

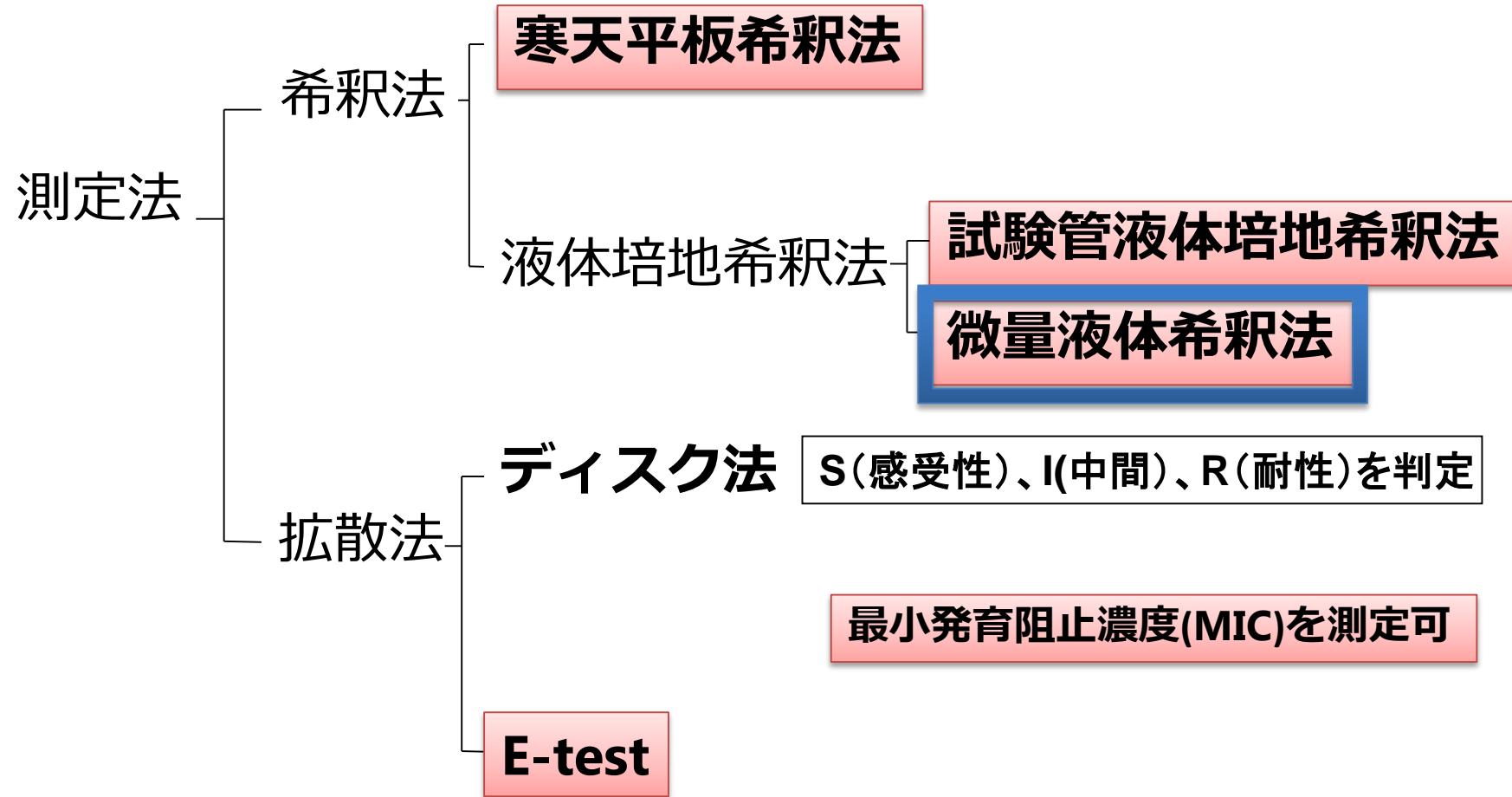
「薬剤感受性試験の実施方法について」

(微量液体希釈法)

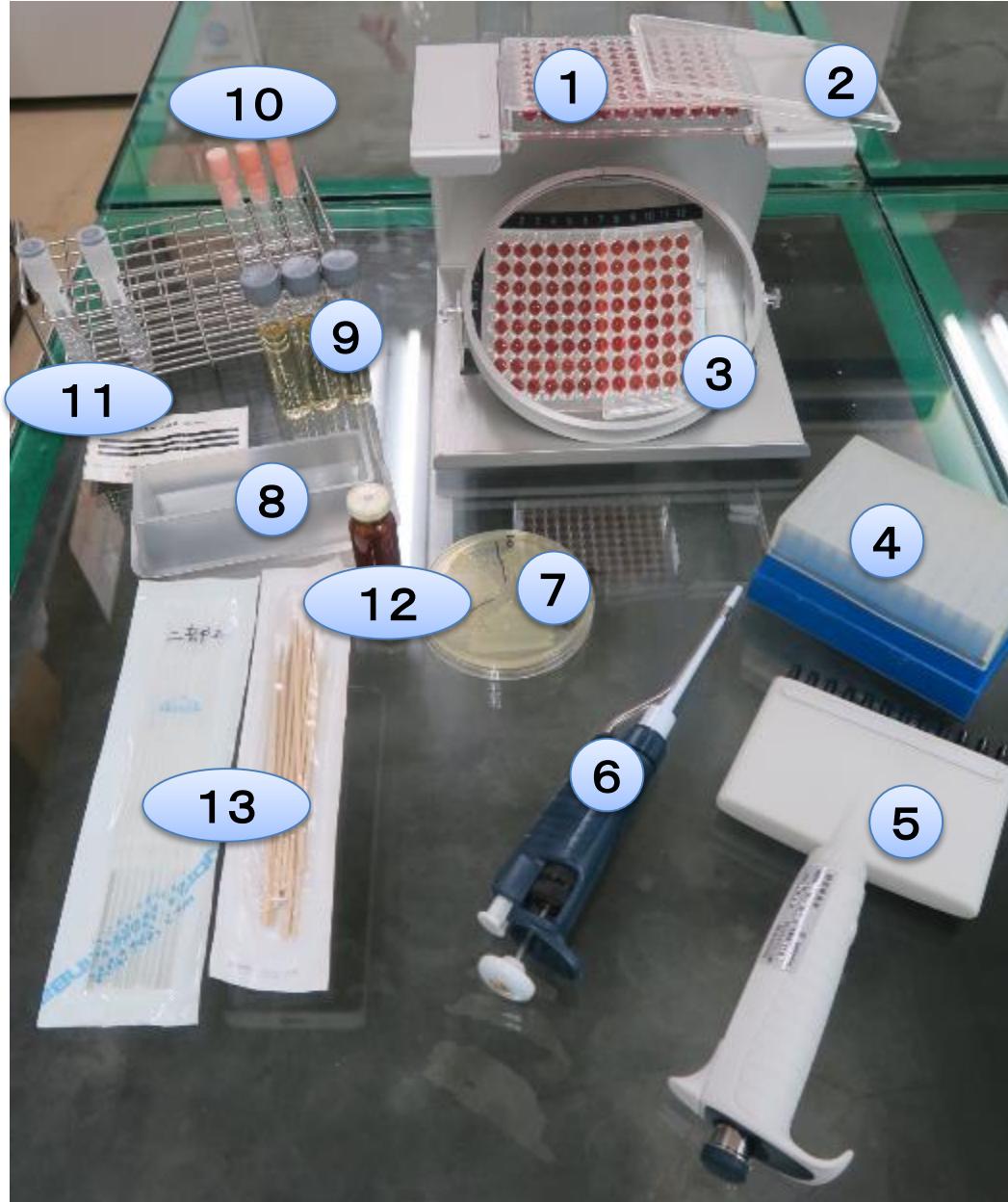
農林水産省動物医薬品検査所



抗菌薬感受性試験法



微量液体希釈法で準備する試薬・器具



- ①ドライプレート
- ②フタ
- ③リーディングミラー
- ④チップ
- ⑤12連又は8連ピペット
- ⑥マイクロピペット
- ⑦菌株
- ⑧リザーバー
- ⑨ミュラーヒントンブイヨン
- ⑩4mL滅菌生理食塩水
- ⑪濁度調整液及び濁度調整紙
- ⑫ヘモサプリメント又は馬溶血液
- ⑬綿棒又はエーゼ

菌液の調整



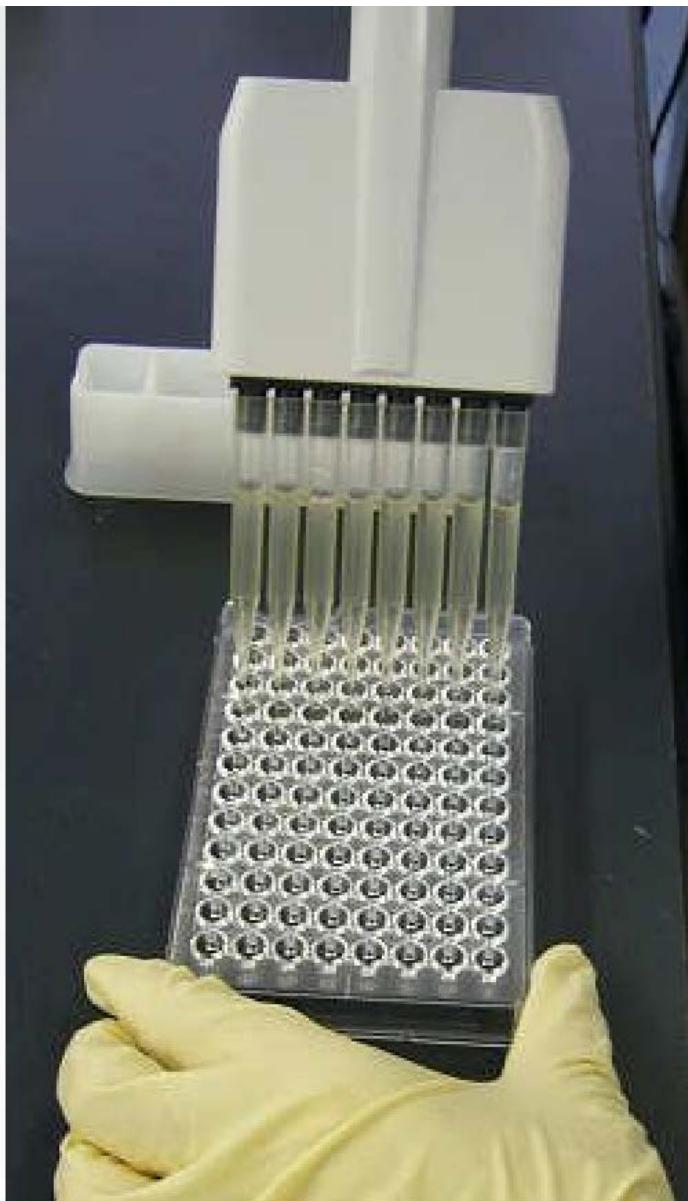
- ・ 22~48時間培養した寒天培地上の被験菌体を釣菌
- ・ 4mLの滅菌生理食塩水に懸濁(Mcfarland標準濁度液0.5と1の間の濁度になるようにあわせる。)
- ・ なお、濁度調整液A液はMcfarland0.5、濁度調整液B液はMcfarland1に相当する

接種用菌液の調整



前もって調製した菌液0.025mL(25μL)を
ヘモサプリ添加MHB (1mLヘモサプリメントを
12mLMHBに添加) に加え、
均等に混和し、それを接種用菌液とする

菌液の接種と培養



- ・接種用菌液をリザーバーに流し込む
- ・チップを装着した8連又は12連ピペットを用いて菌液100μLずつをドライプレートのウェルに薬剤濃度の薄い方から接種する

※ドライプレートは予め冷蔵庫から取り出し、室温に戻しておく

なお、ドライプレートのウェルの底には薬剤が乾燥して貼り付けられているので、接種の際はチップの先端が接触しないように注意する

- ・接種後、フタをして菌種ごとに定められた培養条件で培養する(ドライプレートを重ねて培養する場合、重ねる枚数は最大3枚までとする)



各種菌種培養条件

以下、CLSIにおいて規定されている条件

| 菌名 | 接種用培地 | 培養温度 | 条件 | 培養時間 |
|------------------------------|-----------------------|----------|----|----------------|
| <i>Lactococcus garvieae</i> | CAMHB+ LHB(2.5~5%v/v) | 22°C | 好氣 | 44~48h |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | CAMHB | 22°C | 好氣 | 24~28h又は44~48h |
| | | 28°C | | 24~28h |
| <i>Vibrionaceae</i> | CAMHB | 22°C | 好氣 | 24~28h又は44~48h |
| | | 28°C | | 24~28h |
| 腸内細菌科(ex:大腸菌) | CAMHB | 35°C±2°C | 好氣 | 16~20h |

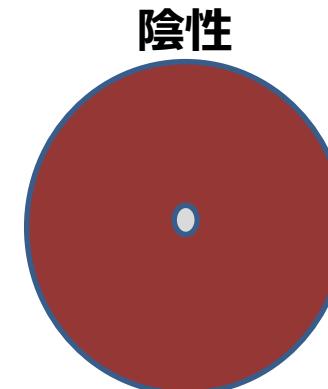
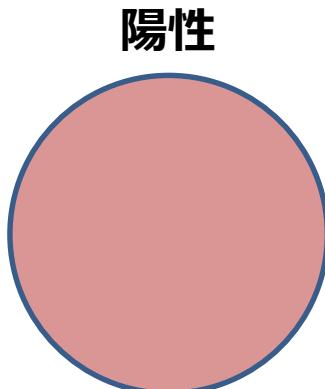
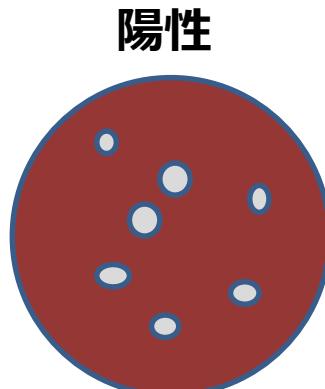
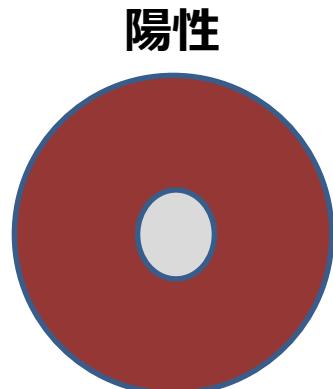
判定

【発育陽性の判定基準】

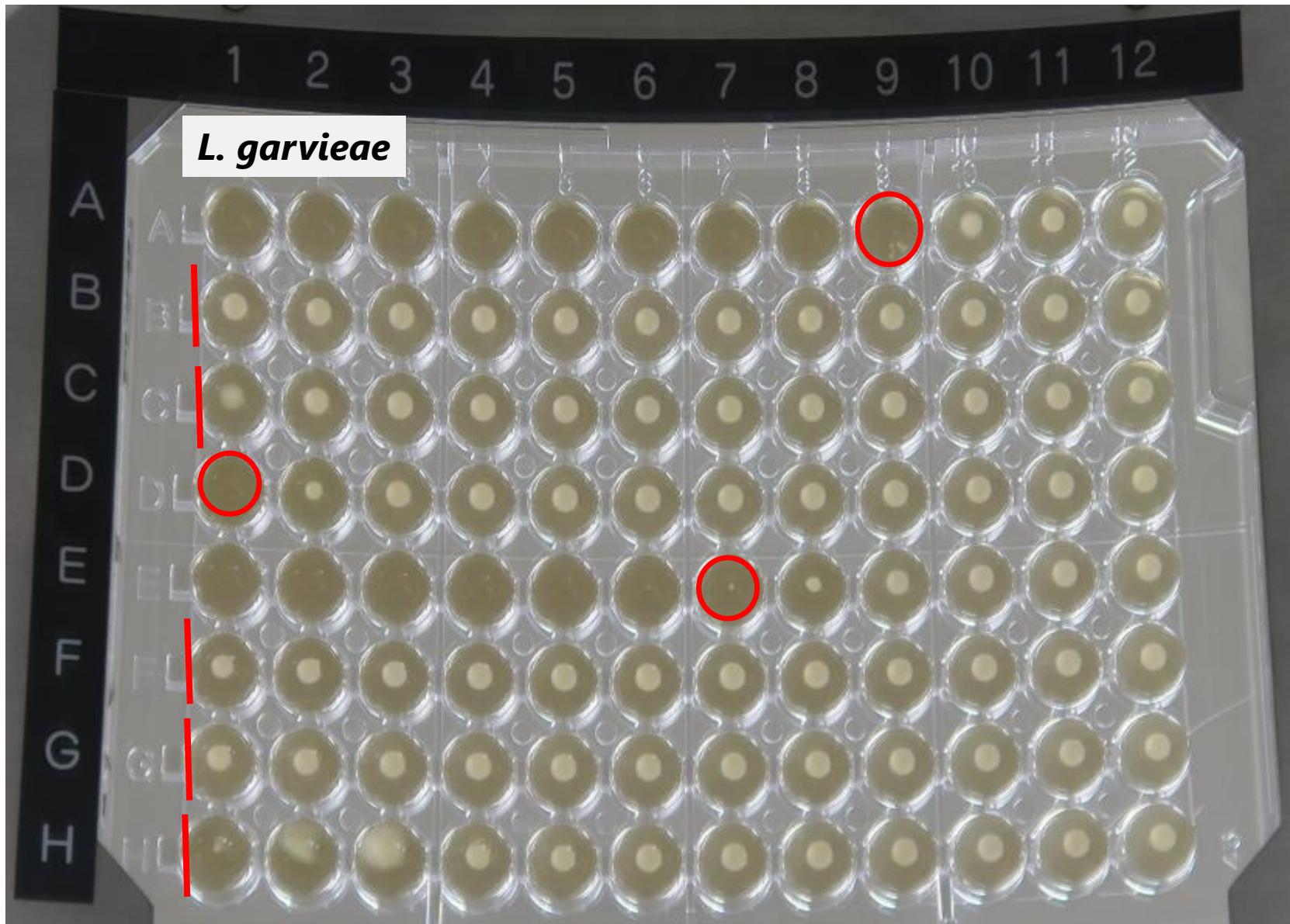
- ・肉眼的に混濁又は直径 1 mm以上の沈殿が認められた場合
- ・沈殿物の直径が1mm未満であっても沈殿塊が2個以上認められた場合

【発育陰性の判定基準】

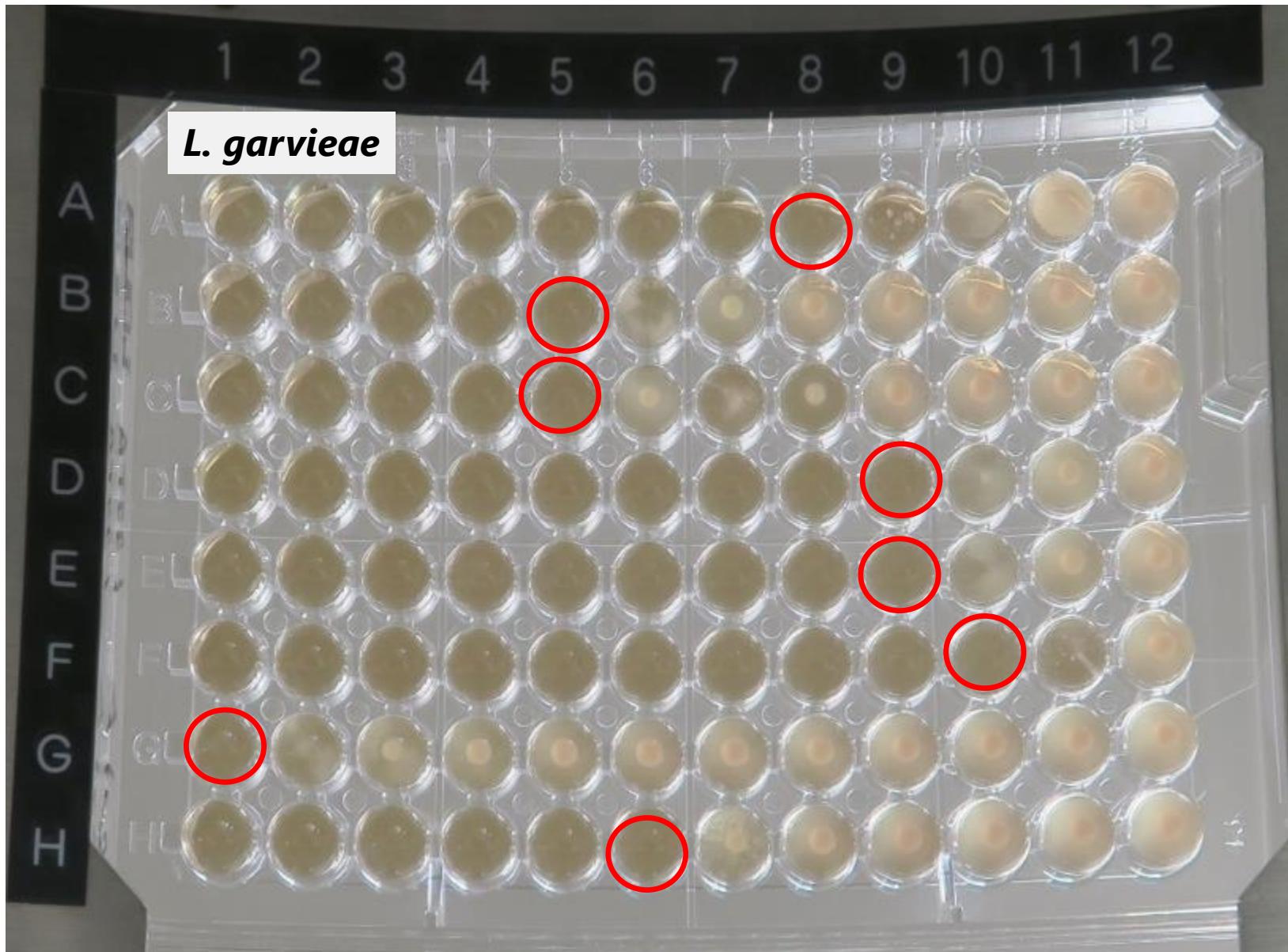
- ・肉眼的に混濁又は沈殿が認められない場合
- ・沈殿物があっても直径が 1 mm未満で 1 個の場合



判定例1



判定例2



最小発育阻止濃度(MIC)

| 薬剤希釈濃度 | 薬剤希釈濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------|
| | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | コントロール |
| 菌の発育 | + | + | + | + | + | - | - | - | + |

MICは $16\mu\text{g}/\text{mL}$

| 薬剤希釈濃度 | 薬剤希釈濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------|
| | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | コントロール |
| 菌の発育 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

MICは $>64\mu\text{g}/\text{mL}$

| 薬剤希釈濃度 | 薬剤希釈濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------|
| | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | コントロール |
| 菌の発育 | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

MICは $\leq 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$



再試験(リテスト)が必要

| 薬剤希釀 濃度 | 薬剤希釀濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------|
| | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | コントロール |
| 菌の発育 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

コントロールが発育していない場合

| 薬剤希釀 濃度 | 薬剤希釀濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------|
| | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | コントロール |
| 菌の発育 | + | - | + | - | + | - | - | - | + |

濃度を飛び越えて発育(スキップ)している場合

精度管理株について



- ・微量液体希釈法を実施する際には、測定対象の菌株と合わせて**精度管理株(*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658)**のMICも測定する
- ・測定後は精度管理株のMICが精度管理用参考値の範囲内であることが試験成立条件となる
 - ・*L.garvieae*と同条件での*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*の精度管理値はCLSIでは定められておらず、精度管理用参考値は、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:CAMHB+ヘモサプリ) *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658

| 培養条件 | 薬剤 | ABPC | EM | FOM | TC | OTC | CP |
|--|----------------|-------|----------|-------|----------|-------------------|-------|
| 22°C 44-48 hours into MHB+ヘモサプリ | 精度管理値 μg/mL | 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°C 44-48 hours into MHB+ヘモサプリ | 精度管理値 μg/mL | - | 0.12-0.5 | - | 256-1024 | 2.38/0.12-9.5/0.5 | |

＜参考1＞*L. garvieae*の微量液体希釈法における CLSI規定の方法、当所での方法との違い

| | CLSI規定 | 当所 |
|----------------------|---------------------|---------------------|
| 接種用培地 | 2.5%～5%馬溶血液添加CAMHB | ヘモサプリ添加CAMHB |
| 培養温度 | 22°C | 22°C |
| 培養時間 | 44～48h | 44～48h |
| 最終接種菌液濃度 (CFU/mL) | 約 5.0×10^5 | 約 5.0×10^5 |

＜参考2＞ストレプト・ヘモサプリメント‘栄研’

日本化学療法学会では栄養要求生の厳しい菌種(*Haemophilus* subsp. (*H.ducreyi*を除く)、*Listeria* subsp.、*Streptococcus* subsp.、*Enterococcus* subsp.、*Moraxella (Brahmella) catarrhalis*)のMIC測定用培地を報告している^{1),2)}。ストレプト・ヘモサプリメント‘栄研’は、この報告による基礎培地への添加栄養成分として開発した試薬である。

1)日本化学療法学会:Chemotherapy, 38 : 102-105, 1990

2)日本化学療法学会:Chemotherapy, 41 : 183-189, 1993

【内容】

本品1バイアルあたり

馬溶血球液……………1.5mL

β-NAD……………1.07mg

酵母エキス……………0.36g

【使用方法】

本品に滅菌生理食塩水又は滅菌精製水5.5mLを添加し内容成分を溶解後、その液1mLをミュラーヒントンブイヨン‘栄研’に添加し、栄養要求生の厳しい菌種の微量液体希釀法によるMIC測定に使用する。

