

A7 マイコプラズマ寒天培地(MYCO)

A7 Mycoplasma Agar (MYCO)

泌尿器生殖器からのマイコプラズマの選択分離と直接菌数測定用培地

用途

A7 マイコプラズマ寒天培地は、泌尿生殖器検体からのマイコプラズマ、*U.urealyticum* および *M.hominis* 培養のための選択培地です(1,2,3)。

注意: *Ureaplasma urealyticum* は、*Ureaplasma parvum* と *Ureaplasma urealyticum* という 2 種に分けられました。本品の使用では両菌種とも *Ureaplasma* spp.とみなしてください。

原理

本培地は、ペプトン、ウマ血清、マイコプラズマ発育因子(システイン、ポリバイテックス、アルギニン、尿素)を含む栄養豊富な主成分から成ります。

マイコプラズマのコロニー形態は以下の通りです:

- *Ureaplasma* spp.
“ウニ”状コロニー: 丸いコロニー周辺部に茶色がかった黒色沈殿物を伴う(硫酸マンガンの酸化による)(4)
- *Mycoplasma hominis*
“目玉焼き”状コロニー: 中央部が突起し、周辺部が明るい光沢を呈する丸いコロニー

抗生物質混合物が、検体中のほとんどのグラム陽性およびグラム陰性菌の発育を抑制します。

キット構成

	調製済み培地
REF43003	平板培地(55mm) 10 枚 MYCO*

*各シャーレに印字

組成

精製水中の組成(g/L)

酵母エキス	5g
ハートペプトン(ウシまたはブタ)	6g
カゼインペプトン(ウシ)	5g
ソイペプトン	5g
塩化ナトリウム	3.5g
リン酸カリウム	2g
システイン塩酸塩	0.1g
硫酸マンガン	0.1g
アルギニン塩酸塩	1g
尿素	1g
ポリバイテックスミクスチャー	10mL
HEPES バッファー	2g
ウマ血清	200mL
寒天	12.5g
抗生物質混合液	10mL
pH6.4	

必要な試薬と器材

試薬

ウレア アルギニン LYO2(Ref42508)

器材

- 10 μ l ピペット
- 大気環境調整装置
- ジャー
- ふ卵器又は大気組成を調整可能な培養容器
- 顕微鏡(対物レンズ $\times 10$)

使用上の注意

- *in vitro* 試験にのみご使用下さい。
- 熟練者のご使用下さい。
- 本製品は動物由来の原料を含みます。由来に関する知識、由来動物の衛生状態は感染性のある病原体がいなことを保証するものではありません。したがって、これらは潜在的に感染の可能性があるものとして、充分注意の上お取り扱い下さい(摂取または吸入しないで下さい)。
- 全ての検体、培養物および検体を接種した製品は感染性があるものとして適切にお取り扱い下さい。被検菌の無菌操作および通常操作の留意事項は以下のガイドラインをご参照下さい。安全ガイドライン: NCCLS M-29A, «Protection of Laboratory Workers from instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, Approved Guideline – December 1997» 操作留意事項: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)、または各国の規制ガイドラインに従って下さい。
- 培地を製造原料として使用しないで下さい。
- 有効期限切れの製品は使用しないで下さい。
- 包装が破損している製品は使用しないで下さい。
- 汚染のある、または水分が浸出している培地は使用しないで下さい。
- 本培地は取扱い説明書に記載されている操作方法に従って使用して下さい。操作方法を変更すると結果に影響を及ぼすことがあります。
- 試験結果の判定の際には、患者の履歴、検体の由来、コロニー形態や検鏡結果、および必要に応じて行った他の試験結果を考慮に入れて下さい。

保管方法

- 箱未開封の状態で、2-8°C下で有効期限まで保管可能です。
- 箱開封後、セロファン袋中では、2-8°C下で2週間保管可能です。

検体

マイコプラズマは粘膜細胞膜に高い親和性をもっているため、出来るだけ多くの細胞を採取することが重要です。

下記の検体は、マイコプラズマの検査に使用することができます:

膣および尿道分泌物:

ウレア アルギニン LYO2(Ref.42508)のウレアーアルギニンブロス(3mL)に検体採取したスワブを浸す。

液体検体:

- 初尿(遠心し、沈殿物を滅菌生理食塩水(例:0.2ml)に懸濁する)
- 精液(原液および滅菌生理食塩水に 1:10 希釈検体)採取や輸送に関しては GLP(Good Laboratory Practices)に準拠し、検体の種別によって適切に処理して下さい。

使用法

1. 培地を室温に戻します。
2. 必要に応じて、37℃のふ卵器に培地を入れて培地表面を乾かします。
3. 10 μ L の検体を接種したウレアーアルギニンブロスまたは液状検体を 3 滴培地に滴下します。接種の際には接種液を広げないようにし、また滴下した検体が接触しないようにします。
4. 室温で 5 分間乾燥させます。
5. プレートを適切な培養条件下(微好気環境)におきます。必要に応じて大気環境調節装置を使用します。
6. フタを下側にして 37℃で培養します。最新の標準法に従い、用途に応じて適切な温度で培養して下さい。通常、24～48 時間培養後に確認します。必要に応じて培養時間を延長して下さい。

判定

発育状態の観察:

- 培養後、顕微鏡(対物レンズ×10)を用いて菌の発育を観察します。
- コロニー性状を観察します:
 – *Mycoplasma hominis* : 100～300 μ m の“目玉焼き”状コロニー
 – *Ureaplasma* spp.: 10～50 μ m の茶色い“ウニ”状コロニー

生菌数測定:

- 顕微鏡で少なくとも 1 滴当たり 3 視野観察し、コロニーの密度を調べます。
- 顕微鏡 1 視野当りに見られるコロニー数から検体中の生菌数を算出します。希釈率と検体の初期容量を考慮します。

換算表:

1 視野あたりの平均コロニー数	接種検体中の CFU*
<1	10 ³ CFU
1～4	10 ⁴ CFU
5～15	10 ⁵ CFU
>15	10 ⁶ CFU

*接種容量に依存:

- スワブ検体の場合、ウレアーアルギニンブロス 3ml
- 液状検体の場合、再懸濁液容量

品質管理

プロトコール:

培地の発育支持能は、下記菌株を用い微好気環境で試験できます:

- *Ureaplasma urealyticum* ATCC27813
- *Mycoplasma hominis* ATCC23114

前培養:

ウレアーアルギニン LYO2 ブロスを用いて連続希釈法を行い、菌株の培養液を作成します(A、B、C の希釈バイアルを作成: ウレアーアルギニン LYO2 の説明の「品質管理」の項参照)。培養後、色の变化したバイアルのうち、最大希釈のバイアルを選択します。

培養:

選択した希釈液をさらに 1:100 に希釈し、A7 マイコプラズマ寒天培地上で培養します。この説明書の「使用法」の項を参照して下さい。

精度管理限界値:

使用菌株	33-37℃での試験結果	
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ATCC27813	48 時間以内に発育	茶色い“ウニ”状コロニー
<i>Mycoplasma hominis</i> ATCC23114		“目玉焼き”状コロニー

コメント:

培地の用途を考慮し、適切な規制(頻度、菌株の数、培養温度等)に従って品質管理を実施されることをお勧めします。

留意事項

- 検体が極僅かに汚染されている場合、寒天上のコロニーが目視で確認できない場合がありますが、対象菌の存在はウレアーアルギニンブロスにおける変色により確認できます(測定濃度 $\leq 10^2$ CFU)。
- 発育の度合いは微生物各固体の要求性に左右されます。従って、特殊な栄養要求性をもつマイコプラズマのある種の株においては発育しないことがあります。

性能

マイコプラズマ 20 菌株(*M. hominis*, *Ureaplasma* spp.)と、グラム陽性菌・グラム陰性菌 18 株、酵母 2 株を用い、37℃にて性能が評価されました。

発育支持能:

試験されたマイコプラズマ 20 株が 24 時間培養後に発育し、48 時間以内に特徴的コロニーを形成しました。

コメント: 酵母は 24 時間まで発育抑制されました。

感度:

試験された全ての細菌は 48 時間まで発育抑制されました。

菌数測定:

2 株のマイコプラズマについて、滴下検体当たりのカウント数と換算表を用いた推測値の間に相関が得られました:

Ureaplasma spp. :

3 視野当たりのコロニー数	滴下検体当たりのカウント数(CFU)	換算表から推測した生菌数(CFU)
[1～3]	1.08×10^4	10 ⁴
[5～8]	1.08×10^5	10 ⁵
[49～60]	1.08×10^6	10 ⁶

Mycoplasma hominis :

3 視野当たりのコロニー数	滴下検体当たりのカウント数(CFU)	換算表から推測した生菌数(CFU)
[1～2]	1.2×10^4	10 ⁴
[7～11]	1.2×10^5	10 ⁵
[67～75]	1.2×10^6	10 ⁶

廃棄処理

使用の有無にかかわらず、他の汚染廃棄物とともに、感染の危険性のある物質の廃棄方法に従い廃棄して下さい。廃棄産物や流出産物は使用施設の責任の元、それぞれの性質や危険性の度合いに応じて適切な規制に従い廃棄して下さい。

参考文献

1. BEBEAR C., DE BARBEYRAC B., BERNET C.,RENAUDIN H.- Méthodes d'exploration des infections à mycoplasmes - *Ann. Biol. Clin.*, 1989, vol. 47, p. 415-420.
2. CLYDE W.A., KENNY G.E.,SCHACHTER J. - *Cumitech 19*, ASM, 1984.
3. FIACCO V., MILLER M.J., CARNEY E., MARTIN W.J. -Comparison of Media for Isolation of *Ureaplasma urealyticum* and Genital *Mycoplasma* Species - *J. Clin. Microbiol.*, 1984, vol. 20, p. 862-865.
4. SHEPARD M.C., LUNCEFORD C. - Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material - *J. Clin. Microbiol.*, 1976, vol. 3, n°6, p. 613-625.

(問い合わせ先)

製品関連

バイオメリュー・ジャパン株式会社

臨床(病院、臨床検査センターなど) TEL: 0120-265-034

産業(企業、保健所など) TEL: 0120-022-328

注文・納期・在庫関連

バイオメリュー・ジャパン株式会社

TEL: 03-6834-2666(代表)

*本添付文書は、下記 Web サイトからダウンロードできます。

<http://www.biomerieux-jp.net/>**記号**

記号	内容
	品番
	製造元
	保管温度
	有効期限
	ロット番号
	使用手順を参照
	試験可能数

バイオメリュー・ジャパン株式会社

〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目 17 番 7 号赤坂溜池タワー2 階

Tel: 03-6834-2666 / Fax: 03-6834-2667

<http://www.biomerieux.co.jp>**bioMérieux SA**

376 Chemin de l'Orme

69280 Marcy-l'Etoile/France

Tel.33(0)4 78 87 20 00 /

Fax133(0)4 78 87 20 90

<http://www.biomerieux.com>**BIOMÉRIEUX**

The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux sa or one of its subsidiaries.