

## レジオネラGVPC寒天培地 (GVPC)

*Legionella* GVPC agar (GVPC)

レジオネラの選択分離

### 用途

レジオネラGVPC寒天培地は、標準法T90-431(6)およびISO11731(7)に準拠し、水環境中の*Legionella*の菌数測定用に開発された培地です(臨床検体の*Legionella*検出にも使用します)。

特にヒトの感染症の原因となる多くの*Legionella*：*Legionella pneumophila*(ポンティアック熱の原因菌：分離頻度が最も多い)、*L. bozemanii*、*L. longbeachae*、*L. dumoffii*、*L. jordanis*、*L. gormanii*、*L. anisa*、*L. micdadei*などが検出可能です(2,8)。

臨床分野では、*Legionella*症の診断は臨床症状、放射線診断結果および他の検出法(培養、尿中抗原、免疫蛍光法等)に基づき行います(9)。

### 原理

活性炭が酵母エキスに含まれる生育阻害因子を吸着し、*Legionella*の発育が促進されます。

ACES緩衝液により、培地は*Legionella*の発育に至適のpH6.9に保たれます。

グラム陽性菌、一部のグラム陰性菌、酵母やカビの発育は3種類の抗生物質により阻害されます。

### キット構成

	<b>調製済み培地</b>
REF43031	平板培地(90mm)10枚×2パック
GVPC*	

\*各シャーレに印字

### 組成

酵母エキス	10g
活性炭	2g
ACES/KOH 緩衝液(pH調整剤)	12.8g
ケトグルタル酸塩	1g
寒天	16g
L-システイン塩酸塩	0.4g
ピロリン酸鉄	0.25g
グリシン(アンモニウム非含有)	3g
硫酸ポリミキシンB	80000UI
バンコマイシン	0.001g
シクロヘキシミド	0.08g
精製水	1L
pH 6.9	

### 必要な機材

- 大気環境調整装置
- ジャー
- ふ卵器

### 使用上の注意

- *in vitro*試験、微生物試験にのみご使用下さい。
- 熟練者のみご使用下さい
- 全ての検体、培養物および検体を接種した製品は感染性があるものとして適切にお取り扱い下さい。被検菌の無菌操作および通常操作の留意事項は以下のガイドラインをご参照下さい。“NCCLS M-29A, Protection of

Laboratory Workers from instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, Approved Guideline – Current Revision” 操作留意事項 “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Latest edition”または各国の最新のガイドラインに従って下さい。

- 本培地を製造原料として使用しないで下さい。
- 有効期限切れの製品は使用しないで下さい。
- 包装が破損している製品は使用しないで下さい。
- コンタミネーションの起きている、または水分が浸出している培地は使用しないで下さい。
- 培地表面が乾燥していたり、培地の厚さが極度に薄い場合、*Legionella*の生育が抑制される可能性があるため使用しないで下さい。
- シャーレに分注された培地量は、標準法 T90-431で推奨されている、厚さ5mmを保証する量です。袋を開封せずに2-8℃で保存した場合、有効期限までこの厚さと性能が保たれることが確認されています。
- 試験結果の判定の際には、患者の履歴、検体の由来、コロニー形態や検鏡結果、および必要に応じて行った他の試験結果を考慮に入れて下さい。
- *Legionella*は高齢・免疫機能の低下などリスクを負っている場合には特に重篤な症状を引き起こします。
- 性能に示された結果は取扱説明書に記載された方法に従って得られたものです。操作方法を変更すると結果に影響を及ぼすことがあります。

### 貯蔵条件

- 箱未開封の状態、2-8℃下で有効期限まで保管可能です。
- 箱開封後、セロファン袋未開封の状態では、2-8℃下では2週間、室温では1週間保管可能です。

### 検体

#### 水の検査:

標準法をご参照下さい。

#### 臨床分野での使用:

呼吸器官由来の検体を直接あるいは遠心後に培地へ接種します。

菌叢が多様な場合には、酸処理(0.2M HCl)後中和(0.01M NaCl)や加熱(50℃ 30分)処理を施すことが推奨されています(1,8)。

### 使用法

#### 水の検査:

1. 培地を室温に戻します。
2. 通常、検体を直接接種するときは、本培地2枚に処理前の水(原液およびPBS緩衝液で1/10に希釈したものを)0.2mlずつを塗抹することをお勧めします。水を処理した後は、以下のように培地へ接種します。
  - 濾過濃縮した検体を一枚へ
  - 酸処理した濃縮検体を一枚へ
  - 熱処理した濃縮検体を一枚へ
 使用する培地の数、方法、接種量はそれぞれの標準法に従って下さい。

3. 接種後、フタを下にし、好気条件もしくはCO<sub>2</sub>高分圧条件下にて37 ±1 で10日間培養して下さい。通常、培養開始後3、5、10日目に培地を確認します。

#### 臨床分野での使用:

1. 培地を室温に戻します。
2. 検体を接種します。
3. 好気かつCO<sub>2</sub>高分圧条件下に培地を設置します(必要であれば大気環境調整装置などをご使用下さい)。
4. フタを下にして37 で培養します。  
用途に応じて、最新の標準法に従い適切な温度で培養して下さい。  
培養時間は検体の種類および被検菌により異なります。通常、培養開始後3～5日後に培地を確認します。陰性の場合、培養時間を10日目まで延長して下さい(2)。

#### 注意:

3日間培養後、*Legionella pneumophila* は好気条件下では小さいコロニーを、CO<sub>2</sub>高分圧条件下ではより大きなコロニーを形成します。

#### 判定

- 培養後、菌の発育を確認します。
- 特徴的なコロニー(通常灰青色ですが、培養時間が長くなると灰白色になります)を確認します。コロニー周縁は通常ピンクがかっており、双眼顕微鏡で観察するとすりガラス状に見えます(6)。

#### 水の検査:

結果の判定、菌数測定およびコロニーの同定は、標準法に従って行って下さい。

#### 臨床分野での使用:

分離された微生物は、追加試験、特に免疫学的試験等を用いて同定して下さい(8)。

#### 品質管理

GVPC寒天培地は品質に対する厳格な要求に充分耐えうるよう開発されています。試験に用いた菌株は標準法T90-461(11)で推奨されているものです。ロットごとの品質管理における菌株試験結果は試験成績書に記載されています(ご要望により提供致します)。

#### プロトコール:

培地の栄養性能は以下の菌株を用いて試験して下さい。

- *Legionella pneumophila* ATCC33152
- *Enterococcus faecalis* CIP106877

#### 精度管理限界値:

使用菌株	33-37°Cでの試験結果
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152	5日間で発育 灰色のコロニー*
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP106877	5日間で一部または完全に 発育阻害

\*菌数を管理する場合、リファレンスと比較して回収率66%以上でないといけません。

#### 注意:

用途および参照する規則(頻度、菌株の数、培養温度)を考慮に入れ品質管理を実施して下さい。

#### 留意事項

- *Pseudomonas*、腸内細菌あるいは酵母の一部の菌株は本培地上で発育しますが、特徴的なコロニーは形成しません。
- 各種要求性および抗生物質に対する感受性により、*Legionella* の一部の菌株は本培地に発育しないことがあります。

#### 性能

##### 水の検査:

本培地の性能は標準法NF T90-431およびISO 11731に基づき、自然汚染された水を用いて2つの外部検査機関により評価されました。

**最初の評価**(10)は267の検体(家庭用の熱水、冷却塔、冷却システムおよび温水)を用い行われました。本培地と市販されている他の2種類のGVPC生培地とで比較が行われました。

126の検体が、3種類の培地のうち少なくとも1種類で陽性となりました(*Legionella pneumophila* あるいは他の*Legionella* が存在)。

##### Legionella 回収試験:

	GVPC ref. 43031	GVPC no.1	GVPC no.2
陽性検体数	114 / 126	108 / 126	110 / 126

菌数測定結果:3種類の培地間で一致。

選択性:培地上に他の菌叢が確認された検体数は以下の通り。

	GVPC ref. 43031	GVPC no.1	GVPC no.2
検体数	70 / 267	93 / 267	86 / 267

**2段階目の評価**(10)は104の水検体を用いて行われました。本培地と市販されている他のGVPC生培地とで比較が行われました。

##### Legionella 回収試験:

	GVPC Ref. 43031	他の GVPC
陽性検体数 ( <i>Legionella</i> spp)	55	52

菌数測定結果:2種類の培地間で一致。

#### 臨床分野での使用:

本培地(ref. 43031)と他のGVPC生培地とで比較が行われました。由来が様々な154の検体(気管支肺胞液、気管支・気管吸引物、喀痰、胃挿管)がテストされました。検体は前処理したもの、あるいは未処理のものを培地上に直接接種しました。37、CO<sub>2</sub>高分圧下で培養開始後3、5、10日間後に性能が評価されました。

**培地の栄養性能およびLegionellaの検出感度:**

検査した154検体のうち、15検体が2種類の培地のうち少なくとも1方でLegionella陽性となりました(同定確認済み)。

陽性の 検体数	いずれか で陽性	GVPC ref. 43031	他 の GVPC
3 d	10	8	7
5 d	15	13	11
10 d	15	13	11

菌数測定結果: 2種類の培地間で一致。

選択性: 培地上に他の菌叢が確認されたサンプル数は以下の通り。

	いずれか で陽性	GVPC ref. 43031	他 の GVPC
3 d	100	77	98
5 d	114	89	113
10 d	116	90	116

**廃棄処理**

未使用の試薬は危険性のない廃棄物として廃棄して下さい。

使用済み試薬の廃棄は他の汚染した廃棄材料と同様、感染性もしくは感染の危険のある製品の取り扱い方法に従って行って下さい。

起こりうる危険を適切に考慮の上、各検査室の責任の元、廃棄産物や流出物はそれぞれの危害毒性や度合いを考慮し、地域の適切な規制に従って廃棄して下さい。

**参考文献**

- PASCULLE W.- Update on *Legionella* - *Clinical microbiology Newsletter*, July 1, 2000, vol. 22, p. 13, 33-41.
- REYROLLE M., JARRAUD S., FRENEY J. et al. - Evaluation of a new GVPC medium for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. - Centre National de Référence des Legionelles, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.
- SQUINAZI F., NAHAPETIAN K. - *Legionella pneumophila* méthodes de recherche chez l'homme et dans l'environnement - *Revue française des laboratoires*, avril 1988, n° 172, p. 97-101.
- Circulaire DGS N° 97/311 du 24 avril 1997, relative à la surveillance et à la prévention des Légionelloses.
- Circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998, relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux Legionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public.
- Norme NF T90-431 (nov. 93) - Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila* (novembre 1993) - Méthode générale par ensemencement direct et filtration sur membrane.

- Norme ISO 11731 (1998/05/01) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella*.
- JARRAUD S. / REYROLLE M. / ETIENNE J. - Diagnostic des Légionelloses. - *Revue Française Des Laboratoires*, 1999, n°312, p. 119-124.
- JARRAUD.S., GIRARDO.P., et al - Les Légionelloses - Supplément au n°339, *Revue Française des Laboratoires*, Janvier 2002.
- Poster EWGLI - 19th annual meeting - Chamonix 2004 "Evaluation of a new GVPC medium for the detection of *Legionella* in environmental samples" - M.Reyrolle - J.Andre - P.Chambon - S.Jarraud - J.Freney - J.Etienne.
- Norme NF T90-461 (juillet 2001) - Contrôle qualité des milieux de culture.

**記号**

記号	内容
REF	品番
	製造元
	保管温度
	有効期限
LOT	ロット番号
	使用手順を参照
	試験可能数

(問い合わせ先)

製品関連

シスメックス株式会社 CSセンター

臨床(病院、臨床検査センターなど) TEL: 0120-265-034

産業(企業、保健所など) TEL: 0120-022-328

注文・納期・在庫関連

シスメックス・ビオメリュー株式会社

TEL: 03-6834-2666(代表)



シスメックス・ビオメリュー株式会社

東京都品川区大崎一丁目2番2号

大崎セントラルタワー8階



69280 Marcy-l'Etoile/France

Tel.33(0)4 78 87 20 00 /

Fax133(0)4 78 87 20 90

http://www.biomerieux.com

