

令和 8 年度外部精度管理事業
課題 1 レジオネラ属菌の遺伝子検査
実施手順書

- 1) 検体はレジオネラ属菌等から抽出した DNA を乾燥させたものです。到着後、検体記号がチューブの側面に記載されていることを確認してください。検体受け取り後、溶解を行うまでは 4°C にて保管してください。
- 2) 各チューブのスピンダウンを行ってから、100 μ L の Nuclease-free water を加え、室温で 10 分間静置したのち、Vortex 30 秒間→スピンダウン→Vortex 30 秒間→スピンダウンと操作して、乾燥物を完全に溶解させてください。溶解後は速やかに検査を実施してください。検査後の残液は短期（1 週間程度）であれば 4°C、長期であれば -20°C 以下で保管してください。レジオネラ属菌の PCR 検査において、上記溶解液を 1 反応当たり、0.2 μ L 程度使えば十分なシグナルが得られる想定です。（例えば、SOP 上で DNA を 2 μ L 使用する、としている施設の場合には、10 倍程度希釈してご使用ください。）
- 1) 溶解後の検体について、各施設の SOP 等に基づいて、①まず、検体がレジオネラ属菌に該当するか否か PCR 検査等を実施して判定し、②判定結果がレジオネラ属菌であった場合には、さらにそれが *Legionella pneumophila* であるか否か検査を実施して判定してください。ただし、①と②を同時に行っても構いません。（参考：病原体検出マニュアル「レジオネラ症」）
- 2) *L. pneumophila* と判定された検体については、*L. pneumophila* 血清群の同定を行なってください（この検査については、参考結果としてご報告いただき、評価対象にはなりません）。
- 3) 検査終了後、本手順書【各検体の結果入力項目】の内容（各検体の入力項目、アンケート調査項目）を外部精度管理事業結果入力専用ウェブサイトに入力してください。（「受領連絡」を行うと結果入力に進めます。入力の途中で一時保存可、のちに再開可能です）。
- 4) 評価対象となる必須項目は、レジオネラ属菌特異的遺伝子検査の結果及び *L. pneumophila* 特異的遺伝子検査の結果です。それぞれが陽性か陰性かを入力してください
- 5) 結果登録締切日（検体発送後約 3 週間、日付は検体発送時に通知、ホームページにも発表予定）までに結果の入力を完了し、必ず「確定」してください。期日前であれば「確定」していても修正可能ですが「確定」していないと登録とみなされません。
* 結果入力の確定が上記の締切日時に間に合わないと見込まれる場合は、かならず事前に事務局に連絡してください。連絡無しに検査結果が未確定や未入力の場合、参加辞退として処理されますのでご注意ください。
- 6) 必須事項の正確な入力も評価対象です。例年、結果の記入漏れ・検体記号の誤記などのある施設が散見されます。これらの不備があった場合は正解になりませんので、正確な入力にご留意ください。
- 7) 検査後の検体残液は成績報告書返送まで保管してください。試験のコントロールとして使用し

ていただいてもかまいません。

ご不明な点やトラブルなどがありましたら、下記にお問い合わせください。

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

外部精度管理事業事務局

TEL 03-5285-1111(内線 2301)

E-mail: eqa@nih.go.jp

各検体の結果入力項目

送付検体についてそれぞれ下記項目を括弧内の入力規則に従って記入してください。検体の順番は任意です。（設問 I. 及び II. が評価対象となります。III. は評価対象外です。）

<検体 1 > 検体記号（アルファベット 4 文字 [半角大文字]）： _____

- I. レジオネラ属菌遺伝子検査の結果（右の項目より選択） 【陽性・陰性】

- II. I. が陽性だった場合、*L. pneumophila* 遺伝子検査の結果（右の項目より選択）【陽性・陰性】

- III. II. が陽性だった場合、マルチプレックス PCR による *L. pneumophila* 血清群の同定を実施し、血清群を下記より選んでください。
【1・2・3/15・4/10・5・6/12・7・8・9・11・13・14・UT・その他（具体的に）】

<検体 2 ～> 検体記号（アルファベット 4 文字 [半角大文字]）： _____

以下、検体 1 と同様に回答してください

アンケート調査項目

以下の回答はトラブルシューティングに活用されます。

■ 遺伝子検査について

- レジオネラ属菌特異的遺伝子検出プライマー等
用いたプライマー名等を以下の選択肢から選んでください
 - LEG 448A と LEG 854B
 - 5S rRNA Forward (5-29)と 5S rRNA Reverse (91-112)
 - CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit
 - Loopamp レジオネラ検出試薬キット C
 - Loopamp レジオネラ検出試薬キット E
 - その他（特記事項に記載）
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- *Legionella pneumophila* 特異的遺伝子検出プライマー等
用いたプライマー名等を以下の選択肢から選んでください
 - Lmip L920 と Lmip R1548
 - mip Forward (948-965)と mip Reverse (1092-1115)
 - その他（特記事項に記載）
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- 使用した PCR キットを以下の選択肢から選んでください
 - TaKaRa Ex Taq (Hot Start Version 含む)
 - EmeraldAmp Max PCR Master Mix (Takara Bio)
 - TOYOBO KOD シリーズ（製品名は特記事項に記載）
 - Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO)
 - ニッポンジーン（FastGene 等）（製品名は特記事項に記載）
 - QIAGEN（製品名は特記事項に記載）
 - Thermo Fisher Scientific（製品名は特記事項に記載）
 - その他（メーカー・製品名を特記事項に記載）
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- 泳動に使用したサイズマーカーを以下の選択肢から選んでください
 - ニッポンジーン Gene Ladder（100 / Wide / Fast 等）（製品名は特記事項に記載）
 - ニッポンジーン OneSTEP Ladder（50/100 等）（製品名は特記事項に記載）
 - Takara 100 bp DNA Ladder
 - FastGene 100 bp DNA Ladder PLUS（100-1000 bp）（日本ジェネティクス）
 - 100 bp DNA Ladder One（ナカライテスク）
 - 100 bp DNA Ladder（TOYOBO）
 - その他（特記事項に記載）
特記事項(補足がある場合も記入してください)

■ マルチプレックス PCR による血清群同定検査について

- 使用したプライマーを以下の選択肢から選んでください
 - 病原体マニュアル「レジオネラ症」に記載のプライマーを自家調製
 - レジオネラ・レファレンスセンターから配布されたものを使用
 - (株) ファスマックから購入
 - その他 (特記事項に記載)
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- 使用した PCR キットを以下の選択肢から選んでください
 - Multiplex PCR Kit (Plus 含む、QIAGEN)
 - Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (Takara Bio)
 - Platinum Multiplex PCR MM (Thermo Fisher Scientific)
 - その他 (特記事項に記載)
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- 陽性コントロールを使用しましたか？
 - GenCheck *Legionella* SG control set ((株) ファスマック) を使用した
 - 使用しなかった
 - その他 (特記事項に記載)
特記事項(補足がある場合も記入してください)
- 泳動に使用したサイズマーカー
 - 遺伝子検出検査と同じ
 - その他 (特記事項に記載)
特記事項(補足がある場合も記入してください)

■ その他 ; 特記事項 (意見、コメント等、自由記載)