

レジオネラ属菌検査の注意点

～環境検体において検出率を向上するためにできること～

長野県環境保全研究所 感染症部

主旨

- 感染症や食中毒の検査について、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」や、各種文献を参考にしながら当所で作成した検査実施標準作業書（SOP）に沿って実施している。しかし、マニュアル等に記載されていない、培地への菌液塗布方法等による検出率のばらつきが生じることが考えられる。
- 今回は、手技による影響を受けやすいと考えられる「レジオネラ属菌」について培地塗布の強さ及び塗布時間について検証を行うこととし、その数値を具体化することで、検出率のばらつきを小さくし、技術の伝承を容易にすることを目的として検証を行ったので報告する。

検証内容

1 検査手技による影響

- (1) 検体塗布時の強さによる検出菌数の比較
- (2) 培地塗布時間による検出菌数の比較
- (3) 塗布の強さを変化させ、菌液が培地に完全に吸収するまで塗布したときの検出菌数の比較

2 技術の伝承

レジオネラ属菌検査未経験者 3 名による検証

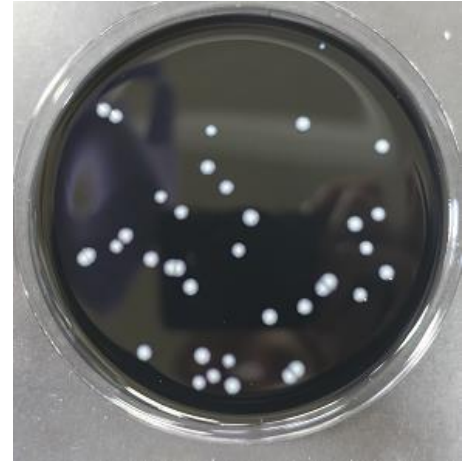
統計の検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

※すべての検証において事前にクリーンベンチで培地を5分間乾燥させた。₃

試供菌株

レジオネラ属菌標準株

L. pneumophila SG1 (ATCC33152)



使用器具等

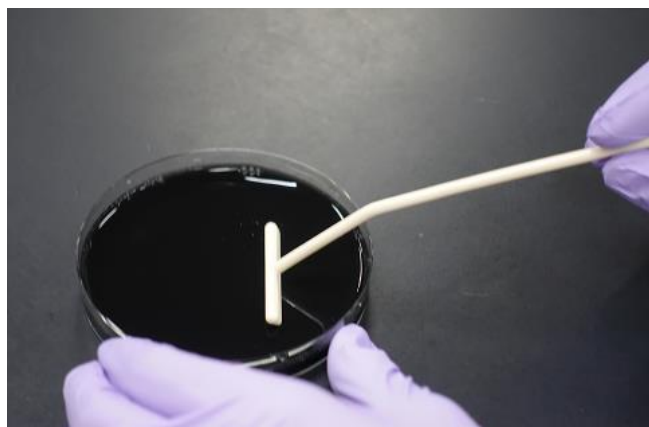
- ・レジオネラGVPC寒天生培地（関東化学）
- ・吸引ろ過器（柴田科学）
- ・コンラージ棒（日水製薬）
- ・白金耳10 μ L（アズワン）
- ・電子天秤（メトラー）
- ・50mL遠沈管（labcon）
- ・ポリカーボネートタイプメンブレンフィルター
孔径0.20 μ m 寸法47 ϕ mm（ADVANTEC）

1 検査手技による検証

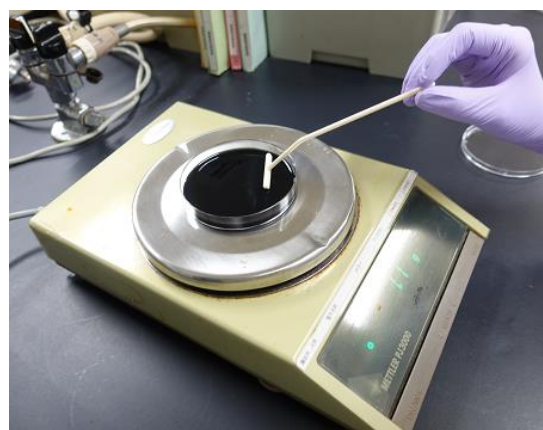
(1) 検体塗布時の強さによる検出菌数の比較

<方法>

- ① 試供菌液100 μ LをGVPC寒天生培地に添加。
- ② 電子天秤の上に培地を置き、重さを確認しながら1g、10g、30g、50g、100gの5段階の条件で塗布した（時間は10秒で統一し同じ操作を5回繰り返した）。
- ③ 菌液が培地に吸収されるまで室温放置し、恒温器で $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、7日間培養後、検出菌数を測定した。



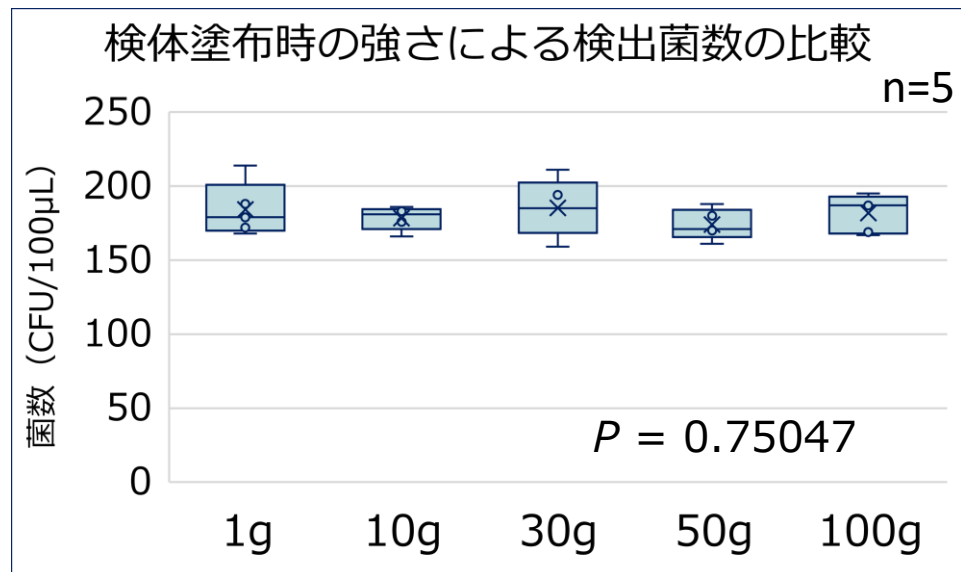
通常の塗り方



電子天秤を用いた塗り方

1 検査手技による検証

結果



塗布時の強さを変化させても有意差は認められなかった



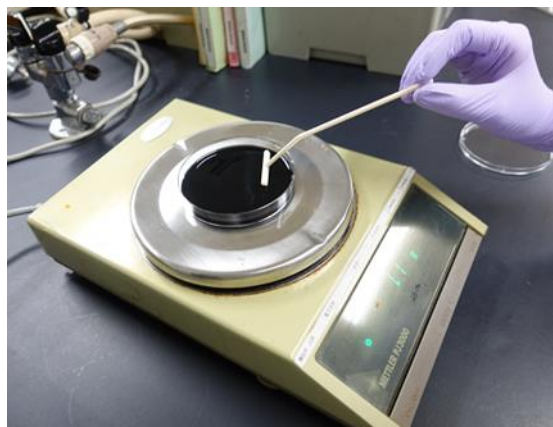
培地に菌液が吸収されやすくなるような手技等が
検出される菌数に影響を及ぼす可能性がある？

1 検査手技による検証

(2) 培地塗布時間による検出菌数の比較

<方法>

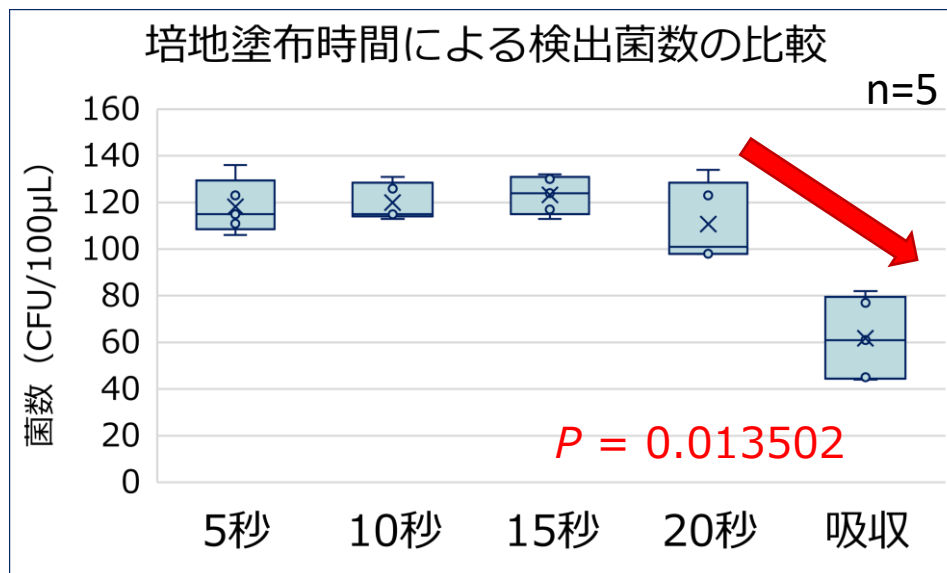
- ① 試供菌液100 μ LをGVPC寒天生培地に添加。
- ② 電子天秤の上に培地を置き、タイマーを用いて時間を測りながら、5秒、10秒、15秒、20秒、菌液が培地に完全に吸収されるまでの5段階の条件で塗布した（塗布の強さは10gで統一し同じ操作を5回繰り返した）。
- ③ 菌液が培地に吸収されるまで室温放置し、恒温器で36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C、7日間培養後、検出菌数を計測した。



【培地塗布時間の条件】
5秒、10秒、15秒、20秒、
培地に菌液が完全に吸収
されるまで

1 検査手技による検証

結果



吸収：培地に菌液が完全に吸収されるまで（平均29.4秒）

- ・ 塗布時間の長さにより、検出菌数に有意差が認められた。
- ・ 培地に菌液が完全に吸収されるまで（29.4秒）塗布すると、著しく菌数が減少した。



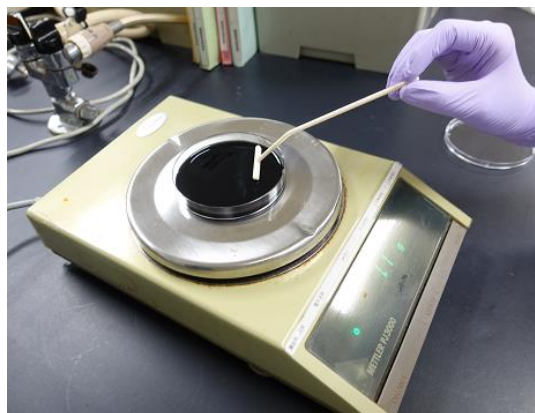
培地塗布は菌液が乾かない程度に塗布することで菌数の減少を防ぐことが出来ると考えられる

1 検査手技による検証

(3) 塗布の強さを変化させ、菌液が培地に完全に吸収するまで塗布したときの検出菌数の比較

<方法>

- ① 試供菌液100 μ LをGVPC寒天生培地に添加。
- ② 電子天秤の上に培地を置き、重さを確認しながら、1g、10g、30g、50g、100gの5段階の条件で、菌液が培地に完全に吸収するまで塗布した。（同じ操作を5回繰り返す。）
- ③ 恒温器で36 \pm 1 $^{\circ}$ C、7日間培養後、検出菌数を測定した。



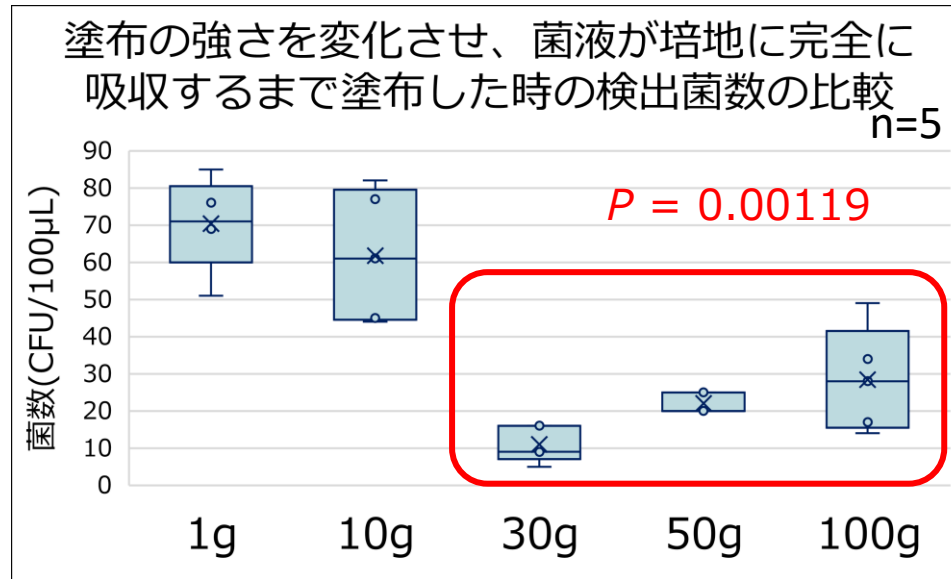
【培地塗布時間の条件】
培地に菌液が完全に吸収されるまで



【培地塗布時の強さの条件】
1g、10g、30g、50g、100g

1 検査手技による検証

結果



塗布の強さを変化させ、菌液を完全に吸収するまで塗布したとき、検出菌数に有意差が認められた。特に、塗布時の強さ30g以上では、菌数が著しく減少した。



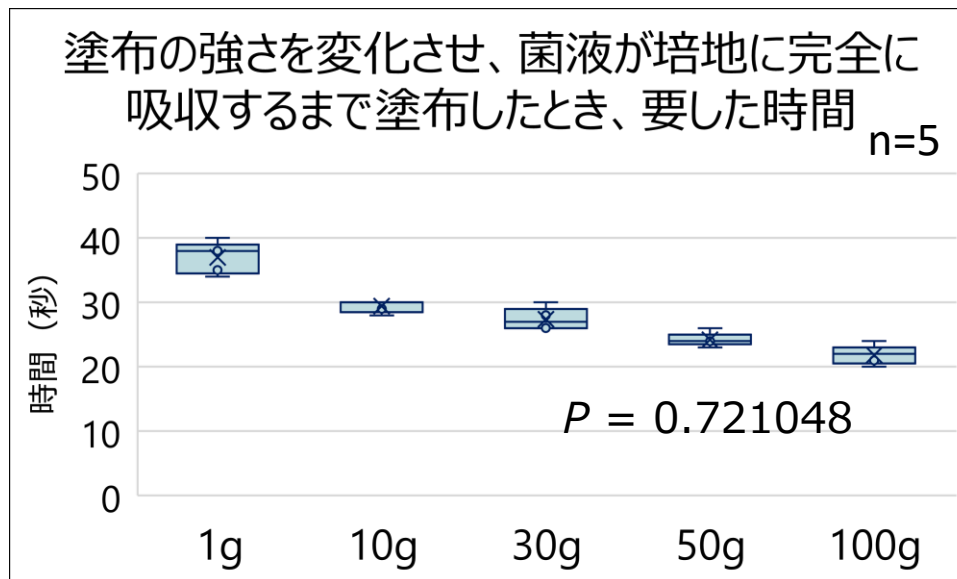
培地に菌液を完全に吸収させた場合、塗布の強さが検出率に影響を及ぼす可能性がある



力加減を強くし、培地に菌液を吸収させるように塗布するとより菌数が減少する可能性がある

1 検査手技による検証

結果



塗布の強さを変化させ、菌液を完全に吸収するまで塗布したとき、要した時間に有意差は認められなかった。

1 検査手技による検証

～まとめ～

n=5

検証項目	統一した条件	変化させた条件	菌数への影響
(1) 塗布の強さ	・ 培地：GVPC寒天生培地（市販品） ・ 培地乾燥時間：クリーンハンフ5分 ・ 塗布時間：10秒	塗布の強さ 1g、10g、30g、50g、 100g	なし
(2) 塗布時間	・ 培地：GVPC寒天生培地（市販品） ・ 培地乾燥時間：クリーンハンフ5分 ・ 塗布の強さ：10g	塗布の時間 5秒、10秒、15秒、20秒、 菌液が完全吸収されるまで	完全に吸収されるまで塗布したとき菌数減少
(3) 塗布の強さ+塗布の時間	・ 培地：GVPC寒天生培地（市販品） ・ 培地乾燥時間：クリーンハンフ5分 ・ 塗布時間：菌液が完全吸収されるまで	塗布の強さ 1g、10g、30g、50g、 100g	30g以上の強さで塗布したとき菌数減少

- ◆ 検体を塗布する際は菌液が乾かない程度に塗布することで検出率の向上が期待できる。
- ◆ 塗布の強さによる影響は無かったが、培地の吸収具合を考慮し、優しく(10g以下)塗布することで菌数の減少を防ぐことにつながる。

レジオネラ属菌検査未経験者による検証

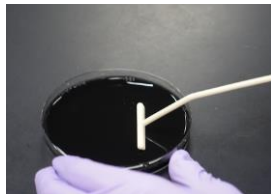
検査手技による影響の検証から得られた結果について、
レジオネラ属菌検査未経験者3名に対して、段階的に検査手
技の条件を細かく指示することによる検出菌数の比較を行った。

条件A：何も指定せず塗布

条件B：当所で使用しているSOPの菌液塗布に関する部分のみ閲読
後塗布

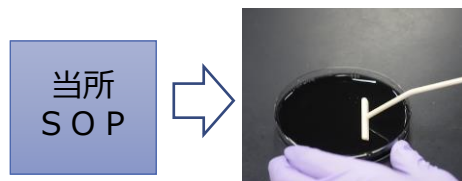
条件C：前述の検査手技による検証で得られた方法（塗布の強さ
10g程度、時間は吸収しない程度、目安として15秒以内）
を反映させた条件で塗布

条件A



塗り方を指示せず
培地塗布

条件B



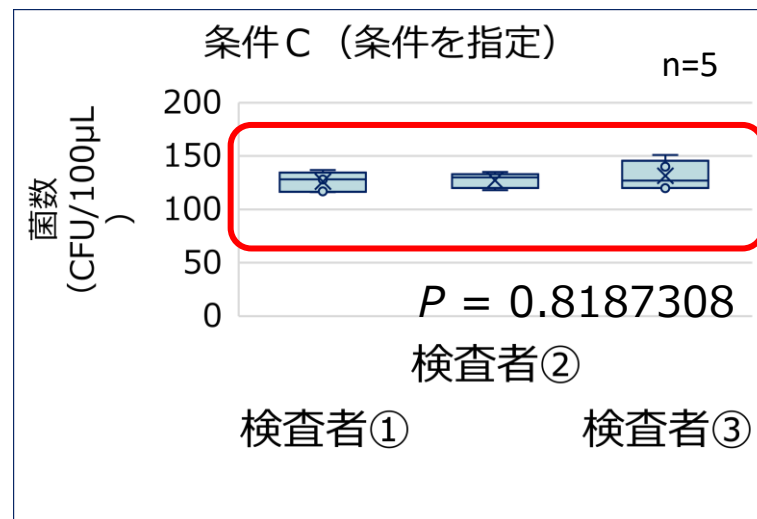
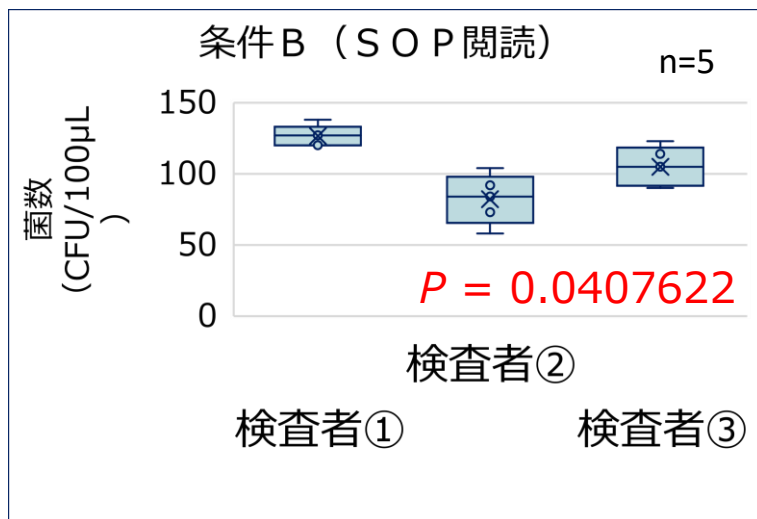
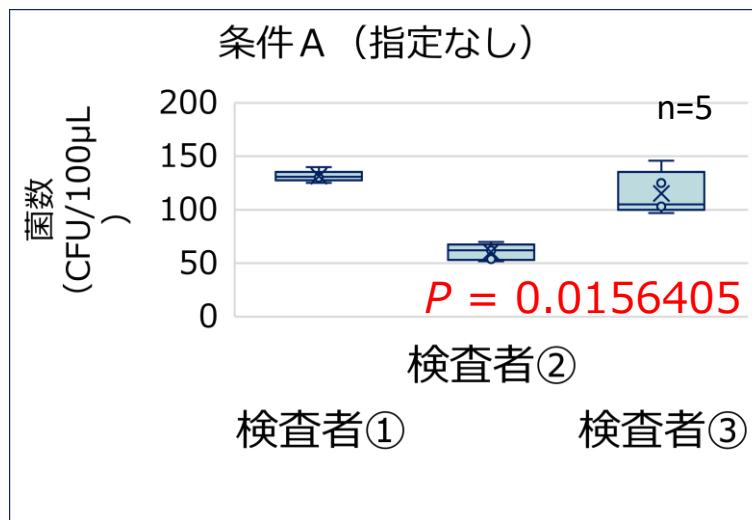
当所SOPを読んで培地塗布

条件C



塗布の方法を細かく説明し、
練習したうえで培地塗布

結果



条件A及びBでは、検査者間の結果に有意差が認められたが、条件Cでは、有意差が認められなかった。

レジオネラ属菌検査未経験者による検証

～まとめ～

- 培地塗布の方法を指定しない場合（条件A）、検査者によって塗布の方法は様々であることがわかった
- 条件C < 条件B < 条件Aの順で検出率のばらつきが小さくなった



- ◆ 細かな条件を揃えることで、検査者による検査結果の**ばらつきが小さくなる**ことがわかった。
- ◆ 細かな検査手技に関する説明をSOPなどに記載し、周知することで、**検査精度を向上させ、人材育成にもつながる**と考えられる。

考察

- レジオネラ属菌（環境検体）の検査では、培地への塗布方法等細かな検査手技により、ばらつきが生じることがわかった。
- マニュアル等に記載されていない箇所について、どのような検査条件を用いることが最適か考え、検証することで検出率を向上させることができると考えられる。
- レジオネラ属菌の検査だけでなく、細菌検査において、細かな検査手法や条件について検査者間で共有することは、検査精度の向上、維持に有効であり人材育成にもつながると考えられた。