



「薬剤感受性試験の実施方法 について」

(ディスク拡散法)

農林水産省動物医薬品検査所



目次

I. 薬剤感受性試験

1. 薬剤感受性試験(ディスク法)のフローチャート

2. ディスク法の各論

別表1 供試薬剤一覧

別表2 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658における精度
管理用株の精度管理値

II. 精度管理用菌株の扱いについて

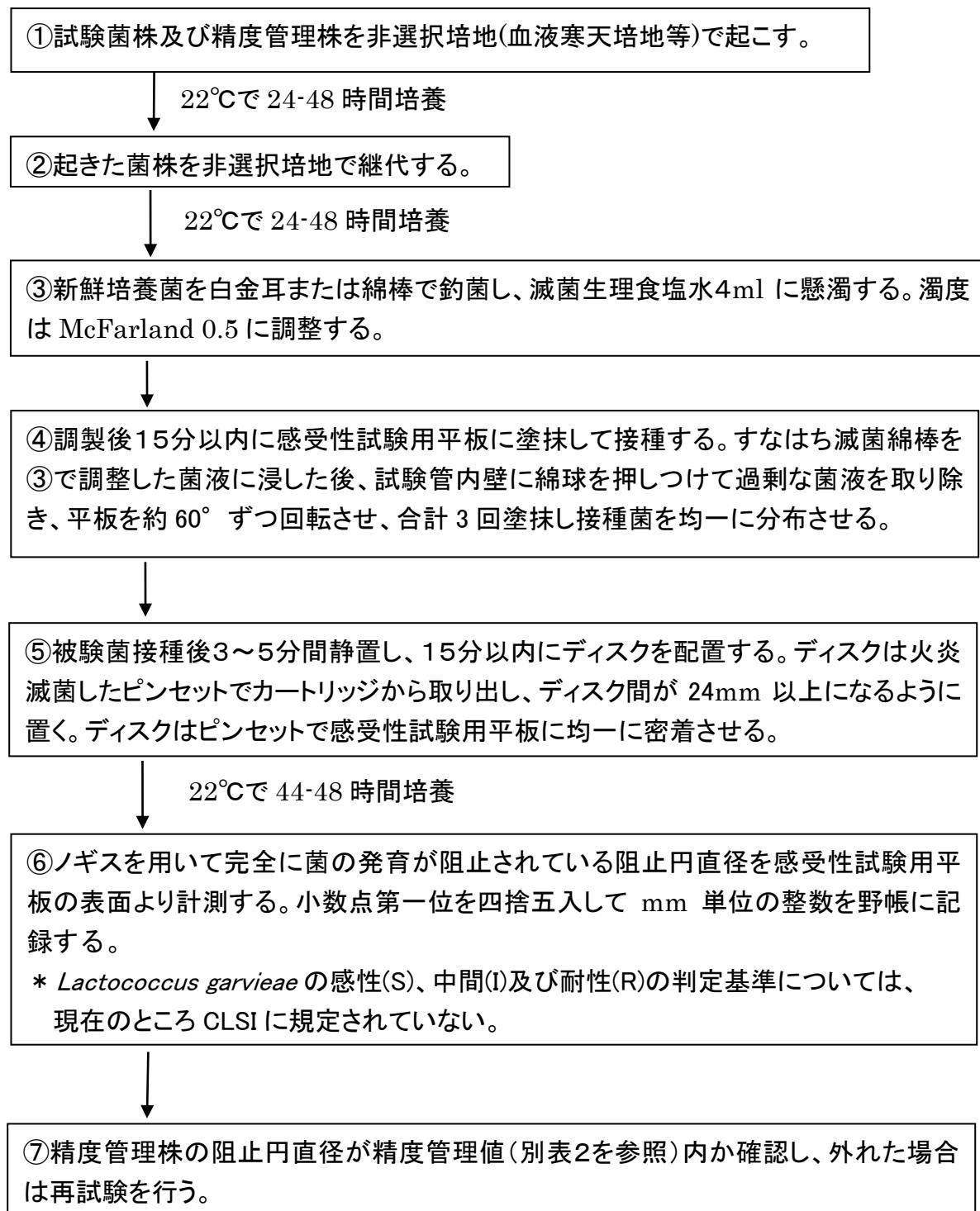
III. 薬剤感受性試験に用いる資材一覧

I. 薬剤感受性試験

1. 薬剤感受性試験(ディスク拡散法)のフローチャート

Lactococcus garvieae のディスク拡散法による薬剤感受性試験について大まかな手順を以下に示す。

1) *Lactococcus garvieae*



2. ディスク法の各論

1) 原理

毛細管現象により、寒天中の水分がディスクの濾紙に吸収され、ディスク中の薬剤が溶解する。溶解した薬剤は直下の培地に移行し、培地上の細菌に作用しながら拡散していく。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により阻止円が形成される。すなわち阻止円が小さければ、その薬剤に対する感受性が低いということになる。本法は Kirby-Bauer 法による拡散法を測定原理とし、CLSI に準拠した方法で実施している。

2) 感受性試験用培地

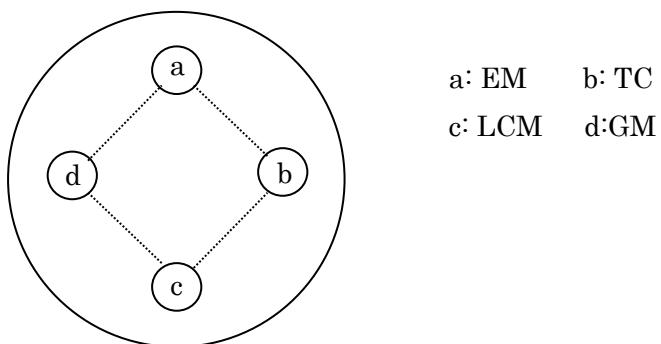
表面を乾かした 5%羊脱纖維血液加ミューラーヒントン寒天培地

(培地の厚み4mm、直径 90mm 丸シャーレに培地 20ml 分注)

3) 菌液の調製

培養した寒天培地上の被験菌を釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁する方法(直接法)により調製する。菌液濃度は McFarland 0.5($1\sim2\times10^8\text{CFU/mL}$)と同じ濁度に合わせる。

4) ディスクの配置



5) 試験にあたっての注意

- ① 感受性試験用培地の厚さは薬剤の拡散に影響を与えるため、4mm の均一な厚さに合わせること。
- ② 菌液の濃度と接種菌液量は結果に影響があるので、必ず濁度は McFarland 0.5 に合わせ、過剰な菌液を取り除き接種すること。
- ③ ディスクは密栓したままの状態で室温に戻した後に、開封し使用すること。
- ④ 均一に薬剤を拡散させるため、ディスクは感受性試験用培地上に密着させること。



6) 測定結果の記録及び注意点

完全に菌の発育が阻止されている阻止円の直径を平板の表側から測定する。小数点以下は四捨五入し、mm 整数を記録用紙に記録する。

～測定に関する注意点～

阻止円が二重の場合、内側を計測する。

阻止円内にコロニーが認められる場合は、誘導耐性または汚染菌の可能性が考えられる。

→全種類の薬剤の阻止円内にコロニーが認められる場合等は汚染菌の可能性が高いため再試験を実施する。また、特定の薬剤の阻止円内に数個のコロニーが認められる場合は、誘導耐性の可能性が考えられるので、阻止円直径を計測した上で「R」と追記する。

7) 使用上又は取り扱い上の注意

(1)取り扱い上(危険防止)の注意

- ① 操作は全て微生物の取り扱いに習熟した人の指導の下に、バイオハザード対策を実施した上で行うこと。
- ② 検体(被験菌)及び培養後の菌類は全て感染の危険があるものとして十分に注意して取り扱うこと。
- ③ 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- ④ 口によるピペットイングはしないこと。

(2)使用上の注意

- ①試薬は指定の貯蔵方法で保存すること
- ②使用期限を過ぎたディスクは使わないこと。
- ③ディスクは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④開封後のディスクは乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下に保存すること。開封後はなるべく早く(約2か月以内)使用すること。
- ⑤ディスクは輸送上及び保管上乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下の状態を維持すること。
- ⑥使用中のカートリッジは、カートリッジの入っているビンに戻さないこと。

(3)廃棄上の注意

- ①使用後の平板は、オートクレーブ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレーブを使用する場合は蒸気を吸い込まないように注意すること。
- ②検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1,000ppm 以上、1時間以上浸漬)又はグルタルアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)による消毒処理、あるいはオートクレーブ(121°C、20分間以上)による滅菌処理を行うこと。
- ③滅菌後のシャーレや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

別表1 供試薬剤一覧

Lactococcus garvieae

供試薬剤	略号	ディスク 略号	備考
Gentamicin (ゲンタマイシン)	GM	GM	人体兼用
Erythromycin (エリスロマイシン)	EM	EM	人体兼用
Lincomycin (リンコマイシン)	LCM	LCM	人体兼用
Tetracycline (テトラサイクリン)	TC	TC	人体専用

水産用医薬品として承認されている抗菌・抗生物質(水産用医薬品の使用について第30報)

有効成分分類	対象魚種	使用基準の範囲									
		すずき目魚類	にしん目魚類(海水中原種されているもの)	にしん目魚類(淡水中原種されているもの、あゆを除く)	うなぎ目魚類	こい目魚類	かれい目魚類	ふぐ目魚類	かじか目魚類	あゆ	くるまえび
抗菌	アモキシリソ	類結	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	安息香酸ビコザマイシン	類結	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	アンピシリン	類結	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	エリスロマイシン	レンサ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテラサイクリン	レンサ ビブリオ	×	×	×	×	レンサ	×	×	×	×
	塩酸オキシテラサイクリン	ビブリオ	ビブリオ	せっそう ビブリオ レンサ	バラコロ	×	レンサ	ビブリオ	×	×	×
	オキソリン酸	類結	せっそう ビブリオ	せっそう ビブリオ	ひれ赤病 赤点病 バラコロ	エロモナス	×	×	×	ビブリオ	×
	オキソリン酸(懸濁水性剤)	類結	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	オキソリン酸(薬浴剤)	×	×	×	バラコロ (うなぎのみ)	×	×	×	×	ビブリオ	×
	ジヨサマイシン	レンサ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
抗生	エンポン酸スピラマイシン	レンサ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	スルファモノメトキシン又は そのナトリウム塩	ビブリオ ノカルジア症	ビブリオ	せっそう ビブリオ	ひれ赤病	×	×	×	×	ビブリオ	×
	スルファモノメトキシンナトリウム (薬浴剤)	×	×	せっそう ビブリオ	×	×	×	×	×	×	×
	スルファモノメトキシン及びオル メトブリムの配合剤	×	×	×	バラコロ	×	×	×	×	ビブリオ	×
	チアンフェニコール	類結 ビブリオ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	塩酸ドキシサイクリン	レンサ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	フロルフェニコール	類結 レンサ	×	せっそう ビブリオ	バラコロ	×	×	×	×	ビブリオ	×
	塩酸リノコマイシン	レンサ	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ホスホマイシンカルシウム	類結 エドワジエラ症	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	スルフィソゾールナトリウム	類結(ぶりのみ) ビブリオ(ぶりのみ) ノカルジア症(ぶりのみ)	ビブリオ、冷水病 (にじますのみ)	×	カラムナリス (こいのみ)	×	×	×	ビブリオ 冷水病	×	×

別表 2 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658における精度管理用株の精度管理参考値(mm)

精度管理用 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 の阻止円直径が精度管理参考値内であることが試験成立条件です。

以下の参考値は、当所で試験を行った結果から設定した参考値ですので、検査室によって値が異なる可能性があります。精度管理参考値は、各検査室で精度管理用株を用いて適当な回数感受性試験を行い、その結果から適切な幅を見込んで設定してください。

精度管理用参考値(感受性試験用培地:MHA+5% sheep blood)

培養条件	薬剤 薬剤含有量	GM 10μg	EM 15μg	LCM 2μg	OTC* 30μg	TC 30μg
22°C 44-48 hours on MHA+5% sheep blood	精度管理 参考値 mm	19-26	17-24	≤6	NT**	28-35

* : オキシテトラサイクリン

** : NT は実施せず

〈補足〉

CLSI Vet03-Aにおいては、感受性試験用培地としてMHAを用いた場合の精度管理値が下記の表の通り設定されています。MHA 培地を別途用意できる場合は、その培地を用いて精度管理用菌株の培養を行い、下記の表の値を精度管理値として差し支えありません。ただし、その場合は、精度管理用菌株の確認にはなりますが、*L. garvieae* の感受性試験に用いる MHA+5% sheep blood の精度管理の確認はできないことにご留意ください。

CLSI Vet03-Aにおいて規定されている阻止円直径(感受性試験用培地:MHA)

培養条件	薬剤 薬剤含有量	GM 10μg	EM 15μg	LCM 2μg	OTC 30μg	TC 30μg
22°C 44-48 hours on MHA	精度管理値 mm	22-32	19-31	- ***	28-38	-

*** : - は CLSI において精度管理値を規定していない薬剤

II. 精度管理用菌株の扱いについて

CLSIに準拠した薬剤感受性試験には精度管理用菌株が必要です。精度管理用菌株については、薬剤感受性試験を実施する毎に、その試験成立を確認するために、必ず分離株と同様に試験に用いて、試験毎にその成績を記載する必要があります。

しかしながら *Lactococcus garvieae* のディスク拡散法には CLSI で推奨されている精度管理用参照菌株がありません。そのため、本研修では感受性試験用培地以外の条件が同じで、精度管理値が規定されている *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 を精度管理用の参照菌株として用いる事により、培養温度や培養時間、試験手技等の精度を担保することとしています。

III. 薬剤感受性試験に用いる資材一覧

- * 市販ディスク
- * 感受性試験用培地
 - ・ミューラー–ヒントン寒天培地
 - ・羊脱纖維血液
 - ・シャーレ
- * その他
 - ・菌起こし用非選択培地（5%血液寒天培地等）
 - ・滅菌生理食塩水
 - ・滅菌綿棒
 - ・マクファーランド標準濁度液
 - ・ノギス
 - ・滅菌エーゼ
 - ・低温恒温機
 - ・ガスバーナー
 - ・火炎滅菌用アルコール
 - ・ピンセット