

GBS増菌培地の開発

極東製薬工業株式会社 製品開発部
○北川 真喜

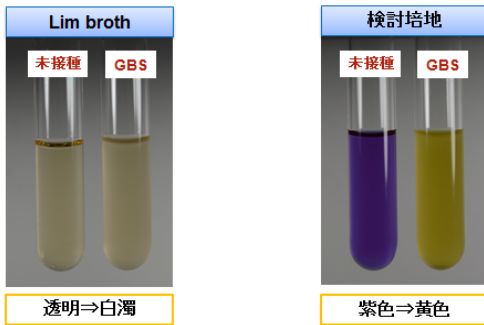
はじめに

B群溶血性連鎖球菌 (Group B *Streptococcus*: GBS) は新生児における敗血症や髄膜炎などの感染症の主要な起因菌である。アメリカ疾病予防管理センター (CDC) のガイドラインである「Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, 2010」では、妊娠35-37週に Todd Hewitt Broth にコリスチンとナリジクス酸を添加した Lim Broth 等による増菌培養を推奨している。

目的

本邦では、増菌培養の実施施設は関西圏内を除き極めて少ない。Lim Broth ではグラム陰性桿菌以外の菌種の抑制が不可能なため、ほぼ全ての検体で増菌培養後のサブカルチャーが必要となり、検査が煩雑となることが、理由の一つであると考えられる。
そこで、Lim Broth に糖と pH 指示薬を添加し、GBS の増殖により培地色が紫色から黄色に変化する培地を開発し、基本性能について検討した。

培地仕様



GBS の発育により糖が分解され、培地 pH が低下する。
培地中のブロムクレゾールパープル (BCP) が pH の低下により紫色から黄色に変化する。

供試菌株

1. *S. agalactiae* (GBS) : 32株
ATCC株 : 2株
臨床分離株 : 30株
2. *Staphylococcus* spp. : 16株
S. aureus : 3株
CNS : 13株
3. その他の菌種 : 12株
連鎖球菌 : 3株
グラム陰性桿菌 : 6株
Candida spp. : 2株
Lactobacillus salivarius : 1株

GBS発育性能確認試験

【対照培地】

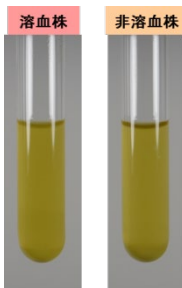
Lim Broth (コリスチン、ナリジクス酸添加 Todd Hewitt Broth)

【方法】

- 1) 前培養
バイタルメディア羊血液寒天培地で35°C, 18時間好気培養した。
- 2) 菌液調整
McFarland #0.5 の菌液を調整後、 $\times 10^{-7}$ の段階希釈液を作製した。
- 3) 接種
 1×10^{-6} および 1×10^{-7} の希釈液を各々100 μ L 接種した。
(接種菌量: 10CFU および 1CFU相当)
- 4) 増菌培養
35°C, 24時間好気培養した。
- 5) 判定
発育の有無および培地色の変化を確認した。

【結果】

- 供試した32株全てで対照とした Lim Broth と同等の発育であった。
- α 溶血を呈する菌株と非溶血性菌株に差は認められず、全て黄色に変色した。



strain	希釈倍率	Lim Broth	検討培地	strain	希釈倍率	Lim Broth	検討培地
ATCC12386	$\times 10^{-7}$	+	+	T-14	$\times 10^{-7}$	+	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-15	$\times 10^{-7}$	+
ATCC13813 非溶血株	$\times 10^{-7}$	+	+	T-16		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-17	$\times 10^{-7}$	+
G-2	$\times 10^{-7}$	+	+	T-18		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-19	$\times 10^{-7}$	+
T-1	$\times 10^{-7}$	+	+	T-20		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-21	$\times 10^{-7}$	+
T-2	$\times 10^{-7}$	+	+	T-22		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-23	$\times 10^{-7}$	+
T-3	$\times 10^{-7}$	+	+	T-24		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-26	$\times 10^{-7}$	+
T-4	$\times 10^{-7}$	+	+	T-27		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-28	$\times 10^{-7}$	+
T-5	$\times 10^{-7}$	+	+	T-29		$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+		T-30	$\times 10^{-7}$	+
T-6	$\times 10^{-7}$	+	+			$\times 10^{-6}$	+
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-7	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-8	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-9	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-10	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-11	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-11	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				
T-13	$\times 10^{-7}$	+	+				
	$\times 10^{-6}$	+	+				

GBS添加回収試験

【方法】

- 前培養
バイタルメディア羊血液寒天培地で35°C, 18 時間好気培養した。
- 菌液調整
McFarland #0.5の菌液を調整後、 $\times 10^{-7}$ の段階希釈液を作製した。
- 接種
 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} の希釈液各々100 μ L を接種した。
- 増菌培養
35°C, 24 時間好気培養した。
- 培養液の希釈
増菌後の培養液を $\times 10^{-8}$ 段階希釈した。
- 回収
 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} の希釈液 100 μ L を羊血液寒天培地にコンラージ棒にて塗布した。
- 測定
35°C, 24 時間好気培養後にコロニーカウンターにてコロニー数をカウントした。

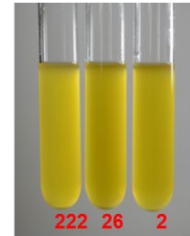
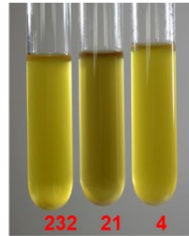
【結果】

- 接種菌数に関わらず、増菌培養後の黄変の程度は同等であった。
- 増菌後の培地中の菌数は接種菌数に関わらず、同一菌株では、ほぼ同数であった。

ATCC13813 (非溶血株)

ATCC12386 (溶血株)

臨床分離株G-2 (溶血株)



strain	接種菌数 (CFU)	24時間培養後の菌数 (CFU/mL)
<i>S. agalactiae</i> ATCC13813	232	5.8×10^{10}
	21	2.4×10^{10}
	4	1.0×10^{10}
<i>S. agalactiae</i> ATCC12386	222	7.0×10^9
	26	1.2×10^{10}
	2	5.8×10^9
<i>S. agalactiae</i> 臨床分離株G-2	284	1.0×10^{12}
	65	7.8×10^{11}
	13	7.0×10^{11}

GBS以外の菌種発育試験 (Staphylococcus属)

【対照培地】

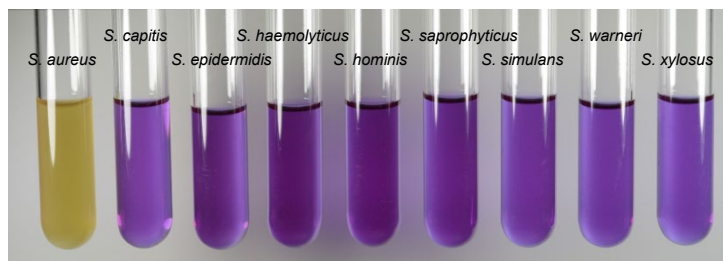
Lim Broth(コリスチン、ナリジクス酸添加Todd Hewitt Broth)

【方法】

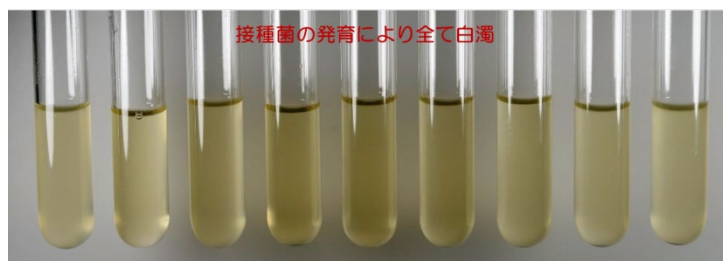
- 前培養
バイタルメディア羊血液寒天培地で35°C, 18 時間好気培養した。
- 菌液調整
McFarland #1.0の菌液を調整した。
- 接種
調整した菌液100 μ L を接種した。
- 増菌培養
35°C, 48 時間好気培養した。
- 判定
24 時間後, 48 時間後に発育の有無および培地色の変化を確認した。

strain	24時間			48時間		
	Lim Broth 発育	検討培地		Lim Broth 発育	検討培地	
		発育	培地色		発育	培地色
<i>S. aureus</i> ATCC43300	+	+	中間色	+	+	黄色
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+	+	紫色	+	+	黄色
<i>S. aureus</i> ATCC29213	+	+	中間色	+	+	黄色
<i>S. capitis</i> ATCC35661	+	NG		+	NG	
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	+	NG		+	NG	
<i>S. haemolyticus</i> ATCC29970	+	NG		+	NG	
<i>S. hominis</i> ATCC27844	+	NG		+	NG	
<i>S. saprophyticus</i> ATCC15305	+	NG		+	NG	
<i>S. simulans</i> ATCC27851	+	NG		+	NG	
<i>S. warneri</i> ATCC17917	+	NG		+	NG	
<i>S. xyloso</i> ATCC29971	+	NG		+	NG	
<i>S. lugdunensis</i> ATCC49576	+	NG		+	+	紫色
<i>S. intermedius</i> GTC00266	+	+	紫色	+	+	紫色
<i>S. hyicus</i> GTC00305	+	+	紫色	+	+	紫色
MRCNS K-1	+	NG		+	NG	
MRCNS K-2	+	NG		+	+	紫色

検討培地

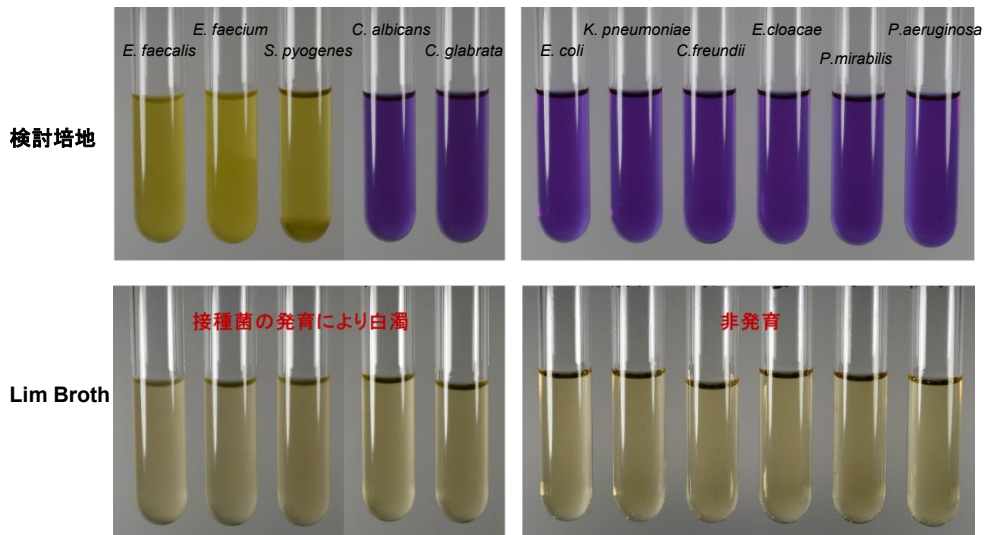


Lim Broth



GBS以外の菌種発育試験(その他)

strain	24時間			48時間		
	Lim Broth 発育	検討培地		Lim Broth 発育	検討培地	
		発育	培地色		発育	培地色
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	+	+	黄色	+	+	黄色
<i>E. faecium</i> ATCC19434	+	+	黄色	+	+	黄色
<i>S. pyogenes</i> ATCC12344	+	+	黄色	+	+	黄色
<i>E. coli</i> ATCC25922	NG	NG	斜線	NG	NG	斜線
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	NG	NG	斜線	NG	NG	斜線
<i>C. freundii</i> ATCC8090	NG	NG	斜線	NG	NG	斜線
<i>E. cloacae</i> ATCC23355	NG	NG	斜線	NG	NG	斜線
<i>P. mirabilis</i> ATCC43071	+	w	紫色	+	+	紫色
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	NG	NG	斜線	NG	NG	斜線
<i>C. albicans</i> ATCC90028	+	+	紫色	+	+	紫色
<i>C. glabrata</i> ATCC90030	+	+	紫色	+	+	紫色
<i>L. salivarius</i> ATCC11741	+	+	紫色	+	+	紫色



結果まとめ

- GBS**
 - 供試した32株全てLim Broth と同等の発育であった。
 - 溶血株と非溶血株による差は認められず、培地は全て黄変した。
- Staphylococcus* spp.**
 - S. aureus* : 3株は発育し、培地は全て黄変した。
 - CNS: 13株は対照としたLim Broth では全て24時間で発育を認めたのに対し、検討培地では、24時間培養では2株、48時間培養では4株が発育し、その他は非発育であった。
- その他の菌種**
 - 連鎖球菌は全て発育し、培地は黄変した。
 - P. mirabilis* を除くグラム陰性桿菌は非発育であった。
 - Candida* spp. は発育を認めたが、培地の黄変は起こらなかった。
 - L. salivarius* は発育を認めたが、培地の黄変は起こらなかった。

結語

検討培地は対照として供試したLim Broth と同等のGBS 発育性能を有していることを確認した。
 また、Lim Broth ではグラム陰性桿菌以外の菌種は全て増殖を認めたのに対し、検討培地では限られた菌種 (*S. aureus* および連鎖球菌) のみ培地色の変化を認め、その他の菌種は非発育もしくは培地色の変化は認めなかった。
 今回の結果より、臨床検体での運用にあたってはLim Broth に比べサブカルチャーの低減が可能となり、検査の効率化が期待できると考える。