

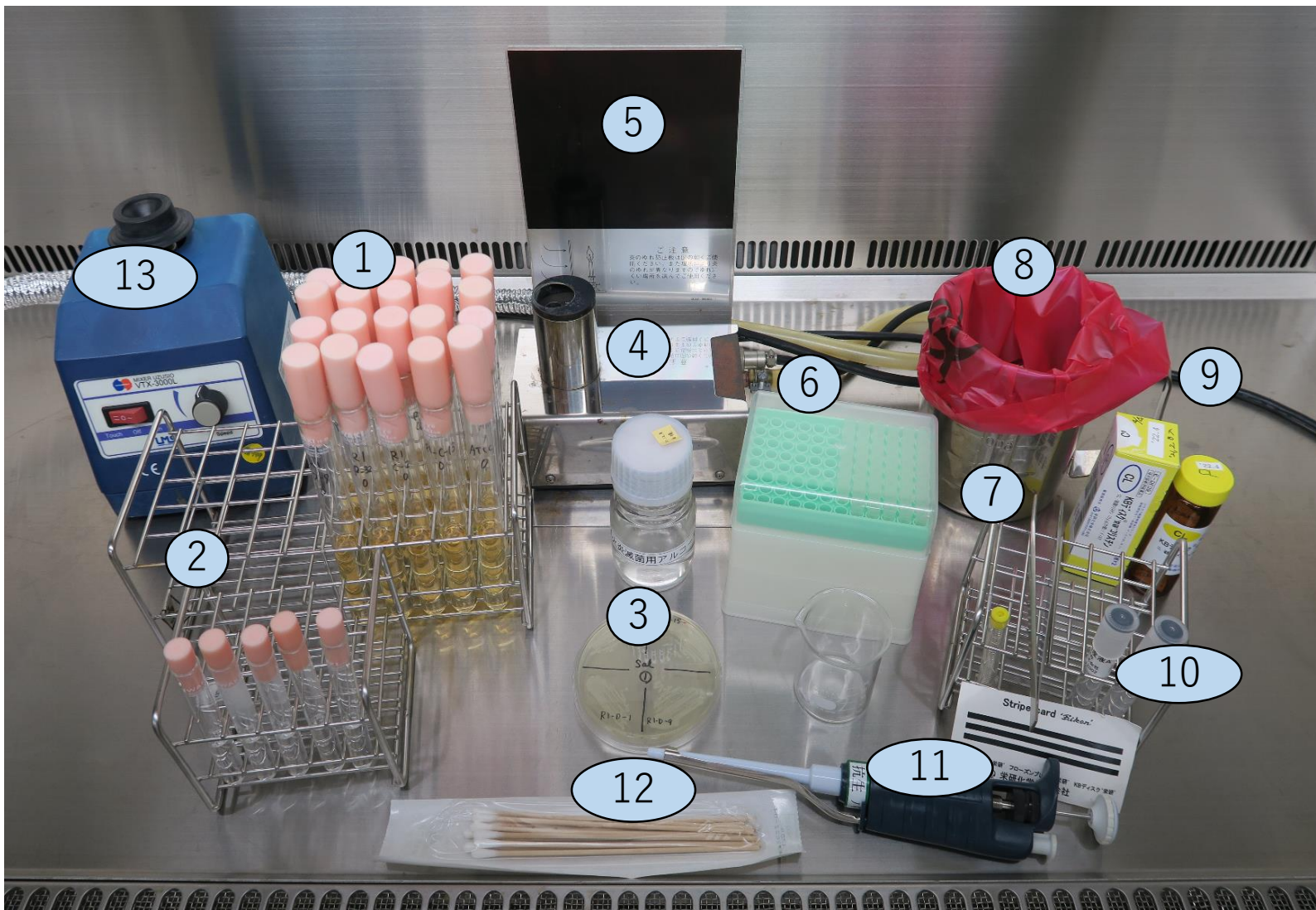
コリスチンの薬剤感受性試験法

Colistin Broth Disk Elution (CBDE) 法

CLSI M100 30th (2020.1)

CBDE法の実施手順

CBDE法で準備する試薬及び器具



液面とフタまでの距離に余裕がある中試がおすすめです。また透明度の高い試験管を使用してください。

- ①陽イオン調整ミューラーヒントンブロス (10mL)
- ②3mL滅菌生理食塩水
- ③被験菌株及び精度管理株
- ④火炎滅菌用アルコール
- ⑤ガスバーナー
- ⑥チップ (あればロングチップ)
- ⑦ピンセット
- ⑧医療廃棄物入れ
- ⑨コリスチンのディスク (10 μ g)
- ⑩濁度調整液
- ⑪マイクロピペット
- ⑫滅菌綿棒又は滅菌エーゼ
- ⑬ボルテックス (なくても実施可能)

※CLはプラスチック素材に吸着しやすいので、ディスクに直接触れる器具はプラスチック製のものを避けてください。

試験方法

【1日目】

- ①被験菌株及び精度管理株（※）を非選択培地（ハートインフュージョン寒天培地等）で起こす。
- ② $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の好気条件下で18～24時間培養する。

【2日目】

- ③陽イオン調整ミューラーヒントンブロス（CAMHB）とコリスチン（CL）のディスクを必要な数（CAMHB：4本/株、ディスク：7枚/株）用意し、室温に戻す。
- ④室温に戻したCAMHBのチューブに株名とCLの濃度を記入し、それぞれの濃度になるように下記の枚数のディスクを無菌的に入れる。

<CLのディスクの枚数>

- ・ 0枚（コントロール）
- ・ 1枚（CL濃度： $1 \mu\text{g/mL}$ ）
- ・ 2枚（CL濃度： $2 \mu\text{g/mL}$ ）
- ・ 4枚（CL濃度： $4 \mu\text{g/mL}$ ）

※精度管理株

- ・ *P. aeruginosa* ATCC 27853
- ・ *E. coli* AR Bank # 0349 mcr-1

いずれも精度管理値は $\leq 1 \sim 4 \mu\text{g/mL}$

- ⑤CAMHBを10秒程度静かにボルテックスまたはタッピングし、30～60分室温に静置してCLを溶出させ、希釈列とする。

底に沈んだディスクがクルクルと上まで舞い上がる程度。蓋に液が付かないように注意してください。



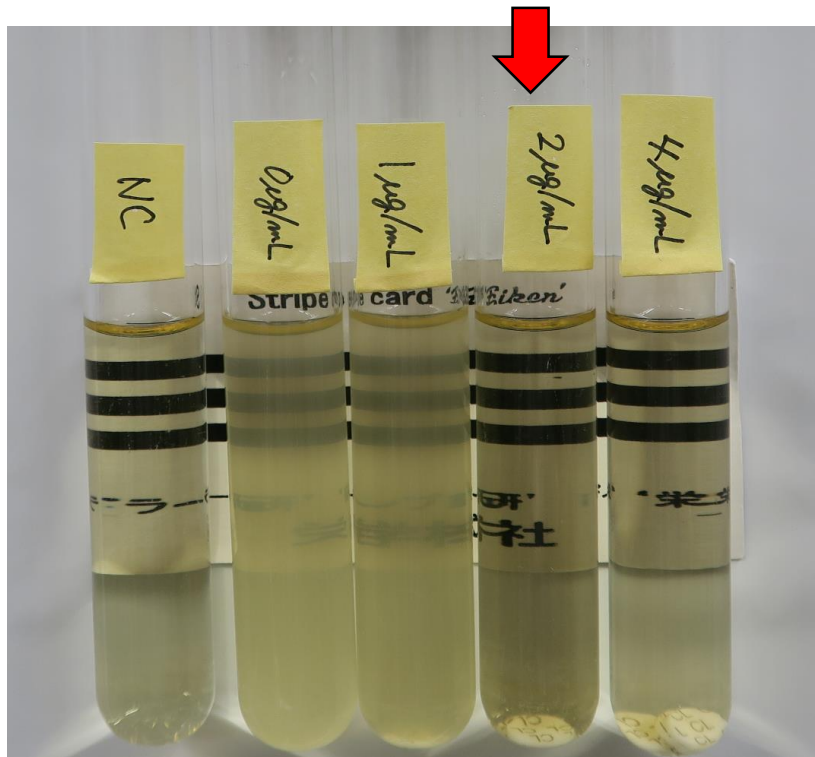
- ⑥新鮮培養菌を綿棒等で釣菌し、滅菌生理食塩水 3 mLに懸濁して濁度をMcFarland 0.5に調整する。
- ⑦濁度調整後15分以内に、全ての希釈列のCAMHBに菌液を50 μ Lずつ接種する。
- ⑧接種後、10秒程度静かにボルテックスまたはタッピングする。
- ⑨ねじ蓋の場合はインキュベーターに入れる前に蓋を少し緩める。
- ⑩33～35℃の好気条件下で16～20時間培養する。

⑤の時と一緒にです。

通気性のある栓を用いる場合は緩めなくてOKです。

【3日目】

- ⑪完全に菌の発育が阻止されている濃度をMICとして判定する。
(例)



ごく薄く菌が生えている場合もあるため、陰性対照（菌液未接種のフロス）を1本用意し、濁度調整用の黒線の入った紙を背景にして判定すると判定しやすいです。

※濁度を見て判定するため、透明度の高い試験管を使用してください。

この例の場合のMICは $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ になります。

- ⑫精度管理株のMICが精度管理値に入っていることを確認し、外れた場合は再試験を行う。

精度管理値がいずれも $\leq 1 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ なので、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ のチューブに発育が認められていない限り精度管理値に入っていることになります。