

皆川班会議

H29年度 精度管理 赤痢菌検査
標本の作製

国立感染症研究所
感染症疫学センター
村上光一

細菌小班・細菌WG活動

H28年

7月6日 細菌WG会議

赤痢菌を対象に
20地衛研程度を対象に

7月21日 細菌WG会議(衛微協にて)

赤痢菌2株、類似菌1株を別々に 送付
候補株を WG内に送付し、性状等を試験

10月14日 菌株送付(細菌WG内) 5株

候補株の評価等

11月15日 細菌WG会議

問題点の洗い出し

12月9日 菌株送付(細菌WG内)

問題のあった候補株の再送付
(使用可能確認)

H29年

4月 菌株のチェック

5月13、5月14日 2組作成 各48

5月15日-17日 戸山へ搬送

5月22日 各施設へ到着

赤痢菌を対象とした理由

細菌性赤痢検査の重要性

- 三類感染症である
- 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

赤痢菌検査に関する現状調査のまとめ（昨年度・佐多班） （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）		ない
		5以下	10-20	
菌株同定検査	35	33	2	31
同定された菌名	菌数			
<i>Shigella dysenteriae</i>	6			
<i>Shigella flexneri</i>	11			
<i>Shigella boydii</i>	4			
<i>Shigella sonnei</i>	16			
EIEC	3			
EIEC以外の大腸菌	13			
<i>Morganella morganii</i>	5			
その他	6			

その他の内容	件/年
外来・公立施設からの依頼	3,000
行幸啓に係る検査	11
一般依頼検査	10
チフス患者の接触者検便や服薬後検査	10
一般依頼検査	100
食品等従事者検便	870
調理従事者からの依頼検査	900

希少感染症??

赤痢菌の調査項目（同定）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	<i>ipaH</i> を検出しているか？ <i>invE</i> が脱落する可能性を理解しているか？
3	血清型別試験	免疫抗血清の保有状況は？ 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

上記4項目を重視し、共通抗原を有する大腸菌との鑑別

参加地方衛生研究所の選出のための基本データ （H28年当時）

地方	人口 （万人）	配布機関数	赤痢菌を扱った経験		計
			あり	回数	
			なし		
北海道・東北・新潟 (11)	1,686	1	1	1	3
関東甲信静 (28)	4,944	2	1	2	5
東海・北陸 (8)	1,260	1	1	1	3
近畿 (15)	2,276	1	1	2	4
中国・四国 (11)	1,170	1	1	1	3
九州 (12)	1,323	1	1	1	3
計	12,659	7	6	8	21

一次候補菌株の 評価（疫学センター内で）

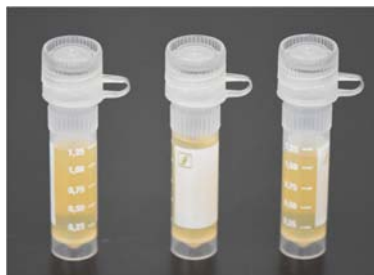
3回継代での変化

菌株 / 抗血清	A多	A1多	B多	C多	C1多	C2多	C3多	D多	D I	D II
T9 (<i>S. flexneri</i>)	-	-	+	+	+	+	-	-	未実施	未実施
16-52 (<i>S. flexneri</i>)	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施
T12 (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
B (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
T10 (大腸菌)	-	-	-	-	+	-	-	-	未実施	未実施

pH 7.8 のPBSで作成したニュートリエントブロス No. 2
(0.8% 胆汁酸塩)で 4時間継代、その後 一晚 これを2回
繰り返す

菌株 / 抗血清	A多	A1多	B多	C多	C1多	C2多	C3多	D多	D I	D II	PCR
T9 (<i>S. flexneri</i>)	±	±	++	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE</i> , <i>ipaH</i> 陽性
16-52 (<i>S. flexneri</i>)	-	-	++	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE</i> , <i>ipaH</i> 陽性
B (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>invE</i> , <i>ipaH</i> 陽性

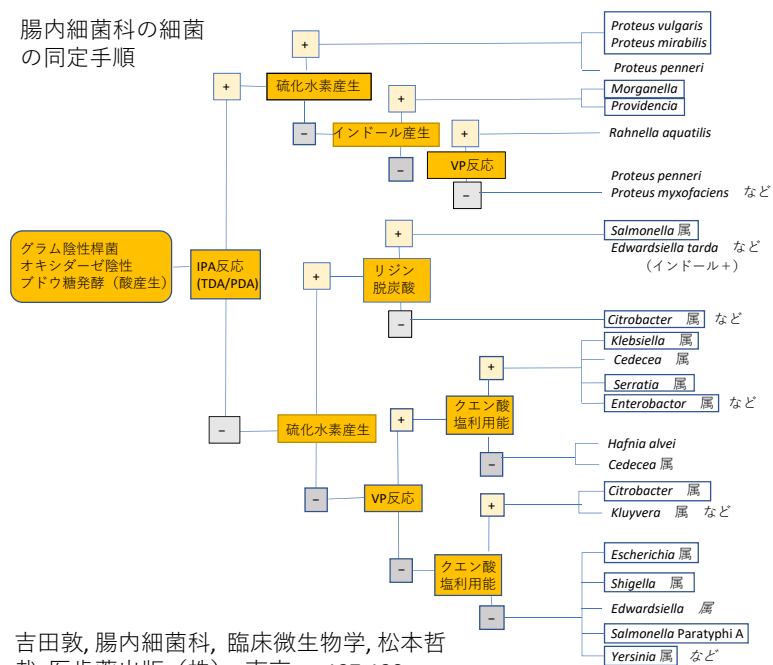
出題方法



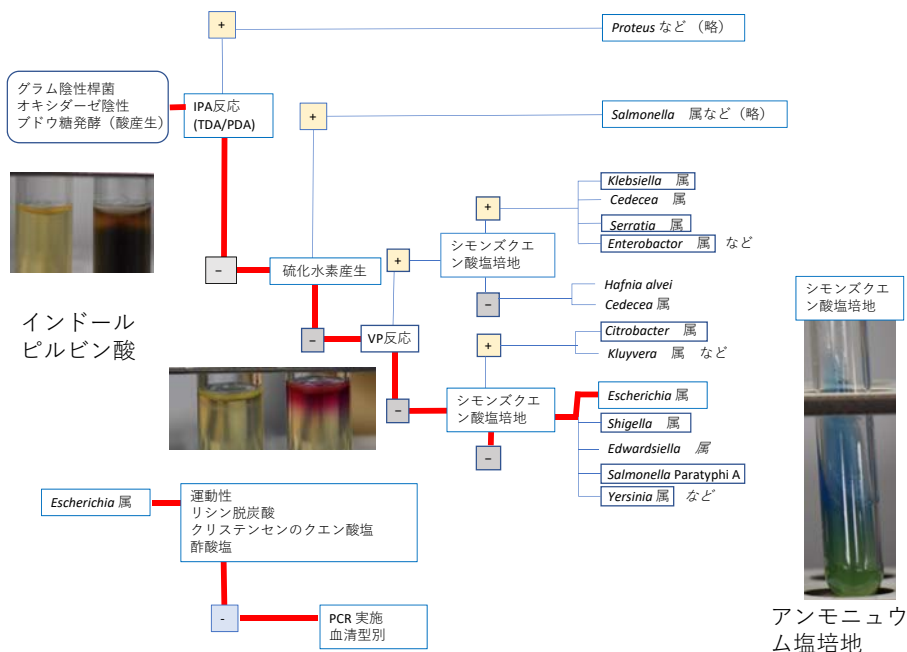
3株送付(混合ではない)
赤痢菌を同定
菌種も同定

S. flexneri
S. sonnei
大腸菌

腸内細菌科の細菌
の同定手順



吉田敦, 腸内細菌科, 臨床微生物学, 松本哲哉, 医歯薬出版(株): 東京. p. 127-130.



糖分解用半流動培地を用いて



粘液酸秤量 (無菌的)



NaOH で pH 7.4 へ



滅菌した培地を 粘液酸へ注ぐ



強い酸性

粘液酸培地作成



NaOH で pH 7.4 へ



4 ml 分注 1晩培養してコンタミ 確認

菌株 凝集する抗血清等 各2株の結果 (実際の精度管理進捗と並行して)

菌株 / 抗血清	A多	A1多	B多	C多	C1多	C2多	C3多	D多	D I	D II	invE, ipaH
T10 (大腸菌)	0	0	0	0	2	0	0	0			不検出
B (<i>S. sonnei</i>)	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	陽性
T16-52 (<i>S. flexneri</i>)	0	0	2	0	0	0	0	0			陽性

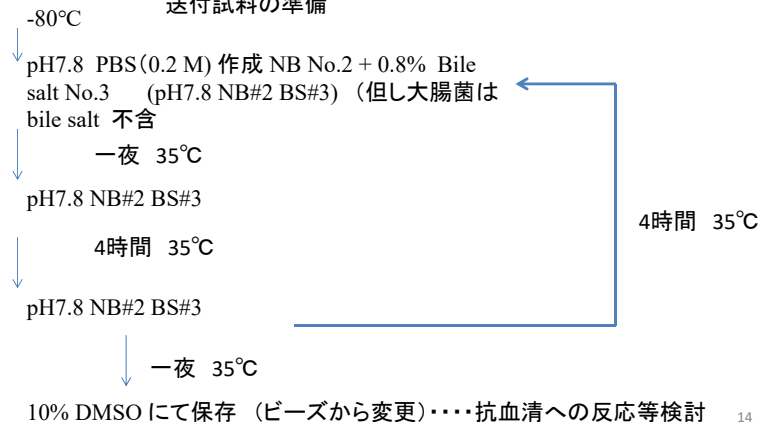
菌株 / 抗血清	8	9	10	11	← ボイド
T10 (大腸菌)	0	2	0	0	

菌株 / 抗血清	I	II	III	IV	V	VI	3(4)	6	7(8)	← フレキシネル
T16-52 (<i>S. flexneri</i>)	0	2	0	0	0	0	2	0	0	

送付準備

H29年4月上旬 元になるストックを
もう一度作成しなおした。

送付試料の準備

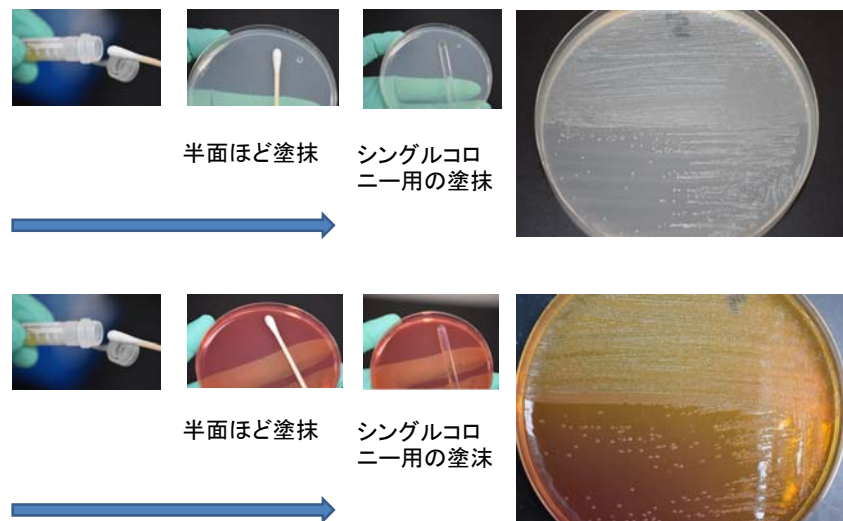


送付試料の準備 (H29年度)



送付標本の処理方法パンフレット作製

滅菌綿棒にて、輸送培地表面から菌を十分 採材する。寒天培地の半面に、当該綿棒で検体を十分に塗抹する。その後、白金耳等にて単独集落の形成を目的に塗抹する。



平行 検討
実際に5月22日から
検査開始



まとめ 精度管理用試料を作成し、地衛研に配布した。

事前検討、事後検討を行った。事前検討(菌株の送付培地の条件検討)には予想外に労力を要した。

赤痢菌配付用試料の作成には困難さが伴った。
スケールアップには更なる検討を要する。

新鮮分離株の使用が妥当だが、株の保存特性が分からず使用し難い。

保存すれば、必ず変異する。

多くの細胞が不可逆変異したストックから 若干残存した正常な細胞を選抜する、有効な方法を開発する必要がある。

冷凍保存の方法について再検討する必要がある。