

微生物検査自動塗抹装置 PREVI Isola の 基礎的検討

関 洋之*¹, 本田 雅久*¹, 荒谷 清*¹, 大田 俊行*¹, 深谷 美保*²

*1 産業医科大学病院 臨床検査・輸血部：福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1 (〒 807-8556)

*2 シスメックス株式会社 学術本部

要 旨

微生物検査の第一段階は、検体を各種選択培地に塗抹し培養することから始まる。塗抹作業は検体の種類や目的菌に合わせて様々な培地を組み合わせる必要があり、現在でもほとんどの検査室においてマニュアル法にて実施されている。

今回、我々はシスメックス・ビオメリュー社の微生物検査自動塗抹装置 PREVI Isola (2009年6月発売)を導入し、その基礎的性能について検討を行った。本装置では同時再現性、希釈直線性について良好な成績が得られ、半定量性が認められた。本装置による塗抹方法はまったく新しい塗抹パターンを採用しているが、従来のマニュアル3分画法との相関は良好であり、シングルコロニーの形成率、混合菌液からの分離能も良好であった。

また、検体処理能力も優れており、これからの微生物検査業務の効率化・標準化に有用であると考えられた。

キーワード PREVI Isola, 自動塗抹装置, 細菌検査

はじめに

微生物検査の第一段階は、検体を各種選択培地に塗抹し培養することから始まる。検体の種類や臨床からのオーダー・目的菌ごとに様々な培地を組み合わせ塗抹する必要があり、現在でも多くの施設においてマニュアル法で実施されているため、多大な労力と時間を塗抹作業に費やしている。今回我々は、シスメックス・ビオメリュー社の自動塗抹装置 PREVI Isola (2009年6月発売、以下、PREVI Isola)を導入し、その基礎的性能と導入効果について検討を行ったので報告する。

PREVI Isola の分離培養法とその見方

PREVI Isola は、従来のマニュアル画線塗抹法とはまったく異なる新しい方法で分離塗抹を行う。必要に応じて液状化した検体を本体内部のピペットにて検

体ごとに設定された適量(尿・血液・増菌培養液は10 μ L、便抽出液・トランスワブ(medical wire社)抽出液・喀痰処理液は18 μ L)を吸引して培地上のスタートラインに分注する。そしてアプリケーションと呼ばれる塗抹部品で培地の円周沿いに検体を塗抹する。

コロニーはスタートラインからエンドラインに向かって培地の円周に沿って発育する。

菌量が多いほどエンドラインに近い位置までコロニーが発育する(図1)。

スタートラインから培地を8つのエリアに分割し、それぞれスコア2～スコア8と定義すると、スコア2が10² CFU/mL、スコア3が10³ CFU/mL、スコア4が10⁴ CFU/mL、スコア5が10⁵ CFU/mL、スコア6が10⁶ CFU/mL、スコア7が10⁷ CFU/mL、スコア8が10⁸ CFU/mLの菌量に相当する(図2～5)¹⁾。なお、半定量値ではスコア2を+以下、スコア3とスコア4を+、スコア5とスコア6を++、スコア7とスコア8を+++と判定した。

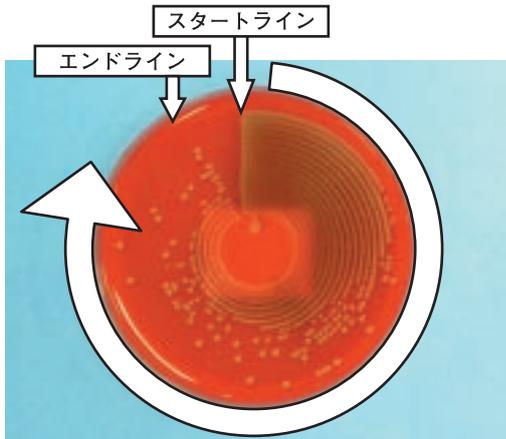


図1. PREVI Isola の塗抹培養所見

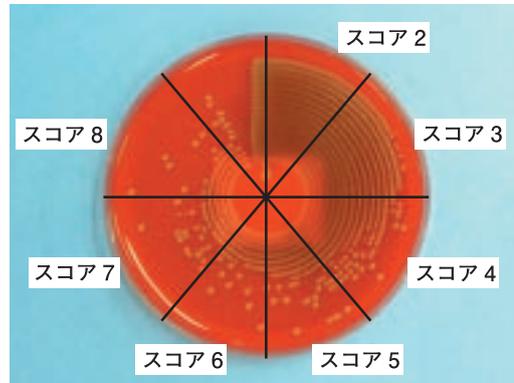


図2. 発育菌量 (スコア) の見方

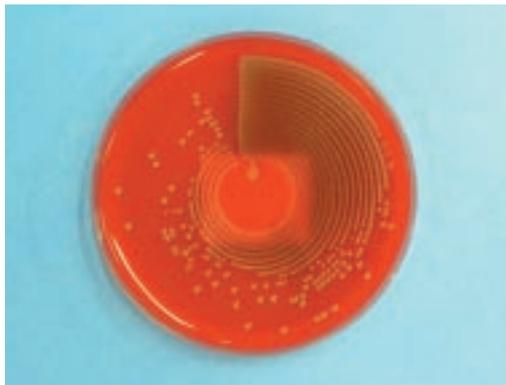


図3. *E. coli* 菌量 10^8 CFU/mL (スコア 8)

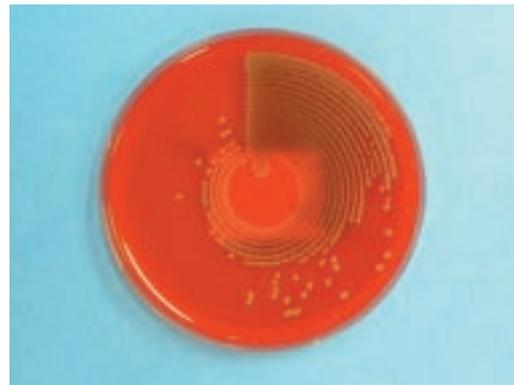


図4. *E. coli* 菌量 10^6 CFU/mL (スコア 6)

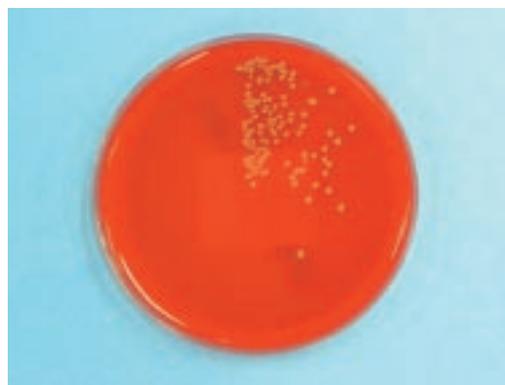


図5. *E. coli* 菌量 10^4 CFU/mL (スコア 4)

本機のシステム構成

当大学病院はオーダーリングシステムを採用しており、検査システム CIS にて細菌検査依頼指示書のバーコードを用いて細菌検査室にて部門受付をすることにより、検査オーダー・目的菌・検査材料・患者属性などをホストコンピュータから取得する。部門受付と同時に検体番号を割付け、オーダー情報を PREVI Isola のワークステーションコンピュータに送信する。これらの情報をもとに PREVI Isola 本体は培地を選択し、投入された前処理検体を培地に自動塗抹していく（図6）。

検体前処理方法

尿は原液を用いた。

喀痰は喀痰 1mL とスプータザイム 1mL を等量混和し液状化した後、滅菌生理食塩液で 10mL にメスアップし、10 倍希釈液とした。

鼻腔・咽頭・膿・便などのトランスワブで提出された検体は滅菌生理食塩液 3mL で抽出した後、2.5mL を滅菌チューブに分注して塗抹検体とした。

方法

1. 同時再現性

標準菌株 *E. coli* ATCC 25922 と *S. aureus* ATCC 29213 を用い、0.45%滅菌食塩水にて 10^8 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^4 CFU/mL 相当の菌液を調整し、PREVI Isola にて極東バイタルメディアヒツジ血液寒天培地に 10 枚ずつ塗抹培養して、同時再現性をスコアおよび半定量値にて評価した。

2. 希釈直線性

臨床検体から分離された *S. aureus* と *E. coli* を用いてそれぞれ 0.45%滅菌食塩水で McF 0.5 (10^8 CFU/mL に相当) に調整した。これを 0.45%滅菌食塩水にて連続的に 10 倍希釈し、 10^8 CFU/mL ~ 10 CFU/mL の 8 段階の菌液を調整し、PREVI Isola にて極東バイタルメディアヒツジ血液寒天培地に 2 枚ずつ塗抹培養し、調整菌液濃度に対してのスコアの希釈直線性を評価した。

3. マニュアル画線塗抹法との相関

2009 年 11 月～2010 年 3 月に当院にて提出された喀痰（45 検体）および尿（35 検体）を用いマニュアル画線塗抹法での培養結果と PREVI Isola の培養結果の半定量値を比較検討した。

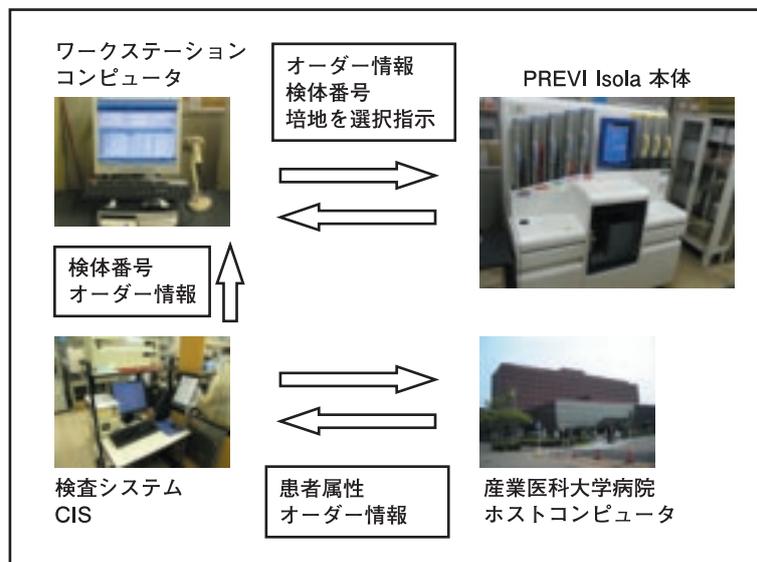


図6. 当検査部の PREVI Isola システム構成

4. シングルコロニーの分離能

S. aureus ATCC 29213 を 10^8 CFU/mL に調整した菌液を用いて 10^8 CFU/mL ~ 10 CFU/mL までの 8 段階の菌液を調整し、PREVI Isola とマニュアル画線塗抹法にて極東ヒツジ血液寒天培地に各 5 枚ずつ塗抹培養し、発育したシングルコロニー数をカウントして比較検討した。

5. 2 菌種混合液の分離能

臨床検体から分離された *S. aureus* と *E. coli* をそれぞれ 0.45% 滅菌食塩水で McF 0.5 (10^8 CFU/mL に相当) に調整し、等量混合した。これを 0.45% 滅菌食塩水にて連続的に 10 倍希釈し、 10^8 CFU/mL ~ 10^3 CFU/mL の 6 段階の菌混合液を調整し、PREVI Isola にて極東ヒツジ血液寒天培地に塗抹分離して 2 菌種の分離能を検討した。

6. 塗抹処理能力の検証

PREVI Isola にて 10 個の検体を 1 検体あたり 3 種類の培地に塗抹し、検体塗抹処理時間を検証した。また、検体受付総数 110 検体の業務内容をマニュアル画線塗抹法と PREVI Isola で処理した場合とで比較した。

結果

1. 同時再現性

E. coli ATCC 25922 において、 10^8 CFU/mL の菌液では 8 枚が + + +, 2 枚が + +, 10^6 CFU/mL の菌液では 9 枚が + +, 1 枚が +, 10^4 CFU/mL の菌液では 10 枚すべてが + であった (表 1)。

S. aureus ATCC 29213 において、 10^8 CFU/mL の菌液では 10 枚すべてが + + +, 10^6 CFU/mL の菌液では 9 枚が + +, 1 枚が +, 10^4 CFU/mL の菌液では 10 枚すべてが + であった (表 2)。

表 1. PREVI Isola の同時再現性 (*E. coli* ATCC 25922)

調整菌液濃度	10^8 CFU/mL		10^6 CFU/mL		10^4 CFU/mL	
	スコア	半定量値	スコア	半定量値	スコア	半定量値
No.1	7	+++	6	++	4	+
No.2	7	+++	5	++	4	+
No.3	8	+++	6	++	4	+
No.4	7	+++	5	++	3	+
No.5	8	+++	5	++	4	+
No.6	7	+++	5	++	4	+
No.7	5	++	5	++	3	+
No.8	7	+++	6	++	4	+
No.9	6	++	5	++	4	+
No.10	8	+++	4	+	4	+

表 2. PREVI Isola の同時再現性 (*S. aureus* ATCC 29213)

調整菌液濃度	10^8 CFU/mL		10^6 CFU/mL		10^4 CFU/mL	
	スコア	半定量値	スコア	半定量値	スコア	半定量値
No.1	8	+++	6	++	3	+
No.2	7	+++	4	+	4	+
No.3	7	+++	6	++	4	+
No.4	8	+++	5	++	3	+
No.5	8	+++	5	++	4	+
No.6	8	+++	5	++	3	+
No.7	8	+++	5	++	4	+
No.8	8	+++	6	++	3	+
No.9	8	+++	5	++	3	+
No.10	8	+++	5	++	4	+

2. 希釈直線性

S. aureus と *E. coli* の直線性は 2 菌種ともに 10 CFU/mL, 10⁵ CFU/mL, 10⁶ CFU/mL で ++, 10⁷ CFU/mL, 10⁸ CFU/mL で + 以下, 10³ CFU/mL, 10⁴ CFU/mL で +, 10⁵ CFU/mL, 10⁶ CFU/mL で ++, 10⁷ CFU/mL, 10⁸ CFU/mL で +++ であった (図7~10).

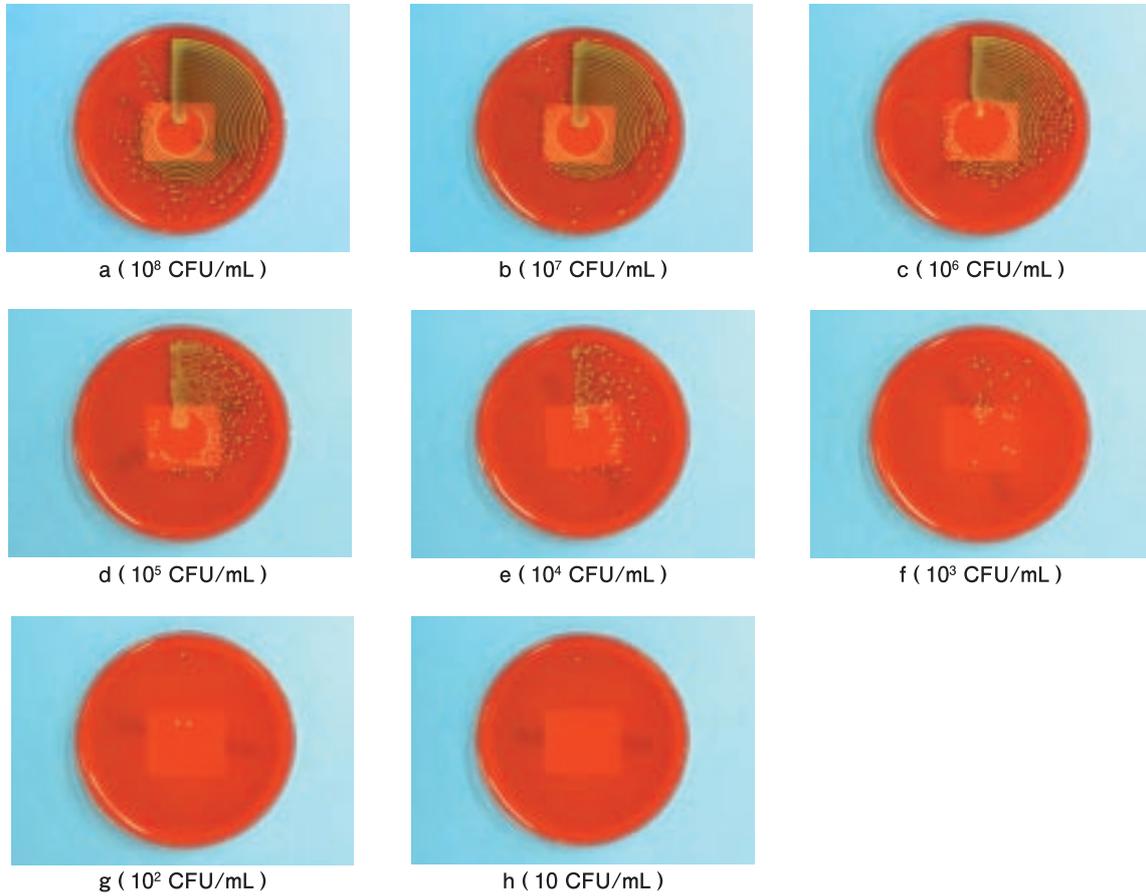


図7. PREVI Isola における *S. aureus* 各菌濃度の塗抹培養所見

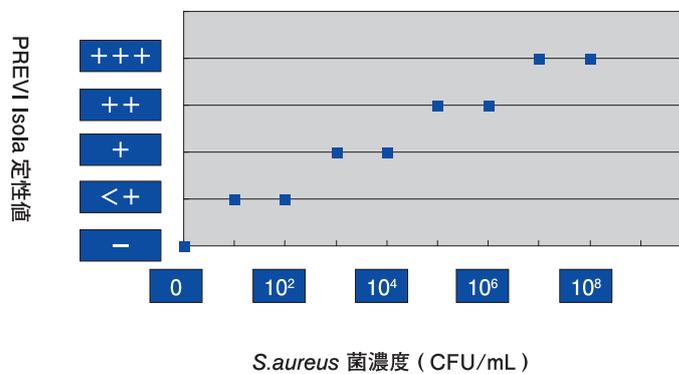


図8. PREVI Isola における *S. aureus* の希釈直線性

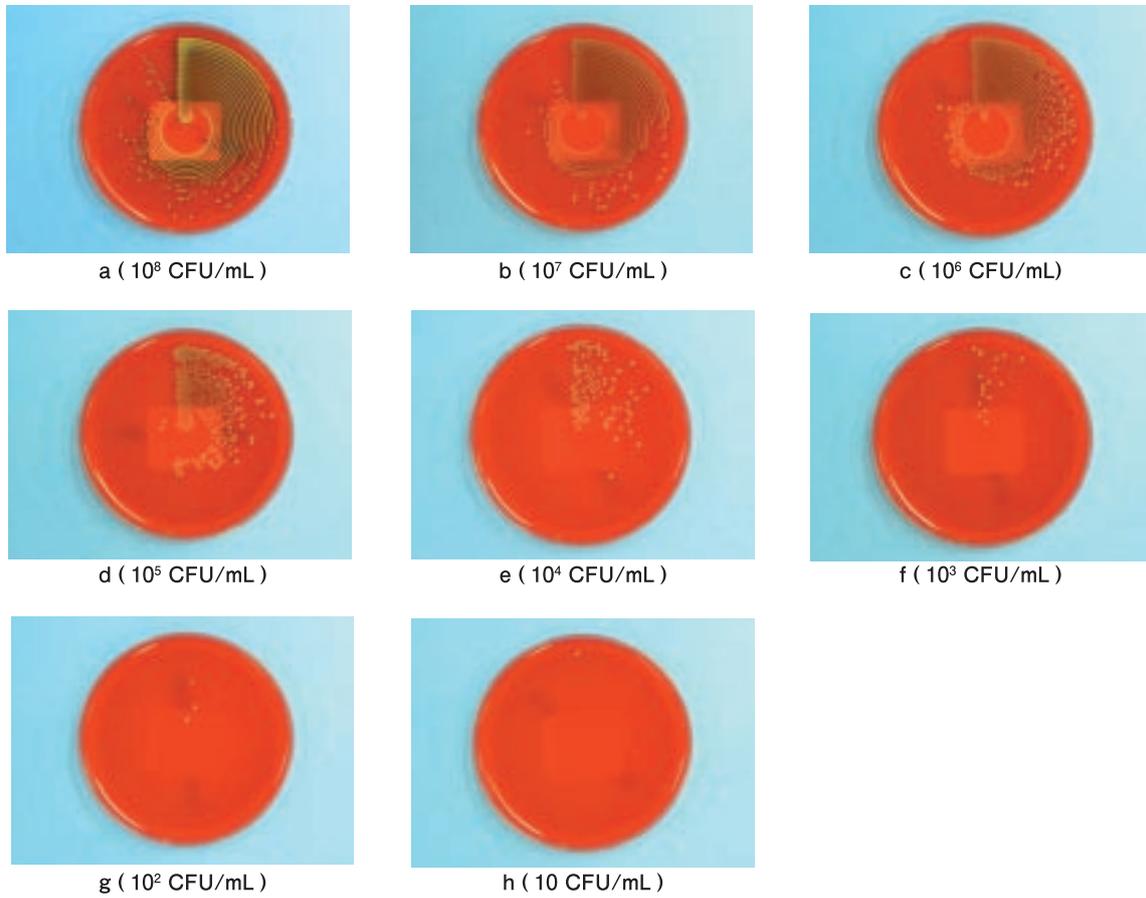


図9. PREVI Isola における *E. coli* 各菌濃度の塗抹培養所見

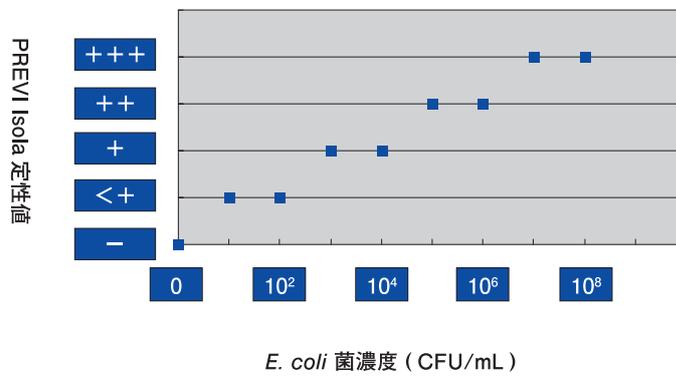


図10. PREVI Isola における *E. coli* の希釈直線性

3. マニュアル画線塗抹法との相関

臨床検体, 喀痰 45 検体, 尿 35 検体を用いて PREVI Isola とマニュアル画線塗抹法の相関を検討した. 喀痰の一致率は 84.4%, 尿の一致率は 97.1% であった(表 3, 4).

4. シングルコロニーの分離能

10⁴ CFU/mL 以下の菌液では両者のシングルコロニー数に大きな差は認められなかったが, 10⁵ CFU/mL 以上の菌液ではマニュアル画線塗抹法よりも PREVI Isola の方がシングルコロニーの分離数が多く認められた(図 11, 12).

表 3. 喀痰の塗抹培養定性一致率

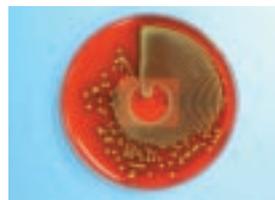
		(n=45)				
PREVI Isola	+++				6	17
	++				13	
	+			2		
	<+		2	1		
	-	4				
		-	<+	+	++	+++
		マニュアル画線塗抹法 一致率 38/45 = 84.4%				

表 4. 尿の塗抹培養定性一致率

		(n=35)				
PREVI Isola	+++				1	17
	++				2	
	+			1		
	<+		3			
	-	11				
		-	<+	+	++	+++
		マニュアル画線塗抹法 一致率 34/35 = 97.1%				



マニュアル法



PREVI Isola

図 11. シングルコロニーの分離能の比較
(*S. aureus* ATCC 29213 10⁸ /CFU/mL)

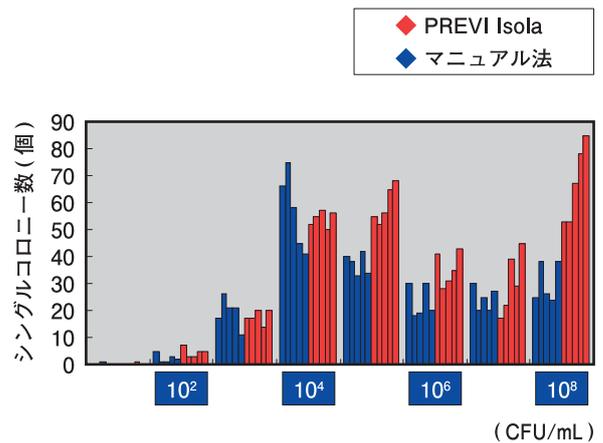


図 12. シングルコロニーの分離能の比較
(*S. aureus* ATCC 29213 菌濃度)

5. 2 菌種混合液の分離能

10⁸ CFU/mL (+ + +) から 10³ CFU/mL (+) まで *S. aureus* と *E. coli* のコロニーの分離能は良好であった (図 13) .

6. 塗抹処理能力

10 検体を PREVI Isola にて 1 検体あたり 3 枚の培

地に塗抹した. スタートから終了まで約 10 分の時間を要した. 1 検体を 3 枚の培地に塗抹する場合, 前処理検体を用いて 1 時間あたり約 60 検体の塗抹処理能力が期待できる. また, 110 検体の受付業務および塗抹業務を実施して, PREVI Isola 導入後は業務時間内に業務を終了することができるようになった (表 5) .

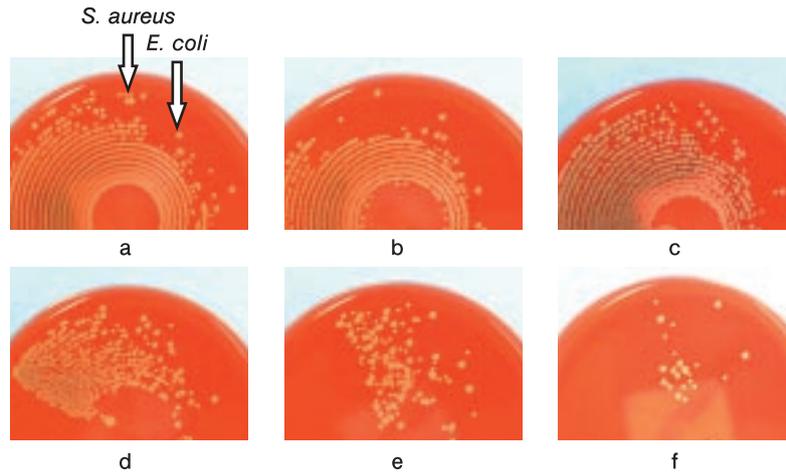


図 13. 混合菌種の分離能

a : 10⁸ CFU/mL, b : 10⁷ CFU/mL, c : 10⁶ CFU/mL,
d : 10⁵ CFU/mL, e : 10⁴ CFU/mL, f : 10³ CFU/mL

表 5. PREVI Isola 導入前 (シミュレーション) と導入後 (実測) の業務時間の比較

PREVI Isola 導入後 (2010 年 8 月 9 日)	PREVI Isola 導入前 (マニュアル法塗抹の場合)
8:30 血液培養検査・報告 検体受付 48 検体 検体ラベル・前処理ラベル出力	8:30 血液培養検査・報告 検体受付 48 検体 検体ラベル・前処理ラベル出力
10:00 1 回目の PREVI Isola へのデータ転送 (48 検体) ワークシートおよび PREVI Isola バーコード出力 検体前処理および PREVI Isola 投入終了	10:00 1 回目のワークシート出力 (48 検体) 検体前処理・マニュアル法にて塗抹
12:00 昼休み	12:00 昼休み
12:45 検体受付 52 検体	12:45 1 回目のマニュアル法塗抹つづき
13:30 2 回目の PREVI Isola へのデータ転送 (52 検体) ワークシートおよび PREVI Isola バーコード出力 検体前処理および PREVI Isola 投入終了	13:00 検体受付 52 検体 2 回目のワークシート出力 (52 検体) 1 回目のマニュアル法塗抹つづき
15:30 3 回目の PREVI Isola へのデータ転送 (10 検体) ワークシートおよび PREVI Isola バーコード出力 検体前処理および PREVI Isola 投入終了 外注検査処理	15:00 1 回目のマニュアル法終了 15:30 3 回目のワークシート出力 (10 検体) 外注検査処理 2 回目の受付検体のマニュアル法開始
16:30 PREVI Isola メンテナンス 当日のワークシート出力・グラム染色標本染色	17:15 ~ 17:30 休憩 ↓ 2 回目・3 回目のマニュアル法塗抹 便検体・嫌気性菌検体処理 マニュアル法塗抹終了
17:15 業務終了	21:00 当日のワークシート出力・グラム染色標本染色 21:30 業務終了

考 察

PREVI Isola の同時再現性は *E. coli* ATCC 25922 と *S. aureus* ATCC 29213 とともに 10^8 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^4 CFU/mL の各菌濃度において良好であった。また、その塗抹パターンも一定しており結果が容易に判定できた。同時再現性が良好で塗抹パターンが一定していることから、前処理検体を本装置に投入後は、塗抹培養結果に技師間差が生じない。よって、微生物塗抹培養検査の標準化に対しても有用であると考えられた。

希釈直線性は *S. aureus* と *E. coli* において 0 CFU/mL ~ 10^8 CFU/mL まで良好な直線性を認め、菌濃度に対する半定量性が認められた。よって、塗抹培養結果より起因菌の菌量の推定が可能である。

マニュアル画線塗抹法との相関の検討では、塗抹培養定性結果の完全一致率は喀痰で 84.4%、尿で 97.1% と良好であり、塗抹培養定性結果の判定については従来法のマニュアル画線塗抹法と同様の判定ができた。

シングルコロニーの分離能の検討では、 10^4 CFU/mL 以下の菌液では両者のシングルコロニー数に大きな差は認められなかったが、 10^5 CFU/mL 以上の菌液ではマニュアル画線塗抹法よりも PREVI Isola の方がシングルコロニーの分離数が多く認められ、PREVI Isola のシングルコロニーの分離能はマニュアル画線塗抹法より良好であった。

これは、マニュアル画線塗抹法において 10^5 CFU/mL 以上の菌液では、第 2、第 3 分画の狭い領域にてシングルコロニーを分離するのに対し、PREVI Isola では培地のスタートラインからエンドラインに向かって円周沿いに、広い領域においてシングルコロニーの分離が可能であるためと推察された。また、PREVI Isola はシングルコロニーの分離数が多く、発育コロニーの性状が観察しやすいため、塗抹培養後のコロニーの菌名の推定および釣菌作業効率が向上した。

本装置の塗抹処理能力は非常に優れており、前処理検体 1 検体を 3 枚の培地に塗抹する場合、連続して 1 時間あたり約 60 検体の塗抹処理が期待できる。実際に、受付検体 110 検体の作業内容を、PREVI Isola

導入前と導入後で検証した。検体の前処理は導入前後で同じである。導入前はマニュアル画線塗抹法の 3 分画法にて実施しており、その際、培地の選択・ラベルの貼り付け・塗抹作業はすべて技師の手作業であった。これらの作業を一人の技師で実施していた装置導入前では 1 日平均 4 時間以上の大幅な残業のもとで行っていたが、PREVI Isola 導入後は業務時間内で処理することができるようになった。

また、本装置のサンプルチューブはバーコード対応になっているため、検査室で検体受付をした際に発行した検体番号バーコードを貼り付け、ホストコンピュータから取得した検査オーダー・目的菌・検査材料・患者属性等の情報と関連付けて管理することができる。これによって、検体の塗抹違いや選択培地の塗抹忘れなど、ヒューマンエラーのリスクが回避できた。さらに、手作業による塗抹作業が激減したので技師の疲労軽減にも貢献している。

まとめ

本装置では同時再現性、希釈直線性、二菌種混合液の分離能について良好な成績が得られた。PREVI Isola とマニュアル画線塗抹法の塗抹培養を比較検討した結果、喀痰および尿について良好な塗抹培養結果の一致率が認められた。

また、PREVI Isola ではシングルコロニーの分離能において良好な結果が得られ、塗抹培養後の検査作業の効率化に有用であると考えられた。

PREVI Isola の導入効果として、良好な同時再現性が認められ①塗抹培養の技師間差が無くなった。その処理能力の高さから②塗抹作業時間が大幅に短縮された。良好なコロニーの分離能のため、③発育コロニーの同定や推定・釣菌作業の効率化が認められた。

また、バーコード対応により各サンプルチューブを患者情報や検査オーダー情報と関連付けて管理、処理できるため、検体間違いや選択培地の塗抹忘れが無く、さらに塗抹パターンも一定していることより、本装置は微生物塗抹培養検査の標準化にも有用であると考えられた。

参考文献

- 1) Glasson JH et al. Evaluation of an Automated Instrument for Inoculating and Spreading Samples onto Agar Plates. *J Clin Microbiol.* 2008 ; 46 (4) : 1281-1284
-

Basic Evaluation of the Automated Streaking Instrument for Microbiological Analysis PREVI Isola

Hiroyuki SEKI^{*1}, Masahisa HONDA^{*1}, Kiyoshi ARAYA^{*1}, Toshiyuki OTA^{*1} and Miho FUKAYA^{*2}

*1 Department of Laboratory and Transfusion Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, 807-8556

*2 Scientific Affairs, Sysmex Corporation

SUMMARY

The first stage of microbiological testing begins with inoculation of specimens to selection agar plates and incubation. It is necessary to inoculate a combination of various selection agar plates in conformity with the kind of specimens and target microorganisms in streaking process, and the manual method has been used in most laboratories still now.

This time, we introduced automated streaking instrument PREVI Isola (released by Sysmex BioMérieux, June 2009) and evaluated the basic performance. This instrument showed good results of within-run reproducibility and linearity of dilution, and its semi-quantitative performance was accepted. The inoculation with PREVI Isola is a totally new method and new inoculating pattern, but the correlation with the conventional manual loop-to-plate method was good, and the rate of single colony production, the separation ability of each bacterial strain from mixed culture were also good. Also, the specimen processing capacity was excellent, and we considered it is very effective for efficiency and standardization of routine work in microbiological testing.

Key Words PREVI Isola, Automated Streaking Instrument, Microbiological Testing
