

感染研 担当者が梱包・チェックシートを用いて確認

バイオセーフティ管理委員会
 バイオセーフティ管理室

チェックシート

梱包前日までにすべての輸送容器を梱包責任者、バイオセーフティ管理室員が確認。足りない部分は、事前に修正等を実施

一個に1枚必要

輸送容器を感染研に送付する際に使う

- 手順書を作成
- チェックシートを作成

梱包前日までにすべての輸送容器を梱包責任者、バイオセーフティ管理室員が確認。足りない部分は、事前に修正等を実施

別紙1_原料前送容器の準備技術

別紙2_原料前送容器送付チェックシート

輸送容器を感染研に送付する際に使う

- 手順書を作成
- チェックシートを作成

梱包前日までにすべての輸送容器を梱包責任者、バイオセーフティ管理室員が確認。足りない部分は、事前に修正等を実施

発送当日の作業

- 1 担当者が梱包、内容はそのまま（個別ではなく）1枚チェックシートを用いて確認
- 2 管理運営委員が点検、1枚チェックシートに確認のサイン
- 5 発送場所（総務部庶務）に運ぶ
- 3 バイオセーフティ管理室員が最終確認、サイン
- 4 運搬業者に運す（細菌第一節まで、ゆうパックに取りに来てもらう（事前にお願ひ）普及止まっているエレベーターを稼働の手続き）

バイオセーフティ管理室員が午前中、細菌第一節に張付き

20	21	22	23	24	25	26	
				北海道・東北・中部地区 九州・沖縄地区 転送容器類	中国・四国地区 近畿地区 関東地区 転送容器類		
				送料番号を発送簿に転記	送料番号を発送簿に転記		
	27	28	29	30	1	2	
		関東・甲信越・中部地区 転送容器類 送料番号を発送簿に転記	バイオセーフティ管理室（1セツト）に封入後、ゆうパックに入れて発送	3本の消毒薬（1セツト）に封入後、ゆうパックに入れて発送	ゆうパック（日本発送）		

まとめ

- 菌株の選定は多施設での事前確認が必要である
- 輸送容器の準備のための手順書、チェックシートをWGでつくるのが輸送作業の効率化に貢献する

感染研では（バイオセーフティ室、総務部）

- 発送作業を担う部署は、施設内関連部署との事前打ち合わせが必要がある
- 必要に応じて、手続き・提出書類の簡略化を事前に確認する必要がある（内容は維持しつつ）
 - ✓ 同じものを同時に多施設に送付することは想定されていない
- ダブルチェックを基本としているが、チェック場所を物理的に近づけることで流れ作業化が可能となり効率化がはかれる

外部精度管理の導入と継続実施のための事業体制の構築に関する研究
平成27年度第二回班会議

コレラ菌に関する外部精度管理調査の結果

- コレラ菌検査・診断マニュアルを作成
- 精度管理株の選定
- 外部精度管理調査の実施
- 感染症検査体制アンケートの実施
- コレラ菌外部精度管理事後アンケートの実施

細菌WG 荒川英二(国立感染症研究所)
大西真(国立感染症研究所)
緒方喜久代(国立感染症研究所)
森本洋(北海道立衛生研究所)
倉園貴至(埼玉県衛生研究所)
磯部順子(富山県衛生研究所)
勢戸和子(大阪府立公衆衛生研究所)

1

外部精度管理調査の実施.....74施設が参加

実施項目: 三類感染症検査に係る「コレラ菌」の同定
実施時期: 平成27年10月5日検体配付(参加施設に到着予定)
平成27年10月26日結果提出締め切り

提出書類: 検査結果報告書
コレラ菌検査経過記録書
感染症検査体制アンケート
温度記録ファイル

配付試料: 試料1 *Vibrio cholerae* O1 CT陽性
試料2 *Vibrio cholerae* O1 CT陰性
試料3 *Vibrio cholerae* O139 CT陽性

12月に事後アンケートを依頼し、70施設の回答を得た。

2

検査結果報告書の様式

様式1
地研研精度管理研究室による平成27年度外部精度管理事後検査報告書

平成 年 月 日

機関名
代表者氏名
検査責任者氏名
検査担当氏名

		該当する結果を○で囲み、必要な情報を記載下さい	
		結果	根拠とした検査結果 (血清型・毒素等)
例示		陽性	陰性 O1抗原(+), CT遺伝子(+)
コレラ菌の 同定結果	試料1	陽性 ・ 陰性	
	試料2	陽性 ・ 陰性	
	試料3	陽性 ・ 陰性	

結果については、以下のとおり
結果を記載下さい
根拠とした検査結果
(血清型・毒素等)
CT遺伝子(+)

なお、報告の正確性の高い「検訂」コントロール用検体提供を推奨いたします。あわせて、手順書と異なる方法を採られた場合には各施設の検査水準調査を併せて下さい。

3

検査結果報告書の集計

試料	判定結果	検査内容	施設数
1. <i>V. cholerae</i> O1 CT陽性	陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	72
	陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陽性	2
2. <i>V. cholerae</i> O1 CT陰性	陰性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	66
	陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陰性	1
3. <i>V. cholerae</i> O139 CT陽性	陽性	O139抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	74
	陰性	O139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陰性	7

4

コレラ(三類感染症)

【定義】コレラ毒素(CT)産生性コレラ菌(*Vibrio cholerae* O1)又は*V. cholerae* O139による急性感染性腸炎

【届出基準】分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌におけるコレラ毒素の確認(毒素産生の確認あるいはPCR法による毒素遺伝子の検出)

「コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱い等について」
昭和63年9月28日付

コレラ菌の中で行政上の防疫対策の対象となるのは*V. cholerae* O1で(のちにO139追加)、かつ、コレラエンテロトキシンを産生する菌のみとし、コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱いについては特段の防疫措置は必要ない。

国内初発であるか否かを問わず、真性患者及び保菌者としての決定は地方衛生研究所における検査によって行うこと。

5

検査結果報告書のまとめ

- O抗原の決定
O1抗原について少ないながら陰性が見られた。
O139抗原の検出は一致していた。
- CT産生の確認あるいはCT遺伝子の検出
いずれの試料においても一致していた。
- 試料2では、正しい同定結果が得られたが「コレラ菌陽性」と判定した施設があった。

実施項目を『三類感染症の原因となる「コレラ菌」の同定』としたほうがわかりやすかったとの意見をいただいた

↓

コレラの届出に必要なO抗原の決定とCTの確認について
検査経過記録書と事後アンケートから検査方法とその結果を解析

6

コレラ届出様式

【12 診断方法】

- 分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における次の①、②いずれかによるコレラ毒素の確認
 - ①毒素産生 ②PCR法による毒素遺伝子
- 検体：便・その他 ()
- 血清型：O1・O139
- O1の抗原型：小川型・稲葉型
- O1の生物型：アジア型(古典型)・エルトル型
- その他の方法 ()
- 検体 ()
- 結果 ()

該当するものをすべて記載すること。

コレラ菌の血清型別試薬

- コレラ菌免疫血清

混合	混合陽性→単味血清で型別
小川型	小川型血清に凝集
稲葉型	稲葉型血清に凝集
	両方に凝集
	両方陰性
- コレラ菌AD(モノクローナル抗体)

感作ラテックスa	a, bが陽性	小川型
感作ラテックスb	a, cが陽性	稲葉型
感作ラテックスc	a, b, cが陽性	彦島型
対照ラテックス	aが陰性	V. cholerae non-O1
	対照が陽性	非特異凝集
- ビブリオコレラ免疫血清 O139 "Bengal"

免疫血清のみ使用	45施設
免疫血清とラテックスキットの併用	26施設
ラテックスキットとO139免疫血清	3施設

コレラ菌の抗原因子と血清型の反応

血清型	抗原因子	コレラ菌免疫血清(各血清に含まれる因子抗体)		
		混合(ABC)	小川型(B)	稲葉型(C)
小川型	AB(C)	+	+	-(+)
稲葉型	AC	+	-	+
彦島型	ABC	+	+	+
O140:Hakata	CD	+	-	+

a 遅れて観察される凝集

B因子またはC因子を持つ海水ビブリオやV. fluvialisが確認されている。

コレラ菌免疫血清では「混合血清のみでコレラ菌の推定を行わないでください」

B因子は小川型の特異抗原であり、彦島型は小川型に結合されることが多い

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料1: V. cholerae O1 稲葉型 CT陽性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
混合	稲葉型	24	64 (91.4%)
生菌で稲葉型	判定不能	5	2
	未実施	27	2
	稲葉型	4	
加熱死菌で稲葉型	判定不能	2	
	未実施	2	
生菌で彦島型	彦島型	1	
加熱死菌で彦島型	彦島型	1	
	判定不能	1	
加熱死菌で判定不能	未実施	1	
	未実施	1	
混合のみ実施	判定不能	1	

CT陽性の場合 O1抗原判定不能を陰性と判断して良いのか

O1抗原確認PCR 未実施 実施

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料2: V. cholerae O1 小川型 CT陰性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
混合	小川型	26	69 (98.6%)
生菌で小川型	判定不能	2	1
	未実施	28	
加熱死菌で小川型	小川型	8	
	未実施	4	
混合のみ実施	小川型	1	
判定不能(自己凝集)	判定不能	1	

O1抗原確認PCR 未実施 CT陰性のため追合せず

【参考】対照(株)使用施設数

免疫血清	ラテックス	施設数
陽性対照	8	12
陰性対照 ^a	7	16

5施設は陽性対照・陰性対照ともに使用していなかった

試料1 彦島型(2)
O1抗原陰性(2)
試料2 O1抗原陰性(1)

a 生食水等を含む

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料2: V. cholerae O1 小川型 CT陰性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
混合	小川型	26	69 (98.6%)
生菌で小川型	判定不能	2	1
	未実施	28	
加熱死菌で小川型	小川型	8	
	未実施	4	
混合のみ実施	小川型	1	
判定不能(自己凝集)	判定不能	1	

使用頻度を考慮すると、毎年血清や試薬を更新するのは困難

血清型別用の対照株を常時準備するのは難しく、抗原液も保存できない

血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法で確認することが望ましい

【参考】対照(株)使用施設数

免疫血清	ラテックス	施設数
陽性対照	8	12
陰性対照 ^a	7	16

a 生食水等を含む

毒素産生性試験の結果

■ PCR法によるCT遺伝子検査実施 71施設 (95.9%)

マニュアルのプライマー	43	どの方法でも結果は一致していた
市販プライマー	20	
小林プライマー	5	
マニュアルと市販の併用	2	
市販と自家製の併用	1	

事後アンケートによると
70施設中22施設で複数のプライマーを準備している
(精度管理用に準備したものを含む)

■ RPLAによるCT産生試験実施 35施設 (47.3%)

試薬: VET-RPLA(デンカ生研) 事後アンケートによる(n=33)

毒素産生用培地: CAYE培地, CAYE-L培地	16
Syncase培地	8
酵母エキスブイヨン	2
AKI培地	1
BHIプロス	1
BHI寒天培地, 普通寒天培地	3
添付文書記載培地	1
未記入	1

検査記録経過書・事後アンケートの解析 検査担当者等について

■ 担当者情報 1名 24施設
2名 23施設
3名 27施設(合計 151名)

■ 担当の内訳と検査経験

担当	記載数	コレラ菌検査の経験 ^a		細菌検査の経験 ^a			
		なし	5年以内	6年以上	なし	5年以内	6年以上
検査担当者	133	42	54	37	1	61	71
検査区分責任者	11	1	6	4	1	1	9
検査部門責任者	5	4	0	1	3	0	2
その他	2	2	0	0	0	1	1
合計	151	49	60	42	5	63	83

^a 検査経験はトレーニングも含むとした

検査担当者の約3割はコレラ菌検査の経験がない

検査

■ 純培養の確認 74施設で実施

使用培地	非選択培地 1~2種類	40施設
	非選択培地 1種類 + 選択培地 1~4種類	12施設
	選択培地 1~3種類	22施設

↓
選択性のある培地だけ
使用して純培養が確かめられるのか

非選択培地	選択培地
<ul style="list-style-type: none"> 普通寒天培地 トリプトソイ寒天培地 ハートインフュージョン培地 (食塩を追加したものも含む) 	<ul style="list-style-type: none"> TCBS クロモアガー-Vibrio ピブリオ寒天 PMT

■ 選択分離培地でのコロニーの観察 74施設で実施

使用培地	TCBS	21施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio	22施設
	TCBS + ピブリオ寒天/X-VP/PMT	11施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio + ピブリオ寒天	17施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio + ピブリオ寒天 + PMT/X-VP	3施設

分離菌性状検査(1)

検査項目	TSI	単糖代謝確認培地	未実施
ブドウ糖	72	2	
乳糖	68	5	1
白糖	69	5	

検査項目	LIM	SIM	その他(培地・試薬名)
運動性	66	5	3 (半流動培地)
リジン脱炭酸	71		3 (メラーの培地等)
インドール	67	5	2 (市販キット)

VP試験	市販VP半流動培地	64	基本的な性状確認は行われていた
	簡易同定キット	1	
	その他	7	
	未実施	2	

オキシダーゼ試験 市販ディスクまたは市販ろ紙 74

分離菌性状検査(2)

耐塩性試験 実施74施設

食塩濃度(%)	施設数
1種類 0	2
3種類 0, 3, 8	1
4種類 0, 3, 7, 10	2
5種類 0, 3, 8, 10	7
6種類 0, 3, 6, 8, 10	60
7種類 0, 3, 7, 8, 10	1
8種類 0, 1, 3, 6, 8, 10	1

無塩での発育確認は必須と考えられている

その他: 約20施設が記載
簡易同定キット(アピ20E, ラピッドID32E, IDテストEB-20)
アルギニン、オルニチン
マンニット
Andrade培地(グルコース ガス産生)
O/129ディスク感受性
ポリミキシンB感受性、ヒツジ赤血球溶血性 など

コレラ届出様式

【12 診断方法】

- 分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における
 - ①毒素産生 ②PCR法による毒素遺伝子
 検体: 便・その他 ()
 血清型: O1・O139
 O1の抗原型: 小川型・稲葉型
 O1の生物型: アジア型(古典型)・エルトール型
- その他の方法 ()
 検体 ()
 結果 ()

該当するものをすべて記載すること。

コレラ菌の生物型別_事後アンケート70施設のまとめ

実施した 31施設 エルトール型 (29), 判定不能 (2)
実施しなかった 39施設

鑑別性状	アジア型 (古典型)	エルトール型	実施 施設数 ^a	判定不能施設の 実施項目
溶血性(ヒンジ)	-	+	1	・VP試験
赤血球凝集性 (ニフトリ)	-	+	3	・VP試験と赤血球凝集性
ポリミキシンB 感受性	+	-	1	
VP試験	-	+	16	
ヘモリシン遺伝子 の鑑別 ^b			25	
rtx因子の有無	-	+	2	

a 複数実施した施設があり合計は48となる
b マニュアルに記載の生物型別用PCRなど

生物型別を実施している施設は半数以下であった

対照(株)の使用状況_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性対照		陰性対照	
	使用した	使用せず	使用した	使用せず
選択分離培地でのコロニー観察	12	58	5	53
生化学的性状の確認	10	59	5	52
血清凝集反応;コレラ菌免疫血清	12	58	16	42
血清凝集反応;コレラ菌AD	8	42	7	36
RPLA法によるCT産生 確認	21	14	15	18
PCR法によるCT遺伝子 確認	56	11	59	7
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	26	9	29	5
PCR法によるO1, O139抗原 確認	38	12	40	7

血清凝集反応の陰性対照は多くが生食水
PCRの陰性対照は多くが滅菌水

行政報告に必要な検査項目_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性判定に必要	陰性判定に必要
TCBSでのコロニー観察	65	66
TSI寒天培地の性状	61	54
LIM培地の性状	61	54
オキシダーゼ	54	47
無塩ブロスでの発育	52	47
VP試験	46	2施設でどちらも選択してなかった
血清凝集反応	67	
PCRによるO1抗原, O139抗原の確認	27	27
CT遺伝子の確認	65	1施設でどちらも選択してなかった
CT産生性の確認	25	
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	15	19
生物型の確認	13	3

- ### 外部精度管理調査のまとめ
- コレラ菌の届出基準を正しく理解し、地衛研で診断できるよう準備しておくことが大切である。
 - O1抗原の検出について、血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法を実施することが望ましい。
 - CT産生性またはCT遺伝子の確認については、どのような方法であっても検査能力に問題はないと考えられた。
 - 行政への報告に必要な検査項目について、「コレラ菌検査・診断マニュアル」を周知する必要がある。
 - 回答用紙およびアンケート等は空欄(未記入)のないよう工夫したが、空欄をゼロにはできなかった。
 - 受領したファイルの整理(施設によってファイル名が様々)や内容の確認、集計作業はかなり時間を要する。
 - 試薬の更新頻度や予算確保、検査マニュアルなどについて質問を受けており、WGで相談して回答する予定である。

試料発送から検査実施までの 温度変化における 検査結果への影響について

北海道立衛生研究所 森本 洋
 H28.1.8 第二回研究班会議

1

目的

- 試料発送から検査実施までの温度変化を確認し、過度な温度変化があった場合、そのことが行政対応として必須の確認項目である血清学的検査及び毒素検査結果に対し、影響を与えているかについて検討した。

2

方法(事前調査)

- 試料発送:平成27年7月24日(金曜日)
 試料到着:平成27年7月27日(月曜日)
- 北海道衛研所有の自記温度記録計を供試試料へ同梱(3次と4次容器間)し、試料到着後、自記温度記録計を回収し、北海道、埼玉県、富山県、大阪府衛研への輸送中の温度変化を確認し、血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えているかについて検討した。

3

結果(事前調査1)

事前調査での輸送中温度変化概要

地衛研	基準	最高	最低	平均
北海道	26.5	28.5	22.1	24.5
埼玉県	26.4	28.2	25.9	27.0
富山県	26.3	28.3	23.0	25.3
大阪府	26.5	30.3	25.3	26.5

基準温度:引受郵便局到着時温度

事前調査での輸送中温度変化(基準との比較)

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
北海道	2	4.4	5
富山県	2	3.3	4
大阪府	3.8	1.2	
埼玉県	1.8	0.5	2

4

結果(事前調査2)

事前調査での輸送中温度変化(最大温度差)

地衛研	最大温度差
北海道	6.4
富山県	5.3
大阪府	5
埼玉県	2.3

5

方法(本調査)

- 試料発送:平成27年10月1日(木曜日)
 岐阜県より東を中心とした38地衛研
 平成27年10月2日(金曜日)
 西日本を中心とした36地衛研
- 試料到着:平成27年10月5日(月曜日)

* 沖縄県のみ1日発送、2日着

6

方法(本調査)

各施設で使用している自記温度記録計を、発送試料中に同梱し、輸送中の温度記録の回答を求めた。また、後日追加データとして、輸送中の最高、最低、平均温度及び試料到着後すぐに検査しなかった場合の検査開始までの試料保管温度についても回答を求めた。
輸送中の温度変化を確認し、血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えているかについて検討した。

7

結果(本調査1)

- 自記温度記録計の設定不備(5機関)、電源の入れ忘れ(2機関)、輸送中の故障(2機関)、作動せず・不具合(2機関)、電池切れ(1機関)、記録計入れ忘れ(1機関)のため、これら13機関からのデータは、ほとんど得ることができなかった。
- 追加データについては、ゆうパック送り状の「お問い合わせ番号」を記録していなかった機関、送り状を廃棄していた(依頼時期が遅れたことも影響)機関等が8機関あった。
- 計21機関から詳細データが得られなかった場合があった。

8

結果(本調査1)

本調査での輸送中温度変化概要

基準温度	1日発送	22.4~26.0	2日発送	25.3~26.1
最高	1日発送	20.2*~29.0	2日発送	25.1*~30.8
最低	1日発送	5.5**~24.3*	2日発送	8.4~25.7*
平均	1日発送	23.4	2日発送	24.0
機関到着	1日発送	16.05~29.0	2日発送	17.3~26.0
開封	1日発送	16.0~26.2	2日発送	19.0~26.5

基準温度: 引受郵便局到着時温度
*: 基準温度ND
**: 日通航空利用

9

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅	地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
沖繩県	5.0	18.5	19	滋賀県	2.2	7.0	
宮城県	0.0	12.8	13	埼玉県	6.1	3.0	
さいたま市	0.0	11.3	12	愛媛県	2.0	6.2	7
山口県	1.0	10.3	11	岐阜市	1.1	6.7	
大分県	3.9	9.2		長野県	0.0	6.8	
広島市	3.0	9.6		京都市	1.4	5.6	
鳥根県	2.0	9.4	10	足立区	0.9	5.8	
函館市*	0.9	9.5		東京都	0.9	5.7	6
札幌市	0.0	9.1		杉並区	1.0	5.5	
和歌山市	1.5	9		東大阪市	0.9	5.4	
鳥取県**	4.9	8.9		宇都宮市	0.0	5.3	
広島県	1.5	8.1	9	相模原市	0.1	5.0	
仙台市	0.9	8.5		福井県	0.1	5.0	
北海道	0.0	8.9		岐阜県	0.2	4.7	
群馬県***	0.0	8.8		愛知県	0.5	4.5	5
岡山市	3~0	7.8~10.8	8~11	石川県	0.8	4.2	
佐賀県	4.0	7.7		新潟市****	0.18	4.59	
兵庫県	3.3	7.7		新潟県	0.2	4.3	
熊本県	2.2	8.0		静岡市	2.0	4.0	
北九州市****	2.6	7.6		神奈川県	2.2	3.7	4
長野市	2.3	7.2		横浜市	0.4	3.8	
福岡市	1.5	7.9	8	姫路市	0.0	3.9	
宮崎県	1.5	7.9		茨城県	2.1	2.4	3
奈良県	1.6	7.7		山梨県	0.0	2.8	
熊本市	1.2	7.6					
福岡県	1.1	7.6					
岡山県	1.1	7.2					
青森県	0.0	7.7					
秋田県	0.0	7.2					

***** 保存中振れ幅 -18: 検査日10/5
**** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7
*** 保存中振れ幅 -23: 検査日10/14
** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7
* 保存中振れ幅 -21: 検査日10/5

地衛研	最大温度差	地衛研	最大温度差
沖繩県	23.5	愛媛県	8.2
鳥取県*	13.8	岐阜市	7.8
大分県	13.1	青森県	7.7
宮城県	12.8	秋田県	7.2
広島市	12.6	京都市	7.0
佐賀県	11.7	長野県	6.8
鳥根県	11.4	足立区	6.7
さいたま市	11.3	東京都	6.6
山口県	11.0	杉並区	6.5
兵庫県	11.0	東大阪市	6.3
岡山市	10.8~13.8	静岡市	6.0
和歌山市	10.5	神奈川県	5.9
函館市**	10.4	宇都宮市	5.3
熊本県	10.2	相模原市	5.1
北九州市***	10.2	福井県	5.1
広島県	9.6	愛知県	5.0
長野市	9.5	石川県	5.0
仙台市		岐阜県	4.9
福岡市	9.4	破泉県	4.9
宮崎県		新潟市****	4.77
奈良県	9.3	新潟県	4.5
滋賀県	9.2	茨城県	4.5
埼玉県	9.1	横浜市	4.2
千葉県	9.1	姫路市	3.9
北海道	8.9	山梨県	2.8
群馬県****	8.8		
熊本市	8.8		
福岡県	8.7		
岡山県	8.3		

* 保存中26.8(検査日10/7) ***** 保存中21.11
** 保存中16.6(検査日10/5) (検査日10/5)
*** 保存中24.4(検査日10/7)
**** 保存中22.1(検査日10/14)

まとめ(事前調査)

- 夏季に実施したため、特に高温側に大きく温度が振れる可能性を予想していたが、比較的安定した結果であり、血清学的検査及び毒素検査について適切な結果が得られていた。
- 夏季に実施したことが良い方向に働き、輸送車及び配送中継所内が冷房等により安定した状態であったと思われる。

12

まとめ1(本調査)

- 輸送中、試料引受郵便局での温度を基準に大きな温度幅が認められた試料が複数あった。
- 特に輸送中及び試料到着後の一時保存温度を含め、20℃以上の高低差のある環境下に置かれた試料が5試料あった。
- このうち1施設の試料においては、最も高低差のある温度環境下(高低差26.8℃)にあった。

13

まとめ2(本調査)

- 輸送中外気温の影響を強く受けていることが示唆された。
- が、他の試料でも、長時間4℃保存環境下に置かれるなど、大きな温度変化があった場合でも適切な結果が得られており、今回の調査では、それぞれの温度変化が、試料菌株に対し影響を与えていたかについては、結論を出すのが難しいと思われた。

14

まとめ3(本調査)

- 外部精度管理調査においては、配付試料の安定性を担保することが不可欠である。
- シミュレーションを入念に行うのはもちろんのこと、基本的には、実施時期にかかわらず外気温の影響を受けにくく、また、試料到着後輸送中の温度と変わらない温度帯で一時保存しやすい、チルド輸送での対応が適当と思われた(沖縄県について要検討)。
- 配付試料においては、輸送中の温度、一時保存温度を念頭に置いた菌株選定が必要と思われた。

15

外部精度管理の導入と継続実施のための事業体制の構築に関する研究
平成27年度第2回班会議
富山県衛生研究所 細菌部 磯部順子

平成28年度地方衛生研究所 外部精度管理について

2年間の精度管理調査の実績

	平成26年度	平成27年度
参加機関	研究班と一部の地研	全国74か所の地研等
対象疾患	サルモネラ腸炎? (チフス)	コレラ
配付病原体	S. Cerro S. Infantis(硫化水素非産生)	V. cholerae O1(CT+)稲葉 O1(CT-)小川 O139(CT+)
検体の形態と数	模擬便 2	カジトン培地3
調査項目	サルモネラの検出と同定	三類感染症の報告 そのためのコレラ菌疑い株の同定
結果の解析	結果の解析 事後アンケート	結果の解析 事後アンケート 赤痢菌の検査の現状アンケート
その他	感染症検査の現状アンケート	感染症検査体制アンケート

今年度(以降)の実施内容について

平成27年度第1回班会議より

- 平成27年度はコレラで実施したい。
- 次年度は赤痢菌の必要性が高いのではないか。

H27年度 コレラ菌

- ワーキンググループで検査マニュアルを作成(旧版を手直し)
- 菌株の選定と実施要領・ワークシート作成
- 菌株の配布
- 結果の回収と実施後アンケート実施

赤痢菌検査の現状把握
(コレラ菌検査精度管理の実施後アンケートに含む)

H28年度 赤痢菌 コレラ菌検査トラブルシューティング

H29年度 (EHEC) 赤痢菌検査トラブルシューティング

平成26年度アンケート結果および必要性などから考えられる対象病原体候補

■ 3類感染症(腸管感染症)の原因菌(調査項目)

- コレラ菌(平成27年度に実施済)
- 赤痢菌(検査項目・手順・遺伝子検査等)
- 腸管出血性大腸菌(検査方法・IS-printing法)
- チフス菌
- パラチフスA菌

■ 5類感染症の原因菌

- A群溶血性レンサ球菌
 - カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)
- 必要性和項目についてはレファレンスセンターと協議が必要

平成27年度第1回班会議より

精度管理対象の項目

検査項目

- 細菌の同定
 - 細菌の検出
 - 遺伝子の検出
 - 毒素産生性の検査
 - 分子疫学的解析
- PFGE
IS-printing

配付試料

- 分離菌
- 模擬臨床検体
- DNAテンプレート

細菌性赤痢の判定を調査項目とするか?


- 3類感染症である
- 食品関連業務に従事する人の場合、就業制限がかかる
- 原因菌を同定する公定法はない
- 原因菌の誤同定が他に比べると多い
- 腸管侵入性大腸菌との絶対的な鑑別点がない



医療機関や保健所からの同定依頼がしばしば発生する

地衛研での最終同定が求められる

赤痢菌同定の問題点



IASR Vol.24 No.9 (No.283) September 2003

赤痢菌の検査法の問題点と解決策
赤痢菌の同定に関する問題事例
医療機関で大腸菌が赤痢菌と誤同定された事例
下病患者から分離された*M. morganii*が赤痢菌と誤同定された事例
赤痢菌同定の問題点
赤痢菌同定における留意点
赤痢菌同定検査の問題点と現場からの提案

10年以上経っても問題点は解決していない

→ 一部の地研では検査数が減少し、希少感染症となりつつある

細菌性赤痢と診断することの難しさを理解していない地研もありうる

赤痢菌検査に関する現状調査のまとめ (20160105時点)

糞便検査	ある	(その件数/年)			ない
		0-10	10-100	100-1,000	
食中毒や感染症発生動向調査等の糞便検査	41	15	11	15	25
赤痢患者の接触者検便や服薬後検便	40	32	8	0	26
その他	7				59

菌株同定検査	ある	(その件数/年)		その他の内容	件/年
		5以下	10-20		
菌株同定検査	35	33	2	外来・公立施設からの依頼	3,000
同定された菌名	菌数			行幸歴に係る検査	11
<i>Shigella dysenteriae</i>	6			一般依頼検査	10
<i>Shigella flexneri</i>	11			チフス患者の接触者検便や服薬後検査	10
<i>Shigella boydii</i>	4			一般依頼検査	100
<i>Shigella sonnei</i>	16			食品等従事者検便	870
EIEC	3			調理従事者からの依頼検査	900
EIEC以外の大腸菌	13				
<i>Morganella morganii</i>	5				
その他	6				8

赤痢菌検査に関する品質保証のポイント

届出基準: 検査材料 便
検査方法 分離・同定による病原体の検出

- 赤痢菌同定の根拠
 - 1) 性状
 - 2) 血清型
 - 3) 病原因子(腸管侵入性に関する遺伝子)
- 赤痢菌同定の問題点
 - 1) 日常の検査項目では、「陽性」となる性状が少なく、同定困難
 - 2) 赤痢菌と決定するための性状があまりにも多様である。
 - 3) 重要な性状のひとつ「運動性」「ガス産生性」を自動同定機器や簡易同定キットでは検査不可能。(医療機関等で分離された菌株の鑑別依頼多い)
 - 4) 免疫血清がない、あるいは血清型が決まらない
 - 5) 病原因子(腸管侵入性に関する遺伝子)を検出しても、EIEC(腸管侵入性大腸菌)との鑑別が必要。

勢戸先生ファイルの改変 9

赤痢菌検査に関する品質保証ポイント

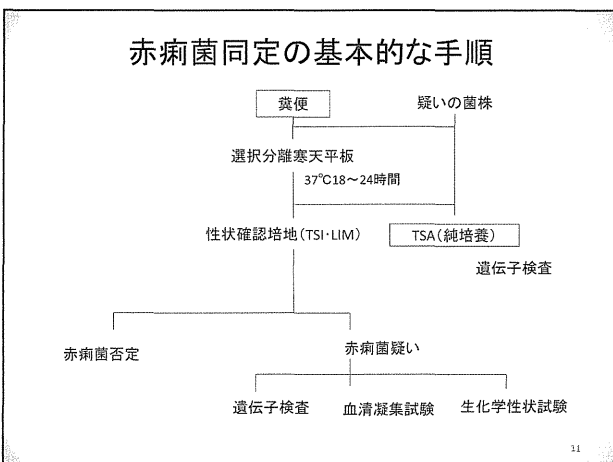
届出基準: 検査材料 便
検査方法 分離・同定による病原体の検出

- 赤痢菌同定の根拠
 - 1) 性状
 - 2) 血清型
 - 3) 病原因子(腸管侵入性に関する遺伝子)
- 赤痢菌同定の問題点
 - 1) 日常の検査項目では、「陽性」となる性状が少なく、同定困難
 - 2) 赤痢菌と決定するための性状があまりにも多様である。
 - 3) 重要な性状のひとつ「運動性なし」を自動同定機器や簡易同定キットでは検査不可能。(医療機関等で分離された菌株の鑑別依頼多い)
 - 4) 免疫血清がない、あるいは血清型が決まらない
 - 5) 病原因子(腸管侵入性に関する遺伝子大腸菌)との鑑別が必要。

届出の基準とはなっていない

普遍的な鑑別点はない

10



手順書に添付する参考資料

表2.赤痢菌のおもな生化学性状

性状	反応
インドール	d
メチルレッド	+
Voges-Orosukauer	-
硫化水素(TSI)	-
ウレアーゼ(christensen)	-
リジンデカルボキシラーゼ	d
アルギニンヒドラーゼ	d
オルニチンデカルボキシラーゼ	-
酢酸ナトリウム	d
ブドウ糖からのガス産生	d
糖(酸)	d
ブドウ糖	+
乳糖	d
白糖	d
マンニト	d
サリシン	-
β-ガラクトシダーゼ	d
運動性	-

+.90%以上が陽性、-.90%以上が陰性、d:菌株によって異なる

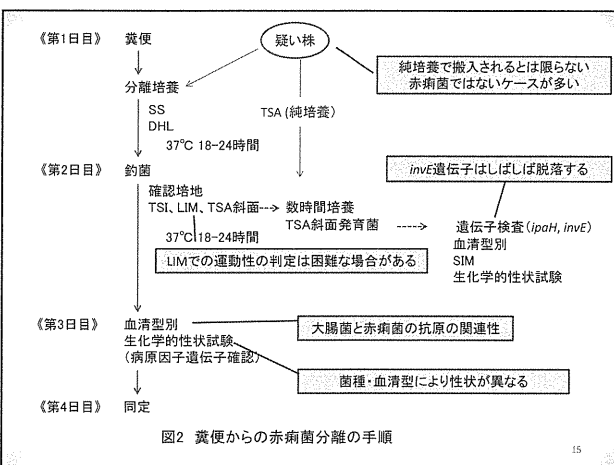
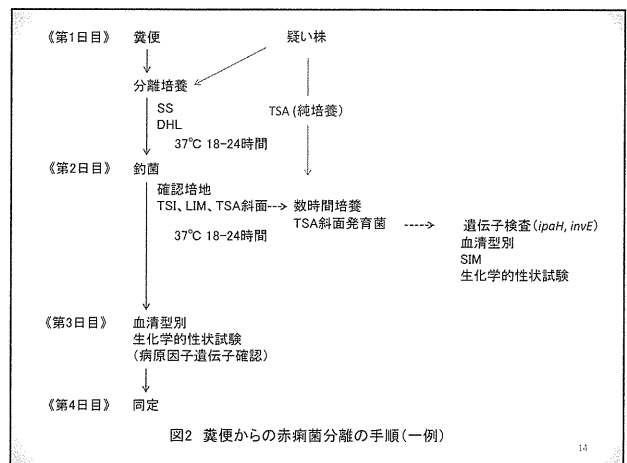
12

手順書に添付する参考資料

表3.赤痢菌の鑑別性状

性状	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>E. coli</i>
インドール	d	d	d	-	d
β-ガラクトシダーゼ	d	-	d	+	+
オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-	-	+	+
ブドウ糖からのガス産生	-	d	d	-	+
糖(酸):マンニト	-	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	(+)	+(+)
白糖	-	-	-	(+)	d
ラフィノース	-	d	-	(+)	d
キシロース	d	d	d	-	+
ズルシット	d	-	-	-	d
酢酸ナトリウム	-	d	-	-	+(+)

dが多く、これだけでは判定できない



赤痢菌の調査項目のポイントをどこにするか？

1	運動性の確認	運動性がないということが全ての赤痢菌における唯一無二の絶対的な性状である。SIM培地を併用しているか？
2	遺伝子検査	ipaHを検出しているか？ invEが脱落する可能性を理解しているか？
3	血清型別試験	免疫血清の保有状況は？ 共通抗原に対する認識・・・ EIECを疑う場合の検査は？
4	類似菌との鑑別	<i>Morganella morganii</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> との鑑別

どの段階で赤痢菌と決定するのか？

- 細菌性赤痢の精度管理調査の検討項目
(意見のまとめ)
- 模擬(臨床)検体からの菌の分離・性状確認・鑑別・同定・型別
 - 菌株(非典型株を含む)を用いた赤痢菌の鑑別・同定
 - 1の場合もしくは2で菌を混合接種する場合 分離寒天培地から当該菌を選択できるか？
 - 1,2に共通な項目(通常どの範囲まで実施しているか/できるか?)
 - ・生化学性状(検査項目)
 - ・血清型別
 - ・遺伝子検査の活用状況
- point 類似菌との鑑別ができるか？(鑑別のポイントのチェック)
腸管侵入性大腸菌(EIEC)・*Plesiomonas shigelloides*・*Morganella morganii*
- 当面は判断困難な問題
- ・鑑別不可能なEIEC
 - ・新血清型赤痢菌
 - ・報告されていない抗血清に凝集しない赤痢菌と同定される株
 - ・*Shigella boydii* 13病原遺伝子を保有しない赤痢菌の対応
- その他
- ・薬剤感受性試験・臨床症状からの判断を含む出題・誤同定の事例調査・自家調整培地の精度の担保？

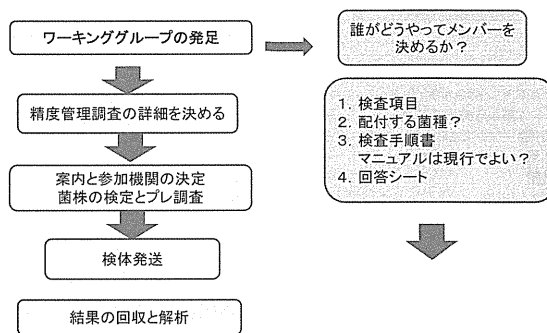
- 今年度(以降)の実施内容について
- 平成28年度は細菌性赤痢で実施したい。
 - 次年度はEHECの必要性が高いのではないか。
- H28年度 赤痢菌
- ・菌株の選定と実施要領・ワークシート作成
 - ・菌株の配布
 - ・結果の回収と実施後アンケート実施
- コレラ菌検査トラブルシューティングは必要か？
- H29年度 (EHEC?) 赤痢菌検査トラブルシューティング

平成27年度に作成した書類等

1. 病原体検出マニュアル(改定版)
2. 実施予定案内文
3. 搬送容器の準備説明書
4. 搬送容器チェックシート
5. 参加申込書兼誓約書
6. 精度管理細菌検査実施手順書
7. 案内文(part2)
8. 結果報告書
9. 検査経過記録書
10. 検査体制アンケート
11. 事後アンケート
12. まとめ??

19

細菌性赤痢を対象とする精度管理調査



20

