

チアンフェニコールディスクに おける精度管理参考値の作成

目的

薬剤耐性対策において、抗菌剤の慎重使用の徹底が最も重要とされている。適切な動物用抗菌剤使用のためには、薬剤感受性試験を実施し有効な薬剤を選択することが必要である。薬剤感受性試験の一つであるディスク拡散法は、簡便に実施できることから獣医領域で広く使用されている。しかし、ディスク拡散法には薬剤感受性ディスクの入手が不可欠であるが、動物用抗菌剤では入手できる薬剤の種類が限られている現状がある。このことから、動物用抗菌剤の各製造販売業者において薬剤感受性ディスクの供給体制を整備いただいている。この度、チアンフェニコールのディスクが新たに開発されたが、薬剤感受性試験の確実性を担保する為の精度管理値が CLSI 等により設定されていないことから、動物医薬品検査所にて *Streptococcus pneumoniae* と *Staphylococcus aureus* について、精度管理値の参考値を作成した。

材料と方法

被験菌は、*S. pneumoniae* ATCC®49619 及び *S. aureus* ATCC®25923 を使用した。また、ディスク拡散法に使用した薬剤感受性ディスクは 3 ロット使用し、培地は以下のものを使用した。

菌種	培地ロット	製品名	メーカー	製造番号
<i>S. pneumoniae</i>	Lot.1	Difco™ Mueller Hinton Medium	BD	1201622
	Lot.2	Difco™ Mueller Hinton Medium	BD	2060506
	Lot.3	Difco™ Mueller Hinton II Agar Medium	BD	2067329
	Lot.4	ポアメディア®ミューラーヒントンミューラーヒントン S ヒツジ血液寒天培地	栄研化学(株)	36009
<i>S. aureus</i>	Lot.1	Difco™ Mueller Hinton Medium	BD	1201622
	Lot.2	Difco™ Mueller Hinton Medium	BD	2060506
	Lot.3	Difco™ Mueller Hinton II Agar Medium	BD	2067329
	Lot.4	ポアメディア®ミューラーヒントンミューラーヒントン S 寒天培地	栄研化学(株)	36014

● *S. pneumoniae* ATCC®49619

5%羊脱繊維血液（コージンバイオ(株)）添加 HIA（Heart Infusion Agar）を用いて 35±2℃、18～20 時間、5%CO₂ 条件下で培養後、5%羊脱繊維血液添加 MHA（Mueller Hinton Agar）を用いて、CLSI（VET01^[1]、VET08^[2]）に準拠した方法でディスク拡散法を実施した。薬剤感受性ディスクはチアンフェニコールディスク（栄研化学(株)、TP1、TP2 及び TP3 の 3 ロット）を使用し、コントロールとしてチアンフェニコールと同系統であり CLSI に精度管理値が設定されているフロルフエニコールディスク（栄研化学(株)）を同時に測定した。

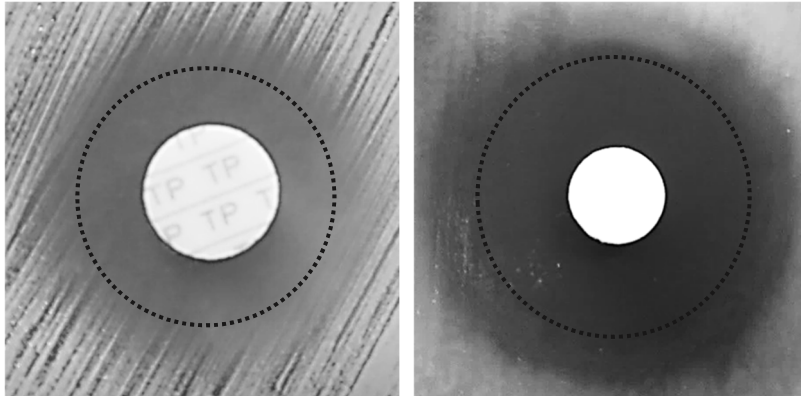
● *S. aureus* ATCC®25923

HIA を用いて 35±2℃、16-18 時間、好気条件下で培養後、MHA を用いて、CLSI（VET01 [CLSI, 2018]、VET08^[2]）に準拠した方法でディスク拡散法を実施した。薬剤感受性ディスクはチアンフェニコールディスク（栄研化学(株)、TP1、TP2 及び TP3 の 3 ロット）を使用し、コントロールとしてチアンフェニコールと同系統であり CLSI に精度管理値が設定されているフロルフエニコールデ

ディスク（栄研化学株）を同時に測定した。

- 阻止円径の測定

CLSI (M02^[3]) 及び EUCAST^[4] に準拠して測定を行った。目視可能な発育の一番内側を測定した。測定箇所を以下に示す（図1）。



（図1）左 *S. pneumoniae* ATCC®49619 右 *S. aureus* ATCC®25923

- 統計解析

CLSI (VET02-A3^[5] 及び M23^[6]) に記載の精度管理値作成方法（一部改変）を用いて、各培地ロットの平均値、中央値、標準偏差及び実測範囲から精度管理値を算出した。

結果

- *S. pneumoniae* ATCC®49619

測定回数は、全体で 348 回（各培地ロット 29 回）実施した。全体の実測値は 23～28 mm であり、平均値 25 mm、中央値 25 mm 及び標準偏差（SD）0.9164 より精度管理値（All Lot mean ± 3SD）は 22～28 mm となった。（表1）培地ロット別の実測値は、Lot.1 で 23～28 mm、Lot.2 で 24～27 mm、Lot.3 で 23～28 mm 及び Lot.4 で 23～27 mm となった。また、ディスクロット別の実測値は、TP1、TP2 及び TP3 の全てで 23～28 mm となった。

- *S. aureus* ATCC®25923

測定回数は、全体で 348 回（各培地ロット 29 回）実施した。全体の実測値は 11～16 mm であり、平均値 14 mm、中央値 14 mm、及び SD 0.8715 より精度管理値（All Lot mean ± 3SD）は 11～17 mm となった。（表2）培地ロット別の実測値は、Lot.1 で 11～16 mm、Lot.2 で 12～16 mm、Lot.3 で 11～15 mm 及び Lot.4 で 12～16 mm となった。また、ディスクロット別の実測値は、TP1 で 11～16 mm、TP2 で 11～15 mm、TP3 で 12～16 mm となった。

考察

S. pneumoniae ATCC®49619 は、Streptococcus 属菌、*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida* 及び *Erysipelothrix rhusiopathiae* 等、また、*S. aureus* ATCC®25923 は、*Staphylococcus* 属菌、*Enterococcus* 属菌、*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida* 及び *Bordetella bronchiseptica* 等のディスク拡散法の精度管理株とされており^{[7][8]}、これらの菌

種についてディスク拡散法を実施する際に使用される。

本調査によって、*S. pneumoniae* ATCC[®]49619 では 22-28 mm、*S. aureus* ATCC[®]25923 では 11~17 mmの精度管理値を得られた。CLSI では、精度管理値を設定する際の試験条件として、①1つ以上の獣医学診断検査施設を含む7カ所以上の検査施設で試験を実施すること、②培地は異なる製造所から3ロット使用すること、③薬剤感受性ディスクは異なる製造所から2ロット使用すること、④MHA と薬剤感受性ディスクごとに1検査施設あたり70回以上試験を行い、全ての検査施設で420回以上実施すること、⑤コントロールとして同系統の薬剤を使用すること及び⑥測定結果の95%信頼区間を精度管理値とすることなどが挙げられている。本調査では、①の実施は困難であり、②及び③についても3製造所分を入手することができなかったため、MHA 培地は、同一製造所で製造された製品3ロットと別製造所製品1ロットの計4ロット、薬剤感受性ディスクは同一製造所で製造された3ロットを用いた。本調査は1施設のみでの結果であることから、算出された精度管理値は7施設以上で実施した場合の値よりも範囲が狭くなることが考えられた。このことから、本調査では All Lot mean $\pm$ 3SD を精度管理値として採用した。本調査によって得られた精度管理値は、ディスク拡散法でチアンフェニコールを使用する際の参考値として利用できると考えられる。

参考文献

- [1] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals*. 5thed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [2] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals*. 4thed. CLSI supplement VET08, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [3] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 13th ed. CLSI standard M02. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [4] EUCAST https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents
- [5] CLSI. *Development of In Vivo Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Agents; Approved Guideline-Third Edition*. CLSI document VET02-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [6] CLSI. *Development of In Vivo Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters*. 5thed. CLSI guideline M23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [7] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals*. 5thed. CLSI supplement VET01S PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020
- [8] CLSI. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals*. 1sted. CLSI supplement VET06. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017

表1 *S. pneumoniae* の試験結果

培地	Lot.1			Lot.2			Lot.3			Lot.4		
阻止円径(mm)	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3
32												
31												
30												
29												
28	1		1					1				
27	5	6	5	7	2	7	6	3	4		1	
26	11	10	14	13	14	10	11	13	9	7	5	3
25	8	7	7	9	11	10	9	4	9	19	14	15
24	3	5	2		2	2	3	5	6	3	8	11
23	1	1						3	1		1	
22												
21												
20												
測定回数	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
	87			87			87			87		
Mean	25.7	25.5	25.9	25.9	25.6	25.8	25.7	25.4	25.3	26.7	25.1	24.9
MEDIAN	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	25.0	27.0	25.0	25.0
SD	1.111	1.122	0.915	0.753	0.736	0.912	0.930	1.293	1.072	0.712	0.581	0.860
Range	5	4	4	3	2	3	3	5	4	3	2	4
All Lot mean				25			All Lot Median				25	
Average SD				0.9164			Median of Ranges(MR)				4	
2SDs				1.8329			1/2MR Round up(R)				2	
3SDs				2.7493			Median ± 1/2R				23-27	
All Lot mean ± 2SD				23-27								
All Lot mean ± 3SD				22-28								

表2 *S. aureus* の試験結果

培地	Lot.1			Lot.2			Lot.3			Lot.4		
阻止円径(mm)	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3	TP1	TP2	TP3
20												
19												
18												
17												
16	1			3		1				4	4	2
15	3	1	4	6	6	5	2			7	4	3
14	12	9	13	14	12	12	10	2	11	13	10	10
13	9	17	11	6	10	8	11	20	16	5	9	10
12	3	2	1		1	3	6	6	2		2	4
11	1							1				
10												
9												
8												
測定回数	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
	87			87			87			87		
Mean	13.6	13.3	13.7	14.2	13.8	13.8	13.3	12.8	13.3	14.3	14.0	13.6
MEDIAN	14.0	13.0	14.0	14.0	14.0	14.0	13.0	13.0	13.0	14.0	14.0	14.0
SD	1.055	0.660	0.761	0.902	0.819	0.988	0.882	0.620	0.604	0.936	1.149	1.083
Range	5	3	3	3	3	4	3	3	2	3	4	4
All Lot mean				14				All Lot Median				14
Average SD				0.8715				Median of Ranges(MR)				3
2SDs				1.7430				1/2MR Round up(R)				2
3SDs				2.6145				Median $\pm$ 1/2R				12-16
All Lot mean $\pm$ 2SD				12-16								
All Lot mean $\pm$ 3SD				11-17								