

「薬剤感受性試験の実施方法 について」

（微量液体希釈法）

農林水産省動物医薬品検査所

目次

I. 薬剤感受性試験

1. 薬剤感受性試験（微量液体希釈法）のフローチャート
2. 微量液体希釈法の各論

別表 1 供試薬剤一覧

別表 2 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658 における精度
管理用株の精度管理値

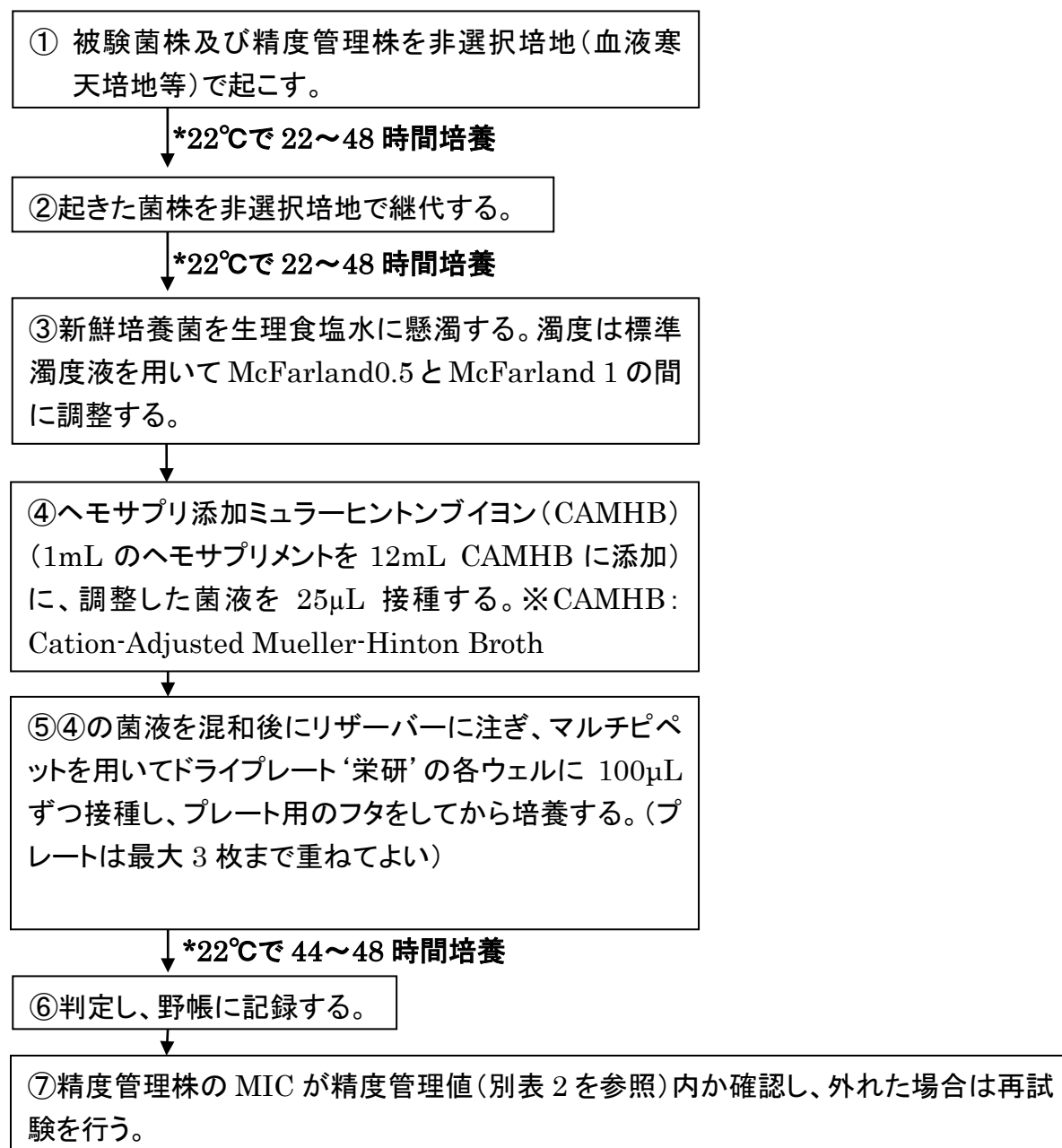
II. 精度管理用菌株の扱いについて

III. 薬剤感受性試験に用いる資材一覧

I. 薬剤感受性試験

1. 薬剤感受性試験（微量液体希釈法）のフローチャート

MICを測定する*Lactococcus garvieae*の場合の大まかな手順を以下に示す。



〈判定例〉下記の表の場合、MIC は 16μg/mL と判定する。

薬剤希釈濃度	薬剤希釈濃度 (μg/mL)								
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	C
菌の発育	+	+	+	+	+	—	—	—	+

2. 微量液体希釈法の各論

ドライプレート‘栄研’を使用する際は、室温に戻してから開封すること。

1) 菌液の調整

①22℃22～48 時間培養した寒天培地上の被験菌を釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁し、菌液濃度を McFarland 標準濁度液 0.5 と McFarland 標準濁度液 1 の間の濁度に合わせる。

②①の菌液 0.025mL をヘモサプリ添加ミューヒントンブイヨン(1mL のストレプトヘモサプリメント‘栄研’を 12mL のミューヒントンブイヨンに添加)に加え、均等に浮遊させて接種用菌液(※)とする。CLSI では、4%馬溶血液添加ミューヒントンブイヨンを推奨しているが、馬溶血液を用いた場合とヘモサプリメントを用いた場合とでは、事前検討を行った結果、差は見られなかった。本研修では、資材の管理の容易さを考慮してヘモサプリメントを使用する。

2) 菌液の接種と培養

接種用菌液(※)を 0.1mL ずつドライプレート‘栄研’の各ウエルに接種する。これにより最終接種菌量は約 5×10^4 colony forming unit(CFU)/ウエルになる。

3) 測定結果の記録

記録用紙に測定結果を判定基準に従い記録する。

下記の判定基準に従い、明らかに菌の発育を認めたものを発育陽性(+)、菌の発育が認められないものを発育陰性(-)とする。

【発育陽性の判定基準】

- ① 肉眼的に混濁又は直径 1mm 以上の沈殿が認められた場合(+)
- ② 沈殿物の直径が 1mm 未満であっても沈殿塊が 2 個以上認められた場合(+)

【発育陰性の判定基準】

- ① 肉眼的に混濁又は沈殿が認められない場合(-)
- ② 沈殿物があっても直径が 1mm 未満で 1 個の場合(-)

4) 測定にあたっての注意

- ① 菌液の濃度と接種菌液量は結果に影響することがあるので、必ず McFarland 標準濁度液を用いて指定の濁度に合わせ、規定の液量を接種すること。
- ② 菌液は調製後 15 分以内に接種すること。
- ③ 菌液を接種したプレートは、培養中に培地水分の蒸発や雑菌の汚染が起こらないようにフタをしてから培養すること。
- ④ プレートを重ねて培養する場合は、各ウエルの培養温度を均一にするため、4 枚以上重ねるのは避けること。

5) 測定結果の判定法

抗菌薬の被験菌に対する MIC は、被験菌の発育を阻止した薬剤濃度系列のうち、最小

希釈濃度で表す。

〈判定例〉①MIC は 16 μ g/mL と判定する。

薬剤希釈濃度	薬剤希釈濃度 (μ g/mL)								
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	C
菌の発育	+	+	+	+	+	-	-	-	+

(C: コントロール、薬剤不含有培地)

判定の際、薬剤希釈系列中に不連続な発育が認められた場合(スキップ現象)は判定を保留し、再度試験を行う。再試験において不連続な発育が再現された場合は、汚染菌の混入が無いことを確認したうえで、最終的に発育を阻止した最小の薬剤希釈濃度をもって MIC とする。

〈判定例〉②(スキップ現象の場合)

薬剤希釈濃度	薬剤希釈濃度 (μ g/mL)								
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	C
菌の発育	+	-	-	+	+	-	-	-	+

結果に再現性が有り、8 及び 4 μ g/mL のウエルに発育している菌が汚染菌でない場合、MIC は 16 μ g/mL と判定する。

6) 使用上又は取り扱い上の注意

(1) 取り扱い上(危険防止)の注意

- ① 操作は全て微生物の取り扱いに習熟した人の指導の下に、バイオハザード対策を実施した上で行うこと。
- ② 検体(被験菌)及び培養後の菌類は全て感染の危険があるものとして十分に注意して取り扱うこと。
- ③ 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- ④ 口によるピペッティングはしないこと。
- ⑤ プレートは輸送上及び保管上 2~10 $^{\circ}$ C の状態を維持すること。

(2) 使用上の注意

- ① 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること
- ② 使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- ③ プレートは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④ 開封後のドライプレート‘栄研’は速やかに乾燥剤の入った袋に戻し、密封して 2~10 $^{\circ}$ C に保存すること。開封後はなるべく早く(約 1 ヶ月以内に)使用すること。

(3) 廃棄上の注意

- ① 使用後のプレートは、オートクレーブ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレーブ

を使用する場合は蒸気を吸い込まないように注意すること。

②検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1,000ppm 以上,1 時間以上浸漬)又はグルタルアルデヒド(2%,1 時間以上浸漬)による消毒処理、あるいはオートクレーブ(121℃,20 分間以上)による滅菌処理を行うこと。ただし、接種機器及び自動読み取り機の付属機器についてはその取扱説明書に従うこと。

③プレートはポリスチレン(PS)、袋はポリエチレンテレフタレート(PET)、アルミニウム、ポリエチレン(PE)、ケースは紙を主な材料としている。

④滅菌後のプレートや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

別表1 供試薬剤一覧

供試薬剤	略号	備考
Ampicillin (アンピシリン)	ABPC	人体兼用*
Erythromycin (エリスロマイシン)	EM	人体兼用
Fosfomycin (ホスホマイシン)	FOM	人体兼用
Tetracycline (テトラサイクリン)	TC	人体用
Chloramphenicol (クロラムフェニコール)	CP	人体兼用
Nalidixic acid (ナリジクス酸)	NA	人体兼用
Lincomycin (リンコマイシン)	LCM	人体兼用
Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST 合剤)	ST	人体兼用
供試薬剤数	8	

*人体兼用：動物用及び人体用で承認されている。なお、ABPC、EM、FOM、LCM は水産用でも承認されている。

別表2 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 における精度管理用株の精度管理値 (μg/mL)

精度管理用 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 の MIC が表に示した精度管理値内であることが試験成立条件です。

以下の参考値は CLSI で規定されたものではなく、当所で試験を行った結果から設定した参考値ですので、検査室によって値が異なる可能性があります。精度管理値は、各検査室で精度管理用株を用いて適当な回数感受性試験を行い、その結果から適切な幅を見込んで設定してください。

精度管理用参考値(感受性試験用培地: Cation-Adjusted Mueller- Hinton Broth (CAMHB) + ヘモサプリ)

培養条件	薬剤	ABPC	EM	FOM	TC	OTC*	CP
22℃44～48h into CAMHB+ヘモサプリ		0.5-2	4-16	16-64	0.25-1	—***	0.5-2

培養条件	薬剤	FF	NA	OA**	LCM	ST
22℃44～48h into CAMHB+ヘモサプリ		—	0.12-0.5	—	256-512	2.38/0.12-9.5/0.5

*OTC: Oxytetracycline (オキシテトラサイクリン)

**OA: Oxolinic Acid (オキシリジン酸)

***—: 実施していないもの

〈補足〉

CLSI Vet03-A においては、感受性試験用培地として CAMHB を用いた場合の精度管理値が下記の表の通り設定されています。ヘモサプリを加えない CAMHB を用いる場合は、下記の表の値を精度管理値としてください。なお、ヘモサプリを加えた CAMHB を用いる場合は、下記の表の値は適用できないことにご留意ください。

CLSI Vet03-A において規定されている阻止円直径 (感受性試験用培地: CAMHB)

薬剤	ABPC	EM	FOM	TC	OTC	CP
培養条件						
22℃44～48h into CAMHB	0.25-1	4-32	—*	—	0.12-1	—

薬剤	FF	NA	OA	LCM	ST
培養条件					
22℃44～48h into CAMHB	0.5-2	—	0.008-0.03	—	0.03/0.6-0.25/4.8

*:—は精度管理値を規定していない薬剤

II. 精度管理用菌株の扱いについて

CLSI に準拠した薬剤感受性試験には精度管理用菌株が必要です。精度管理用菌株については、薬剤感受性試験を実施する毎に、その試験成立を確認するために、必ず分離株と同様に試験に用いて、試験毎にその成績を毎回記載する必要があります。

しかしながら *Lactococcus garvieae* の微量液体希釈法には CLSI で推奨されている精度管理用参照株がありません。そのため、感受性試験用培地以外の条件が同じで、精度管理値が規定されている *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 を精度管理用の参照菌株として用いる事により、培養温度、時間、菌の塗布方法等の試験の精度を担保することとしています。

III. 薬剤感受性試験に用いる資材一覧

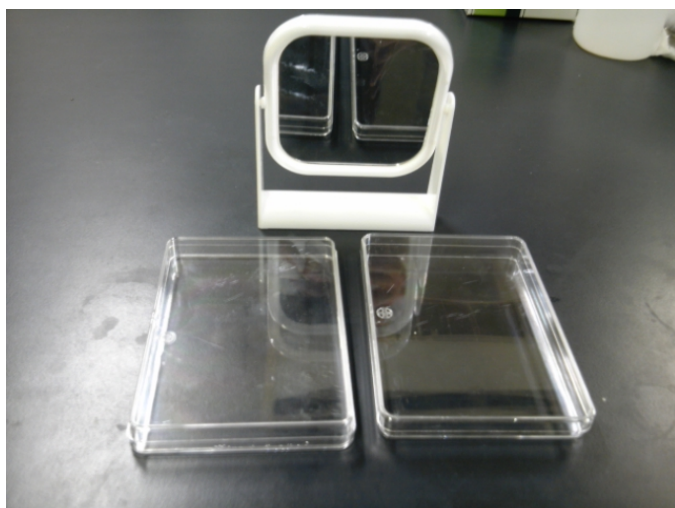
薬剤感受性試験(微量液体希釈法)を実施するため、以下のものがが必要です。

- ・ MIC 測定用プレート:ドライプレート‘栄研’
- ・ ミュラーヒントンブイヨン
- ・ マイクロチップ(200 μ L)
- ・ マルチチャンネルピペット 12 チャンネル又は 8 チャンネル
- ・ 滅菌リザーバー(8 チャンネルの場合プラスチックシャーレで代用可)
- ・ 被験菌株の非選択培地(MHA、HIA 等)
- ・ 滅菌生理食塩水
- ・ MIC 測定用プレートのフタ
- ・ ストレプト・ヘモサプリメント‘栄研’又は馬溶血液

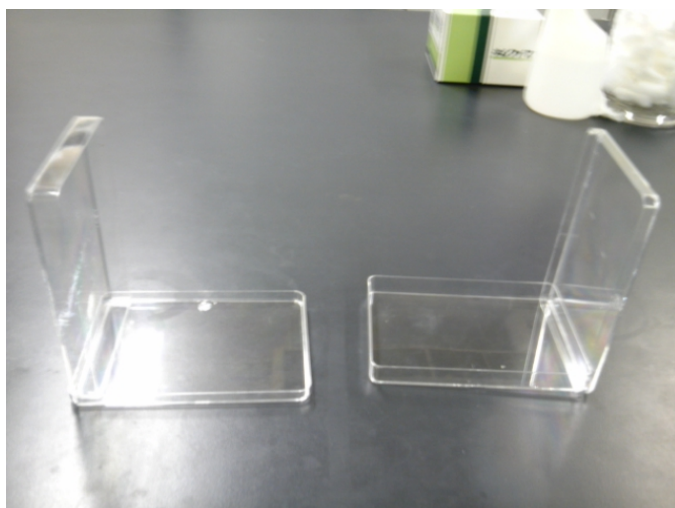
【その他】

- ・ ディスポーザブルシャーレ
- ・ 白金耳、綿棒、試験管、試験管立て
- ・ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ(～100 μ L、～1mL用)
- ・ 22～28℃孵卵器
- ・ ガスバーナー
- ・ 滅菌缶
- ・ 判定用鏡

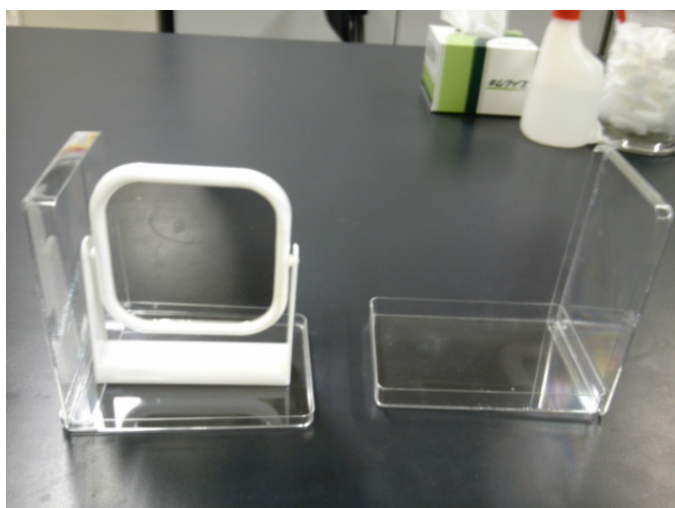
(参考資料)判定用鏡作成方法

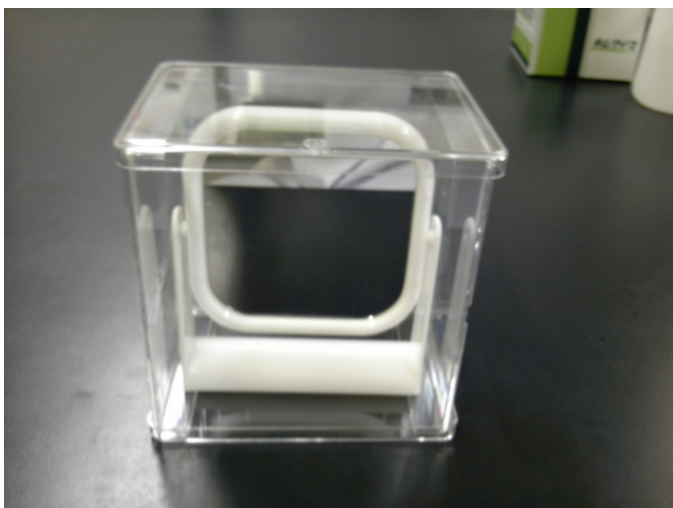


スタンドの鏡(100 円ショップで購入)と
角シャーレ 2 セット用意します。

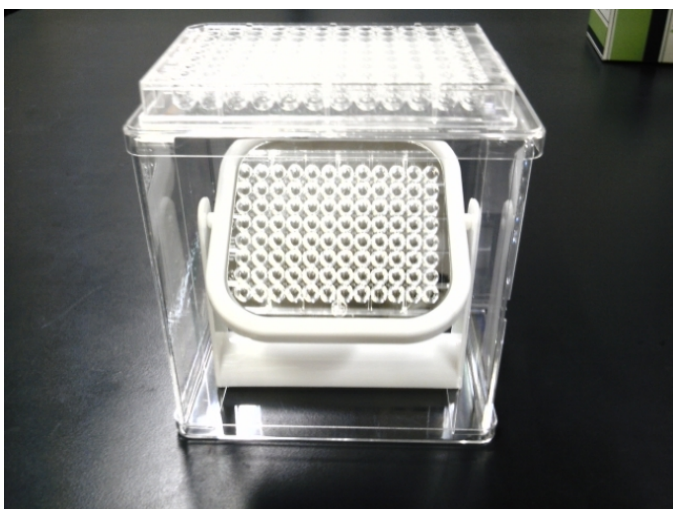


シャーレを L 字に開けます。





L字にしたシャーレでふたをします。



プレートを上に乗せ、鏡の角度を変えて菌の発育状態を判定します。