxytoca*
- *Enterobacter cloacae* , *E.aerogenes*
- *Citrobacter spp.*
- *Escherichia coli*

**KECE**



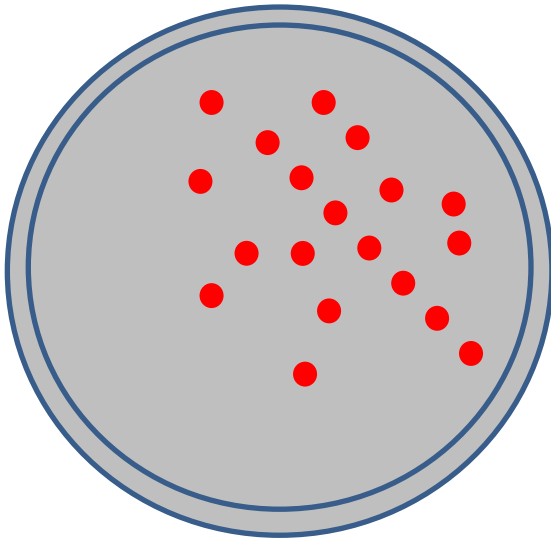
# 黑色色素產生

- *Salmonell spp.*
- *Citobacter spp.*
- *Proteus spp.*



# 赤色色素產生

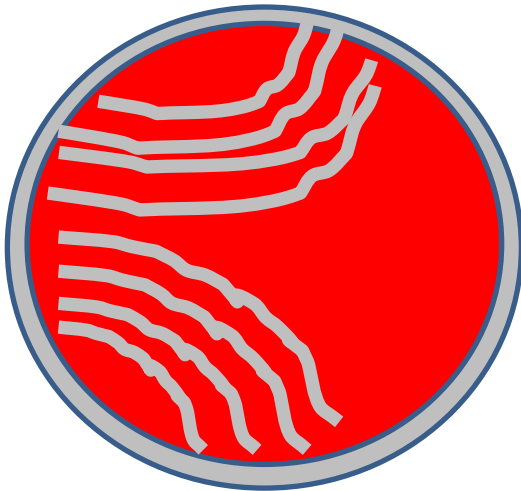
- *Serratia marcescens*





# Swarming

- *Proteus spp.*



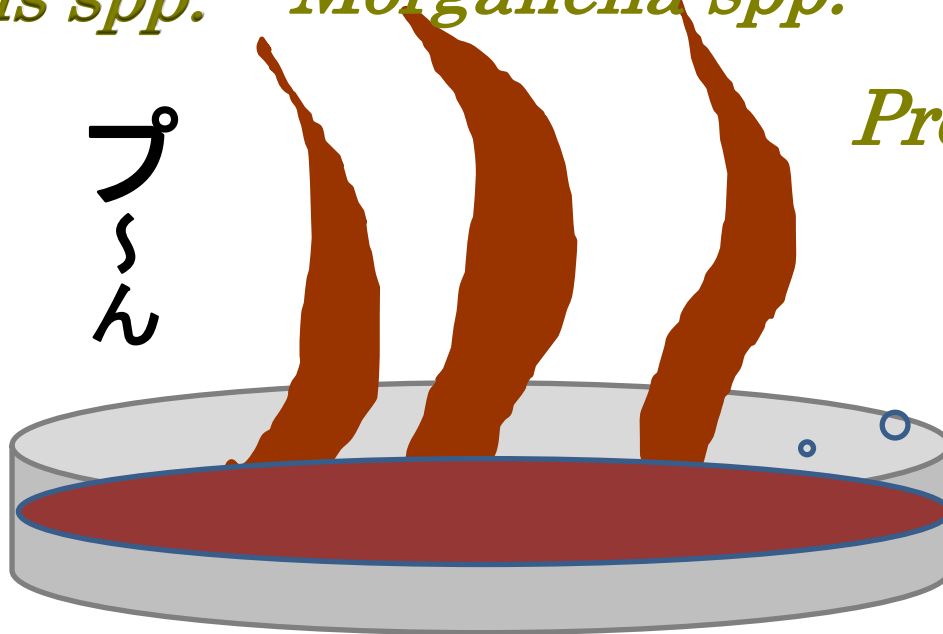
# アンモニア臭

*Proteus spp.*

*Morganella spp.*

*Providencia spp.*

プ  
ッ  
ン

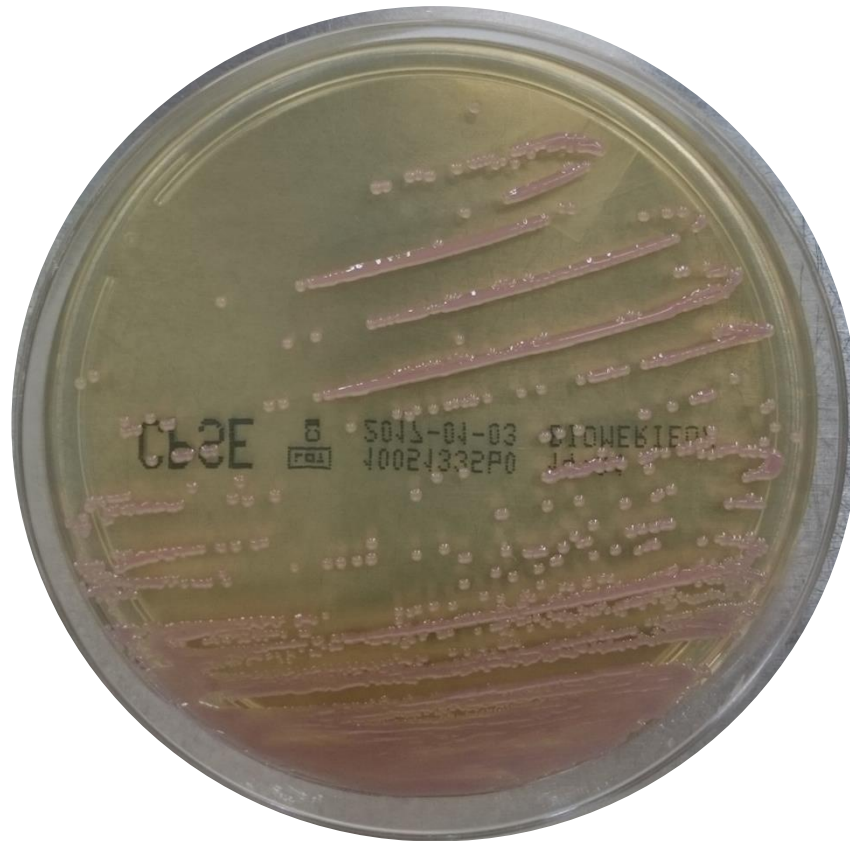


くさ~

# 集落(コロニー)からの菌種推定 特殊な培地

**chromID CPS**

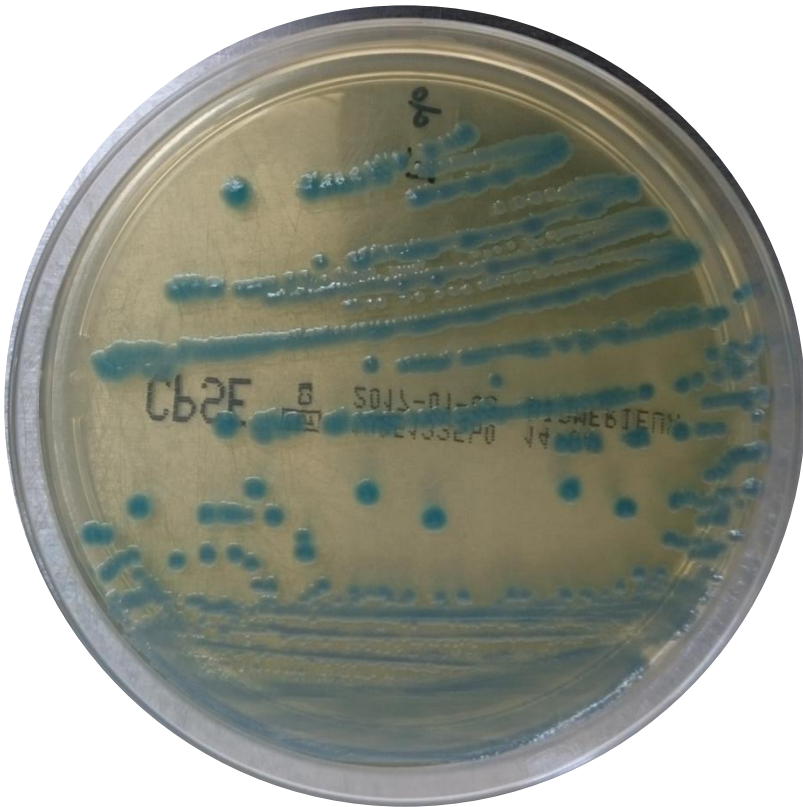
# *E.coli*



ピンク～ワインレッド色のコロニー

*E.cloacae*

*K.pneumoniae*



緑青～灰青色のコロニー

*P.mirabilis*



*P.vulgalis*



明るい茶～こげ茶色のコロニー

**確認培地（試験管培地）による鑑別**

# 表 I -3 腸内細菌科の生化学性状による分類

第1群	IPA反応	(+)	<i>Proteus spp.</i>	<i>Providencia spp.</i>
	H <sub>2</sub> S産生	(-/+)	<i>Morganella morganii</i>	
	VP反応	(-/+)	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Tatumella ptyseos</i>
第2群	IPA反応	(-)	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>
	H <sub>2</sub> S産生	(+)	<i>Edwardsiella tarde</i>	
	VP反応	(-)		
第3群	IPA反応	(-)	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
	H <sub>2</sub> S産生	(-)	<i>Serratia spp.</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	VP反応	(+)	<i>Cedecia spp.</i>	<i>Ewingella americana</i>
第4群	IPA反応	(-)	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>
	H <sub>2</sub> S産生	(-)	<i>Yersinia spp.</i>	( <i>Citrobacter spp.</i> )
	VP反応	(-)	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	<i>Kluyvera spp.</i>

赤は臨床材料からの分離頻度が高い菌または临床上重要な菌



# 表 I -4 腸内細菌科に用いられる確認培地

培地名		斜面	高層	注意点
TSI培地		① 乳糖・白糖分解 ② ブドウ糖分解(発酵) ③ ガス発生 ④ 硫化水素	乳糖・白糖分解 (赤→黄)  ブドウ糖分解 (赤→黄)	斜面が黄変の場合、乳糖か白糖の一方、または両方を分解
SIM培地		① IPA反応 ② 硫化水素産生 ③ インドール産生 ④ 運動性	IPA反応 H <sub>2</sub> S産生(黒色) インドール(Kovac試薬→赤) 運動性(穿刺部周囲混濁)	腸内細菌科のH <sub>2</sub> S産生はTSI培地で判定 IPAはKovac試薬滴下前に判定
LIM培地		① リジン脱炭酸反応 ② インドール産生 ③ 運動性	リジン脱炭酸反応 陽性(→黄→紫)、陰性(→黄) インドール反応(赤色) 運動性(穿刺部周囲混濁)	リジン脱炭酸反応陽性では培養中、一度黄変してから紫色に戻る
VP半流動培地		① VP反応 (Voges-Proskauer反応)	VP反応 (KOH+α-ナフトール→桃赤色)	40%KOHとα-ナフトール試薬を滴下、15分後に判定
シモンズのクエン酸塩培地		① クエン酸塩利用	クエン酸塩利用 (緑→青色)	フタをきつくしめようと偽陰性になる (空気に十分触れさせる)
DNA培地		① DNase 産生	DNase 産生 (青→赤紫色)	斜面部中心に一本線を引く様に菌を接種すると陰陽性の色調が明瞭

# 腸内細菌科の性状

IPA	H <sub>2</sub> S	第1群	TSI			IND	SC	DNA	Sac	Lys	Ure
			斜面	高層	ガス						
+	+	<i>Proteus mirabilis</i>	赤	黒	+	—	+	d	—	—	+
		<i>Proteus vulgaris</i>	黄	黒	+	+	—	+	+	—	+
	—	<i>Morganella morganii</i>	赤	黄	+	+	—	—	—	—	+
		<i>Providencia rettgeri</i>	赤	黄	+	+	+	—	d	—	+

IPA	H <sub>2</sub> S	第2群	TSI			SC	Lys	ONPG	IND	VP
			斜面	高層	ガス					
—	+	<i>Salmonella Typhi</i>	赤	黒	—	—	+	—	—	—
		<i>Salmonella ParatyphiA</i>	赤	黄	+	—	—	—	—	—
		<i>Salmonella Enteritidis</i>	赤	黒	+	+	+	—	—	—
		<i>Salmonella arizonae</i>	黄	黒	+	+	+	+	—	—
		<i>Citrobacter furendii</i>	黄	黒	+	+	—	+	—	—
		<i>Edwardsiella tarde</i>	赤	黄	+	—	+	—	+	—

# 腸内細菌科の性状

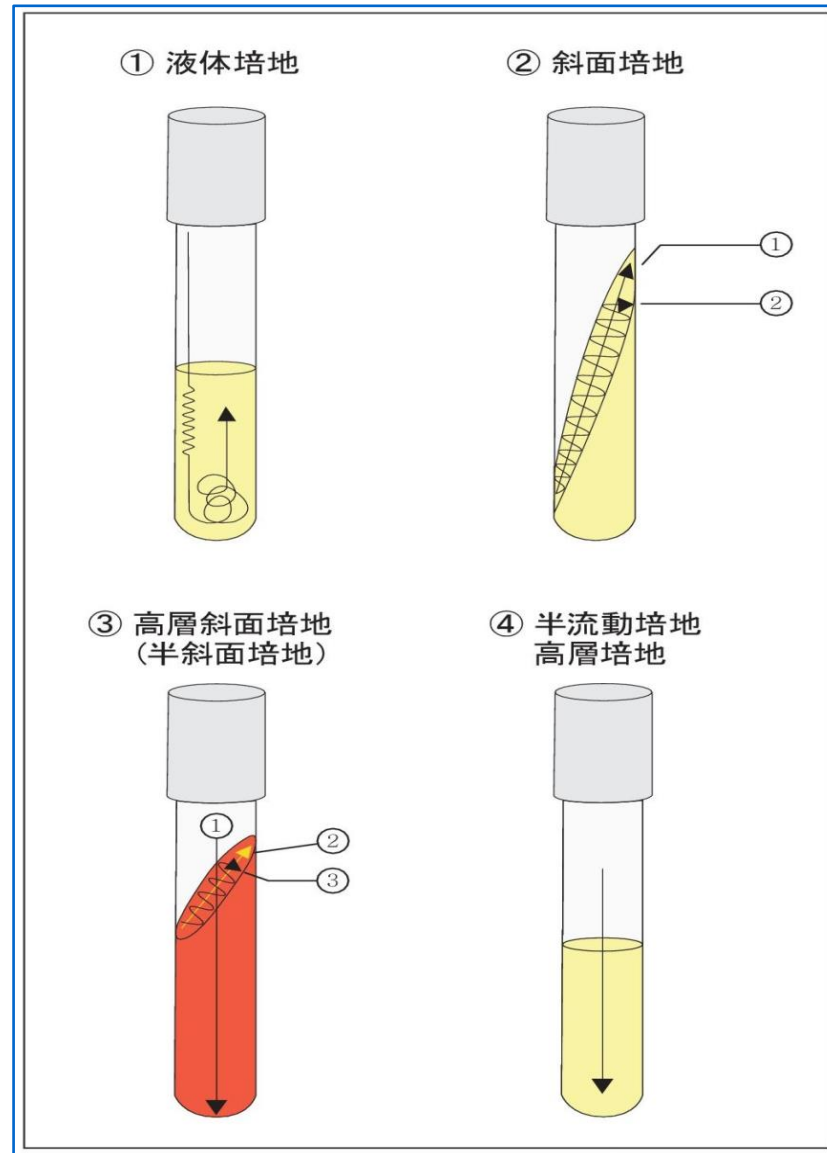
IPA	VP	第3群	TSI			SC	Lys	Mot	DNA	ONP G	Lac
			斜面	高層	ガス						
—	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	黄	黄	+	+	+	—	—	+	+
		<i>Klebsiella oxtoca</i>	黄	黄	+	+	+	—	—	+	+
		<i>Serratia marcescens</i>	黄	黄	+	+	+	+	+	+	—
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	黄	黄	+	+	+	+	—	+	+
		<i>Enterobacter cloacae</i>	黄	黄	+	+	—	+	—	+	+

IPA	VP	第4群	TSI			SC	Lys	Mot	IND
			斜面	高層	ガス				
—	—	<i>Escherichia coli</i>	黄	黄	+	—	+	+	—
		<i>Shigella boydii</i>	赤	黄	—	—	—	—	—
		<i>Shigella dysenteriae</i>	赤	黄	—	—	—	—	—
		<i>Shigella flexneri</i>	赤	黄	—	—	—	—	—
		<i>Shigella sonnei</i>	赤	黄	—	—	—	—	—
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	黄	黄	—	—	—	—	d
		<i>Yersinia pestis</i>	赤	黄	—	—	—	—	—
		<i>Plesiomonas shigelloides</i>	赤	黄	—	—	+	+	+



# 確認培地(試験管培地)と性状及び鑑別 INViC試験

# 試験管培地への接種法



# 第1群

## *Proteus mirabilis*



TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/A	(-)	(+, -, +) IPA(+)	(-)	(+)

# 第2群

## *Salmonella spp.*

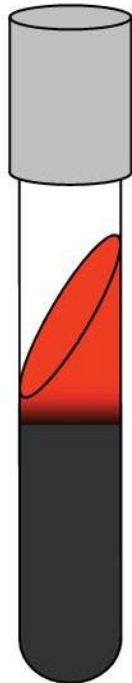


TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/AG H <sub>2</sub> S產生	(+)	(+, -, +)	(+)	(-)



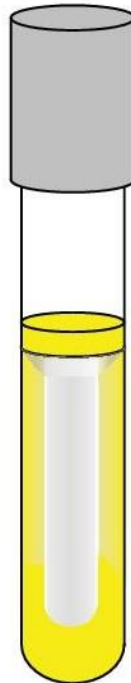
# 第1群

*Proteus mirabilis*



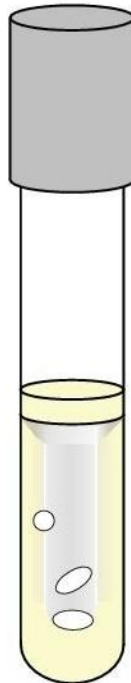
TSI

-/A  
H<sub>2</sub>S+



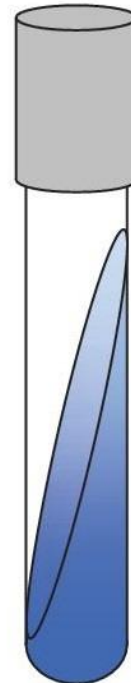
LIM

リジン-  
IND-  
MOT+



VP半流動

VP-  
GAS+

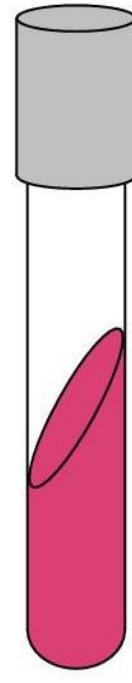


シモンズ  
クエン酸  
+



オルニチン

+



クリステン  
ゼン尿素  
+

# *P.mirabilis* (第1群)



# *P.vulgalis* (第1群)



# *P.mirabilis* (第1群) *P.vulgalis*



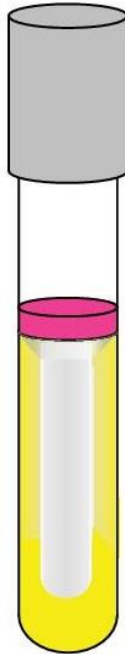
# 第1群

*Morganella morganii*



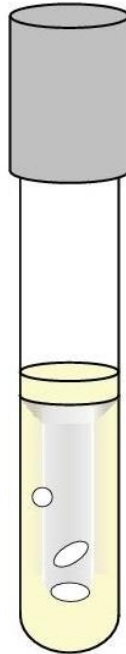
TSI

-/A  
H<sub>2</sub>S-



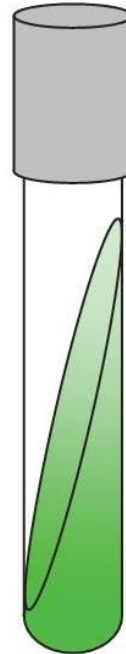
LIM

リジン-  
IND+  
MOT+



VP半流動

VP-  
GAS+

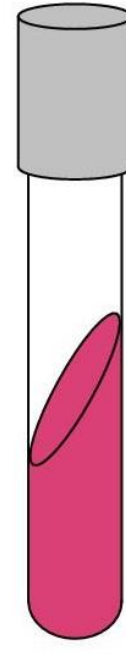


シモンズ  
クエン酸  
-



オルニチン

+



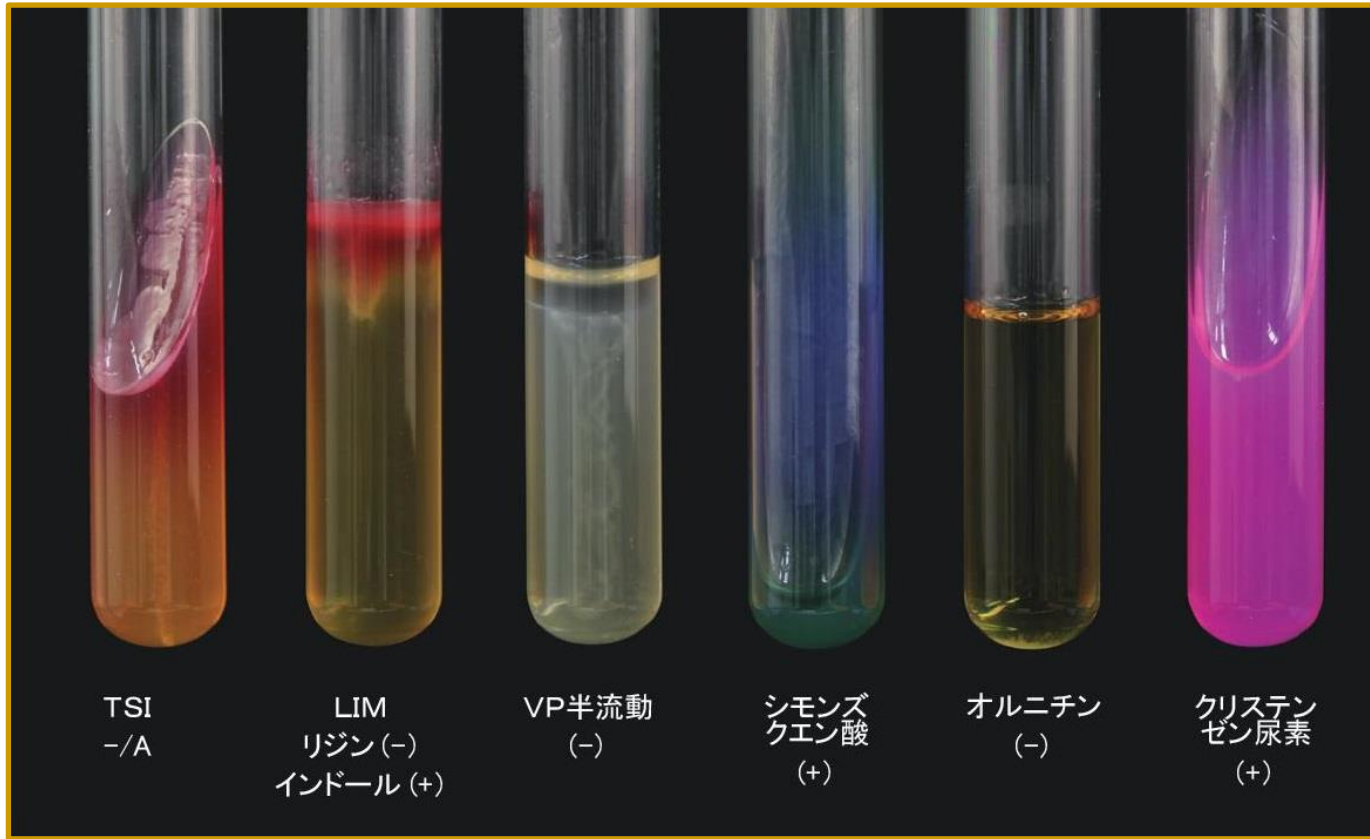
クリステン  
ゼン尿素  
+

# *M.morganii* (第1群)





# *P. rettgeri* (第1群)



# *Providencia spp.* (第1群)



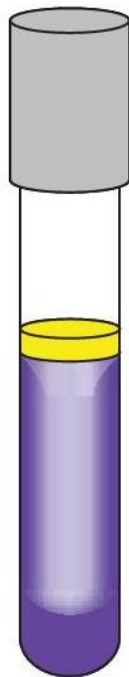
# 第2群

## *Salmonella Enteritidis*



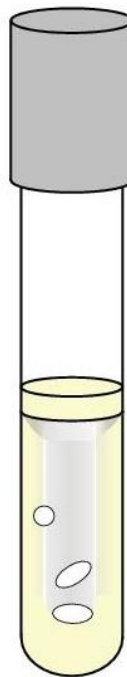
TSI

-/AG  
H<sub>2</sub>S+



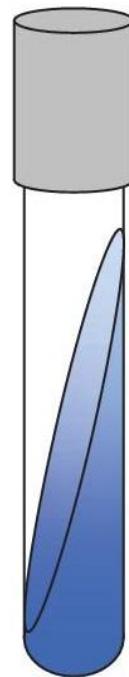
LIM

リジン+  
IND-  
MOT+



VP半流動

VP-  
GAS+



シモンズ  
クエン酸  
+



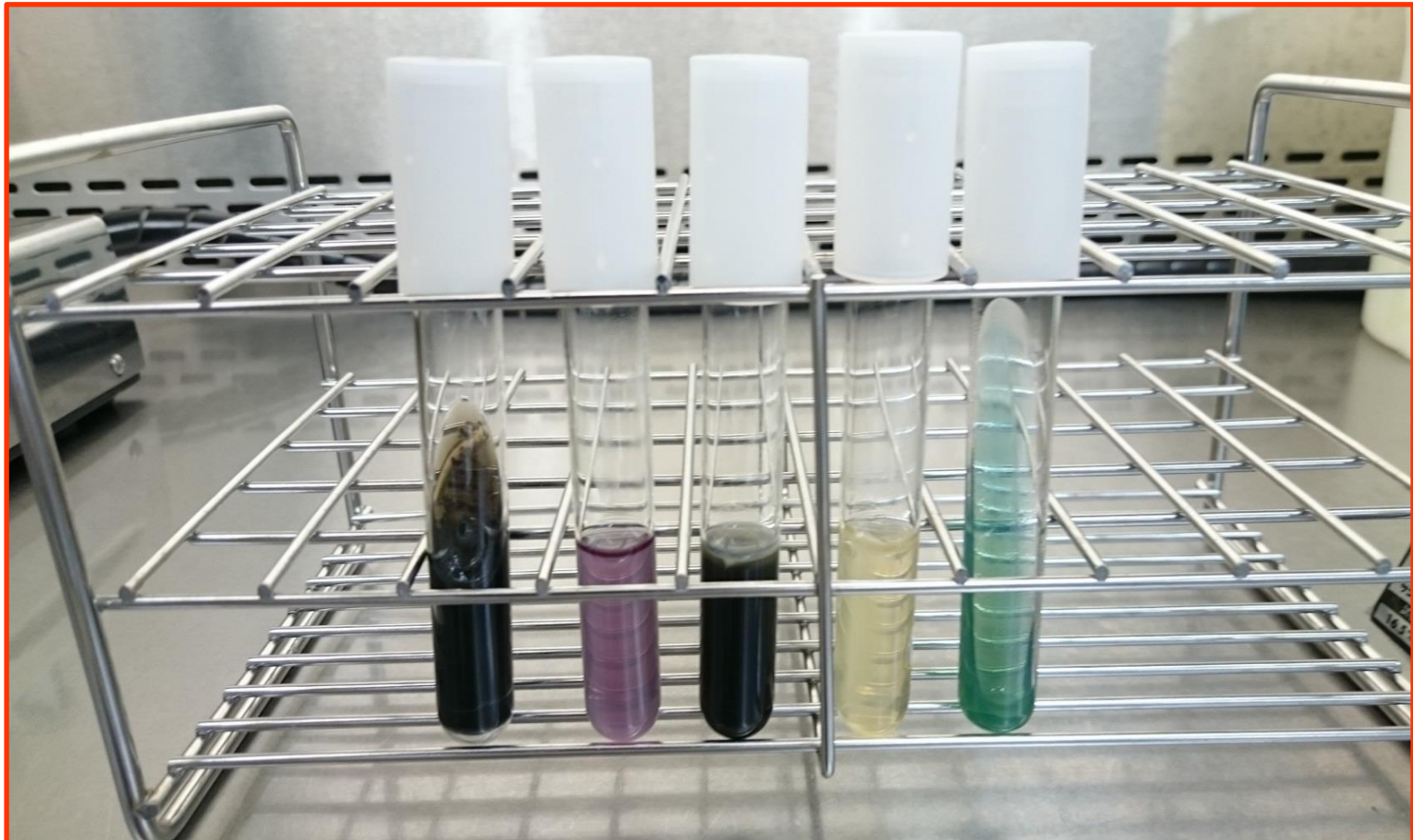
オルニチン

+

# *S. Enteritidis* (第2群)



# ***S. Enteritidis* (第2群)**





# 第2群

*Salmonella Typhi* (チフス菌)



TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/A H <sub>2</sub> S 産生	(-)	(+, -, +)	(+)	(-)

*Salmonella Paratyphi A* (パラチフスA菌)

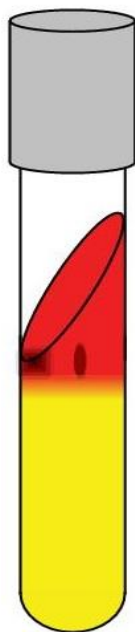


TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/A	(-)	(-, -, +)	(-)	(-)



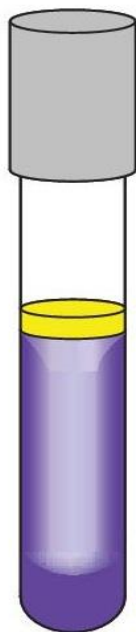
# 第2群

## *Salmonella Typhi*



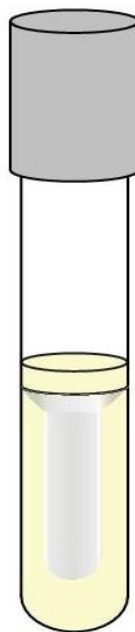
TSI

-/A  
H<sub>2</sub>S+



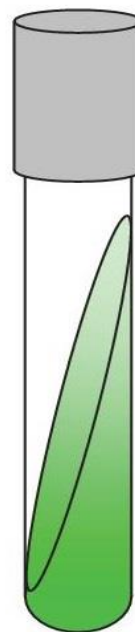
LIM

リジン+  
IND-  
MOT+

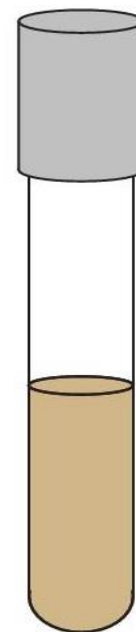


VP半流動

VP-  
GAS-  
MOT+



シモンズ  
クエン酸  
-



オルニチン

-

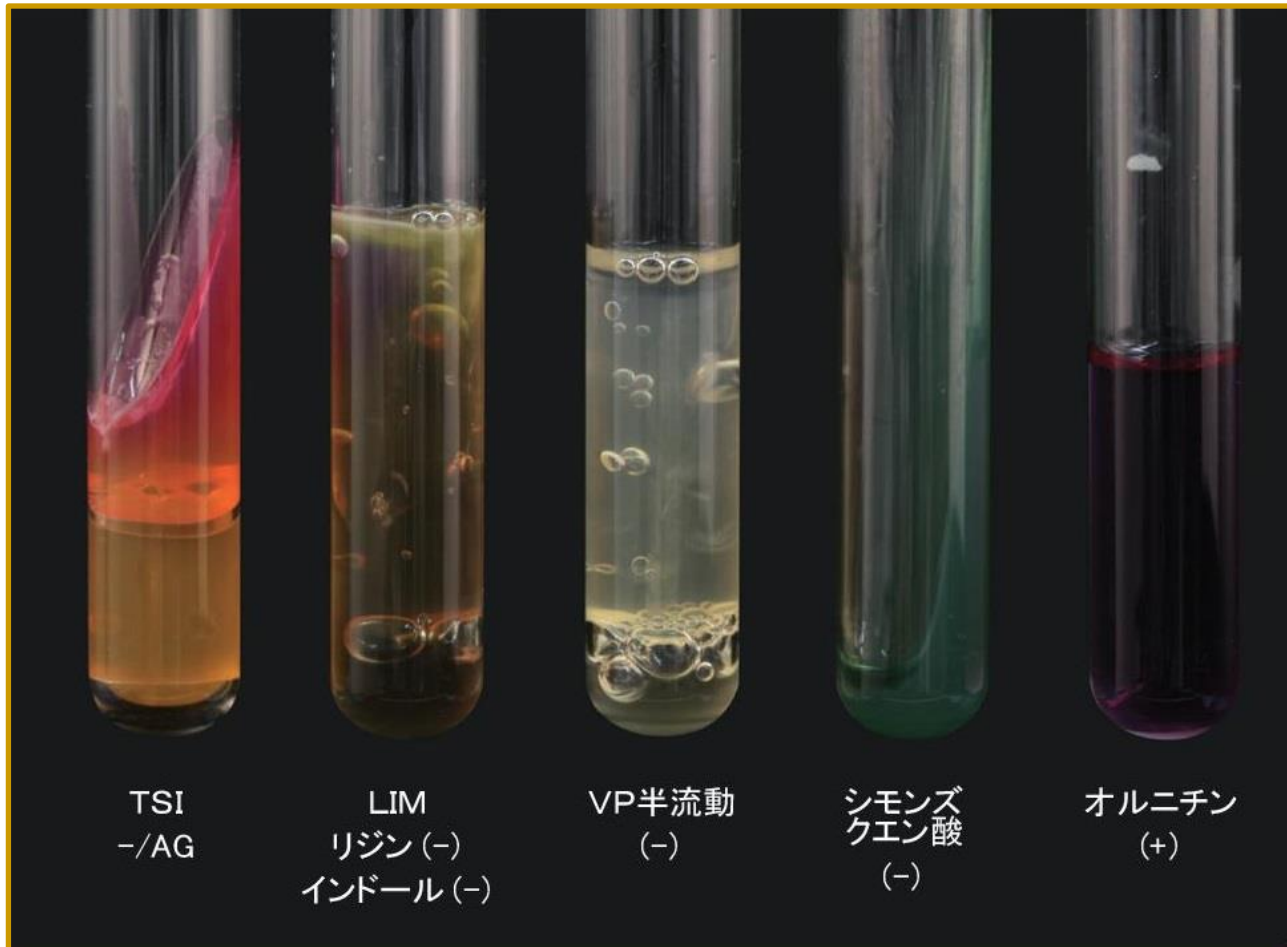
# *S. Typhi* (第2群)



# *S. Typhi* (第2群)

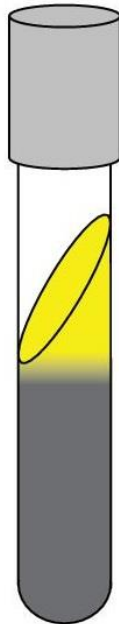


# *S. Paratyphi* A (第2群)



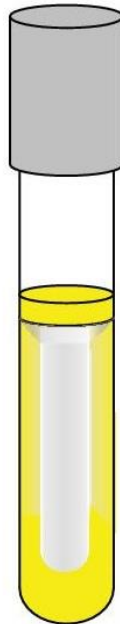
# 第2群

*Citrobacter freundii*



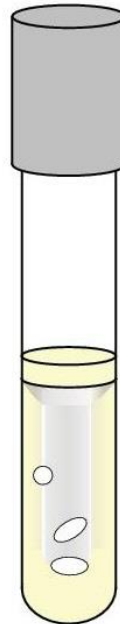
TSI

A/A  
H<sub>2</sub>S+



LIM

リジン-  
IND-  
MOT+



VP半流動

VP-  
GAS+



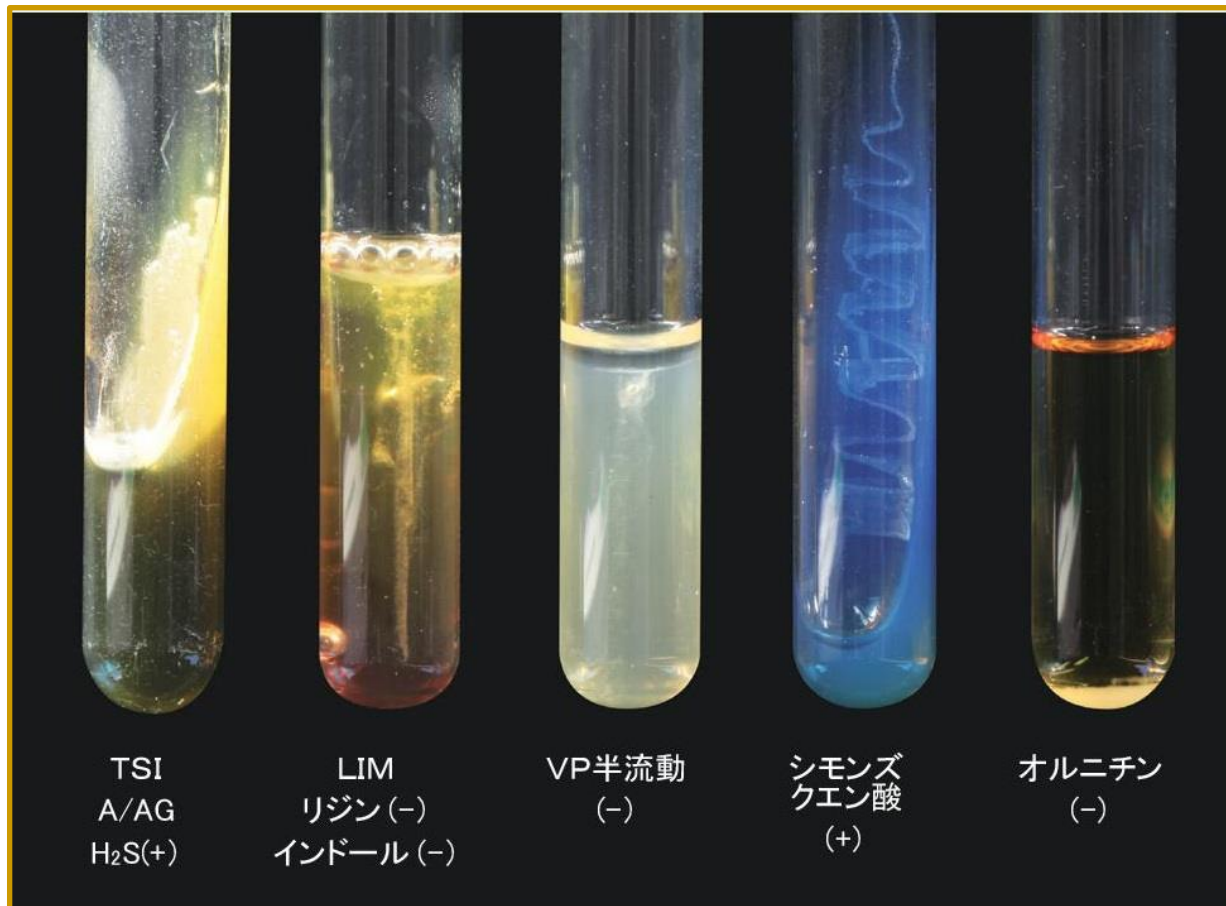
シモンズ  
クエン酸  
+



オルニチン

-

# *C. freundii* (第2群)





# 第3群

*Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)



TSI	SC	SIM	LIM	VP
A/AG	(+)	(-, -, -)	(+)	(+)

# 第3群

*Serratia marcescens*

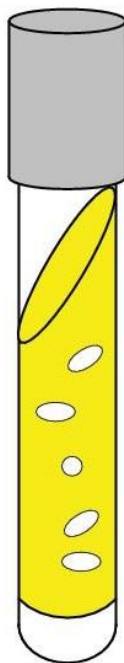


TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/A	(+)	(-, -, +)	(+)	(+)



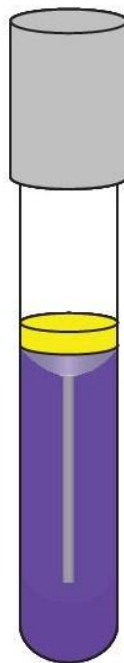
# 第3群

*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*



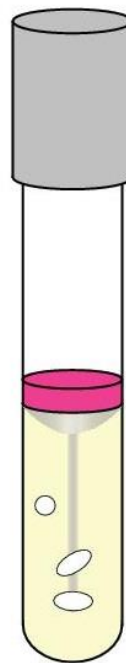
TSI

A/AG  
H<sub>2</sub>S-



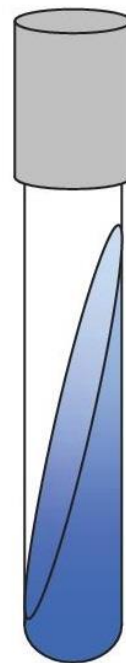
LIM

リジン+  
IND-  
MOT-



VP半流動

VP+  
GAS+



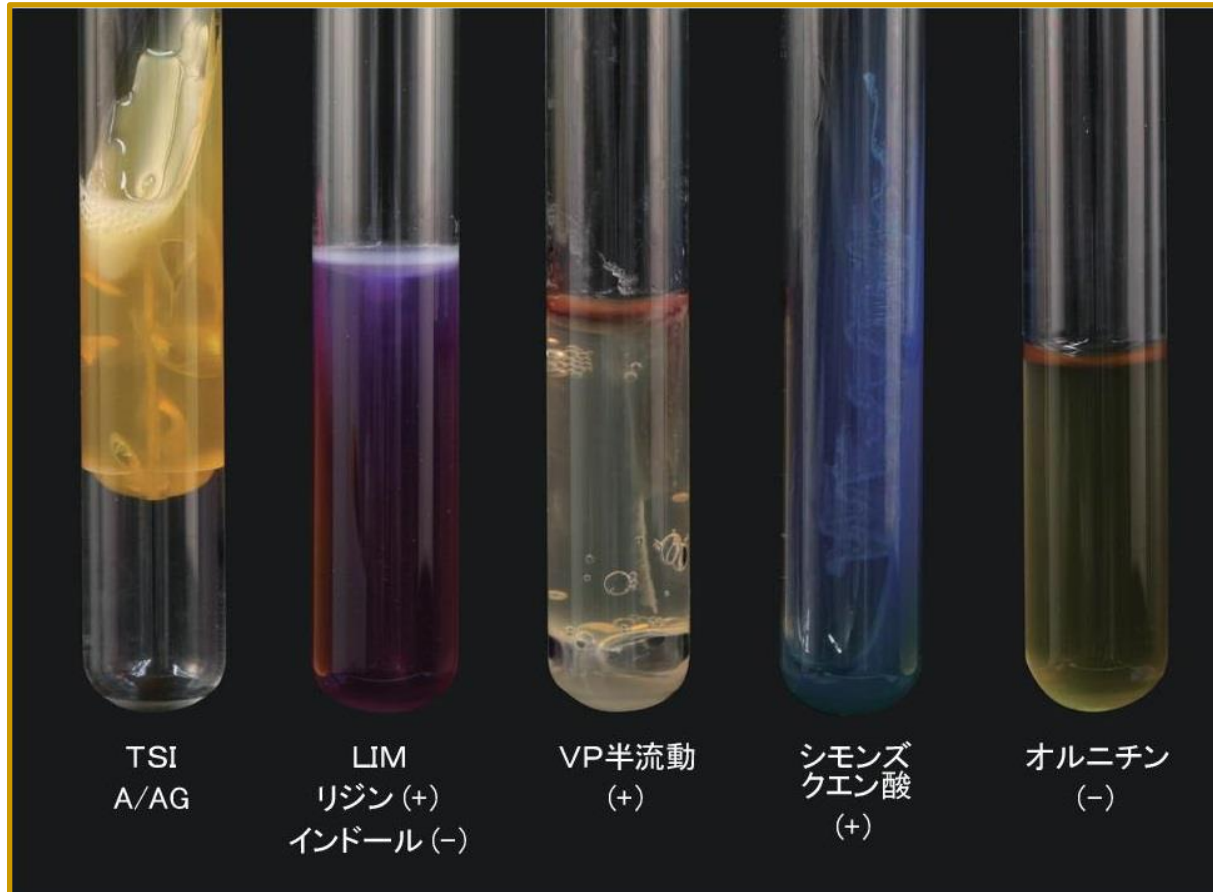
シモンズ  
クエン酸  
+



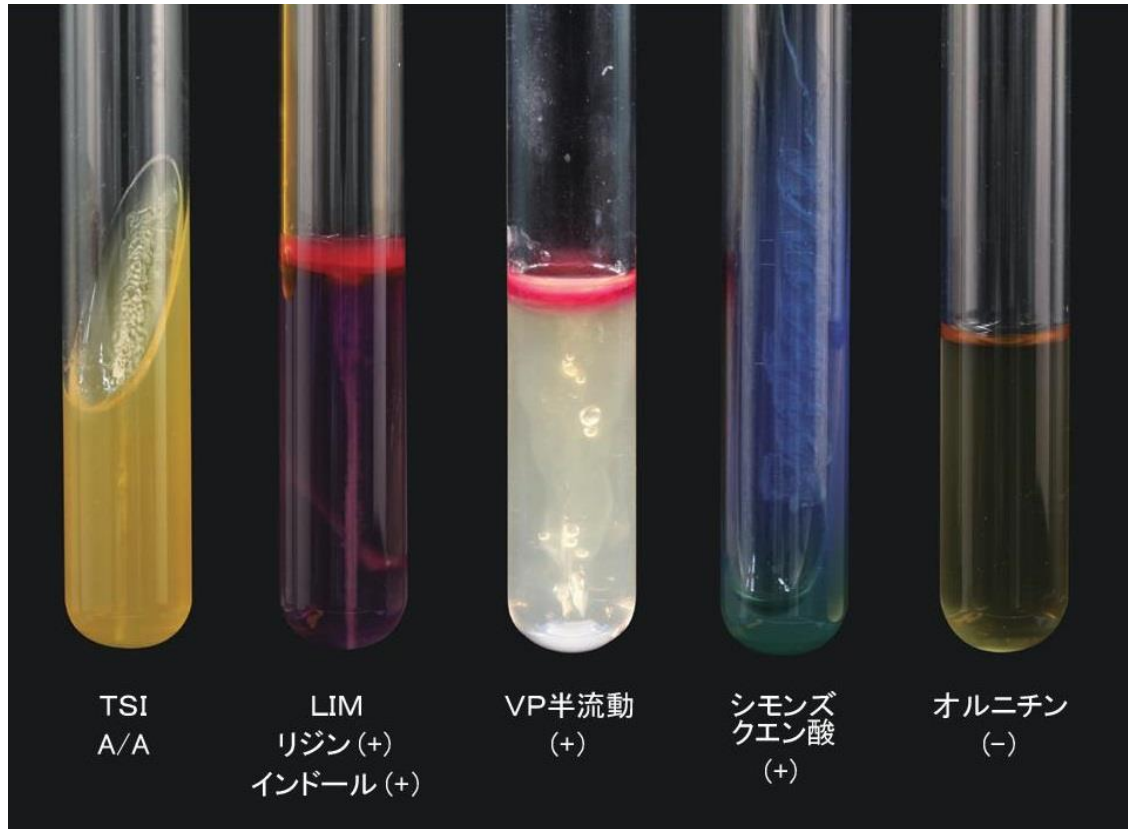
オルニチン

-

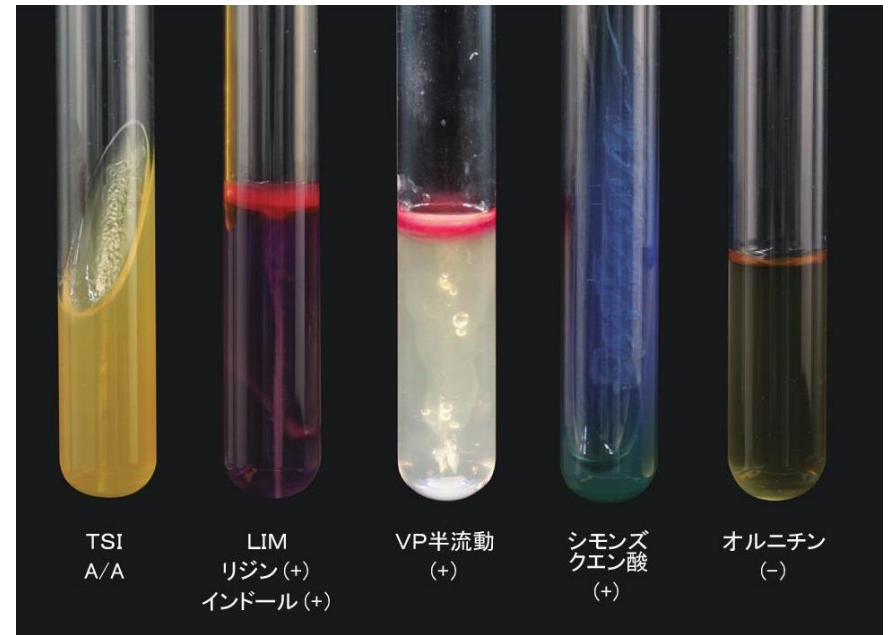
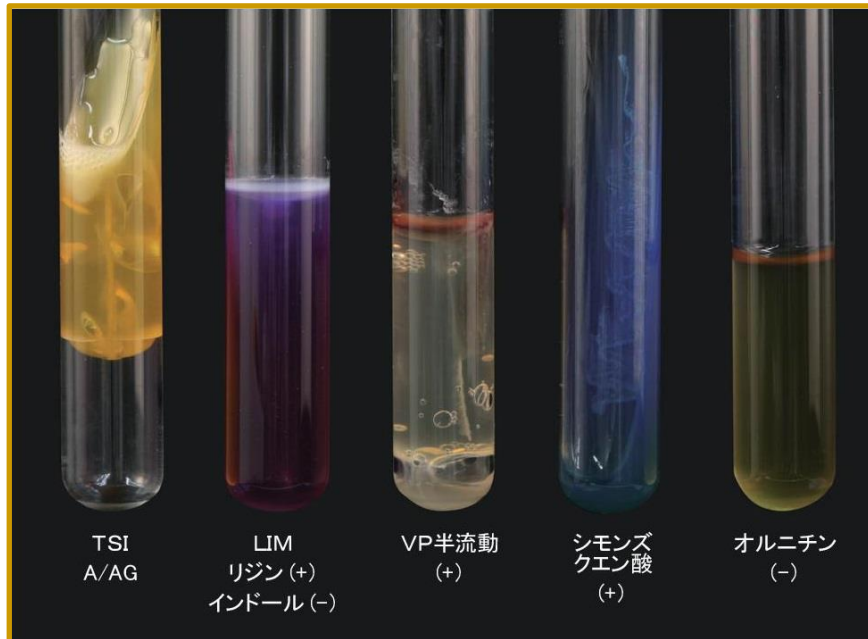
# *K.pneumoniae* (第3群)



# *K. oxytoca* (第3群)

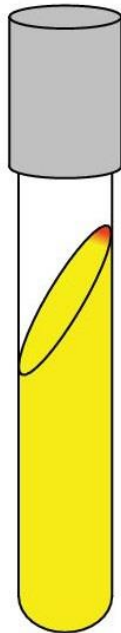


# *K.pneumoniae* (第3群) *K.oxytoca*



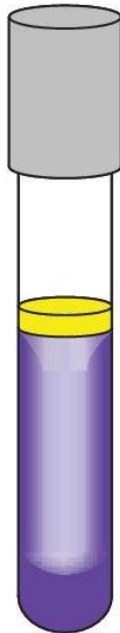
# 第3群

*Serratia marcescens*



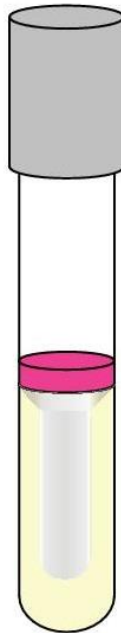
TSI

A/A  
H<sub>2</sub>S-



LIM

リジン+  
IND-  
MOT+



VP半流動

VP+  
GAS-  
MOT+



シモンズ  
クエン酸  
+



オルニチン

+



DNA

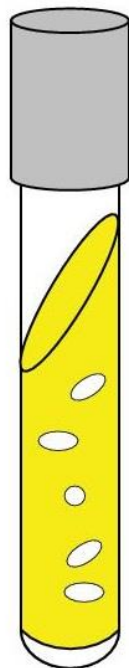
+

# *S.marcescens* (第3群)



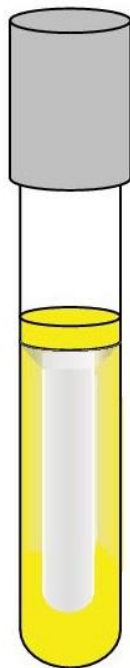
# 第3群

*Enterobacter cloacae*



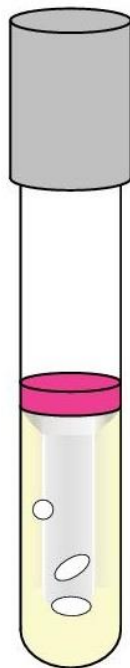
TSI

A/AG  
H<sub>2</sub>S-



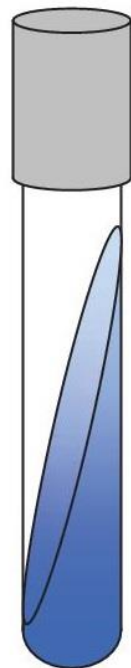
LIM

リジン-  
IND-  
MOT+



VP半流動

VP+  
GAS+



シモンズ  
クエン酸  
+



オルニチン

+



# *E. cloacae* (第3群)



# 第4群

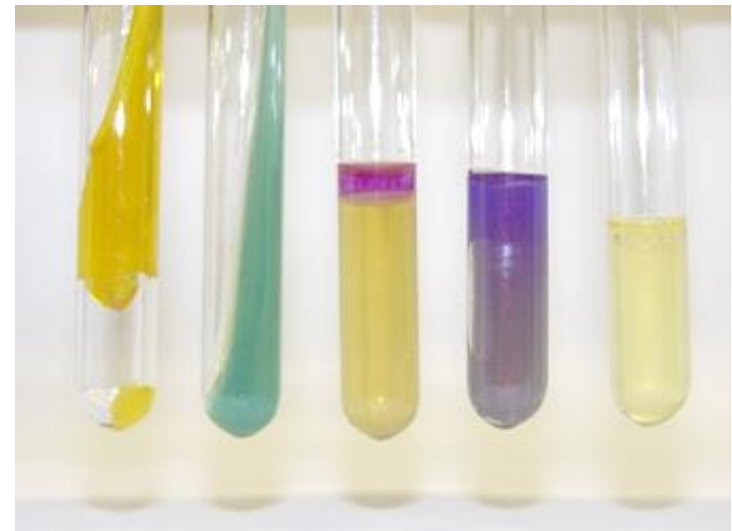
*Shigella spp.*



TSI	SC	SIM	LIM	VP
-/A	(-)	(-, -, -)	(-)	(-)

# 第4群

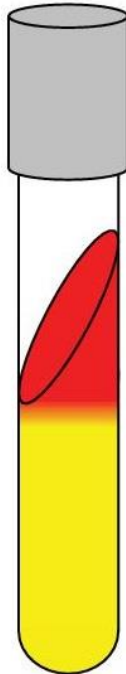
*Escherichia coli* (大腸菌)



TSI	SC	SIM	LIM	VP
A/AG	(-)	(-, +, +)	(+)	(-)

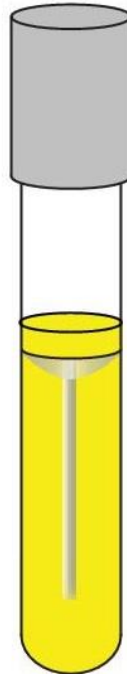
# 第4群

*Shigella dysenteriae*



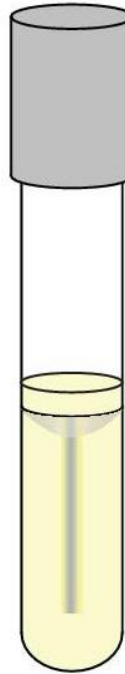
TSI

-/A  
H<sub>2</sub>S-



LIM

リジン-  
IND-  
MOT-



VP半流動

VP-  
GAS-  
MOT-



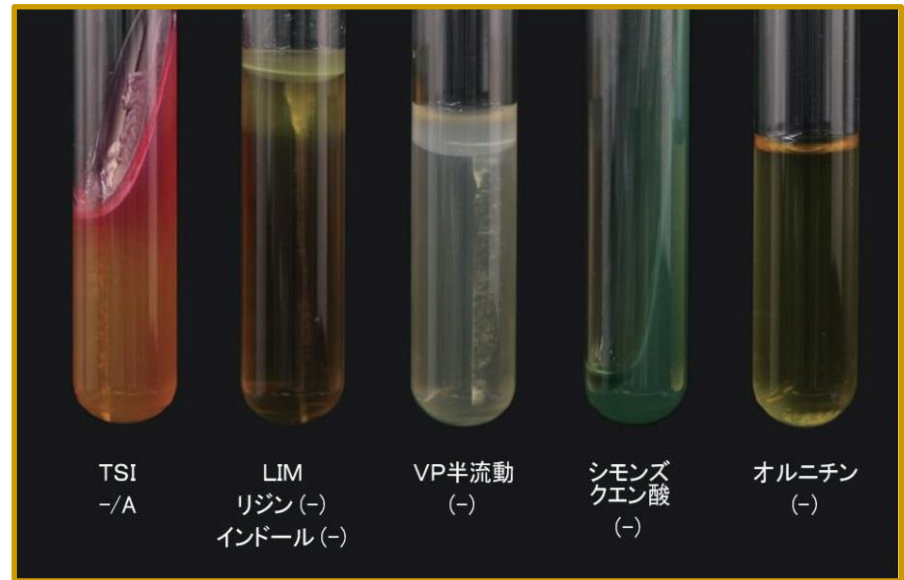
シモンズ  
クエン酸  
-



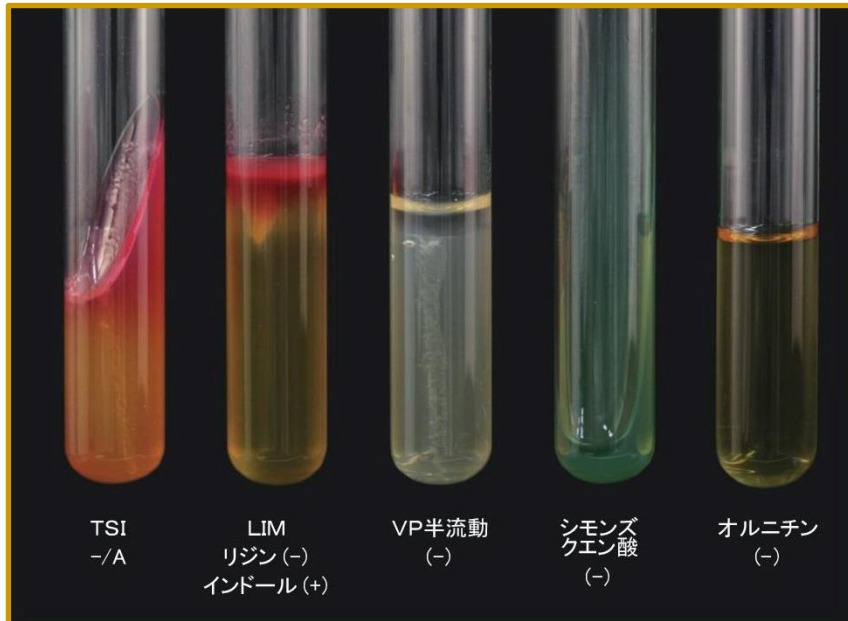
オルニチン

-

# *S.boydii* (第4群) *S.dysenteriae*

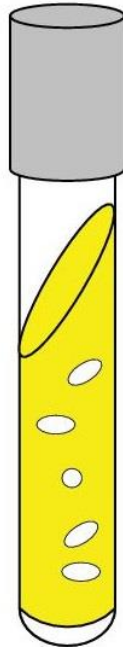


# *S.flexineri* (第4群) *S.sonnei*



# 第4群

*Escherichia coli*



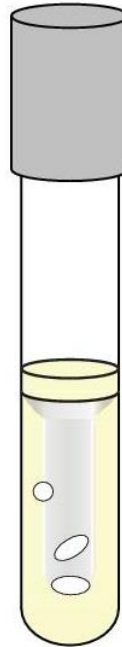
TSI

A/AG  
H<sub>2</sub>S-



LIM

リジン+  
IND+  
MOT+



VP半流動

VP-  
GAS+



シモンズ  
クエン酸  
-



オルニチン

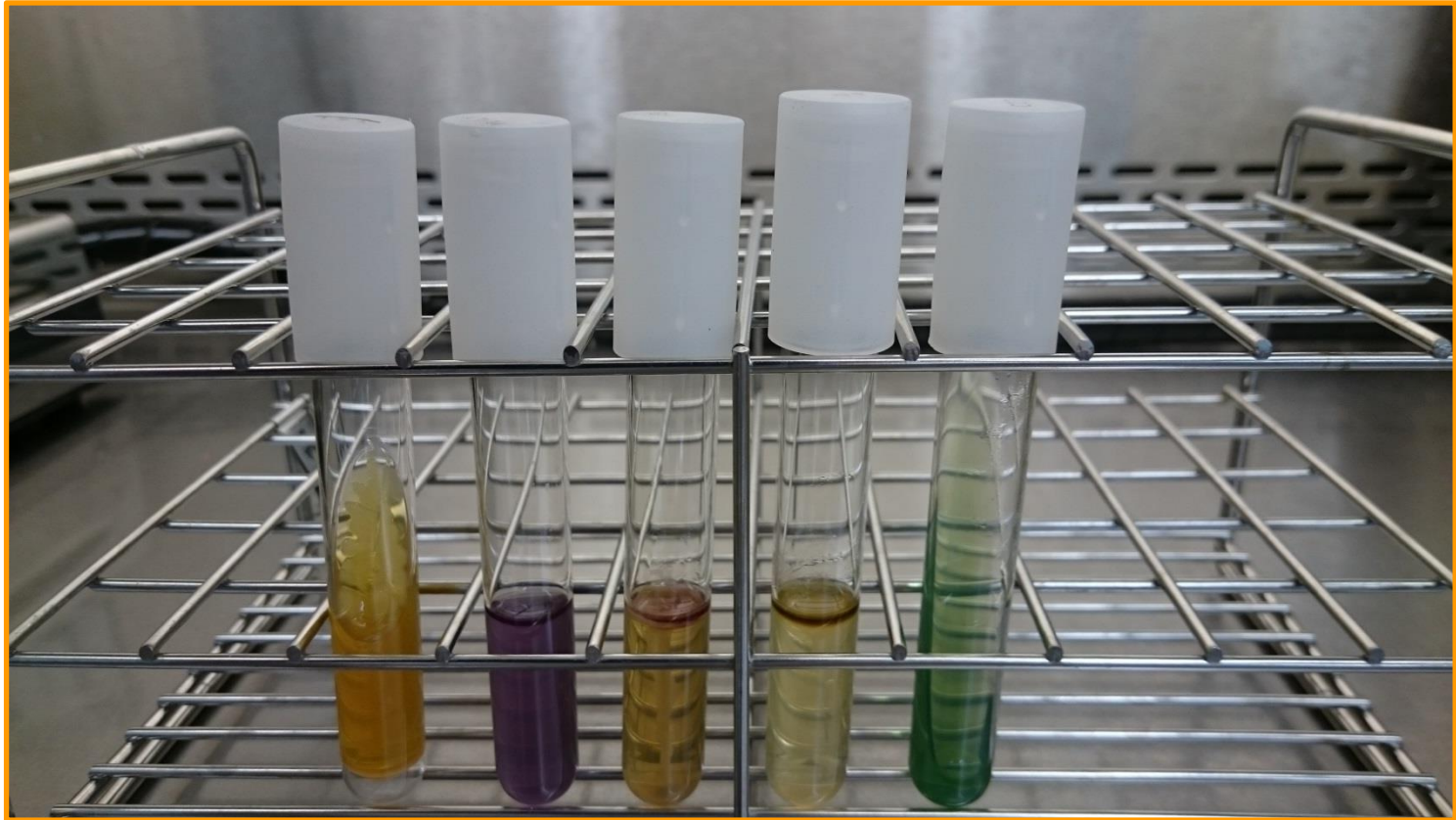
+

# *E.coli* (第4群)





# *E.coli* (第4群)



# *P.shigelloides* (第4群)



# コロニーからの菌種推定注意点

- 同一菌種でも菌株毎に個性があり、典型的な性状(集落形成・糖分解など)異なる場合がある。
- 典型的な糖利用能や生化学陽性反応が陰性化する事があっても陽転化は起こらない。  
(乳糖分解菌種の中に乳糖非分解は存在するが、乳糖非分解菌で乳糖分解菌は存在しない)

# 同定における注意点

- ① 硫化水素産生したからといってすぐサルモネラと判断しない。リジン確認。
- ② 自動細菌検査装置では赤痢菌と同定するときがある。焦って報告しない。
- ③ 病原大腸菌を初代分離の培地の色だけで判断しない。(色素を産生する培地)
- ④ 腸内細菌はオキシダーゼ(－)であるが、唯一 *Plesiomonas shigelloides* は(＋)

# まとめ

- ✧ 塗抹顕鏡では菌種の一部は推定できるが全般的に難しい。
- ✧ 多くの選択培地を組み合わせで菌種の推定が可能な場合がある。
- ✧ 自動細菌検査装置の結果に全て頼らない。

# 結語

腸内細菌科の同定は、それぞれの菌種における基本的なパターンを覚える事が大切である。多くの菌を同定し、集落を睨みながら経験を重ねる事が重要である。



# ご清聴有難うございました。

## 参考文献

John G. Holt, et al: Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9th ed. Lippincott, Philadelphia, 2000

Patrick R, Murray, et al: Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 9Th ed. ASM Press, Washington DC, 2007

小栗豊子(編): 臨床微生物検査ハンドブック 第4版 三輪書店, 東京, 2011

日本臨床微生物学会: 腸管感染症検査ガイドライン. 日本臨床微生物学会誌, 第20巻,

日本臨床微生物学会, 2010

山中學, 吉野二男, 清水加代子(編): 新臨床検査技師講座11微生物学 第1版, 医学書院, 東京, 1986

栄研化学株式会社: 栄研マニュアル 第10版, 栄研化学株式会社, 東京, 1996

坂崎利一(編): 図解臨床細菌検査, 第2版, 文光堂, 東京, 2006

臨床検査学講座 第3版, 微生物学/臨床微生物学 医歯薬出版株式会社, 東京, 2012

栄研化学株式会社: 微生物検査ナビ 第2版, 栄研化学株式会社, 東京, 2016