

抗菌剂的抗菌性能评价试验法
(1) 最小抑菌浓度测定法 I (2018 年度版)
MIC 测定法——液体培养基稀释法

1 适用范围

本试验方法适用于难溶性抗菌剂。

2 试验菌种¹

- (1) 金黄色葡萄球菌 NBRC 12732 (ATCC 6538P)
- (2) 大肠杆菌 NBRC 3972 (ATCC 8739)

3 试验准备

一般情况下, 试验中使用的化学药品和器具应为日本工业标准以及日本药典中指定的化学药品和器具。

3.1 器具、仪器

- (1) L 形试管 (玻璃材质、有盖、长 130~140mm、高 110~120 mm、外径 18 mm)
- (2) 振荡培养机 (精度在±1℃以内的机型)
- (3) 恒温器 (精度在±1℃以内的机型)

3.2 培养基

(1) 普通琼脂培养基 (NA 培养基)

肉提取物	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
精制水	1,000 ml
pH	7.0~7.2

(2) Mueller-Hinton Broth 培养基 (MHB 培养基)²

肉提取液	300.0 g
酪蛋白氨基酸	17.5 g
可溶性淀粉	1.5 g
精制水	1,000 ml
pH	7.3±0.1

¹ 分别选择革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的代表菌作为试验菌种。

² 日本化学疗法学会使用的 MIC 测定法是 MHB 琼脂培养基。MHB 琼脂培养基生产商包括荣研化学 (仅琼脂培养基)、DIFCO、BBL、Merck 等。

4 试验方法

4.1 试验菌的培养

将试验菌移植到普通琼脂培养基中，在 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 24 小时。再将上述培养菌移植到 MHB 培养基中，在 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 16~20 小时。

4.2 接种用菌液的制备

使用 MHB 培养基¹稀释培养液，使菌液中的菌数达到 $1.0\sim 5.0\times 10^4/\text{ml}$ 。

4.3 试验用培养基的制备²

在灭菌后的 L 形试管中加入 MHB 培养基 10ml，再依次以 $800\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 为基准添加 2 倍量或 1/2 倍量的试样^{3,4,5}。测量并调节培养基的 pH 值，使 pH 值保持在添加试样前培养基 pH 值 ± 0.5 范围内。

在经以上步骤制备而成的培养基上接种 0.1 ml 的接种菌液⁶。

4.4 试验操作

将振荡频率调节至 100~200 rpm（水平振荡或垂直振荡）、振幅 40~60 mm，持续 24 小时，将培养基在 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 下振荡培养 24 小时，使试样混合均匀。

¹ 稀释用的 MHB 培养基适用于日本化学疗法学会标准法，其中接种菌液中菌数的设定与该标准法的接种菌数相同。

² L 形试管应采用干热灭菌（温度为 180°C 时持续 30 分钟以上， 170°C 时 60 分钟以上， 160°C 时 120 分钟以上），MHB 培养基应采用高压蒸汽灭菌（温度为 121°C 时 15 分钟）。对于瓶塞，应考虑其耐热性等，通过适当方法进行灭菌后用于试验。

³ 需配制未添加试样的样品进行对照试验。

⁴ 由于试样需直接放入培养基中，故试样中的微生物会对试验结果产生影响，因此试样最好是无菌的。应预先对试料进行灭菌（灭菌方法除干热灭菌外，还有高压蒸汽灭菌、气体灭菌等。）。

① 可高温加热的试样

将试样在 180°C 下加热 30 分钟及以上，在 170°C 下加热 60 分钟及以上，在 160°C 下加热 120 分钟及以上，以对试样进行灭菌和干燥。干燥后，放入装有硅胶的干燥器中冷却。

② 不可高温加热的试样

使用适当的方法对试样进行灭菌后，在不损坏试样的温度范围和时间内干燥，并放入装有硅胶的干燥器中冷却。需注明干燥和灭菌的条件。注意，加热温度或时间不足可能会导致芽孢杆菌孢子存活。

⁵ 标准值为 $800\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，实际操作时应在 3200、1600、800、400 和 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内进行试验。

⁶ 接种菌液设定为 0.1ml，菌数与日本化学疗法学会标准方法相同。

4.5 判定

培养完成后，通过肉眼观察检查有无¹试验菌生长，将未发现试验菌生长²的试样中的最低浓度作为最小抑菌浓度。

除非法律许可，否则在未经授权的情况下复制本文档的全部或部分即构成侵害著作权。

抗菌制品技术协议会

¹ 通过肉眼观察确认生长的菌数在 10⁶ 个/ ml 以上。

² 通过肉眼观察来判断试验菌是否生长。当无法根据试样的浑浊度判定试验菌有无生长时，根据以下方法进行判定。使用磷酸盐缓冲的生理盐水将培养基稀释至 10000 倍，并使用铂或镍铬合金金属丝环（内径 1mm）在普通琼脂培养基上划线，检查试验菌的生长情况。

* 磷酸缓冲生理盐水：将 34 g KH₂PO₄ 溶解在 500 ml 的精制水中，用 NaOH 水溶液调节 pH 值到 7.2 后定容至 1000 ml。取 1.25ml 该溶液使用生理盐水 (0.85%NaCl) 稀释为 1000ml 溶液，并在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 15 分钟。