

原著論文

牛乳汁由来グラム陰性桿菌の簡易菌種推定の試み —臨床疫学的、公衆衛生学的分類とその簡易グループ推定法—

千徳芳彦、大久保宏平

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@nosaiok.or.jp

【要 約】

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）は分離頻度と薬剤感受性、臨床的、公衆衛生学的重要性から「*Escherichia coli* (EC)」、*Klebsiella spp.* (Kleb)、「その他」の3つのグループに分類できた。鑑別培地あるいはEC簡易推定方法で「EC以外」とされたグループからKlebを同定・推定するには外部検査機関への依頼や市販キット、特殊染色などを行う必要があるが、臨床現場ではより簡易性とコストを重視した推定方法が望まれる。上記3群へのグループ分けを前提としたns GNRの菌種推定方法を考案するにあたり、まず、「EC以外」に鑑別されたグループにおけるKlebの簡易推定方法について検討した。「Kleb」の定義をCEZ感受性、「その他」の定義をCEZ耐性とした場合の理論的な鑑別精度について検証したところ、CEZ耐性割合によって感度は大きく変動するが特異度は94.1%と高く、通常想定されるKlebの分離割合ではCEZ耐性割合にかかわらずKleb的中度は89.5–99.7%で、「Kleb」と鑑別された場合にはKlebと推定できることがわかった。一方、「その他」の的中度はCEZ耐性Klebの存在により非常に低かった。第一鑑別にEC簡易推定方法、第二鑑別にKleb簡易推定方法を用いたns GNRのグループ推定方法（簡易二段鑑別法）を用いた場合、ns GNRの7–8割は菌種が推定でき、同定検査にかかわる手間やコストの大幅な削減が期待できた。簡易二段鑑別法は、制約の多い臨床現場において有用な菌種推定方法の1つになりうると思われた。

キーワード：*E.coli*、グラム陰性桿菌、*Klebsiella*、簡易菌種推定、牛乳房炎

【はじめに】

近年、*Escherichia coli* (EC) と *Klebsiella spp.* (Kleb) による病原性の違いに関する報告がいくつかなされ [3, 27, 28]、両者の鑑別意義について認識されつつある。牛乳汁由来グラム陰性桿菌（Gram-negative rod-shaped bacteria: GNR）の菌種を推定するにあたり、ECを推定・

鑑別する方法には市販の鑑別培地が一般的となってきたが [9, 14]、Klebを推定・鑑別することはできない。我々はよりコスト、作業効率を考慮したECの簡易推定法について過去に報告し、全身症状発現例では「EC以外」とされた場合にはほとんどKlebであることを明らかにしたが [26]、局所症状のみのもや症状の情報が不明なものについては応用ができない。「EC以外」のグループからKlebを同定・推定するには外部検査機関への提出やキット、莢膜染色などを行う必要があり、コストと時間

受付：2016年6月29日
受理：2017年2月16日

がかかるのが現状である。人員・作業スペースの不足やコストなどの問題からより簡易性を重視した Kleb 推定方法が望まれるが、そのような報告は見当たらない。

官能検査で菌種推定が困難な GNR (non-sensory GNR: ns GNR) は菌種別分離頻度と薬剤感受性、臨床的重要性、公衆衛生学的重要性から「EC」、「Kleb」、「その他」の3つのグループに分類できることが予測される [6, 12, 16, 26, 27, 28]。特に薬剤感受性において、「EC以外」のグループでは Kleb を除くほとんどがセファゾリン (CEZ) 耐性であるため [1, 12, 15, 16, 21]、CEZ 感受性の有無が Kleb 推定の指標の1つになりうる。Kleb は基質拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamases; ESBLs) 産生性をもつことがあることが広く知られているため CEZ 耐性割合の地域による変動が予想されるが、その分離頻度は今のところ非常に低い [4, 5, 17, 18, 20, 22, 23]。そこで、市販鑑別培地や EC 簡易推定方法により「EC以外」とされたグループにおいて、セファゾリン感受性に従って Kleb を推定した場合の理論的精度と実用性について検証した。また、これらの結果をもとに ns GNR から「EC」、「Kleb」、「その他」の3つのグループを簡易に推定する方法についてチャート化し、同定検査にかかわる業務軽減、コスト削減効果について検証したので報告する。

【材料と方法】

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、緑膿菌、*Pasteurella* spp.、*Serratia marcescens*、*Proteus* spp. などのコロニー形態・色調・臭気特徴的な菌種を除いた、すなわち官能検査で菌種推定が困難だった GNR (non-sensory GNR: ns GNR) 388 株を対象とした。

分離頻度と薬剤感受性状況：乳汁検体は綿棒で羊血液寒天培地 (極東製薬工業株式会社) 上に塗抹し、37°C 12 - 24 時間培養した。分離された ns 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)、同定された菌種の分離頻

度、アンピシリン (ABPC) およびセファゾリン (CEZ) 薬剤感受性状況について調査した。また、その結果をもとに ns GNR のグループ分けを試みた。

簡易菌種推定方法の考案と検証：

1. Kleb 簡易推定方法 (CEZ 感受性による Kleb 推定方法) の妥当性評価：EC を除外した 122 株を対象とした CEZ 感受性データから、「Kleb」の定義を CEZ 感受性とし、「その他」の定義を CEZ 耐性とした場合の、偽陽性率、偽陰性率を試算し、CEZ 耐性割合が 19.3・50.0% [2, 13, 15, 21, 24]、Kleb 有病率が 50・72・96% [26, 28] の場合を想定して、感度、特異度、陽性反応的中度 (Kleb 的中度)、陰性反応的中度 (「その他」的中度)、正確性をシミュレートした。

2. ns GNR 簡易グループ推定方法 (簡易二段鑑別法) の考案と「その他」に鑑別される検体数の予測：EC 簡易推定方法と Kleb 簡易推定方法を併用した場合の、ns GNR のグループ推定方法について、視覚的にわかりやすくチャート作成を試みた。また、「その他」に鑑別されたグループを同定検査に供する場合を想定し、業務量やコスト検証のため検体数を予測した。EC の分離割合 60%、ABPC 耐性割合 18.0・100%、感度 84.0・97.0% [26]、Kleb の分離割合 30%、CEZ 耐性割合 19.3・50.0%、感度 50.0・80.7% で予測した。

【結果】

分離頻度と薬剤感受性：官能検査で菌種推定が困難だった 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. 4.6% (*E.cloacae* 6、*E.aerogenes* 4、他 8 株)、*Citrobacter* spp. 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。

「EC 以外」のグループ内における分離割合 (n=122) は、Kleb 72.1%、その他 (*Enterobacter* spp.、*Citrobacter* spp.、他) 27.9% だった。菌種別の分離頻度から「EC」、「Kleb」、「その他

(*Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, 他)」の3つのグループに分けられることがわかった(図1)。

ABPC 耐性割合は EC18.0%、Kleb97.7%、「その他」97.1%、CEZ 耐性割合は EC5.3%、Kleb19.3%、「その他」94.1%だった。ns GNR は ABPC と CEZ 感受性の有無でも上記3つのグループにわけられ、「EC 以外」では CEZ 感受性の有無で2つのグループに分けられることがわかった(図1)。

簡易菌種推定方法の考案と検証：

1. Kleb 簡易推定方法 (CEZ 感受性による Kleb 推定方法) の妥当性評価: CEZ 感受性データから偽陽性率 5.9%、偽陰性率 19.3%と計算された。これらから、CEZ 耐性割合が 19.3・50.0%、Kleb 有病率が 50・72・96%の場合を想定して、感度、特異度、陽性反応的中度 (Kleb 的中度)、陰性反応的中度 (「その他」的中度)、正確性をシミュレートした結果、CEZ 耐性割合により感度は大きく変動したが、特異度および Kleb 的中度は CEZ 耐性割合にかかわらず非常に高い値だった。また Kleb 的中度は Kleb 有病率が増加するほど高い傾向を示した。一方、「その他」的中度は Kleb 有病率および CEZ 耐性割合が低下するほど高値を示したが、今回のシミュレート範囲では非実用的な低値だった。

正確性は 80%以上であったが、「その他」的中度と連動して変化した(表1)。

2. ns GNR 簡易グループ推定方法 (簡易二段鑑別法) の考案と「その他」に鑑別される検体数の予測: EC 簡易推定法を第一鑑別、CEZ 感受性による Kleb 簡易推定法を第二鑑別とした場合の ns GNR のグループ推定方法について、視覚的にわかりやすくチャートを作成した(簡易二段鑑別法、図2)。簡易二段鑑別法において、「その他」に鑑別されたグループを同定検査に供する場合を想定し業務量やコスト検証のため EC の ABPC 耐性割合 18.0-100%、Kleb の CEZ 耐性割合 19.3-50.0%の場合のそれぞれの感度から検体数を予測した結果、ns GNR100 株中の 70 から 85 株で菌種を推定できることがわかり、業務軽減、コスト削減が期待できることがわかった。

【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) の菌種別の分離頻度は過去の報告とほぼ同様であり [8, 11, 19, 24]、最も分離頻度の高かったのは *E.coli* (EC) で 68.7%、次に高かったのは *Klebsiella spp.* (Kleb) で 22.6%であった。「EC 以外」のグルー

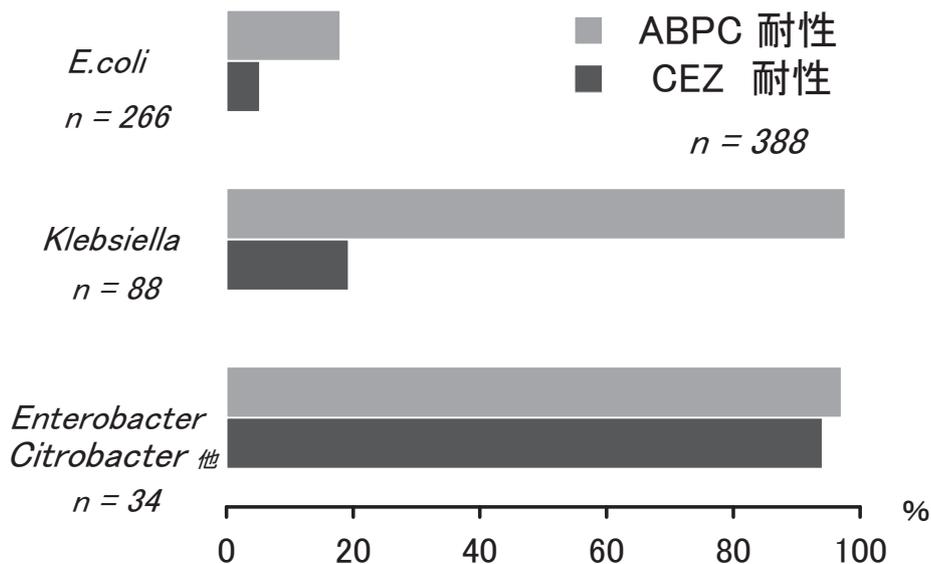


図1 官能検査で菌種推定が困難だった牛乳汁由来GNR (ns GNR) 388株の菌種別分離頻度とアンピシリン・セファゾリン感受性による分類。3群に分けられた。

表1

*Klebsiella*簡易推定法による*Klebsiella spp.*推定精度評価。セファゾリン耐性割合、*Klebsiella spp.*分離割合をシミュレートした。

<i>Kleb</i> * CEZ 耐性割合	19.3 (50.0) ***			%
<i>Kleb</i> 有病率 **	50.0	72.0	96.0	
感 度	80.7 (50.0)			
特異度	94.1			
<i>Kleb</i> 的中度	93.1 (89.5)	97.3 (95.7)	99.7 (99.5)	
その他の中度	82.1 (65.3)	65.3 (42.1)	16.9 (7.3)	
正 確 性	86.8 (72.1)	84.4 (62.3)	81.3 (51.8)	

* *Klebsiella spp.*、** *E.coli* 以外のグループにおける*Klebsiella spp.*の分離割合

*** ()CEZ耐性割合が50.0%の場合

プ内における分離割合は *Kleb* 72.1%、その他 (*Enterobacter spp.*、*Citrobacter spp.*、他) 27.9% で、「EC 以外」の内、約 70% が *Kleb* であった。日々の乳汁検査の菌種別分離頻度により、「EC」、「*Kleb*」、「その他」の 3 グループに分類可能だった。全身症状発現例においても、EC、*Kleb* の分離頻度は高く、「その他」の分離頻度は非常に低いこと [26, 28]、*Kleb* は EC よりも重篤化する傾向にあると報告されていることから [3, 27, 28]、臨床的視点からも同様にこの 3 グループに分類可能である。

また、ns GNR は薬剤感受性（それぞれが染色体性に持つ β ラクタマーゼの性質）でも、上記 3 グループに分類できることが予測できた [6, 12, 16]。すなわち ABPC 感受性の「EC（構成型の AmpC 型）」、ABPC 耐性かつ CEZ 感受性の「*Kleb*（クラス A 型）」、ABPC・CEZ ともに耐性の「その他（誘導型の AmpC 型）」である。薬剤感受性でも予測通り、3 つのグループに分類することが可能であった（図 1）。薬剤感受性には R プラスミドが関与してくる可能性が高いので地域によっては多少の変動が想定されるが、実際には牛乳汁由来 GNR における基質拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamases: ESBLs) や AmpC などのプラスミド性 β ラクタマーゼ産生菌の分離頻度は非常に低いことが報告されている [4, 5,

17, 18, 20, 22, 23]。「その他」はもともと分離頻度が低く、特に全身症状発現例からはほとんど分離されないが、多剤耐性あるいは多剤耐性化しやすいグループなので公衆衛生上重要である。

ns GNR の菌種推定を行うには、EC を推定することを第一鑑別、「EC 以外」のグループから *Kleb* を推定することを第二鑑別とした、二段階のグループ推定が合理的であると思われた（簡易二段鑑別法）（図 2）。第一鑑別、すなわち EC の簡易推定には、市販鑑別培地（クロモアガー）の他に ABPC 感受性と溶血性を利用した EC 簡易推定方法がある [26] が、コストと簡易性を重視するため第一鑑別には EC 簡易推定法を用いることとした。第二鑑別、すなわち「EC 以外」における *Kleb* と「その他」の鑑別は通常であれば外部検査機関に依頼するか市販同定キット、莢膜染色などが必要になる。しかし、同定作業にはコストの増加と業務の煩雑化が避けられない。そこで、*Kleb* がもともと CEZ 感受性であることを利用した簡易な鑑別方法の可能性について検証した。

「EC 以外」の菌種は、CEZ 感受性群、CEZ 耐性群の 2 グループに分類可能であった（図 1）。これらの結果から、「*Kleb*」の定義を CEZ 感受性、「その他」の定義を CEZ 耐性として、*Kleb* の簡易推定方法の理論的精度について検

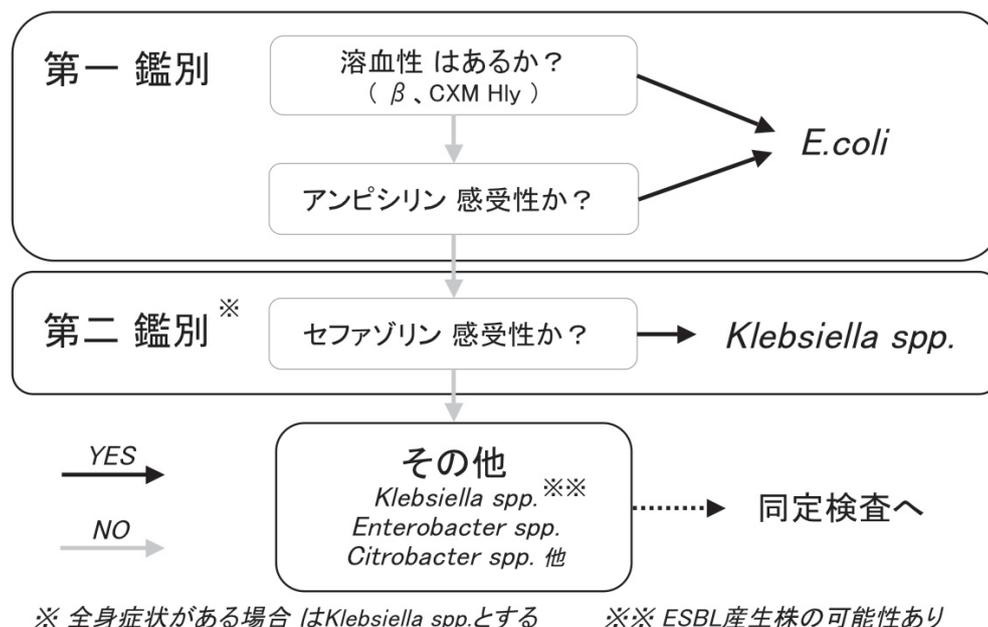


図2 簡易二段鑑別法による ns GNR の菌種推定・分類チャート。CXM Hly: CXM 誘発性溶血現象。第一鑑別には *E. coli* 簡易推定法を用いているが、市販鑑別培地でもよい。

討した。国内における *Kleb* の CEZ 耐性割合は 3–18% 前後と報告されており [13, 15, 21, 24]、今回の調査でも 19.3% であったが、地域、農場において変動が予想される。特に ESBLs 産生性はプラスミド性に伝播するため、局地的な耐性割合の増加も考えられる [2]。そこで、*Kleb* の CEZ 耐性割合が 19.3% あるいは 50% [2] で、「EC 以外」のグループにおける *Kleb* 有病率（分離割合）が 50、72、96% [26, 28] の場合を想定して検討したところ、感度は CEZ 耐性割合の増加により明らかに低下したが、特異度は 94.1% と高かった（表 1）。また、通常想定される範囲（分離割合 72% 以上）では *Kleb* 的中度は CEZ 耐性割合にかかわらず 95% 以上であった。特に、全身症状発現例における場合を想定した分離割合 96% [26] では、*Kleb* 的中度は 99.5% 以上だった。一方、「その他」的中度は CEZ 耐性割合および *Kleb* 分離割合の低下により増加したものの、非実用的な低値であった。以上から、「*Kleb*」と推定されれば非常に高い精度で *Kleb* と推定できることがわかったが、「その他」と鑑別された場合には条件によっては CEZ 耐性 *Kleb* がかなりの割合で含まれることがわかった。公衆衛生的な重要性も考慮すれば、「その他」に鑑別された菌

種は時間・コストをかけて確実に同定すべきであると思われた。

「その他」のグループには公衆衛生上、重要な菌種が多く含まれる。本グループに鑑別された EC、あるいは *Kleb* は ESBLs 産生性である可能性があり、*Citrobacter spp.*、*Enterobacter spp.* や、ブドウ糖非発酵菌などの誘導型 AmpC 型 β ラクタマーゼ保有菌種の治療における抗菌薬選択は、人では慎重になされている [25]。また、ESBLs を含めた各種の β ラクタム広域耐性に関与する β ラクタマーゼの多くはプラスミド性であり、他菌種への伝播の可能性があるため公衆衛生上重要視されている [1]。牛乳房炎における ESBLs 陽性菌分離頻度は決して高くはないが [4, 5, 20, 22, 23]、第三世代セファロスピリンの使用頻度が増加している現状を考慮すれば今後これらの監視体制強化が求められることが予想されるため [4, 7, 10, 21]、限られた人員・時間・コストでそのようなニーズに対応できるよう検査体制を準備しておく必要がある。

これらの結果をもとに第一鑑別に EC 簡易推定法、第二鑑別に *Kleb* 簡易推定法を用いた ns GNR の簡易グループ推定法（簡易二段鑑別法）を考案し（図 2）、本法による業務・コスト削

減効果について検証した。その結果、理論的には日々の乳汁検査において ns GNR 100 株中 70 から 85 株で菌種がほぼ確定でき、「その他」、すなわち獣・医療上および公衆衛生上問題となる可能性の高い菌種だけを同定検査に供することが可能となるので関連業務やコストの軽減が期待できることがわかった。なお、全身症状発現例で EC が否定された場合、CEZ 感受性の有無にかかわらず Kleb と推定できるが [26]、CEZ 耐性 Kleb が疑われる場合には外部検査機関に提出して菌種の同定と ESBLs 産生性を確認した方がよい。

菌種の同定検査にはコスト、時間がかかることが問題であった [14]。そのため、すべてを外部検査機関に依頼したり、未同定のまま GNR として処理されている場合も多いと思われる [14]。今回報告した簡易二段鑑別法は個々の菌種を正確に同定するのではなく、官能検査、菌種分離頻度、溶血性、薬剤感受性および臨床症状を用いて 3 つの意義のあるグループに簡易に分類する方法である。本法は、通常の検査手技の流れで特別な器材・資材を用いず実施可能であり確認作業に時間もかからないこと、検体培養と感受性試験を同時に行う簡易方法（直接法）で実施すれば翌日には鑑別可能であり、全身症状発現例など迅速性が要求される場合にも対応できること、特別な訓練も必要なく誰にでも容易に低コストで実施可能であることから、制約の多い業務多忙な臨床家にとって有用な菌種推定方法の 1 つになりうると思われた。また、第一鑑別の部分を市販鑑別培地で実施することも可能であり、その場合の第二鑑別以降の解釈は本法と同じである。なお、本法は牛乳房炎由来の ns GNR を対象として考案した菌種推定方法であり、膿汁や糞便など各菌種の分離割合が乳汁とは異なる検体に適用してはならない。また、本法には薬剤感受性の判定という人為的ミスの介入しやすい作業が含まれている。理論的な精度と実践的な精度の違いについては今後の検討課題としたい。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、忙しい業務の中ご協力頂いた 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。

【引用文献】

- [1] 荒川宜親, 2003. 広域 β -ラクタム薬耐性に関与する β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. 日本臨床微生物学雑誌 Vol.13 No.3 p.150-161
- [2] 浅野美子, 2013. 乳房炎乳汁からの分離菌の簡易同定と薬剤感受性. 家畜診療 60 (10), 589-596
- [3] Bannerman D.D. 2004. Characterization of the Bovine Innate Immune Response to Intramammary Infection with *Klebsiella pneumoniae*. J. Dairy Sci.87:2420-2432.
- [4] Clara Locatelli, Licia Scaccabarozzi, Giuliano Pisoni, 2010. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis, CLIN. MICROBIOL., Oct. Vol. 48, No. 10, p. 3822-3823
- [5] Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M., 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. Vet Microbiol. Mar 23;162(2-4):793-9.
- [6] DAVID M. LIVERMORE. 1995. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. CLIN. MICROBIOL. REV., Oct, Vol.8, No.4, p. 557-584
- [7] Dorina Timofte, Iuliana E. Maciucă, Nicholas J. Evans, Helen Williams, et al. 2014. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -Lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. Antimicrob. Agents Chemother., Feb, Vol. 58, No. 2, p. 789-794
- [8] 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
- [9] 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
- [10] 原田和記, 浅井鉄夫, 2015. 動物に由来する CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌. 日化学療法学会雑誌, MAR. VOL.63, NO.2, P181-6
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 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
- [14] 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
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Mamoru OHNISHI, Takuo SAWADA, Kazuki HARADA, Hidetake ESAKI, et al.,2012. Occurrence of bovine mastitis caused by CTX-M-2 β -Lactamase producing Klebsiella pneumoniae. 獣医学雑誌 16 (2) 142-147.
- [18] Mamoru Ohnishi, Alexandre T. Okatani, Kazuki Harada, Takuo Sawada, et al. 2013. Genetic characteristics of CTX-M-Type extended-spectrum- β -Lactamase(ESBL)-producing Enterobacteriaceae involved in mastitis cases on Japanese dairy farms, 2007 to 2011 CLIN. MICROBIOL., Sep.,Vol.51, No.9, p. 3117-3122
- [19] 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
- [20] Nadine Geser, Roger Stephan and Herbert Hächler , 2012. Occurrence and characteristics of extendedspectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals,minced meat and raw milk. BMC Veterinary Research, 8:21
- [21] 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
- [22] Raija Manninen, Helena Auvinen, Pentti Huovinen, 1997. Resistance to second- and third-generation cephalosporins among Escherichia coli and Klebsiella species is rare in Finland. Clin Microbiol Infect., Vol. 3 No. 4, Aug.p. 408-413.
- [23] Saini V, McClure JT, Léger D, Keefe GP, Scholl DT, Morck DW, Barkema HW. 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms.J Dairy Sci. 2012 Aug;95(8):4319-32.
- [24] 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
- [25] Sang-Ho Choi, Jung Eun Lee, Su Jin Park, Seong-Ho Choi, Sang-Oh Lee,et al., 2008. Emergence of Antibiotic Resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC β -Lactamase:Implications for antibiotic use. Antimicrob.Agents Chemother., Mar., Vol. 52, No. 3, p. 995-1000,
- [26] 千徳芳彦, 大久保宏平, 2016. 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. 家畜感染症学会誌 5 (3), 83-91
- [27] 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.
- [28] 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.

An attempt of the simple estimation of
Gram-negative rod-shaped bacteria species from dairy mastitis
-the clinical epidemiological and public health classification,
and the simple estimation of their group-

Yoshihiko Sentoku, Kohei Okubo

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]

Gram-negative bacteria that is difficult to estimate species by the sensory test (non-sensory GNR: ns-GNR) were could be classified in 3 groups, “Escherichia coli (EC)” ,” Klebsiella spp. (Kleb)” and “the other” ,by their isolation frequency and antibiotics susceptibility,clinical and public health importance. When we estimate the Kleb of "non-EC" group that was differentiated by mediums or EC simple estimation method, it is necessary to use commercially available kits or special staining,or to submit to the external inspection agency. More easily Kleb estimation method of "non-EC" group that emphasizes simplicity and cost are desired in the clinical field. Upon devise ns-GNR species estimation method that assumes the 3 grouping, we investigated Kleb simple estimation method of "non-EC". On the assumption that the definition of “Kleb” was cefazolin(CEZ)-susceptible and “the other” was CEZ-resistant, theoretical discrimination accuracy was examined. Sensitivity was varied greatly by CEZ-resistant ratio, but specificity was 94.1%. Kleb predictive value at usual isolation ratio of Kleb was 89.5-99.7% regardless of CEZ-resistant ratio. So,if it was discriminated to “Kleb” , it could be estimated Kleb. On the other hand, “the other” predictive value was very low due to the presence of CEZ-resistant Kleb. By the group estimation method of ns-GNR that as the first by EC simple estimation method and as the second by Kleb simple estimation method (the simple two-step differentiation method),70-80% of the ns-GNR could be estimated species. Therefore a significant reduction in labor and cost about the identification test could be expected. We concluded that the simple two-step differentiation method is one of the useful species estimation method in the clinical field.

Keywords: Dairy Mastitis, *E.coli*, Estimate species, GNR, *Klebsiella*