

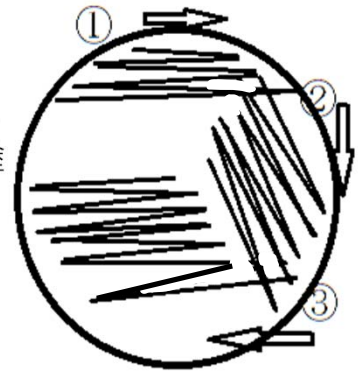
細菌の分離方法～大腸菌の例～

分離

採材

DHL寒天培地に集落ができるよう塗抹（分離培養）

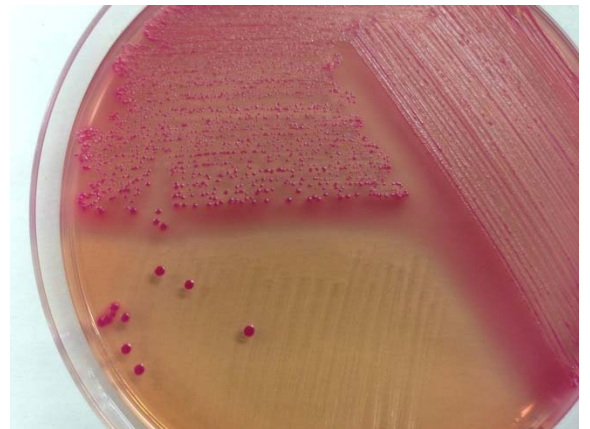
注：材料を白金耳、エーゼなどで直接DHLに塗抹し集落（コロニー）を作らせる。



※塗り方例

37℃、18～24 h 培養

大腸菌と思われるコロニーを確認（DHLの場合、赤紫色コロニー）



（同定） 必要に応じて実施
以下の方法は一例

上記の大腸菌と思われるコロニーを普通寒天に純培養する。

性状試験

使用するもの	試験項目	
T S I 培地	分解能	Y / Y
	硫化水素産生	-
	ガス産生	+ or -
L I M 培地	リジン脱炭酸	+ or -
	インドール産生	+
	運動性	+ or -
トリプル・アイ	トリプル・アイ産生	-

簡易保存

Api 20E(ID%が80%以上で*E.coli*とする)

- DHL (Desoxycholate-hydrogen sulfide-lactose) 培地：腸内細菌選択用分離培地
- TSI (Triple Sugar Iron) 培地：腸内細菌の鑑別用培地
- LIM (Lysine Indole Motility Medium) 培地：腸内細菌の鑑別用培地
- API 20E：細菌同定用の生化学試験キット

抗菌剤の感受性試験の方法

拡散法

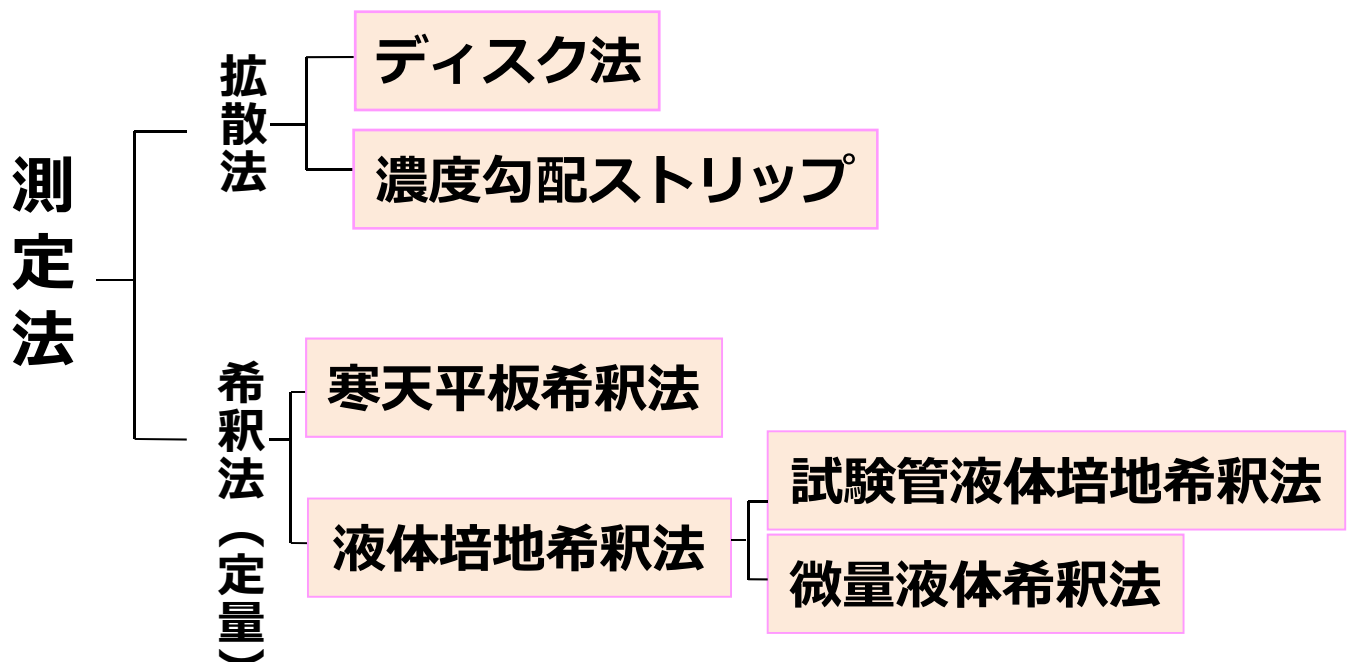
ディスク法：一定濃度の薬剤が含まれたディスクを使用し、阻止円の大きさで測定

濃度勾配ストリップ：濃度段階のついたスティックを使用し、MICを測定

希釈法

寒天平板希釈法：薬剤の濃度段階をつけた寒天平板を使用し、MICを測定

微量液体希釈法：薬剤の濃度段階をつけた液体培地を入れた96ウェルマイクロプレートを使用し、MICを測定



注：各方法の標準的なプロトコールは、以下の機関等が公表している。

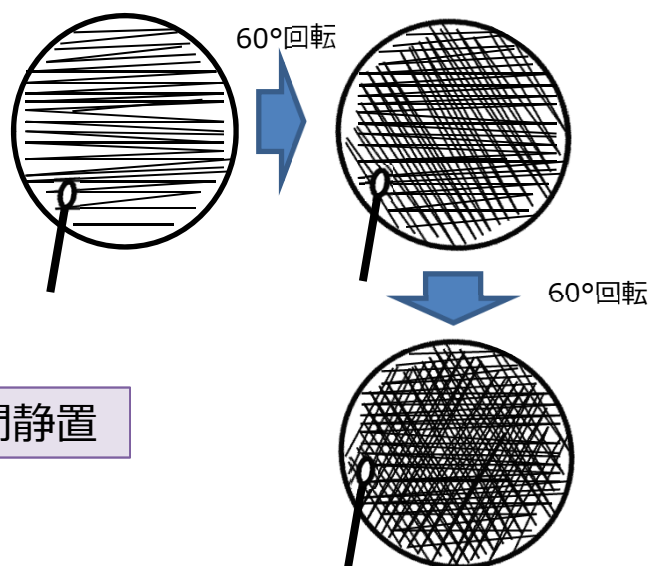
- ・Clinical and Laboratory Standards Institute (米国 CLSI)
- ・European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)
- ・日本化学療法学会

ディスク法

注：本資料はあくまで参考資料として一般的な方法を示したものです。詳細については、それぞれのディスクの添付文書などをご覧ください。

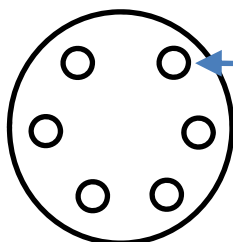
試験菌株を選択性のない寒天培地から釣菌し、生理食塩水などに懸濁
又は
試験菌株をTSB培地に接種し、2～6時間培養したものを、生理食塩水などで菌液濃度を調整
※いずれも濁度は標準濁度液を用いてMcFarland 0.5 に調整

調整した菌液をミュラーヒントン寒天培地上に、滅菌綿棒で均一に塗抹



菌液を塗布した寒天培地を3～5分間静置

寒天培地上にディスクを置く

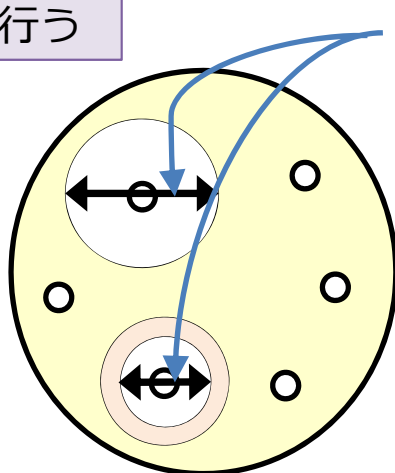


ディスク

注：ディスクとディスクの間は24mm以上あける。

菌種に合わせて培養を行う

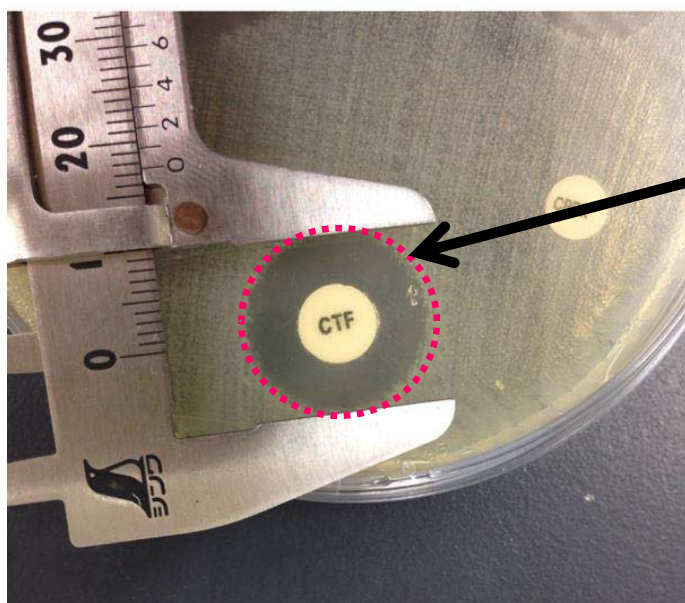
判定



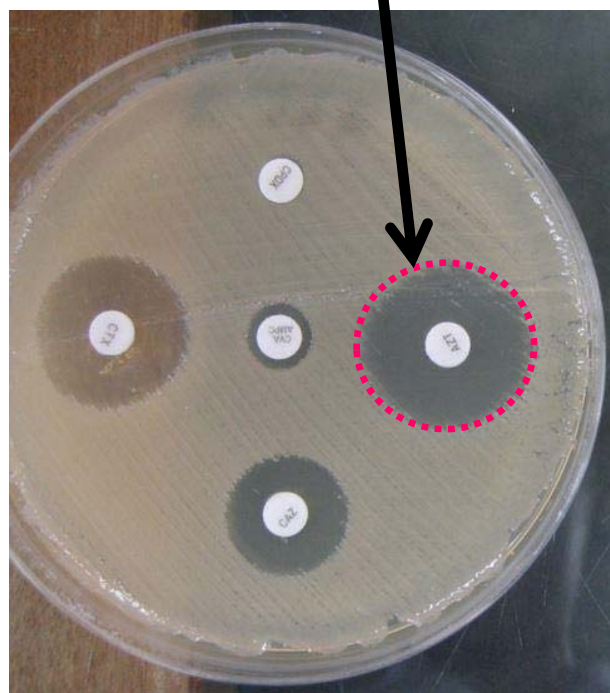
阻止円直径

注：完全に菌の発育が阻止されている阻止円の直径を、シャーレの裏側からノギスでミリ単位で計測。直径により耐性が判断。

- ・ TSB (Trypase Soy broth) 培地：栄養要求性の厳しくない菌の増菌用培地。
- ・ McFarland標準濁度液：菌液の濃度調整に用いる標準液で、標準液の濁度と比較することで菌液の濃度を推定。



阻止円



ディスペンサー



(参考) 濃度勾配ストリップ



阻止帯の
大きさによりMIC
がわかる
方法

MIC
0.19 $\mu\text{g/ml}$

微量液体希釈法

注：本資料はあくまで参考資料として一般的な方法を示したものです。試験は、CLSI、EUCAST、日本化学療法学会などの標準プロトコルに準拠してください。

一夜培養した試験菌株と滅菌生理食塩水をMcfarland 1 に調整

ミュラーヒントンブイヨンなどに懸濁液を加えて混和

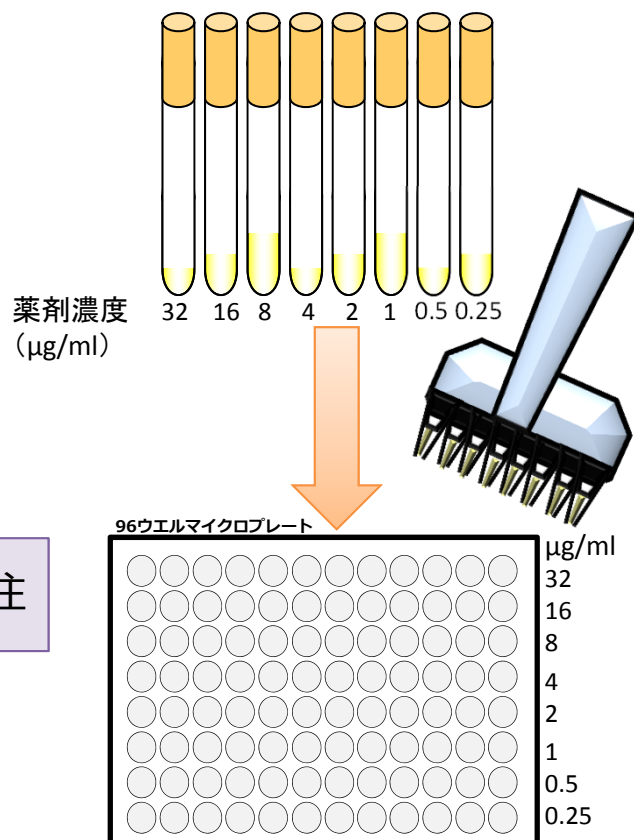
薬剤の二倍階段希釈系列を作成

各薬剤含有液体培地を各ウェルに分注

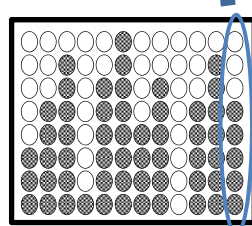
菌液を各ウェルに接種

35℃、16～20h培養

各濃度における菌の発育によりMICを判定



あらかじめ各濃度の薬剤が吸着しているドライプレート、フローズンプレートも市販されています。



【薬剤濃度(µg/ml)】

32
16
8
4
2
1
0.5
0.25

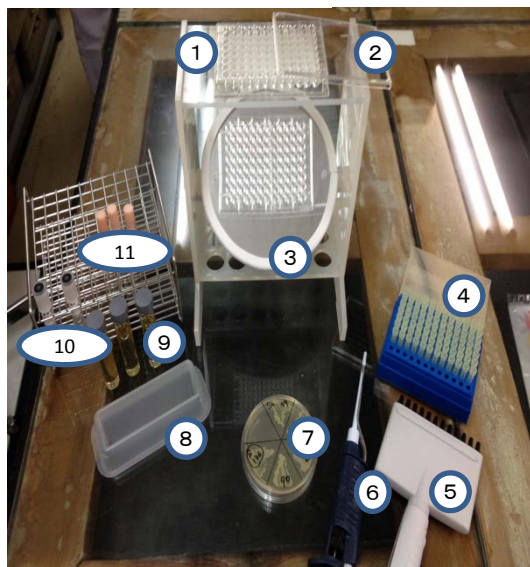
菌が発育していないので混濁していない
= 陰性 (-)

菌が発育して白く混濁している
= 陽性 (+)

8, 16, 32 µg/ml で陰性なので、
最小濃度の 8 µg/ml が MIC になる

必要な機器等

- | | |
|------------|--------|
| ①ドライプレート | ⑦菌株 |
| ②プレート用フタ | ⑧トレイ |
| ③リーディングミラー | ⑨MHブロス |
| ④チップ | ⑩生理食塩水 |
| ⑤12連ピペット | ⑪濁度調整液 |
| ⑥マイクロピペット | |



接種・培養



ドライプレートへの菌液の接種

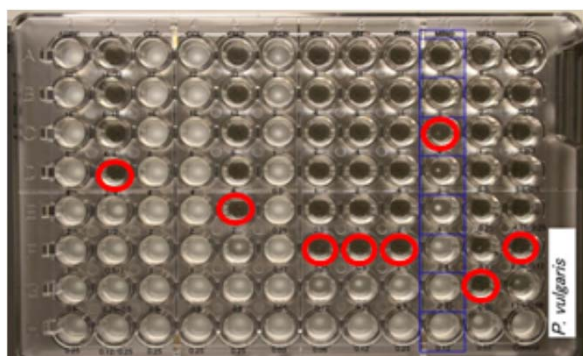
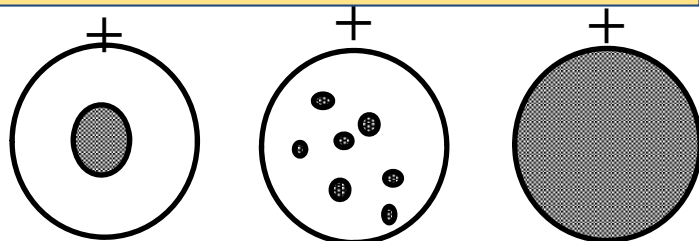


プレートを重ねすぎると上下段で培養温度に差が出てしまうため、4枚以上重ねて培養しないこと。

結果の判定

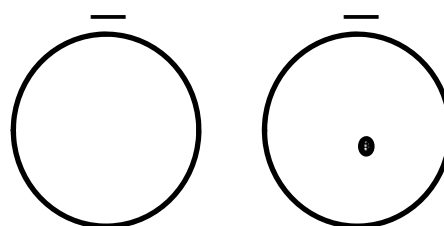
陽性（+）の判定基準

- 肉眼的に混濁又は直径 1 mm 以上の沈殿が認められた場合
- 沈殿物の直径が 1 mm 未満であっても、沈殿塊が 2 個以上認められた場合



陰性（-）の判定基準

- 肉眼的に混濁又は沈殿が認められない場合
- 沈殿物があっても直径が 1 mm 未満で 1 個の場合



左の写真では ○ がMIC値

寒天平板希釈法

注：本資料はあくまで参考資料として一般的な方法を示したものです。試験は、CLSI、EUCAST、日本化学療法学会などの標準プロトコールに準拠してください。

試験菌株と精度管理株を非選択培地(普通寒天培地等)で培養（集落ができるように）。

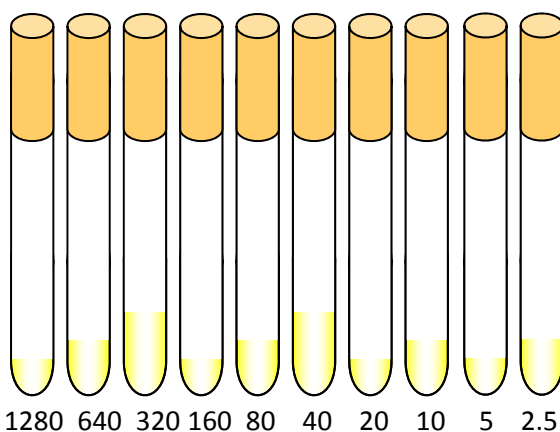
35℃、18～24h 培養

寒天培地で培養した株を
TSB培地（4ml）に接種

35℃、18～24h 培養

薬剤の調整
薬剤の二倍階段希釈系列を作成

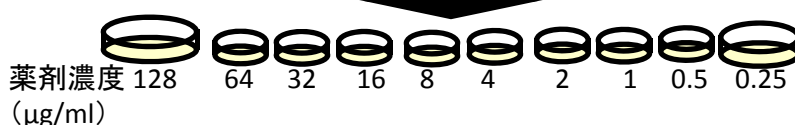
薬剤濃度
($\mu\text{g/ml}$)



培地の調整
上記希釈液 2 mlとミューラーヒントン寒天培地18mlを混和して作成

希釈液 2 ml

ミューラーヒントン寒天
培地18ml



菌液を接種

調整した菌液を専用の
器具で培地に接種

35℃、18～24h 培養

発育した菌

薬剤濃度

128 $\mu\text{g/ml}$

A: +

B: -

C: -

64 $\mu\text{g/ml}$

A: +

B: +

C: -

32 $\mu\text{g/ml}$

A: +

B: +

C: +

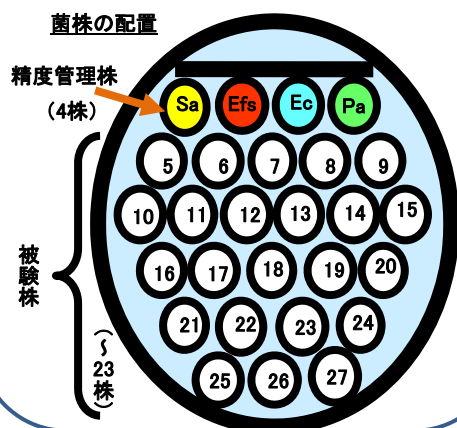
判定

MIC A: >128 $\mu\text{g/ml}$ B: 128 $\mu\text{g/ml}$ C: 64 $\mu\text{g/ml}$

菌液の希釈・調整



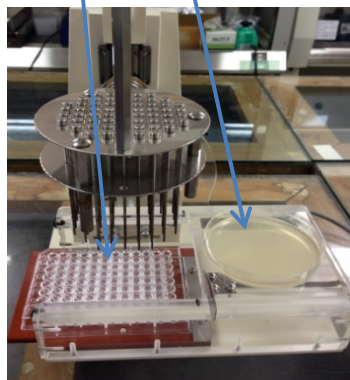
同じ菌株群で多数の薬剤を調べる時は、複数調整する。
5薬剤程度で新しい接種用菌液に交換。



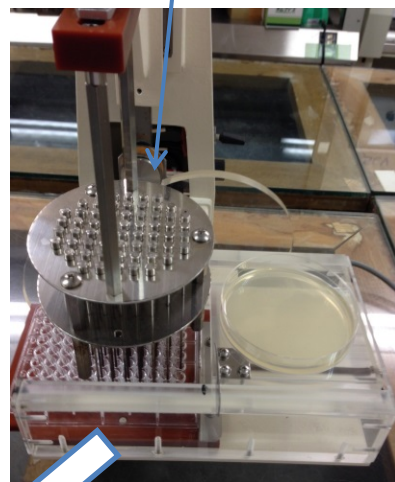
菌液の接種 (接種器を使用した例)

注：ここでは希釈・調整した菌液を96ウェルプレートに入れて培地に接種しています。

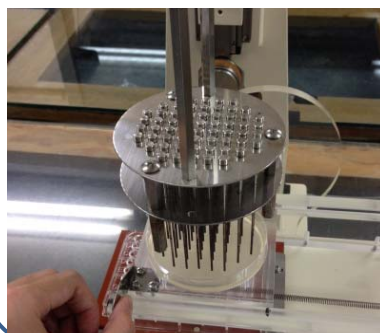
①菌液と培地をセットする。



②マイクロプランターを菌液につける。



③マイクロプランターを培地に付ける。

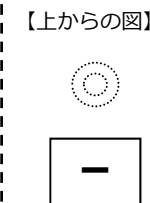
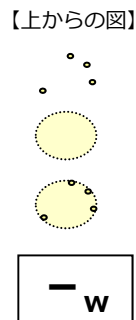
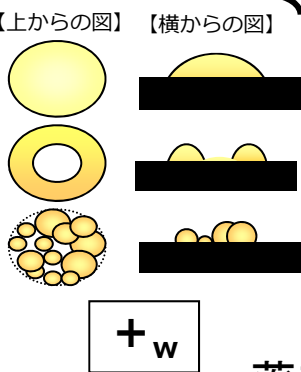
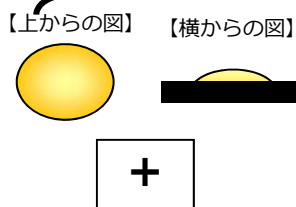


④培地を別のものに替え、①に戻る。

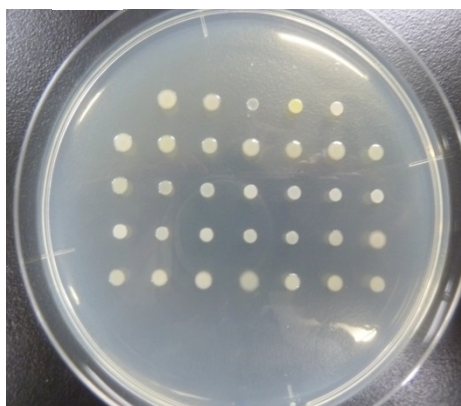
結果の判定

判定：+ 菌が肉眼で確認でき、菌が隆起して見えるもの

判定：- 菌が肉眼で確認できない、又は、確認できても菌が隆起して見えないもの (膜状)



← 低 薬剤濃度 高 →



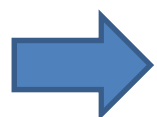
培地の薬剤濃度が高くなるにつれて、発育できる菌が少なくなっていく

参考文献

該当頁	文献名
(全般)	高橋敏雄ほか ；家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応. 感染症学雑誌. 80 (185-195). 社団法人 日本感染症学会 (2006)
	田村豊；細菌感染症に対する化学療法（抗菌化学療法）. 動物の感染症（第二版）. (68-75). 株式会社 近代出版 (2006)
	田村豊；動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策－特に診療獣医師の果たす役割について－. 日本獣医師会雑誌. 56 (685-691). 社団法人日本獣医師会 (2003)
	日本感染症学会 日本化学療法学会編；抗菌薬使用のガイドライン. 株式会社 協和企画 (2005)
	Alan R. Hauser著（岩田健太郎監訳）；抗菌薬マスター戦略. 株式会社 メディカル・サイエンス・インターナショナル (2008)
	動物用抗菌剤研究会編；動物用抗菌剤マニュアル. 株式会社インターズー (2004)
	農林水産省動物医薬品検査所；家畜由来細菌の抗菌剤感受性調査 http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/
	農林水産省経営局；家畜共済にける抗菌性物質の使用指針 http://www.maff.go.jp/j/keiei/hoken/saigai_hosyo/s_yoko/
(P 6)	食品安全委員会；家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針 http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryoku/taiseikin_hyoukasisin.pdf
	食品安全委員会；食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryoku/taiseikin_rank_20140331.pdf
(P 7)	農林水産省消費・安全局；動物用抗菌性物質製剤のリスク管理措置策定指針 http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/shishin.pdf
(P 8-10)	Anthony F, Acar J, Franklin A, et al.; Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agent in veterinary medicine. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 20, (829-839) (2001)
	Federation of Veterinary of Europe ; Antibiotic resistance and prudent use of antibiotics in veterinary medicine http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf
	Codex ; Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance CAC/RCP61-2005 http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/10213/CXP_061e.pdf
(P 9)	農林水産省消費・安全局；家畜伝染病予防法に基づく飼養衛生管理基準 http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e_koutei/kaisei_kadenhou/index.html
	農林水産省消費・安全局；生産衛生管理ハンドブック（肉用牛、肉用鶏、採卵鶏） http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/handbook/201108.html
(P12-)	公益社団法人日本化学療法学会；委員会報告・ガイドライン一覧 http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/
	Wayne, PA, CLSI ;Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A3, 3rd edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008)
	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ; Antimicrobial Susceptibility testing http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/
(P13,14)	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構；医薬品医療機器情報提供ホームページ KBディスク栄研 http://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/09A2X10001000010_A_02_04/
(P14)	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構；医薬品医療機器情報提供ホームページ 薬剤感受性試験用 Etest フォームパック http://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/13A2X00243000039_A_01_01/13A2X00243000039_A_01_01?view=body

慎重使用のために ①

家畜の健康を保ち、感染症を予防することで抗菌剤の使用機会を減らしましょう。



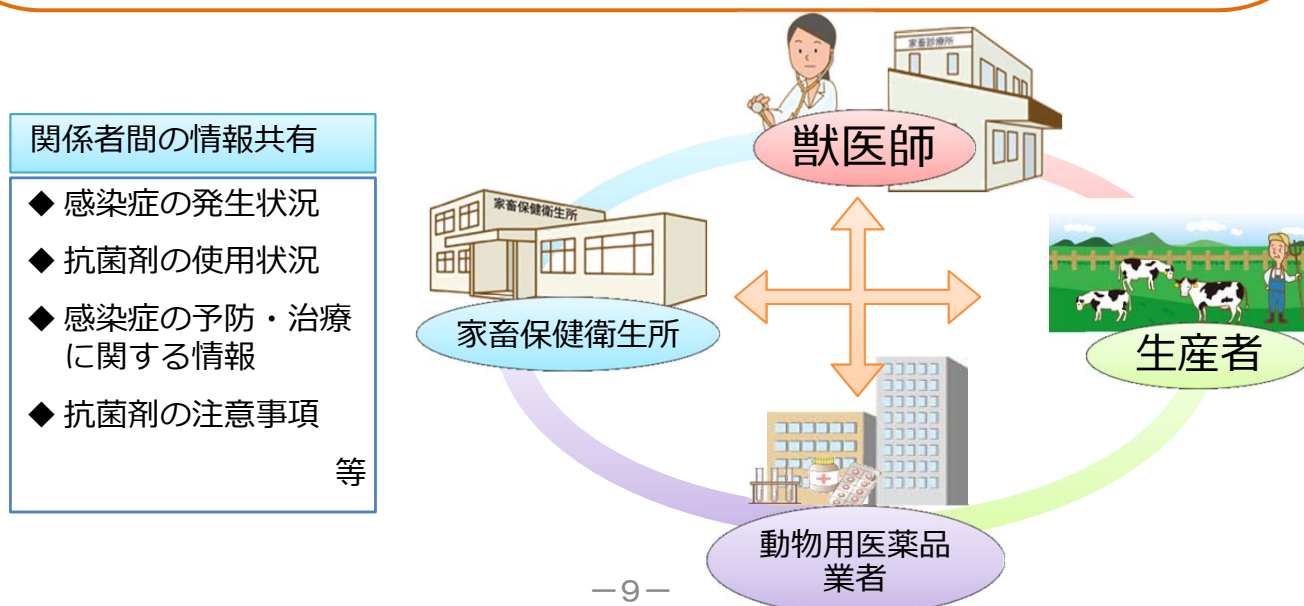
薬剤耐性菌の選択の抑制

感染症予防のために、以下の取組が必要です。

- ✓ 家畜の健康状態に悪影響を与える飼養環境の改善
 - ✓ 適切なワクチン接種
 - ✓ 適切な飼料の給与及び栄養管理
 - ✓ 飼養衛生管理基準^(※)の遵守
- (※) 衛生管理方法の詳細については、農林水産省「飼養衛生管理基準」をご覧ください。

・また、農水省では食品の安全性を向上させるために、農場で実施してほしい対策を「生産衛生管理ハンドブック（肉用牛、肉用鶏、採卵鶏）」としてとりまとめ・公表しています。こちらも併せて御活用ください。

- 上記の取組の実施状況を定期的に確認し、問題がある場合には、生産者に対し指導しましょう。
- 抗菌剤の使用について、関係者で情報を共有しましょう。



慎重使用のために ②

抗菌剤での治療は、菌分離や薬剤感受性試験の結果に基づいて行いましょう。

感染症が発生した場合、以下の事項に留意し、適切な病性把握と診断を行いましょう。

- ◆ 生産者からの発病後の経過や措置などに関する聞き取り、臨床病理検査などによる病原体や病態の鑑別
- ◆ 疫学情報の把握
- ◆ 菌分離などを行い、原因菌を検索
- ◆ 分離された原因菌は、感受性試験を実施

感受性試験の方法は、この後のページに紹介しています。

抗菌剤での治療が必要だと判断された場合

抗菌剤の選択

- 薬剤感受性試験の結果を踏まえて有効な抗菌剤を選択
- 第一次選択薬は、薬剤感受性試験で感受性を示した抗菌剤の中で、できるだけ抗菌スペクトルの狭い抗菌剤を選択
- フルオロキノロン等は第二次選択薬としての使用に限定（※）

（※）第二次選択薬として承認されている家畜に使用される抗菌剤（平成25年12月現在）：

- ・フルオロキノロン（エンロフロキサシン、オフロキサシン、ノルフロキサシン、オルビフロキサシン、マルボフロキサシン、ダノフロキサシン、ジフロキサシン）
- ・第3世代セファロスポリン（セフトチオフル、セフキノム）
- ・15員環マクロライド（ツラスロマイシン）

最新のリストは動物医薬品検査所HPをご覧ください（HP内

第二次選択薬	製剤一覧
--------	------

検索

 ）。
URL: <http://www.maff.go.jp/nval/risk/index.html>

抗菌剤の使用

- 承認された用法・用量、効能・効果、使用基準などに基づいて使用
- 未承認薬の使用、適応外使用は原則行わない

抗菌剤の使用後

- 投与後の効果判定を行い、必要に応じて抗菌剤を変更