

微生物検査

担当：棚村 一彦、高橋 裕治

I.実施内容	
1.実施期間	2009年10月22日～11月13日
2.実施項目	①グラム染色（臨床検体） ②同定検査（臨床分離株） <i>Escherichia coli</i> O26 ベロ毒素VT1陽性 ③感受性検査（臨床分離株） <i>Escherichia coli</i> (ATCC25922株)
3.参加施設数	グラム染色（30施設）、同定検査（20施設）、感受性検査（20施設）
4.実施内容および出題のねらいについて	①グラム染色 未染色標本を配布し、各施設における染色方法及び同一の評価基準を用いたことによる結果解釈のバラツキの程度を調査した。 ②同定検査 EHECの血清型として分離頻度が高い <i>Escherichia coli</i> O26の同定及びベロ毒素の検出を目的として行った。 ③感受性検査 ATCC株を用い、検査結果が精度管理基準値内に含まれているかを調査した。
5.評価基準	①グラム染色 ・可： ・許容範囲： ・不可： ②同定検査 ・可： <i>E. coli</i> の同定及びベロ毒素の検出又はEHECを示唆する報告が有る ・許容範囲： <i>E. coli</i> 及び血清型O26と同定しているが、EHECを示唆する報告が無い ・不可：上記以外 ③感受性検査 可：精度管理基準値内 許容範囲：無し 不可：精度管理基準値外

II.結果	
①：表1参照 ②：表2、3参照 ③：表4、5参照	

Ⅲ. 考察	
① グラム染色	<p>昨年同様、未染色標本を配布し各施設での染色・鏡検・評価を実施してもらった。尚、今回は同一の評価基準を用いたことによる結果解釈のバラツキの程度を調査した。グラム陽性球菌とグラム陰性桿菌が混在する標本を用いて染色技術を調査した。グラム陽性球菌(3+)or(4+)、グラム陽性桿菌(-)、グラム陰性球菌(-)、グラム陰性桿菌(4+)酵母様真菌(-)、糸状菌(-)、白血球(3+)or(4+)、上皮細胞(-)or(1+)を可とした。</p> <p>《白血球の記載》</p> <p>白血球の記載が無かった施設が1施設あった。</p> <p>また、白血球数が少なく不可とした施設が4施設、許容範囲が2施設であった。</p> <p>標本の白血球は変性したのも含まれており、低くカウントした可能性が考えられる。</p> <p>《細菌数の記載》</p> <p>グラム陽性球菌が不可の施設が4施設、グラム陰性桿菌が不可の施設が2施設あった。グラム陰性桿菌が不可の2施設は1施設がグラム陰性球菌(3+)としてカウントされていた。もう1施設は、グラム陰性桿菌が(1+)に対して陽性桿菌が(2+)カウントされていた。この施設についてはエタノールで数秒の脱色がされており、脱色不十分であった可能性が考えられる。またグラム陽性球菌が不可の4施設は、1施設がピクリン酸による脱色、残り3施設はアルコールによる脱色で、脱色過多であったと考えられる。尚、脱色液に関してはアセトンが1施設、アセトン・エタノール混合液が13施設、ピクリン酸が10施設、アルコールが6施設であった。アセトンおよびアセトン・エタノール混合液は脱色され易い特徴があるが、今回、その使用施設については問題なく、結果良好であった。</p>
② 同定検査	<p>腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> : EHEC) による感染症は、重篤な溶血性尿毒症症候群 (HUS) を引き起こして死亡するケースもあり、感染症法において全数把握の3類感染症と位置づけられている重要な感染症である。</p> <p>IASRの報告によると、EHECの血清型については、O157が64%と半数以上を占めており、次いで今回出題したO26が23%を占めている (2010年1月21日現在)。</p> <p>今回の出題のねらいは、EHECとして<i>E. coli</i> と血清型O26の同定及びベロ毒素の検出とした。回答の評価基準は、<i>E. coli</i>の同定及びベロ毒素の検出又はEHECを示唆する報告が有る場合を「可」、<i>E. coli</i>及び血清型O26と同定しているが、EHECを示唆する報告が無い場合を「許容範囲」、それ以外を「不可」とした。</p> <p>参加20施設の内、便培養検査を実施していない1施設と記載の無かった1施設を除く18施設に対して評価を行った。その結果、評価「可」に該当する施設は12施設であり、「許容範囲」とした施設は、3施設であった。この3施設の内2施設においては、病原性大腸菌との報告があったが、病原性大腸菌の中でも感染症法の3類感染症に該当するのはEHECであり、臨床症状等の患者情報からEHECを疑った方が良いと考え、今回は「許容範囲」とさせて頂いた。評価「可」及び「許容範囲」となった施設は15施設で全体の83%となり、前回の血清型O103 (回答率68%) に比べ、良好な結果となった。残りの3施設については、菌種の同定はできていたが、血清型O26の報告やEHECを示唆する報告が無かったため、評価を「不可」とさせて頂いた。</p> <p>今回の調査でも昨年と同様に、検出菌に対する各施設の日常での検査方法についても回答して頂いた。血清型の検査は13施設、ベロ毒素の検査は8施設、残りの施設は外注検査として実施されており、昨年と同様の結果であったが、各施設においてEHECを検出できる体制が整っていることは確認できた。しかし、EHECを示唆する報告が無かった施設は、血清型や臨床症状等の患者情報から推測されるHUSを考慮して、臨床に「EHECの可能性がある」等の検査コメントを報告した方が良いと思われる。</p>

III.考察	
③感受性検査	<p>今回は、<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922株) を試料とした。</p> <p>同定検査の結果は、全ての施設で <i>Escherichia coli</i> と同定できており、特に問題は無かった。感受性検査においては、参加19施設（記載の無かった1施設を除く）の内、ディスク法が4施設（21%）、液体希釈法が16施設（84%）で実施されていた（両方で回答が1施設有り）。</p> <p>評価は、ATCC株を用いたため、結果が精度管理基準値内に含まれた場合を「可」、精度管理基準値外の場合を「不可」とした。</p> <p>液体希釈法を実施している施設の結果では、1施設において設問用紙での回答があり、出題者側が望む回答を得られなかったため、評価対象外とさせて頂いた。残りの15施設においては、全ての施設で精度管理基準値から外れる回答は無く、良好な結果であった。ディスク法を実施している施設の結果では、3施設は精度管理基準値内の回答であったが、1施設においてCTX、IPM、LVFXの回答が精度管理基準値外であった。3薬剤とも精度管理基準値より大きい阻止円であったという同様の傾向が見られるため、日常の検査方法に問題がないかを確認して頂きたい。</p>

IV.まとめ
<p>グラム染色記載法の標準化を推進すべく同一の評価基準で結果解釈のバラツキの程度を調査した。全体的に良好な結果であったが、細胞の記載（今回は変性があったためか？）と脱色手技に課題が残ったと思われる</p> <p>同定検査は、昨年に引き続き腸管出血性大腸菌（EHEC）を課題とした。昨年の血清型O103に比べ、検出頻度が高い血清型O26であったため、昨年より改善されていた。EHECの検出は、自施設で出来ない項目は外注検査により補っているため、検査体制が整備されていることも確認できた。</p> <p>薬剤感受性検査は、<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922株) を用い、回答が精度管理基準値内に含まれているかを確認した。全体的に良好な結果であったが、1施設だけ精度管理基準値外となる回答が見られた。再度、日常行っている検査手順に問題がないかを確認して頂きたい。</p>

表1. グラム染色

施設番号	染色法	GPC	GNC	GPR	GNR	酵母様真菌	糸状菌	白血球	上皮細胞	評価
1	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	1+	1+	不可
3	ハッカー変法	-	-	-	4+	-	-	1+	2+	不可
6	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
7	フェイバーG法	4+	-	-	4+	-	-	4+	-	可
15	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	2+	-	許容範囲
17	フェイバーG法	4+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
21	ハッカー変法	1+	-	-	4+	-	-	4+	1+	不可
24	パーミーM法	4+	-	-	4+	-	-	4+	-	可
27	フェイバーG法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
30	ハッカー変法	-	-	-	4+	-	-	3+	1+	不可
34	ハッカー変法	3+	-	-	4+	-	-	4+	-	可
35	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
46	パーミーM法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
52	フェイバーG法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
54	パーミーM法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
56	ハッカー変法	4+	-	2+	1+	-	-	1+	1+	不可
61	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
66	フェイバーG法	3+	-	-	4+	-	-	4+	1+	可
67	ハッカー変法	4+	-	-	4+	-	-	1+	-	不可
72	ハッカー変法	3+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
81	neo-B & M法	3+	-	-	4+	-	-	4+	-	可
95	フェイバーG法	2+	-	-	4+	-	-	4+	-	許容範囲
102	パーミーM法	3+	-	-	4+	-	-	3~4+	-	可
121	武藤化学 (3ステップ法)	3+	-	-	4+	-	-	4+	-	不可
146	フェイバーG法	3+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
152	フェイバーG法	4+	3+	-	-	-	-	2+	2+	不可
170	フェイバーG法	3+	-	-	4+	-	-	4+	+	可
172	neo-B & M法	4+	-	-	4+	-	-	4+	2+	許容範囲
207	パーミーM法	3+	-	-	4+	-	-	4+	-	可
252	フェイバーG法	-	-	-	4+	-	-	4+	-	不可

可

GNR (4+)、GPC (3+) ~ (4+)、WBC (3+) ~ (4+)、上皮 (-) ~ (1+)

許容範囲

GNR (3+)、GPC (2+)、WBC (2+)、上皮 (2+)

不可

上記以外

表2. 同定検査の集計結果（試料2）

施設番号	回答結果	日常検査法
3	EHEC O26の可能性あり	基本的に外部委託
6	<i>Escherichia coli</i> O抗原の血清型：O26（ペロ毒素（外注にて）：VT1（+）VT2（-））	菌種の同定を行い、O抗原の血清型の同定まで行う ペロ毒素の検査は必要に応じて外注にて検査を行っている
7	<i>Escherichia coli</i> （EHEC VT1産生 O26）	菌名、Veroto毒素産生性、O抗原
15	<i>E. coli</i> ペロ毒素VT1（+）血清型O26、O111、O157以外	同定、感受性、ペロ毒素、血清（O26、O111、O157）3種のみ
17	<i>E. coli</i> O26:H11（VT1+ VT2-）	自動機器同定、マニュアル同定で菌種決定 O抗原の型別、H抗原の型別、ペロトキシンの有無
24	<i>Escherichia coli</i> O26 VT1産生株（EHEC）	大腸菌抗原同定の依頼があれば、血清型の検査を行い、ペロ毒素追加の有無を医者に確認する。追加された場合は検査を実施する。
30	<i>Escherichia coli</i> O26 VT1陽性（EHEC）	種まで
34	<i>Escherichia coli</i> O26	菌種の同定、O血清群別
35	<i>Escherichia coli</i> （ペロトキシン（+））	記載なし
52	便培養検査は実施していない	記載なし
54	<i>E. coli</i> （血清型O6群）	大腸菌まで 他に病原性細菌が認められず、O157以外の病原性大腸菌が疑われる場合、外注機関にO群血清型別、ペロトキシンなど依頼する。
61	<i>E. coli</i>	院内では病原大腸菌免疫血清「生研」O157、O群（混合1～8） 血清型と毒素は外部委託
66	<i>Escherichia coli</i>	通常は種まで同定し、血清型・ペロ毒素は必要に応じて外注
67	<i>E. coli</i> （病原性大腸菌）混合血清（混合1）で凝集	病原大腸菌 混合血清：デンカ生研（混合1）で凝集。あと外部委託
72	<i>Escherichia coli</i> （O26）VT1（+）VT2（-）	大腸菌の生化学的性状による同定検査、O抗原血清型を行っている。 ペロ毒素検出検査は追加検査にて行っている。
102	<i>Escherichia coli</i> O26（VT1産生菌）	ペロトキシン産生の有無及びペロトキシン産生の場合血清型
146	<i>Escherichia coli</i> O抗原型：O-26 ペロトキシン VT1陽性 VT2陰性 三類感染症、四種病原体 直ちに保健所長を經由し、知事へ届出が必要です	種レベルまで同定実施 大腸菌抗原同定検査（O抗原）実施 大腸菌ペロトキシン検出検査実施
170	記載なし	記載なし
172	<i>Escherichia coli</i> （O26）VT1陽性 VT2陰性 （三類感染症として取り扱われる菌です）	種および血清型まで同定 腸管出血性大腸菌が疑われた場合は大腸菌ペロトキシン検査実施
252	<i>Escherichia coli</i> O26（病原性大腸菌）	病原性大腸菌はO抗原まで検査、ペロ毒素の検査は外注

表3. 同定検査の評価結果（試料2）

施設番号	評価基準				総合評価
	菌種	血清型	ベロ毒素	EHECを示唆するコメント	
3	○	△（O26の可能性あり）	－	○	可
6	○	○	○	－	可
7	○	○	○	○	可
15	○	×	○	－	可
17	○	○	○	－	可
24	○	○	○	○	可
30	○	○	○	○	可
34	○	○	－	－	許容範囲
35	○	－	○	－	可
52	実施せず	－	－	－	評価対象外
54	○	×	－	－	不可
61	○	－	－	－	不可
66	○	－	－	－	不可
67	○	△（混合1で凝集）	－	－	許容範囲
72	○	○	○	－	可
102	○	○	○	－	可
146	○	○	○	○	可
170	記載なし	－	－	－	評価対象外
172	○	○	○	○	可
252	○	○	－	－	許容範囲

- ：可
- △：許容範囲
- ×：不可
- －：未実施又は記載なし

表4. 同定結果及び感受性検査の方法（試料3）

ディスク法

施設番号	同定検査		感受性検査		報告時コメント
	菌名	使用機器	使用培地	使用ディスク	
24	<i>Escherichia coli</i>	VITEK	MH寒天	KBディスク	—
52	<i>Escherichia coli</i>	IDテスト	MH寒天	センシディスク	ESBLスクリーニング検査：陰性 起炎菌の可能性が高いと考えられる。
102	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	MH寒天	KBディスク	—
252	<i>Escherichia coli</i>	Crystal	MH寒天	KBディスク	—

MIC法

施設番号	同定検査		感受性検査	報告時コメント
	菌名	使用機器	使用機器	
3	<i>Escherichia coli</i>	MicroScan	MicroScan	—
6	<i>E. coli</i>	MicroScan	MicroScan	—
7	<i>Escherichia coli</i>	V I T E K 2	イノキュレーターα	—
15	<i>E. coli</i>	MicroScan	MicroScan	—
17	<i>E. coli</i>	VITEK	—	設問の内容だけでは、フォーカスが特定できない。 もう少し患者背景が分かるようにして頂かなければ抗菌薬の適正使用等についても提案できない
30	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	MIC2000	—
34	<i>Escherichia coli</i>	—	MicroScan	—
35	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	VITEK2	—
54	<i>Escherichia coli</i>	MicroScan	MicroScan	血培陽性時、主治医に直接電話し、尿培追加などしてもらい、フォーカスを検討してもらおう
61	<i>E. coli</i>	MicroScan	MicroScan	—
66	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	VITEK2	野生型：非常に典型的、非常に頻繁、S
67	<i>E. coli</i>	MicroScan	MicroScan	—
72	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	VITEK2	—
102	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	VITEK2	—
146	<i>Escherichia coli</i>	Crystal	MicroScan	ESBLスクリーニング検査：陰性 起炎菌の可能性が極めて高いと考えられます
172	<i>Escherichia coli</i>	VITEK	MicroScan	CPDXのMICは $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ 以下でありESBLsは否定されます

施設番号	結果
170	記載なし

—：記載なし

表5. 感受性検査の評価結果（試料3）

ディスク法

施設番号	ABPC			CEZ			CTX			IPM			AZT			LVFX			総合評価
	阻止円	判定	評価	阻止円	判定	評価	阻止円	判定	評価	阻止円	判定	評価	阻止円	判定	評価	阻止円	判定	評価	
24	18	S	可	24	S	可	30	S	可	29	S	可	30	S	可	32	S	可	可
52	19	S	可	22	S	可	32	S	可	28	S	可	28	S	可	35	S	可	可
102	19	S	可	27	S	可	38	S	不可	34	S	不可	—	—	—	39	S	不可	不可
252	20	S	可	25	S	可	34	S	可	28	S	可	34	S	可	35	S	可	可
精度管理基準値	16-22			21-27			29-35			26-32			28-36			29-37			—

MIC法

施設番号	ABPC			CEZ			CTX			IPM			AZT			LVFX			総合評価
	MIC値	判定	評価	MIC値	判定	評価	MIC値	判定	評価	MIC値	判定	評価	MIC値	判定	評価	MIC値	判定	評価	
3	<4	S	可	<4	S	可	<8	S	可	<1	S	可	<8	S	可	<1	S	可	可
6	≦4	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	可
7	4	S	可	≦1	S	可	≦0.5	S	可	≦0.5	S	可	≦1	S	可	≦2	S	可	可
15	<4	S	可	<4	S	可	<8	S	可	<1	S	可	<8	S	可	<1	S	可	可
17	8	—	—	2	—	—	1	—	—	0.5	—	—	1	—	—	0.25	—	—	評価対象外
30	8	S	可	≦2	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦2	S	可	≦0.5	S	可	可
34	≦8	S	可	≦8	S	可	≦8	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦2	S	可	可
35	8	S	可	≦4	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦0.12	S	可	可
54	≦8	S	可	≦8	S	可	≦8	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦2	S	可	可
61	≦4	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	可
66	8	S	可	≦4	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦0.12	S	可	可
67	≦4	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	≦8	S	可	≦1	S	可	可
72	4	S	可	≦4	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦0.25	S	可	可
102	4	S	可	≦4	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦1	S	可	≦0.12	S	可	可
146	≦8	S	可	≦8	S	可	≦8	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦2	S	可	可
172	4	S	可	≦4	S	可	≦8	S	可	≦0.5	S	可	≦1	S	可	≦0.5	S	可	可
精度管理基準値	2-8			1-4			0.03-0.12			0.06-0.25			0.06-0.25			0.008-0.06			—

—：記載なし

施設番号	結果
170	記載なし