

実習課題:グラム陽性球菌検査

グラム陽性球菌にはヒトや家畜に広く分布し、医学的にも重要な菌属が幾つか含まれている。特に、本実習項目で取り扱うブドウ球菌属とレンサ球菌属には化膿性疾患の主要な原因菌となるものが含まれており、日常的にも微生物検査で最も頻繁に遭遇する菌群である。

ーグラム陽性球菌説明へリンク

ー疾患例へリンク



ブドウ球菌の電子顕微鏡(SEM)像

本実習課題は以下を<目的>とする。

<目的>

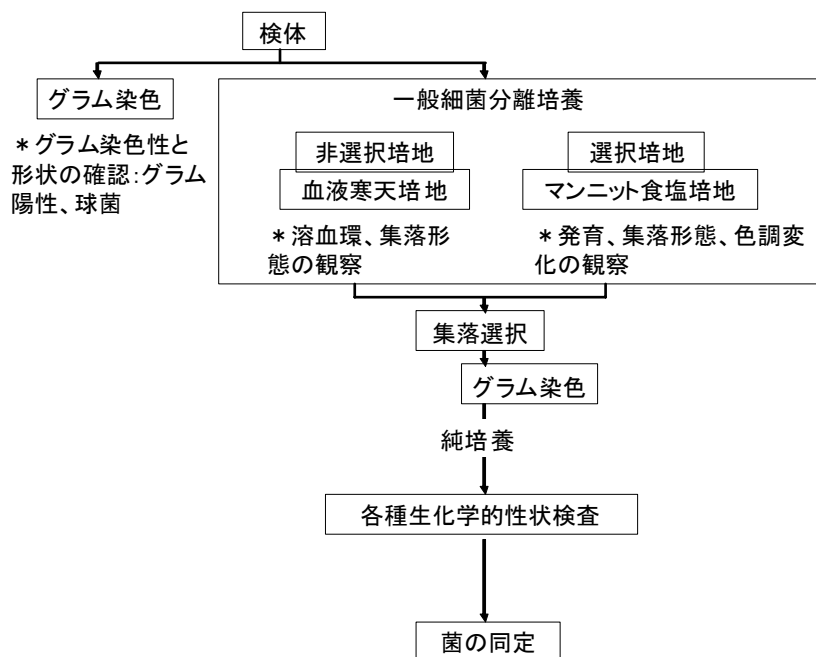
- 1)! 病原性グラム陽性球菌の性状について知る
- 2)! グラム陽性球菌の分離同定法について知る
- 3)! 咽頭からの材料採取法とその培養法について知る
- 4)! 血液寒天培地上での溶血環の種類を知る
- 5)! 咽頭に存在する細菌の同定法を知る



ブドウ球菌が起因菌となる疾患像例

ブドウ球菌が起因菌となる疾患像例

菌の分離・同定手順のフローチャート



本目的を達成するために、2つの実習項目を学ぶ。

- ・実習項目(1)未知検体からの菌分離とその同定
純培養したグラム陽性菌株(未同定菌)を、未知検体として、分離培養、各種性状検査を行い同定作業の実習をする。
- ・実習項目(2)咽頭拭い材料からの菌分離とその同定
自身の咽頭拭い材料を検体として、分離培養、各種性状検査を行い同定作業の実習をする。

実習項目(1) 未知検体からの菌分離とその同定

<1日目>

「準備する材料」

グラム陽性球菌純培養菌斜面(4種) 1本
マンニット食塩培地(培地説明へリンク) 1枚
血液平板 1枚
スライドグラス、グラム染色液



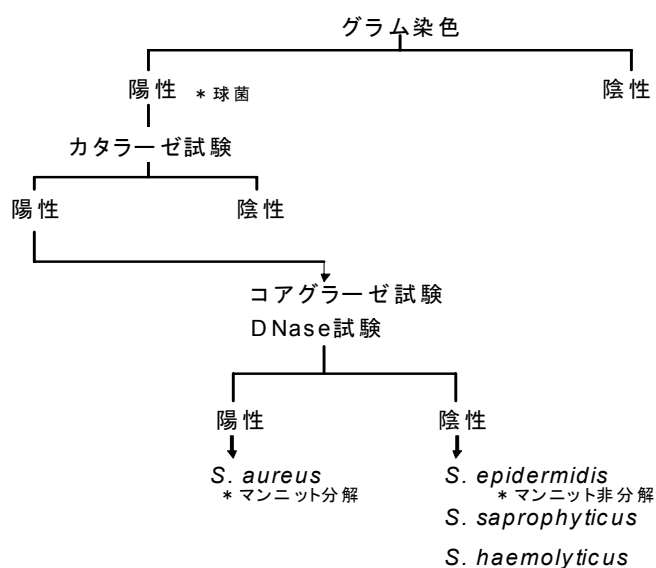
準備する材料(スライド)

①-1分離培養とグラム染色:未知純培養菌をブドウ球菌属から1本選び、マンニット食塩培地に分離培養する。同時に、選択した菌のグラム染色を行い、形態、染色性などを観察する。同様にレンサ球菌属から1本選び、血液寒天培地に分離培養ならびに染色観察する。接種した培地は、37℃で翌日まで培養を行う。(実技動画挿入)

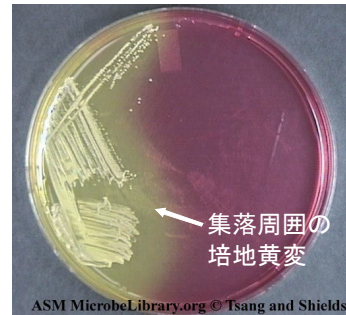
<2日目>

ブドウ球菌

ブドウ球菌同定手順



- ①-2 集落選択とグラム染色：前日マンニット食塩培地ならびに血液寒天培地に接種した菌の集落を観察。集落の形態、集落周辺の色調の変化(マンニット分解性)(スライド参照)に注意する。



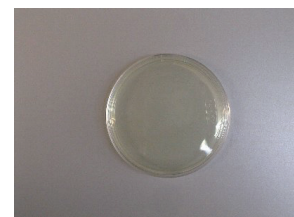
マンニット食塩培地上の *S. aureus*

- ①-3 代表的集落を選び、グラム染色

- ①-4 生化学的性状検査：

「準備する材料」

| | |
|---|-----|
| コアグララーゼ試験用フィブリノーゲン液 0.5 ml 入り小試験管 | 1 本 |
| DNase 培地平板(4人で1枚使用)(培地説明ヘリンク) | 1 枚 |
| 3% H_2O_2 溶液 | |



<カタラーゼ試験> ([カタラーゼ説明ヘリンク](#))

- 1)! 少量の菌をコロニーから採取し(培地を採取しないよう注意する)、スライドガラス上に白金耳で塗抹する。
- 2)! 3% H_2O_2 を1滴加える。
- 3)! カタラーゼ産生菌は直ぐに気泡を生じる。滴下後数秒以上経過して気泡が生じる場合は、混入培地による偽陽性である。(実技動画挿入)

<コアグララーゼ試験> ([コアグララーゼ説明ヘリンク](#))

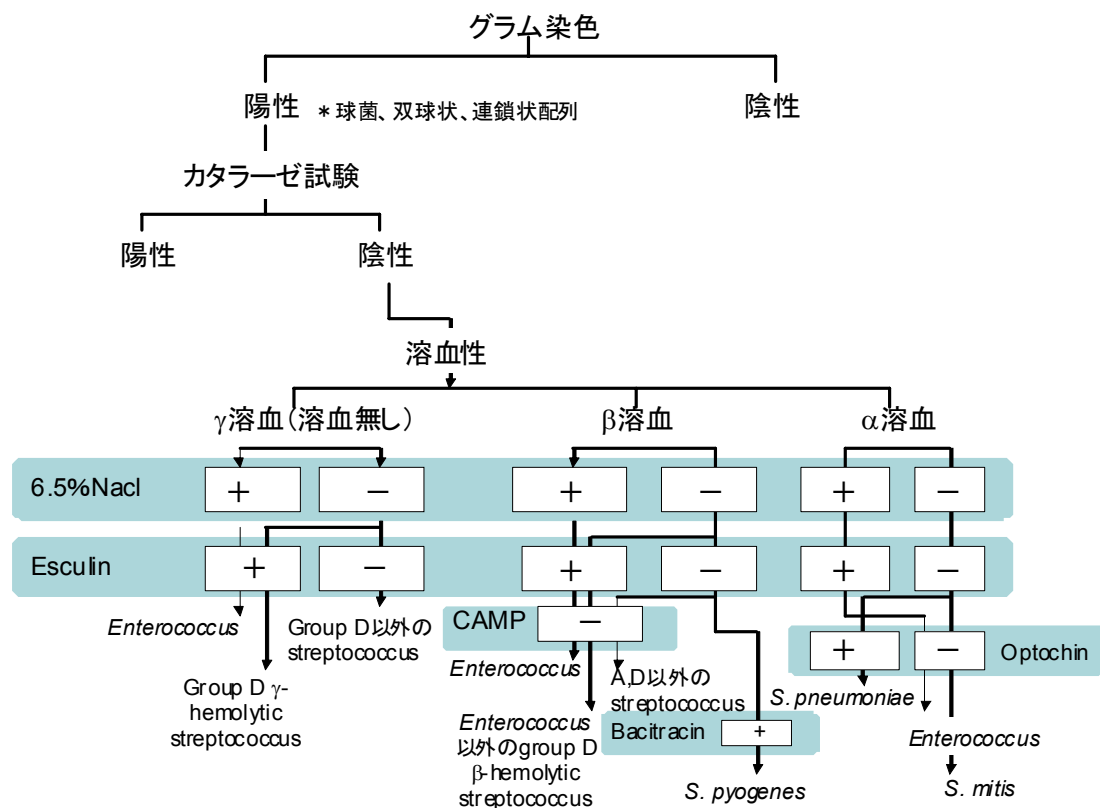
- 1)! 白金耳で1集落全部をコアグララーゼ試験用小試(うさぎプラズマ溶液)の液中によく溶かして加える。
- 2)! 恒温槽(37°C)で2時間インキュベートする。
- 3)! インキュベート後、小試を取り出し、少し傾けて、プリン状に凝固していれば陽性、凝固していなければ陰性と判断。確認のため、引き続きで翌日まで孵卵器でインキュベート。翌日観察できない場合は、翌日孵卵器より取り出し、冷蔵庫へ移し次回の実習日まで保存する。(実技動画挿入)

<DNase 産生性試験> ([DNase 説明ヘリンク](#))

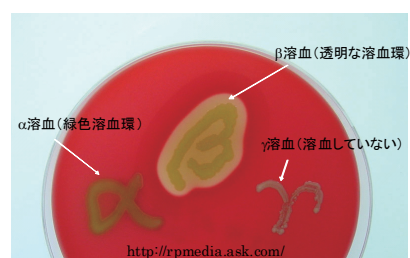
- 1)! 同一の集落から菌を採取し、DNase 培地の4分の1の区画に画線培養する。
- 2)! 孵卵器で一晩培養(翌日実習ができない場合は培養後冷蔵庫で次回の実習まで保存)(実技

動画挿入)

レンサ球菌 レンサ球菌同定手順



②-1 集落選択とグラム染色: 前日血液寒天培地に接種した菌の集落を観察、特に溶血環(α、β、γ)について観察する。代表的集落を選び、グラム染色を実施(菌の形態ならびに配列などを観察)。



溶血環

②-2 生化学的性状検査:

「準備する材料」
 血液寒天培地平板 2枚 (グループ)
 バシトラシンディスク(実習準備台)
 オプトヒンディスク(実習準備台)
 ピンセット



材料

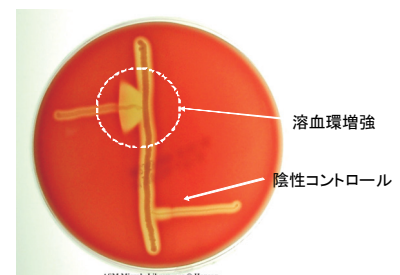
＜オプトヒン、バシトラシン感受性試験＞(薬剤説明へリンク)

1) α 溶血を示すレンサ球菌のうち、肺炎球菌のオプトヒン感受性検査を実施。血液寒天平板を2区画に分け、対象となる集落を1区画に白金耳で一様に塗布する。オプトヒンディスクを区画の中央に置き、ピンセットでディスク表面を軽く押し、ディスクを培地表面に密着させる。37°Cで一晩培養する。

2) β 溶血を示すレンサ球菌のうち、A 群化膿レンサ球菌のバシトラシン感受性検査を上記オプトヒン試験と同様の手順で実施する。

* ! Esculin 試験(実習では実施しない)

* ! CAMP テスト(実習では実施しない) : *S. aureus* を血液寒天培地に画線塗抹し、それに直角になるよう被検菌を塗抹して 37°C で一晩培養する。陽性ならば溶血環が明瞭に増強される。(CAMP 説明へリンク)



CAMPテスト

＜3日目＞
ブドウ球菌

「準備する材料」

1.5N HCl溶液

①ー5 生化学的性状判定:

＜コアグララーゼ試験＞

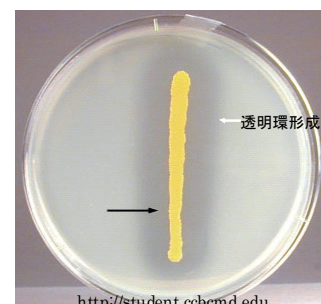
試験管を少し傾けて、プリン状に凝固していれば陽性、凝固していなければ陰性と判断。



コアグララーゼ判定

＜DNase 産生性試験＞

培養した平板に 1.5N HCl を平板全面を覆うように加え、約 15 分後に判定する。菌の周りに透明帯を生じたものを陽性、生じないものを陰性とする。



DNase産生判定

①-6 同定:

下記表を参考に分離した菌の同定を行う。

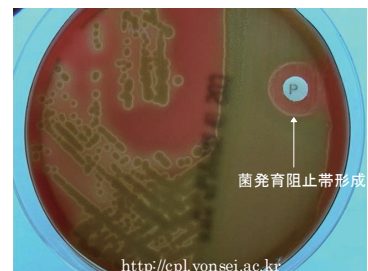
主なブドウ球菌属の性状

| 菌種 | 食塩 抵抗性 | マンニト 分解 | カタラーゼ産生 | コアグラーゼ 産生 | DNase 産生 |
|-------------------------|-----------|------------|---------|--------------|-------------|
| <i>S. aureus</i> | + | + | + | + | + |
| <i>S. epidermidis</i> | + | - | + | - | - |
| <i>S. saprophyticus</i> | + | d | + | - | - |
| <i>S. haemolyticus</i> | + | d | + | - | - |

レンサ球菌

＜オプトヒン、バシトラシン感受性試験＞

それぞれの薬剤含有ディスク周辺の菌発育阻止帯の有無により判定。



②-3 同定

下記表を参考に菌の同定を行う。

オプトヒン感受性試験判定

レンサ球菌属および腸球菌属の主な菌種性状比較

| 菌種 | 群抗原 | 溶血性 | バシトラ シン | オプ ト ヒ ン | CAMP テスト | 6.5%NaCl での増殖 | 胆汁エスクリン 培地での増殖 |
|------------------------------------|-----|-----------|------------|-------------------|-------------|------------------|-------------------|
| <i>S. pyogenes</i> | A | β | S | R | - | - | - |
| <i>S. agalactiae</i> | B | βまたは非溶血 | R | R | + | V | - |
| <i>Enterococcus</i> | D | α,βまたは非溶血 | R | R | - | + | - |
| <i>S. pneumoniae</i> | - | α | V | S | - | - | + |
| Viridans Streptococcus group | -/V | αまたは非溶血 | V | R | - | - | - |

実習項目(2) 咽頭拭い材料からの菌分離とその同定

咽頭には α 溶血性あるいは非溶血性のレンサ球菌が正常細菌叢として存在しており、これらを分離同定する。

<1日目>

「材料」

血液寒天培地

1 枚

滅菌 tongue depressor

1

滅菌綿棒

1

スライドグラス、グラム染色液

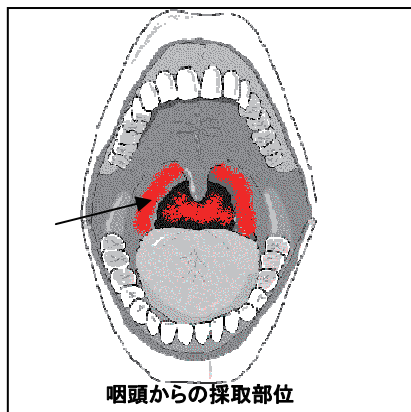


準備する材料(スライド)

③-1 咽頭材料採取:

2人1組になり、相手の咽頭より材料を採取する。

- 1)!相手の口を大きく開けてもらう。
- 2)!tongue depressor で舌を軽く押さえ、咽頭が良く見えるようにする。
- 3)!滅菌綿棒で喉の奥を軽く拭う。舌や歯茎に触れないようにする。無理をして相手に嘔吐感を起こさせないようにやさしく行う。
- 4)!拭い棒を血液寒天培地の一角に接種し、その後、白金耳で集落が分離するよう塗り広げる。培地は翌日まで培養する。
- 5)!拭い棒は、さらにスライドグラスに塗末し、火炎固定後、グラム染色を行う。形態、染色性を顕微鏡で観察する。
- 6)!使用した拭い棒は、廃棄バスケットに廃棄する。(実技動画挿入)



咽頭からの採取部位

<2日目>

- 1)!培地上の集落観察: 特に溶血環(α 、 β 、 γ)について観察。
- 2)!代表的集落を選び、グラム染色を実施。菌の形態、染色性ならびに配列を観察。
- 3)!前述のレンサ球菌分離手順に準じて、必要に応じて、カタラーゼ試験、オプトヒン、バシトラシン感受性試験、6.5%NaCl耐性試験を実施する(他の試験項目は、本実習では割愛する)。

<3日目>

生化学的性状検査ならびに前日までに得られた成績を基に、レンサ球菌属の性状表(前述)より菌種の同定を試みる。