

# 第3回 国臨協関信支部主催研修会

## － 血液培養検査について －

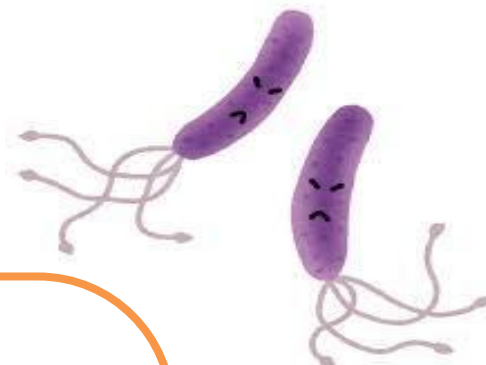


国立がん研究センター中央病院

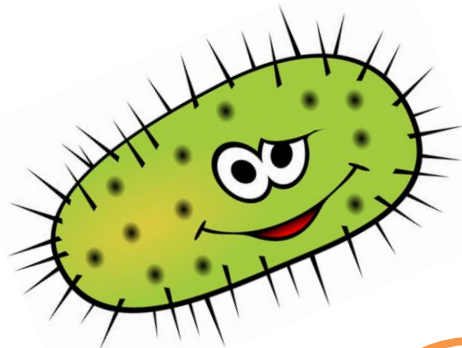
臨床検査部 荘司 路



## 本日の内容



1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応



1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応

# BACTEC 9000 & FX

## 日本ベクトンディッキンソン社

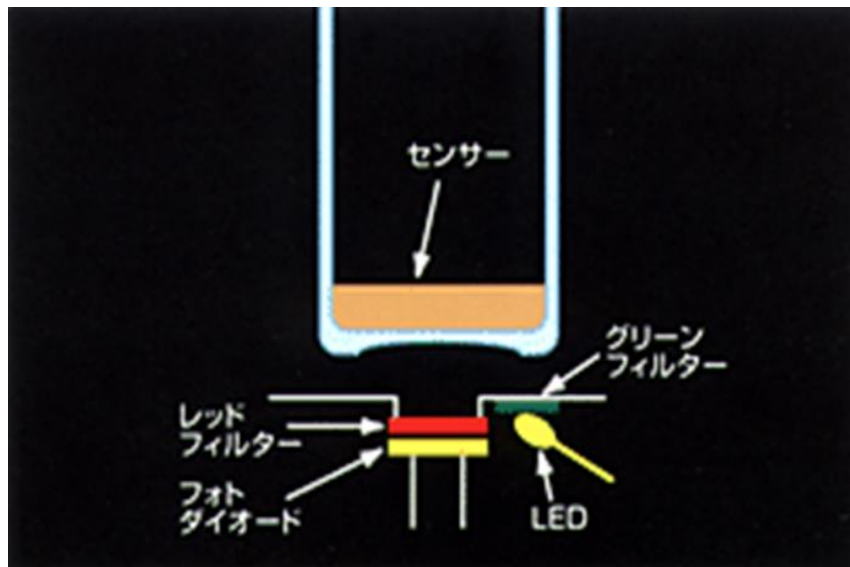


BacT/ALERT 3D & VIRTUO  
シスメックス ビオメリュー社

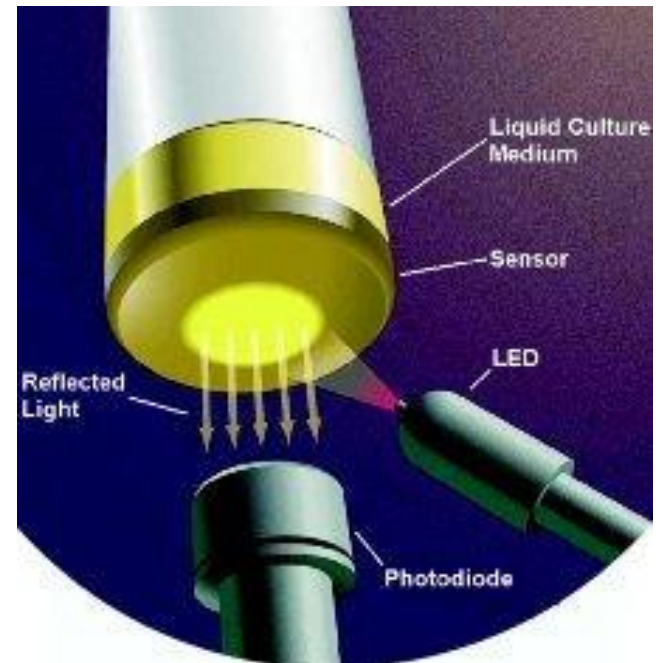


# 測定原理

## BACTEC



## BacT/ALERT



血液培養ボトルの底部の色調によるCO<sub>2</sub>センサー、インキュベータ・モジュールに装備されたLEDイルミネータと光ダイオード探知器から構成されている。



# VersaTREK システム ベックマン・コールター社

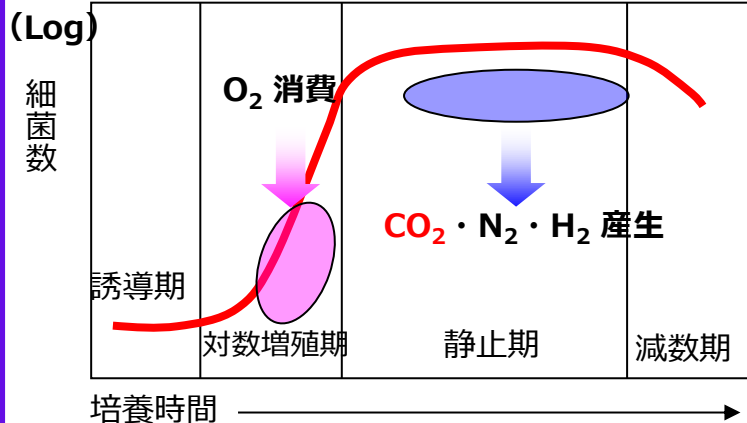


# 測定原理

## VersaTREK

ヘッドスペース部分に2ヶ所ある圧カトランスデューサが、 $O_2$ の消費と $CO_2$   $N_2$   $H_2$ 産生の圧力変動を感知

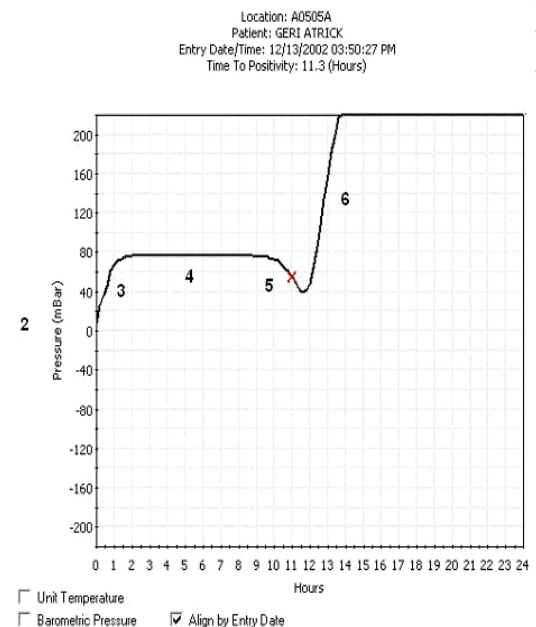
### 細菌の発育曲線



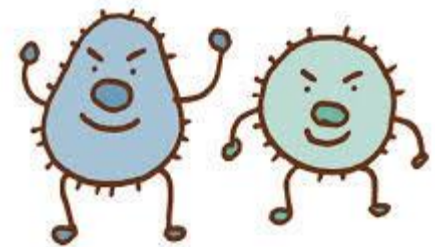
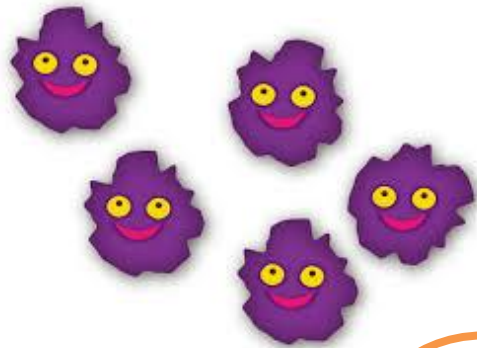
ヘッドスペース部分の $O_2$ 消費, $CO_2$ , $N_2$ , $H_2$ の産生に伴う圧力変動をボトル内圧センサーで感知しています。

ボトル内圧  
センサー

### ボトル内ガス圧変動グラフ

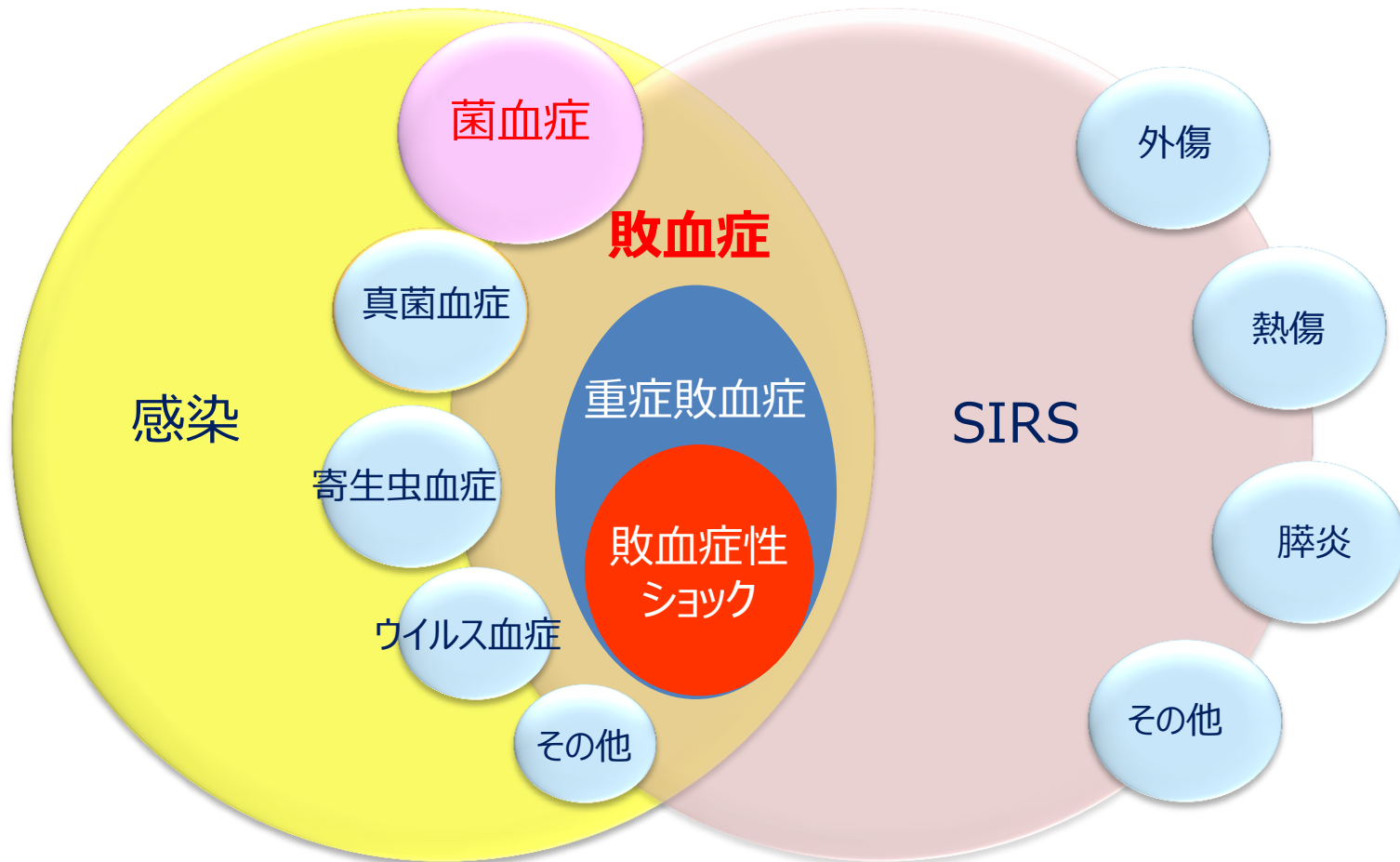






1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応

# 従来の敗血症の定義



# Systemic Inflammatory Response Syndrome

全身性

炎症

反応

症候群

体温  $> 38^{\circ}\text{C}$  or  $< 36^{\circ}\text{C}$



心拍数  $> 90$ 回/分



2つ以上満たすとSIRS

呼吸数  $> 20$ 回/分  
または  $\text{PaCO}_2 < 32\text{Torr}$

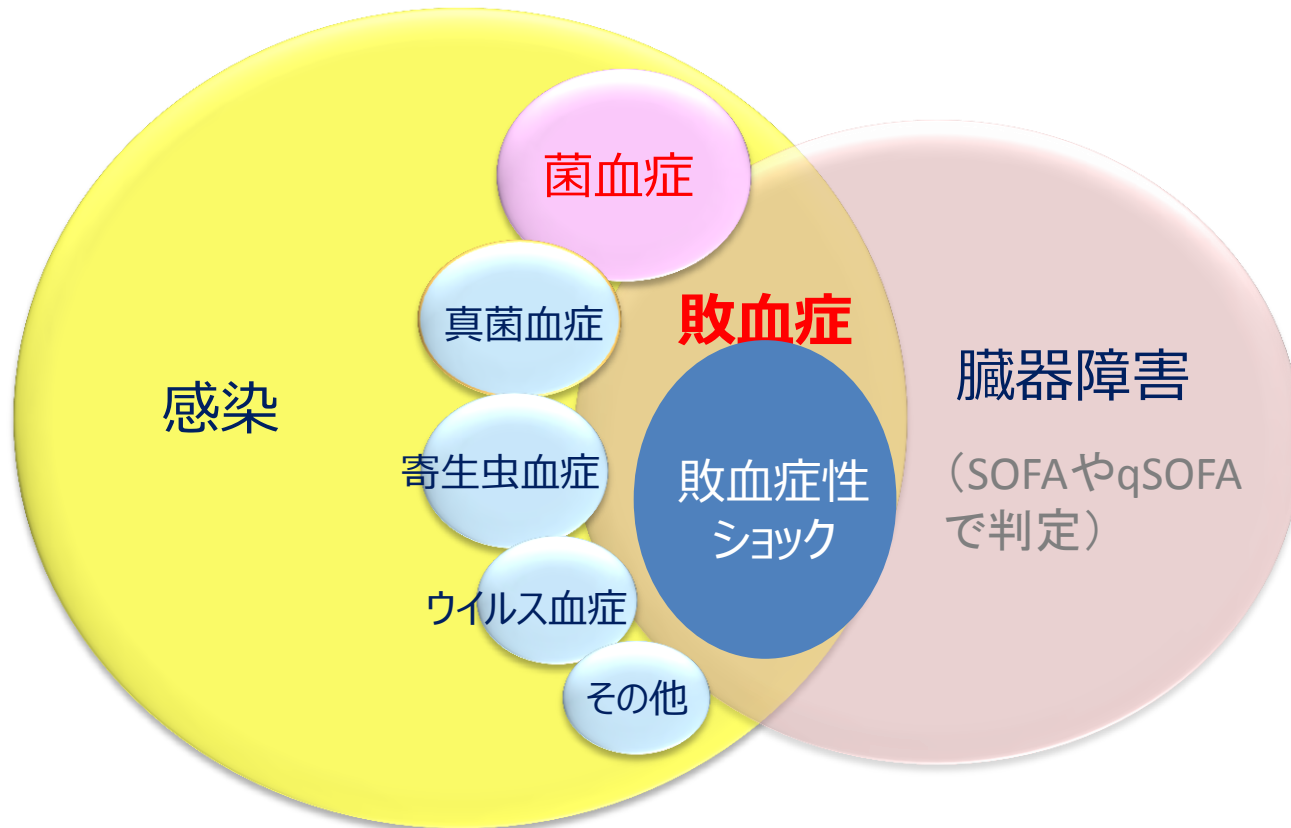


白血球数  
 $> 12,000/\mu\text{L}$   
または  $< 4,000/\mu\text{L}$   
あるいは  
未熟顆粒球  $> 10\%$

# 新しい敗血症の定義

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection.

感染による制御不能な宿主反応によって引き起こされる生命を脅かす**臓器障害**



Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)  
*JAMA* February 23, 2016 Vol. 315, No.8



National Cancer Center Hospital

# SOFAスコア

(sequential organ failure assessment)

	0	1	2	3	4
呼吸機能 PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	>400	≤400	≤300	≤200 +補助呼吸	≤100 +補助呼吸
凝固機能 血小板数(×10 <sup>3</sup> /μl)					
肝機能 ビリルビン値(mg/dL)					
循環機能 血圧低下					
中枢神経機能 GCS	15	13-14	10-12	6-9	<6
腎機能 クレアチニン値(mg/dL) or 尿量(mL/day)	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 <500mL/day	>5.0 <200mL/day

新しい敗血症の診断基準

ICU

感染が疑われ、SOFAスコアが2点以上増加

Crit Care Med 1998 : 26 より改変



## quick SOFAスコア

### スクリーニングツール

ICU以外（一般病棟、救急外来など）

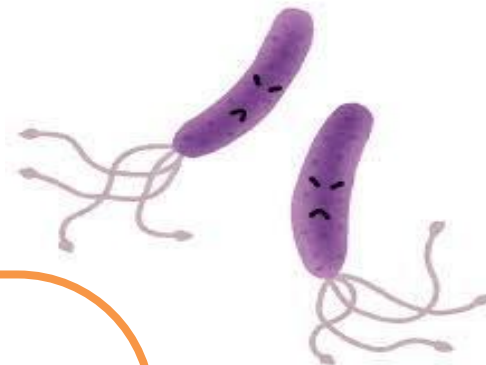
感染が疑われ、quick SOFAが2点以上

（3項目各1点）

Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)  
**JAMA** February 23, 2016 Vol. 315, No.8







1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応

## 血液培養を行う目的

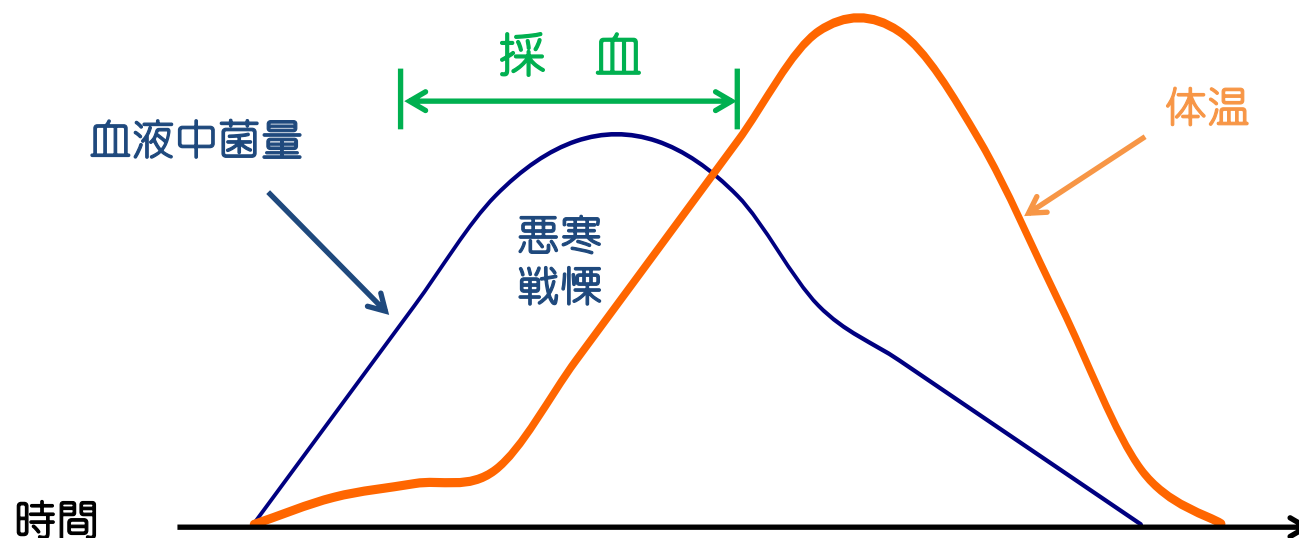
血液培養検査は、適切な感染症診療を行ううえで最も重要な検査として位置づけられている。

検査室からの血液培養陽性報告は、患者の治療方針に  
直接影響を及ぼす可能性があるので迅速に！！

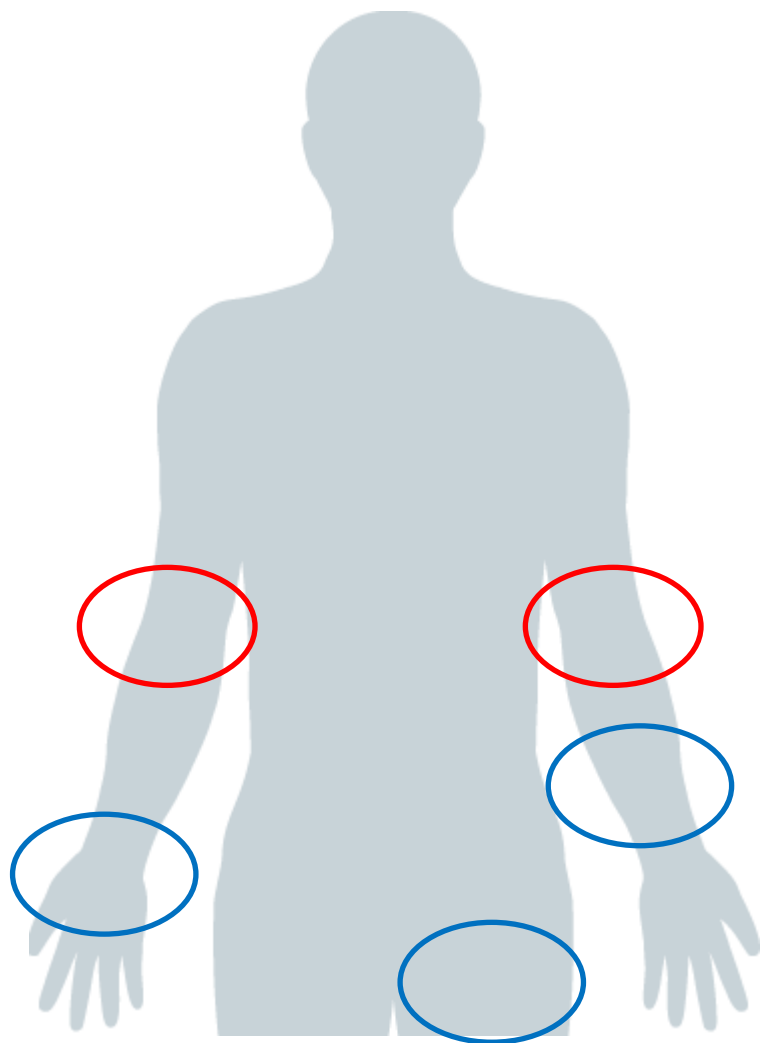
# 採血のタイミング

採血は、抗菌薬投与前に実施するのが原則である。抗菌薬投与が開始されてしまった場合は、血液中の抗菌薬濃度が最も低い時期（次回、抗菌薬投与前）に採血を実施する。

採血のタイミングは、血流中の細菌量が最も多いとされる、悪寒戦慄が出現時や発熱の初期が最適である。



# 採血部位について



- 血液培養は**上肢の静脈**から行うことが推奨されている。
- 末梢に点滴ラインなどが入っている場合は一方の手の2箇所やカテーテルラインから採血することも可能である。
- 鼠蹊部からの採血は、腸球菌や腸内細菌が混入する危険性もありあまり推奨されていない。

# 採血の準備



- 70%アルコール綿（イソプロパノールまたはエタノール）
- 1～2%ヨードチンキ、あるいは、10%ポビドンヨード液
- シリンジ又は翼状針
- 駆血帯
- 血液培養ボトル2セット
- 手袋、マスク
- 針捨てボックス

## 血液培養ボトルの消毒

血液培養ボトルのフリップキャップを取り外し、ゴム栓の部分を  
アルコールで消毒。（ゴム栓部分は無菌ではないよ！！）





# 採血部位の消毒



→ 皮脂や蛋白汚れを落とし、消毒効果を高めるためアルコールで広範囲にごしごし消毒する。  
ゴシゴシと消毒したアルコール綿に汚れが確認された場合は新しいアルコール綿でもう一度消毒しましょう。

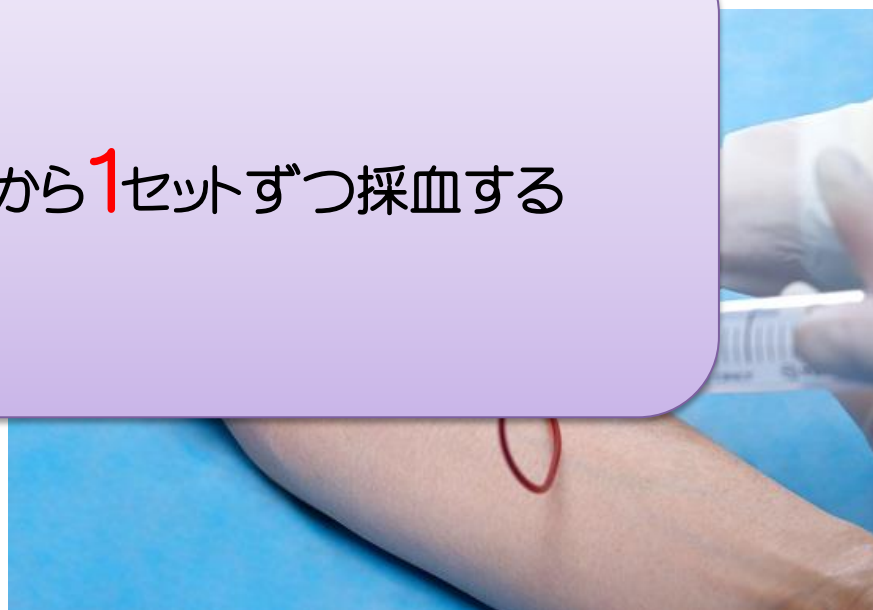


→ 1～2%ヨードチンキまたは、10%ポピドンヨードを使用する場合はたつぷりと塗布する。  
消毒薬が最大限に効果を引き出すためには、1.5～2 分の時間を要する。最近は、クロルヘキシジンアルコール製剤による消毒が優れているとの報告もある。乾くことが重要ではなく作用させることが重要である。

# 採 血



異なる2箇所から1セットずつ採血する



# 血液培養ボトルへの注入



→ ボトルに**適量**の血液を注入する

好気用・嫌気用レズンボトル：8～10mL

小児用レズンボトル：1～3mL

真菌・抗酸菌ボトル：3～5mL

→ 嫌気ボトルに空気を入れないようにする

→ 注入時に針は交換しない

(写真のように**安全器材**を用いると針刺し  
のリスクを軽減することができます。)

→ 注入後は凝固防止のため、静かに混和する



## 複数セット採取する目的は何？

- ➡ 血液採取量が増えることにより検出率が向上する。  
1セット20mL (各ボトル10mL)

BD BACTEC™ 血液培養自動分析装置によるセット数と検出率の研究



Cockerill, F. R., J. W. Wilson, E. A. Vetter, K. M. Goodman, C. A. Torgerson, W. S. Harmsen, C. D. Schleck, D. M. Ilstrup, J. A. Wshington II, and W. R. Wilson. 2004. Optimal testing parameters for blood cultures. Clin. Infect. Dis. 38: 1724-1730.

## 複数セット採取する目的は何？

- ➡ 培養陽性時に皮膚常在菌などのコンタミネーションが考えられる菌種が分離された場合の解釈に必要



4本中1本のみが陽性

コンタミネーション



# 陽性時の確認事項

## →陽性ボトルの本数

起炎菌なのかコンタミネーションなのかの判断

## →陽性ボトルの種類

好気・嫌気が陽性：腸内細菌や *Staphylococcus* 属などの通性嫌気性菌

好気のみ陽性：緑膿菌をはじめブドウ糖非発酵菌の多くや酵母様真菌

嫌気のみ陽性： *Bacteroides* 属や *Clostridium* 属などの嫌気性菌

## →陽性までの時間

真の菌血症が疑われる患者の血液中の細菌量は、血液培養採取時に混入する菌量に比べるとはるかに多く存在し、95～97%が培養開始から約3日で陽性となることが多い。



## 陽性時の確認事項

カテーテル関連血流感染を疑う場合、末梢採血とカテーテル採血との陽性までの時間の差を見てカテーテル関連血流感染か否かを判断をしている

カテーテル採取血培	発育	発育	発育	発育	未発育	未発育
末梢静脈採取血培	発育	発育	発育	未発育	発育	未発育
検出菌の状態	同一菌	同一菌	同一菌	—	S.aureus又は Candida spp.	—
陽性までの時間差	—	カテーテル採取 が2時間以上早く 陽性	双方の陽性時間 差は2時間以内	—	—	—
他の感染部位の存在	なし	—	—	—	なし	—
判定	CR-BSIを示唆	CR-BSIを示唆	CR-BSIの 可能性	コロナイゼーション 又は雑菌汚染	CR-BSIを示唆カ テーテル培養か 末梢血の血培で 同一菌を証明する	CR-BSI否定的

# 陽性時の確認事項

## →陽性ボトルの外観



### ガス産生

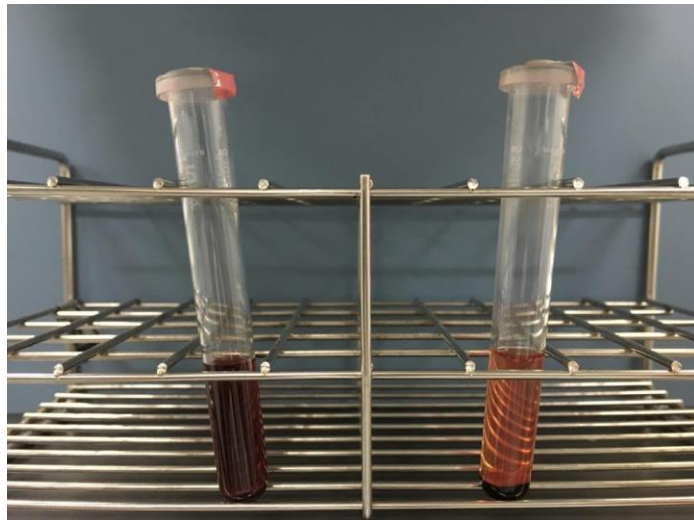
腸内細菌、嫌気性菌

### 溶血

溶連菌、肺炎球菌、  
*Clostridium*、*Bacillus*

### 混濁

グラム陰性桿菌  
*Staphylococcus*属



## 陽性時の確認事項

### → 血液培養と同時期に実施している他の培養検査結果の確認

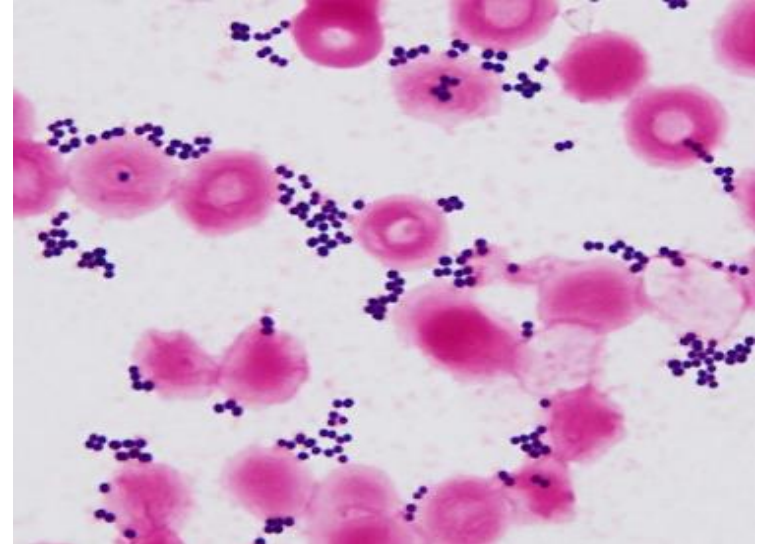
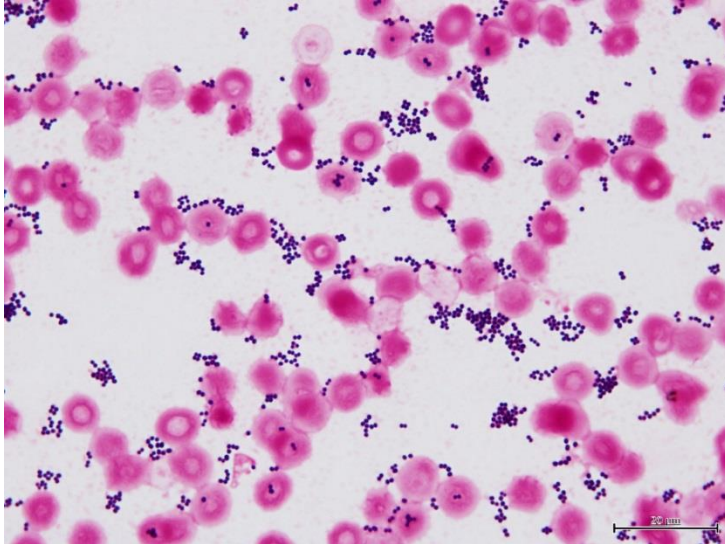
血液培養が陽性となる患者さんは、すでに症状が出ていることが多く、同時期に他の検査材料が提出されていることが多い。

どこが感染のフォーカスなのかを判断する重要な情報なので、必ず他の培養結果を確認しあわせて報告する。

(培養検査結果だけでなく、生化学検査、

一般検査の結果も確認するといいいよ！！)

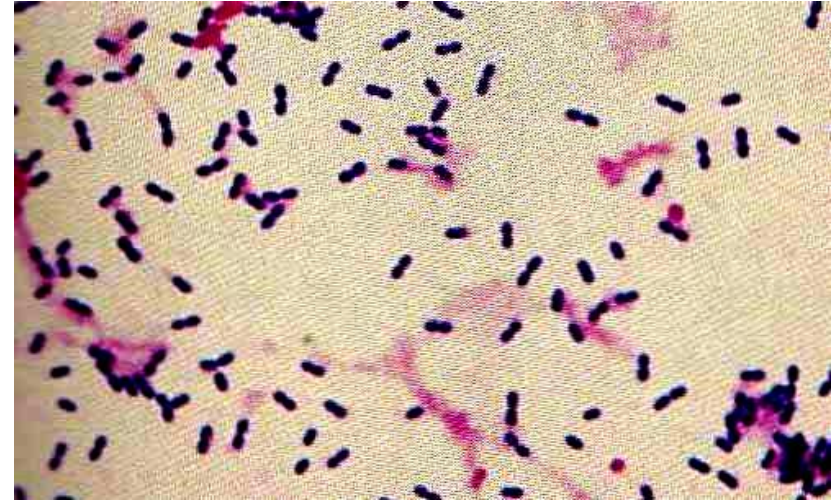
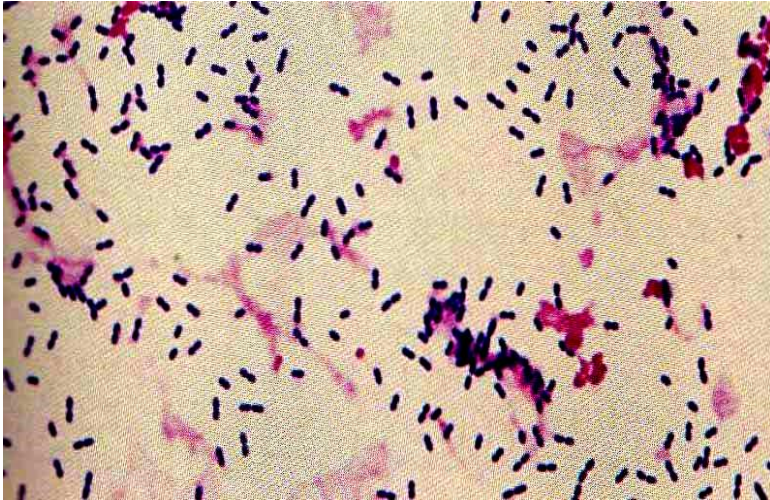
## 陽性時の中間報告



〇〇日採取の血液培養2セットからグラム陽性球菌が、検出されました。染色形態から *Staphylococcus* 属が疑われます。同日に提出されたカテーテル培養からは *S. epidermidis* が検出されています。



## 陽性時の中間報告



〇〇日採取の血液培養からグラム陽性双球菌が、検出されました。  
染色形態から肺炎球菌が疑われます。採尿が可能な患者様であれば、  
『尿中肺炎球菌抗原検査』の実施をお薦めします。

## 分離菌種

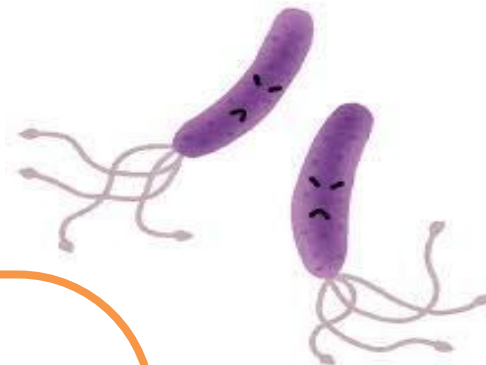
- ➡ *Coagulase-negative Staphylococci*(CNS)、  
*Corynebacterium* spp.、*Propionibacterium* spp.、  
などの皮膚の常在菌や*Bacillus* spp.など環境由来菌は、  
血液培養を汚染させる代表的な菌種である。
- これらの菌種の中でもCNSは、カテーテル関連血流感染症の代表的な起因菌として知られており、真の血流感染症を引き起こすこともあるので起因菌か否かの判断は、慎重に行う必要がある。



## 分離菌種

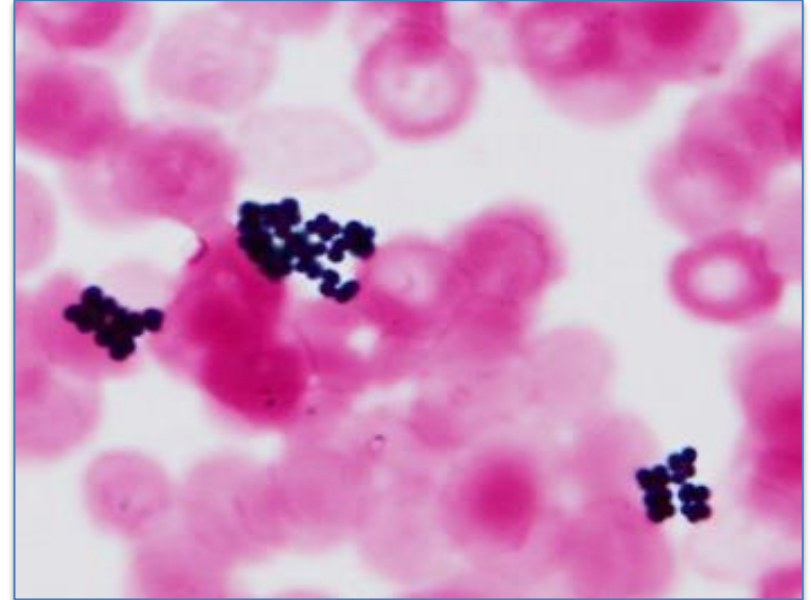
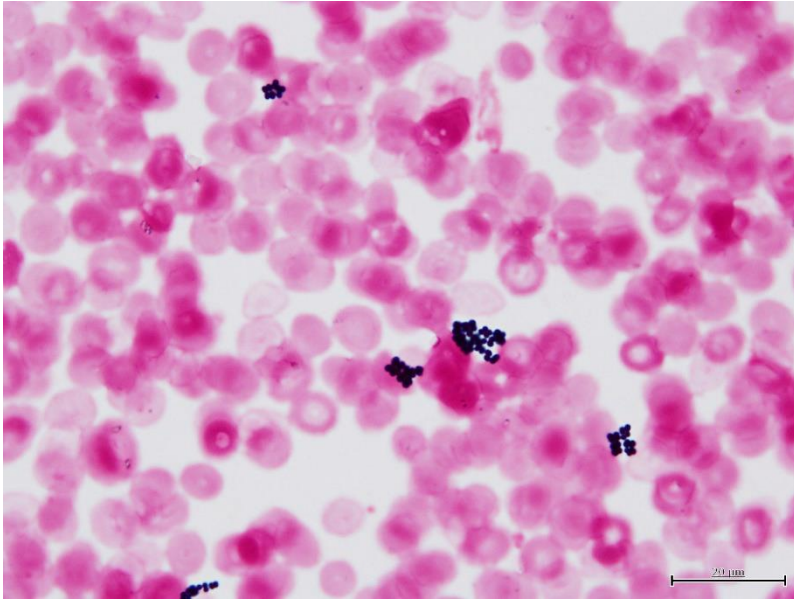
➡ *E. coli* などの腸内細菌科や *P. aeruginosa* などグラム陰性桿菌の多くは血流感染の起因菌として認識されており、1セットのみの陽性であっても血流感染の真の起因菌として治療が開始される。

時より、採血部位（鼠径部）からの汚染菌として検出されることもあるので、汚染か否かの判断は、菌種のみでなく患者の症状や全身状態も考慮し行うことが必要である。



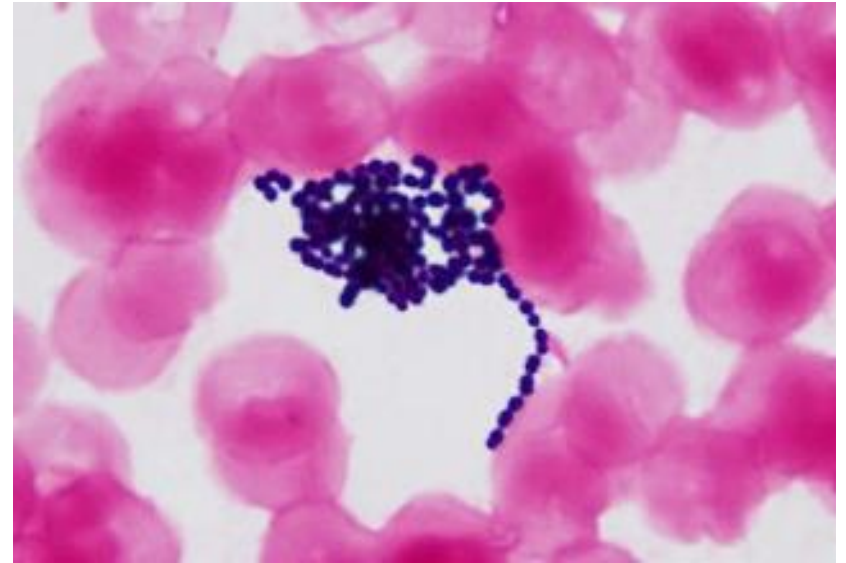
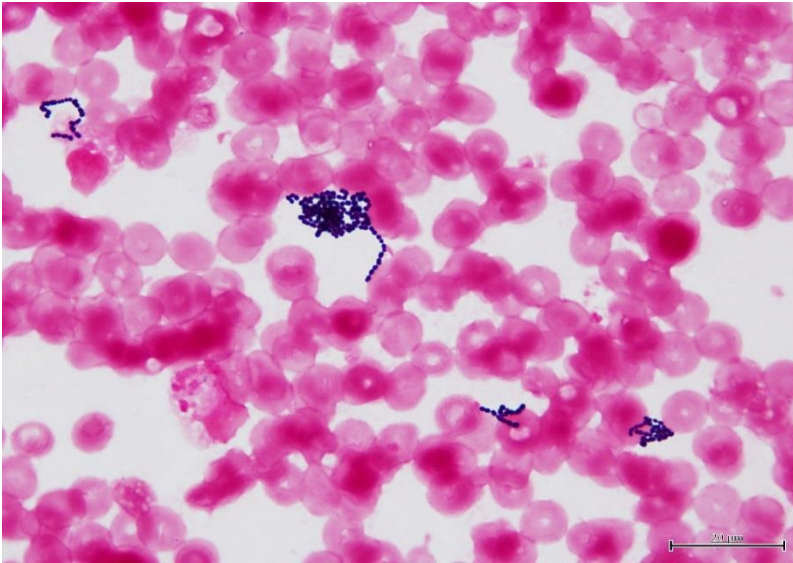
1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応

# *Staphylococcus aureus*



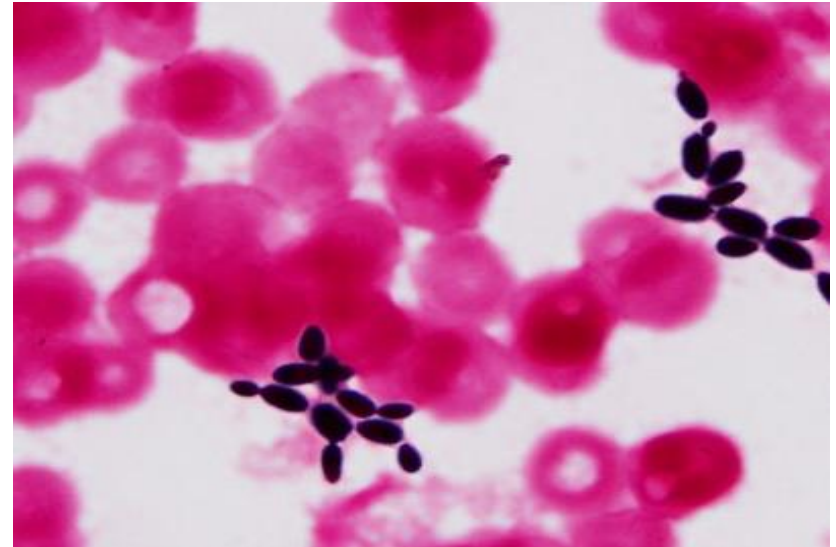
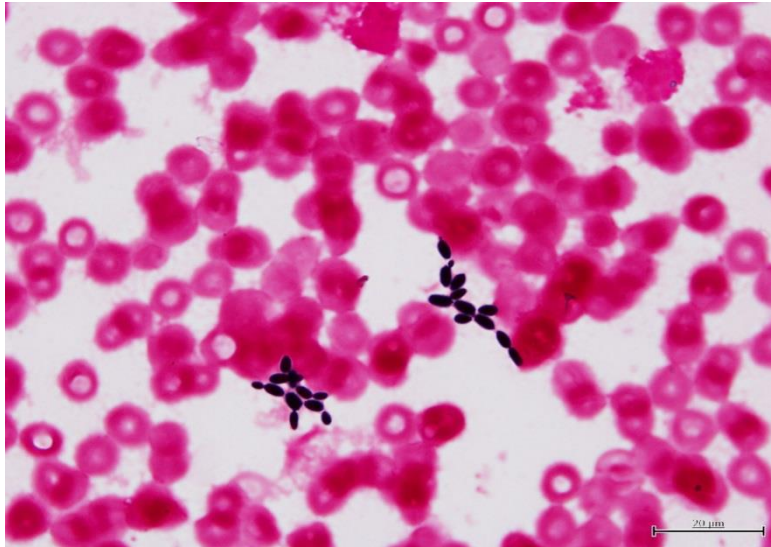
- クラスター形成がゴツゴツとして大きいのは *S. aureus* のことが多い ???
- *S. aureus* であればコンタミよりも真の起炎菌である可能性が高い。
- 病原性が強く、IEや骨髄炎などの合併症を起こしやすい。
- MRSA も考慮し必ずMRSA選択培地を追加培養しましょう。

# viridans group streptococci



- グラム陽性の典型的なレンサ球菌で、菌種により卵円形または陽性桿菌が連鎖しているようにみえる場合がある。
- anginosus group: 肺化膿症、心筋内膿瘍、腹腔内膿瘍、脳膿瘍、化膿性関節炎、化膿性脊椎炎などの膿瘍を形成しやすい。
- mitis group: 抜歯や出血を伴う歯石除去などの歯科処置後血液中に侵入する。発熱、心雑音、点状出血、心内膜に疣贅を形成するなど感染性心内膜炎を引き起こす。感染性心内膜炎が疑われる場合には、8時間間隔で3回、各2セットの血液培養施行が推奨されている。

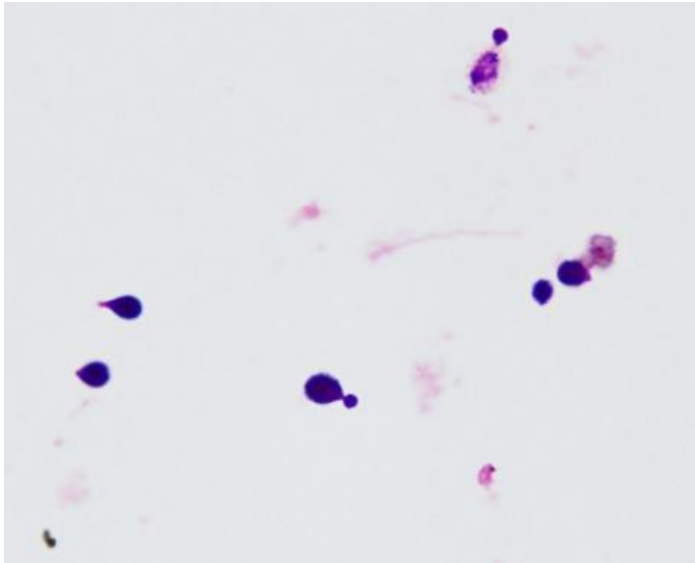
# Candida 属



- グラム陽性で楕円形。
- カンジダ血症の致死率は40～50%と極めて高く、血液培養からカンジダ属が検出されたら、治療が必要。
- 眼内炎、感染性心内膜炎、化膿性血栓性静脈炎、といった転移性病巣作ってしまう。(治療開始前にこれら臓器の精査を忘れずに)
- *C. glabrata* , *C. krusei* は、アゾール系薬に耐性を示す場合があるので、キャンディ系のミカファンギンを推奨する。
- *C. parapsilosis* , *C. guilliermondii* は、キャンディ系薬に耐性のことが多い。

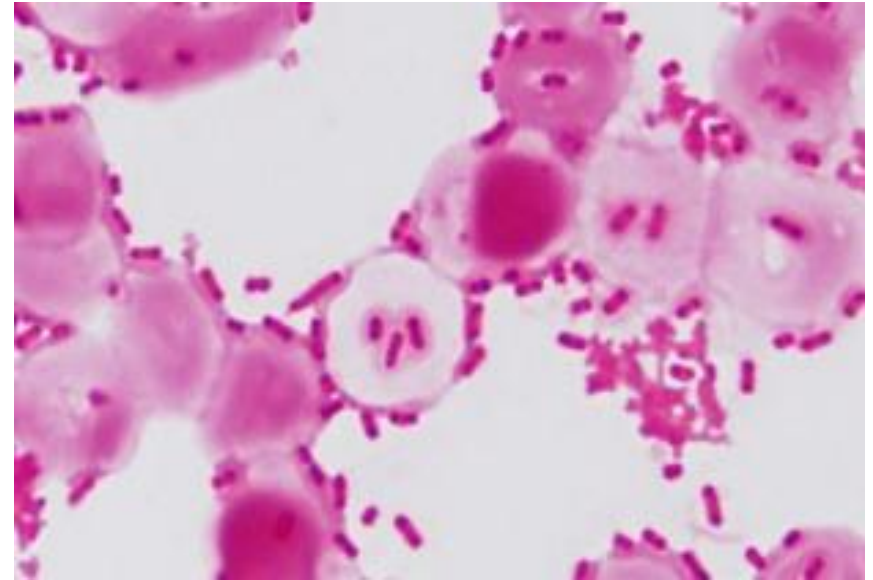
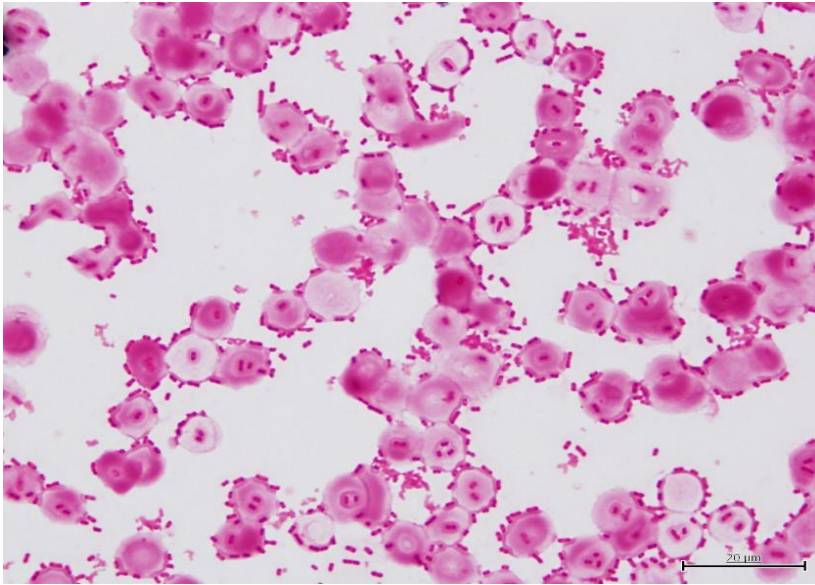


## *C. neoformans* , *C. gattii*



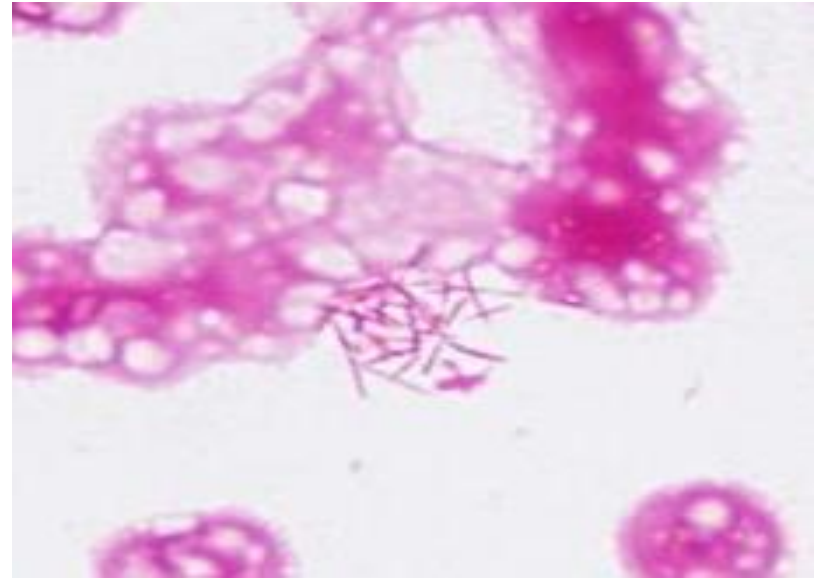
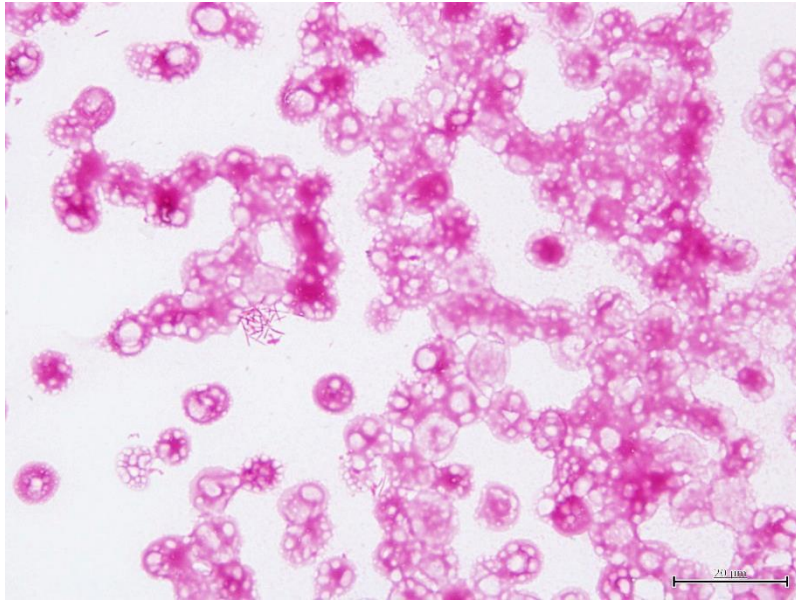
- 莢膜を有する酵母様真菌で球形である。墨汁染色により莢膜を確認する。
- *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* , *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* と2つの変種とされていたが、現在は*C. neoformans* と*C. gattii*の2種に分かれた。
- *C. gattii*は、カナダ・バンクーバー島周辺、ワシントン州やオレゴン州などで、集団感染事例が報告されており、検出患者の渡航歴の調査も重要である。
- 髄液、血液など無菌的臨床検体からの病原体検出および脳脊髄液のクリプトコックス莢膜抗原陽性であった場合5類感染症として届出が必要である。(H26.9.19より)

# *Klebsiella pneumoniae*



- グラム陰性のやや大きい桿菌で、菌体周囲に厚い莢膜が観察される。
- ヒトの腸管に常在し、尿路・胆管・肺炎・膿瘍と様々な感染症を起こす。
- ESBL産生菌やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を考慮し、ESBL選択培地やクロモアガーmSuper CARBAなどの選択培地も追加し培養しましょう。
- 血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体からカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が検出された場合は5類感染症として届出が必要です。

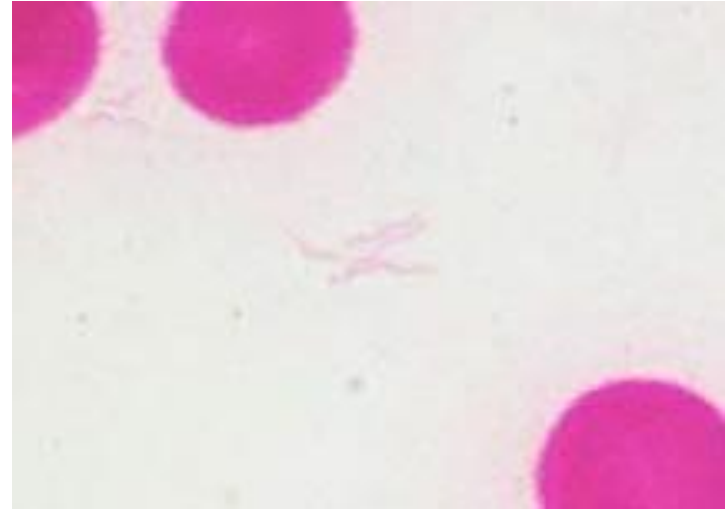
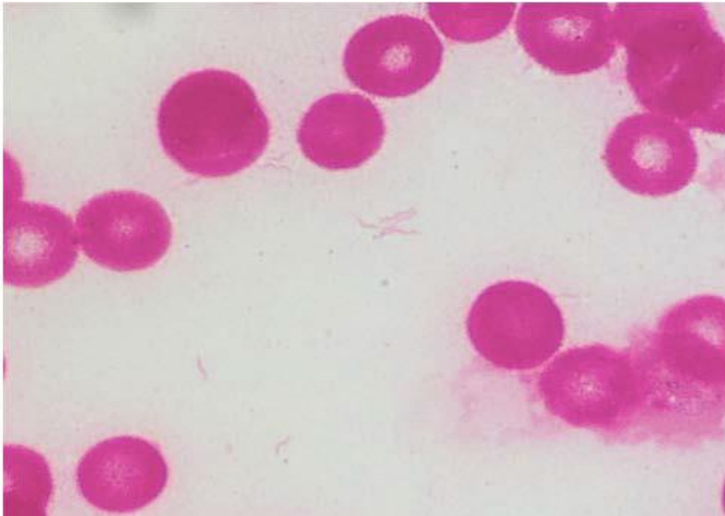
# Capnocytophaga



- 紡錘状で細長いグラム陰性桿菌 (*Fusobacterium nucleatum* 様)。
- ヒト口腔内 (特に歯周部)、イヌ、ネコの口腔内に常在する。
- *C. canimorus* による敗血症は、イヌやネコに咬まれたり、ひっ搔かれたりすることで感染発症する。脾臓摘出者、アルコール中毒、糖尿病などの慢性疾患、免疫異常疾患、悪性腫瘍にかかっている方、高齢者など、免疫機能が低下している方は、重症化しやすい。

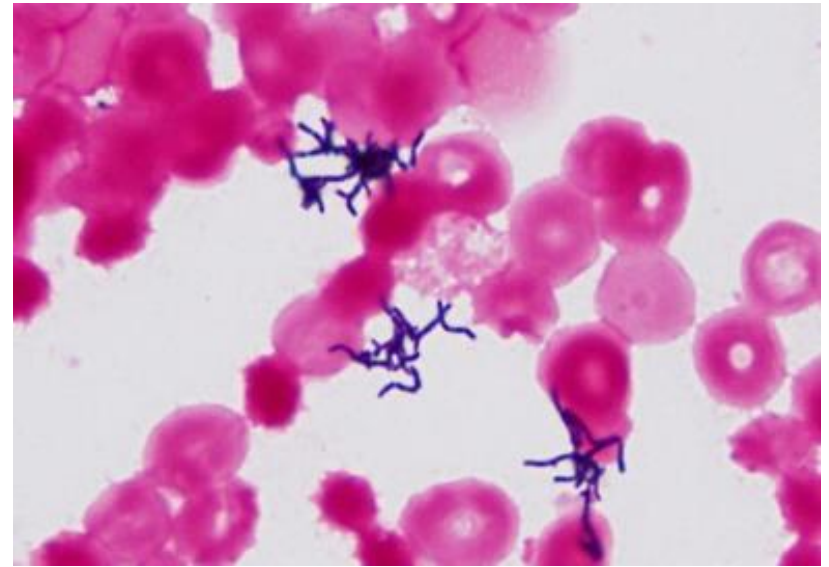
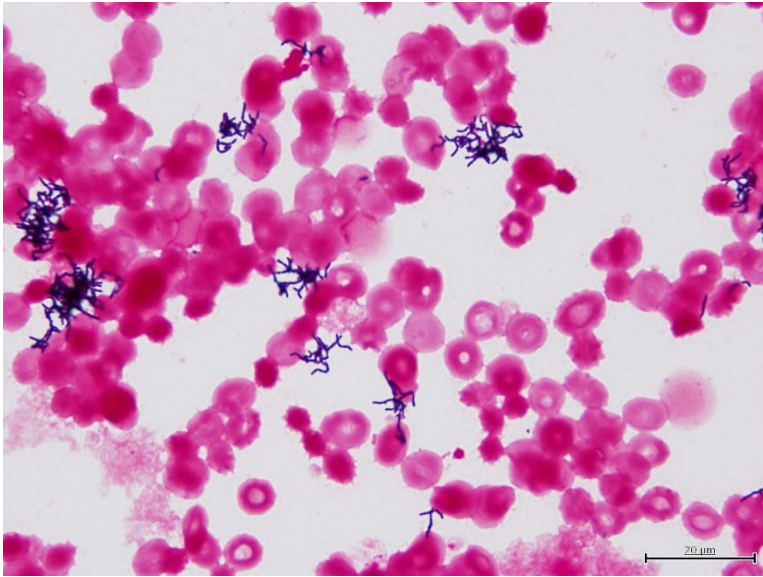


# *Helicobacter cinaedi*



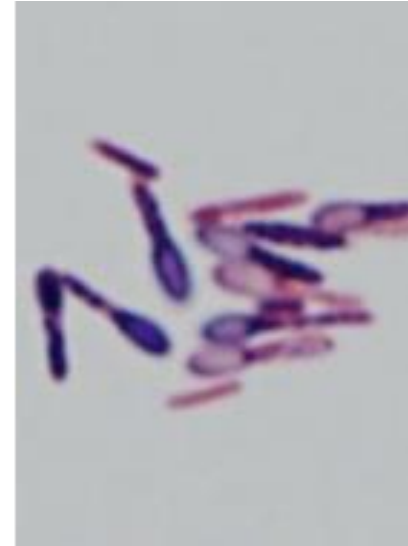
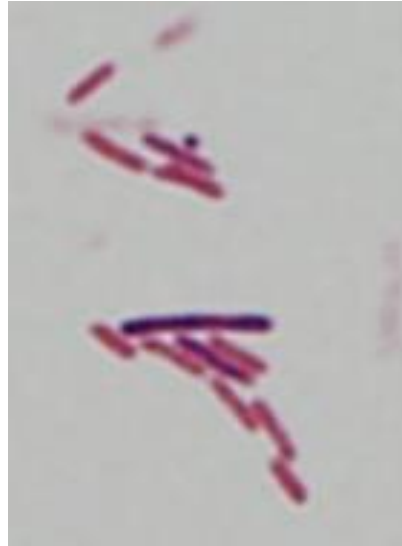
- グラム陰性のらせん菌 (*Campylobacter* 属よりも長く、2巻以上のらせん形態)
- 血液培養3～7日間で好気ボトルが陽性となる。
- 遊走性があり、血液寒天培地に光沢のあるフィルム状コロニーを形成する。
- 微好気環境に水素5～10%を添加することで増殖が促進
- 化学療法中の患者、免疫不全の患者、透析患者などの患者から検出され、蜂窩織炎、菌血症などが多く報告されている。
- 多くの感受性に良好であるが、抗菌薬投与後に症状が改善しても再燃する症例も認められており、慎重に経過を追って行く必要がある。

# *Propionibacterium acnes*



- 嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌で分岐がみられる。
- 皮膚や皮腺導管内常在菌であり、検体採取時に混入して嫌気用ボトルから検出される。
- コンタミネーションの場合が多いが、眼内レンズ、人工心臓弁、脳室腹腔シャント等、人工物の移植手術における術後感染にも関与し、重篤な症状をもたらす場合もある。陽性ボトルの本数、陽性までの時間なども考慮し起炎菌の有無を判断する必要がある。

# グラム陽性桿菌それともグラム陰性桿菌 ???



- グラム陽性大桿菌で芽胞を形成する *Bacillus* 属や *Clostridium* 属の中には、グラム陰性菌に染色される菌もあるので注意。

*C. clostridioforme* / *C. symbiosum* / *C. tertium*

**劉の反応**：3%水酸化カリウム液1滴をスライドに滴下し、なるべく若い培養菌を白金線で釣菌して混和する。グラム陽性菌は何の変化もないが、グラム陰性菌は菌苔が粘稠性となり、静かに引き上げると糸を引いたようになります。（外膜にあるリポ多糖がKOHにより溶出する現象で、グラム陽性菌では厚いペプチドグリカン層のため溶出しない）

第27回 日本臨床微生物学会総会・学術集会  
The 27th Annual Meeting of Japanese Society for Clinical Microbiology  
ワークショップ 関東甲信越地区

まれな菌!?  
いざという時困らないために  
2016



## *Exophiala dermatitidis* / *jeanselmei*

国立がん研究センター中央病院 臨床検査部 莊司 路

### 【臨床的意義】

黒色真菌感染症の起因菌であり、皮膚外傷から侵入し皮膚に症状、肉芽腫状病変を形成しクロモミコシスのほか、黒癬などの皮膚の浅在性病変、皮下の膿瘍または囊種、さらには脳膿瘍、感染性肺胞嚢胞性線維症をはじめとする内臓病変をおこす。近年では、化学療法中や免疫機能の低下した患者からの発症例が増加傾向にあり、日和見感染症としても注目されている(図1、2)。



図1 舌から食道  
臓器粘膜に多数の黒色偽膜の付着が散在

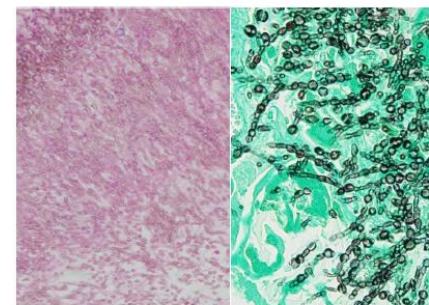


図2 左: HE 染色、右: グロコット染色  
(×100) (×400)





1. 血液培養装置
2. 敗血症について
3. 血液培養検査について
4. 確認すべきポイント
5. アウトブレイク時の対応

## アウトブレイクかも??

同じ病棟で、同時期に血液培養からグラム陽性桿菌  
が検出されている！！なにかおきてる

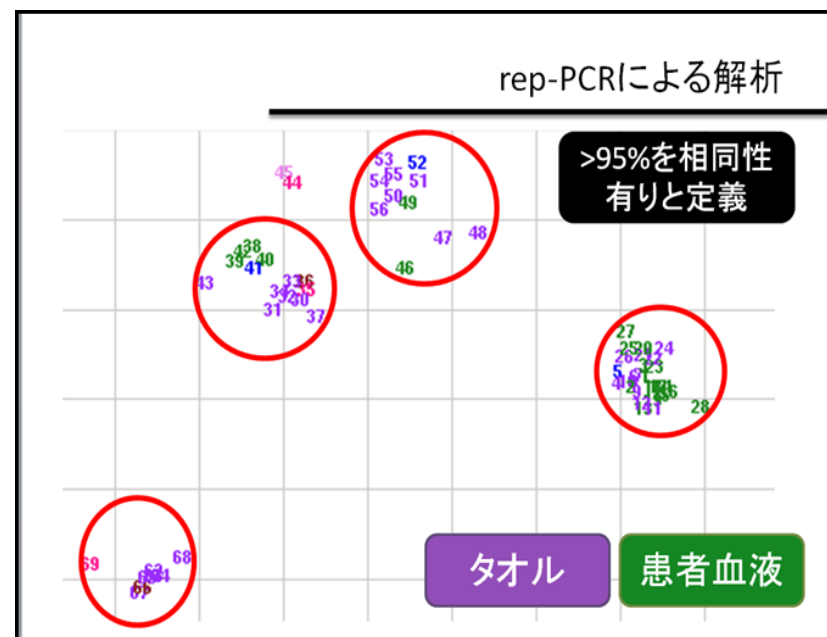
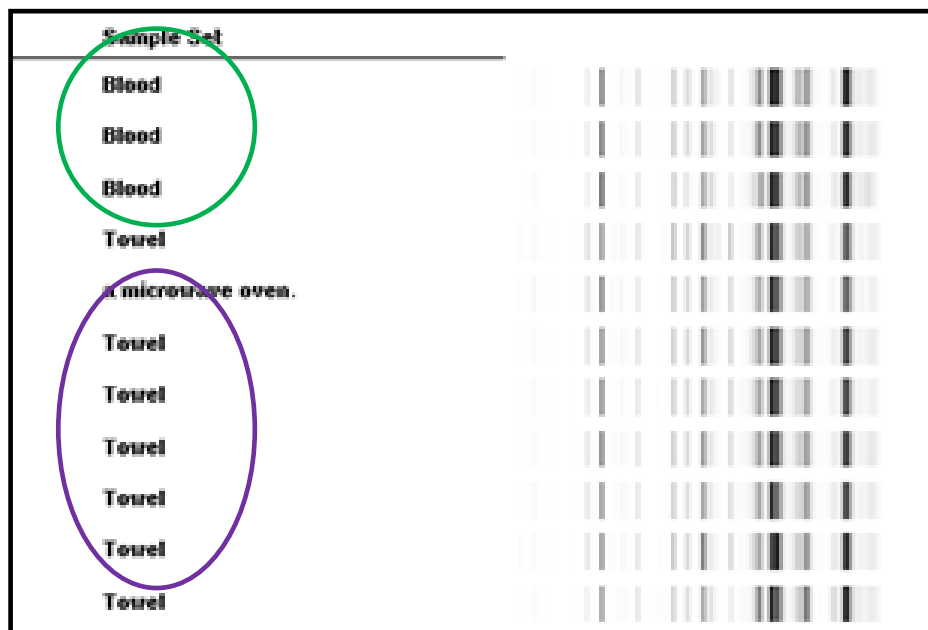
最初に気が付くのは検査技師



# DiversiLabシステムによる遺伝子解析



電気泳動装置であるバイオアナライザーとDiversiLab専用ソフトウェアからなるシステムで、Rep-PCRを基本原理とし、細菌、抗酸菌、真菌までのゲノタイピングを同じシステムで実施することが可能



## ま と め

- ➡ 血液培養陽性患者の起因菌の有無を判断する場合は、患者の症状や全身状態、身体所見、治療内容・経過、他部位（カテーテル先端や膿瘍など）培養検査やその他検査結果等も考慮し判断する必要がある。
- ➡ 検査室からの血液培養陽性報告は、患者の治療方針に直接影響を及ぼす可能性があるので迅速に、できるだけ多くの情報を報告する必要がある。
- ➡ 同定・薬剤感受性結果確定後は、担当医や感染症専門医、ICT等と、患者の状態、使用抗菌薬についてディスカッションすることが、微生物担当技師のスキルアップに繋がる。





御静聴有難うございました

