

病原微生物検査学実習 A および
病因検査技術開発法 I における
実習マニュアル 2019. V1

学生番号

氏名

はじめに

病原微生物を取り扱う場合に特に注意しなければならない点は、全ての操作が完全な無菌操作のもとで行わなければならないことと、感染の危険を絶対に避けなければならないことである。これを怠ると実習者自身が感染を受ける危険があるだけでなく（実習室内感染）、関係者以外の周囲に人々にも感染させしめることがある（生物災害、バイオハザード）。その危険を避け、また安全に操作するには、**①無菌的な取り扱い、②器具の滅菌、③汚染物質の滅菌消毒**などに厳重な注意を払わなければならない。そのためには、実習中の私語はできる限り慎み、意識を集中して実習に取り組むことが重要である。（実習書 p6-10 参照のこと）

【一般的注意事項】

- ① 実習室内では清潔な白衣（微生物専用）を必ず着用すること。
- ② 操作中に少しでも微生物付着の危険があった場合には、直ちに教員にその旨を報告し、適切な消毒を実施すること。また、退出の際には、必ず備え付けの消毒剤で手指の消毒を十分に行うこと。
- ③ 実習室内感染防止のため、実習室内での飲食・喫煙および化粧は絶対にしてはならない。
- ④ 携帯電話などは絶対に持ち込まないこと（実習室内感染防止）。
- ⑤ 手指で顔面、ことに眼部、鼻腔、口辺など微生物の侵入門戸となる部位にはできるだけ触れないようにすること（感染防止）。
- ⑥ 微生物含有容器は細心の注意をもって取り扱い、破損しないようにすること。万一、誤って菌液をまき散らした場合は、直ちに教員に申し出て適切な処置を行い、汚染拡大の防止に努めること（感染防止）。
- ⑦ 実習室から微生物、検査材料を持ち出してはならない（持ち出し厳禁）。
- ⑧ アルコールやエーテルなどの引火しやすいものの取り扱いを含めて、火気に注意すること（危害防止）。
- ⑨ 実習台の上は整理整頓し、実習の後にはグルコン酸クロルヘキシジン液（ヒビテン液）や70%エチルアルコール液などの消毒剤を噴霧すること。
- ⑩ 孵卵器や冷蔵庫を開けっ放しにしない。また、菌を培養した培地類をいつまでも孵卵器や冷蔵庫内に放置しないこと（整理整頓）。
- ⑪ 使用した器具はすみやかに各自洗浄し、所定の場所に戻すこと（整理整頓）。

【レポートについて】

レポートは後々の自分の勉強（定期試験、臨地実習、国家試験）に役立つような形式でまとめられることが望ましく、単に教科書やマニュアルを写したものは不可とする。具体的には、実習中の説明、自身が観察した結果（グラム染色による形態の

観察、生化学性状の判定法やその結果など) および考察の順でまとめること。レポートをまとめることは、授業や実習内容の復習として重要であり、その過程で不明なことは、必ず教員や TA に質問し解決するようにしてください。提出期限は実習の翌週実習終了時とする (期限厳守)。

【実習の評価】 出席点、提出レポート、試問（口頭試問もしくは試験）により総合的に評価する。従って、欠席する場合は必ず教員に連絡すること、また、レポートの提出期限も厳守すること。

実習 第一, 二回 (今週はレポート提出の必要はありません)

【実習内容】

- * 病原微生物学実習における諸注意
- * 各種器具の取り扱い
- * 消毒、滅菌について
- * グラム染色
- * 環境菌の培養
- * 手洗い実習

【予習事項】

1. 各種実験用器具の名称およびその使用法
2. 消毒、滅菌の原理とその方法について

I. 実習の心得および機械・器具の取り扱い方

- ①滅菌器 (オートクレーブ、乾熱滅菌器など)
- ②孵卵器 (普通孵卵器、低温恒温器、炭酸ガス孵卵器など)
- ③恒温水槽、消毒用噴霧器、天秤
- ④ガスバーナー、蒸留水作製装置、凍結乾燥機

II. 滅菌、消毒法

1. 実験台の消毒について

実習前には毎回実験台を雑巾にて水拭きすること、また、実験終了時には、菌の使用に関わらず、必ず消毒薬入り噴射瓶をもちいて、実験台一面に消毒薬を噴霧し消毒を行うこと

2. 手指の消毒について

毎回、実習室流し台に消毒液 (グルコン酸クロルヘキシジン液) を用意しますので、実習終了時ならびに実習室退出時には手指を消毒すること。(消毒液に手指を 20-30 秒間浸し、そのあと十分に水洗する) また、手指に菌液がついた場合は、教員にその旨を申し出、別途指示に従うこと。

(消毒および滅菌については、必ず教科書の該当部分を読むこと)

III. 衛生的手洗い

感染対策における最も基本的な要件として、医療従事者による手洗いの励行があります。医療従事者の手指は病原性微生物の伝播媒体となることがあるため、正しい手洗いを完全にマスターし、目的にあったレベルの手洗いが常にできるようにして

おこなげればなりません。医療現場における手洗いには日常的手洗い(social handwashing)、衛生的手洗い(hygienic handwashing)、手術時手洗い(surgical handwashing)の3種類がありますが、本実習では、医療従事者による手洗いの中で、最も重要な衛生的手洗いについて実習する。

(1)手洗い概説

手指に存在する微生物は皮膚常在菌(定住フローラ、resident skin flora)と皮膚通過菌(一過性フローラ、transient skin flora)に分けることができる(表1)。常在菌、例えば、表皮ブドウ球菌などのコアグララーゼ陰性ブドウ球菌(coagulase-negative staphylococci)は、皮脂腺、皮膚のヒダなどに常在しており、消毒薬による手洗いによってもなかなか除去しきれない。通過菌は皮膚表面、爪などに周囲の環境より付着したのですが、これらは抗菌成分を含まない石けんと流水でもほとんど除去することができる。

表1 手指に存在する微生物

皮膚常在菌	表皮ブドウ球菌などのCNS	消毒薬でも除去しきれない
皮膚通過菌	大腸菌等のグラム陰性菌 黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌など様々	石けんと流水でほとんど除去

日常的手洗いは、日常生活における手洗いと同様に、配膳の前やトイレの後などに行う簡易な手洗いで、流水のみの場合と石けん(抗菌成分を含む場合もある)を用いる場合がある。この手洗いによっても通過菌の一部を除去できるが、この手洗いの本質はあくまでも物理的な汚れの除去にすぎず、患者の処置前後や検査材料を扱う場合には、より念入りな衛生的手洗いを行う必要がある。

(2)衛生的手洗い(hygienic handwashing)

①衛生的手洗いの目的

主に医療現場において医療関連感染の予防策として行う手洗いであり、皮膚通過菌のほとんどを除去することを目的とする。必要な場面でこれを行うことにより手指を介した接触感染を防止することが最終的な目的である。

②衛生的手洗いの方法

正しい手洗い手順を守り十分な時間をかければ、抗菌成分を含まない石けんと流水による手洗いでほとんどの通過菌を除去することが可能であるが、抗菌成分入りの石けん(薬用石けん)を使用する機会が多い。また、微生物により高度に汚染されて

いると思われる場合などには、速効的な殺菌力のある消毒薬を用いて行うが、基本的な知識として、通過菌は抗菌成分を含まない石けんによる手洗いでほとんど除去できることの理解が必要である。また、乾燥にはペーパータオルなどを用い、タオルからの再汚染を受けないように注意する。

③衛生的手洗いが必要な場面

実際に手洗いはいつするのか？ トイレに行ったあと・居室への入室・退室時・利用者への接触の前後・汚物を処理した後・床のものを拾った後、靴など床にあるものを触った後（床にもものを落とした時は、一連の作業が終わってから拾うこと）・血液、体液、分泌液、排泄物などとの接触後・一つの処置から次の処置に移る前・別の利用者のケアに移る前・スタッフルームに入る時など。

米国CDCの2002年手指衛生ガイドラインでは、手洗いは表2に示す場面で行われるべきとしている。

表2 CDC「医療現場における手指衛生のためのガイドライン（2002年）」の勧告

非抗菌性石けん （普通の固形石けんなど）	手指が目に見えて汚れている場合血液、体液などで汚染されている場合	抗菌性石けん（消毒薬配合スクラブ）と流水でも可
	炭疽菌が疑われる場合など	
速乾性手指消毒薬を日常的に用い手指消毒する	患者に直接接触する前	
	中心静脈カテーテル挿入時に滅菌手袋を着用する前	
	導尿カテーテル、末梢静脈カテーテルなど外科的処置を要しない侵襲的医療器具を挿入する前	
	患者の健常皮膚に接触した後	
	体液、排泄物、粘膜、非健常皮膚、創処置の後に目に見える汚染のない場合	
	同一患者の汚染部位から清潔部位に移る場合	
	患者の近傍物品に接触した後	
手袋をはずした後		

④手洗いの手技

手洗いは、個々による自由な手順では手の甲や指先などを洗い損ねる場合が多いので、衛生的手洗いにおいては、常に全員が同じレベルでの除菌を行うことができるよう手洗い手順をマニュアル化し、遵守することが望ましい。以下、図1に手洗い手順例を示す。

【手洗いのポイント】

- ★指輪、腕時計ははずす。[SEP]
- ★爪は短くする。[SEP]
- ★タオルの共有はしない。
- ★手荒れ防止策をとる(手のスキンケアに心がける)
- ★手洗い場は「手洗い専用」とし、手洗い場の周囲がぬれた場合はこまめに拭き、乾燥させておく
- ★最後に速乾性消毒剤を15秒以上手指に擦り込めば完璧！

図1 衛生的手洗い手順例（流水を用いる場合）

1. 石鹸をつけて十分泡立てる



2. 手のひらと甲（5回づつ）



3. 指の間（5回づつ）



4. 親指洗い（5回づつ）



5. 指先（5回づつ）



6. 手首（5回づつ）



7. 流水で十分にすすぐ



7. ペーパータオルで拭く



8. 蛇口にペーパータオル被せて締める



○上記の手洗いの後、速乾式手指消毒薬で手指消毒を遂行すれば完璧！！

(2)衛生的手洗いの実際

① 日常的手洗い

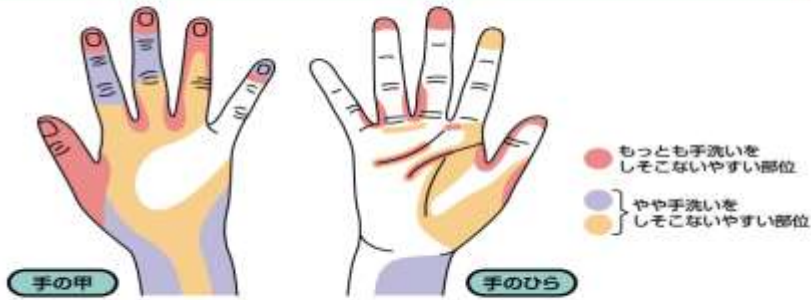
1. 時計や指輪などの装飾品をはずす
2. 手洗い前に、ワンプッシュの蛍光塗料を手指全体にすり込み乾燥させる
3. 手洗い検査機に手を挿入し、紫外線ランプ下で蛍光塗料の付着を確認する
4. 日常行なっているように手洗いを行い、ペーパータオルで水分を拭き取る
5. 再び、手洗い検査機に手を挿入し、紫外線ランプ下で洗い残し部位を観察し、確認シートに記載する



② 衛生的手洗い

1. 手洗い前に、ワンプッシュの蛍光塗料を手指全体にすり込み乾燥させる
2. 手洗い検査機に手を挿入、紫外線ランプ下で蛍光塗料の付着を確認する
3. 衛生的手洗いを行い、ペーパータオルで水分を拭き取る
4. 再び、手洗い検査機に手を挿入し、紫外線ランプ下で洗い残し部位を観察する

手洗いをしそこないやすい部位



(3) 手指消毒薬

高度の微生物汚染があった場合の消毒薬としては、4%クロルヘキシジンスクラブ、7.5%ポビドンヨードスクラブ、1%クロルヘキシジンエタノールローション、0.5%クロルヘキシジンエタノールローションと0.2%クロルヘキシジンエタノールローション、0.2%ベンザルコニウム塩化物エタノールローションなどの速乾性手指消毒薬、脱脂綿などによるスワブ法に用いるアルコール系消毒薬としては消毒用エタノール、70%イソプロパノール、イソプロパノール添加エタノール液などがある。これらの消毒薬は、通過菌や常在菌の一部に速効的な殺菌力を発揮するのみならず、クロルヘキシジンなどの成分が皮膚常在菌に対して持続効果を発揮することも期待されている。

(4) 最後に手あれについて

頻回の手洗いによる手荒れかに注意が必要である。手荒れ部位では、健康な皮膚と比べ、ブドウ球菌やグラム陰性菌が頻繁に付着していますので、手荒れは病院感染対策上、重大な問題となる。従って、手荒れが生じにくい手洗い法の選択や、スキンケアとしてハンドクリームやハンドローションの使用など、手荒れ予防に積極的に取り組むことが非常に大切である。

IV. グラム染色 (Hucker の変法)

1. 原理

グラム陽性菌と陰性菌の細胞壁の構造の違いによる

2. 染色液

- a. クリスタル紫
- b. ルゴール液 (媒染液)
- c. サフラニン

グラム染色用ルゴール液 組成

ヨウ素 (I)	1 g	}
ヨウ化カリウム (KI)	2 g	
精製水	300 ml	

500ml 容量の三角フラスコに量り取った KI 2 g を入れ、少量の精製水(5 ml 前後)にて完全に溶かす。次にヨウ素(I)を少量ずつ加えていき、よく振って完全に溶けたところで残りの精製水全量を加える。褐色瓶に貯える（*処方どおりしないと1日中振っていても溶けない）。

2. グラム染色標本の作製 (別途実技指導)





グラム染色は、細菌学的手技のうち最も重要なものの一つであり、微生物の分類・同定には不可欠な手技であるのでよく習熟すること。

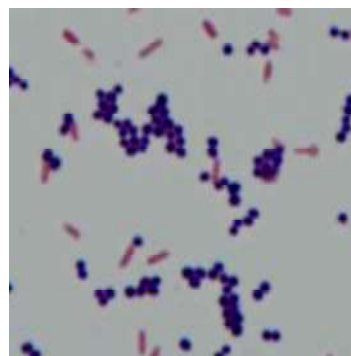
- 白金耳、白金線の取り扱い方
- ガスバーナーの取り扱い方
- 塗抹標本の作り方

3. グラム染色法 (Hacker 変法) の実際

- 標本を火炎固定する
- クリスタル紫液を標本にのせる 1 分間
- 水洗 (標本の裏から洗う)
- ルゴール液を標本にのせ、直ぐに捨てる(共洗い)
- 再度、十分量のルゴール液を標本にのせる 1 分 30 秒
- 水洗
- エタノールで脱色 30 秒以内
- 水洗
- サフラニンで後染色 1 分間
- 水洗
- 濾紙などで水分をとる

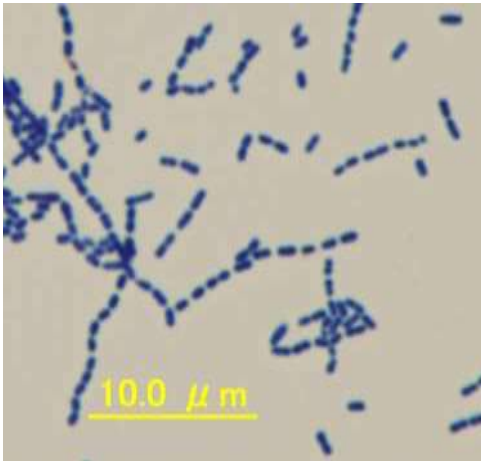
4. 顕微鏡で観察 (油浸法と使用後の始末)

	グラム陽性(青) Gram-positive	グラム陰性(赤) Gram-negative
球菌 (spherical) coccus		
桿菌 (rod) bacillus		

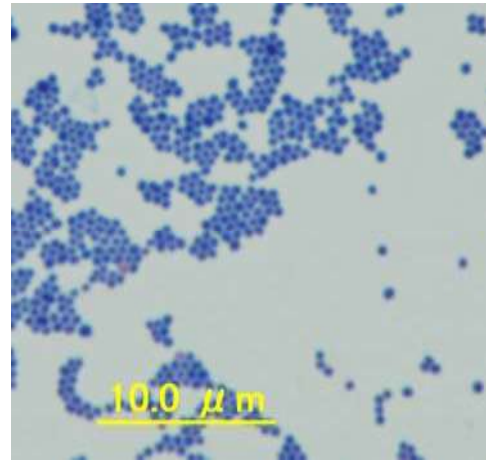


ブドウ球菌(紫)と大腸菌(赤)

グラム陽性球菌

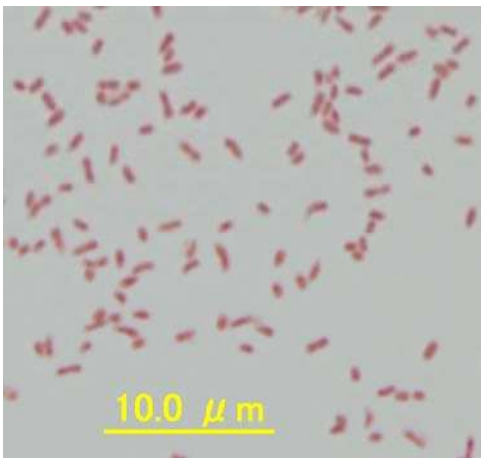


レンサ球菌

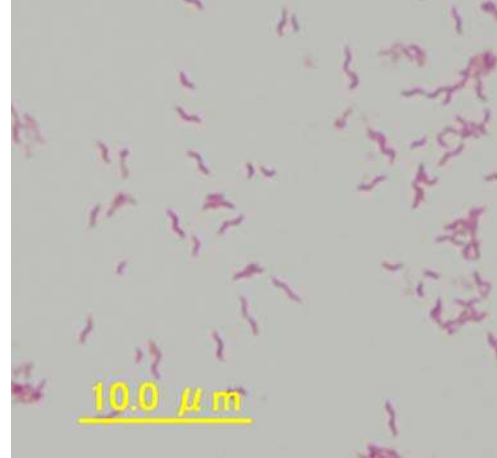


ブドウ球菌

グラム陰性桿菌



大腸菌 (短桿菌)



カンピロバクター (らせん状桿菌)

今週は以下の課題についてまとめてください。

1. 染色について →染色の目的、グラム染色の原理
2. 培養について →培養の目的、使用目的による培地の分類
3. 消毒と滅菌について →熱を用いる滅菌法と、手指消毒用消毒薬について

グラム陽性球菌 I の分離・同定
-*Staphylococcus* 菌属の分離・同定を学ぶ-

【実習内容】

- * コロニー観察
- * グラム染色による菌の形態観察
- * ブドウ球菌の同定法
- *

【今週の予習事項】

今週は、*Staphylococcus* 菌属の分離・同定を実習しますので、実習に使用する培地の組成について予習して下さい。

【培地の作製方法】

1、スタヒロコッカス培地 No.110 (栄研マニュアル P201)

本培地粉末 149g に精製水 1,000ml を加えよく振りまぜて均等浮遊液としたのち、加温溶解し、121℃ 15 分間 高圧蒸気滅菌する。滅菌した培地は、よく振り混ぜて十分混和したのち、恒温水槽内でおおよそ 50℃に冷ましてから無菌的に約 20ml ずつシャーレに分注して平板に固める。

2、

3、DNA 培地 (栄研マニュアル P205)

本培地の粉末 42.5g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解し、121℃ 15 分間滅菌する。滅菌後、恒温水槽内で約 50 °C に冷ましてから約 20ml ずつを無菌的にシャーレに分注し平板に固める。

4、coagulase test 用ウサギプラズマ (栄研マニュアル P207)

バイアル 1 本を 7ml の滅菌生食水で溶解し、無菌的に滅菌小試験管に分注する。

II. 分離培養

Sample 1 と 2

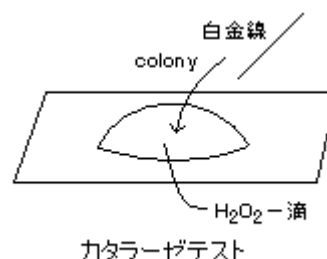
各班、Sample 1 と 2 を普通寒天平板に各々画線塗抹し、孵卵器 (37℃) にて一夜培養したものを教材とする (班に 2 組ずつ配布する予定である)。実習では、Sample 1 と 2 の colony を観察し、記録する。また、各 Sample の 1 colony を用いて、グラム染色用塗抹標本の作製およびカタラーゼテストを行う。

【コロニーの観察】

色、大きさ、高さ、溶血性、表面の様子（ツルツル、乾いた感じなど）などのコロニーの特徴をとらえ、個々の菌種を識別できることが望ましい。

カタラーゼテスト

菌のカタラーゼの産生性を調べる試験である。過酸化水素水(H_2O_2)をピペットにてスライドガラス上に一滴置き、白金線にて 1 colony を過酸化水素水(H_2O_2)内に接種する（右図参考）。泡が出たら陽性と判定する。この反応は新しい colony で行うことが望ましく、また血液寒天をえぐると偽陽性となるので注意すること。（ H_2O_2 を手指につけないように注意してください！）



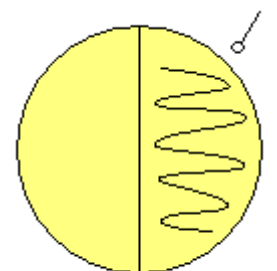
III. 確認培養および鑑別試験

Staphylococcus sp.を疑う 2 菌種 (Sample 1 と 2) の同定法

(1) スタヒロコッカス培地 No.110 培地にて、食塩耐性、色素産生性、マンニット分解性を確認

スタフィロコッカス No.110 培地(薄黄色)を 2 つに区画して、S1 と S2 それぞれの菌を白金耳にて接種、37°C 一夜培養して色素産生と食塩耐性を観察。

7.5% NaCl 存在下で菌が発育していた場合には、「食塩耐性」と判定し、*Staphylococcus* 属菌であることが分かる。また、0.05% BTB 液を滴下し、マンニットを分解していた場合、酸性になり BTB 液は黄変、非分解の場合には青緑のままとなる。*Staphylococcus aureus* は食塩耐性(+)、マンニット分解能(+)、色素(黄色)産生性(+)である。



Staphylococcus No.110培地

(2) コアグララーゼテスト coagulase test

コアグララーゼとは、*Staphylococcus aureus* が産生する動物の血漿凝固酵素であり、*Staphylococcus* 属の菌種の鑑別に用いられる。S1 と S2 の 1colony 量の菌をそれぞれ coagulase test 用サギプラズマ(無色)に加え、よく混和して 37°C で翌日まで培養する。凝固していればコアグララーゼ陽性、凝固しなければコアグララーゼ陰性である。

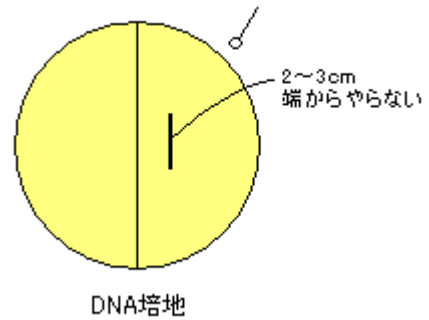
Staphylococcus aureus はコアグララーゼ(+)である。



(3) DNase 産生試験

DNA 培地(薄黄色)を 2 つに区画して、S1 と S2 のそれぞれの菌を白金耳にて 2~3cm 塗布し、37°C 一夜培養する。発育した菌苔の周りに赤い透明帯を形成したものを DNase 陽性、混濁したものを DNase 陰性とする。

Staphylococcus aureus は DNase (+)である。



【レポートについて】

今週は以下の点に注意して、レポートをまとめてください。

1. 使用した培地とブドウ球菌の特性（例えば、食塩耐性、マンニット分解性など）について
2. ブドウ球菌の病原因子について
3. ブドウ球菌属の話題の耐性菌について
(注意) 菌名はすべてイタリックで書いてください。

グラム陽性球菌Ⅱの分離・同定
-Streptococcus 属菌の分離・同定を学ぶ-

【実内容】

- * レンサ球菌のコロニーおよび溶血環の観察
- * グラム染色による菌の形態観察
- * レンサ球菌の同定

【今週の予習事項】

今週は、グラム陽性球菌のうち、「レンサ球菌の分離同定」を実習しますので、各確認試験について予習して下さい。

【培地の作製方法】

血液寒天培地（自家製の場合）

基礎培地としては、ハートインフュージョン寒天培地（ニッスイ）を用いる。本培地粉末 40g に精製水 1000 ml 加え、よく振り混ぜたのち、121℃ 15 分間滅菌する。滅菌後、恒温水槽内でおおよそ 50～55℃ に冷ましてから、羊脱繊維血液を 5% の割合に加え、泡だてないように、よく混和してから約 20 ml ずつを無菌的にシャーレに分注し平板に固める。

II. 分離培養

Sample 1, 2, 3

Sample 1, 2, 3 を血液寒天平板に各々画線塗抹し、孵卵器（37℃）にて一夜培養したものを教材とする（班に 2 組ずつ配布する予定である）。実習では、colony の様子および溶血環について観察、記録する。また、各 Sample の 1 colony を用いてグラム染色用塗抹標本の作製およびカタラーゼテストを行う。

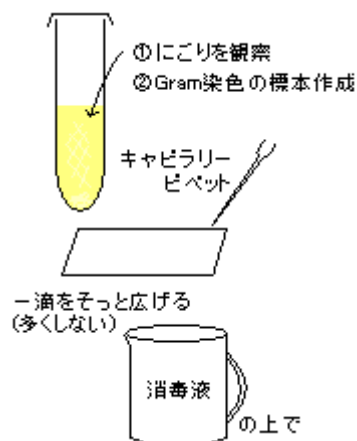
【コロニーの観察】

今週はとくに溶血性とコロニーの大きさ、表面の様子の特徴をとらえ、個々の細菌を識別できるような表現をしてください。

【Streptococcus 属菌のレンサ形成をみる】

寒天平板上のコロニーを用いて作成した標本と液体培養を行った場合の「菌の形態、特にレンサ形成の違い」について観察する。

まず始めに、ブレインハートインフュージョンブイヨン



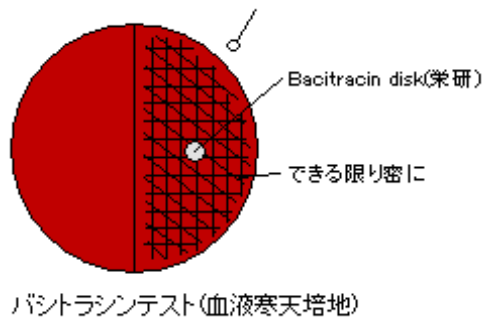
の「にごり(菌の増殖状態)」を観察する。その後、それぞれの菌液(試験管の底の部分)を滅菌したキャピラリーピペットで1滴分とり、そっとスライドグラス上に広げグラム染色用の標本を作製する。火炎固定後、グラム染色を行い、連鎖形成の状態などを調べる。

(注意)この操作は安全キャビネット内で行なうこと。レンサ球菌は陰性化しやすいのでアルコール脱色は10秒前後にするとよい。

1. β 溶血を示す Sample 1 & 2 の同定法

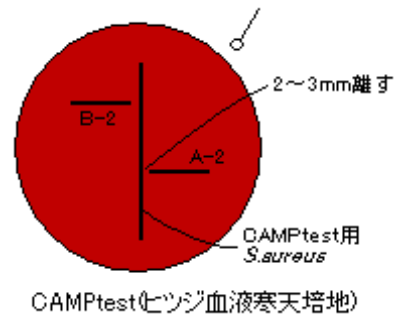
(1) **Bacitracin test:** 羊血液寒天培地を2つに区画し、白金耳を用いてそれぞれの菌をできる限り細かく密に塗布した後、その中央に火炎滅菌したピンセットにて Bacitracin disk (栄研) を置き、37°C一夜培養する。阻止円の直径を測り、直径が 13mm 以上の場合は、感受性(Bacitracin test 陽性)と判定する。Bacitracin test 陽性は A 群連鎖球菌 \Rightarrow *Streptococcus pyogenes*

バシドラスンテスト



(2) **CAMP test:** *Staphylococcus aureus* の β -hemolysin と *Streptococcus agalactiae* の産生する CAMP 因子がヒツジ血液寒天培地上で相乗的に作用し、*S.agalactiae* の溶血が増強される現象を観察する。

ヒツジの血液寒天の中央に白金耳を用い CAMPtest 用 *S.aureus* をタテ一直線に塗抹した。*S.aureus* 塗抹線に対して直角になるように、それぞれの菌を *S.aureus* に触れないように 2~3mm 離して塗抹する。37°C、一夜培養後、溶血が *S.aureus* に近い部分で増強され、矢じり形になれば CAMP test 陽性である。*Staphylococcus agalactiae* (+)

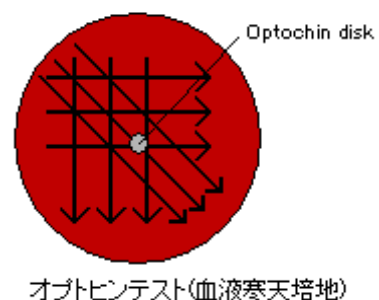


3. α 溶血を示す Sample 3 の同定法

Optochin test: 羊血液寒天培地に菌を3方向から白金耳にて密に塗布し、その中央に火炎滅菌したピンセットにて Optochin disk を置き、一夜培養後、阻止円の直径を測る。直径が 13mm 以上を感受性(Optochin test 陽性)とする。

Optochin test 感受性は肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae*、耐性:緑色連鎖球菌 α -*streptococcus*)

オプトヒンテスト



【レポートについて】

今週は以下の点に注意して、レポートをまとめてください。

1. レンサ球菌の特性（例えば、溶血性、病原因子など）について
2. レンサ球菌の分類について

グラム陰性桿菌 I の分離・同定

-腸内細菌科菌種 3 菌種およびブドウ糖非発酵菌の分離・同定を学ぶ-

【実習内容】

- * 腸内細菌科細菌のコロニーの観察
- * 分離培地による糖分解性の判定
- * 各種確認培地による腸内細菌科の同定
- * ブドウ糖非発酵菌のコロニーの観察
- * 各種確認培地によるブドウ糖非発酵菌の同定

【今週の予習事項】

今週は、グラム陰性桿菌のうち、「グラム陰性桿菌の分離同定」を実習します。
使用する培地の種類が多くなりますので、分離培地および確認培地について十分な予習が必要となります。

I. 培地、試薬の作成

班名	培地および試薬	作成量(ml)	作成数
1 班	DHL 寒天培地	500 ml	25 枚
	SIM 寒天培地	150 ml	40 本
	リジン脱炭酸試験用培地	200 ml	40 本
2 班	Mac Conkey 寒天培地	500 ml	25 枚
	OF 培地 (Gul, Mal, Xy)	100 ml × 3	各 15 本
3 班	DHL 培地	300 ml	15 枚
	Christensen の尿素培地	150 ml	40 本
4 班	Mac Conkey 寒天培地	500 ml	25 枚
	Simmons クエン酸ナトリウム培地	100 ml	40 本
	King A 培地	80 ml	15 本
5 班	DHL 寒天培地	500 ml	25 枚
	TSI 培地	200 ml	60 本
6 班	Mac Conkey 寒天培地	500 ml	25 枚
	VP 半流動培地	150 ml	40 本
	King B 培地	80 ml	15 本

【培地の作製方法】

1、DHL 寒天培地（栄研マニュアル P61）

本培地粉末 63g に精製水 1000ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を恒温槽内で約 50 °C に冷ましてから約 20 ml ずつをシャーレに分注し平板に固める（保存しない場合は滅菌不要）。

2、Mac conkey 寒天培地（栄研マニュアル P59）

本培地粉末 50g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を恒温槽内で約 50 °C に冷ましてからシャーレに約 20 ml ずつ分注して平板に固める（保存しない場合は滅菌不要）。

3、SIM 培地（栄研マニュアル P103）

本培地粉末 39g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、小試験管に約 3 ml ずつ分注、121°C、15 分間の滅菌後、高層に固める。（※スクリー型の小試験管に分注したものを滅菌するが、このとき蓋をしっかりと閉めすぎないこと、完全に閉めてから、少し緩めると良い）

4、VP 半流動培地（栄研マニュアル P81）

本培地粉末 31g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、小試験管に約 3 ml ずつ分注、121°C、15 分間の滅菌後、高層に固める。（※すこし長めの小試験管に分注したものを滅菌する。蓋はアルミ缶の蓋を用いる）

5、リジン脱炭酸試験用培地（栄研マニュアル P123）

本培地粉末 14g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、小試験管に約 4～4.5 ml ずつ分注したのち、121°C、15 分間滅菌する。（※スクリー型の小試験管に分注したものを滅菌するが、このとき蓋をしっかりと閉めすぎないこと、完全に閉めてから、少し緩めると良い）

6、Simmons クエン酸ナトリウム培地（栄研マニュアル P107）

本培地粉末 24.2g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、小試験管に約 2～2.2 ml ずつ分注、121°C、15 分間の滅菌後、斜面に固める。（※すこし長めの小試験管に分注したものを滅菌する。蓋はアルミ缶の蓋を用いる）

7、Christensen の尿素培地（BBL）

尿素寒天基礎培地（栄研）2.4g に精製水 95ml を加え、加温溶解し、115°C、20 分間滅菌する。滅菌後、寒天培地を小型の恒温槽内で約 50～55 °C に保温しておく。アンプル 1 本分の尿素（液体）を無菌的にとり、50～55 °C に保温してある寒天培地に加えてよく混和したのち、予め乾熱滅菌した滅菌駒込ピペットで約 3 ml ずつ滅

菌小試験管分注し、半斜面に固める。※素早く分注しないと固まってしまう。

8、TSI 寒天培地（栄研マニュアル P99）

本培地粉末 60g に精製水 1000ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、小試験管に約 3 ml ずつ分注、121°C、15 分間の滅菌後、上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層になるように（半高層斜面）固める。（※スクリー型の小試験管に分注したものを滅菌するが、このとき蓋をしっかりと閉めすぎないこと、完全に閉めてから、少し緩めると良い）

9、King A 培地， King B 培地（栄研マニュアル P159）

本培地粉末を A 培地は 47g, B 培地 38g にそれぞれ 1%グリセリン水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち、加温溶解する。溶解した培地を十分混和し、2.0~2.5 ml ずつ小試験管に分注し、121°C、15 分間滅菌後、斜面に固める。

（King A 培地はスクリー型の小試験管に分注したものを滅菌するが、このとき蓋をしっかりと閉めすぎないこと、完全に閉めてから、少し緩めると良い）

（King B 培地はすこし長めの小試験管に分注したものを滅菌する。蓋はアルミ缶の蓋を用いる）

10、OF 培地（グルコース,マルトース,キシロース）（栄研マニュアル P71 参照）

OF 基礎培地（BBL）の粉末 9.8g に精製水 1000ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液とした後、加温溶解する。※所定の糖 10 g（1%）を加えて、よく振り混ぜた後（※糖は少し加温するとすぐに溶解する）、小試験管に 4~4.5 ml ずつ分注し、115°C、15 分間滅菌する。滅菌後は水で急冷し高層に固める。（※添加する糖は、必要に応じて変える。糖の濃度は通常 1 %、高価な糖は 0.5%にすることもある）

（※すこし長めの小試験管に分注したものを滅菌する。蓋はアルミ缶の蓋を用いる。3 種類の培地が区別できるように **G, M, X** と試験管に記載すること）

11、Kovacs Indole test reagents

iso-amyl alcohol	75 ml
para-dimethylaminobenzaldehyde	5 g
concentrated hydrochloric acid (HCl)	25 ml

VP test reagents

A 液：α-naphthol(6%) in absolute ethyl alcohol 100 ml

B 液：Potassium hydroxide(40%) containing 0.3% creatine 100 ml

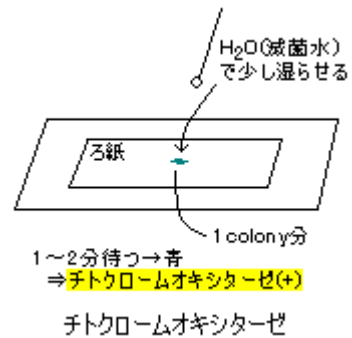
II. 分離培養 **Sample 1, 2, 3**（腸内細菌科細菌 3 菌種）と **Sample 4**

使用する寒天培地の表面に水滴等がないことを確認した後、Sample 1-4 を各々マッ

コンキーと DHL 寒天番地に画線塗抹し、37℃にて一夜培養する（各班で実施）。翌日、各々の寒天平板上の colony を観察・記録し、独立した colony を数個、寒天平板の裏から、丸で囲みマーキングする。コロニーの観察では、糖分解の判定も兼ねているので、注意して観察すること。その後、単独に分離した colony を選択し、チトクローム オキシダーゼ試験を実施する。平板は次週まで冷蔵庫に保存する。

チトクローム オキシダーゼ試験

チトクローム オキシダーゼ試験用濾紙（ニッスイ）の一片をシャーレに入れ、精製水を極少量滴下して濾紙全体を湿らせた後、新鮮な菌を白金耳でたっぷりつけて濾紙に塗布し、呈色の有無をみる。1分以内に深青色を呈したものを陽性とし、数分後にみられる淡青色は陰性と判定する。*E. coli* などの腸内細菌科の細菌は陰性、陽性であれば、ブドウ糖非発酵菌を疑う。



III. 確認培養

☆ 腸内細菌を疑う菌 (Sample 1 - 3) の同定法

分離した単一 colony を白金線で各確認培地に接種するが、この菌をとる行為を「釣菌」という。以下の操作はすべて白金線で行う。Sample 1, 2, 3 の DHL もしくはマッコンキー寒天培地上の菌をそれぞれ確認培地に接種し、それぞれ 37℃一夜培養する（この確認培養のことを IMViC 略す）。

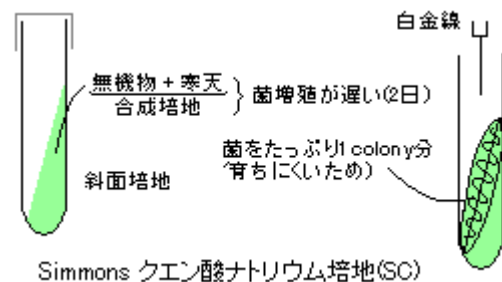
培養時には、スクリュキャップは少し緩めて培養しないと十分な発育がみられなくなるので注意する。

(1) Simmons クエン酸ナトリウム培地(SC)(栄研)

白金線で少し多めの菌を斜面部に塗布し、37℃一夜培養する。この培地は合成培地で増殖が遅いため、2 日以上経ってから判定する。この培地は合成培地であり、炭素源としてクエン酸ナトリウムを、窒素源としてリン酸二水素アンモニウムの利用能を試験する培地である。窒素源としてリン酸アンモニウムのみを、炭素源としてクエン酸アンモニウムのみを含む。

この培地には pH 指示薬として BTB が添加されている。この培地で生育できる菌は、クエン酸ナトリウムとリン酸アンモニウムの両方

方を利用できる菌体のみである。陽性菌は、リン酸二水素アンモニウムが減少することにより培地を深青色(アルカリ性)に変え、陰性の場合には緑色(中性)のままであ

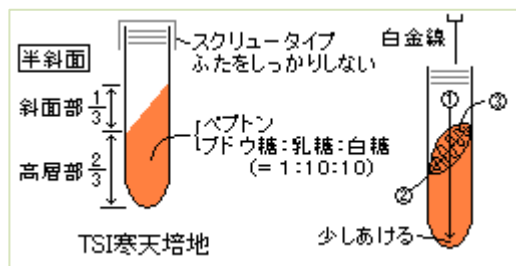


る。

(2) TSI 寒天培地(栄研)

白金線で微量の菌を高層に穿刺し、その後 斜面全面に菌を塗布した後、37°C一夜培養する。TSI 培地は三糖鉄(TSI:Triple Sugar Iron)寒天培地であり、ブドウ糖、乳糖および白糖分解性、ガス産生性、硫化水素産生性が同時に試験できる。上部 1/3 が斜面、下部 2/3 が高層(半高層斜面)からなる半高層斜面培地である。滅菌後の培地は、pH 指示薬としてフェノールレッド(PR)が添加されているため、オレンジ色を帯びた赤色となる。

この培地は、乳糖や白糖が 1%に対してブドウ糖が 0.1%と少なく含まれているので、ブドウ糖と乳糖の発酵の観察が同時にでき、斜面では乳糖・白糖産生性が、高層ではブドウ糖産生性が判定できる。さらに、高層では硫化水素産生性、ガス産生性も判定可能である。ペプトン中の含硫アミノ酸(シスチンなど)とチオ硫酸ナトリウムが含まれているので、硫化水素の産生は高層の黒変で判定する。産生された硫化水素は、硫酸第 1 鉄と反応して黒色の硫化鉄を形成するため、培地は黒変する。



判定は以下のように行う。

TSI寒天培地

糖を分解すると酸(pH↓)
↓
赤→黄(+)

乳糖・白糖の分解をみる
ブドウ糖の分解をみる

ブドウ糖:乳糖:白糖 = 1:10:10
↳ブドウ糖はすぐに枯渇(細菌は単糖から分解)

斜面/高層	+ / +	- / +
ブドウ糖	○	○
乳糖	○	×
白糖	○	×

黄/黄: + / +
赤/黄: - / +

二糖類を分解できない(ペプトンを分解 → NH₂ アルカリ(pH↑))
↓
黄→赤
斜面部全て
③日程経つと全体が赤に)

ガス(+) 硫化水素(+) H₂S(+)

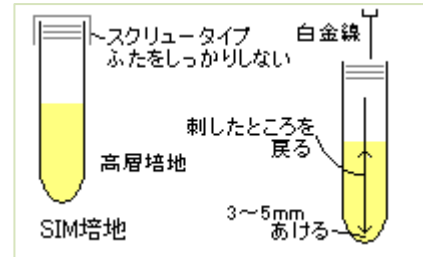
ガスを産生
硫化水素が発生すると高層部が黒くなる

(3) SIM 培地

白金線で微量の菌を高層の約 1/2 のところまで穿刺し、37°C一夜培養する。この培

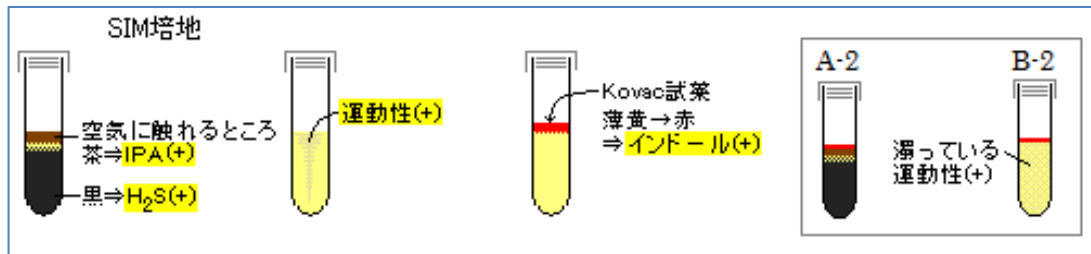
地で確認できる項目は、硫化水素(S)生産能、インドール(I)形成能、運動能(M)およびインドール・ピルビン酸(IPA)産生能である。硫化水素生産能を調べるための硫黄源は、培地に含まれるペプトン、チオ硫酸ナトリウムおよび塩酸シスチンに由来する。硫黄を含んだアミノ酸（メチオニン、システインなど）やチオ硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどを分解し、硫化水素を産生した場合には、高層部分が黒変する。これは、培地中に含まれる鉄イオンと硫化水素が反応し、硫化鉄を生じるためである。

IPA(indol pyrvic acid)反応は、トリプトファンを脱アミノ化しインドール・ピルビン酸を生成するかどうかを調べる反応である。培地上層部に茶色を生じた場合陽性である。この反応は、産生されたインドール・ピルビン酸が培地中の鉄イオンと結合し、酸素の存在下で褐色の生成物を生じるためである。この反応は、インドール試薬添加後では判定不能となるので注意する。



インドール反応は、菌がトリプトファン分解酵素であるトリプトファナーゼを産生するか否かを調べる反応で、培地にトリプトファンを豊富に含む SIM 培地が用いられる。培地に Kovacs 試薬を滴下して判定する。赤変すれば陽性である。

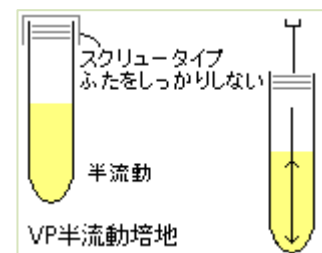
判定は以下のように行う。



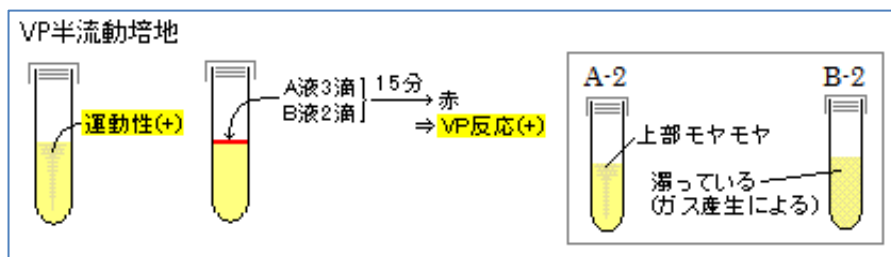
(4) VP 半流動培地

SIM 培地に準じて穿刺し、37°C一夜培養する。ただし *Yersinia* を疑う菌は 25°Cでも培養が必要である。この培地は SIM 培地同様、運動性を予備的に確認することができるが TSI 培地でガス産生が陽性の場合、運動性の有無は確認してはいけない。

VP(Voges-Proskauer)反応は、ブドウ糖からアセチルメチルカルビノール(アセトイン)を産生するか否かを調べる。アセトインは、強アルカリ下で酸化するとジアセチルを生成し、ジアセチルはクレアチニンと縮合反応して赤色の生成物を生じる。試験方法は、 α -naphthol(6%) in absolute ethl alcohol を 3 滴加えた後、Potassium hydroxide (40%) containing 0.3% creatine を 2 滴加え、赤色を呈したら VP 反応陽性である。



判定は以下のように行う。

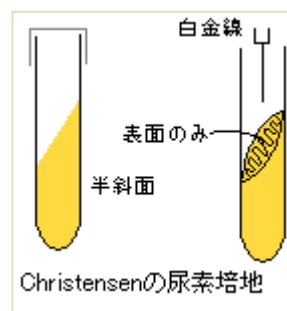


(5) Christensen の尿素培地

白金線で多めの菌を斜面部全面に塗布し、37°C一夜培養する。高層部には接種しない。尿素は熱に弱い(分解してしまう)ため、この培地を作成するときには、寒天抹に精製水を加えて加熱溶解、121°C15分間の加熱を行った後、尿素寒天基礎培地(BBL)の粉末に精製水を加え、マイレックスフィルターで濾過滅菌したものを混和する。

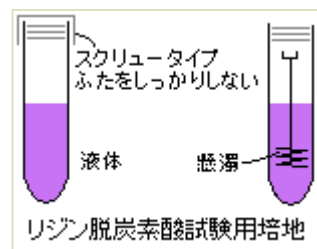
判定は以下のように行う。

黄色から桃色に変化すればウレアーゼ陽性である。2日以上経っても桃色にならなければ陰性と判定する。

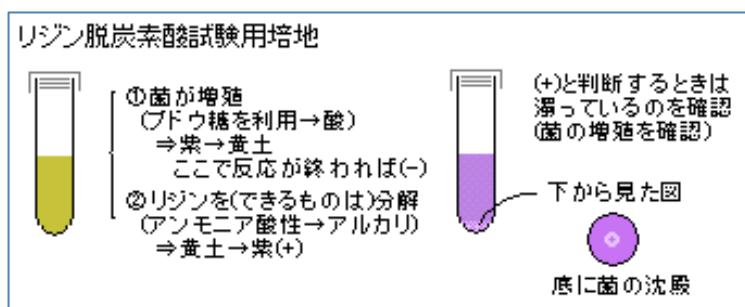


(6) リジン脱炭酸試験用培地

白金線で微量の菌を接種し、37°C一夜培養する。アミノ酸を利用できるかを知るために、脱炭素反応を見る。菌は最初、発育にブドウ糖を利用するため pH が下がり紫から黄土に変化する。このとき、試験管内は脱炭酸の至適 pH であり、ここでリジンを分解できるものは分解(脱炭素反応)を開始し、アンモニアが産生されて pH が上がり、再び紫色となる。黄土色は陰性、紫色は陽性と判定する。菌が発育して菌の沈殿や濁りがあることを確認してから判定を行う。



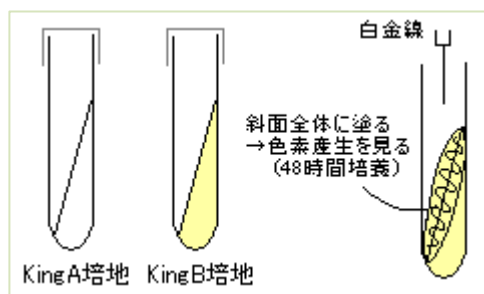
判定は以下のように行う。



III. 確認培養

ブドウ糖非発酵菌を疑う菌の同定法

TSI 培地、OF 培地、SC 培地、KingA,B 培地に接

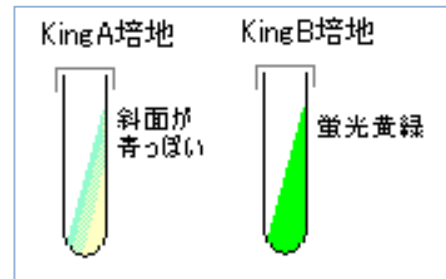


種する。

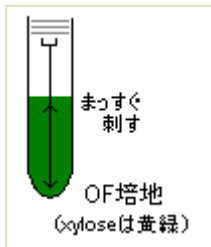
(1) KingA 培地、KingB 培地 (栄研)

KingA 培地、KingB 培地の斜面全面に菌を塗布し、37°C一夜培養後、色素産生を観察し、色素が確認できない場合は、48 時間培養を行う。

King 培地は、*Pseudomonas* 属用の色素産生確認培地であり、King A 培地は *P. aeruginosa* の産生する pyocyanine (青緑色) や pyorubin (赤色) の産生に適し、King B 培地は pyoverdin (蛍光黄緑色色素) の産生に好適な培地である。

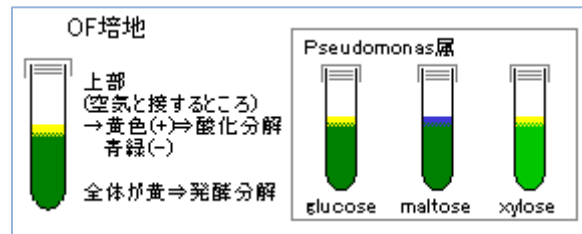


(2) OF 培地(glucose,maltose,xylose)(BBL 社)



菌を底部まで接種し、37°Cで 24~48 時間培養する。黄色に変化すると陽性、青緑色で陰性と判定する。全体が黄色に変化した場合、発酵分解(+)であるが、上部(空気と接する部分)のみが黄色に変化した場合は酸化分解(+)である。

判定は以下のように行なう。



【レポートについて】

今週は以下の点に注意して、レポートをまとめてください。

1. 腸内細菌科の定義と分類について
2. 各種確認培地の組成および判定法について
3. ブドウ糖非発酵菌の特徴と分類について
4. OF 培地と TSI 培地の関係について

薬剤感受性試験 (寒天平板拡散法)

-薬剤感受性試験および薬剤耐性菌の検出方法を学ぶ-

【実習内容】

- * 寒天平板拡散法
- * 薬剤耐性菌(MRSA, ESBL 産生菌)の同定方法

【今週の予習事項】

今週は、「薬剤感受性試験」および薬剤耐性菌の同定法を実習します。
米国臨床検査標準委員会（CLSI）の勧告法に準じた方法にて寒天平板拡散法の実習を行う。

I. 培地等の作製

班名	培地	作成量 (ml)	作成数
1 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚
2 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚
3 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚
4 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚
5 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚
6 班	ミューラヒントン寒天培地	200 ml	10 枚

チップ詰めと滅菌

【培地組成】

1、ミューラヒントン寒天培地

本培地の粉末 38.0g に精製水 1000 ml を加え、よく振り混ぜて均等浮遊液としたのち加温溶解し、121°C 15 分間滅菌する。滅菌後、恒温槽内で約 50 °C に冷ましてから約 20ml ずつシャーレに無菌的に分注し平板に固める。

II.方法

被検菌液の調整：一夜培養した菌(Sample1、2)を滅菌生食水に加えて、McFarland No.0.5 (1×10^8 CFU/ml)の濃度に調整する。滅菌綿棒を菌液に浸し、ミューラヒントン寒天培地一面に3方向から塗りひろげる。表面が乾いたら、火炎滅菌したピンセットを用いて、薬剤ディスクを置き、軽く押さえる。37°Cで24時間培養し、ディスク周りの阻止円の直径を測定する。

【使用薬剤】Sample1 は薬剤としてオキサシリン、セファロスポリン系薬剤(セフォ

キシチン)の2剤選択する。

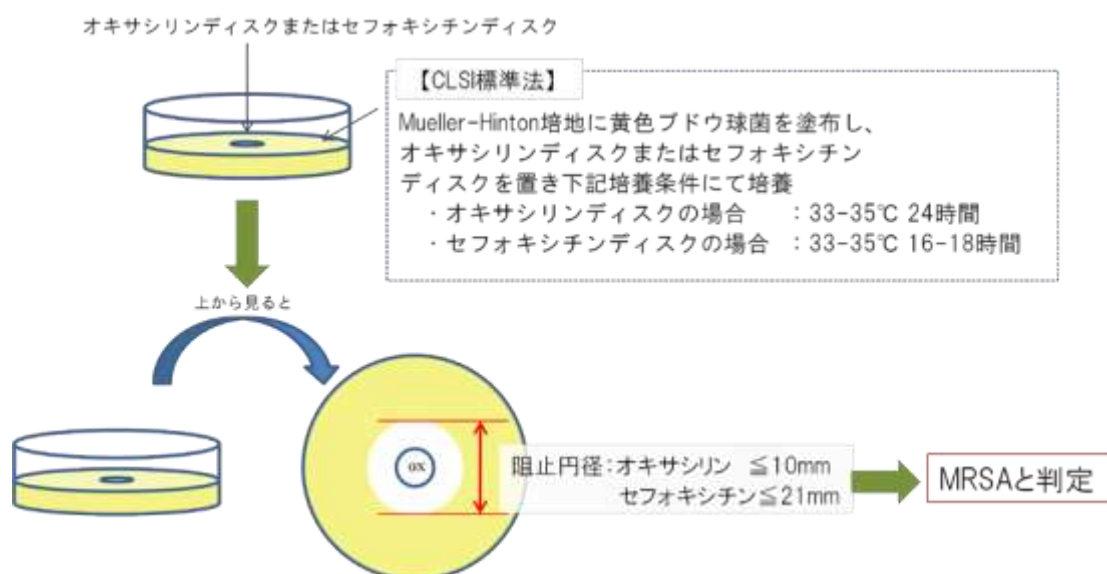


図2 ディスク拡散法によるMRSAの判定

【使用薬剤】Sample 2はセファロスポリン系薬剤(セフポドキシム, セフォタキシム)の2剤とセフォタキシムにβ-ラクタマーゼ阻害剤(クラブラン酸)を加えたものを選択する。

Cefotaxime (CTX)。

【追加資料】基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌のスクリーニング法および確認法を説明する

a) 基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌とは: ペニシリンおよびペニシリンより基質を拡張した抗菌薬として開発されたβ-ラクタム系抗菌薬 (主に第3世代セファロスポリン) を加水分解するβ-ラクタマーゼをいう。CLSI 勧告法では*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*と*Proteus mirabilis*の4菌種について規準が決められているが、実際には上記の4つの菌種以外にもESBLを産生するグラム陰性桿菌に多く存在するので注意が必要である。

b) ESBL スクリーニング法: ESBLの特徴は、Cefpodoxime (CPDX)、Ceftadizime (CAZ)やCefotaxime (CTX)のような第3世代セファロスポリンに対し耐性を示すため、これら3剤でスクリーニングを行なう。具体的には、CPDX (10 μg/ml)、CAZ (30 μg/ml)、CTX (30 μg/ml) 含有ディスクのいずれかを使用して感受性検査を行い、耐性であるかを判定する。*E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*であればCPDX ≤ 17mm、CAZ ≤ 22mm、CTX ≤ 27mm、*P. mirabilis*であればCPDX ≤ 22mm、CAZ ≤ 22mm、CTX ≤

27mm となれば ESBL を疑い、以下の確認検査を実施する。

c) ESBL 確認検査(ダブルディスクシナジーテスト, DDST 法) : CAZ (30 μ g/ml) または CTX (30 μ g/ml) とクラブラン酸 (CVA,10 μ g/ml) を含むディスクを使用し検査を行なう。クラブラン酸 (CVA,10 μ g/ml) を含むディスクの方が CTX のみよりも阻止円が 5mm 以上拡大すれば、CVA による阻害反応が生じたことが分かり “ESBL” と確認できる。

【レポートについて】

今週は以下の点に注意して、レポートをまとめてください。

1. 薬剤感受性試験の意義について
2. 抗菌薬の作用機序と耐性機序について
3. MRSA、ESBL について

真菌の分離・同定
-真菌の分離・同定を学ぶ-

【実習内容】

- * 真菌の培養
- * スライドカルチャー

【今週の予習事項】

今週は、「酵母様真菌」について予習して下さい。

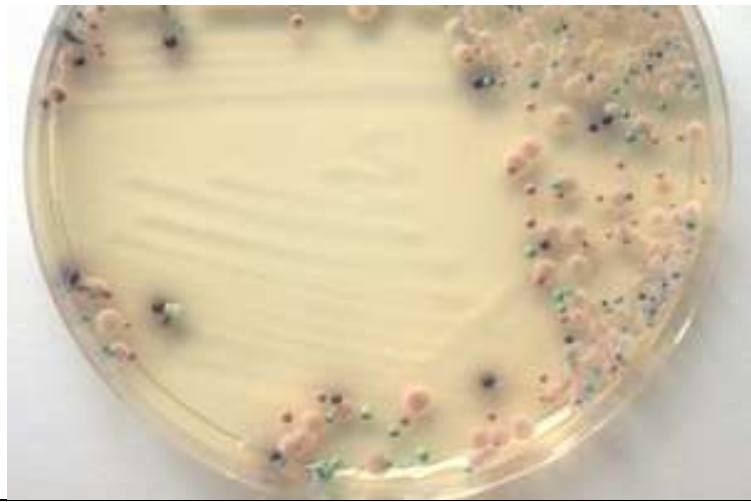
【培地の作製方法】

1、コーンミール寒天培地 (Sigma,ニッスイマニュアル P155 参照)

本培地粉末 17.0g と寒天沫 7g を精製水 1000 ml に加温溶解し、121°C、15 分間滅菌後、少し冷ましてから、Tween 80 を 0.1~0.3%の割合で無菌的に添加し、厚さ約 2 mm に平板に固める。(※いつもより少し薄めの平板を作ることがポイントである)

2. クロモアガーカンジダ (関東化学 K.K)

特異性の高い特殊酵素基質によって、カンジダ属の主要菌種を色分けする寒天平板培地である。培地上のコロニーの色により、主要なカンジダ属の推定が可能であり、分離培地上でコロニーの鑑別をすることで、検査の迅速化・省力化が図れる。この培地は、バックグラウンドが透明なので、コロニーの色が明瞭に観察できる。

菌名	典型的なコロニー所見
	
<i>C.albicans</i>	緑色のスムーズ型コロニー
<i>C.tropicalis</i>	中心部が濃青色のスムーズ型コロニーで周囲にハローを形成
<i>C.krusei</i>	ピンク色でラフ型コロニー

II. 分離培養

Sample 1 (*Cryptococcus neoformans*)

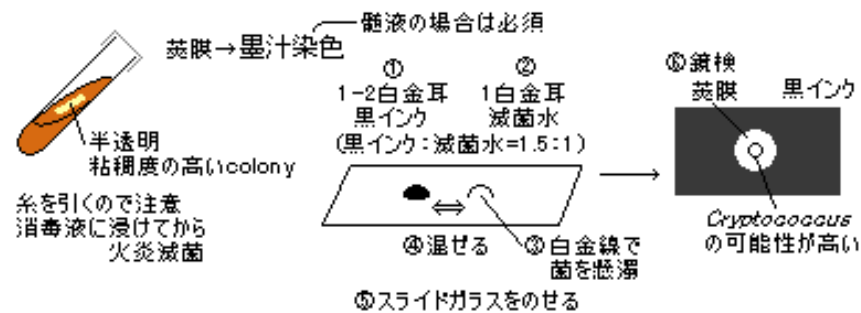
Sample 2 (*Candida albicans*)

Sample 1 は血液寒天平板に、Sample2 はクロモアガーカンジダ（関東化学 K.K）に塗布し、37°C、2〜3 日培養する。

Ⅲ. 確認培養

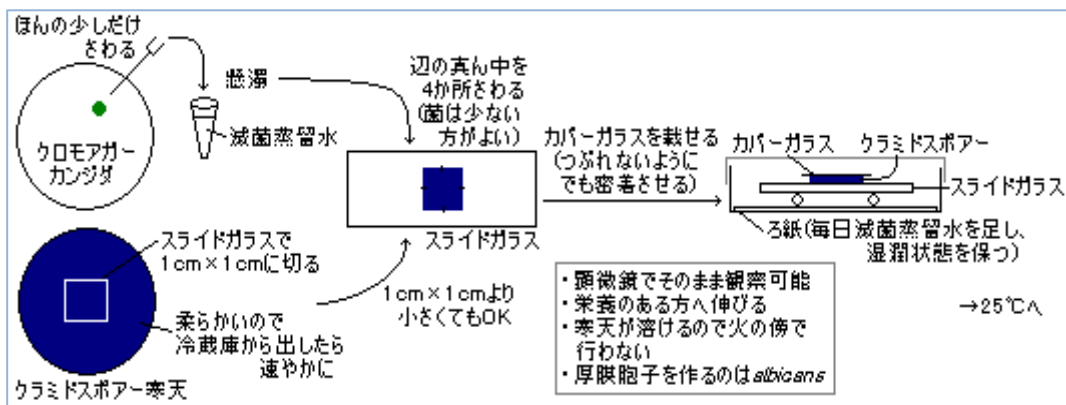
(1) *Cryptococcus neoformans* を疑う菌の同定

墨汁法による莢膜染色

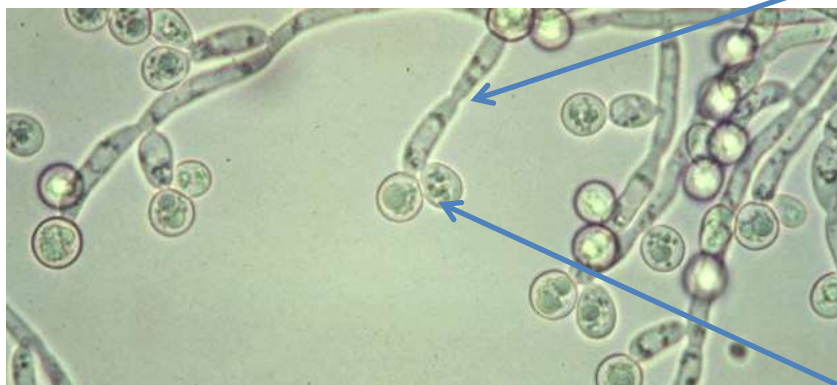


(2) *Candida albicans* を疑う菌の同定

クロモアガー寒天培地での培養およびスライドカルチャー



仮性菌糸



症例研究

症例 1：感染性腸炎を疑う

学習の目的：糞便の検査法を学ぶ

1. 腸管感染症の種類：健常人に発症する市中感染症としての下痢症を考える。
2. 下痢症の原因微生物とその疫学についてまとめる。
3. 腸管感染症に用いる検体を取り扱う上で注意すべき事項についてまとめる。
4. 糞便の肉眼的観察についてまとめる。

症例 1 は写真 1 のような糞便が届いた

→検体の肉眼的観察から得られる情報はなにか？

5. 分離培養に使用する分離選択培地を、使用目的ごとにまとめる。

症例 1 は、SS 寒天培地に分離培養し、写真 2 のようなコロニーをえた。また、コロニーのグラム染色所見は写真 3 のようであった。

→これらの所見から得られる情報はなにか？

6. 同定検査の結果、写真 4 のような所見を得た。

→菌種同定のために、追加すべき検査法になにか？まとめる。

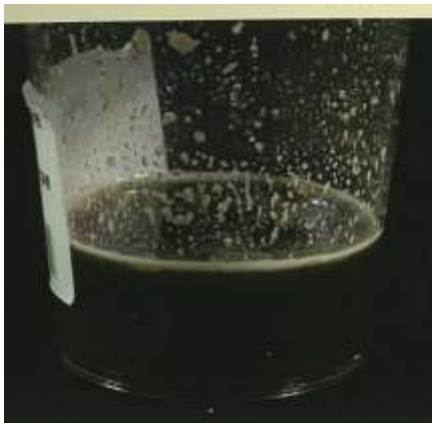


写真 1.



写真 2.

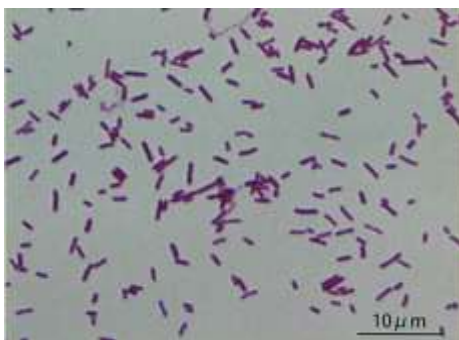


写真 3.



写真 4.

7. 本症例の推定菌種を述べ、本菌感染症の治療法や感染対策についてまとめる。

症例 2：抗菌薬関連下痢症を疑う

学習の目的：糞便の検査法を学ぶ

6. 下痢の種類：免疫が低下している長期入院患者を中心に発症する抗菌薬関連下痢症を考える。
7. 肺炎治療のためセファロスポリン系薬を投与された患者が3日後に発熱、腹痛、下痢を訴えらので、大腸内視鏡を実施(写真1. 黄白色の偽膜が認められた)。
8. 抗菌薬投与後に発生する下痢の原因菌についてまとめる。
9. 糞便のグラム染色所見についてまとめる。

症例1は写真2のような糞便が届いた

→検体の肉眼的観察から得られる情報はなにか？

10. 写真3のGram染色所見から考えられる原因菌は？
11. 分離培養に使用する分離選択培地と培養方法について考える。
7. 同定検査とともに、写真4のようなイムノクロマト法による毒素検出をおこなった。
→本症例の推定菌種と毒素検出を行う意義についてまとめる。

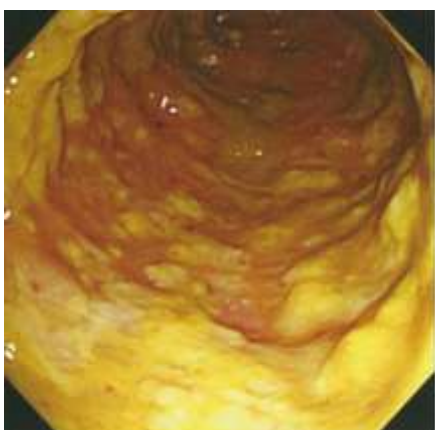


写真1.



写真2.

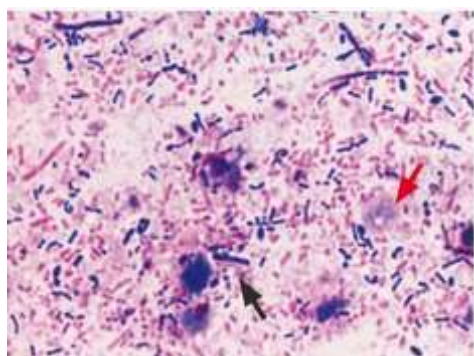


写真3. (矢印赤は白血球、黒は菌体)



Toxin 陰性

Toxin 陽性

写真4. イムノクロマト法による毒素検出

8. 本菌感染症の治療法や感染対策についてまとめる。

症例3：尿路感染症を疑う

学習の目的：尿の検査法を学ぶ

尿路感染症の種類：腸管由来菌が尿道から上行性に膀胱内に侵入し、炎症が生じるのが膀胱炎、感染がさらに尿管を経て腎盂に及んだ場合、腎盂腎炎とよばれる。

12. 尿路感染症の原因微生物についてまとめる
13. 尿検体を取り扱う上で注意すべき事項についてまとめる。
14. 尿の肉眼的観察についてまとめる。
15. 症例 3 は写真 1 のような尿の直接塗抹のグラム染色所見を得た
→ 検体の肉眼的観察から得られる情報はなにか？
16. 写真 2 は BTB 乳糖加寒天培地(左)とマッコンキー寒天培地上のコロニー。 写真 3 は BTB 乳糖加寒天培地の拡大写真
→ このコロニー所見から推定できる原因菌は？
6. 同定検査の結果、写真 4 のような所見を得た。
→ 本症例の推定菌種と毒素検出を行う意義についてまとめる。



写真 1.

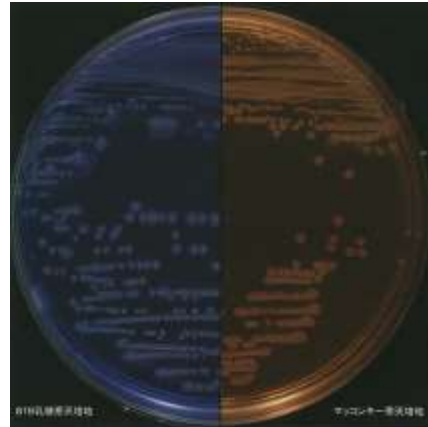


写真 2.

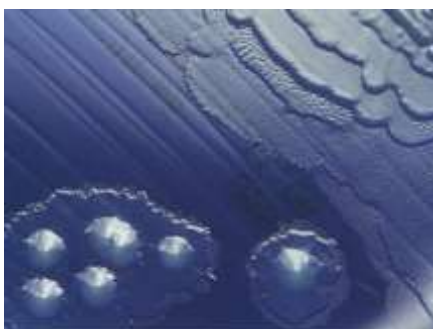


写真 3.



写真 4.

7. 尿中菌数定量培養の意義について考える。
8. 本菌感染症の治療法や感染対策についてまとめる。

症例 4：肝膿瘍を疑う

学習の目的：膿の検査法を学ぶ

検体の種類：感染部位が深部臓器や体腔と体表や粘膜面を含む表在部位に大別できる。

1. 深部臓器に膿を生ずる原因菌についてまとめる。
2. 検体を取り扱う上で注意すべき事項についてまとめる。
3. 症例 4 の入院時の CT 所見は写真 1 のような腫瘍が認められた(矢印赤)
4. 材料の直接塗抹のグラム染色所見を得た
→検体の肉眼的観察から得られる情報はなにか？
5. 写真 3 マッコンキー寒天培地上のコロニーを白金耳で釣菌したところ。
→この所見から推定できる原因菌は？
6. 同定検査の結果、写真 4 のような所見を得た。
→本症例の推定菌種はなにか？



写真 1.

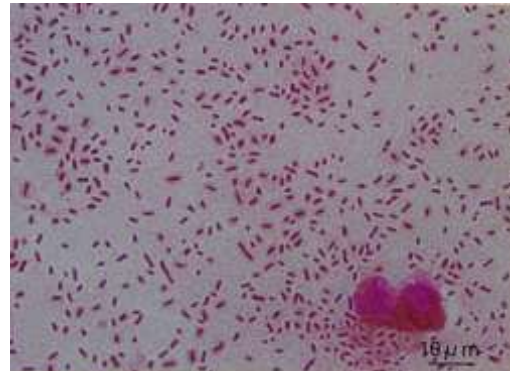


写真 2.



写真 3.



写真 4.

7. 本菌感染症の治療法や耐性菌についてまとめる。

症例 5：肺炎を疑う

学習の目的：喀痰の検査法を学ぶ

下気道感染症の種類：気管支炎、肺炎、肺膿瘍および膿胸がある。患者背景から市中肺炎、院内肺炎、誤嚥性肺炎、人工呼吸器関連肺炎、医療介護関連肺炎に分類され、原因微生物に相違がある。

17. 5つに分類される肺炎の疫学と原因微生物についてまとめる。

18. 喀痰検体を取り扱う上で注意すべき事項についてまとめる。

19. 喀痰の外観的観察についてまとめる。

症例5は市中肺炎が予想され、写真1のような喀痰が届いた

→検体の外観的観察から得られる情報はなにか？

4. 喀痰の直接塗沫のグラム染色所見は写真2のようであった。

→これらの所見から得られる情報はなにか？

5. 羊血液寒天培地上のコロニーは写真3、4であった。

→菌種同定のために、追加すべき検査法(迅速検査も含む)になにか？まとめる。



写真 1.

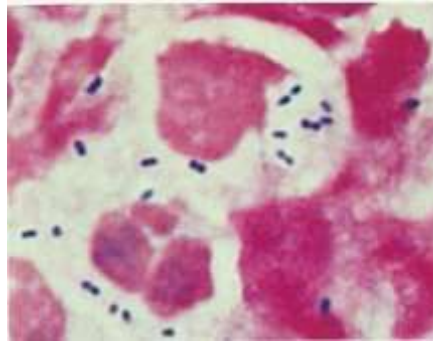


写真 2.

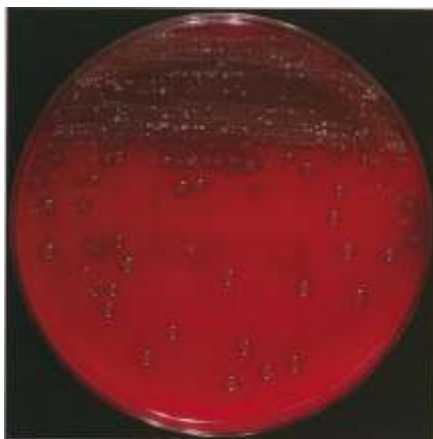


写真 3.



写真 4.

6. 本症例の推定菌種を述べ、本菌感染症の治療法と耐性菌についてまとめる。

症例7：細菌性髄膜炎を疑う

学習の目的：髄液の検査法を学ぶ

必要な臨床症状は発熱、頭痛、嘔吐、項部硬直、Kernig 徴候、Brudzinski 徴候などの髄膜刺激症状。採取した髄液は細胞数計測と分画、髄液糖・蛋白量の測定、グラム染色を行う。

20. 細菌性髄膜炎の疫学と原因微生物(年齢との関連性)についてまとめる。

21. 検体を取り扱う上で注意すべき事項についてまとめる。

22. 髄膜炎の検査法についてまとめる。

症例 7 は髄膜炎が疑われ、検査室に髄液が届いた

→細胞数計測と分画、髄液糖・蛋白量の測定から得られる情報はなにか？

4. 髄液の直接塗沫のグラム染色所見は写真 1 のようであった。

→これらの所見から得られる情報はなにか？

5. チョコレート寒天培地(左)と羊血液寒天培地(右)上のコロニーは写真 3 のようであった。

→菌種同定のために、追加すべき検査法(迅速検査も含む)になにか？についてまとめる。

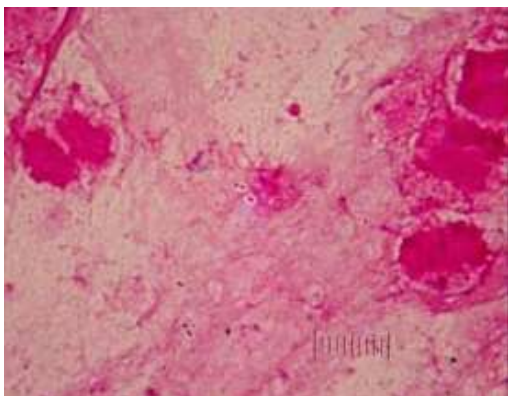


写真 1.

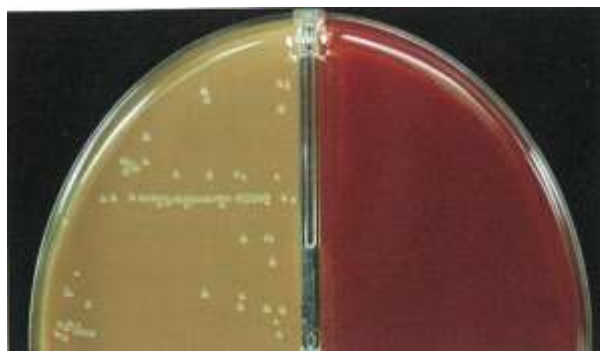


写真 2.

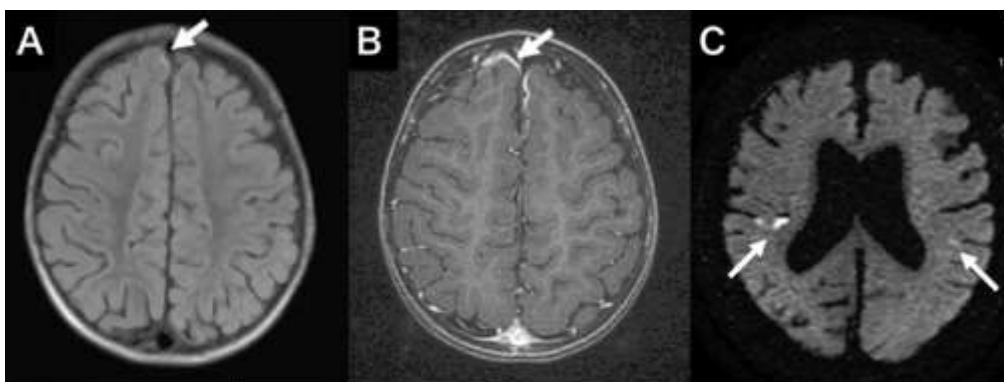


写真 3. MRI 画像. A: FLAIR, B: 造影 T1 強調画像, C: DWI

6. MRI 画像所見についてまとめる

7. 本症例の推定菌種を述べ、本菌感染症の予防法と耐性菌についてまとめる。