

水産分野における薬剤耐性に関する技術研修会テキスト

水産分野における

薬剤感受性試験マニュアル



目次

1 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験とは	1
水産動物由来細菌の薬剤感受性試験のこれまでと現状	1
水産動物由来細菌の薬剤感受性試験条件	2
薬剤感受性試験の精度管理	2

2 ディスク拡散法

ディスク拡散法の実際	6
1) ディスク拡散法に必要な試薬・器具	6
2) 感受性試験用培地	8
3) 薬剤感受性ディスクの用意	8
4) 菌液の調整	10
5) 菌液の接種法とディスクの配置	11
6) 培養条件と温度	11
7) 阻止円直径の測定	12
8) 判定	14
9) 精度管理	14
10) 危険防止または取り扱い上の注意	15

3 微量液体希釈法

微量液体希釈法の実際	17
1) フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具	17
2) 感受性試験用培地	18
3) フローズンプレートの発注	19
4) 菌液の調整	20
5) 菌液の接種と培養	21
6) 菌の増殖判定と記録	22
7) 判定	24
8) 精度管理	24
9) 危険防止または取り扱い上の注意	25

参考文献	26
------	----

Appendix

水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和５年３月時点）	27
講習会の記録用紙	28
ディスク拡散法記録用紙	29
微量液体希釈法記録用紙	30-31
ディスク配置図	32

ここでは、薬剤感受性試験についての基本を学ぶ。

薬剤感受性試験とは

薬剤感受性試験とは、抗菌剤に対する細菌の感受性を調べるために行われる試験である。これにより、感染症の治療に有効な抗菌剤を選択することが可能となる。

薬剤感受性試験法には、拡散法と希釈法の2種類がある（図 1-1）。拡散法は、薬剤感受性ディスクという円形の濾紙を用いるディスク拡散法とストリップと呼ばれる薬剤の濃度勾配を持たせた短冊状の濾紙を用いる E-test 方がある。菌液を塗布した培地上に薬剤を含有した濾紙を置くことにより、培地中の水分をディスクが吸収し、抗菌剤が培地中に拡散する。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により細菌の増殖が見られない阻止円または阻止帯が形成される。阻止円においては、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。阻止帯は阻止帯が生じはじめた目盛りから最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）を測定する。

希釈法は、液体培地を用いる液体希釈法と寒天培地を用いる寒天希釈法がある。また、液体希釈法のうちマイクロプレートを使用し、微量の液体培地（100 μ l）で希釈法を行うことを微量液体希釈法と言う。希釈法は、抗菌剤を溶解させた培地から段階希釈系列を作成し、そこに一定濃度の菌液を接種し培養を行う。これにより、細菌の発育が阻止される抗菌剤の濃度から定量的な MIC 値を測定することが出来る。しかしながら、希釈法は煩雑かつ、作業者の習熟度も要求されることから、水産試験場の多くは、ディスク拡散法を採用している。

水産動物由来細菌の薬剤感受性試験のこれまでと現状

養殖魚に代表される水産動物由来細菌の薬剤感受性試験は、2003 年に動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度（MIC）測定法が発表された¹⁾。本法は、NCCLS（National Committee for Clinical Laboratory Standards、米国臨床検査標準委員会）が定めた薬剤感受性試験法に準拠している。

2005年にNCCLSがCLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute、臨床検査標準協会）と改名後、水産動物由来細菌の液体培地希釈法とディスク拡散法による薬剤感受性試験法が発表された。その後、数回にわたり改訂され、2020年に改定された「VET03 Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 2nd Edition」²⁾と「VET04 (VET03 Supplement) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 3rd Edition」³⁾が最新版となっている。

本 CLSI 法は、世界で唯一の水産動物由来細菌の薬剤感受性試験法となっていることから、ここでは本法に準拠したマニュアルを示す。

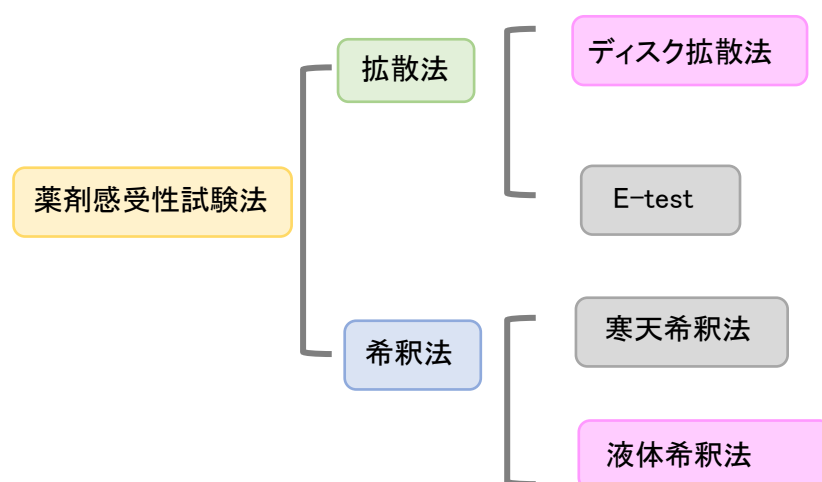


図 1-1 薬剤感受性試験の種類

水産動物由来細菌の薬剤感受性試験条件

2021年改定 CLSI 法に含まれる対象菌種は、5 グループに分類される。菌種ごとに培地・培養条件が異なるため、被検菌株の菌種を把握した上で薬剤感受性試験を行う必要がある。また、ディスク拡散法と液体希釈法でも試験条件が異なる（表 1-1、表 1-2）。講習会では、連鎖球菌症原因菌として知られる *Lactococcus garvieae* と *Vibrio* spp. を被検菌株とする。

薬剤感受性試験の精度管理

薬剤感受性試験の精度管理（QC: Quality control）は、薬剤感受性試験の正確性および再現性を確認するため重要。試薬や実験器具の性能や試験従事者の能力についてもモニターする。

水産動物由来細菌の培養条件はヒトや畜産と異なるため、精度管理株として以下の2株が認められている。この精度管理株で薬剤感受性試験を行い、精度管理値限界値の範囲内であることを確認する。

Escherichia coli ATCC 25922

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC 33658

なお、上記2株の精度管理株は、ATCC (American Type Culture Collection) より細菌分与を受けることが可能であり、住商ファーマインターナショナルが輸入代行をおこなっている。しかし、ATCC 以外の機関から分与を受けることも可能である (表 1-3)。特に JCM (理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室) は、日本にある機関ため金額も安価で入手し易い。表の NCIMB (The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd.) は、英国の微生物株保存機関であり株式会社テクノスルガ・ラボが輸入代行を行っている。どこの微生物株保存機関から分与を受けても同じ株であるが、ATCC 以外の機関から分与を受けた際は、精度管理値を確認する必要があると思われる。

精度管理は、試験毎および試薬や培地ロット等が変わる毎に行う必要がある。しかしながら、現在 CLSI が提案している精度管理値限界値は一部の条件のみである。特に、*Lactococcus garvieae* の培養条件に対する精度管理値は提供されていない。

表 1-3 精度管理株の微生物株保存機関別カタログ番号

微生物名	微生物株保存機関		
	ATCC	JCM	NCIMB
<i>Escherichia coli</i>	25922	5491	12210
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	33658	7874	1102

表 1-1 CLSI によるディスク拡散法プロトコル

Group	Organism	Medium	Incubation	Incubation Time
1 Nonfastidious bacteria	<i>Enterobacteriales</i>	MHA	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Vibrionaceae</i> (including facultative halophilic species)	MHA	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MHA	22 ± 2 °C	24-28 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Aeromonas hydrophila</i> and other mesophilic Aeromonds	MHA	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	MHA	35 ± 2 °C	16-20 h	
Nonfastidious gram-positive cocci	MHA+5% defibrinated sheep blood	35 ± 2 °C 5% CO ₂	20-24 h	
2 Strictly halophilic <i>Vibrionaceae</i>	Unknown	MHA+1% NaCl	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
3 Gliding bacteria	<i>Flavobacterium columnare</i>	Diluted MHA (4 g/L)+ 5% fetal calf serum+agar (17 g/L)	28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Diluted MHA (4 g/L)+ cation-adjusted MHA+agar (17 g/L)	15 ± 2 °C	72-96 h
	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	No recommendations at this time		
4 Streptococci	<i>Lactococcus</i> spp.	MHA+5% defibrinated sheep blood	22 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Vagococcus salmoninarum</i>		28 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
5 Nonfastidious bacteria	Psychrophilic <i>Aeromonas salmonicida</i>	MHA	15 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	No recommendations at this time		
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Diluted MHA (3 g/L) +inorganic ion	25 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>		25 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	No recommendations at this time		
	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>Nocardia</i> spp.	CLSI document M24		

表 1-2 CLSI による液体希釈法プロトコル

Group	Organism	Medium	Incubation	Incubation Time
1 Nonfastidious bacteria	<i>Enterobacteriales</i>	CAMHB	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Vibrionaceae</i> (including facultative halophilic species)	CAMHB	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CAMHB	22 ± 2 °C	44-48 h
			28 ± 2 °C	24-28 h
	<i>Aeromonas hydrophila</i> and other mesophilic Aeromonds <i>Pseudomonas</i> spp. Nonfastidious gram-positive cocci	CAMHB	28 ± 2 °C	24-28 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
			35 ± 2 °C	16-20 h
2 Strictly halophilic <i>Vibrionaceae</i>	Unknown	CAMHB+1% NaCl	22 ± 2 °C	24-28 h and/or 44-48 h
			28 ± 2 °C	44-48 h
3 Gliding bacteria	<i>Flavobacterium columnare</i>	Diluted CAMHB (4 g/L)	28 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Diluted CAMHB (4 g/L)	18 ± 2 °C	92-96 h
4 Streptococci	<i>Lactococcus</i> spp.	MHA+LHB	22 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	(2.5% to 5% v/v)	28 ± 2 °C	44-48 h
5 Nonfastidious bacteria	Psychrophilic <i>Aeromonas salmonicida</i>	CAMHB	15 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	Unknown	4 °C 15 °C	6 days
	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Diluted MHA (1:7) +inorganic ion supplementation	25 ± 2 °C	44-48 h
	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	KDM-2	15 °C	96 h with agitation
	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>Nocardia</i> spp.	CLSI document M24		