

[原 著]

GBS スクリーニング検査における増菌培養液を用いた直接ラテックス凝集法の有用性

馬殿真樹子・東山智宣・池本敏行・岡田仁克

大阪医科大学附属病院中央検査部

(平成 28 年 3 月 28 日受付, 平成 28 年 5 月 9 日受理)

Group B *Streptococcus* (GBS) スクリーニング検査の増菌培養法において, 増菌培養液を直接用いて連鎖球菌抗原検査を実施する直接ラテックス凝集法(ラテックス法)の有用性を確認するために, ラテックス法と増菌培養液を血液寒天培地等でサブカルチャーするサブカルチャー法, 検体を血液寒天培地等に直接塗布して培養する直接培養法の 3 法を比較検討した。

当院婦人科を受診し, GBS スクリーニング検査の依頼があった臨床検体(膣分泌物 50 検体)を対象にした結果, ラテックス法とサブカルチャー法に差はみられず, ラテックス法はサブカルチャー法の代替法として適用できる可能性が示唆された。ラテックス法はサブカルチャー法と比較し, 簡便で低コストな検査法であり, 迅速性にも優れている。

ラテックス法とサブカルチャー法が陰性で直接培養法が陽性となるケースがあった。その際サブカルチャー法で *Enterococcus faecalis* の過剰な発育が観察された。模擬検体を用いた検討から *E. faecalis* による GBS の発育抑制が観察され, GBS スクリーニング検査偽陰性を避けるために直接培養法と増菌培養法を併用すべき事が示唆された。

Key words: GBS スクリーニング検査, 直接ラテックス凝集法, *Enterococcus faecalis*

序 文

B 群溶血性連鎖球菌 (Group B *Streptococcus*; 以下 GBS) は, 新生児髄膜炎や敗血症の主要な起原菌である。予防的抗菌薬投与対象者の選択は危険因子に基づくアプローチよりも培養に基づくアプローチの方が効果的であるという研究結果¹⁾²⁾により, 米国疾病管理予防センター (Centers for Diseases Control and Prevention) は GBS スクリーニング検査を全妊婦に対し実施する事を勧告¹⁾し, 本邦でも浸透している。

GBS スクリーニング検査には, 直接培養法と増菌培養法がある。「新生児 GBS 感染予防に関するガイドライン 2010 年改訂版³⁾」には, GBS 検査の検体採取法や培養法, 薬剤感受性試験について詳細に記されている。培養法に関しては, 血液寒天培地等に直接塗布して培養する直接培養法ではなく, 選択増菌培地を使用することで検出感度に優れた増菌培養法を推奨してい

る。増菌培養後の GBS 検出法については, 血液寒天培地等でサブカルチャーするサブカルチャー法だけでなく, 増菌培養液を直接用いた直接ラテックス凝集法(以下, ラテックス法)や DNA probe, 核酸増幅法等が挙げられている (Figure 1)。

直接培養法と増菌培養法の陽性率は, 国内では岩崎ら⁴⁾がそれぞれ 5% と 11%, 渋谷ら⁵⁾が 14.9% と 23.3% と報告しており, 増菌培養法の有用性が示されている(ともに増菌培養後の GBS 検出法はサブカルチャー法である)。しかしながら, 現状は国内の多くの施設で GBS スクリーニング検査は直接培養法が一般的で, 増菌培養法を導入している施設は少数であると思われる。その原因として, 増菌培養法のコストや煩雑さ, 迅速性の問題が挙げられる。

サブカルチャー法とラテックス法は装置導入が不要なため, DNA probe や核酸増幅法よりコスト面で有利である。しかし, サブカルチャー法は結果の報告に 3, 4 日間かかり迅速性に欠ける。一方, ラテックス法は, 直接培養法と同様に検体受付の翌日に結果が報告でき迅速性が高い。また, サブカルチャー法と比較すると検査法が簡便でコスト面でも有利である。海外

著者連絡先: (〒569-8686) 大阪府高槻市大学町 2 番 7 号
大阪医科大学附属病院中央検査部細菌検査室
馬殿真樹子
TEL: 072-683-1221

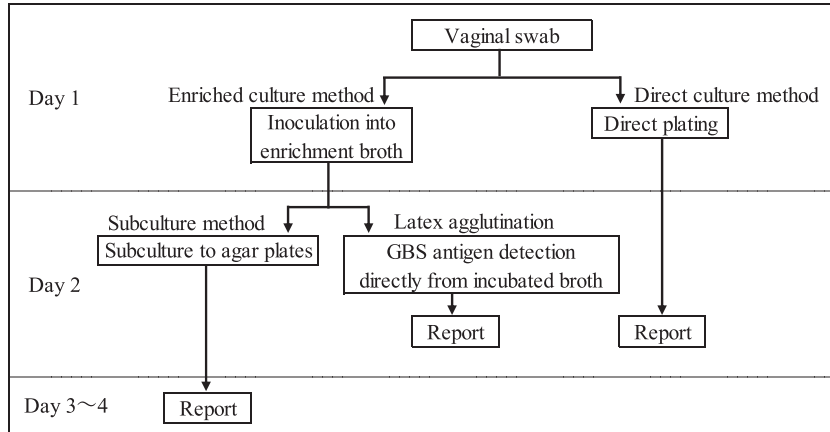


Figure 1. Procedures for subculture and latex agglutination test

Latex agglutination test of enrichment broth offers the advantage of saving 24 h in the turnaround time for detection of Group B *Streptococcus* in pregnant women compared with the recommended subculture method.

ではサブカルチャー法の有用性の報告と同様に、C.H. Park ら⁶⁾、C. Guerrero ら⁷⁾や F. Rallu ら⁸⁾によりラテックス法がサブカルチャー法と同等あるいはそれ以上の感度があると報告されている。

今回、国内ではまだ検討事例の少ないラテックス法の有用性を確かめるため、ラテックス法と増菌培養法で最も汎用されているサブカルチャー法、直接培養法の3法のGBS検出数について比較検討した。さらに、GBSスクリーニング検査偽陰性を導く *Enterococcus faecalis* によるGBSの発育阻害を確認するため、模擬検体を用いた検討も実施した。

対象と方法

1. 臨床検体

1) 対象

2014年9月16日から2014年10月31日に当院婦人科を受診し、GBSスクリーニング検査の依頼があった膈分泌物50検体を対象とした。

2) 方法

直接培養法、増菌培養法（サブカルチャー法およびラテックス法）の3法を用いてそれぞれのGBS検出数を調べた。直接培養法とサブカルチャー法についてはGBS以外に発育した細菌の同定を行った。詳細を以下に示す。

(1) 直接培養法

滅菌綿棒（トランシシステム・クリア、COPAN Italia S.p.A）で採取された膈分泌物を、検体提出日中に滅菌生理食塩水500μLで洗い出し、サンプル懸濁液を

作製した。そのサンプル懸濁液10μLを白金耳でバイタルメディアトリ・ソイ血液寒天培地（ヒツジ）No. 2（以下BA、極東製薬工業株式会社）、コロンビアCNA 5%羊血液寒天培地（以下CNA、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）、chromID Strepto B（以下STRB、シスメックス・ビオメリユー株式会社）にそれぞれ塗布した。BAとCNAは35℃、5%CO₂存在下、STRBは35℃、好気条件下で24時間培養した。

発育したGBSの菌量が培地全体の1/3以下ならコロニー数をカウント、1/3から2/3なら2+、それ以上は3+とした。GBSの発育が確認されない場合は、さらに24時間培養後に観察した。STRBでGBSは薄ピンク色から赤色の球形のコロニーを形成する。GBSの同定には、集落性状からGBSが疑われるものをBAで純培養し、グラム染色による形態、カタラーゼ反応、連鎖球菌抗原検査（プロレックス「イワキ」レンサ球菌、Pro-Lab Diagnostics）を使用した。グラム陽性連鎖球菌、カタラーゼ陰性および連鎖球菌抗原検査の抗原Bが陽性となったものをGBSとした。なお、まれではあるが抗原Bと交差反応を示すGBS以外の菌種の分離報告⁹⁾もある。これを除外するためには生化学的性状試験などの精査が必要であるが、その頻度と検査の迅速性の観点から、今回は生化学的性状試験による確認は実施していない。

またGBS以外に発育した細菌の観察も行い、発育数が多い上位3菌種までを記録した。

Table 1. Comparison of direct plating versus enriched culture method for recovery of GBS

		Enriched culture method		
		Positive	Negative	Total
Direct culture method	Positive	3	1	4
	Negative	0	46	46
	Total	3	47	50

Table 2. The number of the isolates in 50 swabs

	The number of the isolates			
	Direct culture method		Subculture method	
	BA	STRB	BA	STRB
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	19	25	25
<i>Enterococcus</i> other than <i>E. faecalis</i>	3	3	0	2
Coagulase negative <i>Staphylococci</i>	33	15	42	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	8	0
<i>Streptococcus</i> other than GBS	0	7	13	10
Gram-negative bacilli	18	0	3	0
<i>Lactobacillus</i> spp.	10	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	6	0	2	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	3	0	0	0
<i>Candida</i> spp.	6	6	7	6

(2) 増菌培養法（サブカルチャー法およびラテックス法）

サブカルチャー法

直接培養法で作製したサンプル懸濁液 100 μ L を トッド・ヒューイット CNA ブイヨン（以下 LIM, シスメックス・バイオメリュー株式会社）に接種し、転倒混和後、35 $^{\circ}$ C、好気条件下で 24 時間培養した。その増菌培養液 10 μ L を BA, STRB にサブカルチャーし、直接培養法と同様に BA は 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下、STRB は 35 $^{\circ}$ C、好気条件下で 24 時間培養し、GBS の有無を判定した。発育が確認されない場合は、さらに 24 時間培養後に観察した。GBS の同定は直接培養法と同様である。また GBS 以外に発育した細菌の観察も行い、発育数が多い上位 3 菌種までを記録した。

ラテックス法

直接培養法で作製したサンプル懸濁液 100 μ L を LIM に接種し、転倒混和後、35 $^{\circ}$ C、好気条件下で 24 時間培養した。その増菌培養液 10 μ L を未処理のまま連鎖球菌抗原検査（プロレックス「イワキ」レンサ球菌、Pro-Lab Diagnostics）を実施した。連鎖球菌抗原検査の添付文書では培養集落を被検検体にするとして

いるが、本検討では増菌培養液 10 μ L を被検検体とした。抗原 B で凝集する場合をラテックス法陽性とした。

2. 模擬検体

1) 対象試料

E. faecalis による GBS の発育阻害を確認するため、GBS と *E. faecalis*、GBS と *Escherichia coli*、GBS と *Staphylococcus aureus* の混和液を作製した。GBS は臨床分離株を 2 株、*E. faecalis* ATCC29212、*E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC29213 を用いた。臨床分離株はいずれもバイテック 2 GP 同定カード（シスメックス・バイオメリュー株式会社）を用いた同定試験で GBS と確定された β 溶血株を使用し、それぞれ A 株、B 株とした。

GBS と *E. faecalis* の混和液の作製方法は、GBS A 株を 10³ CFU/mL、*E. faecalis* ATCC29212 を 10³、10⁴、10⁵ CFU/mL に調製した。それぞれ 10 μ L ずつ混和し 3 種類の混和液を作製した。B 株についても同様に調製し計 6 種類の混和液を作製した。GBS と *E. coli*、GBS と *S. aureus* も同様の手順で混和液を作製した。

Table 3. Results of GBS positive specimens by direct plating or enriched culture method

		Direct culture method			Enriched culture method		
		BA	CNA	STRB	Subculture method		Latex agglutination
					BA	STRB	
No.1	GBS	6colonies	3colonies	6colonies	N	N	N
	Isolates other than GBS	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , CNS	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , CNS	<i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	
No.2	GBS	10colonies	12colonies	7colonies	P	P	P
	Isolates other than GBS	CNS, <i>E. coli</i>	CNS		CNS, α -st		
No.3	GBS	3+	3+	3+	P	P	P
	Isolates other than GBS	<i>Coryne</i>	CNS, <i>Coryne</i> , <i>E. faecalis</i>	CNS, <i>E. faecalis</i>	CNS, <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , CNS	
No.4	GBS	2+	3+	1+	P	P	P
	Isolates other than GBS	CNS	CNS, α -st		CNS, α -st	α -st	

A total of four specimens were found to be GBS positive by either or both of the above culture methods. Abbreviations: P, positive; N, negative; CNS, Coagulase negative *Staphylococci*; *Coryne*, *Corynebacterium* spp.; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; α -st, α -haemolytic *Streptococcus*

2) 方法

1) で作製した混和液 20 μ L を用い、臨床検体と同様の方法で直接培養法と増菌培養法（サブカルチャー法およびラテックス法）を実施した。直接培養法とサブカルチャー法は STRB を用い、観察は 24 時間後と 48 時間後に実施した。発育した GBS の菌量が培地全体の 1/3 以下なら 1+, 1/3 から 2/3 なら 2+, それ以上は 3+ とした。

対照として 10^3 CFU/mL に調整した GBS 10 μ L を用いて直接培養法とサブカルチャー法とラテックス法を実施した。直接培養法で GBS の発育 1+, サブカルチャー法で 3+, ラテックス法陽性を確認した。

結 果

1. 臨床検体

1) 直接培養法

GBS 陽性検体数は 50 件中 4 件であった (Table 1)。BA, CNA, STRB の培地間における GBS 検出率に違いは認められなかった。また、陽性例全て 24 時間で陽性になり、48 時間経過後に陽性となる例はなかった。Table 2 に GBS 以外に発育した細菌を示した。STRB にも *E. faecalis*, Coagulase negative *Staphylococci* (以下 CNS), *Candida* 等は発育してきたが *S. aureus*, グラム陰性桿菌, グラム陽性桿菌

の発育は抑制されていた。GBS のコロニーの色は薄ピンク色から赤色で *E. faecalis*, CNS, *Candida* のコロニーの色とは明らかに異なっていた。

2) 増菌培養法（サブカルチャー法およびラテックス法）

サブカルチャー法とラテックス法ともに GBS 陽性検体数は 50 件中 3 件であった。サブカルチャー法陽性 3 件が全てラテックス法陽性となり、両法の結果は一致した。

Table 1 に直接培養法と増菌培養法の結果を示した。直接培養法陽性 4 件のうち増菌培養法陽性は 3 件であり、残りの 1 件は直接培養法でのみ陽性となった。

GBS 陽性例を No. 1~No. 4 とし、その詳細を Table 3 にまとめた。GBS の菌量（直接培養法）、GBS の発育の有無（サブカルチャー法）、GBS 以外に発育した細菌、ラテックス法の結果を示す。直接培養法でのみ陽性の No. 1 は、サブカルチャー法の BA, STRB 両培地一面に *E. faecalis* の発育が観察された。No. 2 は No. 1 と同様に直接培養法での GBS の発育は少数であるが、No. 1 と異なり *E. faecalis* の発育がなく、サブカルチャー法とラテックス法の両法で陽性となっている。No. 3 は *E. faecalis* の発育は観察されたが、直接培養法での GBS の発育は多数でサブカルチャー法と

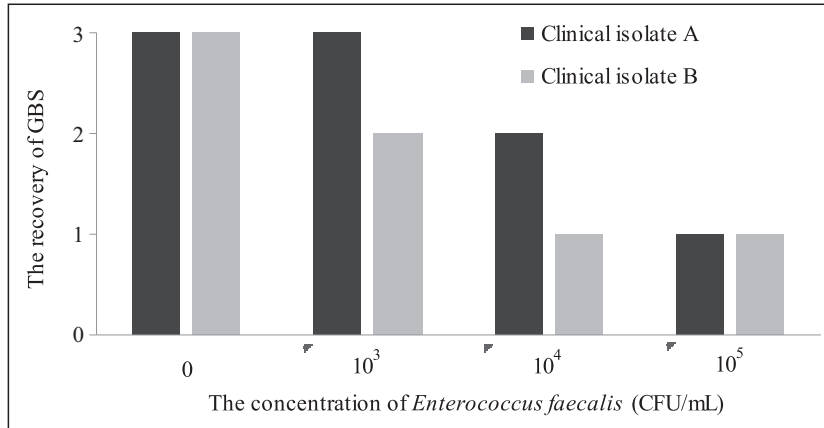


Figure 2. The influence of *Enterococcus faecalis* on the recovery of GBS
10 CFU of GBS were inoculated with known number of *Enterococcus faecalis*.

ラテックス法の両法で陽性となった。

GBS以外に発育した細菌は、LIMで増菌培養後の観察では、*E. faecalis* や CNS 等が高頻度に観察された (Table 2)。

2. 模擬検体

1) 直接培養法

菌種 (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*) と濃度 (10³ CFU/mL, 10⁴ CFU/mL, 10⁵ CFU/mL) に関わらず、全ての混和液で GBS が 1+ 分離できた。培養時間、24 時間と 48 時間で差は認められなかった。

2) 増菌培養法 (サブカルチャー法およびラテックス法)

Figure 2 に GBS と *E. faecalis* の混和液のサブカルチャー法の結果を示す。A 株は *E. faecalis* の濃度が 10³ CFU/mL の場合、GBS の発育が 3+ 観察された。10⁴ CFU/mL の場合は 2+, 10⁵ CFU/mL の場合は 1+ となった。B 株は 10³ CFU/mL の場合 2+, 10⁴ CFU/mL と 10⁵ CFU/mL の場合は 1+ となった。*E. faecalis* の濃度が高くなると、GBS の発育が抑制される傾向となった。GBS と *E. coli*, GBS と *S. aureus* の混和液の場合、全ての濃度で GBS が 3+ 発育し、*E. coli* と *S. aureus* による GBS の発育に影響は認められなかった。

ラテックス法は、A, B 株とも *E. faecalis* の濃度が 10³ CFU/mL の場合は陽性となったが、10⁴ CFU/mL, 10⁵ CFU/mL になると陰性となった。*E. coli*, *S. aureus* の場合、全ての濃度でラテックス法陽性であった。

考 察

臨床検体を用いた直接培養法の検討では、STRB は *S. aureus*, グラム陰性桿菌, グラム陽性桿菌の発育を抑制し、選択性の高さが推察された。GBS のコロニーの色は薄ピンク色から赤色で他の菌とは明らかに色が異なり鑑別しやすく、術者の経験の差に影響されないためスクリーニング培地として有用であると考えられた。増菌培養法の検討では、症例数は少ないがサブカルチャー法とラテックス法の結果が一致したため、ラテックス法はサブカルチャー法の代替法として適用できる可能性が示唆された。

一方、直接培養法が 50 件中陽性検体数 4 件のところ、サブカルチャー法とラテックス法陽性は 3 件となり、直接培養法よりサブカルチャー法の感度が優るといふ多くの報告とは異なる結果となった。直接培養法陽性でサブカルチャー法とラテックス法ともに陰性となったケースは、サンプル中の GBS の菌量が少なく、*E. faecalis* も混在していた。*E. faecalis* が過剰発育し GBS の発育を阻害したと考えられる。*E. faecalis* が混在しない場合は、GBS の菌量が少なくてもサブカルチャー法とラテックス法ともに陽性となった。*E. faecalis* が混在しても GBS の菌量が多ければ、サブカルチャー法とラテックス法ともに陽性となった。模擬検体を用いた検討では、*E. faecalis* の濃度が高いほど、サブカルチャー法で GBS の発育が抑制されている様子が観察され、ラテックス法での GBS 検出も難しくなった。他の菌種、*E. coli*, *S. aureus* ではこの傾向は観察されなかった。

このような *E. faecalis* と GBS の拮抗現象は C.H.

Park ら⁶⁾、C. Guerrero ら⁷⁾や Michael DW ら¹⁰⁾の報告でも示されている。その原因は明らかになっていないが、サンプルに占める菌量の割合と世代時間が有利な菌種が、他菌種の発育を抑制しているのではないかと予測される。*E. faecalis* による偽陰性を避けるために、C. Guerrero らや Michael DW らはサブカルチャー法と直接培養法の併用を推奨している。C.H. Park らの検討では、直接培養法は実施していないが、*E. faecalis* が過剰発育した場合は、ラテックス法がサブカルチャー法より良好な結果を出しており、ラテックス法単法を推奨している。

E. faecalis が共存する場合は相当量の GBS が存在しなければ *E. faecalis* が優先的に増菌する可能性がある。このような状況では増菌培養法より直接培養法が優れていると考えられ、両法の併用が望ましいと考えられる。

結 語

今回の結果から、ラテックス法はサブカルチャー法と同等の検出感度を有する可能性が示された。ラテックス法は、サブカルチャー法と比較しコストが抑えられ、検査法も簡便であるという利点がある。さらに、直接培養法と同様に検体受付の翌日に結果が報告でき迅速性が高い。ラテックス法を採用することで今後増菌培養法の普及が期待される。

また、サブカルチャー法、ラテックス法共に *E. faecalis* の発育が GBS 検出法の難点となることになった。*E. faecalis* は、サブカルチャー法では高頻度に観察されるため、*E. faecalis* を選択的に抑制できる増菌培地が理想である。現状の対応策としては、ラテックス法だけでなく直接培養法も併用する事で、より正確な GBS 検出が可能になると考えられる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMWR 51 [RR-11]: 1-22.
- Schrag, S.J., E.R. Zell, R. Lynfield, et al. 2002. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. N. Engl. J. Med. 347: 233-239.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. MMWR 59 [RR-10]: 1-32.
- 岩崎瑞穂, 小松 方, 長坂陽子, 他. 2006. 妊婦臍内の GBS スクリーニングにおける増菌培養法の有用性. 日臨微誌 16: 141-144.
- 渋谷理恵, 山下知成, 渋谷俊介, 他. 2009. 臍スワブを検体とした B 群レンサ球菌の保菌調査における選択増菌培地の有用性. 感染症学雑誌 83: 52-55.
- Park, C.H., N.M. Vandel, D.K. Ruprai, et al. 2001. Detection of Group B Streptococcal Colonization in Pregnant Women Using Direct Latex Agglutination of Selective Broth. J. Clin. Microbiol. 39 (1): 408-409.
- Guerrero, C., J. Martínez, A. Menasalvas, et al. 2004. Use of Direct Latex Agglutination of Selective Broth in the Detection of Group B Streptococcal Carriage in Pregnant Women. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23 (1): 61-62.
- Rallu, F., P. Barriga, C. Scrivo, et al. 2006. Sensitivities of Antigen Detection and PCR Assays Greatly Increased Compared to That of the Standard Culture Method for Screening for Group B Streptococcus Carriage in Pregnant Women. J. Clin. Microbiol. 44 (3): 725-728.
- Facklam, R. 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol Rev. 15 (4): 613-630.
- Michael, DW, CA Holland-Staley. 1998. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. J. Clin. Microbiol. 36 (8): 2298-2300.

Evaluation of Direct Latex Agglutination of Selective Broth for Detection of Group B Streptococcal Carriage in Pregnant Women

Makiko Baden, Tomohiro Higashiyama, Toshiyuki Ikemoto, Yoshikatsu Okada
Division of Microbiology, Central Laboratory, Osaka Medical College Hospital

The Centers for Disease Control and Prevention guidelines for the prevention of perinatal Group B *Streptococcus* (GBS) infections recommend that pregnant women should be tested at 35 to 37 weeks of gestation for carriage of GBS by enriched culture broth (Todd-Hewitt broth supplemented with selective antibiotics; LIM or TransVag broth), followed by subculture on an appropriate agar plate (LIM-BA). However, this process can be labor-intensive and typically requires 2 or 3 days to provide results, because the broth must be incubated for 18 to 24 hours and then subcultured on agar plates. The aim of our study is to evaluate LIM broth with direct GBS antigen detection (LIM-AG) as an alternative to LIM-BA for GBS screening in pregnant women. Although domestically there has been no study so far about this method, a number of studies conducted outside the country have shown this method to be sensitive, cost-effective, decreasing test turnaround time, and easier to perform in the laboratory. A total of 50 specimens were examined, with 4 positive for GBS. All four isolates were recovered on direct agar media for 24 hours, of which 3 were isolated both from LIM-AG and LIM-BA. One of the specimens was positive by direct culture method only, which revealed heavy growth *Enterococcus faecalis*. Results from our study suggest that LIM-AG would be an appropriate alternative to LIM-BA and also it is more efficient to use direct culture method concurrently with LIM-AG to avoid false-negative study caused by overgrowth of *E. faecalis*.