

## 微生物部門

### 精度管理事業委員

白石 了三

半田市医師会健康管理センター

TEL (0569) 27-7965

### 実務委員

多和田 行男	国立名古屋病院
河合 浩樹	厚生連足助病院

## 微生物検査の精度管理調査

### <はじめに>

微生物における平成 11 年度精度管理事業としては、愛知県下施設における腸管系病原菌の同定を実施した。感染症を取り巻く状況が大きく変化し、感染症新法が 1999 年 4 月から実施された。腸管感染症の分野でもその変貌は著しく旧法定伝染病は発生数は減少したが、サルモネラ症やコレラは再興感染症として増加してきた。本サーベイは、わが国でも最も多い食中毒原因菌であるサルモネラ菌について検査方法及び、検査室の現状把握を目的として、その結果を踏まえて解析した。

### <参加施設>

今回のサーベイは、愛知県下 59 施設を対象とした。

### <対象菌株>

試料 1 は、トリプトソイブイオンを用いて *Salmonella* Enteritidis  $1 \times 10^5$ /ml になるように調整し試料とした。これをキャリア・ブリア培地に採取して検体とした。試料 2 は、トリプトソイブイオンを用いて *Salmonella* Oranienburug  $1 \times 10^5$ /ml になるように調整し、試料とした。今回は、わが国でも卵が原因で問題となっている *Salmonella* Enteritidis (リジン陰性)、昨年いか葉子から検出された *Salmonella* Oranienburug 等各検査室にて、いつ検出されても不思議でない菌を試料とした。尚試料 1, 2 は臨床分離株を用いた。

### <結果>

試料 1, 2 の分離培地を図 1 に示す。SS 寒天培地・TCBS 寒天培地は、ほぼ全ての施設において使用されている。しかし 1 施設においては、BTB 乳糖加寒天培地のみでの使用で他の選択分離培地は使用されていなかった。サルモネラ菌の分離培地は、各社市販されており、SS 寒天培地の選択性が強く最も優れているが、本培地で発育が障害される場合もあるのでやや選択力の弱い、DHL 寒天培地・マッコンキ寒天培地・BTB 乳糖加寒天培地などを併用することが望ましい。

同定機器・キットに関しては(図 2) 26 施設が自動機器による同定を実施しており、40 施設が各種キットによる同定を実施している。又 4 施設は全く使用されていなかった。

従来法の同定検査においては(図 3) 半数程度の施設が TSI 等の確認培地を使用されていた。

各種の同定機器、キットは確率的な数値同定より菌名が同定されるようになっており、サルモネラ(シゲラ spp も含)に限っては主性状が得られる従来法の導入が望ましい。サルモネラのような腸内細菌科細菌では、一次スクリーニング検査として、TSI 寒天、LIM 寒天、普通寒天斜面(チトクロームオキシダーゼ試験および血清学的検査用)を用いる。チトクロームオキシダーゼテストは、糖を含む培地上のコロニーから直接実施すると、偽陰性になるので、普通寒天

培地等を使用すべきである。今回配布した *S. Enteritidis*, *S. Oranienburg* については硫化水素陽性だが、硫化水素の判定は T S I やクリグラー培地で判定するのが一般的である。S I Mからの硫化水素産生は参考にする程度が良い。免疫血清においては、95%の施設が使用されており、スライドラテックス凝集反応によるサルモネラ鑑別キットサルモネラ L A についても 12%の施設が使用されていた。サルモネラ L A は検体中のサルモネラ鞭毛と特異的に反応して凝集を示す迅速キットで、サルモネラと推定される性状を示す選択培地上のコロニーをそのまま検体として実施する。非特異的反応も少ないが、同定は生化学的性状によって実施する必要がある。

図 4 に試料 1、2 のリジン脱炭酸反応の結果を示す。

通常 *S. Enteritidis* はリジン脱炭酸反応が陽性だが、今回の試料においてはリジン脱炭酸反応が欠損している菌株なので、陰性となるはずだが、4 施設では陽性と判定されていた。*S. Oranienburg* においては、リジン脱炭酸反応を実施された全ての施設が陽性と解答されていた。

サルモネラ免疫血清の有無を図 5 に示す。

3 施設においては免疫血清を全く保持していなかった。サルモネラが陽性に出たときの対応方法としては、1) 保健所で確認してもらう。2) 外注に出す。3) 近隣の病院においてお願いする。であり、検査ルートは確立されていた。

免疫血清を保持している施設において、使用状況を図 6 に示す。

○ 群血清 V i 血清をセットにした 1 号、腸チフス菌、パラチフス菌 A 菌同定用の 7 号、H 血清をセットにした 2 号が多く使用されていたが、単品で使用している施設もみられた。

血清型別実施状況を図 7 に示す。

○ 抗原、V i 抗原のみ実施していた施設が 2 8 施設、H 抗原 (1 相菌) まだが 2 1 施設、H 抗原 (相誘導による 1 相菌、2 相菌チェック) まだが 7 施設であった。今回配布した *S. Enteritidis*, *S. Oranienburg* のようなチフス菌、パラチフス A 菌以外の非チフス性サルモネラの場合は、通常 ○ 多価血清と各 ○ 血清による凝集反応を行うだけで、それ以上の検査をする必要がないと考えられるが、重症例や疫学的に必要な場合は H 抗原の決定を行うことが望ましい。

図 8 にチフス性サルモネラの疑いの場合に対して自施設で H 型別を実施していない対応方法を示した。全ての施設において検査ルートは確立されていた。

各施設保有のサルモネラ免疫血清使用期限は、32% (18 施設) において使用期限切れであった。2 類感染症であるチフス菌、パラチフス菌が含まれるサルモネラを検査する上では使用期限内のものであることが望ましい。精度管理の原点だと思われる。

同定結果、及び血清型の結果は (図 9、図 10) に示したとおりである。

今回は同定結果を基に集計したが、*S. Typhi*, *S. Paratyphi A* が同じ O 9 群に含まれているので、*Salmonella* sp, *Salmonella* O9 群と報告された場合でも、各施設のルールで *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* が否定されていると認識されればよいと思われる。しかし、*Citrobacter* sp, *Citrobacter freundii* と解答された施設が 3 件あり、再度検査の見直しが必要であると思われる。

*Salmonella* spp の血清型別は現在 2000 種にも及んでいる。*Salmonella* spp の記載方法だが、菌種名には血清型名称が使用されてきたが、近年分離学的立場よりヒトの疾患と関連があるもの（亜種 I）が *Salmonella choleraesuis* subsp.*choleraesuis* と改められた。例えばエンテリティディス菌は *Salmonella choleraesuis* subsp.*choleraesuis* serovar Enteritidis.しかし最近になってさらに *Salmonella enterica* subsp.*enterica* へと変更された。日常の検査や学術論文にこのような長い菌名を書いてはられないので、日常の血清型の記載については、日本サルモネラセンターでは *Salmonella* serover Enteritidis 又は *Salmonella* Enteritidis と表現する。また学術論文の属名は最初の記載のみを完全つづりとして後の属名は頭文字だけでよいとする決まりがある。しかし日常で使用している報告書に関しては臨床側に分かっただけさえすればよいのでこの限りではない。

表 1 に参考図書を示す。

#### <まとめ>

全体的にほとんどの施設が高いレベルに達するものと思われた。サルモネラはチフス症などを含み発生件数も多く自動機器や簡易キットばかりに頼らず今一度従来法を併用して迅速同定していくことが必要であり、いずれの施設でもこれらの病原菌を最終同定できるようにサルモネラ免疫血清を常備しておくことが必要である。また、S.Oranienburg やリジン脱炭酸欠損株 S.Enteritidis 等の菌種はいずれの検査室においても日常検出されうる菌であるので、検査手順を今一度再確認してはどうかと思われる。最後に細菌検査に掛かるコストは、時代と共に上昇している。今後はいかに低コストで信頼性のあるデータを提供できるかをテーマに検査マニュアル等の情報公開が必要になってくると思われる。

#### <謝辞>

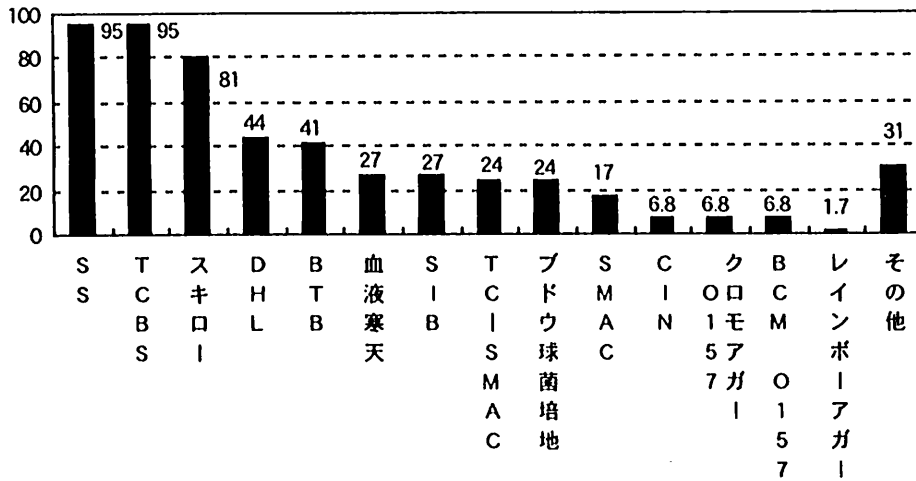
本サーベイに参加していただいた各施設の皆様に厚く御礼申し上げます。

#### <参考文献>

- 1) 善養寺浩 他：腸管系病原菌の検査法 第 4 版.医学書院.1985
- 2) 犬塚和久：糞便検査.検査と技術 22：983-990 1994
- 3) 坂崎利一：Salmonella の新しい分類と血清型リスト (Kauffmann-White schdema) の変更.メヂヤサークル 30：198-205.1985
- 4) 工藤泰雄：Salmonella Enteritidis による胃腸炎.臨床検査 39：1050-1053.1995
- 5) 相楽裕子：急性胃腸炎の診断プロトコル 27：488-497.1999

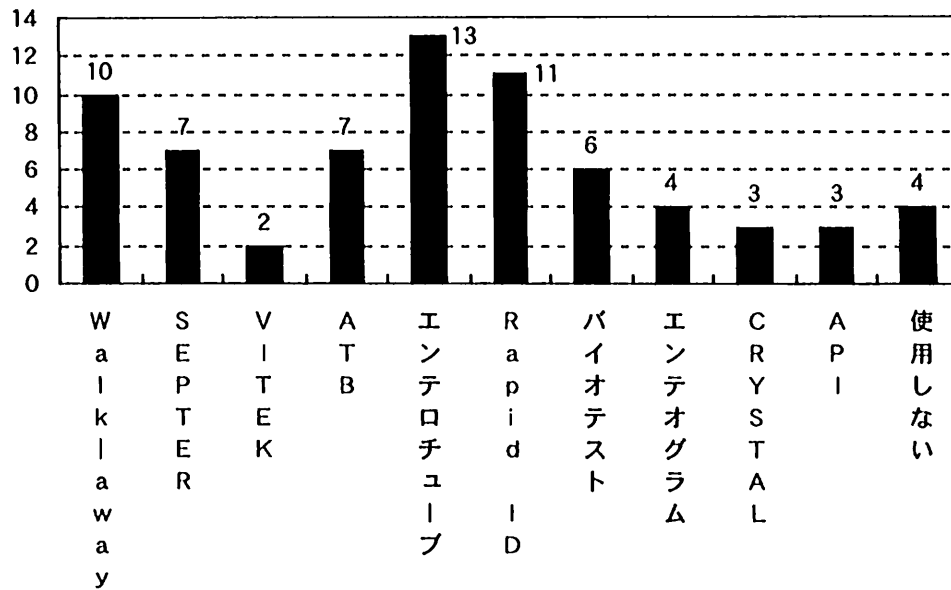
(%)

図1 使用培地



(件)

図2 同定機器・キット使用件数



(%)

図3 従来法実施率

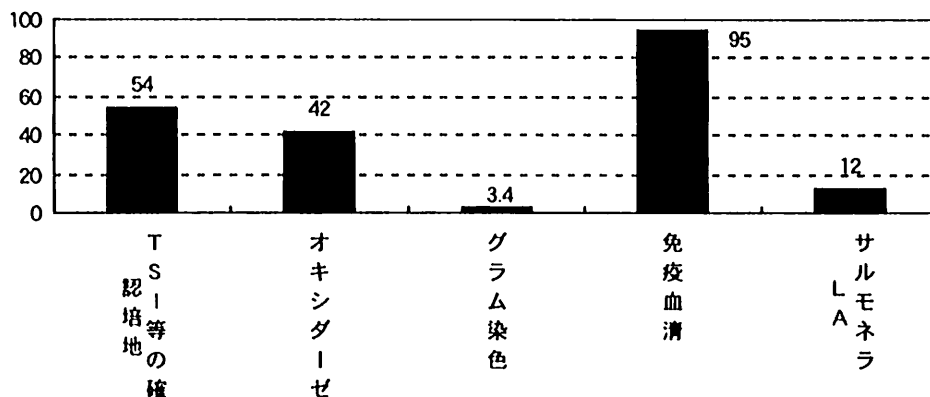


図4 試料1,2のリジン脱炭酸反応結果

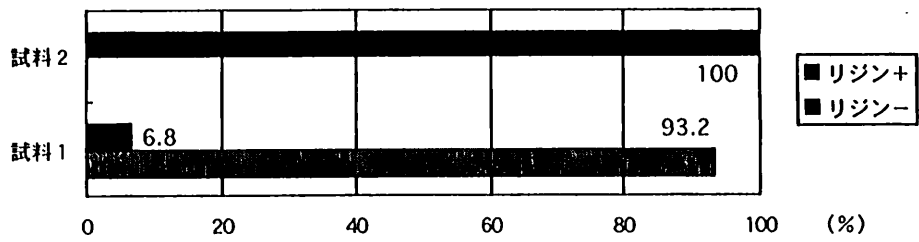


図5 サルモネラ免疫血清の有無

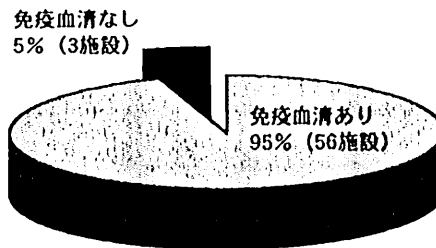


図6 サルモネラ免疫血清使用状況

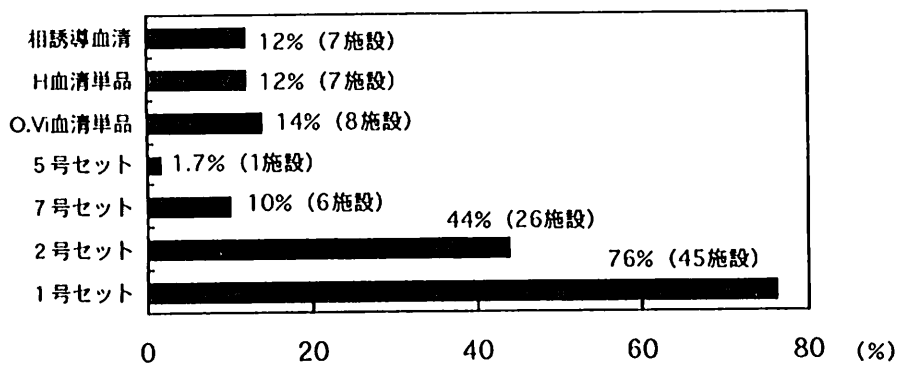


図7 血清型別実施状況

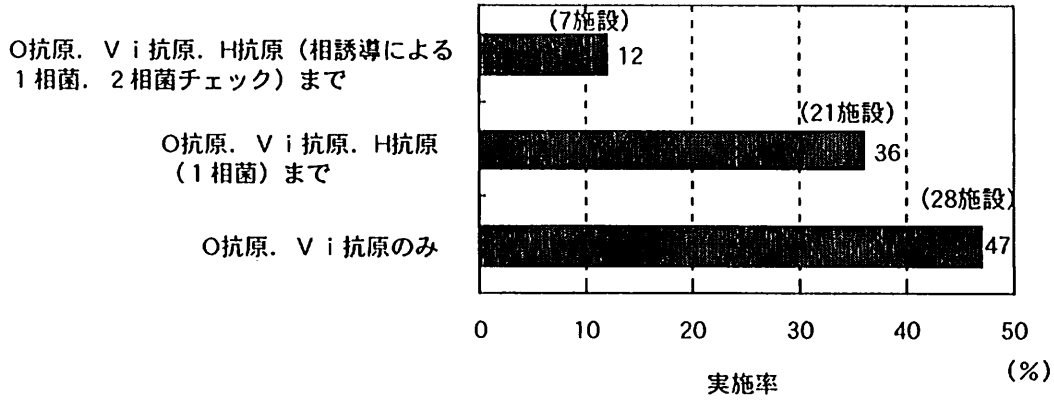


図8 H型別を実施していない施設の対応方法

(法定伝染病サルモネラ菌の疑いの場合に対して)

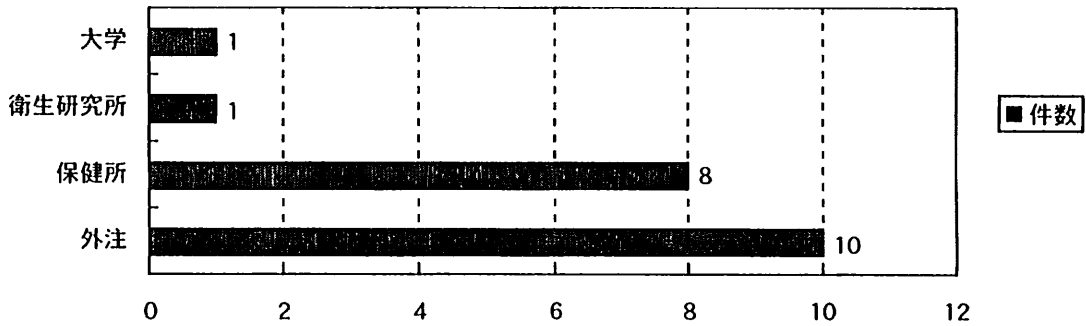


図9 試料1同定結果

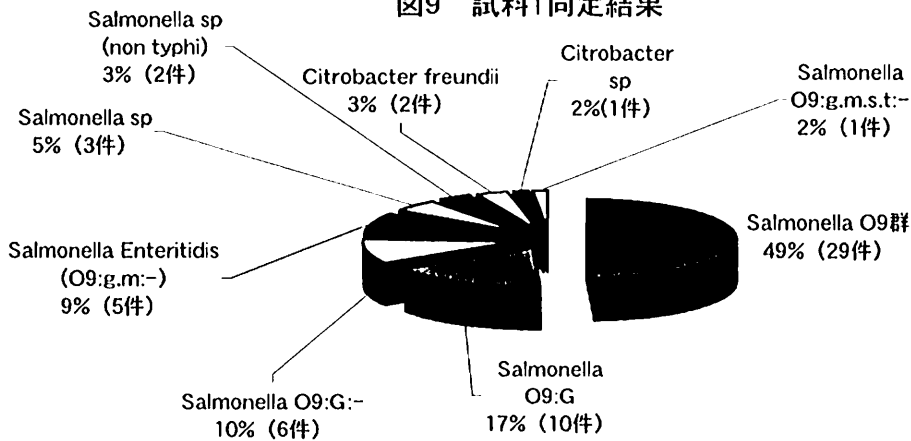


図10 試料2同定結果

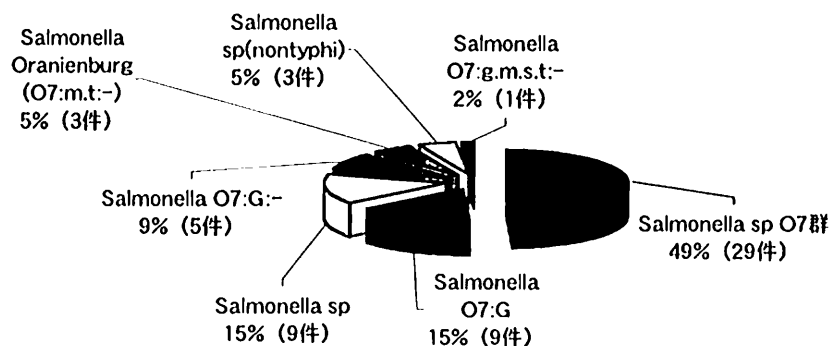


表1 参考図書

・微生物学/臨床微生物学 (1991)	5施設	・臨床検査 (1985)	1施設
・糞便カラーアトラス		・現代の医微生物学 (1987)	1施設
厚生連安城厚生病院微生物検査室 (1997)	5施設	・検査技術全書7	
・臨床微生物検査ハンドブック (1996)	5施設	微生物臨床検査学/微生物学 (1989)	1施設
・院内マニュアル	4施設	・微生物検査 (1979)	1施設
・微生物検査必携 細菌・真菌検査 (1987)	4施設	・腸内細菌 (1992)	1施設
・グラッドウォール臨床検査学 微生物学 (1988)	3施設	・検査と技術 サルモネラの検査法 (1999)	1施設
・医学細菌同定の手引き (1993)	3施設	・日臨技菌株サーベイテキスト (1974)	1施設
・腸内細菌 (II) 各論1. Salmonella属 (1985)	3施設	・病原微生物検出情報 月報 (1999)	1施設
・カラーアトラス 微生物検査 (1996)	2施設	・デンカ生研 サルモネラ構造表	1施設
・腸管系病原菌の検査法 (1985)	2施設	・EIGHTH EDITION BERGY'S	
・新臨床検査技術講座11 (1991)	2施設	MANUAL OF DETERMINATIVE	
・戸田新細菌学 (1993)	2施設	BACTERIOLOGY (1975)	1施設
・標準微生物学 (1999)	2施設	・WHO COLLABORATING CENTRE	
		FOR REFERENCE AND RESEARCH	
		ON SALMONELLA (1984)	1施設