

# 微 生 物 部 門

## 精度管理事業委員

笹野 正明

岡崎市民病院

TEL 0564-21-8111 内線 ( 7136 )

# 微生物検査の精度管理調査

## 【はじめに】

平成 17 年度は細菌性下痢症の原因菌を対象として 2 種類の菌株における同定・薬剤感受性検査およびフォトサーベイ、アンケートを実施した。

## 【参加施設】

今回のサーベイは愛知県下 75 施設を対象とした。

## 【対象菌株】

試料 1 *Escherichia coli* 血清型 O26 型 VT1(+) VT2(-)

試料 2 *Salmonella* sp. (血清型 O4 群)

試料には、臨床分離株の 2 菌種 2 菌株を用い、仮想の臨床経過を想定して出題した。

試料 1 および試料 2 は単一な 1 コロニーを血液寒天平板で 18 時間培養した後、それぞれの菌をスティックで輸送培地（プロコート 栄研器材）に採取したものを試料とした。

なお出題前に行なった薬剤感受性試験の確認は CLSI 法に従い、ディスク法は KB ディスク、MIC 法は栄研化学のドライプレートを使用した。

## 【調査目的】

- ・ 細菌性下痢症の原因菌である 2 菌種についてどのように同定がなされているか
- ・ ペロ毒素の産生確認検査が実施されているか
- ・ 同定検査を実施したうえで、適正な薬剤感受性の成績を臨床に反映させているか
- ・ 感染症法の解釈について
- ・ 貴重症例の観察

## 1. 試料 1 の設問 同定検査サーベイの実施

### 1) 菌株の由来

12 歳男性 腹痛、下痢のため来院した。提出された検体は水様性の下痢便で一部鮮血が認められた。本菌は便の培養で分離された。

2) 試料1の同定検査

試料1の成績菌名を(表1)に示す。

成績菌名(表1)

成績菌名	件数	%
<i>Escherichia coli</i> , Verotoxin-producing	45	60.0
<i>Escherichia coli</i>	13	17.3
腸管病原性 <i>Escherichia coli</i>	12	16.0
<i>Escherichia coli</i> , enteropathogenic	1	1.3
<i>Escherichia coli</i> , enterotoxin-producing	1	1.3
未記入	3	4.0
総計	75	100

未記入の3施設を除く72施設全てにおいて *Escherichia coli* とする成績が得られた。本菌種の同定はどの施設も一定の水準が保たれていると思われる。

試料1の測定機器を(表2)に示す。

測定機器(表2)

測定装置	件数	%
用手法	22	29.3
マイクロスキャン Walk Away 40 Walk Away 40SI	15	20.0
マイクロスキャン Walk Away 96 Walk Away 96SI	8	10.7
マイクロスキャン オ - トスキャン 4	3	4.0
RAISUS(ライサス)	2	2.7
バイテック 60,120,240,480	5	6.7
ATB Expression, miniAPI	7	9.3
バイテック 32, JR	3	4.0
バイテック 2, バイテック 2XL	3	4.0
クリスタルリーダー	1	1.3
BD フェニックス	2	2.6
未入力	4	5.4
総計	75	100

用手法で同定を行なった施設が22施設(29%)、自動機器を用いて同定を行なった施設は48施設(65%)と自動機器が多く使用されていた。

試料1の成績菌名とペロ毒素産生試験・血清型別試験の実施数を示す。(表3)

なおペロ毒素産生試験・血清型別試験の実施数は設問3から引用

菌名と血清型別・ペロ毒素産生確認試験の有無(表3)

成績菌名	回答数	ペロ毒素産生確認試験実施数	血清型別試験実施数
<i>Escherichia coli</i> , Verotoxin-producing	45	44	45
<i>Escherichia coli</i>	13	2	11
腸管病原性 <i>Escherichia coli</i>	12	1	12
<i>Escherichia coli</i> , enteropathogenic	1	0	1
<i>Escherichia coli</i> , enterotoxin-producing	1	1	1
総計	72	48	70

ペロ毒素産生試験を実施している施設は72施設中48施設(67%)、実施していない施設は24施設(33%)であった。成績菌名別では、*Escherichia coli*, Verotoxin-producingと回答した施設中、1施設を除いてすべての施設でペロ毒素産生確認試験を実施しておりペロ毒素の産生が確認されていた。他の成績菌名を書いた施設27施設のうち4施設(7%)でペロ毒素産生確認試験が実施されていた。血清型別試験は、72施設中70施設(97%)、実施していた。

平成13年度の愛臨技コントロールサーベイにおいては、参加施設中48%の施設でペロ毒素産生確認試験が実施されていたが、今回のサーベイでは参加施設中67%の施設でペロ毒素の産生性が確認されていた。

試料1の付加コメントを示す。(表4)

付加コメント(表4)

起炎性の可能性がある	6
起炎性の可能性がきわめて高いと考えられる	56
病院(院内)感染防止対策上、極めて重要な菌であると考えられる	25
病院(院内)感染防止対策上、本菌の重要性は不明である	1
3類感染症として取り扱う	50
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要がある	32
保健所長を経由して都道府県知事に届け出る必要があるかどうか不明である	1
3類感染症の可能性はあるが、院内で対応ができないので検査を外注する	11

付加コメントとペロ毒素産生確認試験実施数（表5）

付加コメント	回答数	ペロ毒素産生確認試験実施数	未実施
3類感染症として取り扱う	50	48	2
3類感染症の可能性はあるが、院内で対応ができないので検査を外注する	11	0	11

感染症法3類に関するコメントを記載した施設は61施設あった。“3類感染症として取り扱う”と解答した50施設のうち、ペロ毒素産生確認試験の結果記載の無い施設が2施設あった。腸管出血性大腸菌症の届出基準では、分離された大腸菌のペロ毒素産生性を確認し、ペロ毒素を検出する必要がある。

試料1の菌株は、グラム陰性桿菌 運動性有り。好気性および通性嫌気性。カタラーゼ陽性。オキシダーゼ陰性。血清型別 O26型 ペロ毒素 VT1(+) VT2(-)。ペロ毒素を産生する大腸菌であることから、感染症法3類感染症の起因病原体である腸管出血性大腸菌と同定される。直ちに医師に報告し保健所に届け出る必要がある。

## 2. 試料2の設問 同定検査・感受性サーベイの実施

### 1) 菌株の由来

菌株由来：22歳女性 腹痛、下痢、発熱を主訴とする急性胃腸炎が疑われた。本菌は泥状便の培養で分離された。

### 2) 試料2 同定検査

試料1の同定検査菌名と測定装置を（表6）に示す。

同定検査菌名と測定装置（表6）

成績菌名	件数	%
<i>Salmonella sp.</i>	70	93.3
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Enteritidis	3	4.0
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Typhimurium	1	1.3
未記入	3	4.0
総数	75	100

未記入の3施設を除く72施設全てにおいて *Salmonella sp* とする成績が得られた。本菌種の同定はどの施設も一定の水準が保たれていると思われる。しかし、4施設において

*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis

*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium

の菌名の記入があった。この菌名は血清型 菌体抗原（O群）・Vi抗原、鞭毛抗原（H型）の検査を実施して決定されるが、結果には菌体抗原（O群）の結果のみ記載されており、菌体抗原（O群）、鞭毛抗原（H型）の実施状況についての質問では“菌体抗原（O群）のみ”の解答であった。

試料2の測定機器を（表7）に示す。

測定機器（表7）

測定機器	件数	%
用手法	20	26.7
マイクロスキャン Walk Away 40 Walk Away 40SI	16	21.3
マイクロスキャン Walk Away 96 Walk Away 96SI	10	13.3
マイクロスキャン オ - トスキャン 4	4	5.3
RAISUS（ライサス）	3	4.0
バイテック 60,120,240,480	5	6.7
ATB Expression,miniAPI	5	6.7
バイテック 32,JR	3	4.0
バイテック 2,バイテック 2XL	3	4.0
BD フェニックス	2	2.7
未記入	4	5.3
総計	75	100

用手法で同定を行なった施設が20施設(26.7%)、自動機器を用いて同定を行なった施設は51施設(68%)と自動機器が多く使用されていた。また、自動機器を用いている施設でTSI寒天培地またはクリグラー培地を使用していない施設が33.3%であった。従来法による一次同定を実施せずにすべて自動化している施設もあるようである。

血清型別検査について（表 8）

血清型別検査実施について	件数	%
O 抗原のみ	43	57.3
O 抗原と H 抗原	23	30.6
H 抗原は一部のみ	3	4.0
O 多価、O 1 多価、Vi のみ実施	1	1.3
実施していない	2	2.6
未記入	3	4.2
総計	75	100

表 8 に各施設の血清型別検査について示す。O 抗原は 70 施設（93%）で実施されているが、H 抗原は 23 施設で実施されていた。

### 3) 試料 2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の方法(表 9)

検査法	件数	%
微量液体希釈法	48	64.0
ディスク拡散法：NCCLS 標準法	23	30.7
ディスク拡散法：昭和ディスク(日水)	1	1.3
未記入	3	4.0
総計	75	100

薬剤感受性試験は 71 施設（94%）で CLSI 法（旧 NCCLS 法）に基づく感受性試験が行なわれており、1 施設が昭和ディスク（日水）を行っていた。CLSI 法（旧 NCCLS 法）を行なう 71 施設のうち 48 施設（67%）で微量液体希釈法による MIC 測定が行われていた。自動機器の内訳を表 10 に示す。

微量液体希釈法 機器 (表 10)

機器	件数	%
マイクロスキャン	28	58.3
MIC-2000 栄研化学・長瀬産業製品	13	27.0
バイテック 2	2	4.2
日本ベクトン・ディッキンソン製品	2	4.2
RAISUS (ライサス)	3	6.3
総数	48	100

ABPC、LVFX の判定は全ての施設で “ S ” と判定されており、判定に問題はなかった。

CTM の判定は CLSI documents によると・・・

“ For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., first-and second-generation cephalosporins may appear active in vitro but are not effective clinically and should not be reported as susceptible ”

と記載されており、判定結果が “ S ” であっても臨床には報告しないとしている。

解答では、“ N/A ”、“ NA ”、“ \* ”、“ 報告しない ”、“ 空白 ”、“ S ”、“ R ” など多数の解答が寄せられた。しかし付加コメントまたはフリーコメントに上記 CLSI コメントに類する記載があった施設は 27 施設 (表 11) しかなく、機器まかせなのか CLSI documents を理解していたのか判断するには情報が乏しかったため CTM の評価は評価外とした。

CTM の判定とコメント (表 11)

	解答	件数	CLSI documents に類するコメント
ディスク拡散法：NCCLS 標準法 昭和ディスク (日水)	*.R	12	8
	S	11	3
	R	1	1
微量液体希釈法	NA.N/A	13	3
	R	9	4
	S	15	4
	その他	5	2
	空白	6	2
総数		72	



便検査 培地の組み合わせ

カモネギ・シガラ 分離用	BTB or DHL or マ ツコキ-寒天培地	O157 分離 用	ビブリア属 分離用	キャンパクター 属分離用	ブドウ球 菌分離用	施設数	%
						28	37.3
						22	29.3
						1	1.3
						1	1.3
						1	1.3
						3	4.0
						6	8.0
						1	1.3
						1	1.3
						2	2.7
						2	2.7
						1	1.3
						1	1.3
						1	1.3
						1	1.3
未記入						3	4.0
合計						75	

## 総括

### 【試料 1】

試料 1 はペロ毒素産生試験の実施状況の把握と菌の法的な取り扱いを調査する目的で出題した。どの施設も菌の同定には問題はなかったが、ペロ毒素産生確認試験は 2 / 3 の施設でしか行なわれていなかった。出題した菌はペロ毒素産生菌である。この菌が臨床で分離同定された場合は、ペロ毒素産生の確認を行ない、ただちに保健所に届け出る必要がある。その後保健所は接触者調査を実施するので検体提出後なるべく早く届け出ないと、その間に接触者の数が増大する恐れがある。

### 《腸管出血性大腸菌の報告基準（一部抜粋）》

#### 「病原体の検出」

腸管出血性大腸菌を分離・同定し、かつ、分離された菌のペロ毒素産生性試験陽性またはペロ毒素遺伝子の確認（PCR法など）もしくは便中のペロ毒素の検出

#### 「備考」

腸管出血性大腸菌症には疑似症の適応はない。

わが国で分離される本菌は代表的な血清型は O 157 : H 7 であるが、本症の診断には血清型の如何は問わない。

（報告に際しては血清型をあわせて報告することが望ましい。）

検体提出の翌日、腸管出血性大腸菌を疑わせるコロニーが発育した場合や、患者の臨床症状から腸管出血性大腸菌感染症を強く疑われる場合、そのコロニーを検査する方法は

【大腸菌の分離 - 生化学的性状による同定 - 血清型別 - ペロ毒素産生性の確認】  
の手順でおこなう方法と、

【大腸菌の分離 - 生化学的性状による同定と同時にペロ毒素産生性の確認 - (ペロ毒素産生株の血清型別)】

の手順で検査する方法が考えられる。感染症法における《届出基準》の記載は、検出された大腸菌のペロ毒素の有無を重視する内容であり、保健所への報告までの時間と検査の効率性を考えると後者の検査法が効率的と考えられる。

感染症法が施行されて 5 年が経過するが、いまだいくつかの施設では血清型別を軸とする大腸菌の検査が行なわれている。抗血清のみでは腸管出血性大腸菌の決定はできない。院内でペロ毒素産生確認試験を実施することを今後考慮してゆく必要があるのではないか。

### 【試料2】

急性胃腸炎の原因菌である *Salmonella* sp.は多数の血清型が知られているが、二類感染症である *Salmonella* Typhi、および *Salmonella* ParatyphiA と二類感染症以外のサルモネラを区別できる検査を行なうことが必要である。そのためにはO型別(O2群、O9群) Vi抗原は必須と考える。

薬剤感受性試験に関してはCLSI documentsを技師が理解していることが必要であり、その上で臨床側に報告をするようにつとめて頂きたい。また、CLSI documentsは治療・抗菌薬の選択にかかわるコメントも多数記載されており、更新もつねにされているのでじっくりと読み、毎日の仕事に活用して頂きたい。

### 【培地の組み合わせについて】

抑制力の強いSS寒天培地のみを用いて検査する施設では、今後BTB、DHL、マッコンキー寒天培地などから一種類を併せて使用することを検討して頂きたい。SS寒天培地を使用していない施設では、SS寒天培地も併せて使用して頂きたい。

O157分離用培地は多くの施設で使用されている。腸管出血性大腸菌の代表的な血清型はO157であり、O157分離用培地はその検出を容易にする、優れた培地であるが、3類感染症の原因菌として我々検査技師が検出に努めなくてはならないのは、ペロ毒素を産生する大腸菌である。血清型を目的とする検査では検出できないペロ毒素産生性の大腸菌があることを忘れてはならない。

### 【試料3】

貴重な映像を入手したので、フォトサーベイに使用した。

肝膿瘍などで赤痢アメーバを疑う場合などに役立ててください。

### <参考資料>

1. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Fifteenth Informational Supplement M100-S15
2. 病原微生物検出情報 2003年 Vol.25 P141-143
3. 菅野治重、川上小夜子; 感染症診断に必要な微生物検査