



# [12] 实用新型专利说明书

[21] ZL 专利号 02263485.1

[45] 授权公告日 2003 年 8 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 2564584Y

[22] 申请日 2002.08.02 [21] 申请号 02263485.1

[73] 专利权人 邢 军

地址 210024 江苏省南京市珞珈路 9 号新 2 栋 7 号信箱

共同专利权人 周春莉

[72] 设计人 邢 军 周春莉

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

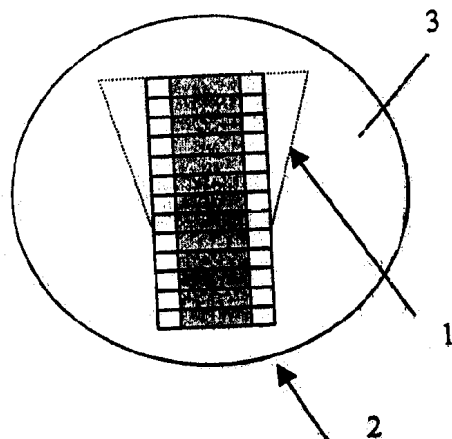
代理人 陈建和

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称 细菌药物敏感性试验检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板

### [57] 摘要

检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，将定量的抗菌素浓度梯度滤膜条固定在基片上，即成为细菌药物敏感性试验检测板。滤膜条上相邻抗菌素浓度成倍增长，设有 8 至 13 级浓度单位。本实用新型在固体或半固体培养基表面，对细菌进行药物敏感性及其抗菌素最小抑菌浓度(MIC)两位一体的检测手段；使用简便，其检测抗菌素最小抑菌浓度(MIC)的功能可替代目前国外生产的昂贵的仪器，供各级医院，兽医站及食品行业使用。本实用新型可靠，简便易行，成本低。



1、检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征是将定量的抗菌素浓度梯度滤膜条固定在基片上，即成为细菌药物敏感性试验检测板。

2、由权利要求1所述的检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征是滤膜条上相邻抗菌素浓度成倍增长，设有8至13级浓度单位。

3、由权利要求1所述的检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征是滤膜条是矩形。

4、由权利要求2所述的检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征滤膜条上相邻抗菌素浓度成倍增长，尤其是从一个单位至4000个单位。

5、由权利要求1所述的检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征是滤膜片每级抗菌素浓度宽度1.5-5mm。

6、由权利要求5所述的检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板，其特征是将滤膜片切成2.5毫米长，10毫米宽的小矩形片，分别将含有氨卞青霉素浓度为每毫升2000, 1000, 500, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1和0.5微克的溶液滴一至两滴到滤片的表面，将这些滤膜片粘附于一60毫米长，10毫米宽的硬塑料片上。

## 细菌药物敏感性试验检测抗菌素的最小抑菌浓度检测板

### 一、技术领域

本实用新型涉及一种细菌药物敏感性试验检测抗菌素的最小抑菌浓度的检测板。尤其是应用了抗菌素浓度梯度的方式，在固体或半固体培养基表面直接检测出抗菌素的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 及用于对细菌进行药物敏感性试验。

### 二、技术背景

细菌感染为临床上最为常见的疾病，通常在确定为何种病原菌感然之后，要进行抗菌素的药敏试验及抗菌素的最小抑菌浓度(MIC) 的检测，以确定该致病菌对那种抗生素敏感及该抗菌素的最小抑菌浓度 (MIC) ，指导医生选择敏感的抗菌素及相应的剂量。

现有传统的方法是：一般是将细菌涂布于固体或半固体培养基表面，然后将直径约 0.5 厘米的，含一定量抗菌素的滤膜片贴在固体或半固体培养基的表面。将培养皿放入 37℃左右孵箱培养过夜，远离滤膜片的培养基上有均匀的，不透明的苔样细菌生长。而在滤膜片的附近，对该抗菌素敏感的细菌可围绕滤膜片形成透亮区，透亮区越大，表明细菌对该抗菌素越敏感；透亮区越小或不形成透亮区，表明细菌对该抗菌素不敏感或有耐药性。

但用抗菌素滤膜片检测细菌药物敏感的方法并不完善，它不能提供抗菌素的最小抑菌浓度( MIC ) ， MIC 是临床上指导医生使用抗菌素的很重要的一个指标。如使用抗菌素的浓度低于最小抑菌浓度，抗菌素将不产生抑制细菌生长的治疗作用，反而会诱导耐药菌的产生。虽然，现在临床上抗菌素的用量一般根据药厂所提供的参考剂量使用，但病人对抗菌素的反应不一，随着耐药菌株感染的扩大，药厂提供的参考剂量已不能再满足临床需要了，抗菌素的使用越来越偏向于个性化。

目前，国外也生产一种可自动检测细菌对抗菌素敏感性及其最小抑菌浓度的设备，但价格十分昂贵，在 4-5 万元人民币以上。在使用该仪器前，首先将细菌接种于透明的 96 孔塑料板内，各个孔内含有不同浓度的抗菌素，经 37℃左右培养过夜后，可见各孔有浑浊不一的细菌生长，含较高抗菌素浓度的孔浑浊度低，而抗菌素浓度低的孔浑浊度高。经仪器扫描照相，通过相应的软件处理后，可得出抗菌素对细菌的最小抑菌浓度。

但该仪器十分昂贵，一般国内大型医院还尚未使用。因此，国内现在一般医院还没有简便的方法检测抗菌素对细菌的最小抑菌浓度(MIC)，这对医生用药及病人的治疗都是一大不足。本法采用抗菌素浓度梯度条的方式，在固体或半固体培养基的表面直接检测抗菌素的最小抑菌浓度及细菌的药物敏感性，可达到指导医生用药，帮助病人提高治疗效果，又可替代用昂贵仪器检测抗菌素最小抑菌浓度(MIC)的三大目的。

### 三、发明内容

本实用新型目的是：1：寻找一种成本低，可同时检测细菌对抗菌素的敏感性及其抗菌素最小抑菌浓度 (MIC) 两个指标的方法及检测板；2：该方法和检测装置可直接在细菌培养的固体或半固体培养基表面进行；3：临床医生可根据该方法定量检测出最小抑菌浓度，确定抗菌素用量，保证抗菌素治疗的有效性；4：本实用新型在目前国内条件下，可在低成本上代替昂贵的进口仪器。

本实用新型的目的是这样实现的：应用抗菌素浓度梯度的方式，对生长在固体表面的细菌进行药物敏感性试验，检测抗菌素的最小抑菌浓度( Minimal Inhibitory Concentration, MIC )及细菌对不同抗菌素的药物敏感性。具体是：将含有不同抗菌素浓度的滤膜片固定在一矩形基片上，制备成可检测细菌药物敏感性及其抗菌素最小抑菌浓度的装置。基片上的相邻滤膜抗菌素浓度呈成倍增长，一般由 8 至 13 级浓度单位，如从一个单位至 4000 个单位共 13 级，一个单位至 2000 个单位共 12 级，一个单位至 1000 个单位共 11 级，一个单位至 500 个单位共 10 级，依此类推。基片一般是矩形的。

本实用新型有以下几个新特点：

1：在固体或半固体培养基表面，直接应用抗菌素浓度梯度的方式检测抗菌素的最小抑菌浓度( MIC )；

2：通过该试验可获得以下结果，1：观察细菌对何种抗菌素敏感；2：可检测出抗菌素的最小抑菌浓度 ( MIC ) ；

3：临床医生可根据抗菌素的最小抑菌浓度，确定抗菌素的用量，保证抗菌素治疗的有效性；

4：国内目前尚无在固体或半固体培养基表面，对细菌进行药物敏感性及其抗菌素最小抑菌浓度 (MIC) 两位一体的检测方法；

5：本实用新型实际上提供了一种方法，使用简便，其检测抗菌素最小抑菌浓度 (MIC) 的功能可替代目前国外生产的昂贵的仪器，供各级医院，兽医站及食品行业使用。本实用新型可靠，简便易行，成本低。

### 四、附图说明

图 1 为本实用新型结构示意图

图 2 为现有技术结构示意图

图 1 和图 2 为示意图，显示了本实用新型发明的基本原理和构成。大圆为含有 LB 固体培养基的培养皿，1 为虚线所围绕的区域为抗菌素抑制细菌生长所形成的透亮区，图 2 中虚线所围绕的三角形透亮区在实际观测时呈梨形；2 为为抗菌素浓度梯度滤膜条，滤膜条上数字为抗菌素浓度单位；3 为苔样不透亮的细菌生长区；4 为现有技术中应用的含一定量抗菌素浓度的滤膜孔。

#### 五、具体实施方式

图 2 为现在常用的细菌药敏检测方法，它只能检测固定剂量下细菌对某一抗菌素的敏感性；而图 1 为本实用新型结构，可见在生长有细菌的平板上形成两个三角形的透亮区，随着氨卞青霉素的浓度的增加，透亮区逐步增大，其和浓度梯度滤纸条相交处的浓度即为氨卞青霉素的最小抑菌浓度 (MIC)。

所述抗菌素为氨卞青霉素，本实验中将 60 毫米长，10 毫米宽含有不同浓度的氨卞青霉素滤膜条 (从每毫升 2000 微克至 0.5 微克不等) 置于涂布有大肠杆菌 DH5  $\alpha$  的固体培养基的表面，经 37°C 左右过夜培养，可见从每毫升 10 微克至 2000 微克处形成一距离从小至大的梨形透亮区，低于每毫升 10 微克的氨卞青霉素未见有透亮区形成。这一结果说明，当氨卞青霉素在大于每毫升 10 微克时可产生抑制细菌生长的作用，这是氨卞青霉素对大肠杆菌 DH5  $\alpha$  的最小抑菌浓度 (MIC)。

滤膜条是一个矩形，在制作时可以每个浓度单位的刷子刷涂，每个浓度的宽度 4-8mm

#### 1: 制备含浓度梯度的氨卞青霉素片

将滤膜片切成 2.5 毫米长，10 毫米宽的小矩形片，分别将含有氨卞青霉素浓度为每毫升 2000, 1000, 500, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 和 0.5 微克的溶液滴一至两滴到滤片的表面，凉干之后，将这些滤膜片粘附于一 60 毫米长，10 毫米宽的硬塑料片上，密封保存于 4°C 左右备用。另一种制法是(机械化): 制作时可以用不同氨卞青霉素浓度单位的刷子刷涂或滚轮滚涂 (并列的滚轮)，每个滚轮的宽度即每级浓度的宽度为 1.5-5mm，这样可以制成相邻抗菌素浓度成倍增长的无限长的滤膜条，切割后使用。

#### 2: 培养大肠杆菌 DH5 $\alpha$

从 -20 度冰箱中取出实验用大肠杆菌株 DH5  $\alpha$ ，溶化后用接种环取一环接种于 5 毫升无菌，室温的 LB 培养液中 (蛋白提取物 10 克，酵母菌提取物 5 克，氯化钠 10 克，加水 1 升，高压 125 度 15 分钟消毒)，在 37 度摇床中每分 200 次振荡培养过夜。取 50 微升细菌涂布于 LB 培养基表面 (蛋白提取物 10 克，酵母提取物 5 克，

氯化钠 10 克，琼脂 15 克，加水 1 升，高压 125 度 15 分钟消毒，待凉至 50 度后，取 20 至 30 毫升倒入培养皿内)，待完全干燥后，将含浓度梯度的氨卞青霉素条置于其表面。

### 3: 观察含浓度梯度氨卞青霉素的滤膜片片对大肠杆菌生长的抑制作用

含浓度梯度的氨卞青霉素滤膜条从高到低按每毫升 2000, 1000, 500, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 和 0.5 微克排列，和涂布有大肠杆菌 DH5  $\alpha$  的固体培养基表面相接触。37 度过夜培养后，第二天可发见，从每毫升 10 微克的滤膜片处至 2000 微克处形成一距离从小至大的梨形透亮区，低于每毫升 10 微克的氨卞青霉素未见有透亮区形成，这表明每毫升 10 微克的氨卞青霉素是该抗菌素的最小抑菌浓度。

本试验证明，用含有不同浓度的氨卞青霉素滤膜条放在涂布有大肠杆菌 DH5  $\alpha$  的固体培养基的表面，可观察到大肠杆菌 DH5  $\alpha$  对该抗菌素敏感及该抗菌素的最小抑菌浓度。在本实验中，每毫升 10 微克的氨卞青霉素浓度即为氨卞青霉素对大肠杆菌 DH5  $\alpha$  的最小抑菌浓度。根据实验结果，该方法简便易行，可推广至临床检验科室及任何涉及细菌检验的单位使用，应用于观察不同抗菌素对细菌的最小抑菌浓度，及选择细菌敏感的抗菌素。

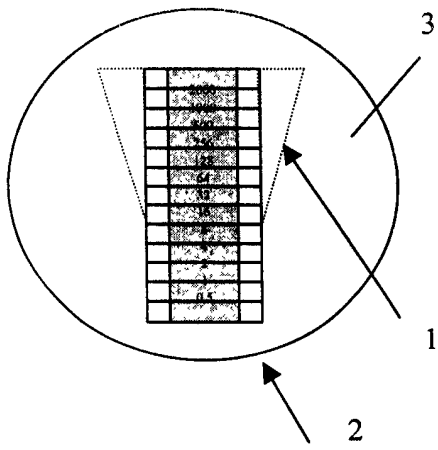


图 1

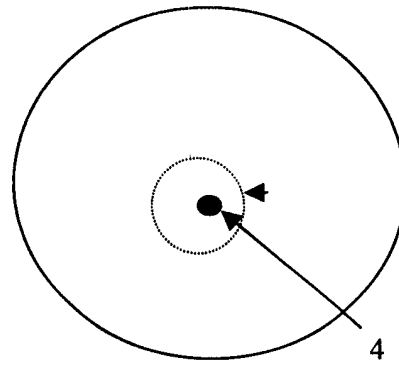


图 2