

原著論文

アンピシリン感受性とセフロキシム誘発性溶血現象を利用した 牛乳汁由来 *Escherichia coli* の簡易菌種推定の試み

千徳芳彦¹⁾ 大久保宏平¹⁾

1) NOSAI オホーツク北見家畜診療所
〒099-0879 北海道北見市美園 497-1

連絡担当者：千徳芳彦
Tel：0157-66-6702 Fax：0157-35-3911
E-mail：y-sentoku@nosaio.or.jp

【要 約】

牛の乳汁検査において、*Escherichia coli* (EC) とその他 (*Klebsiella* spp. 他) を鑑別するための既存の検査手技は煩雑化することが想定される。臨床家は、より簡易な検査方法を望むが、そのような報告はない。グラム陰性桿菌 (Gram-negative rod-shaped bacteria: GNR) のディスク阻止円周囲には、β溶血とは異なる限局した溶血現象がしばしば観察されるが、本現象に関する報告はなく、その現象を利用した菌種推定への活用もない。そこで、本現象の特徴の菌種推定への活用につき調査したところ、主にβラクタムの阻止円周囲に観察され、セフロキシム (CXM) で最も高頻度 (約50%) に、かつ他抗菌剤で溶血が観察される場合は、CXMでも観察されることがわかった。本現象をCXM誘発性溶血現象 (CXM-induced Hemolysis: CXM Hly) とし、CXM Hlyの菌種別、地域・年代別の発現状況、薬剤耐性との関連性について調査したところ、CXM HlyはECに特異性が高い上、ABPC耐性株で有意に多く、かつ地域・年代を問わず普遍的に観察される現象であることがわかった。また、ECの定義をABPC感受性、あるいは溶血性あり (β・CXM Hly) と仮定した上で、ECとEC以外の理論的な鑑別精度について検証したところ、ABPC耐性割合18%で感度97.4%、特異度90.7%、ABPC耐性割合100%で感度86.0%であり、EC有病率50%以上で、EC的中度はABPC耐性割合にかかわらず90%以上であることが判明した。以上から、ABPC耐性割合にかかわらず簡易で迅速かつ高い精度のECの推定に、ABPC感受性と溶血性の併用が活用できることがわかった。

キーワード：セフロキシム、*E.coli*、グラム陰性桿菌性乳房炎、簡易菌種推定、溶血性

【緒論】

近年、*Escherichia coli* (EC) と *Klebsiella* spp. の乳汁検査における鑑別の必要性についていくつか報告されているが [2, 17, 18]、この2菌種の官能検査による鑑別は習熟度を要することか

ら、臨床現場では鑑別用のキットや特殊培地の利用が普及しつつある [9]。しかしながらキットや培地の使用はコストの増加、作業の混乱から煩雑性が増し [4]、かつ作業に時間がかかることから [9]、実際には現場の臨床家にとっては厳しい選択肢となっている。それらのことから臨床現場では簡易性を重視した菌種推定方法の利用が望まれるが、これまでのところ既存の鑑別方法に変わる簡易な方法の報告はなされて

受付：2015年11月25日
受理：2016年4月25日

いない。

官能検査で菌種推定が困難な牛乳汁由来グラム陰性桿菌 (non-sensory Gram-negative rod-shaped bacteria: ns GNR) のうち、分離頻度が最も高いのは *EC* である [3, 5, 12, 16]。 *EC* の簡易菌種推定のためには、いくつかの指標が考えられていたが、それぞれ単独での応用は難しい。そこで我々は ns GNR の感受性試験 (ディスク拡散法) の血液寒天培地上でしばしば観察される阻止円周囲に局限した溶血現象が、菌種推定に利用可能なのではないかと考えた (図1)。そこで本研究ではまず、その特徴を明らかにすることを試み、かつ本現象を活用して簡易な *EC* の菌種推定方法を考案し、その精度について検証したので報告する。

【材料と方法】

研究材料は、北見家畜診療所で実施された2014年7月から2015年8月の乳汁検査で分離されたグラム陰性桿菌 (Gram-negative rod-shaped bacteria: GNR) のうち、官能検査で菌種推定が困難だった緑膿菌、*Pasteurella spp.*、*Serratia marcescens*、*Proteus spp.* などのコロニー形態・色調・臭気特徴的な菌種は除いた388株を対象とした。

GNR 分離頻度と薬剤耐性状況の調査：

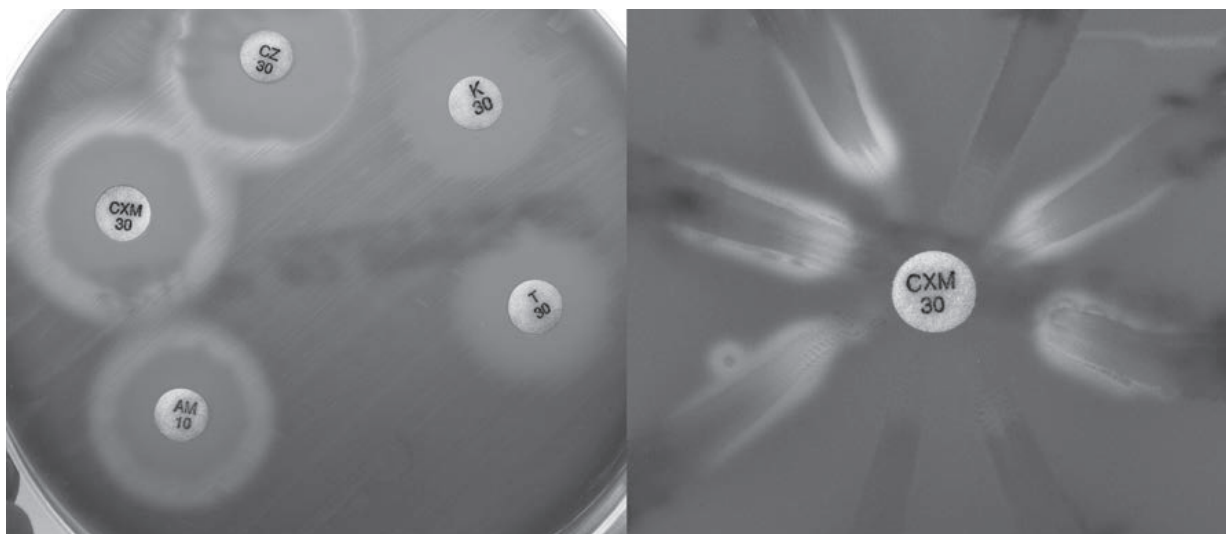
乳汁検体は綿棒で血液寒天培地 (バイタルメディア羊血液寒天培地、極東製薬工業株式会社)

上に塗抹し、37℃ 12-24時間培養した。分離された GNR の同定と薬剤感受性試験は外部検査機関に依頼し (細菌同定・薬剤感受性自動測定装置 VITEC)、同定された菌種の実験頻度、薬剤耐性状況、菌数 +++ 以上を対象とした全身症状発現例の菌種分離割合と全身症状発現割合 (全身症状発現個体数/分離個体数) を調査した。

溶血現象の観察：

外部検査機関に提出したものと同一菌株を血液寒天培地上に適量塗抹しβ溶血、およびディスク拡散法を実施した場合の阻止円周囲の限局的溶血現象を観察し、阻止円周囲の限局的溶血現象が観察されたものについて、その発現時間、抗菌剤および菌種別の陽性頻度 (GNR n=185)、薬剤耐性との関連性 (*E. coli* n=138) について調査した。本現象の普遍性を調査するため、抗菌剤別陽性頻度と過去に別の地域 (網走市・常呂町、1999年9月-2000年3月、全身症状発現例由来 n=64) で調査した GNR の抗菌剤別の溶血割合成績とを突合し、2015年10月から11月に改めて調査した北見地区の成績 (乳汁検査分離例由来 n=109) との比較を行った。なお、この現象がセフロキシム (CXM) で高頻度に観察されることがあらかじめわかっていたので、菌種別陽性頻度、薬剤耐性との関連性について CXM 誘発性溶血現象 (CXM-induced hemolysis: CXM Hly) についても調査

図1 阻止円周囲の限局的溶血現象。βラクトムで見られる (左)。右の写真の画線株は全て *E. coli*。
AM：アンピシリン、CZ：セファゾリン、CXM：セフロキシム、K：カナマイシン、T：オキシテトラサイクリン。



した。

***E. coli* 推定方法の考案と検証：**

E. coli (*EC*) の定義を ABPC 感受性、あるいは溶血性あり (β ・CXM Hly) とし、この定義に合致しないものを *EC* 以外 とし、鑑別精度を評価した。感度と特異度は、ABPC 耐性割合 18% および 100% の場合で *EC* の定義に合致しない *EC* の割合 (偽陰性率)、*EC* 以外の定義に合致しない *EC* 以外の割合 (偽陽性率) を求めて計算した。その結果をもとに、*EC* 有病率 50% および 70% の場合での中度、正確性を計算した。

【統計方法】

菌種と全身症状との関連性は、*Klebsiella spp.* 分離例とその他の分離例の全身症状発現割合、また ABPC 感受性と溶血性との関連性の分析は、ABPC 感受性群と耐性群の間の CXM Hly 陽性割合で、ともに Fisher の直接確率計算法 (両側検定) で検定し、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

【結果】

GNR 分離頻度：

官能検査で菌種推定が困難だった牛乳汁由来 GNR (non-sensory GNR: ns GNR) 388 株の分離割合は、それぞれ *E. coli* (*EC*) 68.6% (266 株)、*Klebsiella spp.* (*Kleb*) 22.6% (*K. pneumoniae* 59、*K. oxytoca* 20、他 9 株)、*Enterobacter spp.* (*Ent*) 4.6% (*E. cloacae* 6、*E. aerogenes* 4、他 8 株)、*Citrobacter spp.* (*Cit*) 2.3% (*C. koseri* 5、*C. freundii* 2、他 2 株)、その他 1.8% (*Chryseobacterium indologens* 2 株、*Acinetobacter baumannii*、*Alcaligenes sp.*、*Myroides odoratus*、*Pantoea agglomerans*、*Serratia sp.* それぞれ 1 株) だった (表 1)。

また、菌数 +++ 以上の症例を詳細に調査したところ、全身症状発現例 (n=112) における菌種別分離割合は *EC* 76.8% (86 例)、*Kleb* 22.3% (25 例) であり、その他 (*Ent*・*Cit*・他) は 0.9% (1 例) であり、その他の全身症状発現例は非常に少なかった。また分離された場合の全身症状発現割合も、*Kleb* と比較し有意に少ないことがわかった ($p = 0.0119$)。 *EC* 以外のみを対象に分析したところ、全身症状発現例

表 1 菌種と各種割合の関連性。ns GNR 全体の CXM Hly 陽性割合は約 50% (88/185 株) であり、先に行った調査、および 15 年前の別の地区の調査成績とほぼ同じだった (図 2)。

菌種	分離 % (n=388)	ABPC 耐性 % (n=388)	溶血性 % (n=185)			菌数 +++ 以上の個体 (n=207)			
			株数	CXM Hly	β 溶血	全身症状発現例 (n=112)			
						個体数	分離 %	全身症状 発現 % ^{g)}	
<i>E. coli</i>	68.6	18.0	126	66.7 (84.0) ^{c)}	10.0 ^{f)}	137	76.8	62.8	
<i>E. coli</i> 以外	31.4	97.5	59	6.8	0	70	23.2	37.1	
<i>Klebsiella spp.</i>	22.6	97.7	47	4.3 ^{d)}	0	56	22.3	44.6 ^{h)}	
その他	8.8	97.1	12	16.7	0	14	0.9	7.1 ^{h)}	
<i>Enterobacter spp.</i>	4.6	100	3	0	0	14	0.9	7.1	
<i>Citrobacter spp.</i>	2.3	100	6	33.3 ^{e)}	0	0	0	0	
他 ^{a)}	1.8	85.7	3 ^{b)}	0	0	0	0	0	

a) *Chryseobacterium indologens* 2 株、*Acinetobacter baumannii*、*Alcaligenes sp.*、*Myroides odoratus*、*Pantoea agglomerans*、*Serratia sp.*

b) *Serratia spp.* 2 株、*Chryseobacterium indologens* c) ABPC 耐性株 d) *Klebsiella pneumoniae*、*K. oxytoca* それぞれ 1 株

e) *Citrobacter koseri* 2 株 f) 株数=140 g) 全身症状発現個体数/分離個体数 h)~h) 直接確率 $p = 0.0119$

で *Kleb* 96.2% (25 例)、その他が 3.8% (1 例)であった (表 1)。

薬剤耐性状況：

菌種別の ABPC 耐性割合は、*EC* 18.0% (48/266 株中)、*Kleb* 97.7% (86/88 株)、*Ent* 100% (18/18 株)、*Cit* 100% (9/9 株) であり、その他が 85.7% (6/7 株) であった。また、ABPC 感受性によって ns GNR を *EC* と *EC* 以外のグループに分けることができた (表 1)。セファゾリン耐性割合は、それぞれ 5.3%、19.3%、100%、88.9%、90.0%であった。

溶血現象の観察：

β 溶血が確認されたのは *EC* のみであり、その頻度は 10% だった (14/140 株) (表 1)。阻止円周囲の限局的な溶血現象の発現時間は、早くて 6 時間後、通常では 12 時間後以降において観察することができた。この溶血現象は、発育阻止濃度前後の特定濃度でのみ発現しており (図 1)、抗菌作用との関連性が示唆された。ns GNR による各抗菌剤別の溶血現象の頻度を網走市・常呂町で 2000 年に調査した成績、およびそれに 2015 年において追加調査した成績を記した (図 2)。本現象はエンロフロキサシンを除けば β ラクトム系でのみ観察され、カナマイシン、オキシテトラサイクリン、エリスロ

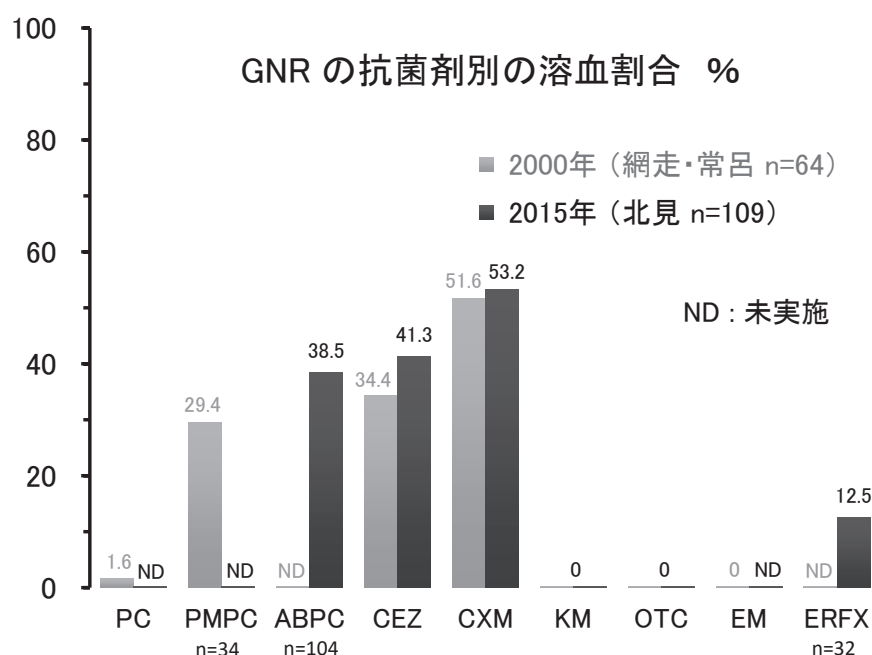
マイシンでは確認されなかった。CXM で最も高頻度に観察され、他抗菌剤で溶血現象が確認できる場合には必ず CXM も陽性であった (溶血株総数 n=179)。その事実を踏まえ、以降は本溶血現象を CXM 誘発性溶血現象 (CXM - induced Hemolysis: CXM Hly) とした。

15 年前の異なる地域との比較により、抗菌剤別の溶血現象の発現割合には年代・地域による差がほとんどないことがわかった (図 2)。また、合計 3 回の調査において ns GNR 全体における CXM Hly 陽性割合にも約 50% とほとんど差がなく (表 1 との比較)、年代・地域を問わずこの現象は普遍性が高いことが推察された。

菌種と CXM Hly との関係：

菌種別の CXM Hly について調査したところ、*EC* が 66.7%、*Kleb* が 4.3%、*Ent* が 0%、*Cit* が 33.3% で陽性であったことから、この現象が *EC* に対して特異性が高いことがわかった (表 1)。今回の GNR の定義から外れるが、*Proteus spp.* にも一部 CXM Hly 陽性株が存在した (1/4 株)。また、その他のマイナーな菌種では CXM Hly 陽性株は確認できなかった。なお、GNR 全体の CXM Hly 陽性割合は 47.6% (88/185 株) だった。

図 2 「官能検査で菌種推定が困難な牛乳房炎由来 GNR: ns GNR」の抗菌剤別の限局的溶血現象の頻度。2000 年 (網走市・常呂町)、2015 年 (北見地区) に調査。主に β ラクトム系で見られ、CXM の頻度が最も高い。EM: エリスロマイシン、ERFX: エンロフロキサシン、OTC: オキシテトラサイクリン、KM: カナマイシン、PC: ペニシリン、PMPC: ピブメシリナム。



薬剤耐性と CXM Hly の関連性：

EC における薬剤耐性と CXM Hly との関連性について調査したところ、ABPC 耐性株において CXM Hly 陽性頻度がより高いことがわかった (84.0% vs. 61.1%, $p=0.0363$ 、それぞれ $n=25$ 、113)。その他の抗菌剤耐性との関連性は認められなかった。

EC 推定方法の考案と検証：

ABPC 耐性割合 18% における偽陰性率は 2.6% (ABPC 耐性割合 18% × CXM Hly 陰性割合 16% × β 溶血陰性割合 90%)、偽陽性率は 9.3% (ABPC 感受性割合 2.5% + CXM Hly 陽性割合 6.8% + β 溶血陽性割合 0%) であった。ABPC 耐性割合 100% では偽陰性率は 14% であった。この結果から、ABPC 耐性割合 18% では感度は 97.4% (ABPC 耐性割合 100% で 86.0%)、特異度 90.7% となった。また、ABPC 耐性割合 18、100%、*EC* 有病率 50、70% では、*EC* 的中度 90.5–96.2%、*EC* 以外の的中度 73.4–97.3%、正確性は 87.4–95.2% であった。ABPC 耐性割合にかかわらず、*EC* 有病率の増加により *EC* 的中度は増加した一方、ABPC 耐性割合の低下や *EC* 有病率の低下により *EC* 以外の的中度は増加した (表 2)。

【考察】

官能検査で菌種推定が困難な牛乳汁由来グラム陰性桿菌 (non-sensory Gram-negative rod-shaped bacteria: ns GNR) の簡易な菌種推定方法を考案するにあたり、まずその菌が分離される頻度について調査した。菌種別の分離頻度は過去の報告と同様であり [3, 5, 12, 16]、ns GNR は *E.coli* (*EC*) (68.6%) と *EC* 以外 (31.4%) の 2 つに大きく分けることができた (表 1)。最も分離頻度が高い *EC* の推定により、残りの検査による手間とコストの削減が期待できた。*EC* 以外は、*Klebsiella spp.* (*Kleb*) とその他に分けられるが、その約 70% が *Kleb* であることがわかった。また全身症状との関連性の調査では、その他の菌種により全身症状が発現することは *Kleb* より有意に少なく ($p=0.0119$)、全身症状がある場合、*Kleb* の分離割合が非常に高いこともわかった (96.2%、表 1)。したがって、状況により *EC* であることが否定できれば、*Kleb* はほぼ確定することができ、*Kleb* を推定する簡易で有用な方法がない現状においては、*EC* をまず先に推定の方が合理的であると考えた。

EC の簡易推定方法を考案するにあたり、まず ABPC の感受性を考えた。乳汁由来 *EC* は他の菌種と異なり、通常 ABPC 感受性である [7,

表 2 簡易推定方法の理論的精度。*E.coli* の定義を「ABPC 感受性 あるいは溶血性 (β 、CXM Hly) あり」とした場合、*E.coli* 有病率 50% 以上では、ABPC 耐性割合にかかわらず *E.coli* 的中度は 90% 以上。

<i>EC</i> ^{a)} ABPC 耐性割合		18.0 (100) ^{b)}	
<i>EC</i> 有病率		50.0	70.0
感 度		97.4 (86.0)	
特 異 度		91.0 (91.0)	
<i>EC</i> 的中度		91.5 (90.5)	96.2 (95.7)
<i>EC</i> 以外 的中度		97.3 (86.7)	92.9 (73.4)
正 確 性		94.3 (88.5)	95.2 (87.4)
単位 %		a) <i>E. coli</i>	b) () ABPC耐性割合 100%の場合

11, 14] ことから、海外でも乳汁由来の *EC* の ABPC 耐性の割合は 10-30% である。この割合は、年毎で変動は予想していたほど高くはなく [3, 5, 8, 12, 16]、今回の調査でも同様にその耐性割合は 18% 程度であった (表 1)。このことは糞便由来 *EC* の多くが ABPC 耐性であることと対照的であり [5]、またその他の菌種は染色体上で保有する β ラクタマーゼの性質上 ABPC 自然耐性である [7, 10, 11, 14]。ABPC 耐性割合を調査した結果では想定した通り ns GNR を 2 グループに分けることができた (表 1)。しかし、ABPC 耐性割合の変動幅を考えた場合では、ABPC 感受性単独では *EC* の菌種推定は難しくなることが予想された。

溶血性においては、乳汁由来 *EC* には他の ns GNR にはほとんど見られない β 溶血株が存在しているが [6, 15]、今回の調査でも *EC* 以外の菌種には全く溶血は見られなかった。その頻度は過去の報告 [6] と同じく 10% 程度と低い頻度であった (表 1)。溶血は *EC* を特徴づける重要な指標ではあるが、 β 溶血単独での菌種推定は難しい。一方、 β 溶血とは異なるディスク周囲の限局した溶血現象 (図 1) についても全く報告がなく、現時点ではこの現象が菌種推定に利用できるかどうかは不明である。本研究では本現象の特徴を明らかにすることも目的としている。ns GNR における本溶血現象の薬剤別の発生状況を調査したところ、主にこの現象は β ラクタム系の抗菌剤で観察される現象であることがわかった (図 2)。特に CXM で陽性頻度は約 50% と最も高く、かつ他剤で溶血現象が確認できる場合では必ず CXM も陽性となった。CXM 誘発性溶血現象 (Cefuroxime-induced Hemolysis: CXM Hly) の年代別・地域別発現状況について調査したところ、別地域の 15 年前の発現割合とほとんど差がなく (図 2)、特に ns GNR における CXM Hly 陽性割合が合計 3 回の調査でほぼ同様に約 50% だったことから (図 2、表 1)、この現象が ns GNR に普遍的なものであり、どの国・地域でも観察される現象であると示唆することができた。また CXM Hly と菌種との関連性を調査したところ、*EC* の 70% 近くの株で観察される *EC* に特異性の高い現象であることがわかった (表 1)。*Kleb* でも 47 株中 2 株で CXM Hly が陽性だっ

たが、羊赤血球に対する溶血性は通常ないとされていることから [1, 19] この 2 株は特殊であったといえる。*Citrobacter spp.* の一部を除き、ブドウ糖非発酵菌の類のその他のマイナーな菌種は、今のところ陽性株は確認できていない。*Citrobacter spp.*、*Enterobacter spp.* を含めたマイナーな菌種はまだ調査した株数が少ないので今後さらに検討する必要があるが、それらの分離頻度は簡易推定の上では特に問題にならないと思われる (表 1)。またこの菌種の特異性は、CXM Hly の性質が容易に菌種の壁を越えるようなプラスミド性である可能性は低いと考えられる。さらに、R プラスミド性の可能性について確認するために、薬剤耐性状況との関連性を調査したところ、*EC* の ABPC 耐性株の CXM Hly 陽性頻度は 84.0% であり、感受性株の 61.1% よりも高いことがわかった ($p=0.0363$)。したがって CXM Hly は ABPC 耐性割合が高い地域で高い頻度で観察される可能性が示唆された。一方その他の抗菌剤との関連性は見られなかったので、上記菌種特異性との関連性も含め、AmpC 型や基質拡張型 β ラクタマーゼ産生などのプラスミド性の可能性は低いと考えられ [11, 13, 14]、局地的に発現頻度が大きく異なる可能性は低いと思われた。これらは、CXM Hly がどの国・地域でも普遍的に観察できる現象であることを強く示唆している。

以上のことから、CXM Hly は① *EC* 特異性が高い、② ABPC 耐性株でより多く発現する、③ 普遍的に観察される現象という、菌種推定に利用可能な 3 つの特徴があることがわかった。CXM Hly と ABPC 感受性との関連性が明らかになったことから、*EC* のもう 1 つの特性である β 溶血性を加えた *EC* の推定方法を検証した。*EC* の定義を ABPC 感受性あるいは溶血性あり (β , CXM Hly) とし、*EC* 以外の定義を ABPC 耐性かつ溶血性なしとした場合で鑑別精度を計算したところ、*EC* の ABPC 耐性割合が 18% の場合、感度 97.4%、特異度 90.7%、ABPC 耐性割合が 100% では感度は 86.0% だった (表 2)。ABPC 耐性割合の増減に合わせて *EC* 全体の CXM Hly 陽性割合も増減したので、CXM Hly 単独の場合よりも安定した精度が期待できることがわかった。的中度においても総

じて高く、*EC* 的中度は ABPC 耐性割合にかかわらず *EC* 有病率（分離割合）が高いほど高値を示すことがわかった。一方、*EC* 以外の的中度は、*EC* 有病率がより低いほど、ABPC 耐性割合がより低いほど高値を示すことがわかった。以上のことから、*EC* と鑑別された場合には ABPC 耐性割合にかかわらず *EC* と推定できること、また *EC* 以外と鑑別された場合でも、*EC* の ABPC 耐性割合が 100% のような極端な場合でなければ *EC* 以外であると推定できることがわかった。したがってどの国や地域においても臨床的に問題なく *EC* と *EC* 以外に識別することができると思われた。なお、*EC* 以外の約 70% は *Kleb* であったが、全身症状を伴う症例で *EC* が否定された場合、そのほとんどが *Kleb* であり（表 1）[18]、その可能性を強く疑った対応が可能であった。

菌種推定方法を考案するにあたり、その分離頻度、臨床的重要性、公衆衛生学的重要性から ns GNR を *EC*、*Kleb*、その他の 3 つのグループに分けて検討するのが合理的であると思われた。臨床的には *EC* よりも *Kleb* で重篤化するとの報告もあるが [17, 18]、現場の臨床家が望むような簡易で有用な *Kleb* 推定方法がない現状では、まず *EC* を先に推定（あるいは否定）すべきである。今回の調査により、*EC* の特性、すなわち ABPC 感受性、溶血性（CXM Hly、 β 溶血性）を併用すれば、高い精度で *EC* であることを推定することが可能であった。また *EC* 以外も高い精度で推定することが可能であり、特に全身症状発現例では、その分離頻度から *Kleb* とほぼ確定できることがわかった。

CXM Hly の利点として、簡易性の他にコスト、再現性の高さ、迅速性が挙げられる。使う資材・器材が少ないだけでなく、*EC* を推定する精度が高いことから *EC* 以外の菌種を同定する場合でも同定検査にまわす検体数を大幅に削減することができ、コストダウンと業務軽減もできる。また、CXM Hly および β 溶血性は視認性が高いため再現性が高く確認作業に時間もかからないという利点も併せて持つ。CXM Hly は 6-12 時間で判定でき、感受性が判定できる程度のコロニーが生えれば CXM Hly の確認が可能である。検体培養と感受性試験を同時に行う簡易方法（直接法）でも実施可能であり、

翌日には鑑別できる。今後は更なるコストと業務軽減のためにも *Kleb* とその他を鑑別する簡易な方法について検討したいと考えている。また、CXM Hly の発現機序は不明であるが、 β ラクタムの発育阻止濃度前後の特定の濃度で発現する抗菌作用との関連性が示唆されたことから（図 1）、CXM が最多である理由や ABPC 耐性株が多い理由または溶血素の種類とその放出（あるいは漏出）機序についても今後検討したい。

本研究において、ns GNR のうち最も分離頻度が高い *EC* を特別な検査手技に頼らず低コストでどの地域でも高い再現性で迅速に菌種が推定できる可能性を示すことができた。現場における簡易性を重視した本推定法は、多忙で制約の多い臨床家にとって有用な菌種推定方法の 1 つになりうるものと思われた。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、忙しい業務中ご協力頂いた、NOSAI オホーツク 北見家畜診療所の皆さまに深謝いたします。

参考文献

1. Albesa I, Barberis LI, Pajaro MC, Farnochi MC, Eraso A. 1985. A thiol-activated hemolysin in gram-negative bacteria. J. Can J Microbiol. Mar; 31 (3): 297-300.
2. Bannerman D.D. 2004. Characterization of the Bovine Innate Immune Response to Intramammary Infection with *Klebsiella pneumoniae*. J. Dairy Sci. 87: 2420-2432.
3. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC and White DG. 2002. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens. During a Seven-Year Period. J. Dairy Sci. 85:1111-1118
4. 福井 祥悟, 松原 靖, 伊藤 隆晶, 渡辺 英樹. 2006. 牛乳房炎起因菌の迅速・簡易同定における酵素基質培地の有用性. 家畜診療 53 (11), 651-656
5. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C et al. 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. Acta Vet Scand. 50 (1): 28
6. 布施勝利, 函城悦司, 菊池直哉, 中野良宣, 中岡祐司, 村上晋一. 1993. 乳牛の甚急性乳房炎から分離された大腸菌の性状. 日獣会誌 46, 917-919
7. 池田文昭. 多剤耐性菌検査の手引き. アシネトバクターを含むブドウ糖非発酵菌. 2012. 日本臨床微生物学会
http://www.jscm.org/tazaitaisei/54_03-02.html
8. 神野雅子, 今村智子, 杉山美恵子, 豊田洋治. 2010. *Klebsiella Pneumoniae* による牛甚急性乳房炎に対する抗生剤の使用法の検討. 家畜診療, 57, 259-263
9. 菊 佳男. 2015. わが国における牛乳房炎の発生状況ならびにその問題点と対策: 乳牛の乳房炎に関する全国アンケート調査から. 家畜感染症学会誌 4 (3), 109-132
10. 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業 JANIS. 2014.
http://www.nih-janis.jp/report/open_report/2014/3/1/ken_Open_Report_201400.pdf
11. 小松方, 多剤耐性菌検査の手引き. 腸内細菌. 2010. 日本臨床微生物学会
http://www.jscm.org/tazaitaisei/54_03-01.html
12. Metzger SA and Hogan JS. 2013. Short communication: Antimicrobial susceptibility and frequency of resistance genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. J. Dairy Sci. 96 : 3044-3049
13. 中村文子, 近藤成美. 2010. 「臨床検査ひとくちメモ」 No.205. モダンメディア 56 (10) : 250-256
14. 大西守, 加藤肇, 大野浩. 2008. 乳房炎起因菌の薬剤耐性化の現状と牛における多剤耐性菌の疫学. 家畜診療 55, 17-26
15. 小栗豊子 編. 2008. 臨床微生物検査ハンドブック 第三版. 三輪書店, 東京 pp83-91
16. 酒見蓉子, 御囲雅昭, 篠田浩二郎, 村松康和, 上野弘志, 田村豊. 2010. 北海道石狩地域における牛乳房炎由来 *Escherichia coli* および *Klebsiella* 属菌の薬剤感受性. 日獣会誌 63, 215-218
17. Schukken YH, Bennett GJ, Zurakowski MJ, Sharkey HL, Rauch BJ, Thomas M J, Ceglowski B, Saltman RL, Belomestnykh N and Zadoks RN. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. J. Dairy Sci. Dec; 94 (12): 6203-15.
18. 杉山美恵子, 渡部雅子, 園部隆久, 村上慶政, 井原晴喜, 豊田洋治. 2013. 乳牛の *Klebsiella pneumoniae* による甚急性乳房炎の診断と治療方法の検討. 家畜診療 60, 265-270
19. Sztramka B1, Kurlenda J, Bielawski K. 1998. Hemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. Med Dosw Mikrobiol. 50 (3-4): 207-13.

An attempt of the simple estimation of *Escherichia coli* from dairy cows mastitis by combination with aminobenzylpenicillin susceptibility and cefuroxime-induce hemolysis

Yoshihiko Sentoku¹⁾, Kohei Okubo¹⁾

1) Kitami Veterinary Clinic, Okhotsk Agricultural Mutual Aid Association
(497-1 misono, kitami-shi, hokkaidou 099-0879)

Correspondence to Yoshihiko SENTOKU
TEL: 0157-66-6702 FAX: 0157-35-3911
E-mail: y-sentoku@nosaiok.or.jp

[Abstract]

Microbiological examination procedures of dairy cows mastitis to distinguish *Escherichia coli* (*EC*) from *Klebsiella spp.* other (the others) have been complicated. Although there is a need for more simple differential methods for clinicians, such methods are not reported. The local hemolysis that different from the β hemolysis, around a zone of inhibition of Gram-negative rod-shaped bacteria (GNR) on blood agar plates is often observed, but this phenomenon is not reported. We investigated characteristics of the phenomenon for estimation of strains of GNR. It was observed mainly around of β -lactam, hemolysis by cefuroxime (CXM) was the highest frequency and always positive when observed hemolysis by other antibiotics. So, it was named CXM-induced Hemolysis (CXM Hly) for convenience. We investigated CXM Hly expression status of each strains, at another region of 15 years ago, relevance of the antibiotics resistance. It was observed in high specifically at *EC*, universally regardless of regions and age, more highly frequency in aminobenzylpenicillin (ABPC) resistance *EC* than ABPC susceptible significantly. We assumed *EC*'s definition is "ABPC susceptible, or hemolytic (β , CXM Hly) " for distinguish *EC* from the others. According to it, theoretical discrimination accuracy were sensitivity 97.4% and specificity 90.7% in ABPC resistance ratio 18%. If ABPC resistance ratio 100%, sensitivity 86.0%. In *EC* prevalence of 50% or more, *EC* predictive value were more than 90% regardless of *EC*'s ABPC resistance ratio. We concluded that it is possible to distinguish *EC* from the others by combination with ABPC susceptibility and hemolysis with a high degree of accuracy, very simply and rapidly.

Key words: cefuroxime, coliform mastitis, *E.coli*, estimate a strain, hemolysis

