

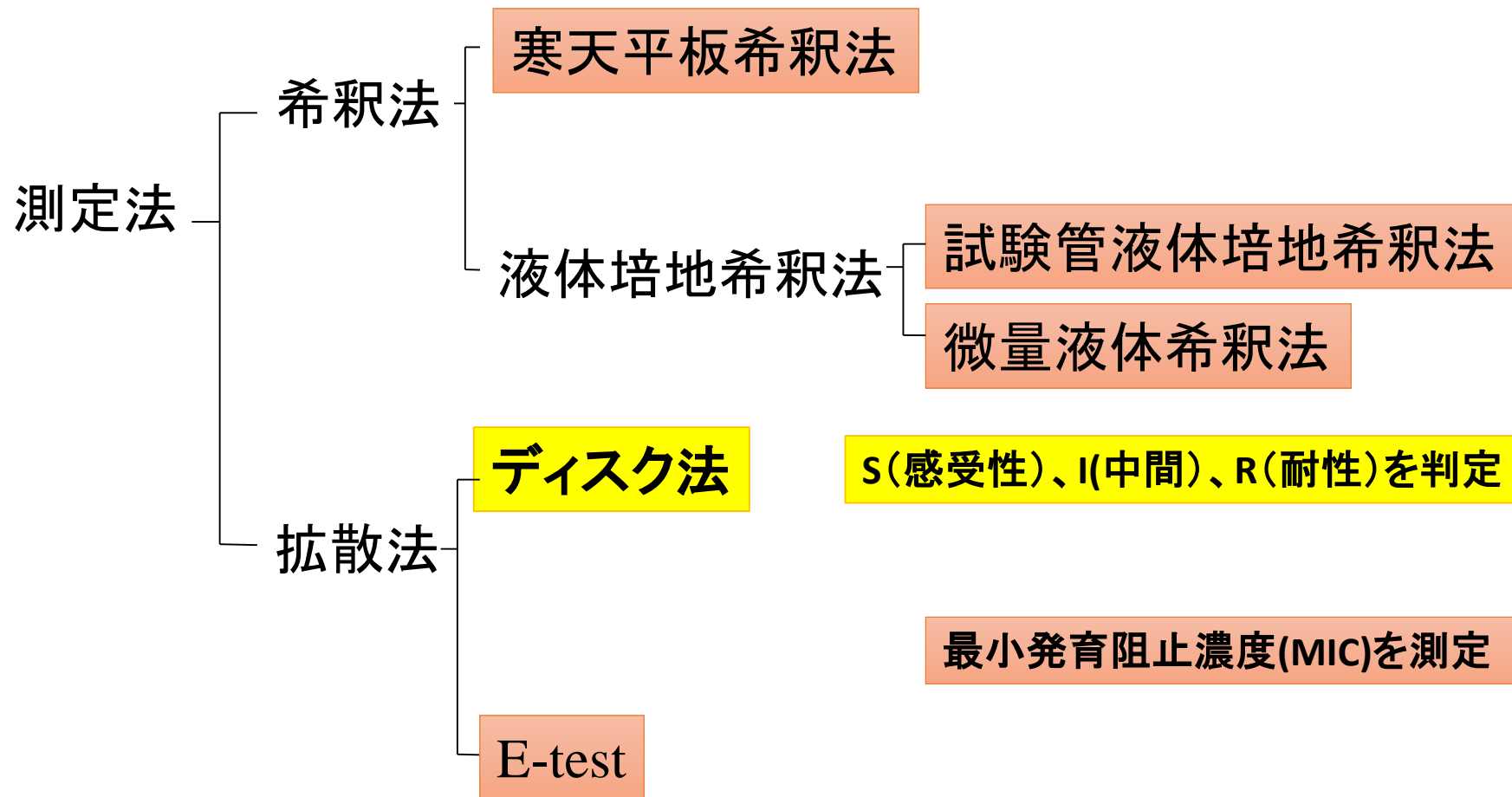
「薬剤感受性試験の実施方法について」

（ディスク拡散法）

農林水産省 動物医薬品検査所



抗菌薬感受性試験法



ディスク法の原理

毛細管現象により、寒天中の水分がディスクの濾紙に吸収され、ディスク中の薬剤が溶解する。溶解した薬剤は直下の培地に移行し、培地上の細菌に作用しながら拡散していく。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により阻止円が形成される。すなわち阻止円が小さければ、その薬剤に対する感受性が低いということになる。本法はKirby-Bauer法による拡散法を測定原理とし、CLSIに準拠した方法で実施している。

ディスク法のメリット・デメリット

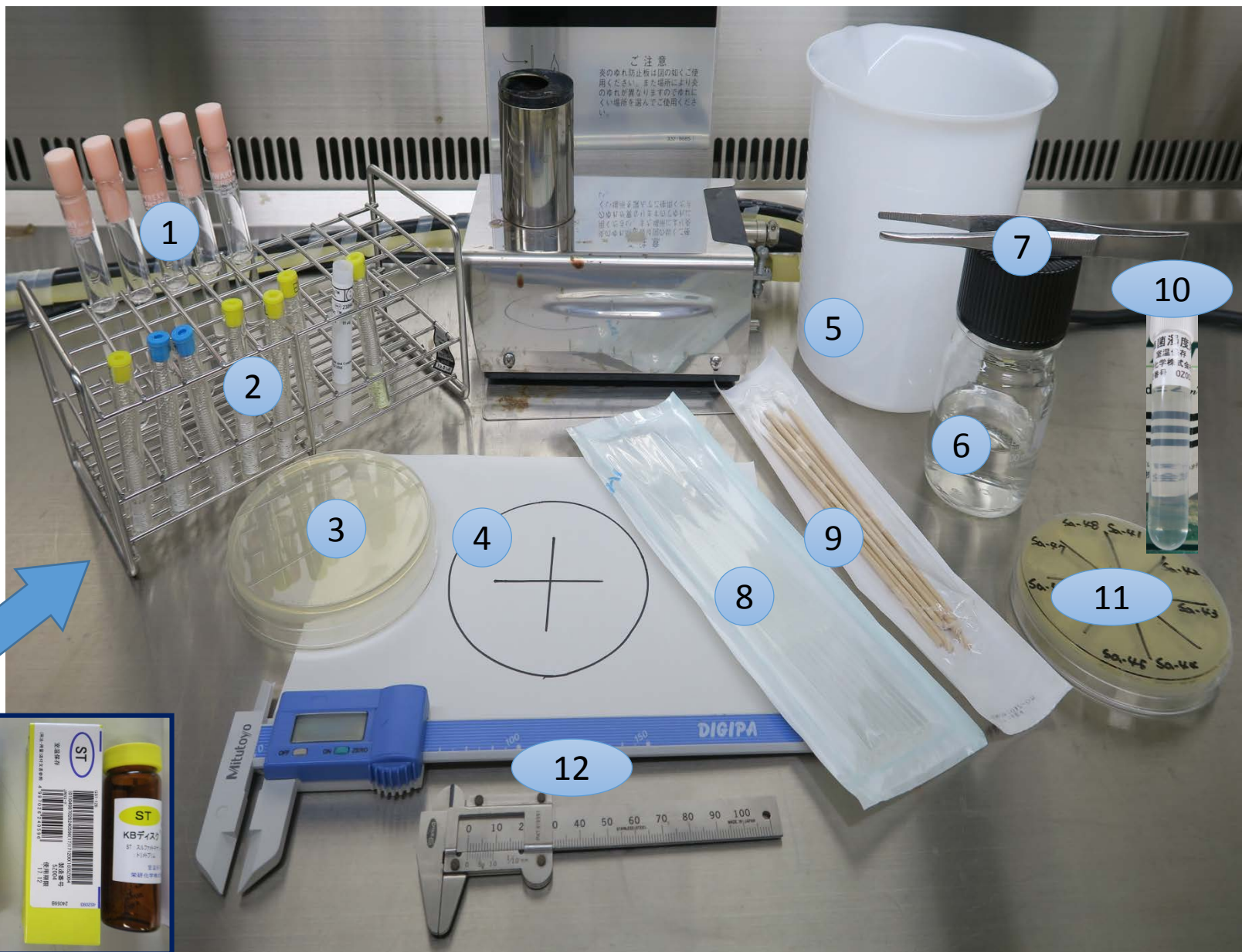
メリット

- ・低コスト。
- ・コンタミネーションに気づきやすい。
- ・市販品で試験が可能。
- ・供試薬剤を容易に変更できる。

デメリット

- ・定性的で、最小発育阻止濃度が測定できない。
- ・多検体実施する場合、阻止円直径の測定労力が大きい。

ディスク法で準備する試薬・器具



- ①4mL滅菌生理食塩水
- ②薬剤感受性ディスク
- ③感受性試験用平板
- ④ディスク型紙
- ⑤消毒容器
- ⑥火炎滅菌用アルコール
- ⑦ピンセット
- ⑧滅菌エーゼ
- ⑨滅菌綿棒
- ⑩濁度調整液
- ⑪被検菌株
- ⑫ノギス



菌液の調整



培養した寒天培地上の被検菌体を釣菌し、4mLの滅菌生理食塩水にMcfarland標準濁度液0.5と同じ濃度になるようにあわせます。

McFarland 標準液と調整菌液を比較する際は透明で径の差が少ない試験管を用います。

参考: McFarland Standard

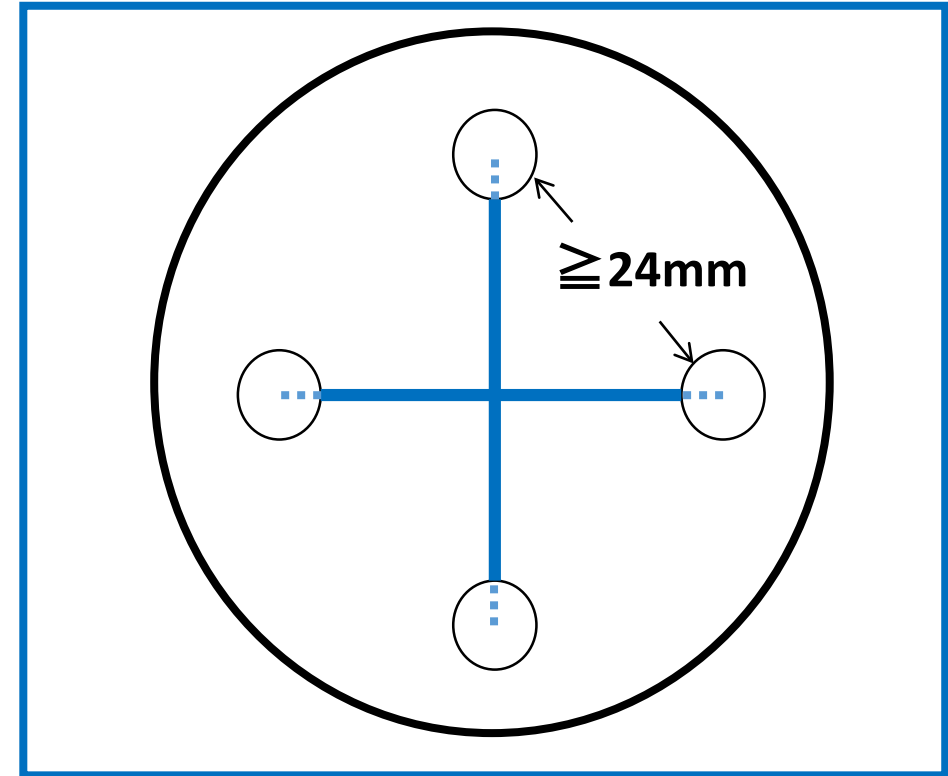
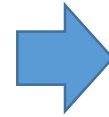
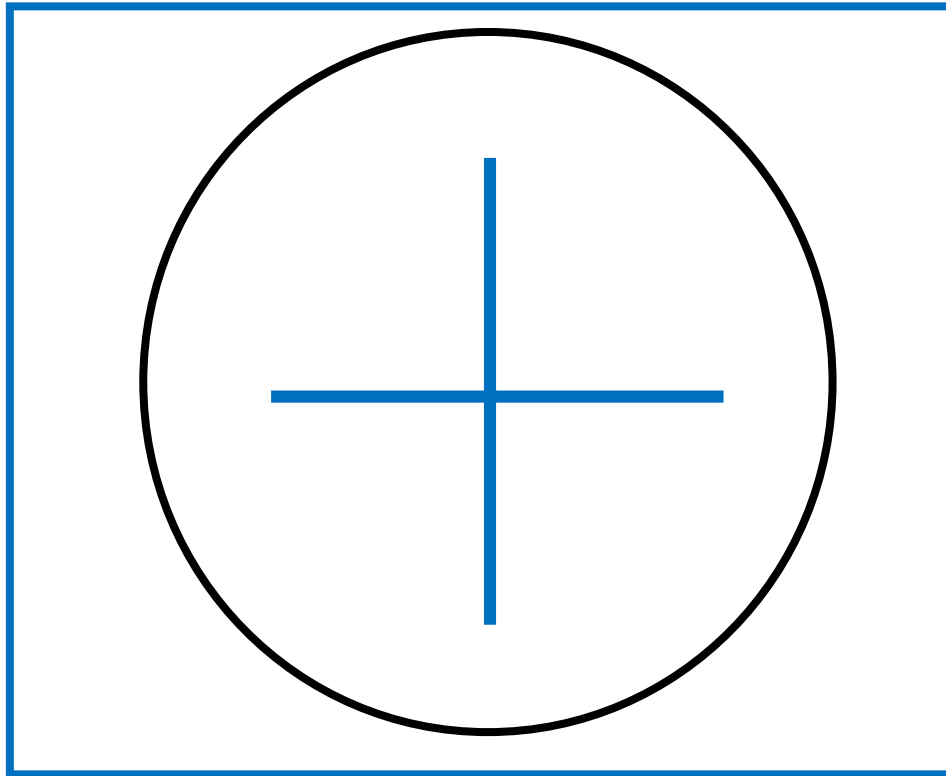


McFarland Standard	1%BaCl ₂ (mL)	1%H ₂ SO ₄ (mL)	菌濃度* (CFU/mL)
0.5	0.05	9.95	1.5×10^8
1.0	0.1	9.9	3.0×10^8
2.0	0.2	9.8	6.0×10^8
3.0	0.3	9.7	9.0×10^8
4.0	0.4	9.6	1.2×10^9
5.0	0.5	9.5	1.5×10^9
6.0	0.6	9.4	1.8×10^9
7.0	0.7	9.3	2.1×10^9
8.0	0.8	9.2	2.4×10^9
9.0	0.9	9.1	2.7×10^9
10.0	1	9	3.0×10^9

* 菌濃度は菌の大きさによって異なることがあります。

菌体大→菌濃度低
菌体小→菌濃度高

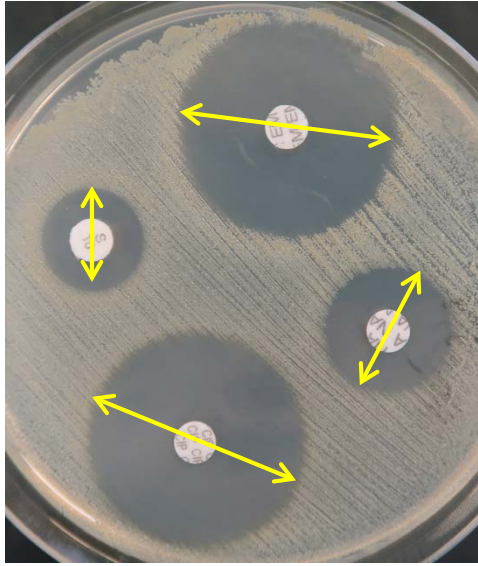
ディスクの配置



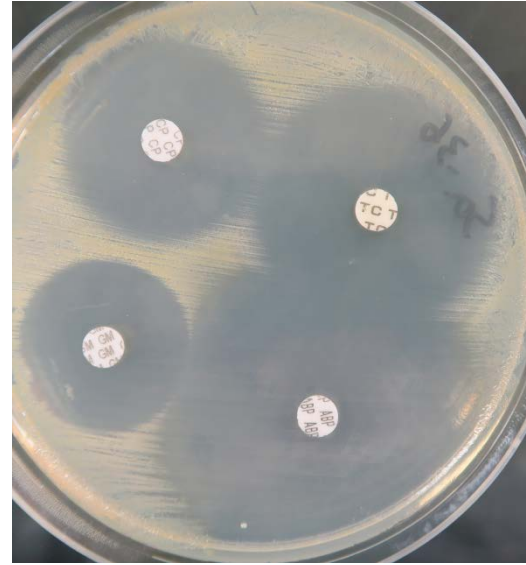
被検菌を接種し3～5分静置した平板を
ディスク型紙に合わせて置く。

火炎滅菌したピンセットで型紙に合わせてディスクを置く。
ディスクはピンセットで平板に均一に密着させる

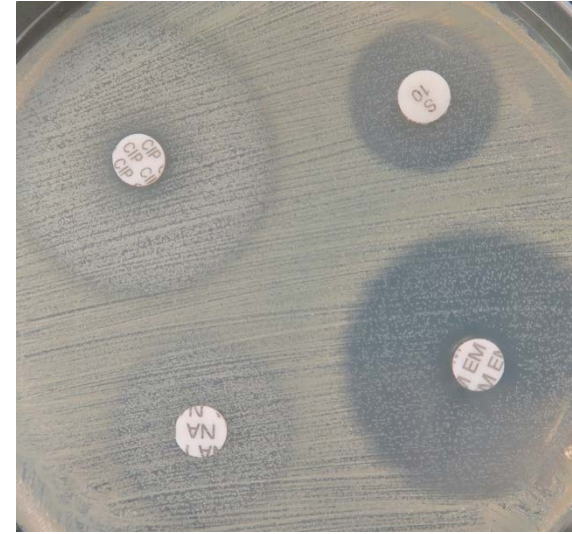
判定例 - 1



○



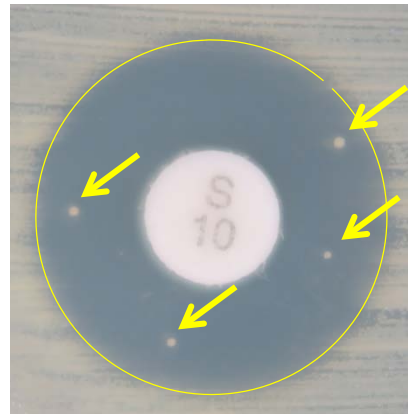
阻止円が重複、いびつ
→配置を変えて再試験



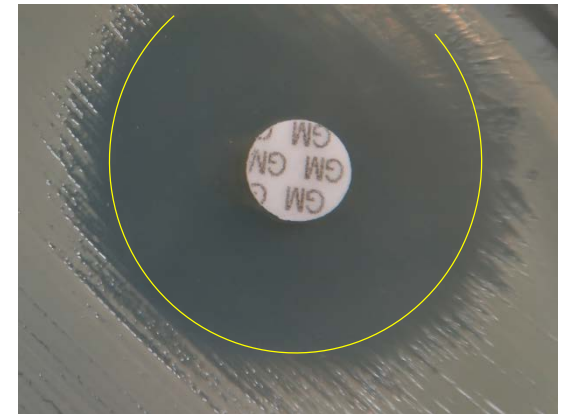
コンタミネーション
→クローニング後、再同定し試験



＜ディスク直径(6mm)



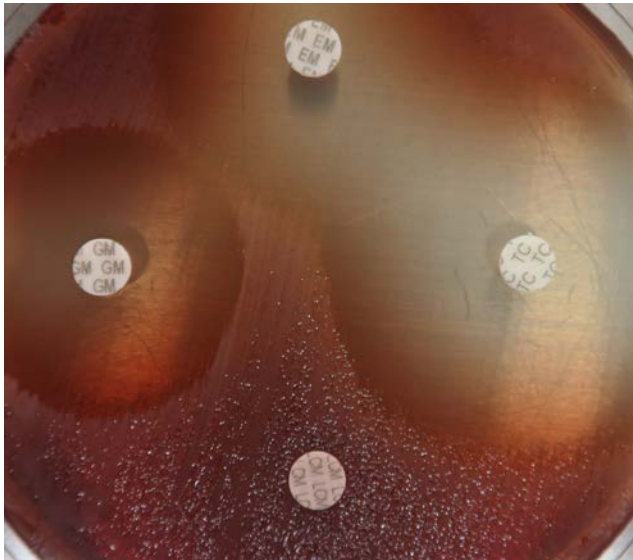
誘導耐性株？



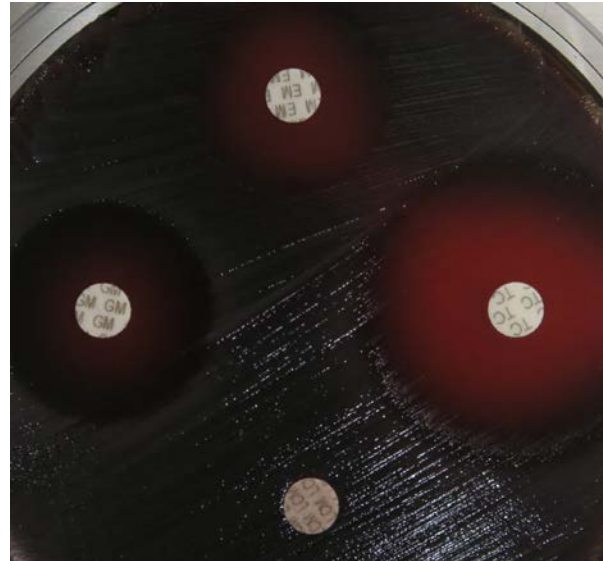
完全阻止円を計測

判定例 - 2

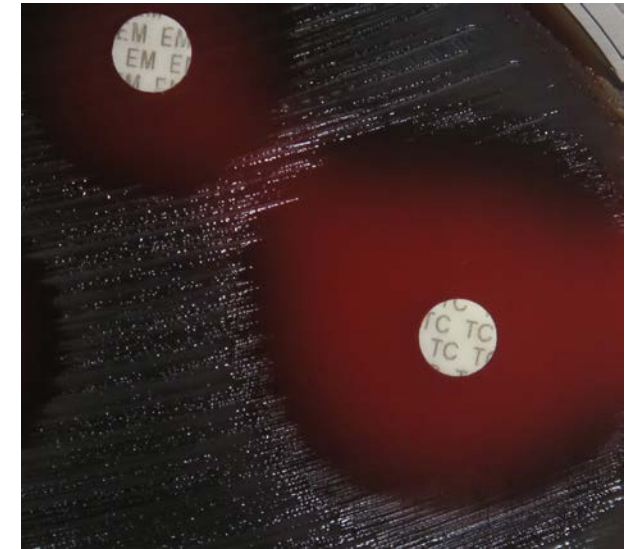
Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC 33658 22°C、48時間培養



MHA



MHA + 5% sheep blood



MHA + 5% sheep blood

完全阻止円：肉眼的に判別可能な菌の発育と発育が阻止されている境界。

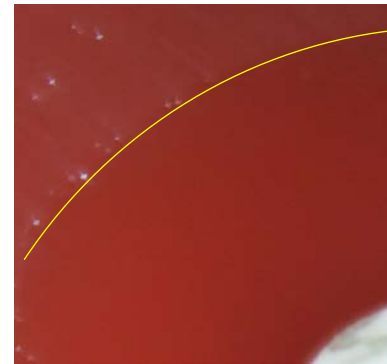
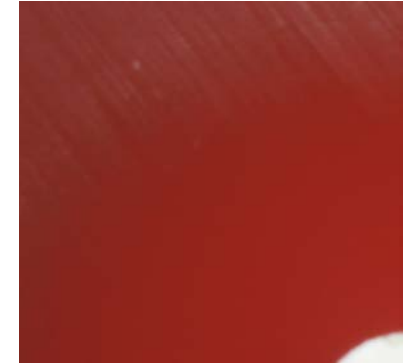
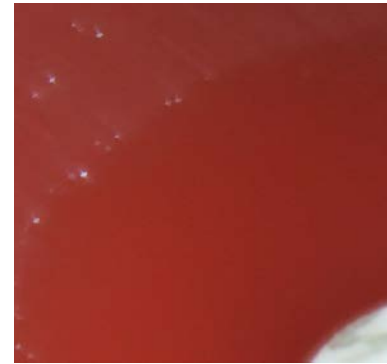
培地の色の変化ではなく、肉眼的に判別可能な菌の発育の有無で測定する。

判定例 - 3

Lactococcus garvieae

MHA+5% sheep blood

22°C、48時間培養



GM



TC

培地の厚みによる阻止円直径の違い



Aeromonas salmonicida subsp *salmonicida* ATCC 33658



厚い ←———— 培地の厚み —————→ 薄い

小さい ←———— 阻止円直径 —————→ 大きい

精度管理株について

ディスク法を実施して頂く際には、測定対象の菌株と合わせて**精度管理株**の阻止円直径も測定して頂きます。

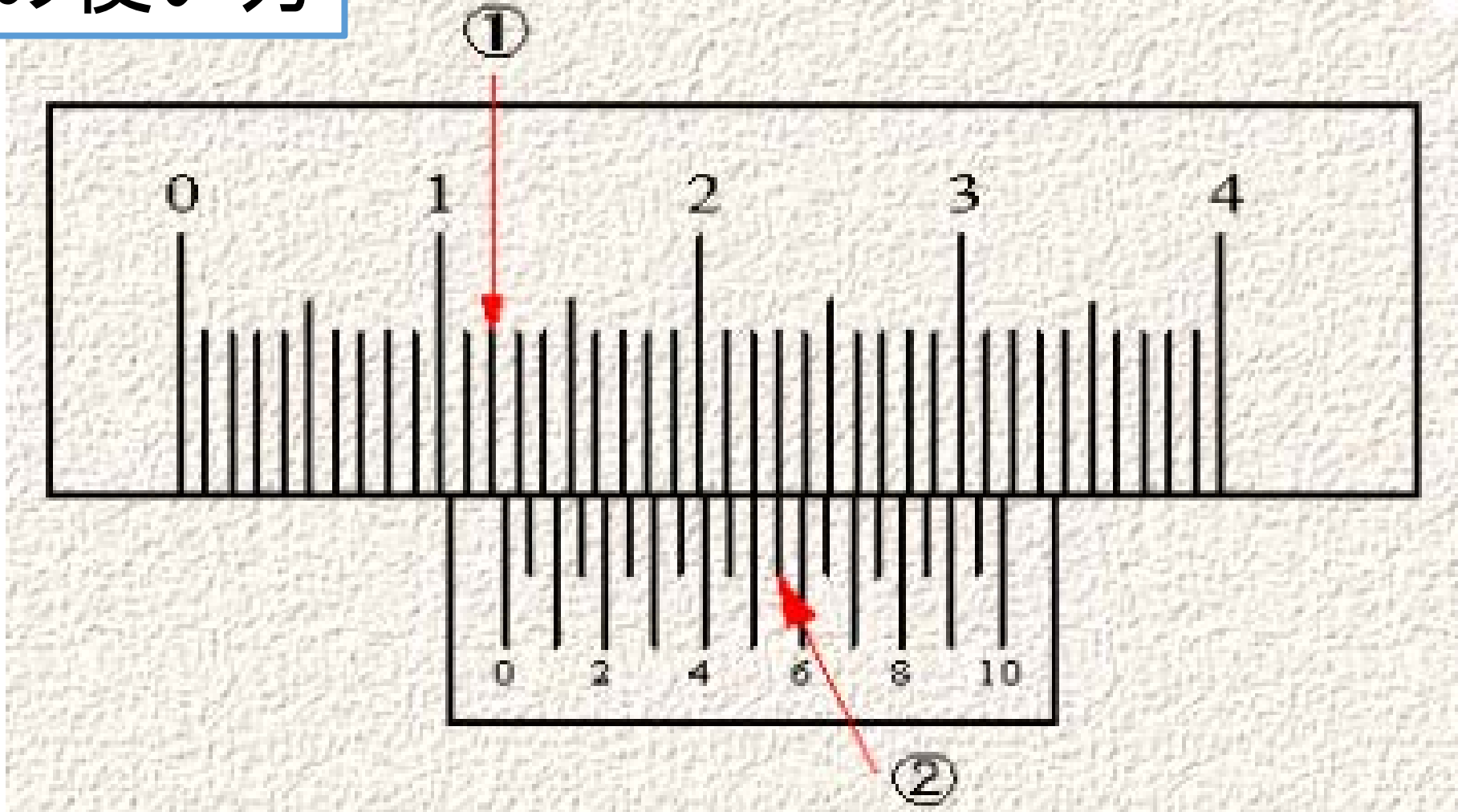
測定後はまず精度管理株の阻止円直径が精度管理用参考値に全て含まれているかどうかご参照ください。

精度管理株の阻止円直径が全て精度管理用参考値に含まれた場合、試験成立となります。

ノギスの使い方

主尺→

副尺→



①副尺の0点が指す値を見る。図の場合0点は12～13mmの間にある。

②副尺と主尺の目盛りが一致する副尺の値を読む。図の場合、副尺目盛り5.5の位置になる。

この目盛りは小数点第一位の値になる。従って、計測値は $12\text{mm} + 0.55\text{mm} = 12.55\text{mm}$ になる。