

[事例・資料]

感染症にかかる外部精度管理調査概要(令和2年度)

微生物課 鶴田恵子 木村碧 柳井祐介 瀧下恵里子 吉原琢哉 吉武俊一 諸石早苗

1 はじめに

「佐賀県感染症予防計画」に基づき、県内の臨床検査を行う機関の細菌検査の精度を調査し情報提供や必要な指導を行うことで、感染症病原体等の検査能力の維持向上を図ることを目的に外部精度管理調査を実施した。

2 実施方法

「感染症検査にかかる外部精度管理調査実施要領」に基づき実施した。

検査は、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として、各施設が通常行っている方法にて行い、検出した菌種名の報告を求めた。

3 参加施設

細菌検査を実施している13施設の参加があった。

4 実施時期

令和3年1月20日(水)に検体を配布し、令和3年2月10日(水)を検査結果回答期限とした。

5 精度管理調査試料の作製

試料には、生化学性状が確認されている衛生薬業センター保存株2菌種を用いた。(表1)

表1 精度管理調査用試料の検体記号及び菌種

	検体記号	菌種	病原因子
試料1	FPRB	<i>Vibrio cholerae</i> O1(エルトール小川型)	CT; -
試料2	PFKH	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	VT1; +, eae; +

(1) 試料1(FPRB)

V.cholerae O1(CT陰性)を1%NaCl加普通寒天培地に塗抹し、36℃で18時間培養した。発育したコロニーを1μl白金耳で1.8ml自家製保存用培地(BHIブロス+10%グリセリン)に接種して試料菌液とした。菌液を1.8ml NaCl加自家製輸送用培地(普通ブイヨン+0.8%Agar+1%NaCl)に接種し、36℃で一晩培養して試料とした。

(2) 試料2(PFKH)

E.coli O26(VT1陽性)をBHI寒天培地(brain heart infusion agar)に塗抹し、36℃で24時間培養した。発育したコロニーを1μl白金耳で1.8ml自家製保存用培地(BHIブロス+10%グリセリン)に接種して試料菌液とした。菌液を1.8ml自家製輸送用培地(普通ブイヨン+0.8%Agar)に接種し、36℃で一晩培養して試料とした。

[事例・資料]

6 試料の確認試験

試料の確認試験については、試料配布前に確認試験を行った。また、配布試料と同じ条件で保存した試料を用いて、精度管理調査に合わせて再度確認試験を行った。

(1) 試料1(FPRB)

分離用培地6種(TCBS寒天培地、SS寒天培地、ドリガルスキー改良寒天培地、羊血液寒天培地、ビブリオ寒天培地、PMT寒天培地)に画線塗抹し、36℃で18時間培養してコロニー形態を観察したところ、すべての培地に発育を認めた。

PMT寒天培地からコレラ菌を疑うコロニーを釣菌し、コレラ菌キット コレラ菌AD「生研」を用いてスライド凝集反応により推定的同定を行った。

さらに、PMT寒天培地のコレラ菌を疑うコロニーを1%NaCl加普通寒天培地に塗抹して、36℃で18時間培養後、生化学性状確認培地に接種して生化学性状を確認し、デンカ生研の免疫血清及び細菌毒素検出キットにて血清型別、コレラ菌毒素(CT)産生性を確認した。(表2)

表2 試料1(FPRB)の生化学性状、血清型、毒素産生性

釣菌した培地	TSI				LIM			VP
	斜面	高層	H ₂ S	ガス	リゾン	インドール	運動性	
PMT寒天培地 (褐色芯黄色コロニー)	+	+	-	-	+	+	+	+

※それぞれの培地は、NaCl濃度が1%なるように調整した。

釣菌した培地	升知-ム・ オシダ-セ	耐塩性試験					血清型	CT 産生性
		0%	3%	6%	8%	10%		
PMT寒天培地 (褐色芯黄色コロニー)	+	+	+	+	-	-	<i>V. cholerae</i> O1 (小川型)	-

また、遺伝子検査(PCR法)を行ったところ、*V. cholerae* 特異遺伝子(atpA)及びO1特異遺伝子は検出されたが、O139特異遺伝子及びコレラ毒素遺伝子は検出されなかった。生物型PCR(標的遺伝子:hlyA)では、481bp及び738bpの2本の増幅バンドが確認された(エルツール型)。さらにBBL CRYSTAL E/NFにて菌種の同定を行い、*V. cholerae*と同定された。

(2) 試料2(PFKH)

分離用培地6種(TCBS寒天培地、SS寒天培地、ドリガルスキー改良寒天培地、羊血液寒天培地、CT-RMAC、CT-SMAC)に画線塗抹し、36℃で24時間培養してコロニー形態を観察したところ、TCBS寒天培地に発育を認めず、他5種は発育を認めた。

CT-RMAC寒天培地より腸管出血性大腸菌(EHEC)O26を疑うコロニーを釣菌し、生化学性状確認培地に接種して生化学性状を確認し、デンカ生研の免疫血清にて血清型別を確認した。(表3)

[事例・資料]

表3 試料2(PFKH)の生化学性状、血清型

釣菌した培地	TSI				LIM		
	斜面	高層	H ₂ S	ガス	リジン	インドール	運動性
CT-RMAC 寒天培地 (灰白色コロニー)	+	+	-	+	+	+	+

釣菌した培地	CLIG			チクローム・ オキシダーゼ	血清型
	斜面	高層	MUG		
CT-RMAC 寒天培地 (灰白色コロニー)	-	+	+	-	<i>E. coli</i> O26:H11

また、下痢原性大腸菌の病原遺伝子(invE、VT1、VT2、LT、ST、eae、aggR、astA、afaD)についてPCR法により遺伝子検査を行い、さらにBBL CRYSTAL E/NFにて菌種の同定を行った。(表4)

表4 試料2(PFKH)の病原遺伝子検査結果、同定結果

釣菌した培地	検出した病原遺伝子	同定
CT-RMAC 寒天培地 (灰白色コロニー)	VT1、eae	<i>E. coli</i>

7 結果

参加施設から報告された集計結果を下記に示す。(表5、6)

表5 試料1(FPRB)の集計結果

菌名	報告施設数
<i>Vibrio cholerae</i> O1 (又は小川型)	4
<i>Vibrio cholerae</i> (疑いを含む)	6
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 non-O139	1
<i>Vibrio cholerae</i> と <i>cholerae</i> 以外の白糖分解 <i>Vibrio</i>	1
<i>Vibrio albensis</i> (非 O1 ビブリオ)	1
計	13

表6 試料2(PFKH)の集計結果

菌名	報告施設数
<i>Escherichia coli</i> O26 VT1(+)	9
<i>Escherichia coli</i> O26	3
<i>Escherichia coli</i> O26 Ehly(+)	1
計	13

[事例・資料]

8 まとめ

県内の細菌検査を行っている機関13施設を対象に、感染症法届出対象疾患及び食中毒菌検出を目的とした精度管理調査を実施した。

試料1(FPRB)では、*V.cholerae*を検出した施設は12施設(92%)で、さらに血清型の検査を行いO1(又は小川型)と判定した施設は、4施設(31%)、コレラ毒素産生性試験を実施した施設は0施設であった。

*V.cholerae*は、通常の検査では検出する機会が少なく、血清等を整備することが難しいと思われるが、検査結果の精度を上げるために、菌のコロニー性状や生化学性状を確認しておく必要がある。

また、検査結果判定後の対応について、複数施設で、*V.cholerae* O1(コレラ毒素未確認)との同定結果をもって三類感染症として届出をすとの回答がみられた。三類感染症であるコレラの届出には、コレラ毒素の確認が必要であり、感染症法に基づく届出の基準や外部検査も含めた届出までに必要な手順についても確認しておく必要があると考える。

試料2(PFKH)では、*E.coli* O26を検出した施設は13施設(100%)で良好な結果が得られた。また、ベロ毒素(VT1)陽性を確認した施設は9施設(69%)であった。

令和元年度における県内での腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症の届出数は、前年より大幅に増加し(110名)、その内訳をO抗原血清型別で見ると、O157とO26で約88%を占めている。*E.coli*は検出頻度が高い細菌であり、また、EHEC感染症は、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重傷合併症を併発する危険があることから、迅速で正確な検査が重要であると考えられる。

今回は、検体記号にアルファベットを使用したところ、検査結果報告書への検体記号の記載誤りが1施設あった。検体の取違えや各種記録への記載誤りは、治療等に大きな影響を及ぼすものであるため、検体記号等についても各工程で十分に確認しながら検査を進める必要がある。