

感染源調査のために必要な 呼吸器検体からの菌の分離

患者分離菌の重要性

富山県衛生研究所 細菌部 磯部順子
金谷潤一

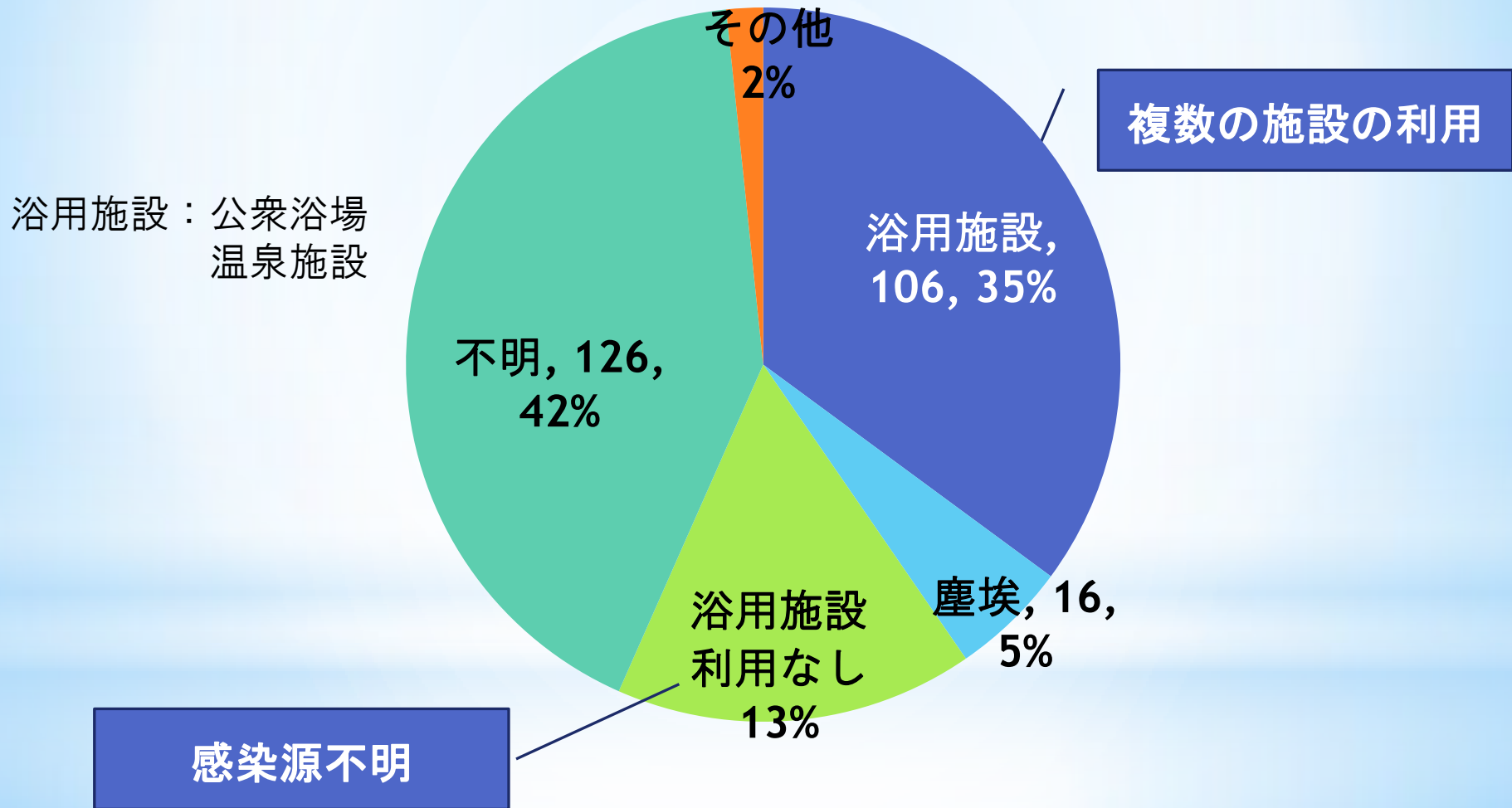
レジオネラ患者数の年次推移 (1999～2015第52週)



富山県におけるレジオネラ症患者の感染源（推定）

潜伏期間（発症前10日間）における行動調査

1999～2015年302名



喀痰からの菌の分離



喀痰

+2-3 倍量のスプタザイム
ボルテックス
15 min 室温放置



(時々ボルテックス)

DNA 抽出

QIAamp DNA
Mini Kit(QIAGEN)

PCR

LAMP

増菌培養

検体
+

9 倍量の MWY
液体培地

35°C, 1-2days

直接塗抹と同様の
培養法

直接塗抹

未処理

熱処理

50°C, 20 min

酸処理

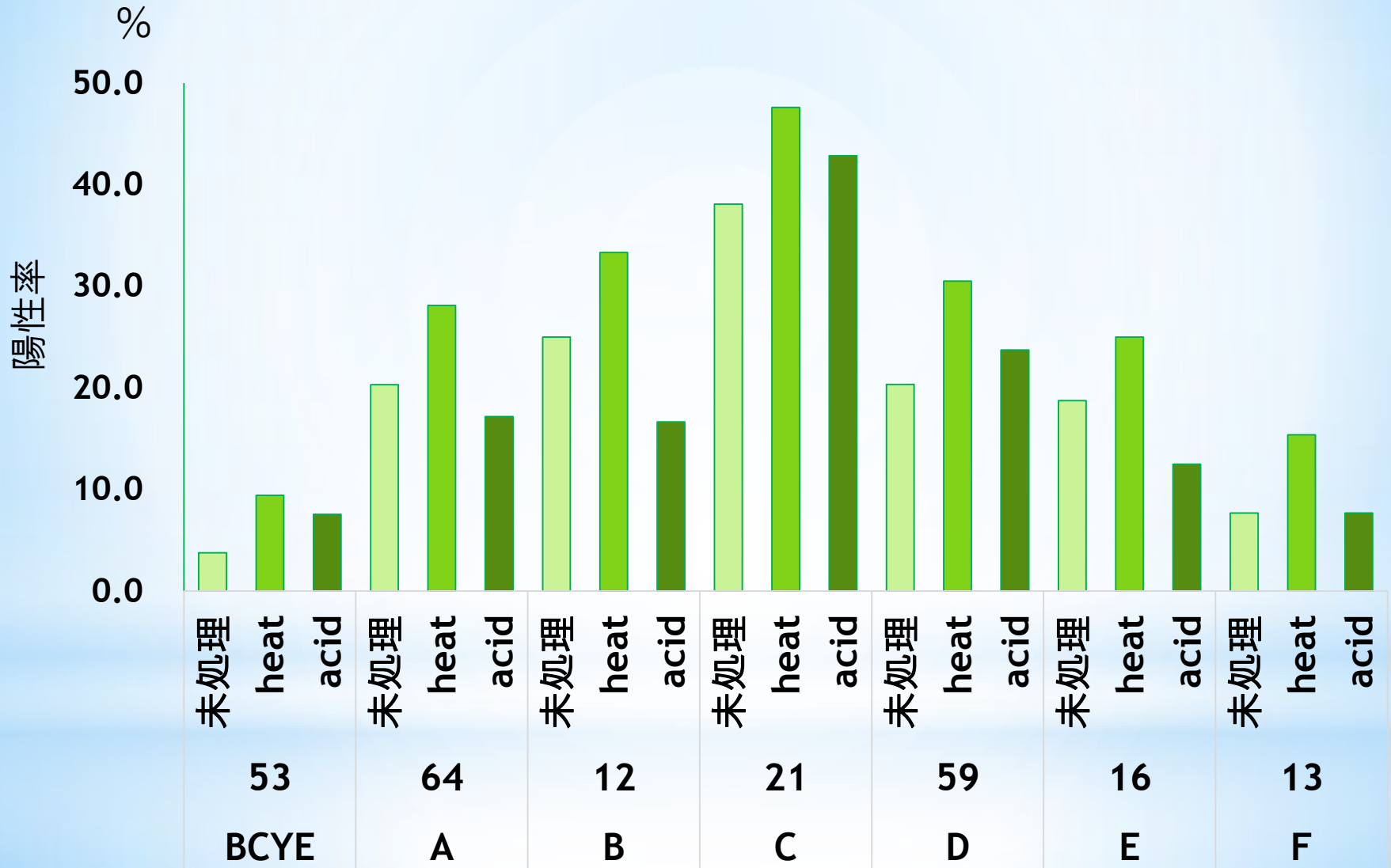
酸処理液を等量混合
5 min 室温放置

白金耳で塗抹
35°C, 3-7 days

観察

GVPC 寒天培地
MWY 寒天培地

喀痰のレジオネラ属菌陽性率（培地別・前処理別）



喀痰のレジオネラ属菌陽性率（培地別・前処理別）

%

	検体数 陽性数 (%)			BCYE	検体数 陽性数 (%)																			
	未処理	heat	acid		A	B	C	D	E	F														
未処理	65	18	27.7	53	5	9.4	64	19	29.7	12	4	33.3	21	12	57.1	59	19	32.2	16	4	25.0	13	2	15.4
heat	65	23	35.4																					
acid	65	18	27.7																					

未処理	heat	acid	処理	heat	acid	処理	heat	acid	処理	heat	acid	処理	heat	acid	処理	heat	acid	処理	heat	acid					

Heat(50°C20分加熱)の陽性率が高かった
BCYEでの陽性率は低かった。

ポイント；レジオネラ属菌以外の菌の抑制

喀痰採取から培養検査開始までの日数別 レジオネラ属菌培養・遺伝子検出陽性率

日数	検体数	陽性数	(%)
0	38 (35)	16 (19)	42.1 (54.3%)
1	21 (17)	7 (4)	33.3
2	0		
3	2 (2)	1 (1)	50.0 (50.0%)
4	1 (1)	0 (0)	0.0
5	1	0	0.0
6	1	0	0.0
9	0 (1)	0 (1)	0.0% (100.0%)
13	0 (1)	0 (0)	
18	0 (1)	0 (0)	
32	0 (1)	0 (0)	
33	0 (1)	0 (0)	
36	0 (1)	0 (0)	
不明	1	0 (0)	0.0
計	65	24	36.9

喀痰採取後は速やかに
検査に供する
24時間を越える場合は
冷凍保存する

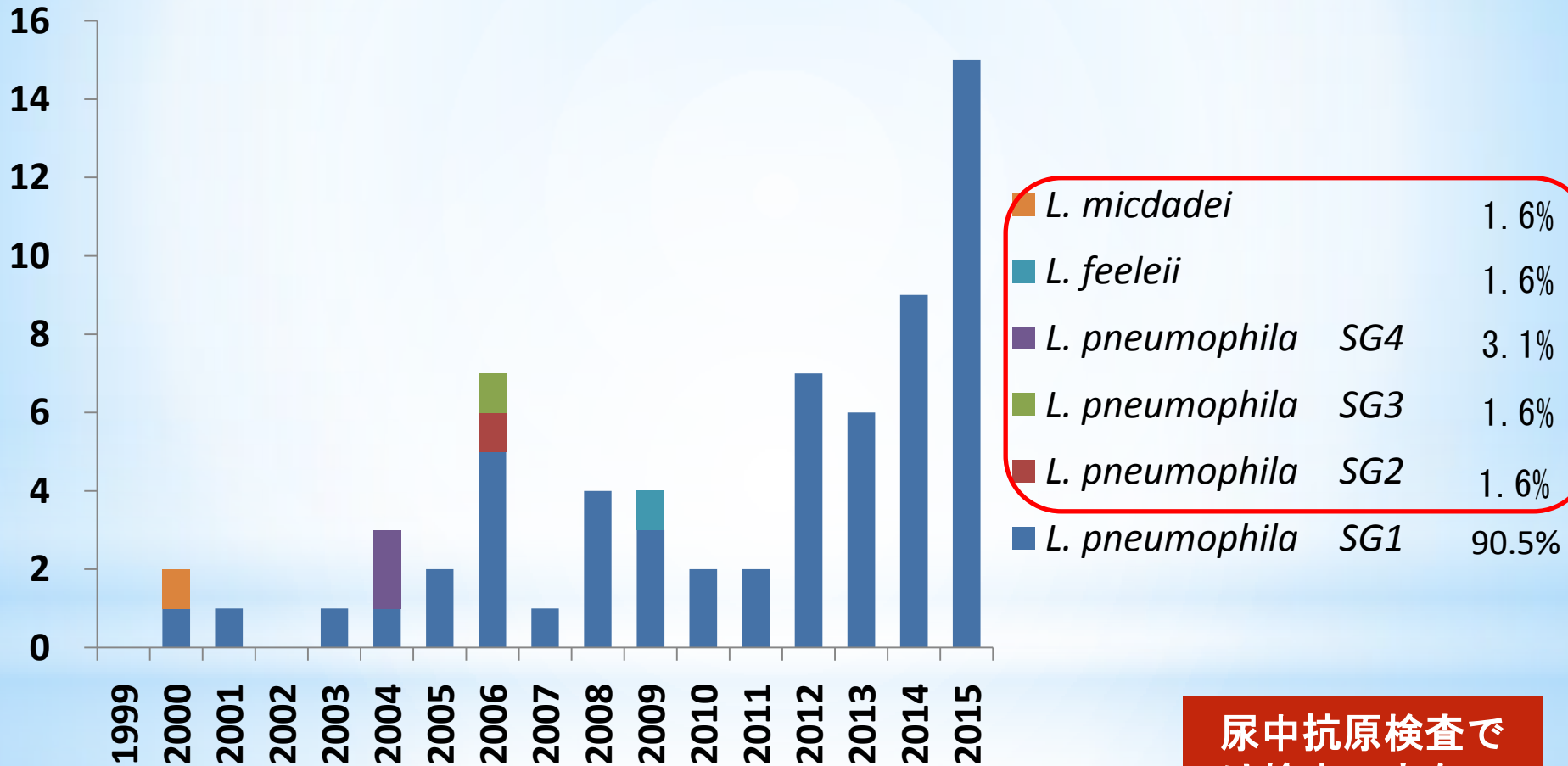
() は遺伝子検査の結果

積極的疫学調査の結果のまとめ

富山県における レジオネラ症患者からのレジオネラ属菌分離の割合 (1999～2015)



患者から分離された菌株（2000～2015） 富山県



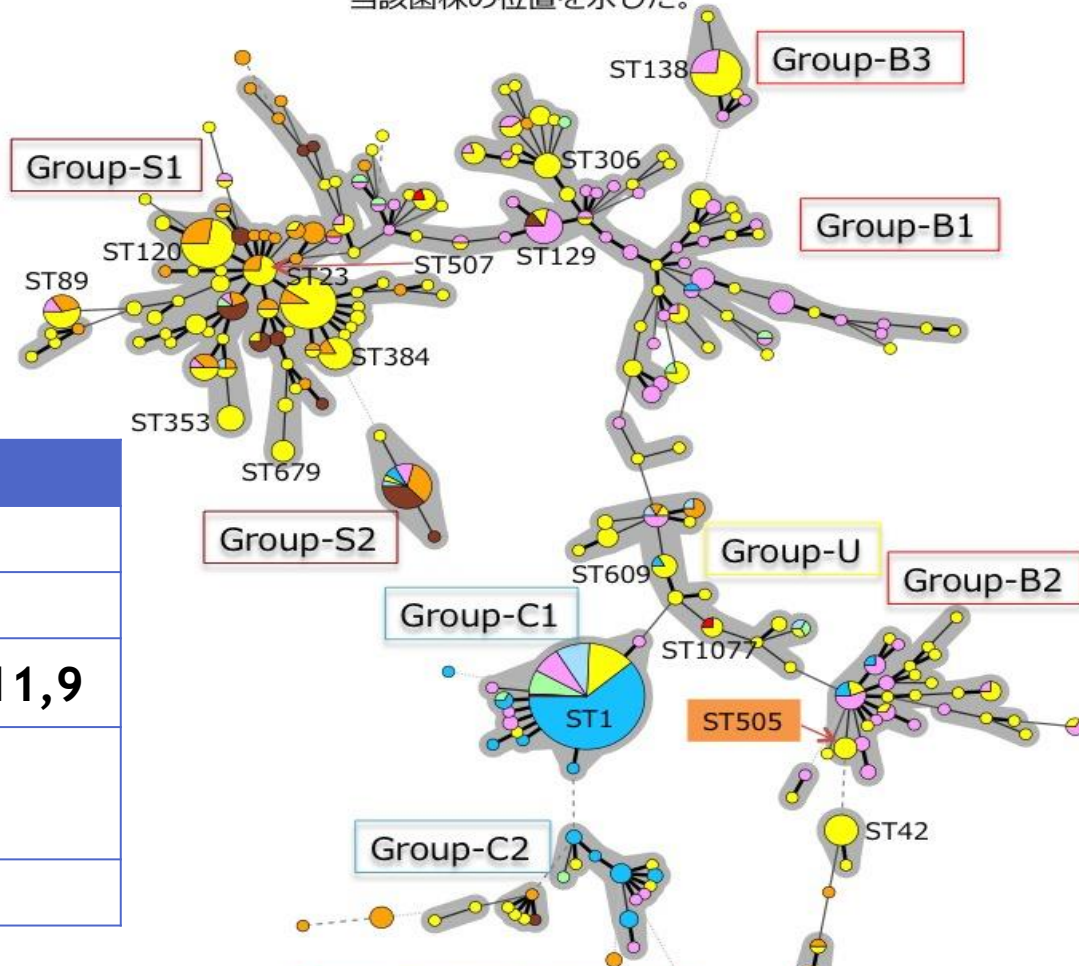
尿中抗原検査では検出できない血清群や菌種

感染研による ST結果報告

菌株番号	LG2634
感染研受付番号	NIIB3490
血清群	1
遺伝子型	7,6,17,3,11,11,9
シーケンス タイプ (ST)	ST505 †
遺伝子型グループ*	B2

L. pneumophila 血清群1 (751株) の minimum spanning tree 図

当該菌株の位置を示した。



株数	株数	株数	株数
354	臨床分離株		
128	浴槽水		
110	冷却塔水		
82	水溜り		
37	土壌		
19	シャワー		
18	噴水		
3	給湯水		

環境分離株

Group-B	Group-C	Group-S	Others
112	22	134	86
87	19	9	13
4	100	3	3
4	0	49	29
4	0	32	1
4	12	1	2
0	13	2	3
1	1	0	1

培養法と遺伝子検査（LAMP法）

期間	2012年11月～2015年11月		
検体数	72		
患者	67		

	検体数	陽性数	(%)
遺伝子検査（LAMP法）	64	27	42.2
培養法	65	24	36.9

		培養法		
		陽性	陰性	計
遺伝子検査 （LAMP法）	陽性	18	7	25
	陰性	2	29	31
計		20	36	56

51.8%は培養も遺伝子検査も陰性

一致率
83.9%

喀痰の質は？
検査までの日数は？

SBT(Sequence Based Typing)

配列解読 遺伝子数	培養検査						遺伝子検査			
	陽性		陰性		未実施		陽性		陰性	
	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)	検体数	(%)
7遺伝子	10	43.5	5	16.1	0	0.0	11	40.8	0	
6遺伝子	4	17.4	0	0.0	0	0.0	4	14.8	0	
5遺伝子	2	8.7	2	6.5	0	0.0	2	7.4	1	3.4
4遺伝子	1	4.3	0	0.0	1	3.2	2	7.4	0	
3遺伝子	2	8.7	2	6.5	0	0.0	2	7.4	1	3.4
2遺伝子	1	4.3	3	9.7	0	0.0	2	7.4	3	10.3
1遺伝子	3	13.0	9	29.0	0	0.0	2	7.4	10	34.5
0遺伝子	0	0.0	10	32.3	6	19.4	2	7.4	14	48.3
計	23	100.0	31	100.0	7	22.6	27	100.0	29	100.0

培養陰性検体でSTが同定された事例

患者	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
1	new	6	10	19	10	29	4	6
2	120	2	3	5	11	2	1	6
3	505	7	6	17	3	11	11	9
4	1798	7	10	17	10	13	4	11
5	502	6	10	19	3	19	4	6

(患者5は利用浴用施設から菌株が分離されたが、SBTは一致せず。浴用施設からはST1が分離)

分離菌による診断例

	分離菌	性別	年齢	備考
1	<i>L. micdadii</i>	男	56	情報なし
2	<i>L. pneumophila</i> SG1/SG4	男	81	
3	<i>L. pneumophila</i> SG3	男	53	建設作業員
4	<i>L. pneumophila</i> SG2	不明	不明	不明
5	<i>L. pneumophila</i> SG1	男	78	無職/複数の浴用施設を利用

No.2の分離菌

菌株No.	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>momps</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
LG47_SG4	392	3	13	1	6	14	9	11
LG49_SG4	643	6	10	17	28	9	4	11
LG51_SG1	278	6	10	15	28	4	14	11

複数の浴用施設を利用し、
それぞれの施設に由来する
*Legionella*属菌が分離された感染症事例

No.5事例で搬入された分離菌



菌株由来	株数	搬入された純培養 <i>Legionella</i> 属菌血清型内訳		
患者喀痰(2回分)	20	<i>L. p</i> SG1 (20株)		
A男子浴槽	6	<i>L. p</i> SG1 (1株)	<i>L. p</i> SG4 (2株)	<i>L. dumoffii</i> 1株
A男子露天風呂	4	<i>L. p</i> SG1 (2株)	<i>L. P</i> SG4 (1株)	<i>L. dumoffii</i> 1株
B男子浴槽水	5	<i>L. p</i> SG1 (2株)	<i>L.p</i> SG9 (3株)	
C館浴用水	0			

L. p:*Legionella pneumophila*



富山県衛生研究所

まとめ



喀痰のレジオネラ属菌検査において、他の細菌を抑制することが検出率を上げるポイントである。



尿中抗原検査では診断できない血清型や菌種が原因となった肺炎もあり、培養の結果で診断することができた。



喀痰からレジオネラ属菌のDNAを抽出して、STを決定することができる場合もある



分離されたレジオネラ属菌により、2か所の異なる施設で感染したことが強く疑われた事例があった。



感染機序など解明されていないことが多いレジオネラ属菌について、臨床検体由来株が分離されることが望ましい。

喀痰（臨床検体）の確保が重要である