

加湿器を原因とした 老人福祉施設での レジオネラ症集団発生事例 ～検査編～

大分県衛生環境研究センター
微生物担当 佐々木麻里

大分県のレジオネラ患者発生時の検査対応 (公衆浴場および旅館業における共同浴室)

□入浴施設に関連するレジオネラ症発生時の対応要領

保健所

レジオネラ症発生届受理
聞き取り調査



公衆浴場等の利用有り



患者喀痰提供依頼

保健所(当該公衆浴場管轄)
施設の立入調査



浴槽水等の検体確保

食品・生活衛生課
(公衆浴場等所管課)

他機関との連絡・調整

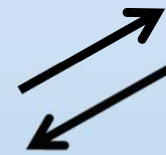


衛生環境研究センター
レジオネラ属菌検査

協力依頼



国立感染症研究所

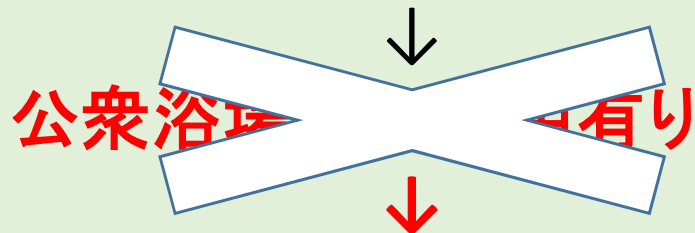


本事例のレジオネラ患者発生時の検査対応

入浴施設に関連するレジオネラ症発生時の対応要領

保健所

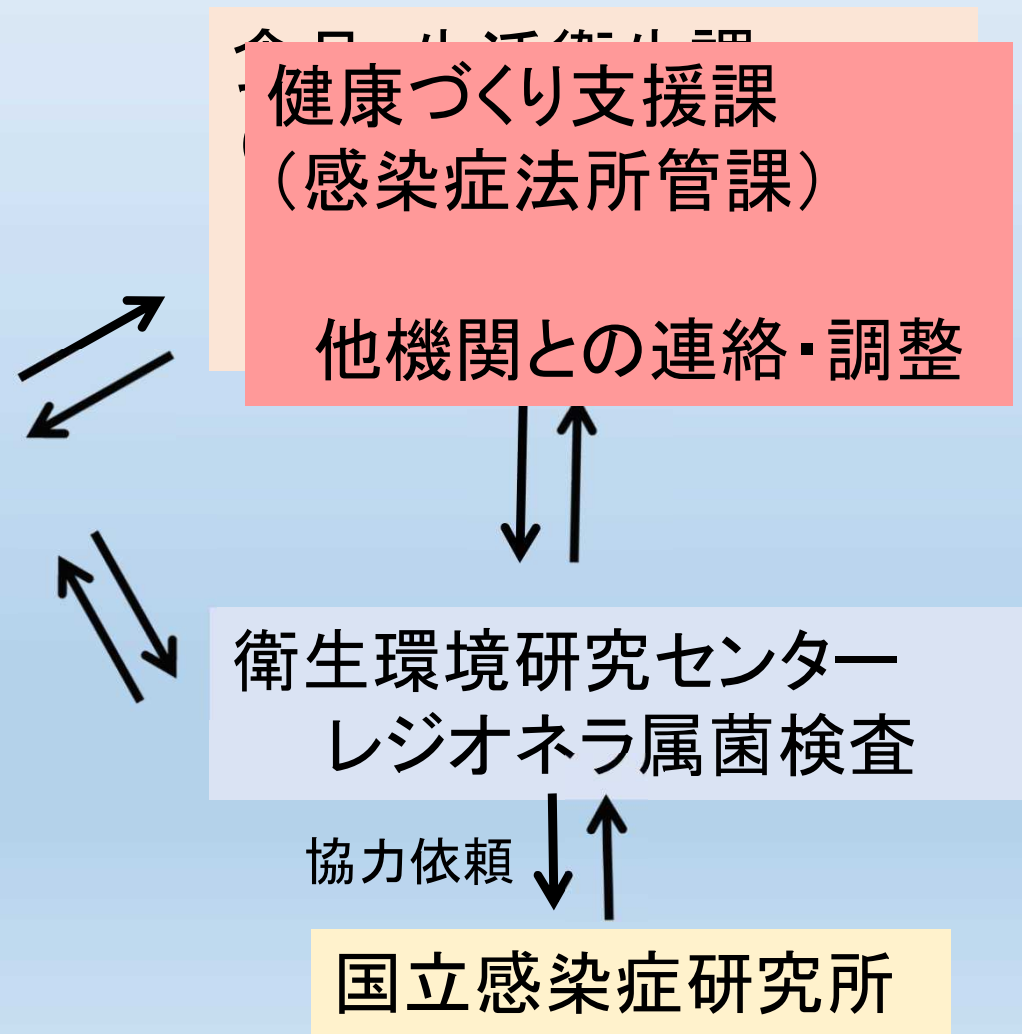
レジオネラ症発生届受理
聞き取り調査



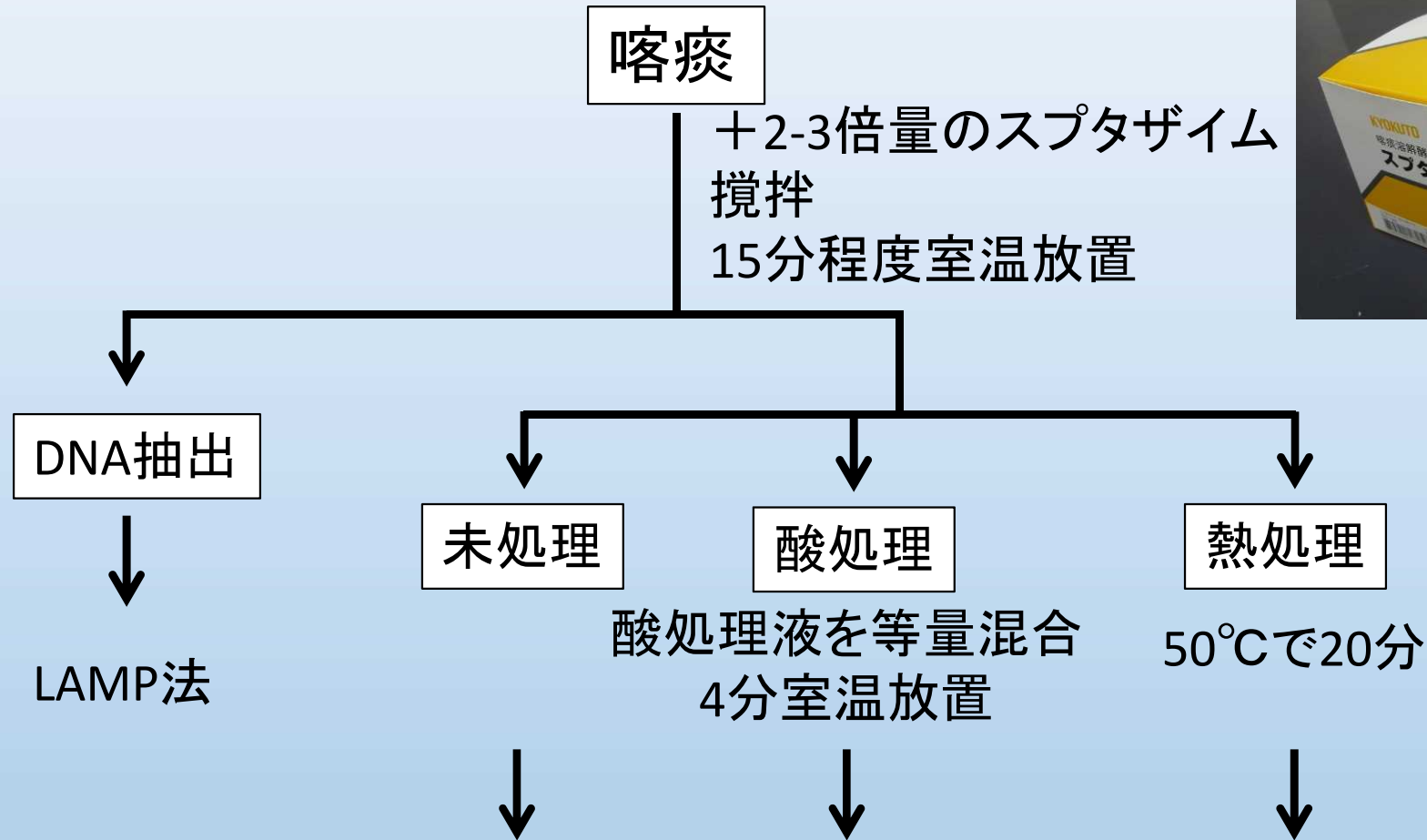
患者喀痰提供依頼

施設の立入調査

浴槽水等の検体確保

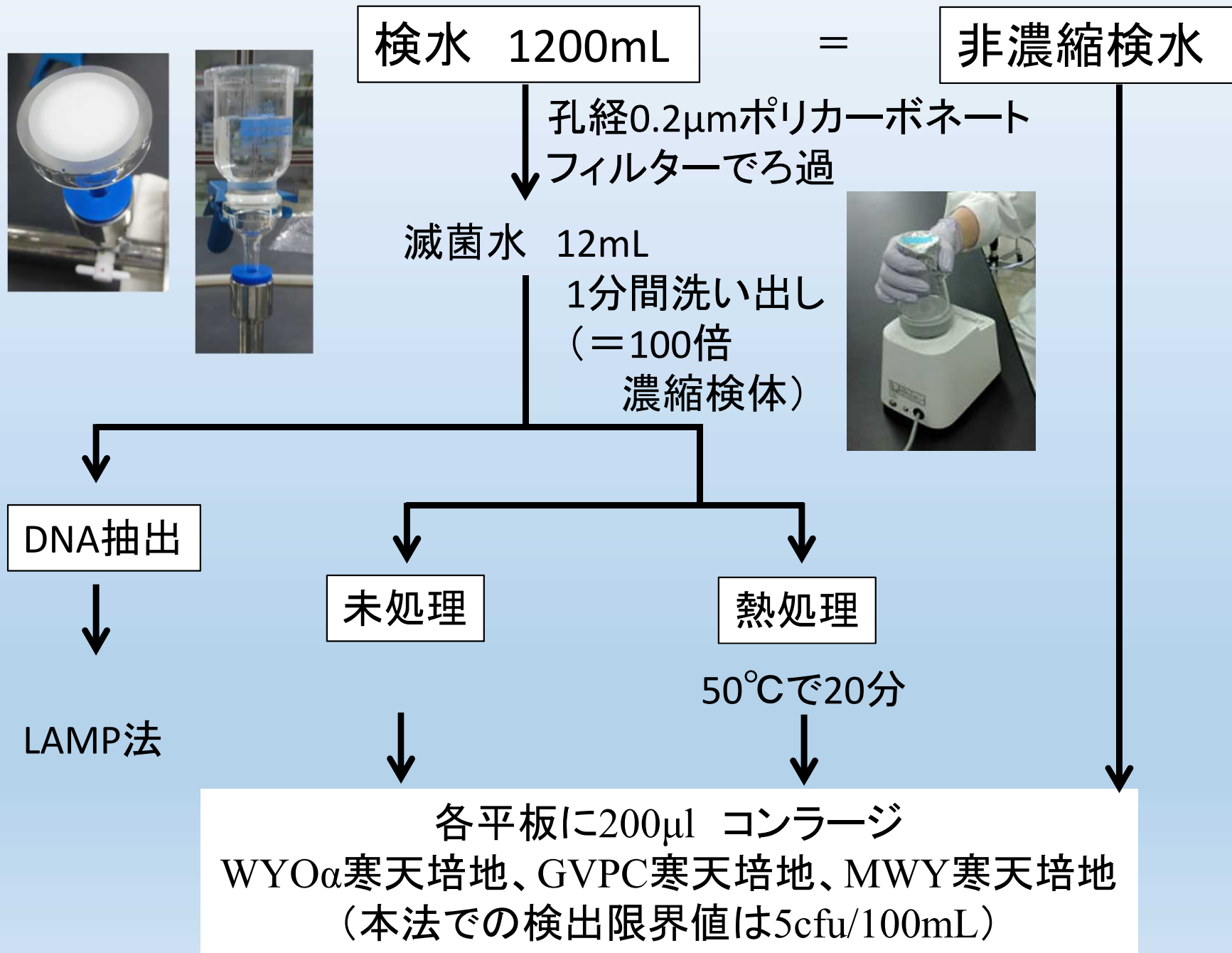


喀痰からのレジオネラ検査



各平板に100μl コンラージ
WYO α 寒天培地、GVPC寒天培地、MWY寒天培地
(場合によってはBCYE α 寒天培地追加)

浴場水からのレジオネラ検査



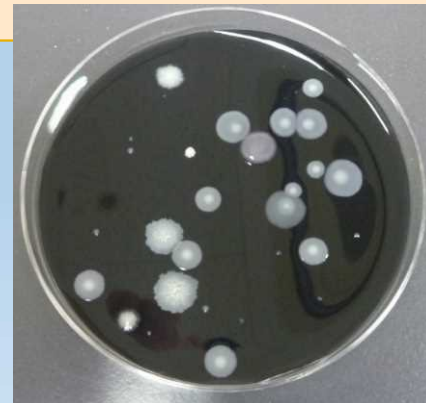
レジオネラ属菌培養検査の流れ

レジオネラ属菌は発育が遅く、培養に7日以上を要する

当日
濃縮・塗抹



7日後
平板観察
釣菌
→確認培養



9-10日後
判定・
PCR・血清
型別

レジオネラ属菌培養検査の流れ

なるべく早く培養検査結果を出すために

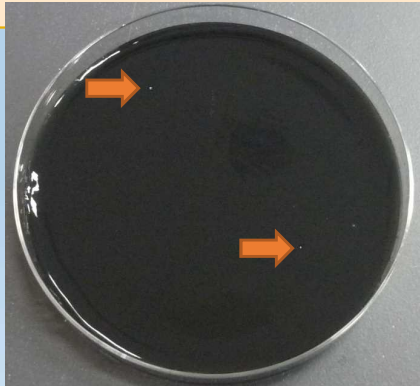
当日
濃縮・塗抹

3日後
斜光法観察
釣菌
→確認培養

5-6日後
判定・
PCR・血清
型別

7日後
平板観察
釣菌
→確認培養

9-10日後
判定・
PCR・血清
型別

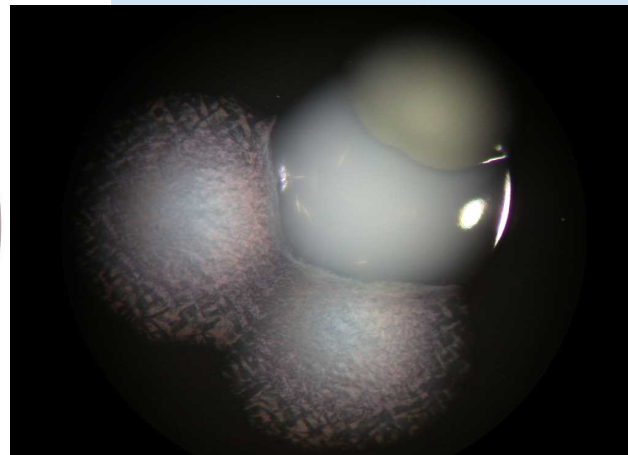
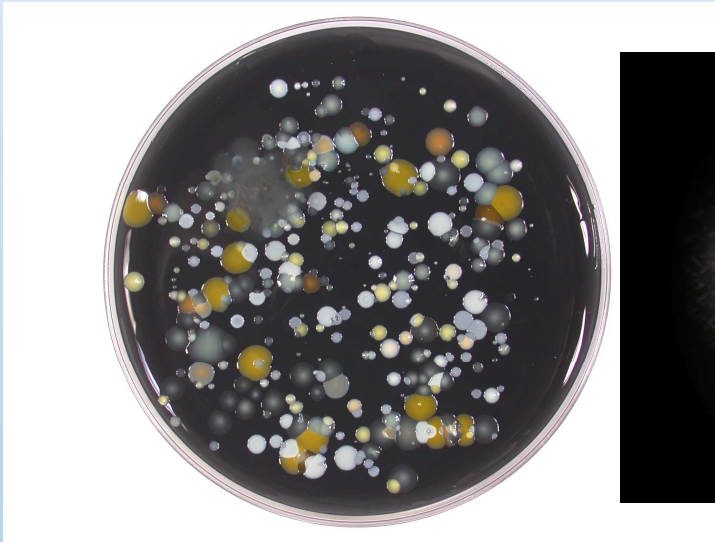


この時点で
「レジオネラ検出」
が言える時が多い

菌数の確定は
この時点

斜光法

2方向から斜光をあて、実体顕微鏡下で観察
→レジオネラ属菌はモザイク様形態を示す



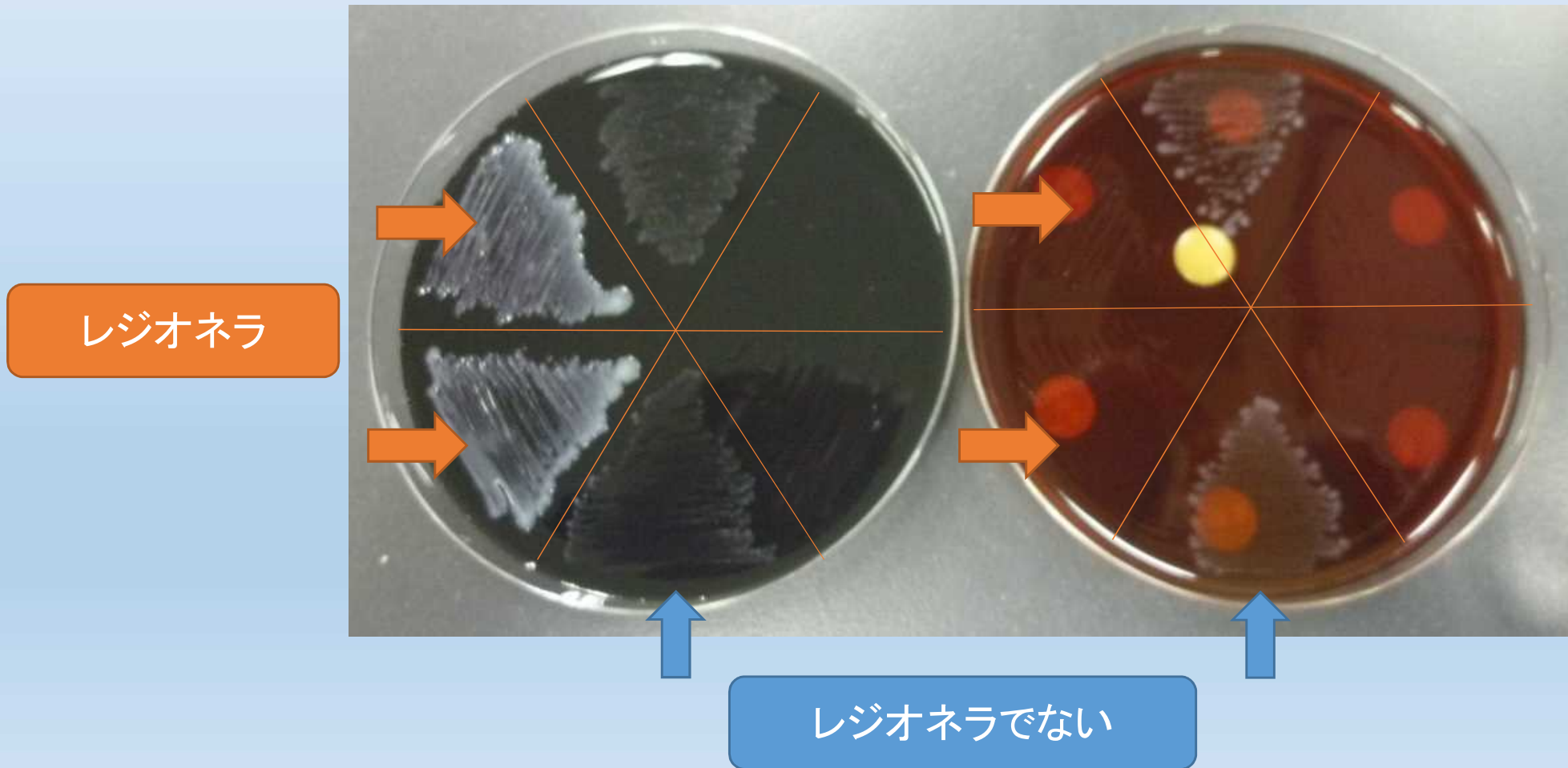
北海道立衛生研究所 森本洋先生提供

確認培養(L-システイン要求性試験)

レジオネラ属菌の発育にはL-システインが必要。

→L-システインを含むBCYE α 寒天培地に発育

L-システインを含まない血液寒天培地には非発育



確認PCR

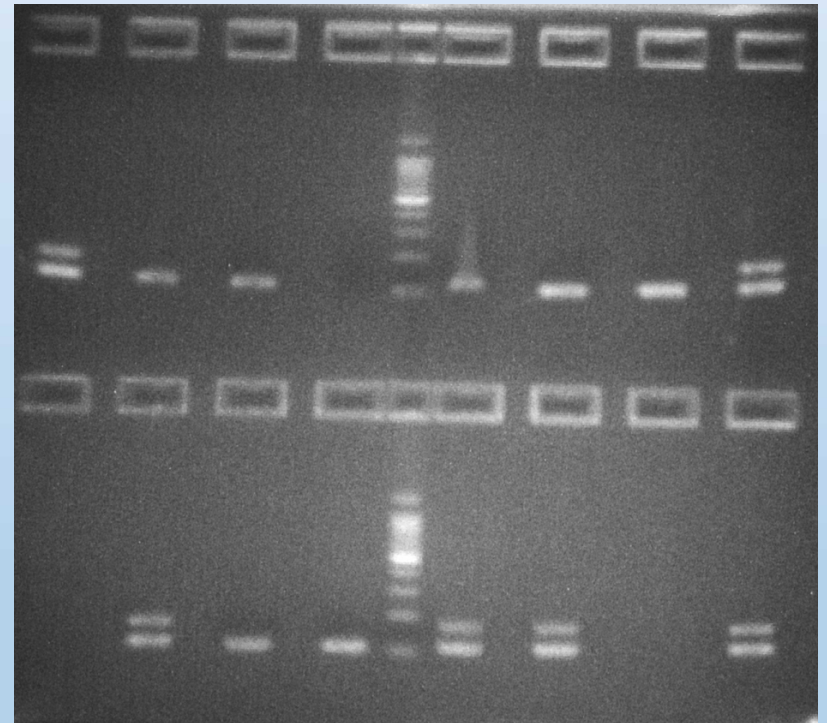
プライマー

5SrRNA・・・*Legionella*属特異的*
mip・・・・・・*L.pneumophila*特異的

PCR反応条件

95°C 30秒 (前熱変性) mip:168bp
95°C 30秒 5SrRNA:108bp
63°C 45秒 } 30サイクル
72°C 7分 (最終伸長)

2%アガロースゲルで5μLを電気泳動



*検出できないレジオネラもある。

マルチプレックスPCRではmipが検出できないこともある。

血清型別

1. 加熱死菌液を調製する

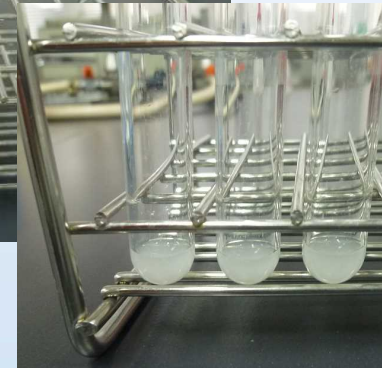


2. Oxoidの血清を用いて、

①「*L.pneumophila*血清群1」

②「*L.pneumophila*のうち血清群1以外」

③「*L.pneumophila*以外のレジオネラ*」
の3種類に分ける



3. ②または③に分類された株について
デンカ生研の血清で型別する



*7種類のレジオネラに対応している。

→凝集が来ないことを理由にレジオネラを否定はできない。



本事例の患者発生状況



	年齢・性別	症状	検査結果
● 患者1	86歳男性	発熱、肺炎	尿中抗原で診断 喀痰培養検査実施せず
● 患者2	84歳男性	発熱、肺炎	尿中抗原で診断 当センターの喀痰培養で <i>L. pneumophila</i> 血清群1を検出
● 患者3	98歳男性	発熱、肺炎、 1/14死亡	尿中抗原で診断 当センターの喀痰培養で レジオネラ属菌を検出せず

本事例でのレジオネラ属菌培養検査の流れ



- 検水は量にこだわらず採れるだけ
→・可能な場合は500mL使用
・不足する場合は濃縮率を調整して対応
例) 60mLの検水を3mLに濃縮(20倍濃縮)
- 拭き取り液は予め5mLに減じる
(少しでも濃縮するため)

本事例でのレジオネラ属菌培養検査の流れ

3例目届出後の検査

検体搬入
1月15日

検出予告
1月18日

検出確定
1月19日

当日
濃縮・塗抹

3日後
斜光法観察
釣菌・PCR・血清型別
→確認培養

4日後
判定・PCR・血清型別

7日後
平板観察
釣菌・PCR
→確認培養

8日後
判定・PCR・血清型別

確認のため、
純培養菌でも実施
&確認培養継続

確認のため、
純培養菌でも実施
&確認培養継続

・コロニーから
直接DNA抽出
・コロニーを集
めて血清型別

菌量が少ないので
生菌で実施

コロニーから
直接DNA抽出

菌量が少ないので
生菌で実施

3例目届出後の検査

220,000cfu/100mL
と報道
(斜光法の段階)

	検体名	LAMP 結果	培養結果
加湿器	患者1居室 加湿器内の残り水(1L)	陽性	<i>L. pneumophila</i> SG1を検出 3,800cfu/ml (380,000cfu/100ml)
	患者2居室 加湿器内の残り水(70mL)	陽性	検出せず
	患者2居室 加湿器の拭き取り	陽性	検出せず
	食堂 備付け加湿器の拭き取り	(-)	検出せず
	職員室 備付け加湿器の拭き取り	陽性	検出せず
エアコン	患者1居室 エアコンの拭き取り	(-)	検出せず
	患者1居室 エアコン(小)の拭き取り	(-)	検出せず
	患者2居室 エアコンの拭き取り	(-)	検出せず
	患者3居室 エアコンの拭き取り	(-)	検出せず

加湿器からレジオネラ属菌を検出

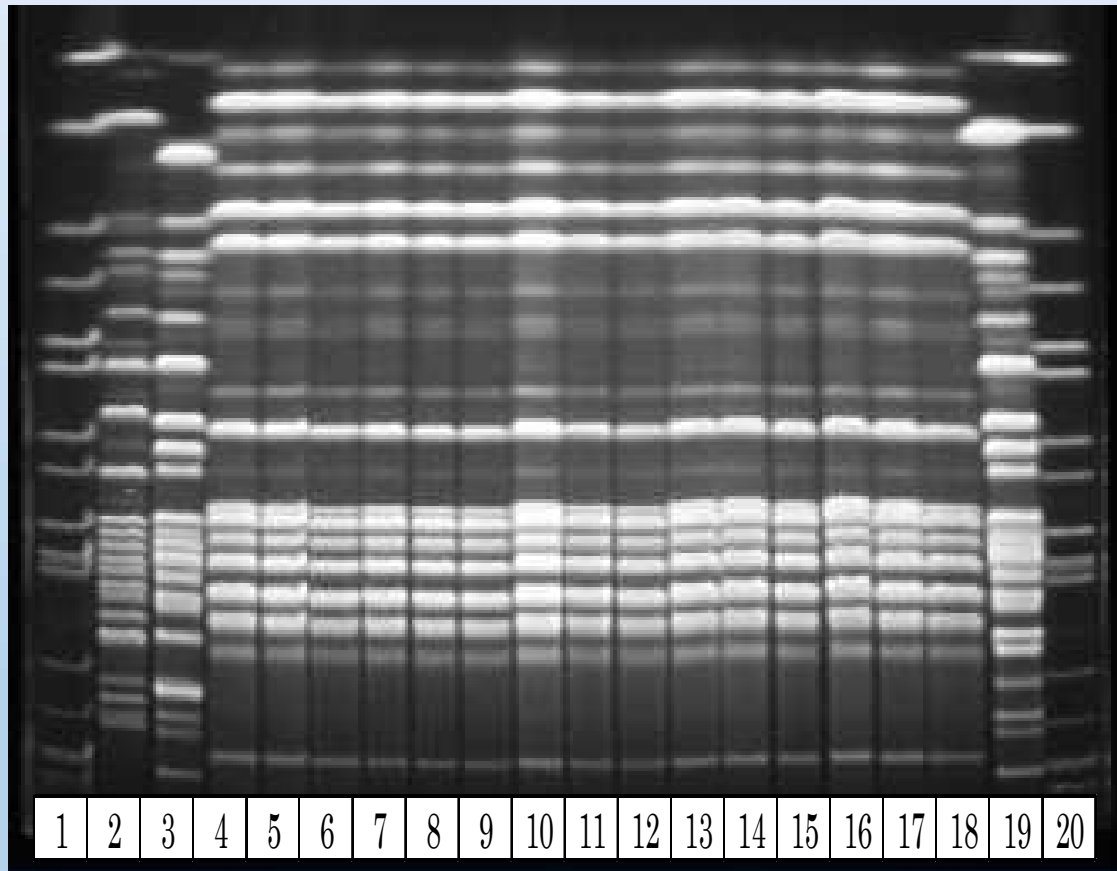
3例目届出後の検査

	検体名	LAMP 結果	培養結果
患者居室	患者1居室 シャワールの排水口拭き取り	(-)	検出せず
	患者2居室 シャワールの排水口拭き取り	(-)	検出せず
	患者2居室 バケツの拭き取り	(-)	検出せず
	患者2居室 バケツ内消毒水	(-)	検出せず
	患者3居室 洗面台の拭き取り	(-)	検出せず
	患者3居室 シャワールの排水口	(-)	検出せず
	患者3居室 蛇口水	(-)	検出せず
入浴設備	機械浴室 浴槽水	陽性	検出せず
	機械浴槽室 排水口拭き取り	(-)	検出せず
	機械浴槽室 シャワー台排水口拭き取り	(-)	検出せず
	一般浴槽室 シャワー前排水口の拭き取り	(-)	検出せず

LAMP陽性の検体があったため、入浴設備の検査を繰り返し、
3つある一般浴槽のうち1つのシャワー水から
***L. pneumophila* SG1 (5cfu/100mL)**を検出。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

制限酵素によって遺伝子が切断されるパターンによって異同を見る方法



laneNo

- 1 サイズマーカー
 - 2 別事例患者株1
 - 3 別事例患者株2
 - 4-6 患者2由来株
 - 7-18 加湿器由来株
 - 19 入浴設備由来株
 - 20 サイズマーカー
-

(*Sfi*1で消化)

患者由来株と加湿器由来株の切断パターンが同じ

Sequence-Based Typing解析

7種類の遺伝子 (*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA*) の一部の領域の塩基配列に基づく型別

国立感染症研究所へ菌株を送付して検査依頼

Options

- Home
- Materials & Methods
 - Frequently Asked Questions
 - Protocols
 - SBT Loci Details
 - Download reference-sequences
- Data Submission Function
 - Strain Data Submission
 - New Allele Submission
- Query Functions
 - Sequence Quality Tool
 - Query the SBT Database
 - Check a sequence for its allele number
 - Current Genetic Diversity of the SBT loci
 - Get Single/Double locus variants of a profile
 - Retrieve allele sequences
 - Look-up an allelic profile or Sequence Type

Legionella pneumophila Sequence-Based Typing

Welcome to the EWGLI Sequence-Based Typing (SBT) Database for *Legionella pneumophila*

A consensus Sequence-Based Typing (SBT) epidemiological typing scheme for clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* has been developed by members of the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) and evaluated for implementation in the investigation of outbreaks of legionellosis caused by *L. pneumophila*.

Using the SBT protocol, the SBT database (version 3.0) allows assignment of the seven ordered alleles, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and *neuA* as described by [Gaia et al. \(2005\)](#) and [Ratzow et al. \(2007\)](#), represented as a Sequence Type (ST), or allelic profile, of the ordered string of allele numbers separated by commas e.g. 1,4,3,1,1,1,1.

The curators encourage the submission of putative new alleles. Submission of putative new alleles can be made via the [Sequence Quality Tool](#) or by the New Allele Submission link (Options menu, left), which examines the forward and reverse chromatogram files. Subject to verification by the curators, a new allele number will be assigned and added to the database. If the curators are unable to verify a new allele, the strain or genomic DNA may be requested to allow sequencing by another designated centre. Submission of strains bearing new allele numbers to the EUL culture collection is strongly encouraged.

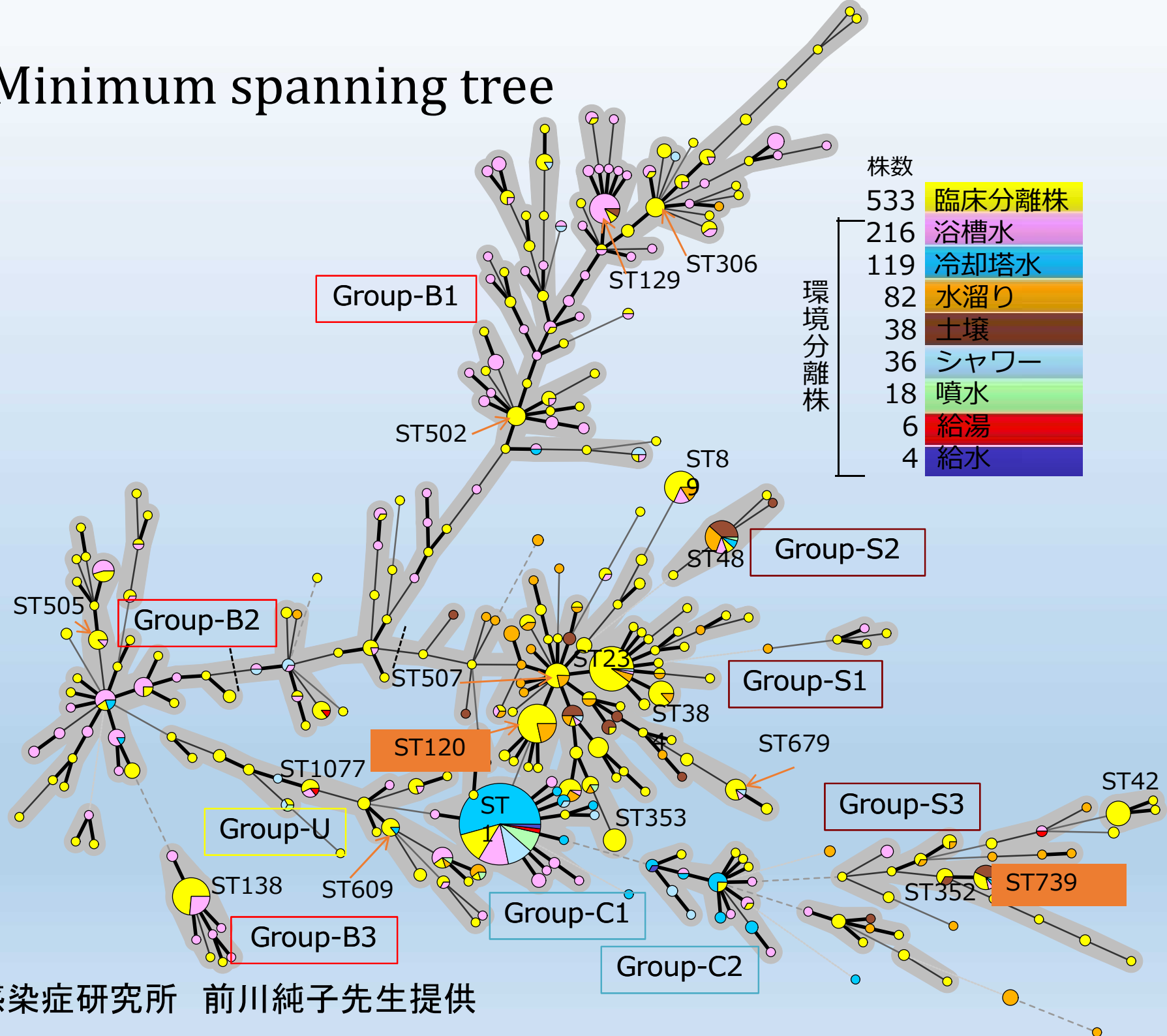
Please contact [Dr. Baharak Afshar](#) for further details.

Sample source, total number of records 12820

Total number of entries:	12820
Number of Sequence Types :	2703
Number of <i>flaA</i> alleles:	38
Number of <i>pilE</i> alleles:	58
Number of <i>asd</i> alleles:	76
Number of <i>mip</i> alleles:	89
Number of <i>mompS</i> alleles:	103
Number of <i>proA</i> alleles:	57
Number of <i>neuA</i> alleles:	65
Number of <i>neuA</i> alleles:	30

EWGLI Provided by The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) in conjunction with **Public Health England** and **ecdc** The European Centre for Disease Prevention and Control

Minimum spanning tree

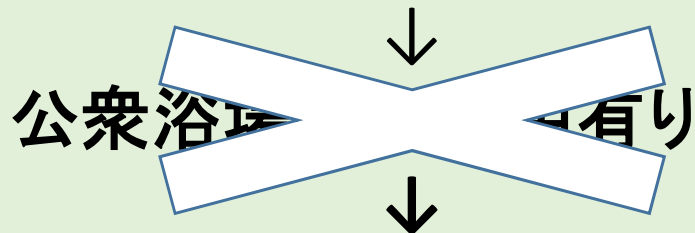


本事例のレジオネラ患者発生時の検査対応

情報のやりとりが非常に煩雑
検査の手を止めて対応していた

保健所

レジオネラ症発生届受理
聞き取り調査



患者喀痰提供依頼

感染症担当課

施設の立入調査

衛生担当課

浴槽水等の検体確保

健康づくり支援課
(感染症法所管課)

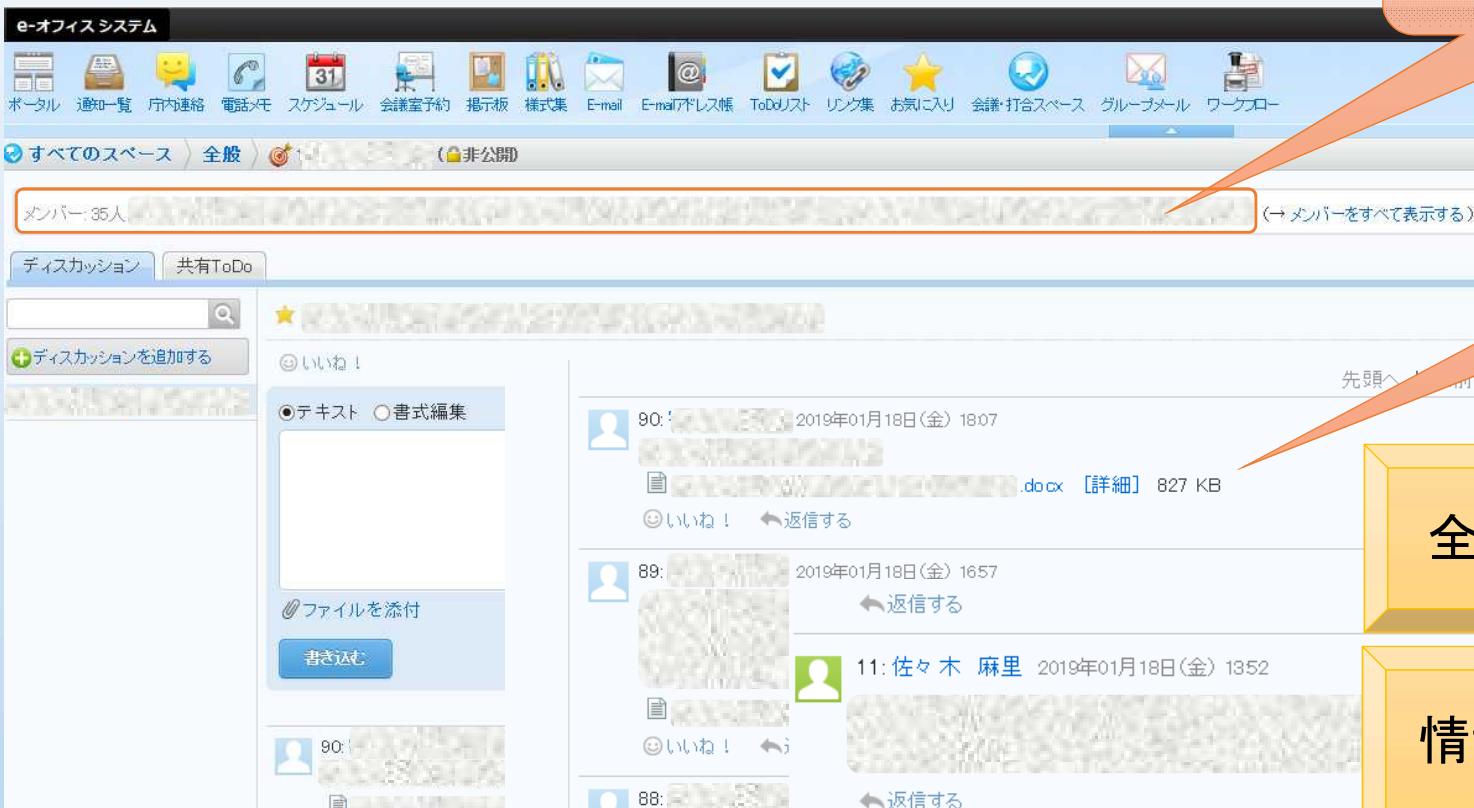
他機関との連絡・調整

衛生環境研究センター
レジオネラ属菌検査

協力依頼

国立感染症研究所

情報共有ツールの利用



関係者全員で
情報共有

ファイルも
添付できる

全員が同じ情報を知る

情報の行き違いが無い

検査の待ち時間に
回答する

検査が早く進む

最後に

レジオネラ属菌培養検査は時間がかかり、検査結果がいつ確定するかは、レジオネラやその他の菌の発育状況によります。

今回、全部で49検体の検査を実施しましたが、常法どおりにいかないことが多くありました。

検査をスムーズに行うために、関係者にたくさんのご協力をいただきました。

本事例での対応が、みなさまの参考になれば幸いです。

SBT解析を快く実施くださいました
国立感染症研究所 細菌第一部
前川純子先生に深謝いたします。

