

# 微生物検査自動塗抹装置 PREVI Isola の 喀痰からの起炎菌分離能力の検討

関 洋之<sup>\*1</sup>, 本田 雅久<sup>\*1</sup>, 荒谷 清<sup>\*1</sup>, 木村 聡<sup>\*1</sup>, 平田 信太郎<sup>\*1</sup>, 深谷 美保<sup>\*2</sup>

\*1 産業医科大学病院 病理・臨床検査・輸血部：福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1 (〒 807-8555)

\*2 シスメックス株式会社 学術本部

## 要 旨

前回<sup>\*</sup>, 我々は微生物検査自動塗抹装置 PREVI Isola (以下, PREVI Isola; シスメックス・ビオメリュー社) の基礎的検討を行い, 同時再現性, 半定量性について良好な成績が得られたことを報告した. また, PREVI Isola は検体処理能力も優れており, 微生物検査業務の効率化・標準化に有用であることを証明した. 今回は, 多数の口腔内常在菌群を含む喀痰を検査材料として用い, 呼吸器感染症の代表的な起炎菌である *Staphylococcus aureus* (以下, *S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* (以下, *S. pneumoniae*), *Klebsiella pneumoniae* (以下, *K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (以下, *P. aeruginosa*) のシングルコロニー分離能に関して検討したので報告する.

**キーワード** PREVI Isola, 自動塗抹装置, 細菌検査, 分離能, 培養

## はじめに

微生物検査自動塗抹装置 PREVI Isola (以下, PREVI Isola; シスメックス・ビオメリュー社) は呼吸器検体用のストリーキングプロトコル設定を使用した場合, ピペットにて 95  $\mu$ L 吸引後, 培地 1 枚当たり 18  $\mu$ L 滴下する. その後, 培地が 40rpm の速度で回転し, 寒天培地上をスタートラインからエンドラインに向かって, 培地円周に沿ってアプリケーションが 17 本の塗抹線を同時に引いていく. この塗抹線は培地の円周沿いに平行に形成され, 培地中心部の塗抹線 A は短く, 外側に近い塗抹線 B ほど塗抹距離が長くなる (図 1). この原理によって, 17 本の塗抹線上では, 外側およびエンドラインに向かうほど検体が希釈され, シングルコロニーを得ることができる. PREVI Isola は  $10^2 \sim 10^8$  cfu/mL の濃度の菌が含まれる検体より, コロニーを分離することができる. とされている.

前回, 我々は単一菌種を用いて PREVI Isola の基礎

的検討を行い, その同時再現性, 半定量性について優れた性能を確認した. しかしながら, 臨床微生物検査では, 多種類の常在菌を含む呼吸器検体よりいかに起炎菌を分離し特定できるかが重要な課題である.

呼吸器由来検体には, 多くの常在菌が存在する. 例えば上気道常在菌には, 緑色レンサ球菌群,  $\gamma$  溶血型レンサ球菌群, *Micrococcus* 属, *Neisseria* 属, 大腸菌, その他の腸内細菌, *Lactobacillus* 属, コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS), 非病原性 *Corynebacterium* 属, *Candida* 属などがある. 一方, 呼吸器感染症の主な起炎菌としては *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* などがある. このように, 多くの常在菌が存在する検体から感染症の起炎菌の存在の有無を確認, 特定するには, まず常在菌群の中から起炎菌を分離培養し, その後の検査に用いるためのシングルコロニーを得る必要がある.

今回我々は, 喀痰塗抹を想定し複数菌種を混合した菌液を用いて PREVI Isola によるコロニー分離能を確認した. また, 常在菌を含む患者の実検体を用

い、代表的な呼吸器感染症の起炎菌を混合した検体を作成し、PREVI Isola で塗抹することにより、複数菌混合検体からの起炎菌分離能を検討した。評価方法としては、異なる菌濃度について起炎菌のシングルコロニーが得られるか否かを確認し、得られたシングルコロニー数の比較を行った。

## 対象

検討対象菌は代表的な呼吸器感染症の起炎菌の臨床分離株 *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* の4菌種を使用した。

検体は、2011年11月～2012年3月に当院入院・外来から細菌培養検査のために提出され、Normal flora と判定された喀痰を用いた。

## 方法

### 検討1：菌数の違いによる菌分離能の比較

基礎検討として、まず各菌種について  $10^8$ cfu/mL,  $10^6$ cfu/mL,  $10^4$ cfu/mL の菌液を作成し、それぞれの菌液を1菌種のみ、2菌種混合、3菌種混合、4菌種混合した菌液を調整し、PREVI Isola にてバイタ

ルメディア羊血液寒天培地（極東）に2枚ずつ塗抹した。塗抹後の培地は35℃の条件で16～20時間好気培養を行った。菌分離能の評価として、培養後の培地に発育した各菌株の隣接しないシングルコロニー数をカウントして平均値を比較した。

### 検討2：常在菌を含む喀痰検体を用いた起炎菌分離能の検討

口腔内常在菌のみが発育し Normal flora と判定された患者喀痰を用い、前処理を実施後、対象の菌液と混合したものを検体とし、PREVI Isola にて塗抹培養し、対象菌の分離能を検討した。培養後、対象となる菌のシングルコロニー数をカウントしてPREVI Isola の起炎菌分離能を評価した。喀痰の前処理は、喀痰1mLに対し喀痰溶解酵素スプタザイム（極東）1mLを等量混合して均一液状化し、さらに滅菌生理食塩水にて10mLにメスアップした。

混合する菌液は各菌の  $10^8$ cfu/mL の菌液、 $10^6$ cfu/mL の菌液、 $10^4$ cfu/mL の菌液を作成した。喀痰検体に1菌種のみ混合する場合は、前処理後喀痰1mLに対し菌液1mLを加え混合してPREVI Isola にて塗抹した。2菌種混合、3菌種混合の場合も、前処理後喀痰1mLに対し菌液を各1mLずつ混和した。

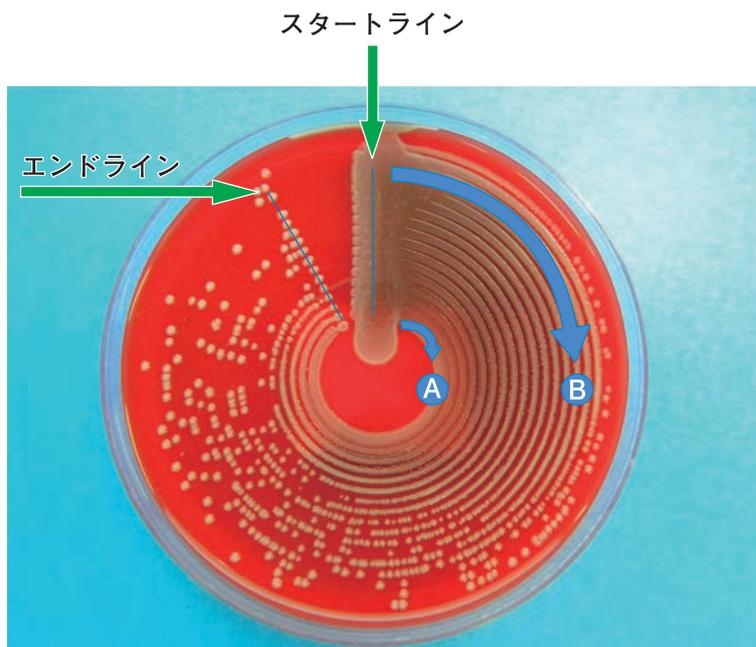


図1. PREVI Isola の塗抹原理

## 結果

### 結果 1-1

検討 1 にて, 1 菌種単独の菌液を塗抹分離した結果を表 1 と図 2 に示す. *S. aureus* では  $10^8$ cfu/mL の菌液で 37 個,  $10^6$ cfu/mL の菌液で 34 個,  $10^4$ cfu/mL の菌

液で 50 個 のシングルコロニーの分離が認められた. 同様に *S. pneumoniae* ではそれぞれ 33 個, 85 個, 46 個, *K. pneumoniae* では 9 個, 14 個, 18 個, *P. aeruginosa* では 8 個, 5 個, 7 個 のシングルコロニーの分離が認められた.

表 1. 1 菌種の菌液を塗抹分離した場合のシングルコロニー数

	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
$10^8$ cfu/mL	37 個	33 個	9 個	8 個
$10^6$ cfu/mL	34 個	85 個	14 個	5 個
$10^4$ cfu/mL	50 個	46 個	18 個	7 個

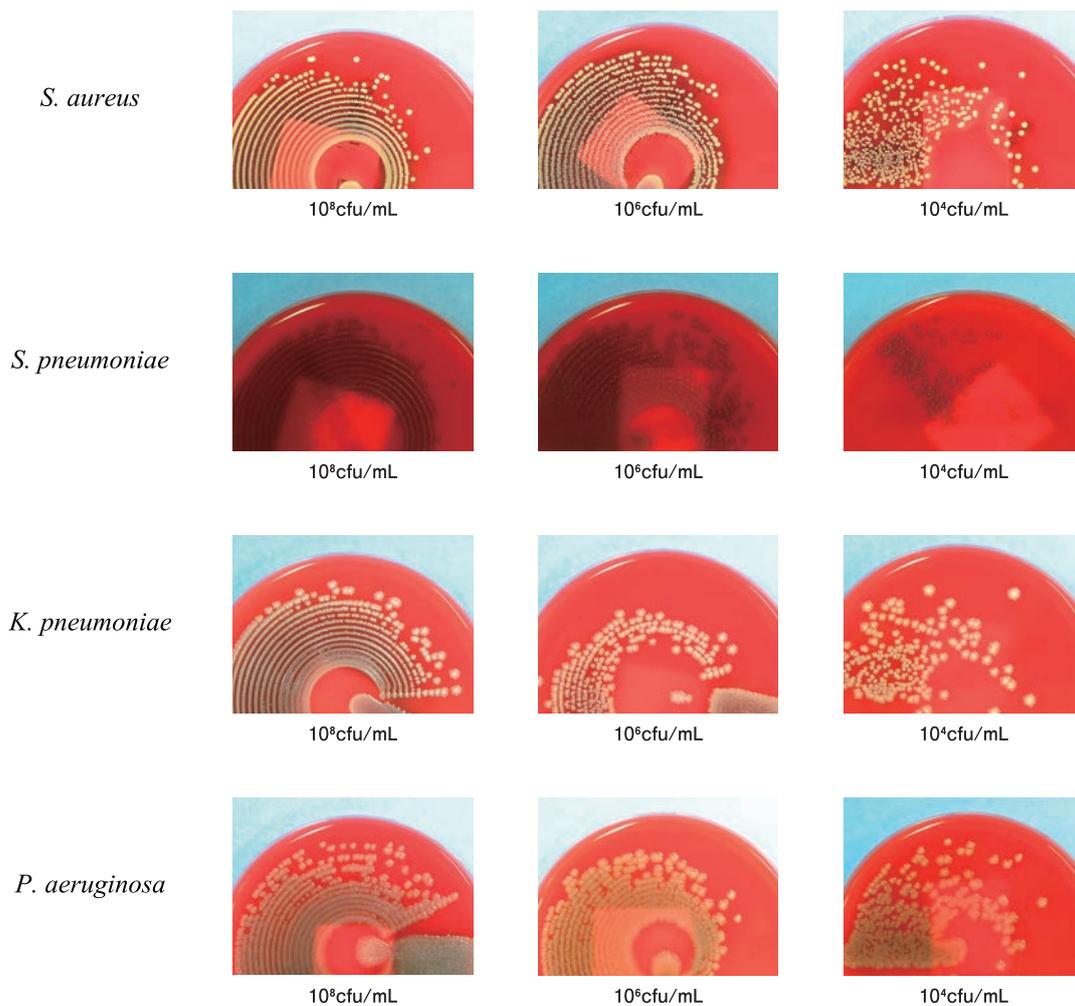


図 2. 呼吸器感染症起炎菌のシングルコロニーの分離 (1 菌種単独)

**結果 1-2**

検討1にて、*S. aureus* と *S. pneumoniae* の2菌種を混合した菌調整液を塗抹分離した結果を表2aと図3に示す。各10<sup>8</sup>cfu/mLの菌液を混合した場合は*S. aureus* が25個、*S. pneumoniae* が34個、10<sup>6</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が24個、*S. pneumoniae* が34個、10<sup>4</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が34個、*S. pneumoniae* が11個のシングルコロニーの分離が認められた。

**結果 1-3**

検討1にて、*S. aureus* と *S. pneumoniae*、*K. pneumoniae* の3菌種を混合した菌調整液を塗抹分離した結果を表2bと図4に示す。各10<sup>8</sup>cfu/mLの菌液を混合した場合は*S. aureus* が15個、*S. pneumoniae* が8個、*K. pneumoniae* が9個、10<sup>6</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が24個、*S. pneumoniae* が34個、*K. pneumoniae* が7個、10<sup>4</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が17個、*S. pneumoniae* が10個、*K. pneumoniae* が6個のシングルコロニーの分離が認められた。

**結果 1-4**

検討1にて、*S. aureus* と *S. pneumoniae*、*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* の4菌種を混合した菌調整液を塗抹分離した結果を表2cと図5に示す。各10<sup>8</sup>cfu/mLの菌液を混合した場合は*S. aureus* が2個、*S. pneumoniae* が3個、*K. pneumoniae* が5個、*P. aeruginosa* が5個、10<sup>6</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が3個、*S. pneumoniae* が3個、*K. pneumoniae* が3個、*P. aeruginosa* が3個、10<sup>4</sup>cfu/mLでは*S. aureus* が9個、*S. pneumoniae* が5個、*K. pneumoniae* が2個、*P. aeruginosa* が6個のシングルコロニーの分離が認められた。

検討1においては、混合する菌種数が増加するに従って、それぞれのシングルコロニー数は減少したが、いずれもその後の検査に使用可能なシングルコロニーの良好な分離が認められた。

表2. 各菌液を混合し、PREVI Isola にて塗抹培養後に発育したシングルコロニー数

a			
2 菌種	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	
10 <sup>8</sup> cfu/mL	25 個	34 個	
10 <sup>6</sup> cfu/mL	24 個	34 個	
10 <sup>4</sup> cfu/mL	34 個	11 個	

b			
3 菌種	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
10 <sup>8</sup> cfu/mL	15 個	8 個	9 個
10 <sup>6</sup> cfu/mL	24 個	34 個	7 個
10 <sup>4</sup> cfu/mL	17 個	10 個	6 個

c				
4 菌種	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
10 <sup>8</sup> cfu/mL	2 個	3 個	5 個	5 個
10 <sup>6</sup> cfu/mL	3 個	3 個	3 個	3 個
10 <sup>4</sup> cfu/mL	9 個	5 個	2 個	6 個

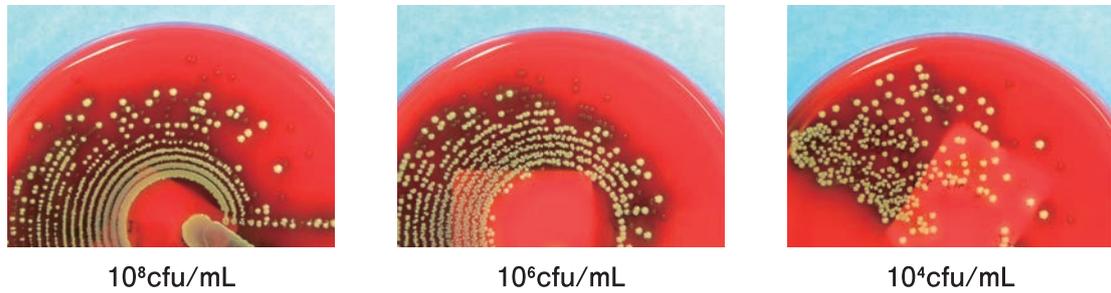


図3. シングルコロニーの分離 (2 菌種混合)  
*S. aureus* + *S. pneumoniae*

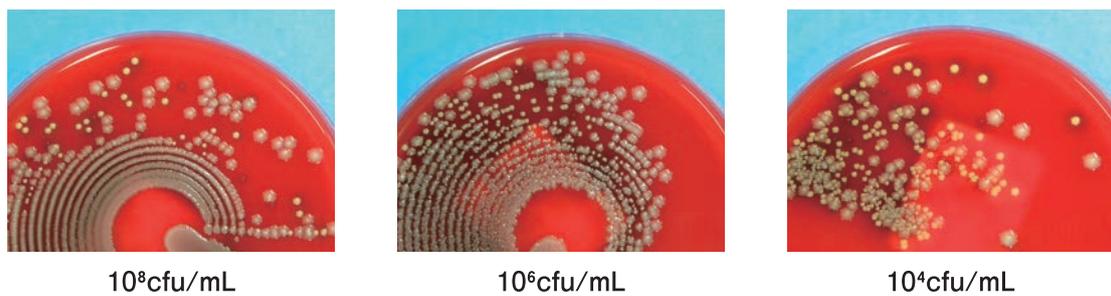


図4. シングルコロニーの分離 (3 菌種混合)  
*S. aureus* + *S. pneumoniae* + *K. pneumoniae*

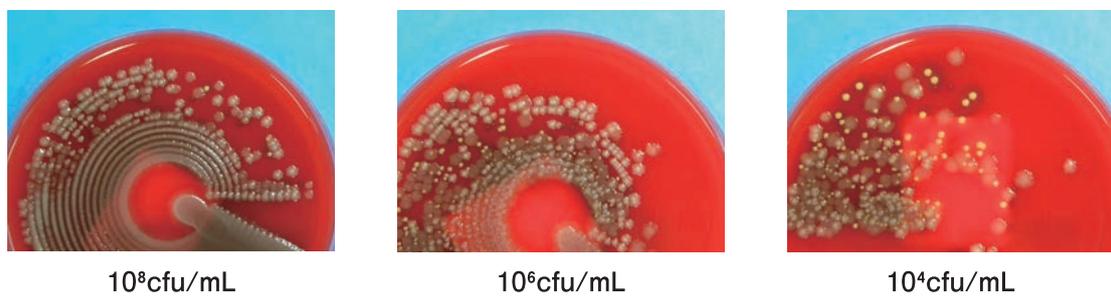


図5. シングルコロニーの分離 (4 菌種混合)  
*S. aureus* + *S. pneumoniae* + *K. pneumoniae* + *P. aeruginosa*

**結果 2-1**

検討 2 において、Normal flora と判定された患者 喀痰検体に 1 菌種の対象菌液  $10^8$ cfu/mL を混合して 塗抹分離した結果を**表 3**に示す。

*S. aureus* では 25 個、*S. pneumoniae* では 31 個、*K. pneumoniae* では 16 個、*P. aeruginosa* では 11 個の シングルコロニーの分離が認められた。

**結果 2-2**

検討 2 において、Normal flora と判定された患者 喀痰検体に 2 菌種 (*S. aureus*, *S. pneumoniae* それぞれ  $10^8$ cfu/mL の菌液を混合して塗抹分離した結果を **表 4 a** に示す。*S. aureus* は 7 個、*S. pneumoniae* は 15 個のシングルコロニーの分離が認められた。同様に、*S. aureus* ( $10^8$ cfu/mL) と *K. pneumoniae* ( $10^8$ cfu/mL) の 2 菌種の場合、*S. aureus* は 8 個、*K. pneumoniae* は 12 個のシングルコロニーの分離が認められた (**表 4 b**, **図 6**)。

表 3. Normal flora 喀痰に 1 菌種の菌液 ( $10^8$ cfu/mL) を混合し、PREVI Isola にて塗抹培養後に発育したシングルコロニー数

<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
25 個	31 個	16 個	11 個

表 4. Normal flora 喀痰に 2 菌種 ( $10^8$ cfu/mL) の菌液を混合し、PREVI Isola にて塗抹培養後に発育したシングルコロニー数

a. *S. aureus*と*S. pneumoniae*の混合菌液

<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
7 個	15 個

b. *S. aureus*と*K. pneumoniae*の混合菌液

<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
8 個	12 個

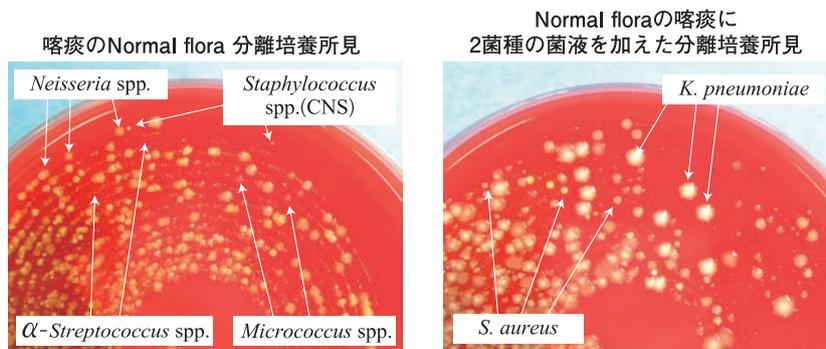


図 6. 喀痰の Normal flora 分離培養所見と、この検体に *S. aureus* ( $10^8$ cfu/mL) と *K. pneumoniae* ( $10^8$ cfu/mL) 2 菌種の菌液を混合して分離培養した所見

### 結果 2-3

検討 2 において、Normal flora と判定された患者喀痰検体に 3 菌種 (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, それぞれ  $10^8$ cfu/mL の菌液を混合して塗抹分離した結果を表 5a に示す。*S. aureus* は 5 個, *S. pneumoniae* は 6 個, *K. pneumoniae* は 8 個のシングルコロニーの分離が認められた。

### 結果 2-4

検討 2 において、Normal flora と判定された患者喀痰検体に 4 菌種 (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, それぞれ  $10^8$ cfu/mL の菌液を混合して塗抹分離した結果を表 5b に示す。*S. aureus* は 2 個, *S. pneumoniae* は 2 個, *K. pneumoniae* は 2 個, *P. aeruginosa* は 4 個のシングルコロニーの分離が認められた。

## 考 察

検討 1 において、3 段階の濃度の菌液を用いて塗抹分離培養した結果、1 菌種のみ菌液ではシングルコロニーの形成および分離能は良好であった。また、1 菌種のみ菌液で塗抹分離した場合、

$10^8$ cfu/mL の菌液よりも、 $10^6$ cfu/mL,  $10^4$ cfu/mL の菌液のほうがシングルコロニーの分離数が多かった。 $10^8$ cfu/mL の菌液では菌数が多いため発育するコロニー数も多くなり、互いに密接して発育するため、他のコロニーと隣接しないシングルコロニー数は減少してしまうと考えられた。よって、患者喀痰中の常在菌が多くなると総菌数が多くなるため、分離目的とする呼吸器感染症起炎菌のシングルコロニー数も減少すると考えられた。今回の PREVI Isola の検討において、菌を 1 菌種, 2 菌種, 3 菌種, 4 菌種と混合して菌種を増加して塗抹分離した結果、それぞれのシングルコロニー数は減少したが、いずれの菌もシングルコロニーの良好な分離が認められた。*K. pneumoniae* と *P. aeruginosa* のグラム陰性桿菌のコロニーは、*S. aureus* と *S. pneumoniae* のグラム陽性球菌に比べコロニーが大きいいため、他の菌コロニーと隣接しやすく、単独のシングルコロニーの分離数は少ない傾向が認められた。特に *P. aeruginosa* のコロニーは大型で他の菌のコロニーと接しやすく、隣接しないシングルコロニーの分離数は少ない傾向が認められた。しかし、コロニーが大型であるために、他の菌コロニーと接していたとしても釣菌して 2 次分離することが十分可能であった。

表 5. Normal flora 喀痰に 3 菌種, および 4 菌種 ( $10^8$ cfu/mL) の菌液を混合し, PREVI Isola にて塗抹培養後に発育したシングルコロニー数

a. 3菌種 ( $10^8$ cfu/mL)

(*S. aureus* + *S. pneumoniae* + *K. pneumoniae*)

<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
5 個	6 個	8 個

b. 4菌種 ( $10^8$ cfu/mL)

(*S. aureus* + *S. pneumoniae* + *K. pneumoniae* + *P. aeruginosa*)

<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
2 個	2 個	2 個	4 個

## まとめ

喀痰検体では、複数の常在菌が存在するため、起炎菌を分離培養し、シングルコロニーを得るためには、細菌検査技師の経験や熟練した高度な画線塗抹技術が必要とされる。また、通常呼吸器感染症の起炎菌は、検体中に $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL以上存在するとされており、高濃度の菌の存在下ではますますシングルコロニーの分離は困難となる。

今回の検討では、多数の常在菌が存在する患者喀痰中に呼吸器感染症の起炎菌である *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* それぞれ $10^8$ cfu/mLを含む検体を作成し、PREVI Isolaで塗抹した結果、シングルコロニーの良好な分離が可能であることが確認された。このことから、PREVI Isolaは常在菌が多数存在する喀痰からの起炎菌分離培養が十分に可能であり、臨床微生物検査室における喀痰塗抹作業の効率化と標準化に極めて有用であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Knobloch J. Efficiency of an automated streaking system for bacteriological diagnostics; ECCMID 2011 poster
- 2) Bruno LC et al. Evaluation of bioMerieux PREVI Isola Automated Plate Streaker; ASM 2011 poster
- 3) Henri de montclos et al. First performance verification of the automated streaking system PREVI Isola. RICAI. 2008 poster
- 4) Rice F et al. Evaluation of bioMérieux's PREVI Isola, an Automated Microbiology Specimen Processor : Improving Efficiency and Quality of Results. ASM. 2009 poster
- 5) Verhoef-Verhage E.A.E. et al. The Previ Isola system for automated streaking of patient materials; ECCMID. 2009 poster
- 6) Zimmermann S et al. Manual versus automated plate streaking of stool samples : a comparative evaluation using PREVI Isola. ECCMID. 2010 poster
- 7) Glasson JH et al. Evaluation of an Automated Instrument for Inoculating and Spreading Samples onto Agar Plates; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2008 Apr; 46 (4) : 1281-1284

# Evaluation of Single Colony Isolation Ability of the Automated Streaking Instrument PREVI Isola from Sputum Samples

Hiroyuki SEKI<sup>\*1</sup>, Masahisa HONDA<sup>\*1</sup>, Kiyoshi ARAYA<sup>\*1</sup>,  
Satoshi KIMURA<sup>\*1</sup>, Shintaro HIRATA and Miho FUKAYA<sup>\*2</sup>

\*1 Department of Surgical Pathology, Laboratory and Transfusion Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, 807-8555

\*2 Scientific Affairs, Sysmex Corporation

## SUMMARY

---

In the previous evaluation, we reported the basic performance of the automated streaking instrument PREVI Isola (released by Sysmex BioMérieux, June 2009). This instrument showed good results of within-run reproducibility and linearity of dilution, and half quantifiability was accepted. Also, the specimen processing capacity was excellent, and we considered it is very effective for efficiency and standardization of routine work in microbiological testing.

This time, we used sputum with oral bacteria as samples, and evaluated about single colony isolation ability for offending bacteria of a respiratory tract infection such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

In this evaluation, PREVI Isola produced enough numbers of isolated colonies from sputum.

We considered it is very effective for efficiency and standardization of processing sputum samples in microbiological testing.

**Key Words** PREVI Isola, Automated Streaking Instrument, Microbiological Testing, Single Colony Isolation Ability, Sputum

---