

[事例・資料]

感染症にかかる外部精度管理調査概要(H25 年度)

細菌課 南亮仁 小松京子 成瀬佳菜子 眞子純孝
吉武俊一 吉原琢哉 増本久人

はじめに

「感染症にかかる外部精度管理実施要領」に従い、糞便由来の感染症法指定菌及び感染性胃腸炎原因菌について外部精度管理を実施したので報告する。

1 実施方法

感染症検査にかかる外部精度管理実施要領に基づき実施した。

各検査機関へは、感染症法における届出対象疾患、感染性胃腸炎原因菌及び食中毒菌を対象に検査を依頼し、検出したすべての菌種名を結果報告とした。

感染症法指定菌及び感染性胃腸炎原因菌の検査方法は特に指定せず、各検査機関が日常行っている検査方法とした。

なお、検出したすべての菌種名を結果報告とした。

2 実施時期

平成 26 年 2 月 10 日 (月) に検体を各検査機関に配布し、平成 26 年 2 月 24 日 (月) を結果回答期限とした。

3 参加検査機関

佐賀県内の検査機関 13 施設が参加した。

4 検体の調製

各検査機関に配付した共通検体は、表 1 に示すとおりである。また、検体調整法および使用菌株性状については、下記に示すとおりである。

表 1 共通検体

検体名	菌種
検体 1	<i>Escherichia coli</i> (O 1 1 1)、 <i>Escherichia coli</i> (O 9 1)
検体 2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

<検体の調製>

① 検体 1

佐賀県衛生薬業センター保存株 *Escherichia coli*(O 1 1 1) と *Escherichia coli*(O 9 1 ベロ毒素産生菌) を 9 : 1 の比率で混合し、1.8m L ヌンクチューブ中の輸送用培地 (普通ブイヨン+0.8% A g a r) に接種し、37℃で一晩培養した。

[事例・資料]

② 検体2

佐賀県衛生薬業センター保存株 *Vibrio parahaemolyticus* を 1.8mL ヌンクチューブ中の輸送用培地 (普通ブイヨン+0.8% Agar + 1% NaCl) に接種し、37℃で一晩培養した。

<検体使用菌株性状>

Escherichia coli(O91)

通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、O抗原、H抗原、一部の K 抗原を持つ。

「デンカ生研」病原大腸菌免疫血清「生研」1号セット、混合9、O91に凝集を示す。ペロ毒素を有する株は腸管出血性大腸菌となり、腸管出血性大腸菌O91は2012年の腸管出血性大腸菌検出例の約2%を占める。

感染症法における取扱い：腸管出血性大腸菌は三類感染症に指定され、医師は診断後直ちに届出を行わなければならない。

Vibrio parahaemolyticus

通性嫌気性グラム陰性桿菌で、3～5%の塩化ナトリウム添加培地によく発育する(好塩性)。病原因子として耐熱性溶血毒(TDH)、その類似溶血毒(TRH)という蛋白質性溶血毒がある。

潜伏期間は12時間前後。

主症状として腹痛、水溶性又は粘液性下痢がみられる。

<事前確認試験>

【検体1：*Escherichia coli*(O91)】

- (1)衛生薬業センターに-80℃で保存してある *Escherichia coli*(O91)をBHI寒天培地に塗布し、36℃で24時間培養した。
- (2)BHI寒天培地に発育した菌を、クロモカルト寒天培地へ1白金耳画線塗抹し、36℃で24時間培養した。
- (3)選択分離培地上のコロニーの性状を観察し、コンタミネーションがない事を確認した。さらにBHI寒天培地に発育した菌を、生化学性状確認培地(CLIG培地、TSI培地、LIM培地)及び血清型確認用培地(TSB培地)へ接種し、36℃で24時間培養した。また、BHI寒天培地上のコロニーに遺伝子学的検査を実施し、ペロ毒素遺伝子を確認した。
- (4)生化学性状と血清型を確認すると共に、菌種同定キットにて菌種の確認を行った。
なお、各種培地性状及び確認検査結果は下記に示す。

表2 *Escherichia coli*(O91)の生化学性状及び確認検査結果

CLIG培地		TSI培地			LIM培地		
斜/高	蛍光	斜/高	H ₂ S	ガス	リジン	IND	運動性
-/+	+	+/+	-	+	+	-	+

クロモカルト：藤色コロニー

デンカ生研「病原大腸菌免疫血清」：O91に凝集を示す。

同定キット (BBL CRYSTAL E/NF)：*Escherichia coli*

[事例・資料]

【検体1 : *Escherichia coli*(O111)】

- (1) 衛生薬業センターに-80℃で保存してある *Escherichia coli*(O111)をBHI寒天培地に塗布し、36℃で24時間培養した。
- (2) BHI寒天培地に発育した菌を、クロモカルト寒天培地へ1白金耳画線塗抹し、36℃で24時間培養した。
- (3) 選択分離培地上のコロニーの性状を観察し、コンタミネーションがない事を確認した。さらにBHI寒天培地に発育した菌を、生化学性状確認培地(CLIG培地、TSI培地、LIM培地)及び血清型確認用培地(TSB培地)へ接種し、36℃で24時間培養した。また、BHI寒天培地上のコロニーに遺伝子学的検査を実施し、組織侵入性遺伝子、易熱性及び耐熱性毒素遺伝子並びにペロ毒素遺伝子が存在しないことを確認した。
- (4) 生化学性状と血清型を確認すると共に、菌種同定キットにて菌種の確認を行った。
なお、各種培地性状及び確認検査結果は下記に示す。

表3 *Escherichia coli*(O111)の生化学性状及び確認検査結果

CLIG培地		TSI培地			LIM培地		
斜/高	蛍光	斜/高	H ₂ S	ガス	リジン	IND	運動性
-/±	+	+/±	-	+	+	+	+

クロモカルト：藤色コロニー

デンカ生研「病原大腸菌免疫血清」：O111に凝集を示す。

同定キット (BBL CRYSTAL E/NF) : *Escherichia coli*

【検体2 : *Vibrio parahaemolyticus*】

- (1) 衛生薬業センターに-80℃で保存してある *Vibrio parahaemolyticus*をBHI寒天培地に塗布し、36℃で24時間培養した。
- (2) BHI寒天培地に発育した菌を、TCBS寒天培地へ1白金耳画線塗抹し、36℃で24時間培養した。
- (3) 選択分離培地上のコロニーの性状を観察し、コンタミネーションがない事を確認した。さらにBHI寒天培地に発育した菌を、生化学性状確認培地(1%NaCl加TSI培地、1%NaCl加LIM培地)、VP確認用培地及び塩化ナトリウム加ペプトン水(0、3、8、10%)へ接種し、36℃で24時間培養した。
また、TCBS寒天培地上のコロニーに遺伝子学的検査を実施し、耐熱性溶血毒(TDH)遺伝子を確認した。
- (4) 生化学性状を確認すると共に、菌種同定キットにて菌種の確認を行った。
なお、各種培地性状及び確認検査結果は下記に示す。

表4 *Vibrio parahaemolyticus*の生化学性状及び確認検査結果

TSI培地			LIM培地			VP テスト	NaCl加ペプトン水での発育			
斜/高	H ₂ S	ガス	リジン	IND	運動性		0%	3%	8%	10%
-/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-

TCBS寒天培地：緑色コロニー

同定キット (BBL CRYSTAL E/NF) : *Vibrio parahaemolyticus*

[事例・資料]

5 結果

回答一覧を表5に、検体別検査結果集計を表6に示す。(調査対象：13施設)

表5：回答一覧

	検体1	検体2
1	<i>Escherichia coli</i> (0-26、0-86a、0-111、0-119、0-127a、 0-128 のいずれか)	<i>Vibrio sp. SF</i>
2	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i> (091)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3	<i>Escherichia coli</i> 混合3血清に属する。157以外の菌種 と思われる。	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> SMC 寒天培地直接分離で発育を認めたが、菌 種同定には至らなかった。
4	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i> (091) VT1 陽性	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
5	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i> (091)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
6	<i>Escherichia coli</i> (091) VT1 陽性	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
7	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio sp.</i> (但し、 <i>V. cholerae</i> は除く)
8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
9	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i> (091)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
10	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
11	<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> (091) VT1 陽性	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
12	<i>Escherichia coli</i> (0111) VT 陰性 <i>Escherichia coli</i> (091) VT1 陽性	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
13	<i>Escherichia coli</i> (0111) <i>Escherichia coli</i> (混合9)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

順番は回答到着順

[事例・資料]

表6 検体別検査結果集計

検体 1		検体 2	
菌名	施設数	菌名	施設数
<i>Escherichia coli</i> (O111) VT 陰性 <i>Escherichia coli</i> (O91) VT1 陽性	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
<i>Escherichia coli</i> (O111) <i>Escherichia coli</i> (O91) VT1 陽性	1	<i>Vibrio sp.</i>	2
<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> (O91) VT1 陽性	1	菌種同定には至らず	1
<i>Escherichia coli</i> (O91) VT1 陽性	1		
<i>Escherichia coli</i> (O111) <i>Escherichia coli</i> (O91)	3		
<i>Escherichia coli</i> (O111) <i>Escherichia coli</i>	1		
<i>Escherichia coli</i> (O111) <i>Escherichia coli</i> (混合9)	1		
<i>Escherichia coli</i>	4※		

※一部の血清型別まで実施したものを含む。

6 まとめ

検体1について、参加した全ての施設で *Escherichia coli* を検出した。うち5施設が血清型 O111 と O91 まで同定した。今回は、各施設における毒素確認試験の有無の調査を目的とし、検体に *Escherichia coli* O91 ベロ毒素産生株を用い、結果記入票と共に検査経過記録書の記入を依頼したが、大腸菌に対する毒素検査を行っているとは確認できたのは13施設中4施設であった。腸管出血性大腸菌による感染症の早期探知の為に、病原性大腸菌に対する毒素検査が重要であると考えられる。

検体2について、12施設が *Vibrio* 属菌を検出した。うち10施設が *Vibrio parahaemolyticus* まで同定した。腸炎ビブリオによる食中毒は年々減少しており、各施設においても腸炎ビブリオを検出する機会は減少していると考えられる。しかし、今回の精度管理においてはほぼ全ての施設で *Vibrio parahaemolyticus* が同定された。

今回の調査は、感染症法における届出対象疾患、感染性胃腸炎原因菌及び食中毒菌を対象に項目を指定せず検査を依頼した。各検査機関が日常行っている検査方法での実施であったが、検査施設の精度の維持・向上を図る契機となす精度管理の目的は達せられたものと思われる。

最後に、この精度管理に御協力いただいた県内検査機関および検査を担当された各位に深く感謝申し上げます。