

正確で迅速な乳房炎検査法の検討

西部家畜保健衛生所西讃支所

○ 高橋茂隆・小野耕一
笹田裕司・真鍋圭哲

1. はじめに

乳房炎対策の一環として、昨年から西部家畜保健衛生所西讃支所で取り組んでいる乳房炎の検査方法について検討したので、報告する。

2. 経緯と目的

乳房炎検査は熟練が必要であり、かつ農家の問題点把握には採材や搾乳手順の確認などの農家での作業が必要不可欠であるという点から、当所で乳房炎検査を実施するには検査者の熟練度の違いによる検査精度や業務の時間的制約が問題となった。そのため、コロニーを見るだけで簡単に菌種の鑑別ができないかということテーマに、昨年から当所では酵素基質培地を試験的に使用している。

酵素基質培地「クロモアガーオリエンタシオン」(以下クロモアガー)では、コロニーが特異的に発色することから、簡易に菌種を鑑別できるとされている。メーカーによると、コリネバクテリウムなどの例外を除いて、主要な乳房炎の原因菌についても、コロニーの色調や大きさの違いで菌種の鑑別は可能とのことであった(表1)。

昨年、クロモアガーと血液寒天培地を併用することにより、県内の他の家畜保健衛生所で実施している血液寒天培地、DHL寒天培地、マンニット食塩培地の3種類の培地を用いる方法(以下従来法)と異なり、コロニーの形態を観察することで、簡易に菌種の鑑別が可能となりうる事が確認された。一方、メーカーのマニュアルには無いコロニーが出現したり、他の培地と比べ発育する菌数が少ないのではないかという疑問を持った。

以上のことから、優れた長所のある本培地を使用し、より正確かつ迅速に検査を行うためには、本培地でのコロニーの形態の整理と、当所に適したマニュアルの整備が必要と思われる、本培地の長所と短所を調査し、評価することが重要と考えた。

3. 材料および方法

その評価方法としては、定性試験として本培地での菌の発育の有無と、菌種ごとにコロニーの形態を比較した。次に、定量試験として乳汁や培養菌液について、発育した菌数を他の培地と比較した。さらに、各培地の検査コストを比較するとともに、検査の迅速性については、検査時間や作業能率を検討した。

1) 定性試験

乳房炎検査で分離された176株中の154株について、クロモアガーで培養を行い、判定は菌の発育の有無やコロニーの形態を比較検討した(表3)。

2) 定量試験

i) 乳汁からの定量

乳房炎原因菌がほぼ純培養された乳汁24検体を用い、クロモアガーと5%羊血液寒天培地(以下血寒)で培養した。判定は各培地のコロニー数を測定した。

ii) 培養菌株での定量培養菌株については、乳房炎の検査材料に近づくために、表4に示す菌株についてコロニーをPBS(-)で希釈し、血寒に対して10

表1 酵素基質培地「クロモアガーオリエンタシオン」とは

1	コロニーが特異的に発色。簡易に菌種を鑑別できる。牛の乳房炎検査に応用可能との報告あり。
2	メーカーによる鑑別法(色調や大きさ)
例)	淡黄色 ⇒ <i>S.aureus</i> , CNS
	白〜青緑 ⇒ <i>Streptococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterococcus</i>
	ピンク ⇒ <i>E.coli</i>
	メタル青 ⇒ <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i>
	茶褐色 ⇒ <i>Proteus</i>
	白〜無色 ⇒ <i>Pseudomonas</i>
	* <i>Corynebacterium</i> , <i>Arconobacterium</i> , <i>Actinomyces</i> は発育せずと記載。

表2 評価試験の調査項目

1	定性試験	菌の発育の有無 菌種毎にコロニーの形態を比較
2	定量試験	発育菌数を他の培地と比較 (乳汁、培養菌)
3	検査コスト	各培地のコストを比較
4	迅速性	検査時間、作業性を検討

表4 材料および方法(定量試験:乳汁)

① 材料
乳房炎原因菌がほぼ純培養された乳汁 24検体
ブドウ球菌 7検体(SA 3検体、CNS 4検体)
レンサ球菌 6検体(<i>Sagalactiae</i> , <i>S.dysgalactiae</i> , <i>S.subers</i> 各2検体)
コリネバクテリウム 5検体(<i>C.bovis</i> 5検体)
大腸菌群 6検体(大腸菌 4検体、クレブジェラ 2検体)
② 方法
1エーゼ(10ul)を接種。
培地:クロモアガー、羊血液寒天培地(血寒)
条件:37°C、24~72時間、好気培養
判定:各培地のコロニー数を測定し、比較検討。

10^{5-7} cfu/mlに調整したものと、菌液を1晩冷蔵後、血寒に対して 10^{5-7} cfu/mlに調整したものを各培地に接種した(表5)。

表3 材料および方法(定性試験)

① 材料	
乳房炎検査で分離された176株中154株	
ブドウ球菌	69株(SA19株、CNS50株)
レンサ球菌群	47株(<i>S.galactiae</i> 、 <i>S.dysgalactiae</i> 、 <i>S.suberis</i> 他)
コリネバクテリウム	19株(<i>C.bovis</i>)
アルカナバクテリウム	4株
大腸菌群	9株(大腸菌、クレブジエラ他) 他
② 方法	
培地:クロモアガー	
条件:37℃、24~72時間、好気培養	
判定:発育の有無、コロニーの形態を比較検討	

表5 材料および方法(定量試験:培養菌株)

① 材料		
ブドウ球菌(SA)		3株
レンサ球菌(<i>S.dysgalactiae</i> 、 <i>S.suberis</i>)		3株
大腸菌群(大腸菌、クレブジエラ、セラチア)		3株
② 方法		
(1) PBS(-)で血寒に対して 10^{5-7} cfu/mlに調整	} 各培地 に接種。	
(2) 菌液を1晩冷蔵後、血寒に対して 10^{5-7} cfu/mlに調整		
培地:クロモアガー、血寒		
条件:37℃、24時間、好気培養		
判定:各培地のコロニー数を測定し、比較検討。		

4. 成績

1) 定性試験

クロモアガーでは、ブドウ球菌の形態は中型で発育が良かった。昨年、SAは全て淡黄色、CNSは白、紫、水色と報告したが、その後の調査ではSA、CNSともに4色を示した(表6)。いずれにしても、メーカーの淡黄色のみとの記載とは異なる成績であった。

レンサ球菌は昨年の報告どおり、発育が悪いものの24時間で小型のコロニーが確認できた(表7)。色調はメーカーと同様に青緑と白色であった。

メーカーが発育しないとしているコリネバクテリウム(以下コリネ)は48時間の培養で、微小な紫のコロニーが確認された(表8)。なお、グラム染色でコリネと区別が付きにくいアルカナバクテリウムは、水色のコロニーが観察され、区別が可能であった。

次に、大腸菌群については、例数は少ないもののメーカーと同様な成績となった(表9)。また、他の菌についても特徴のあるコロニーが観察された(表10)。

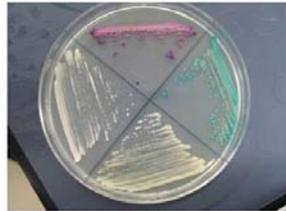
以上をまとめると、クロモアガーでは菌種ごとに特徴のあるコロニーが発育した。また、赤色で示した菌種については、メーカーと異なる成績となった(表11)。

表6 ブドウ球菌(69株)

中型の大きさとで発育よい

SA : 19株 } ともに
CNS: 50株 }

淡黄色、白色
紫色、水色

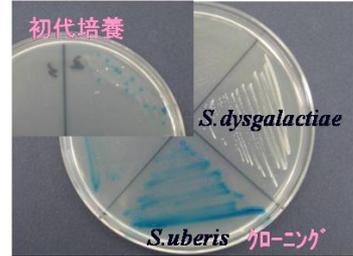


* メーカー: 淡黄色のみ

表7 レンサ球菌群(47株)

小型の大きさとで発育悪い

S.agalactiae 4株
S.dysgalactiae 18株
S.suberis 13株
Streptococcus spp. 9株
Aerococcus spp. 3株
ともに青緑、白色



* メーカー: 青緑、白色

表8 コリネバクテリウム等(23株)

○Corynebacterium bovis: 19株
24時間、好気培養で陰性。
48時間、微小な紫色の
コロニー。

* 血液寒天培地でも発育遅く、
他の菌多いと検出できない。
Corynebacterium
培養48~72時間後の再確認で検出率向上。

* メーカー: 発育せず

○アルカナバクテリウム: 4株

48時間で微小な水色のコロニーが観察。

* メーカー: 発育せず

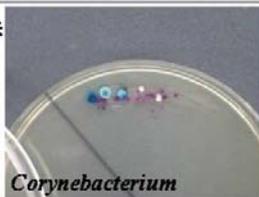


表9 大腸菌群(9株)

○大腸菌: 大型で発育良い
ピンク: 5株

* メーカー: ピンク

○クレブジェラ: 大型で発育良い
メタル青: 3株

* メーカー: メタル青

○プロテウス: 大型で発育良い
茶褐色: 1株

* メーカー: 茶褐色

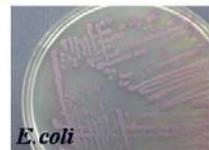


表10 他種の菌株

B.cereus(セレウス)
: 大型で発育良い
透明~青緑: 2株

* メーカー: 記述なし

緑膿菌: 大型で発育良い
薄緑: 1株

* メーカー: 無色~白色

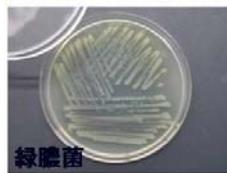
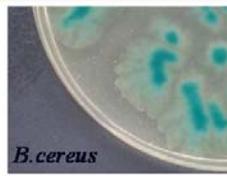


表11 クロモアガーでの発育細菌の特徴

菌種	大きさ	色調	メーカー
ブドウ球菌	中	淡黄色、白色、 紫色 水色	淡黄色
レンサ球菌	小	青緑、白色	青緑、白色
コリネバクテリウム	微小	紫色	発育せず
アルカナバクテリウム	微小	水色	分離せず
大腸菌	大	ピンク	ピンク
プロテウス	大	茶褐色	茶褐色
クレブジェラ	大	メタル青	メタル青
セラチア	大	青緑	青緑
緑膿菌	大	薄緑	無色~白色
セレウス	大	透明~青緑	記載なし

2) 定量試験

i) 乳汁からの定量

ブドウ球菌、レンサ球菌、コリネでは、クロモアガーは血寒よりもコロニー数が若干少ない傾向であったが、有意差はなかった(表12)。

また、大腸菌群ではクロモアガーの方が多い傾向であったが、これも有意差はなかった。

ii) 次に、培養菌株については、コロニーを希釈直後に接種したものは、同じグループ間では有意差はなかった(表13)。

菌液を1晩冷蔵したものでは、ブドウ球菌とレンサ球菌については、クロモアガーは血寒よりもコロニー数が少ない傾向にあり、特にレンサ球菌では有意差があった(表14)。なお、大腸菌群には差はみられなかった。

表12 定量試験成績(乳汁)

菌種	検体数	クロモアガー	血寒 (cfu/10ul)
ブドウ球菌	7	1~200(13)	8~500(30)
レンサ球菌	6	18~ 60(28)	25~200(44)
コリネ	5	5~300(21)	5~200(39)
大腸菌群	6	2~100(19)	0~ 70(7)

* クロモアガーと血寒には有意差なし(p>0.05)。 ()内はGM値

表13 定量試験成績(培養菌株)

(1) すぐに接種

細菌名	クロモアガー	血寒 (10 ⁵ cfu/ml)
ブドウ球菌 SA	19	63
ブドウ球菌 SA	120	350
ブドウ球菌 SA	18	29
レンサ球菌 <i>S.dysgalactiae</i>	118	121
レンサ球菌 <i>S.dysgalactiae</i>	15	31
レンサ球菌 <i>S.uberis</i>	36	43
大腸菌群 <i>E.coli</i>	540	69
大腸菌群 <i>klebsiella</i>	48	41
大腸菌群 <i>Serratia</i>	400	320

* クロモアガーと血寒には有意差なし(p>0.05)

表14 定量試験成績(培養菌株)

(2) 1晩冷蔵

細菌名	クロモアガー	血寒 (10 ⁵ cfu/ml)	
ブドウ球菌 SA	70	50	クロモアガーと
ブドウ球菌 SA	12	560	血寒には有意差なし
ブドウ球菌 SA	8	290	(p>0.05)
レンサ球菌 <i>S.dysgalactiae</i>	10	230	クロモアガーと
レンサ球菌 <i>S.dysgalactiae</i>	2	110	血寒には有意差あり
レンサ球菌 <i>S.uberis</i>	1	85	(p<0.05)
大腸菌群 <i>E.coli</i>	770	730	クロモアガーと
大腸菌群 <i>klebsiella</i>	400	450	血寒には有意差なし
大腸菌群 <i>Serratia</i>	130	100	(p>0.05)

3) 検査コストの比較

検査コストは従来法と比べ、1検体当りのスクリーニング検査費用は同程度であった(表15)。

表15 検査コストの検討成績

○1検体のスクリーニング検査代

クロモアガー	106円	血寒	161円
DHL	43円	マンニット	30円

従来法(血寒+DHL+マンニット) 234円

クロモアガー+血寒法 267円

4) 検査マニュアルの作製と迅速性の検討

以上の成績をもとに、当所に適したマニュアルを作成した。検査手順をチャート化するとともに、各培地の発育菌のカラー写真を掲載した(表16)。

検査の迅速性については、作業の迅速性や簡便性の点で使用培地を3枚から2枚に減少できること、クロモアガーが容易となること、また検査方法のマニュアル化により作業を単純化できることから、作業の省力化とともに作業時間が短縮できる。そのため、煩雑な乳房炎検査の迅速化、簡素化が可能となり、不慣れな検査者には作業能率が向上した(表17)。

表16 乳房炎検査マニュアルの作成

○特徴

- ・ 検査手順をチャート化
- ・ 各培地の発育菌のカラー写真を掲載



表17 検査の迅速性についての検討成績

○作業の迅速性、簡便性

- ・ 使用培地を3枚から2枚へ
- ・ 容易にクローニングが可能
- ・ マニュアルを整備⇒作業を単純化

作業を省力化
作業時間を短縮



乳房炎検査の迅速化
、簡素化が可能

◎不慣れな検査者には、特に有効

5. まとめ

当所で乳房炎検査を正確かつ迅速に実施するため、酵素基質培地「クロモアガーオリエンタシオン」で発育した乳房炎の原因菌の形態を整理した。一部の菌では、メーカーのマニュアルと若干異なる成績が見られた。

定量試験では、培地間の発育菌数には有意差はなかったが、保冷材料ではブドウ球菌やレンサ球菌でクロモアガーは血寒よりも発育菌数が少ない傾向であるため、実際の検査でも支障をきたす恐れがあり、血寒との併用が必要なことを再確認した。

検査コストについては、従来法とはほぼ同程度で、使用には問題が無いと思われる。

さらに、検査方法のマニュアル化等により作業が単純化、省力化され、作業時間の短縮が可能となった。以上の成績から、検査の精度向上や迅速化は可能となり、今後は本培地とマニュアルを有効に活用したい。