

乳房炎検査における黄色ブドウ球菌検出培地の検討

西部家畜保健衛生所西讃支所

○ 白石順也 宮本純子

1. はじめに

乳房炎検査における黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*、以下 SA) の検出には様々な培地が用いられている。また、SA の判別については、特異反応を見ることによって行っているが、培地により判別の容易さは異なる。そこで、2つの試験を行うことにより、どの培地が SA を検出するのに有効であるのかを検討した。

2. 試験 1

様々な培地による SA の発育性の比較及び培地の特異反応の明瞭性の比較

<材料> (図 1)

野外分離した SA を 3 株、*Staphylococcus capitis* (以下 CNS) を 1 株を使用した。CNS については、SA との特異反応を比較するために使用した。培地は血液寒天培地 (血寒)、マンニット食塩寒天培地 (マンニット)、市販卵黄加マンニット食塩寒天培地 (市販マンニット)、自作卵黄加マンニット食塩寒天培地 (自作マンニット)、ベアードパーカー寒天培地 (BP)、食品衛生分野で使用されている市販乾式フィルム状培地 (フィルム) の 6 種類を使用した。フィルムに STX ディスクを挿入することにより SA コロニー周囲がピンクに変化する。

<方法> (図 2)

菌液濃度の調製は上皿電子天秤を使用して、培養した菌塊を 10mg 釣菌し、精製水 1mL に溶解して菌液を作成後、計測できる程度のコロニー数になるようにした。

血寒等のシャーレ培地については、 10^6 倍希釈した菌液を $100 \mu\text{L}$ 塗布後、 37°C 、48 時間培養した。フィルム培地については、 10^7 倍希釈した菌液を 1mL 接種後、 37°C 、24 時間培養し、STX ディスクを挿入して 2 時間同条件で培養後、ピンクゾーンを確認した。

<結果>

各培地における SA の発育性を調べるため、1 検体ごとに培地を 3 枚ずつ使用し、各培地のコロニー数の平均を求め、表に示した (表 1)。血寒を指標として各培地に生育したコロニー数について、一元配置分散分析法により有意差を検討したところ、有意差はなかった。また、SA と CNS の特異反応の有無を比較するため、各培地の培養後の写真を示した (図 3,4)。

図 1 材料

・野外分離 SA 3 株
・*Staphylococcus capitis*
(以下 CNS) 1 株

<使用培地>

1. 血液寒天培地 (血寒)
2. マンニット食塩寒天培地 (M)
3. 市販卵黄加マンニット食塩寒天培地 (市販M)
4. 自作卵黄加マンニット食塩寒天培地 (自作M)
5. ベアードパーカー寒天培地 (BP)
6. 市販乾式フィルム状培地 (フィルム) + STX ディスク
(1~5: シャーレ培地 6: フィルム培地)

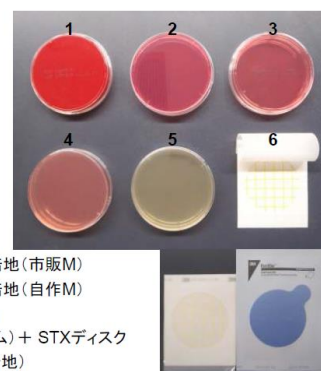


図 2 試験1・方法

- ・菌液調製
培養した菌塊を 10mg 釣菌し、精製水 1mL に溶解し、計測できる程度のコロニー数になるように菌液の濃度を調製
- ・培養
シャーレ培地: $100 \mu\text{L}$ 塗布 (10^6 倍希釈)、 37°C 、48 時間培養
フィルム培地: 1mL 接種 (10^7 倍希釈)、 37°C 、24 時間培養後、STX ディスクを挿入し、2 時間同条件で培養
- ・判定: コロニー数を計測し、血寒と各培地の SA 発育性を比較
培地の特異反応の明瞭性の比較

表 1 試験1・結果

・血寒と各培地におけるSA発育性の比較 (n=3)

	SA1平均	SA2平均	SA3平均
血寒	95	62	150
M	84	45	102
市販M	88	55	107
自作M	85	47	102
BP	92	52	132
フィルム	81	52	104

血寒と各培地におけるコロニー数に有意差なし (p>0.01)

図 3 試験1・培養結果

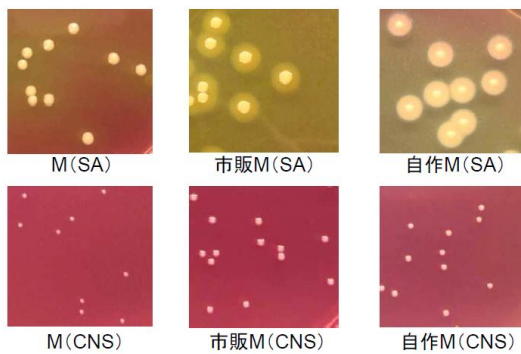
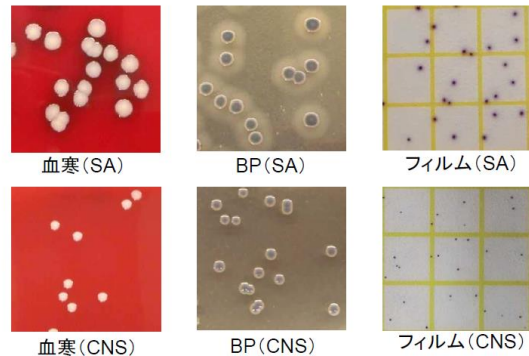


図 4 試験1・培養結果



マンニットでは SA コロニー周囲の培地の黄変化が確認された。市販マンニット、自作マンニットでは SA コロニー周囲に卵黄反応が確認された。市販マンニットの卵黄反応はあまり濁っておらず、透明感があった。それに対して自作マンニットの卵黄反応は白濁していた。血寒では SA コロニー周囲で溶血が起こっていることが確認された。BP では SA コロニー周囲に半透明のハローが確認された。フィルムでは SA コロニーは赤紫色になり、STX ディスクを挿入して培養するとピンクゾーンを形成した。

培地の特異反応の明瞭性を比較するため、SA コロニーの発育に伴って見られた培地の特異反応とその強さを表に示した (表 2)。CNS では各培地に特異反応は見られなかった。培地の特異反応は市販マンニット、自作マンニット、BP、フィルムで強く現れており、CNS と比較して容易に区別することができた。

表 2 試験1・特異反応

・培地の特異反応の明瞭性

培地	SA	明瞭性の強弱	CNS
血寒	溶血	弱	溶血なし
M	黄変化	弱	黄変化なし
市販M	卵黄反応あり	強	卵黄反応なし
自作M	卵黄反応あり	強	卵黄反応なし
BP	ハローあり	強	ハローなし
フィルム	ピンクゾーン形成	強	ピンクゾーンなし

3. 試験 2

SA が確認された生乳を 2 検体使用し、各培地の SA 判別の容易さ、発育性の比較及びコストの比較

<材料> (図 5)

SA が確認された生乳を 2 検体使用した。培地は試験 1 の結果をもとに、特異反応が明瞭であった市販マンニット、自作マンニット、BP、フィルムを使用した。

<方法>

試験 1 と同様に、シャーレ培地については 100 μ L 塗布後、37°C、48 時間培養した。フィルム培地については 1mL 接種後、37°C、24 時間培養し、STX ディスクを挿入して 2 時間同条件で培養後、ピンクゾーンを確認した。

<結果>

SA の特異反応の明瞭性を確認するため、各培地の培養後の写真を示した (図 6)。市販マンニットと自作マンニットは SA コロニーの判別が容易であった。BP については生乳を塗布すると培地が白く濁り、SA コロニー周囲のハローが確認しにくいものがあった。フィルムについては生乳 1mL 接種した場合、生えたコロニー数が多く、計測できなかった。そこで、生乳を精製水で 100 倍希釈してもう一度培養し、コロニー数を計測した。(図 7)。

図 5 試験2・方法

- ・材料: SAが確認された生乳を2検体使用
培地は市販M、自作M、BP、フィルムを使用
- ・培養
シャーレ培地: 100 μ L 塗布、37°C、48時間培養
フィルム培地: 1mL 接種、37°C、24時間培養後、STXディスクを挿入し、2時間同条件で培養
- ・判定: SA判別の容易さについて検討
特異反応が確認されたコロニー数を計測し、SA発育性を比較

図 6 試験2・培養結果

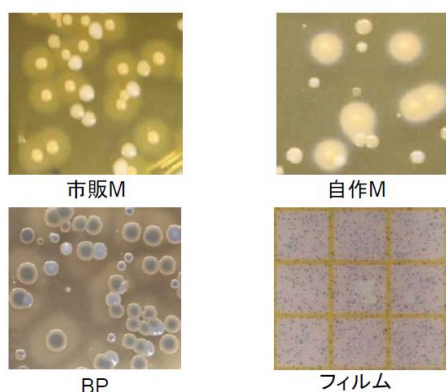
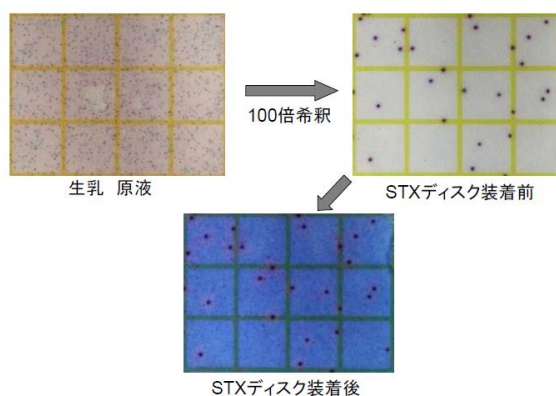


図 7 試験2・フィルムでの培養結果



各培地における SA の発育性を調べるため、コロニー数を計測し、表に示した (表 3)。市販マンニット、自作マンニット、BP における 2 検体の SA コロニー数について、各培地間で大きな差はなかった。フィルムについては、生乳を希釈しないとコロニー数は測定不能であった。

コストについては、試験 2 で使用した各培地 1 枚あたりにかかるコストを表に示した

(表 4)。値段はカタログ価格より算出し、作成が必要な培地に関しては材料費に平板シャーレの価格のみを加えた。また、フィルムについては STX ディスクもセットで使うことから、フィルムと STX ディスクを合わせた価格を表示した。この中では、自作マンニットが他の培地と比較して、1 枚あたり 46 円と低コストであった。

表 3 試験2・結果

・SA発育性の比較(CFU/mL)

培地	検体1	検体2	100倍希釈(検体1)
市販M	2900	1600	—
自作M	2010	1220	—
BP	2200	1400	—
フィルム	測定不能	測定不能	8100

4. 培地の評価

発育性、SA 単一での判別、生乳での判別、コストの 4 項目について比較した (表 5)。生乳での判別について、BP ではハローが見にくいことがあり、フィルムは希釈しないと判別が難しいという理由から、これらの培地の評価を低くした。発育性、SA 単一での判別には差が見られなかったことから生乳での SA 判別の容易さ、コストを重視して、自作マンニットが最も有効であると評価した。

5. まとめ

野外分離 SA 及び生乳を使用した試験において、各培地の SA 発育性にほとんど差は見られなかった。SA の判別については、市販マンニットと自作マンニットの特異反応が確認しやすく、他の培地と比較して明瞭であった。フィルムについてはコストが高く、検査時の希釈の必要性を考慮すると、生乳での検査には不向きと考えられた。培地 1 枚あたりのコストについて自作マンニットが 46 円と安価であった。

以上の検討結果より、乳房炎検査における SA 検出培地には自作卵黄加マンニット食塩寒天培地が有効であることが示された。

参考文献

1)高橋茂隆ら：乳房炎スクリーニング検査への取り組み (第一報)，平成 21 年度香川県業績発表会収録集,2010

表 4 培地のコスト比較

培地	1枚あたりのコスト(円)
市販M	150
自作M	46
BP	300
フィルム	382

表 5 培地の評価

培地	発育性	判別		コスト	総合評価
		SA単一	生乳		
市販M	○	○	○	△	○
自作M	○	○	○	○	◎
BP	○	○	△	×	△
フィルム	○	○	△	×	△