

設問49:コメント4(記載分)

使用培地「4枚」と回答

- 濃縮検体、濃縮後希釈検体(希釈は検体により異なる)各2枚 : 同様含め3施設
- 濃縮検体2枚、濃縮後10倍希釈検体2枚:1施設
- 濃縮原液2枚+濃縮10倍希釈液2枚=4枚(但し、事例発生時は、100倍希釈2枚まで実施):1施設
- 濃縮後の検体とそれを10倍、100倍、1000倍に希釈をし、各々1枚ずつ:1施設
- 酸処理後の濃縮液およびその10倍希釈液を各2枚:1施設

設問49:コメント5(記載分)

使用培地「4枚」と回答

- 残留塩素無検体 濃縮検体WYO、GVPCを1枚ずつさらに濃縮希釈検体に同じ操作:1施設
- 濃縮用に各2(熱・熱+酸)、非濃縮をやる場合は+各2(熱・熱+酸):1施設
- 濃縮検体の熱、酸処理で(WYO、GVPC各1枚)計4枚。非濃縮検体も実施する場合は計8枚:1施設
- 酸処理検体:2枚、非濃縮検体及び酸処理検体:各1枚)、菌数が多く推定される場合には12枚程度使用。(濃縮液を必要に応じて10倍段階希釈し、それぞれ熱・酸処理したものを接種するため。):1施設

設問49:コメント6(記載分)

使用培地「4枚」と回答

- WYOα2枚とGVPC2枚(計4枚)に250μLずつ(計1mL)塗布:1施設
- WYOαとGVPC各2枚ずつ:1施設
- WYOαとBCYEそれぞれに酸、加熱試料添加:1施設
- 非濃縮、濃縮(未、熱、酸):1施設

使用培地「5枚」と回答

- 原液2枚、10倍希釈1枚、100倍希釈1枚、1000倍希釈1枚:1施設

設問49:コメント7(記載分)

使用培地「6枚」と回答

- MWYに未・熱・酸を各2枚ずつ:1施設
- 培地3種類×濃、非濃:1施設
- 濃縮酸処理・非濃縮未処理は100μl、非濃縮酸処理は200μlに各2枚ずつ:1施設
- 濃(500)、濃(100)、非濃にWYO各2枚ずつ:1施設
- 三段階希釈系列を作製、一希釈につき2枚接種 : 同様含め2施設

設問49:コメント8(記載分)

使用培地「7枚」と回答

- 非濃・未にBC&MW各1枚、非濃・熱と酸および濃・未と熱と酸にMW各1枚:1施設

使用培地「8枚」と回答

- 濃縮と濃縮の20倍をMWYとBCYEα各2枚:1施設
- 濃縮液・希釈液にBC&MW各2枚:1施設
- 濃・希釈にWYO&GVPC各2:1施設
- 2段階希釈をして1段階4枚:1施設

設問49:コメント9(記載分)

使用培地「8枚」と回答

- 酸・熱処理でWYOαとGVPC各2枚(希釈があれば酸処理のみ2種培地各2枚ずつ追加し12枚):1施設
- 濃縮検体の0.1ml、0.3mlと10倍希釈の濃縮検体の0.1ml、0.3mlを2種類の培地に塗沫:1施設

設問49:コメント10(記載分)

使用培地「12枚」と回答

- 濃・非濃にBC&MW各3(未・熱・酸):2施設
- 非濃縮検体は前処理せずGVPC、MWYおよびBCYEαに接種(3枚)、濃縮検体は未・熱・酸処理しそれぞれ3枚使用(9枚):1施設
- 酸処理4分、10分、20分それぞれの濃・希釈にWYOα各2:1施設

使用培地「24枚」と回答

- GVPC18枚 MWY6枚:1施設

設問50:培養設定温度

	回答数(%)
35°C	14(約19)
36°C	28(約37)
37°C	31(約41)
その他	2*(約3)

- * 35°Cまたは37°C:1施設
- 36.5°C:1施設

設問51:炭酸ガス培養を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	1*(約1)
行っていない	74(約99)

- * 常時(0.05%)

設問52:培養日数は?

	回答数(%)
5日間	2(約3)
7日間	48*(約64)
10日間	22(約29)
その他	3**(約4)

- * CT水は多様なので10日間培養:1施設
原則7日間、状況に応じて6日間の場合も:1施設
** 6~8日間:1施設、8日間:1施設、最大14日間:1施設

設問53:分離培地の観察は?

	回答数(%)
毎日	39(52)
1日おき	3(4)
その他	33(44)

設問53:コメント1(記載分)

毎日観察と回答

- ほぼ毎日:1施設
- 翌日から毎日観察:2施設
- 土日・祝日を除く:2施設
- 1,2日目はカビや雑菌の発育状況を把握するため、詳細観察は3日目以降:同様含め2施設
- Rizopus等の真菌が培地上に確認された場合は、その部分を取り除く:1施設
- 釣菌は3日目から:1施設

設問53:コメント2(記載分)

その他と回答

- 可能な限り毎日、休日等で観察しない日もあり:1施設
- 2日目以降毎日観察:3施設
- 2日目以降土日を除き毎日観察:1施設
- 3日目以降毎日観察:13施設
- 3日目以降毎日観察(休日などは除く):1施設
- 検査開始が木曜の場合は4日目、金曜の場合は3日目以降観察:1施設

設問53:コメント3(記載分)

その他と回答

- 2日目と5日目:1施設
- 2、5、7日目:1施設
- 2日目、3日目及び5日目以降毎日観察:1施設
- 翌日、3日目、5日目、7日目:1施設
- 培養を開始する曜日により異なるが、原則、2日目以降1日おきに観察:1施設
- 接種2日後と5または6日目、7日目:1施設
- 3日目と7日目と10日目:1施設
- 5日目までは原則観察しない:1施設

設問53:コメント4(記載分)

その他と回答

- 3日目以降に:1施設
- 4日目以降に2-3日おきに観察:1施設
- 5日目までは原則観察しない:1施設
- 7日目、発育が見られない場合10日まで:1施設
- 2日目以降(休日を除く)毎日観察して適時釣菌する。48hrで初回観察。CT水などカビの生育があると検出困難の体験から。48hr以内の生育は非レジオネラとして集落あればチェックする。

設問54:集落の観察方法(培養日数)

	回答数(%)
培養1日目以内の集落はレジを否定	11(約15)
培養2日目以内の集落はレジを否定	22(約29)
その他	42(約56)

設問54:コメント1(記載分)

培養1日目以内の集落はレジを否定と回答

- 斜光法による集落観察結果も参考に:1施設
- 2日目以降に生える集落を観察:1施設
- 3日以降のものについては性状検査(Lシステイン要求性)を行う:1施設
- 3培養日数と集落の特徴:1施設

設問54:コメント2(記載分)

培養2日目以内の集落はレジを否定と回答

- 一日目、二日目の集落にはあらかじめシャーレのふたに印をつけておき、3日目以降にレジオネラが出てきた時に雑菌と区別しやすくしている:1施設
- 最終的には、培養日数よりも集落の特徴に重点を置いた検査方法を行っている:1施設
- 2日目以降でも集落の特徴があきらかに異なる場合はレジを否定:1施設
- 培養日数と集落の特徴を観察している:1施設
- コロニー形成日数及びコロニーの特徴で判断:1施設

設問54:コメント3(記載分)

培養2日目以内の集落はレジを否定と回答

- 浴槽水などの環境水のみ、2日目以内に発育してきた菌は、原則としてレジを否定。ただし、患者の検査では、2日目にレジオネラ菌の発育が見られたことがあるので、2日目からレジを想定して検査している:1施設

設問54:コメント4(記載分)

その他と回答

- 培養日数よりも集落の特徴に重点を置いた検査方法を行っている:同様含め27施設
- 日数によらず確認している:同様含め2施設
- 集落の形態で判断、緊急時には斜光法も併用:1施設
- コロニーの性状で疑う:1施設
- 同一外観のコロニーをカウントし、その代表的コロニーについてシステイン要求性試験を実施するので、コロニー形態・発育態度のみによるレジ否定は実施していない:1施設

設問54:コメント5(記載分)

その他と回答

- 培養日数も考慮するが集落の特徴に重点をおいている:1施設
- 培養日数と合わせて、集落の特徴に注目して検査(釣菌)する:1施設
- 1日目に出現したコロニーは印を付けておき、判断基準の一部としている:1施設
- 1~2日目の集落は通常レジ否定で印をつけておく2日目で疑わしいときは確認する:1施設

設問54:コメント6(記載分)

その他と回答

- 基本的に2日目以内は否定するが、コロニー形成日数は参考程度でコロニー形態に重点をおいて観察:1施設
- おおむね3日以内はレジを否定し、併せてコロニーも観察する:1施設
- 3日目以降で、レジオネラ属菌の特徴を持った集落を観察:1施設
- 2日目で1mm以上のコロニーは否定する:1施設
- 2~3日での発育はL.p否定:1施設

設問55:集落観察方法(推定特徴)

	回答数(%)
灰白色湿潤集落	51(68)
経験則	2(約3)
斜光法(冒頭語句説明を参照)	11(約15)
その他	11(約15)

設問55:コメント1(記載分)

灰白色湿潤集落と回答

- 状況に応じて経験則により判断:1施設

斜光法と回答

- 目視で観察後、斜光法で確認

その他と回答

- 灰白色湿潤集落と斜光法:3施設
- 灰白色湿潤集落と経験則、時として斜光法:1施設
- 灰白色湿潤集落と経験則と斜光法:1施設

設問55:コメント2(記載分)

その他と回答

- 基本的に経験、一部斜光法
- 実体顕微鏡による観察:1施設
- 灰白色湿潤集落を中心にレジオネラ属菌が疑われる集落を観察する:1施設
- 灰白色湿潤集落と臭気:1施設
- 明らかに違うもの以外は全て確認:1施設
- 2~7日の間に発育した集落

設問56:灰白色湿潤集落が多数発育している場合の1検体での総釣菌数は?

	回答数(%)
1~10個	42(56)
11~20個	5(約7)
その他	28(約37)

設問56:コメント1(記載分)

1~10個と回答

- 約3個:1施設
- 3~5個:1施設
- 約6個:同様含め2施設
- 異なる集落を6から8個:1施設
- 8個:1施設
- 8個、場合に応じてそれ以上:1施設
- 約10個:同様含め14施設
- 1平板最大10コロニーを釣菌し、10コロニー未満のときはすべてを釣菌:1施設

設問56:コメント2(記載分)

1~10個と回答

- 集落数が10個以内であれば全て、10個以上の場合は10個:1施設
- 最大10個をコロニー形態別に全体の比率に応じて釣菌する:1施設
- 10個前後であればすべて釣菌して確認:1施設
- 大きさ、形状、発育速度等同様である集落ばかりであるなら集落数が多ければ10個までの釣菌、違いがあれば違う種類×3~5個の釣菌:1施設

設問56:コメント3(記載分)

1~10個と回答

- コロニーのサイズ等形状から最大10個釣菌:1施設
- 大小のコロニーを割合に応じて10個釣菌:1施設
- 分離培地1枚当りの釣菌数は1~4集落。浴場水からは多様な血清型となる例は少ない:1施設
- 特に釣菌数は決めていないが可能な限り全部:1施設
- 状況に応じて決める:1施設

設問56:コメント4(記載分)

1~10個と回答

- 発育時期や形態等でグルーピングして代表的な株を釣菌:1施設
- 灰白色湿潤集落の中で同グループと推察されるものごとに2個~3個:1施設
- 「多数」の程度にもよるが、コロニーの大きさや形状等をグルーピングし、1グループあたり2~5程度を釣菌:1施設
- 各希釈についてレジオネラ属菌が疑われる集落について類似した集落を複数釣菌する:1施設

設問56:コメント5(記載分)

11~20個と回答

- 15個程度:1施設
- 20個:1施設
- 1平板あたり約5個程度で、1検体あたり4枚なので計20個程度:1施設
- 斜光法で集落を確認して、一番多く発育している培地から20個程度、そのほかの培地からは10個以内、最大50程度:1施設

設問56:コメント6(記載分)

その他と回答

- 最低10個、あとは状況に応じて:1施設
- 1平板あたり10個:1施設
- 推定される集落を1平板5から10個程度:1施設
- 斜光法で強く推定される集落を1平板約10個程度:同様含め2施設
- 2~7日の間に発育した集落について、各処理法あたり10個:1施設
- 斜光法で特徴別に5個。1検体20個目標:1施設

設問56:コメント7(記載分)

その他と回答

- 1平板あたり10個釣菌。集落が10個未満の場合は全て釣菌。また、疑わしい集落があった場合は全て釣菌する為、1平板あたり10個以上になる:1施設
- 3日目に、レジが疑われる集落を2平板あたり約10個程度釣菌する(計20個)。ただし、4日目以降にも釣菌するので、それ以上になる:1施設
- 1平板5個、最大30個:1施設
- BCYE α 培地と血液寒天培地に30コロニーを接種:1施設

設問56:コメント8(記載分)

その他と回答

- 50個まで:1施設
- 粘着性の高い集落を中心に約50個程度:1施設
- 50個を上限とし、全てL-システイン要求:1施設
- 疑わしいコロニーはすべて釣菌するので、最大50個ぐらいになるような希釈を選んで行う:1施設
- 1検体で最大80個程度(10個程度/枚):1施設
- 各平板10コロニー×15枚として150個程度:1施設

設問56:コメント9(記載分)

その他と回答

- 疑わしい集落は可能な限り釣菌している:1施設
- 集落の形、大きさが異なれば可能な限り釣菌原則1平板あたり10個 コロニーフェイスが異なる場合はフェイス毎に10個:1施設
- 発育している数にもよるが~10個程度。複数の菌種が混ざっている場合は出来るだけ全部:1施設
- 肉眼および斜光法での形態、発育時期の異なる集落は全て釣菌:1施設

設問56:コメント10(記載分)

その他と回答

- 全部:1施設
- 同種平板で色・大きさなど違いがあると思われるものを釣菌する。(×4):1施設
- 検体により釣菌数は激変するので、数を示すことは不能:1施設
- 特に決めていない:1施設

設問57:自発蛍光の検査を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	22(約29)
行っていない	53(約71)

設問57:コメント1(記載分)

行っていると回答

- 常時:8施設
- 随時、時々、ケースバイケース:各1施設
- L-システイン要求性確認後:1施設
- 他の検査で確定できなかった場合のみ
:同様含め2施設
- 抗血清、ラテックスで決定できない場合:1施設
- 菌種同定の必要時:1施設
- 自然発光すると思われる菌種の時だけ:1施設
- UV照射は5日又は7日に実施:1施設

設問57:コメント2(記載分)

行っていると回答

- 初めての検査施設や雑菌発育の多い検体は常時、検査経験のある検体や塩素消毒効果が高いサンプルは省略(Lpの可能性高):1施設

設問58:釣菌日は?

	回答数
培養4日目	3
培養5日目	5
その他	67

設問58:コメント1(記載分)

培養4日目と回答

- 3日目で降毎日:1施設
- 培養4～5日目:1施設

その他と回答

- 特に決めていない(随時):同様含め44施設
- 培養2日目で降、随時:1施設
- 培養3日目で降、随時:同様含め3施設
- 培養4日目で降、随時:1施設

設問58:コメント2(記載分)

その他と回答

- 基本的には6日目だが、レジオネラを疑うコロニーが出現すれば随時:1施設
- 菌数が少ない場合は7日目、雑菌等が多い場合は3日目で降随時:1施設
- およそ2、3日目:1施設
- 通常、3日目～7日目:1失せ津
- 培養4～5日:同様含め2施設
- 4日目と7日目(月曜検査開始で金曜と翌週の月曜に釣菌):1施設
- 特に決めていないが5日目が多い:1施設

設問58:コメント3(記載分)

その他と回答

- 培養5ないし6日目で降:1施設
- 培養6日目:2施設
- 6～8日目:1施設
- 原則7日目(状況に応じて6日目で釣菌することもある):1施設
- 7日目:同様含め5施設

設問59:グラム染色を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	36(約49)
行っていない	38(約51)

設問59:コメント(記載分)

行っていると回答

- 常時:21施設
- 確認時:1施設
- L-システイン要求確認後:1施設
- 必要に応じて:5施設
- 判断に迷うとき:1施設
- 疑わしい場合:2施設

設問60:L-システインの要求性確認を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	72*(約97)
行っていない	2(約3)

* 常時:64施設、羊血液寒天培地:1施設

L-システインの要求性確認を行っている施設へ

設問61:その時の培地の組合せは?

	回答数(%)
BCYEαと血液寒天	55(約76)
選択分離培地(種類)と血液寒天	4(約6)
その他	13(約18)

設問61:コメント1(記載分)

BCYEαと血液寒天と回答
 • 血寒の代用でBHIを使用する場合も:1施設

選択分離培地(種類)と血液寒天と回答

- MWYと血液寒天:1施設
- GVPCと血液寒天:1施設
- WYOと血液寒天:1施設

設問61:コメント2(記載分)

その他と回答

- BCYEαと普通寒天:3施設
- BCYEαとBCY(L-システイン不含培地):2施設
- BCYEαとレジオネラ基礎培地の平板培地(自家製):1施設
- 血寒の変わりにTSAか普通寒天:1施設
- レジオネラ鑑別培地(極東)システイン含/不含:1施設

設問61:コメント3(記載分)

その他と回答

- BCYEαと血液寒天とBCY(L-システイン不含培地):同様含め2施設
- レジオネラ鑑別培地(極東製薬の生培地)またはBCYEαとSCD寒天培地:1施設
- GVPC寒天培地と血液寒天培地あるいはBHI寒天培地:1施設
- 市販の培地:1施設

設問62:馬尿酸水解試験を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	21*(28)
行っていない	54(72)

* 常時:12施設
 必要に応じて:同様含め5施設
 確認時:1施設

設問63:レジオネララテックステスト(Oxoid)を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	30*(40)
行っていない	45**(60)

* 常時:19施設
 市販抗血清に凝集しない場合:同様含め4施設
 必要に応じて:同様含め2施設
 主に抗血清を使用:1施設
 ** 導入予定:1施設

設問64:抗血清(生研)による
スライド凝集反応を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	73(約97)
行っていない	2(約3)

* 常時:55施設
 常時(1検体あたり最大10株):1施設
 必要に応じて:同様含め3施設
 保健所から衛研に依頼のあった菌株のみ実施:1施設
 ** 水系感染事例が疑われる行政検査時には実施

スライド凝集反応を行っている施設へ
設問65:使用している抗血清は?

	回答数(%)
レジ免疫血清セット	21*(約29)
セット+L.P.7~15群	50**(約68)
その他	1*** (約1)
回答なし	1(約1)

* 衛研で常備:1施設
 ** 研究班の配布品:1施設
 *** セット+LP7~15群 ロングビーチ1.2群 2253 ハックリー1群&2群 フェイレイ1群 2群:1施設

設問66:DDHレジオネラ(極東)による検査を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	39(52)
行っていない	36(48)

設問66:コメント1(記載分)

行っていると回答

- 他の検査で確定できなかった場合のみ:同様含め21施設
- 菌種の同定が必要で他の検査で確定できなかった場合:同様含め2施設
- 必要に応じて実施:同様含め4施設
- 衛研において必要に応じて実施:1施設
- 血清反応がいずれも陰性の場合:同様含め2施設
- 陽性サンプルごとに1集落および抗血清非凝集の集落について:1施設

設問66:コメント2(記載分)

行っていると回答

- 抗血清に凝集がなく、PCRでレジオネラ属菌と確認された場合:同様含め2施設
- 他の検査で確定できなかった場合のみ、遺伝子検査を優先しLegionella pneumophilaかLegionellaeかを判別、非pneumophila株を行政の要望があった場合に:1施設
- 稀に実施:1施設

設問66:コメント3(記載分)

行っていないと回答

- 通常は実施していないが、必要時には実施:1施設
- 年に1~2回、確定できなかった菌について実施するが、結果は依頼側には報告していない:1施設
- キットを購入したが、浴場水では出番なし:1施設

設問67:遺伝子学的検査を

	回答数(%)
行っている(常時orその他)	66(88)
行っていない	9(12)

設問67:コメント1(記載分)

行っていると回答

- 常時:17施設
- 他の検査(抗血清やラテックスなど)で確定できない時(もう一押し状況証拠が欲しい場合など):同様含め27施設
- 必要に応じて:同様含め3施設
- 馬尿酸テストが不明瞭な時など:1施設
- 同定に迷うとき(LAMP):1施設

設問67:コメント2(記載分)

行っていると回答

- 他の検査で確定できず、レジオネラ属菌と確定するために実施:1施設
- 確定検査として行っている:1施設
- 確認のため:1施設
- 確認検査として汎用、場合によっては16sも:1施設
- 通常は最終的な確認のために実施しているが、行政調査の内容によってスクリーニング的に実施:1施設

設問67:コメント3(記載分)

行っていると回答

- システイン要求性+抗血清スライド凝集(-)の場合は、16srDNA (Legionellae)とdnagene (L.pneumophila)で判別。緊急時はLAMP(16srDNA)かリアルタイムPCR(5S rRNA gene: Cycleave PCR Legionella Detection Kit, Takara bio):1施設
- 1. レジオネラ属菌を標的とするLEG PCRと、ニューモフィラを標的とするLP PCRを常時実施。必要に応じて16SリボソームDNAシーケンスを実施して菌種特定
- 2. 昨年LAMPによる迅速検査を試行。行政のニーズに併せてLAMPに移行する可能性あり:1施設

設問67:コメント4(記載分)

行っていると回答

- 清掃消毒後の効果判定など早急に結果が必要な時:1施設
- レジオネラ症の患者発生に伴う原因施設の調査など、早急に検査結果がほしいといった依頼がある場合に、スクリーニングとして検査を行っている。(最終的には培養によって存在が確認されたものを陽性としている):1施設
- 浴槽改善指導後の確認検査時、及び他の検査で確定できなかった場合:1施設

設問67:コメント5(記載分)

行っていると回答

- 現在、培養法と並行して行っている:1施設

行っていないと回答

- 浴場水を対象とした行政検査なので、生菌数が重視される為。感染事件の時は遺伝子解析まで行う:1施設

遺伝子学的検査を行っている施設へ

設問68:その時の方法は?

	回答数(%)
一般的なPCR法	47(約71)
リアルタイムPCR法	0(0)
LAMP法	10(約15)
その他	9(約14)

設問68:コメント1(記載分)

一般的なPCR法と回答

- 研究的にリアルタイムPCR法を実施
- 場合に応じてLAMP法も:1施設
- 今後はLAMP法も使用する予定:1施設

その他と回答

- PCR法とLAMP法:同様含め5施設
- リアルタイムPCR法とLAMP法:1施設
- PCR法とリアルタイムPCR法とLAMP法:1施設
- 主にPCR法。緊急時リアルタイムPCR法かLAMP法:1施設
- PCR法とシーケンス(16SrRNA領域):1施設

遺伝子学的検査を行っている施設へ

設問69:どのような検体に行っていますか?

	回答数(%)
非濃縮検体	0(0)
濃縮検体	6(約9)
分離集落直接	3(約5)
分離菌株	41(約62)
その他	16(約24)

設問69:コメント1(記載分)

濃縮検体と回答

- 浴槽改善指導後の確認検査時:1施設

分離菌株と回答

- 研究的に濃縮検体をリアルタイムPCRで実施:1施設
- LEG、Limp:1施設
- 分離集落を純培養して実施:1施設

その他と回答

- 濃縮検体と分離集落直接:同様含め3施設
- 濃縮検体及び分離菌株:同様含め6施設
- 濃縮検体(アルカリ熱抽出したもの)と分離菌株:1施設

設問69:コメント2(記載分)

その他と回答

- 分離集落直接と分離菌株:同様含め3施設
- 分離集落直接と分離菌株(状況に応じて、コロニースリーブ、単独コロニー直接又は、分離菌):1施設
- 状況に応じて分離集落直接または分離菌株:1施設
- 濃縮検体であたりをつけることもある。基本は分離菌株の検査補充に使用:1施設
- PCR法(分離菌株)、LAMP法(LAMP用濃縮検体):同様含め3施設

標的とする遺伝子、使用プライマー、使用キット名等

	文献、販売メーカー等
LAMP法 Loopamp*レジオネラ検出試薬キットE	薬研化学
リアルタイムPCR Cycleave PCR Legionella(5sRNA)Detection Kit	TaKaRa
16S rRNA遺伝子の塩基配列決定	レジオネラ症防止指針 第3版 第2部 5.1.6.(7)

標的とする遺伝子、使用プライマー、使用キット名等

	文献、販売メーカー等
genus <i>Legionella</i> 16S riosomal RNA gene - 430bp LEG448A 5'-GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3' LEG854B 5'-CGGTCAACTATCGCTTTGC T-3'	山本啓之:PCR法による <i>Legionella</i> 属菌の検出・同定,日本臨床,50特別号,394~399,1992 病原検出マニュアル(国立感染症研究所)等
genus <i>Legionella</i> 5S riosomal RNA gene - 104bp L55 L9 5'-ACTATAGCGATTGGAAACCA-3' L55 R93 5'-GCGATGACCTACTTTCGCAT-3'	Mahbubani,M.H.ほか、Molecular and Cellular Probes,4:175-187,1990
genus <i>Legionella</i> 5S riosomal RNA gene -108bp F(5-29) 5'-GGCGACTATAGCGPTTTGGAA-3' R(91-112) 5'-GCGATGACCTACTTTCPCATGA-3' P=A/G	Perkin Elmer社 EnviroAmp Legionella Kits

標的とする遺伝子、使用プライマー、使用キット名等

	文献、販売メーカー等
<i>L.pneumophila</i> chlromosome DNA - 800bp LEG1 5'-GTC ATC AGG AAT CTC GCT G-3' LEG2 5'-CTG GCT TCT TCC AGC TTC A-3'	Stranbach,M.N.ほか、J.Clin.Microbiol.27:12 57-1261,1989
<i>L.pneumophila</i> macrophage infectivity potentiator (mip) gene- 168bp F(948-955) 5'-GCATTGGTGCCGATTGG-3' R(1092-1115) 5'-GRITTTGCATCAAATCTTTRTGAA-3' R=C/T	Perkin Elmer社 EnviroAmp Legionella Kits
<i>L.pneumophila</i> macrophage infectivity potentiator (mip) gene - 650bp LmipL920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3' LmipR1548 5'-GTTTGTATGACTTAAATTC A-3'	Mahbubani,M.H.ほか、Molecular and Cellular Probes,4:175-187,1990 病原検出マニュアル(国立感染症研究所)等

標的とする遺伝子、使用プライマー、使用キット名等

	文献、販売メーカー等
<i>L.pneumophila</i> 特異プライマー	Microbiol Immunol. 2003;47(11):859-69. Use of the dnaI gene for the detection and identification of all <i>Legionella pneumophila</i> serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus <i>Legionella</i> . Liu H, Li Y, Huang X, Kawamura Y, Ezaki T.

設問70: 定量検査を行っていますか？

	回答数 (%)
行っている(常時orその他)	73*(約97)
行っていない	2 (約 3)

* 常時:60施設
 事案検体及び菌量が多く推定されるとき:1施設

定量検査を行っている施設へ

設問71: 集落数のカウント初日は培養

	回答数 (%)
3日目	36 (50)
5日目	18 (25)
7日目	6 (約8)
10日目	1 (約1)
その他	11 (約15)

設問71: コメント1(記載分)

3日目と回答

- 48時間で初回観察:1施設
- 3日目から釣菌した集落でLシステイン要求試験等でレジオネラと同定されたものをカウント:1施設
- 3日目で一応カウント、最大7日までで再検し最終決定(遅発育株の分離とカビ発生による計数阻害防止のため):1施設

5日目と回答

- 疑わしい集落が確認できた日:1施設

設問71: コメント2(記載分)

10日目と回答

- 疑わしい集落が発育した日から:1施設

その他と回答

- 1日目:1施設
- 2日目:2施設
- 基本的に3日目から、以降も集落が発生すればカウント:1施設
- 3日目または4日目:1施設
- 3日目或いは5日目(搬入が水曜日の場合):1施設

設問71: コメント3(記載分)

その他と回答

- 4日目:1施設
- 4~6日目(検査開始の曜日による):1施設
- 6日目:1施設
- 6日~8日:1施設
- 決めていない。疑わしい集落が観察されたとき:1施設

定量検査を行っている施設へ

設問72: カウント初日以降の確認は？

	回答数 (%)
毎日	57 (約79)
一日おき	3 (約 4)
その他	12 (約17)

設問72: コメント(記載分)

毎日と回答

- 土日祝日を除く:同様含め3施設
- 可能な限り毎日:1施設
- 毎日チェックするが、カウントは状況に応じて:1施設

その他と回答

- 2-3日おき:1施設
- 培養5日目、7日目:同様含め2施設
- 7日目と10日目:2施設
- 6~7日目:1施設
- 7日目:1施設
- 7日目にカウントと釣菌:1施設
- 原則カウント初日のみ:同様含め3施設

定量検査を行っている施設へ

設問73: 定量値の確定は培養

	回答数 (%)
5日目	3 (約 4)
7日目	42 (約59)
10日目	21 (約30)
その他	5 (約 7)

設問73:コメント(記載分)

7日目と回答

- 数が少ないときには7日まで待つ最終決定、数十~100個を超える時には早めに決定:1施設

10日目と回答

- 7日目に推定菌数を求めた後、L-システイン要求確認検査のため3日間培養し菌数を確定するため:1施設

その他と回答

- 6日目:1施設
- 6日~8日:1施設
- 7~10日前後:1施設
- 確認試験で確認後

定量検査を行っている施設へ

設問74:灰白色湿潤集落が多数あった場合、レジオネラとその他の菌をどのように区別しカウントしていますか?

	回答数(%)
すべてレジとしてカウント	17(約23)
経験則	9(約12)
斜光法	11(約15)
その他	38(約51)

設問74:コメント1(記載分)

すべてレジとしてカウントと回答

- L-システイン要求性とグラム染色で判定:1施設
- カウント後、対比培養等の結果を踏まえて菌量確定:1施設

経験則と回答

- システイン要求結果を待てない場合に斜光法を使用、基本的にシステイン要求結果を待って陽性集落は目視で判断:1施設

設問74:コメント2(記載分)

斜光法と回答

- 斜光法で計測し、システイン、PCRで確定し、陰性となったものは計測から除外:1施設

その他と回答

- グラム染色とL-システイン要求性試験:1施設
- L-システインの要求性確認:同様含め5施設
- L-システイン要求性を確認後同コロニーと思われたものすべて:1施設
- 継代して確認する:1施設
- PCRの結果に基づく:1施設

設問74:コメント3(記載分)

その他と回答

- 同一外観のコロニーをカウントし、その代表的コロニーについてシステイン要求性試験を実施する:1施設
- 集落を可能な限り釣菌し、L-システイン要求性試験等でレジオネラと判定されたものをカウント:1施設
- ひとまずカウントし(カウントするコロニーは経験則による)、L-システイン要求確認検査結果により菌数確定:1施設
- システイン要求性及び免疫血清:1施設

設問74:コメント4(記載分)

その他と回答

- 異なる集落を6から8個釣菌しその結果から判断:1施設
- 釣菌した菌には全て性状確認を行うが、あまりに数が多い場合は、経験則を用いる:1施設
- L-システイン要求性やPCRの結果などから区別している:同様含め2施設
- グループ毎に遺伝子を確認:1施設

設問74:コメント5(記載分)

その他と回答

- 2日~7日の間に発育した集落について全てカウントし、10コロニー中の確定集落割合を乗じてカウント値とする。レジオネラの確定はシステイン要求性とPCRによる:1施設
- コロニーの大きさや、形状等をグルーピングし、L-システイン要求試験、デュオパスレジオネラ、ラテックスレジオネラによる免疫学的試験を実施する。その上でレジオネラ属菌と判断できたコロニー(グループ)のみカウントしている:1施設

設問74:コメント6(記載分)

その他と回答

- 検査した集落中のレジオネラの割合から推定同様含め:2施設
- 釣菌し性状試験と遺伝子検査にて、比率を求めて推定する:1施設
- 無作為に10個釣菌した結果、8個がレジオネラであればカウントした8割をレジオネラとする:1施設
- 灰白色湿潤集落を10個程度釣菌しBCYEαと血寒に画線、集落数にBCYEαにのみ発育した率を乗じて算出:1施設
- 確認試験での割合:1施設

設問74:コメント7(記載分)

その他と回答

- 確認検査でレジオネラと確認されたものと同様の集落:1施設
- 経験則で幾つかの同類集落別にカウントし、釣菌後最終的にレジオネラ陰性の同類集落の数を差し引いている:1施設

設問74:コメント8(記載分)

その他と回答

- ・ コロニー性状の違いを見て判断する:1施設
- ・ 色調別に各々計測:1施設
- ・ 実体顕微鏡での観察:1施設
- ・ コロニー形態などの観察、斜光法を用いることもある。一部、凝集反応像をみることもある:1施設
- ・ 基本的には斜光法:1施設
- ・ 経験則と斜光法(不確実だと思われるコロニーについては斜光を併用している):1施設

設問75:安全キャビネットを利用していますか?

	回答数(%)
利用している	36(約49)
利用していない*	37(50)
クリーンベンチを使用	1(約1)

* 使用した方がよいと思われるが、安全キャビネット内でろ過装置に水検体を取り込んだり、血清型別を行うことは現実的には不可能。
 ・患者検体の処理には、安全キャビネットを使用。
 という意見も。

設問76:どの検査工程から安全キャビネットを利用していますか?(記載分のみ)

	回答数
採水ボトル開封時から検体の接種、濃縮、推定集落の釣菌作業を含め、レジオ菌の存在が否定されない限り	3*
検体の濃縮、推定集落の釣菌作業	1**
ろ過濃縮作業のみ	1
集落釣菌作業以降	5**
血清反応の為に菌液調整や、馬尿酸試験を行う操作	1
コロニー分離後、DDH/レジオネラ実施時等	1
最初の遠心後に、上清を濃縮するためにマイクロチューブに分注する工程	1

* 斜光法での確認時を除く:2施設
 ** 斜光法での確認時を除く:1施設

設問77:培地への接種を濃縮検体のみと回答した施設の、レジ様集落が多数発育した場合の定量値の求め方。(記載分のみ)

- ・ すべてのコロニー数を数える
- ・ 検体は浴場水等なので、検出されることはあまりない
- ・ 経験則
- ・ 集落数をすべて数え、釣菌し確定したものの割合を乗ずる。
- ・ 分離培地上に発育したレジオネラ様集落を計数し、検水100mlあたりの菌数を算定する。
- ・ コロニーをカウントし、100ml中のCFUを求める。コロニー数 × 10 = ●●CFU/100ml(検出限界は10CFU)
- ・ 1cm²のコロニーを計測し平板全体に換算
- ・ UC(測定不能)
- ・ レジオネラ様集落と思われるもの

レジ様集落の確認やカウント法を経験則とした施設へ

設問78:内容を具体的に記載願います。(記載分1)

- ・ コロニーの性状(灰白色湿潤集落など)とLシステム要求性:同様含め2施設
- ・ 灰白色湿潤集落で経験的にレジオネラと考えられる場合にはカウントしている。不安な場合は他の方法で確認している:1施設
- ・ 定型的な集落についてすべてカウントする:1施設
- ・ 疑わしい集落以外にも記録の上複数釣菌して判定する:1施設
- ・ シャーレを光に透かして、コロニーの位置に印をつけながら、目視でカウント:1施設

レジ様集落の確認やカウント法を経験則とした施設へ

設問78:内容を具体的に記載願います。(記載分2)

- ・ PCRで確認:1施設
- ・ 一次培地で灰白～薄青白色湿潤集落を疑うが、類似集落は目視判定せず全てシステム要求性試験に供試する:1施設
- ・ 灰色湿潤集落でも、色形大きさ等が異なる場合は、グループごとに数個を同定して判断する:1施設
- ・ 色、形、におい、L-システム要求性を確認:1施設

設問79:どの時点でレジと確定させ成績書に反映させていますか?

- ・ 75施設で53通りの確定方法があった。
- ・ 大別すると4パターンに分類された。
 - ①レジオネラ属菌に対して広く対応
 - ②レジオネラ属菌に対して対応
 - ③レジオネラニューモフィラを中心に特定の種類だけに対応
 - ④線引きが難しかった
- ・ 基準はレジオネラ属菌に対し10CFU/100mL未満

設問79:どの時点でレジと確定させ成績書に反映させていますか? ①

	回答数
斜光法とL-システム要求性、グラム染色でレジと推定し、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	1
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、ラテックス、血清学的検査、DDH、PCR、LAMPのいずれかで陽性	1
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、ラテックス、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	2
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、ラテックス、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	1
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、イムノクロマト、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	1
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	1

設問79:どの時点でレジと確定させ成績書に反映させていますか? ②

	回答数
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、血清学的検査、PCRで陽性	2
斜光法とL-システム要求性でレジと推定し、PCRで陽性	2
斜光法とL-システム要求性	1
斜光法、L-システム要求性、グラム染色でレジと推定し、PCRで陽性	1
グラム染色、L-システム要求性、馬尿酸、酸臭からレジオネラ属菌が強く推定され、血清型別試験、場合によってはPCR	1
L-システム要求性を確認後、オキシダーゼ、馬尿酸、血清凝集などで総合的に判断	1

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ③	
	回答数
レシステイン要求とグラム染色でレジと推定され、ラテックス、血清学的検査、DDH、遺伝子学的検査のいずれかで陽性	1
レシステイン要求とグラム陰性長桿菌でレジと推定され、ラテックス、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	1
グラム染色とレシステイン要求性でレジと強く推定され、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	2
レシステイン要求性でレジと強く推定され、ラテックス、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	1
レシステイン要求性でレジと強く推定され、ラテックス、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	4
レシステイン要求性でレジと強く推定され、ラテックス、血清学的検査、LAMPのいずれかで陽性	1

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ④	
	回答数
レシステイン要求性でレジと強く推定され、イムノクロマト、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	1
レシステイン要求性でレジと強く推定され、血清学的検査、DDH、PCRのいずれかで陽性	5
レシステイン要求性でレジと強く推定され、血清学的検査、DDHのいずれかで陽性	2
レシステイン要求性でレジと強く推定され、ラテックス、血清学的検査のいずれかで陽性	1
レシステイン要求性でレジと強く推定され、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	7

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ⑤	
	回答数
レシステイン要求性でレジと強く推定され、イムノクロマト、血清学的検査、PCRのいずれも陽性	1
レシステイン要求性のある集落について血清学的検査及びPCR(場合によりDDH)で陽性	1
レシステイン要求性でレジオネラが推定され、血清学的検査、PCRで陽性と判定された場合(mip陰性の場合DDH)	1
レシステイン要求性、PCR検査、血清学的検査で陽性	1
レシステイン要求性で、ラテックス、血清学的検査、PCR法で全て陽性	1
レシステイン要求性、ラテックス、血清学的検査、PCR(必要に応じてDDH)の全てで陽性	1
レシステイン要求性、グラム染色後、PCR陽性	1

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ⑥	
	回答数
レシステイン要求性、グラム染色性、PCRのすべてでレジが確認され、血清学的検査の実施後	1
レシステイン要求性とグラム染色でレジと強く推定され、血清学的検査で陽性	1
レシステイン要求性で強く推定され、血清学的検査で陽性	2
レシステイン要求性で強く推定され、ラテックスで陽性	1
レシステイン要求性、ラテックスで強く推定され、血清学的検査で陽性	1
レシステイン要求性でレジオネラが強く推定され、血清やLAMP法で陽性	1

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ⑦	
	回答数
レシステイン要求性を示し、PCRで陽性	1◎
レシステイン要求性を示し、LAMP法で陽性	1○≤
レシステイン要求性を示し、遺伝子学的検査で確認	1○≤
レシステイン要求性を示し、グラム染色、馬尿酸水試験	1?
レシステイン要求性を示し、グラム染色	2◎
レシステイン要求性を確認し、適宜、馬尿酸水試験	2?
レシステイン要求性を確認した時点	2◎

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ⑧	
	回答数
レシステイン要求性でレジと推定、染色性を確認し、ラテックス、血清学的検査、馬尿酸試験で陽性。ラテックス、血清学的検査陰性の場合、デオバス、Lamp反応のいずれも陽性	1○≤
同一外観の代表的コロニーについてシステイン要求性試験を実施しPCR、必要によりDNAシーケンシング。LAMPによる迅速検査も試行。	1◎
斜光法とレシステイン要求性でレジと強く推定され、グラム染色、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性	1◎
レシステイン要求性、血清型別、遺伝子検査結果	1?
PCRで確認、血清確認、レシステイン要求性確認	1◎

設問79:どの時点でレジと確定させ 成績書に反映させていますか? ⑨	
	回答数
分離培地及び選択培地により、レジと推定され、血清学的検査、PCRで陽性	1△
血清学的検査。自己凝集等で判断できないものをラテックス、DDH、PCRで確認	1◎
免疫血清とPCRの結果で菌種を判断して確定	1◎
ラテックステスト、免疫血清、DDH、PCR等のいずれかの方法	1◎
7日後まで観察し、PCRで陽性	1◎

設問80:依頼施設に対し中間報告等 行っていますか?	
	回答数(%)
行っている(常時orその他)	29(約39)
行っていない	45(約61)

設問80:コメント1(記載分) 行っていると回答	
ラテックスの段階で状況に応じて:1施設	
遺伝子学的検査で陽性と判断したら :同様なめ4施設	
濃縮検体で遺伝子検査陽性となった場合に参考 値として連絡する:1施設	
ランプ法でレジオネラが陽性となったらすぐ:1施設	
コロニー観察でレジが疑われ、PCR陽性だった場合 :1施設	
斜光法、LAMP法の結果と併せて速報:1施設	

設問80:コメント2(記載分)

行っていると回答

- ・ 当所では、自主検査を受け付けていないので、その対応はわからないが、行政検査の場合は、コロナスweepPCR(+)又は単独コロナーPCR(+)の時点で、中間報告:1施設
- ・ L-システイン要求性でレジと強く推定され、ラテックス、血清学的検査、PCRのいずれかで陽性と判定された場合、菌数を確定する培養10日目を待たずに、保健福祉センター(受付機関)あてに報告している:1施設

設問80:コメント3(記載分)

行っていると回答

- ・ 現状(保健所の行政検査)では、レジオネラ属菌が検出された段階で連絡している:1施設
- ・ L-システイン要求性、血液寒天での培養、ラテックス、血清学的検査、PCR(必要に応じてDDH)の全てで陽性と判定された場合:1施設
- ・ 検査終了後、電話連絡:1施設

設問80:コメント4(記載分)

行っていると回答

- ・ 疑わしいコロニーが観察されたら:1施設
- ・ 斜光法でレジが強く推定されたらすぐ:1施設
- ・ L-システイン要求性があり陽性が疑われた場合:同様含め2施設
- ・ 特に取り決めていないが行政に対してシステイン要求+の場合:1施設
- ・ レジが強く推定されたらすぐ:同様含め2施設
- ・ レジオネラにほぼ間違いがないと分かったらすぐ:1施設

設問80:コメント5(記載分)

行っていると回答

- ・ 随時(必要に応じて等):同様含め2施設
- ・ 数などの状況によると思います:1施設
- ・ 菌数が多く、危険な状態と考えられる場合は、上司の了解のもと、中間報告を行う場合がある:1施設
- ・ 時々:1施設
- ・ 浴槽水、プール水で10CFU/100mL以上、冷却塔水で1000CFU/100mL以上の場合:1施設

行っていないと回答

- ・ 患者発生の際の検査では行っている:1施設
- ・ 必要に応じて対応:1施設

設問81:異動、退職時により検査対象者が交代する場合、検査手技の引き継ぎを行っていますか？

	回答数(%)
行っている	63*(約85)
行っていない	11(約15)

* 基本的に、検査員全員が検査できるようにしている:1施設

** 現時点では、担当者3名が検査対応可能:1施設
行われなかった:1施設

設問82:レジ検査に不安を感じたことはありますか？

	回答数(%)
ある	47(約63)
特にない	28(約37)

設問82:コメント1(不安がある:記載分)

- ・ 検出されない場合
- ・ 遠心濃縮法でのロス
- ・ 現在行っている濃縮法で、レジオネラ菌が確実に捕まえているのか:同様含め3施設
- ・ 検査結果が陰性の場合、本当に陰性なのか、濃縮操作後の回収がうまくできているのか分からないため
- ・ 今まで経験はないが、前処理してもレジ以外の菌が多数のときレジの検出ができなかったのか陰性だったのかかわからないのでは
- ・ 方法(全体的、前処理、回収率等)

設問82:コメント2(不安がある:記載分)

- ・ 遺伝子検査では陽性だが、培養では陰性になることが多い
- ・ 市販の血清で凝集が無く、デオバスとLamp法で陽性とする場合
- ・ 尿中抗原検査でレジオネラ症と診断され、レジオネラ属菌が分離されない場合
- ・ レジが強く疑われるが、確定させるのが困難な場合:16施設
- ・ 他の細菌等の妨害で、確定させるのが困難な場合:同様含め3施設(FCMスクリーニングと熱+酸処理の追加で分離率はかなり改善しているというコメントも)

設問82:コメント3(不安がある:記載分)

- ・ 濃縮、非濃縮の集落数に乖離がみられた場合の定量結果
- ・ 検査法、選択培地により発育集落数は異なると考える
- ・ 精度管理の試行で、各施設間の菌数のばらつきが大きいことがわかったので
- ・ 去年の外部精度管理の結果をもとに、現在、検査法改正も検討している
- ・ 精度管理
- ・ 定量検査の信頼性
- ・ システイン添加培地上の発育が不十分であるとき

設問82:コメント(不安がある:記載分)

- ・コロナー数が多いときに、すべてについてL-システム要求性を確認せずに定量している
- ・陽性の判断は血清凝固反応である。公衆浴場水ではこれで良いと考えるが「型別不能」と成績に表記した事例があった。
- ・異動等に伴い検査担当が交代する時
- ・経験者が少なく、手順全般に不安
- ・検査経験が全くなく、新しく担当になり、初めて検査したとき。
- ・実際にレジオネラ検査を行ったことがない。
- ・検査する機会があまりないため

設問82:コメント(不安なし:記載分)

- ・最終確認はPCRで行っているため。
- ・血清に凝集せず、DDHIに反応しない場合、感染研に相談した。
- ・現在担当2年目で陽性として扱った件数は30件程度であり、PCRを導入してからは今現在のところ、不安に感じたことはない。
- ・斜光法によって、格段判定が容易になった
- ・現在の当所の検査プロトコルで特に問題はないと考える。しかし下記にある研修システムや検査法の統一というのは必要だと思う。

設問83: 貴施設でレジ検査研修を受け入れていますか？

	回答数(%)
受け入れている	20(約27)
受け入れていない	54(約73)

設問83:コメント(記載分)

受け入れていると回答

- ・希望があれば 特別区の衛生検査職
- ・実績は無し 過去にあった
- ・当所対応

受け入れていないと回答

- ・過去には受けたが現在は受けていない
- ・要望があれば対応
- ・希望があれば検討する

設問84:研修システムは必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	71(約95)
不必要	0(0)
その他	4(約 5)

設問84:コメント1(必要:記載分)

- ・レジ防止指針にもあるように根拠が必要:4施設
- ・行政処分や訴訟問題等にかかわるため、判定基準の統一のための研修が必要:同様含め2施設
- ・検査機関間の精度の統一を図るため、研修システム、検査方法の統一、精度管理が必要:同様含め3施設
- ・精度管理を行うには正しい手法の検査ができていないと精度管理そのものができない。そのため検査法の研修は必要である。また、研修を行えば、その手法が公定法的に広まって行くため。
- ・生育が遅く、生化学的に特定困難で夾雑菌も多い。文献だけでは技術習得は難しい。経験者の指導と自分の体験が役立った。

設問84:コメント2(必要:記載分)

- ・1地研が経験する検査数は限りがあり、新しい知見や例外的な症例、検体の扱いなどの情報を定期的に取り入れていくシステムが必要と考える。
- ・本物のレジオネラのコロナーを見て覚えることは、経験の少ない者には必要。
- ・ある程度の技術レベルが必要な検査なので
- ・出来る範囲内で必要
- ・県では内部精度管理を検討している
- ・一般的に、検査技術の研修システムは存在した法が良い

設問84:コメント3(その他:記載分)

- ・初めて検査を行う場合は、実際の手技を見た方がよいと思う
- ・機関間の精度上の標準化は必要
- ・不明
当施設の検査担当者に対する研修ということであれば必要
- ・あった方がよい

設問85:検査法の統一は必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	68(約91)
不必要	3(4)
その他	4(約 5)

設問85:コメント1(必要:記載分)

- 基本となる部分と濃縮法ごとの統一が必要では:6施設
- 検査法により結果に差が出ることがないよう検査法の統一が必要
- 統一しないと、結果がばらばらになるのでは。
- 特に濃縮法は統一が必要だと思う
- 濃縮法と分離培地の統一
- 検査施設間で、検査方法の統一性を持った方が良いのでは
- 基本となる部分は必要では
- 基本部分を統一し、数種類の選択肢がある場合は優先順位と理由を示して欲しい。

設問85:コメント2(必要:記載分)

- 公定法・通知法などにより標準的な検査法を示すことは必須
- 各施設(民間検査所も含む)で検査法が異なり検査精度が違うと行政指導がやりにくくなるから
- ある程度信頼できる方法の提示は必要
- 基準値(10CFU/100ml)の信頼性のためにも基本の部分では統一方法を示すべきだ。ただし、手技や観察が重視される検査なのでマニュアルだけでは精度は高まらない。
- 検査法により検出率が異なっているため
- 酸処理と熱処理 フィルター濾過と遠心法 等による検出値の相違について
- 出来る範囲内で必要

設問85:コメント3(必要:記載分)

- 同一日に自主検査と行政検査が行われ、自主検査:陰性、行政検査:陽性の場合が多すぎるので、自主検査(民間検査機関)での検査方法に疑問を感じている。
- 民間機関と同じ検体を検査しても結果が違うから。

設問85:コメント4(不必要、その他:記載分)

- 不必要
 - 自主検査に限っていうのであれば、厳しく統一する必要は無いと考える
- その他
 - 指針で二法の濃縮法が示されているので、どちらかで実施することでよいと思う。
 - 機関間の精度上の標準化は必要
 - 施設の都合もあるので、統一が困難なことがあると思う

設問86:精度管理は必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	71(約96)
不必要	2(約 3)
その他	1(約 1)

設問86:コメント(必要:記載分)

- 必要だが、実施に当たっては種々の困難が予想される
- レジオネラに限らず、検査(特に依頼検査)を行う場合は精度管理が必要と思う。
- 標準サンプル調製方法の工夫が必要、経験則だがポリカーボネートの過法を導入して以降、環境検体を用いて定法による阻害を感じたことはないが、人工培地で調製した菌による添加回収実験(精度管理検査)をやると総じて回収率が低くなるように感じている。

設問87:a.研修システム、b.検査法の統一、c.精度管理を仮に必要とするならその優先順位は？

	回答数(%)
b, a, c	48(64)
b, c, a	11(約15)
a, b, c	5(約 7)
c, b, a	5(約 7)
c, a, b	3(4)
a, c, b	2(約 3)
決められない	1(約 1)

設問87:コメント1(b, a, c:記載分)

- 基本検査法の整理と研修等による導入がまず必要だと考える。現在の10CFU/100mL未満という基準は、濃縮工程だけからの計算上による理論値であり、過程の方法論が多岐にわたっている可能性のある現状で精度管理を行うと、結果が悪かった場合の原因検証が難しく、適切な改善が行いにくいと考える。:同様含め6施設
- 基本検査法の整理と研修等による導入は必要と考えます。各自治体における人事異動の関係で技術の継承が困難になることが想定され、検査法の統一と定期的な研修の開催は不可欠なと思います。

設問87:コメント2(b, a, c:記載分)

- 検査法が統一されないと、精度管理を実施したとしても、結果の比較は難しいかと思われるから。
- 検査法の統一がなされてから研修システムを整備するのが順番であろう。どの施設でも同じ方法で行うようになってから精度管理(外部)を行うのが円滑に事業が進むであろうと思われる。
- まずは検査法の統一をしなければ研修も出来ないだろうし、精度管理も無意味になるのではないか。
- 民間機関の検査データが大きく異なることがあり、まず検査法の統一してから、研修システム、精度管理の順かと思います

設問87:コメント3(b, a, c:記載分)

- 検査法の統一が最優先であり、これに基づいた知識・手技の取得を目的とした研修システムの構築が重要である。:同様含む2施設
- 最初に検査法の統一が行われ、各検査機関で検査法の統一が行われた後に、精度管理が実施されればと考えます。
- 精度管理の必要性を強く感じている。そのためには、検査法を統一し研修を行う必要があると思う。
- 基本検査法の整理と周知、必要とする施設への研修やセミナー等の実施がまず必要だと考える。

設問87:コメント4(b, a, c:記載分)

- 検査法が決まっていなくて研修をどのように行なうのか、また、研修を受けても現場で生かされないことが考えられる。レジオネラの場合、方法で結果がばらつくことは十分考えられるので、何が正しいかわからなくなる危険性がある
- 検査法や使用器具により回収率にばらつきがあるため
- 基本的な検査方法(使用する器材等も含む)の再確認がまず必要であると思う

設問87:コメント5(b, c, a:記載分)

- 検査法が統一された上で、精度管理が実施されれば、自機関の検査手技の検証、技術の維持に有効であると思う
- 検査指針を決定してから精度管理が必要だと思う。
- 検査法の統一と精度管理は実務上必須の課題であるので、優先順位は高い。研修システムはこれらが滞りなく稼働できれば、自ずから整ってくる業務内容と考える。

設問87:コメント6(a, b, c:記載分)

- 精度管理を充実させる必要があると考えている

設問87:コメント7(c, b, a:記載分)

- 関連しているので同時に進めていくことが望ましいと考える。
- 検査を行う以上、精度管理は必須であると考え。精度が保たれていれば検査法は多少ブレがあっても問題無いが統一されたものがあつた方が明確な拠り所ができ、それを元に研修が行われればより確かな検査が行えると考え。
- 精度管理を行うことで、現在の検査体制の問題が浮き彫りになると思います。その上で、検査法を比較・検討・検査系の確立を行った上で、最も正しいと考えられる検査法を研修すべき。

設問87:コメント8(c, a, b:記載分)

- コストの問題や検査法統一の困難さから、一定の精度管理基準を定めて後は研修や自己確認で対応するが妥当。上記のとおり、人工継代したレジオネラ菌の調製技術に問題点があると考え。(理想的には1. b. 2. c. 3. a。しかし、検査法がレジオネラ防止指針を根拠に浸透してしまっている現在の営利検査機関にbを求めることは膨大な科学的根拠(現在の検査体制を否定できる根拠)と投資コストの弁償、代償的補助等がなければ(例えば高額な遠心機導入済みの検査機関で過濃縮にさせる)実施は困難と思われる。)

設問87:コメント9(a, c, b:記載分)

- コメントなし

設問88:浴槽水以外でどのような検体に対しレジオネラ属菌検査経験がありますか?-1-(複数選択可)

検体名	回答数	検体名	回答数
シャワー水	23	ミネラルウォーター	9
足湯	9	水道水	15
貯湯槽	36	冷却塔水	49
温泉源泉	27	プール水	30
飲用泉	8	噴水	20

設問88:浴槽水以外でどのような検体に対しレジオネラ属菌検査経験がありますか?-2-(複数選択可)

検体名	回答数	検体名	回答数
井戸水	17	その他環境水	12
河川水	4	腐葉土	9
湖沼水	3	砂場の砂	0
加湿器の水	18	その他土壌	14
熱帯魚や金魚の水槽	3	喀痰	30

設問88:浴槽水以外でどのような検体に対しレジオネラ属菌検査経験がありますか?-3-(複数選択可)

検体名	回答数
胸水	2
咽頭ぬぐい液	7
鼻腔ぬぐい液	4
その他ヒト由来検体	9
その他	11

設問88:その他環境水1(記載分)

検体名	回答数	検体名	回答数
温泉施設のガス抜きタンク	1	冷却塔補給水	1
給湯水(循環等)	2	児童公園の流れの水	1
公園の池	1	雑用水	1
滝施設	1	消防用水	1
水景施設	3	打たせ湯	2

設問88:その他環境水2(記載分)

検体名	回答数
循環式浴槽のろ過器のドレン水	1
井戸水の貯水槽	1
実験器具の水槽(ウォーターバスなど)	2
科学館の展示用水	1
湧水	3
ジャグジー	1

設問88:その他土壌(記載分)

検体名	回答数
田んぼの土	1
屋上緑化の土	1*
菜園や庭の砂	1
運動場の土	1
患者発生施設周囲の土壌	1
産業廃棄物処分場	1

* 対照として菌液を置いて酸処理と加熱処理の併用を行なった。何とか単離して陽性としたが、菌液はダメージが大きく、生育集落は原液のマイナス4乗~5乗に減少した

設問88:その他ヒト由来検体(記載分)

検体名	回答数	検体名	回答数
気管支(肺胞)洗浄液	4	心血	1
気管支内粘液	1	分離菌株(喀痰等)	2
胸腔液	1	CPCA装置ぬぐい液	1
尿	1	CPCA装置洗浄液	1

設問88:その他(記載分)

検体名	回答数	検体名	回答数
温泉施設の配管等のヌメリ	1	エアコン(空調機)吹き出し口	2
呼吸器のチューブ	1	排水溝ふきとり	1
シャワーヘッド拭取り	3	ユニットバス蛇口	1
追炊き口拭取り	1	浴用水のろ材	2
浴槽拭き取り	2	浴室内(壁面等)	2
岩盤浴	1		

特記事項:コメント1

- 調査研究において、非濃縮、濃縮検体でLAMP法(栄研化学)陰性で、培養陽性だった場合を何度か経験している。その時検出された種類は、第6回全国レジオネラ対策会議資料によると、LANP法キットの特異性において、不検出(*L.birminghamensis*)または低感度(*L.spiritensis*)の種類と記載されていた。このように、LANP法キットの特異性において、不検出または低感度の種類が単独で浴槽水等に存在している場合があったので注意する必要があると思われる。また、特異性の向上に向けプライマーの検討が必要であると思われる。

特記事項:コメント2

- 血清型UTが検出された場合、16sRNAシーケンスで菌種を決める。感染源調査では患者株とPFGE像が一致する株を求めて、レジが疑わしい菌株はすべて釣菌する。現在の基準では違反しているからといって必ずしも処分していないのが現状である。10cfu/100mlの結果となる施設は多く、管理の徹底は必要であるが、このような基準というのは検査法の統一も含め見直す必要があるのではないかと考える。

特記事項:コメント3

- FCM(フローサイトメトリー)法は、塩素管理を条件とした浴槽水のレジオネラ汚染スクリーニング方法として開発した。細菌を標的として浴槽水の清浄度を評価することができ、短時間で検水の消毒状況の是非を判断できる(レジオネラ菌培養検査の定性結果との判定一致率が約90%、H21年度厚労科研総括分担研究報告書、研究代表者遠藤卓郎pp83-91)。FCM法で大量の細菌を検出する検体はリスクが高いと判断して、通常の検査に非濃縮検体の検査を追加している。

特記事項:コメント4

- 行政検査では、検体接種平板を培養初日から10日目まで、毎日斜光法で観察している。その結果48時間以内にレジオネラ集落を確認できる場合を多数経験している。
- 尿中抗原検査の普及で、培養分離株を得ることが難しい。散发事例がほとんどで、感染源の特定にいたらないケースが多い。

特記事項:コメント5

- 病院におけるレジオネラ症の診断は、尿中抗原の有無で行われているが、菌分離も併行して実施し、分離株は地研へ送付するシステム作りも必要ではないか。
- 当所では、患者発生などにより突発的事象が起こったときにのみの検査で、定常的に行う検査ではない。定性を誤認することはないものの、定量については常々精度管理が必要な検査であると感じていた。本アンケートをきっかけに検査法の詳細な規定や精度管理が行われることを望んでいる。

特記事項:コメント6

- 各自治体(地衛研)の規模で違いがあると思いますが、年間の検査検体数、一日の受け入れ検体数、検体の種類(浴槽水以外の冷却塔水や周景用水など)も知りたいです。ちなみに当所では昨年度(平成21年度)の検査数は68、一日の受け入れ検体数は最大5検体、検体は浴槽水(ジャグジー水を含む)のみです。
- アンケート内容が地衛研向きかつ具体性があり大変良かったと思います。

特記事項:コメント7

- アンケートは一般的な浴槽水の検査について回答したが、検体の種類や必要性によって、検体の前処理、培地や摂取量等は臨機応変に対応している。
- 当所でのレジオネラ検査は、公的機関依頼の検体(冷却塔水、噴水)のみで、現在行っている方法で回答しました。

特記事項:コメント8

- 感染源調査等行政検査としてレジオネラ属菌検査を実施する場合と自主検査では対応が異なります。
- 自主検査を受け入れたことがない。行政検査では、残留塩素を有する浴槽水を収去している。日常扱うサンプルは陽性であっても菌数が少ないため、集落数が多い場合のアンケートの項目においては回答が難しかった。
- 研修等に係わる質問は、その主旨(一般論?当所について?)がわからなかったため、個人的な見解として回答した。

特記事項:コメント9

- 当所でレジオネラの有料一般検査を行うことはありえない。ありえないことを想定して回答することは難しいので現在行っている状況で回答できるように設定していただきたい。(有料検査を想定するか現在行っているレジオネラ検査を想定するかで回答が異なる可能性がある)また採水、搬入は保健所、検査は当所(衛研)が行うので保健所が行う項目に関しては適切な回答であることは保証できない。

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

平成 22 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討
－外部精度管理試料安定化に向けた取り組み－

研究分担者 森本 洋 北海道立衛生研究所

研究要旨

昨年度までの精度管理施行に伴い報告された課題点の一つに、配布用試料の安定性が指摘されていた。そこで今回、外部精度管理試料安定化に向けた取り組みとして、液体培地を利用した試料作製を試みた。本法による模擬試料であれば、作製後 1 週間以内に検査ができるのであれば、未処理、酸処理の場合、非選択培地、選択培地(今回は MWY 寒天培地)に関係なく、オーダーの減少もなく検査結果を求めることができると思われた。熱処理については試料作製 3 日目以内であれば、同じ結果を求めることができると思われた。保存期間が長くなるほど、熱処理による影響が認められたことから、熱処理を想定した模擬試料を作製することは容易な事ではなく、供試菌の選択を含めた十分な検討が必要であると思われる。今後は保存期間の延長や他の選択分離培地の影響等も考慮した検討が必要であると考え。

精度管理については、検査のどの部分に重きを置くかの定義付けが重要になると思われる。その中で、精度管理試料については、定義目的を達成できるだけの安定した試料を作製する必要があり、加えて複数の担当者間で比較的簡易に調製ができるような、試料作製方法であることが望ましいと思われる。

A. 研究目的

外部精度管理を行うためには、①精度管理用菌株の選択、②配布試料の安定化、③精度管理参加条件の設定、④配布方法、⑤精度管理用の検査方法、⑥評価と解析方法などを十分に検討した上で行う必要がある。平成 19 年度から 21 年度に行われた厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」で検討された精度管理において、

その考察とまとめの中でいくつかの課題点が報告されている¹⁾。その中で、配布用試料については、次のような報告がなされていた。

1. 試料用ディスク配布後の菌数にバラつきがあったことから、発送から測定結果を得るまでの工程で何らかの影響を受けた可能性が示唆された。
2. 試料測定結果を見ると、その回収率に著しい差異が認められた。特に酸処理法に比べ、加熱処理を行うことによる低下が著しかった。回収率低下要因の究明を行うとともに、ディス

ク法に代わる新たな標準試料作製や疑似検体作成の検討など、両方からアプローチしていく必要があると考えられた。

これらのことから、今回、外部精度管理試料安定化に向けた取り組みとして、液体培地を利用した試料作製を試みたので報告する。

B. 研究方法

〈供試菌の選択〉

外部精度管理のための供試菌は、培養検査工程において、レジオネラ属菌として典型的な性状を有し、酸処理、熱処理、各種選択分離培地により大きな影響を受けにくく、さらには、ヒトに対しての感染性が低い(無い)タイプのものが理想と思われる。そこで、過去の浴槽水検査において、未処理、熱処理:50°C 20分、酸処理:0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え室温で4分間放置、熱処理後酸処理、これら全てから、非選択分離培地(BCYE α :Oxoid社)、選択分離培地(MWY:Oxoid社、GVPC:Merck社)上で有意に発育し、かつ10⁴CFU/100mL以上検出されたにもかかわらず、施設利用者から感染者の報告がない、*L.pneumophila* SG3 野生株を供試することとした。

〈液体培地の調製〉

液体培地の組成は、Oxoid社のBCYE α 寒天培地をベースに、寒天とActivated Charcoalを除いたものとした。すなわち、精製水90mLに対し、Yeast extract(Oxoid)1gを加え、滅菌後、Legionella BCYE Growth Supplement(SR0110A:Oxoid)1バイアルを指示通り溶解、添加し調製したものである。本液体培地は、供試菌を増殖させる目的として利用するのではなく、添加した供試菌数を一定期間安定させることを目的としている。また検査工程や供試

菌調製の妨げにはならない。本実験でのActivated Charcoalについては、ろ過濃縮の際フィルター目詰まりの原因となること、供試菌調製の際濁度調整の妨げとなること、加えて環境水中のようにレジオネラ属菌の発育阻害となる物質もなく、レジオネラ属菌増殖の際に発生する代謝産物の影響も無いことから、添加しないこととした。

〈使用平板培地〉

Oxoid社のLEGIONELLA CYE AGAR BASEに必要なサプリメントを指示通り溶解、添加し調製したBCYE α 、MWY寒天培地を使用した。

〈供試菌液の調製〉

BCYE α 寒天培地で、36°C、40時間培養した供試菌を、液体培地内でマクファーランドNo.1に調整し、それを同じ液体培地で10³、10⁴、10⁵、10⁶倍に希釈したものを供試菌液とした。

〈確認試験〉

調製した菌液に対し、それぞれ前処理(未処理、熱処理:50°C 20分、酸処理:0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え室温で4分間放置)を行い、BCYE α とMWY寒天培地各2枚に100 μ Lずつ接種(酸処理は200 μ l)し、36°Cで7日間培養(毎日観察)後、最終的な菌数を測定し平均値を求めた。この操作を菌液保存0、1、2、3、4、7日目に行った。菌液の保存は郵パックのチルドを想定し5°Cで行った。なお、昨年度までの精度管理試行で、加熱処理後の菌数の低下が著しかったことから、急激な温度変化による影響を避けるために、冷蔵保存菌液を試験前に36°C、30分間加温してから、各前処理を行った。

C. 研究結果及び考察

結果を表に示した。菌液保存0~3日目まで