**《微生物源抗生素类次生代谢物抗细菌活性测定**

 **抑菌圈法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国家标准委关于下达2018年第二批国家标准制修订计划的通知》（国标委综合〔2018〕41号》，项目编号“20181036-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国计量大学等单位共同组成。

二、目的和意义

微生物源抗生素类次生代谢产物化学结构复杂，种类繁多，在医药、食品、农业等领域发挥着重要的作用，对国民经济所作的贡献令人瞩目。日本和美国等国家对次生代谢产物的研究一直处于世界领先地位。我国次生代谢产物研究起步较晚，总体处于跟跑阶段，且产品同质化严重，缺乏核心竞争力。目前，我国次生代谢物研究领域存在的主要问题有：活性测定和功效评价缺乏统一的试验方法和标准；以次生代谢物为主要活性成分的产品质量控制缺乏统一的标准和先进的技术等。因此，本课题拟在前期工作基础上，研究建立次生代谢产物活性测定、功效评价技术等相关标准。研究结果将为以次生代谢产物为主要活性成分的活性评价、产品研发和质量控制提供强大的技术保障，有效推动次生代谢物产业的发展。

抗菌活性是指抗菌物质抑制或杀灭病原微生物的能力，可用体外抑菌试验和体内实验治疗法测定。体外抑菌实验对临床用药或者农业上病害防治以及食品领域均具有重要参考意义。抑菌圈法是杀菌剂抗细菌活性测定的常规方法之一，抑菌圈法又叫扩散法，是利用待测药物在琼脂平板中扩散使其周围的细菌生长受到抑制而形成透明圈，即抑菌圈，根据抑菌圈大小判定待测药物抑菌效价的一种方法。抑菌圈法操作便捷、简单易行、成本低廉、结果准确可靠，是抑菌试验的经典方法，被广泛使用。而牛津杯法又是目前抑菌圈研究法中使用最多的方法。牛津杯法又称杯碟法，将已灭菌的牛津杯置于试验平板中，往杯中注入一定量的待测样品，培养一段时间后测定抑菌圈大小的一种方法。但在利用该方法测定活性物质抗细菌作用时，往往由于不同研究者采用的供试菌和培养基的不同，以及培养时间、培养温度和供试菌浓度等条件的不一致，从而得出不同的抑制效果。同时现有的抗菌活性测定相关标准中，往往以抑菌圈的大小作为评价指标。抑菌圈的大小虽然很直观地反应了供试药剂对供试菌是否有抑制作用以及抑制强弱，但缺乏抗菌物质的量和抑菌效果间的关系方程，也无法用于不同抗生素间抑菌效果强弱的比较。因此，统一微生物源抗生素类次生代谢产物抑细菌活性测定的方法和评价指标，是目前次生代谢产物领域亟待解决的问题。

为了规范微生物源次生代谢产物抗细菌活性测定方法和评价指标，本标准将对抗细菌活性实验中的培养基、培养条件等进行优化，同时以半抑制浓度IC50（Median Inhibition Concentration，指对供试菌的抑制率达到50%时所用的药物浓度）作为评价指标，明确微生物源次生代谢产物抗细菌活性的量效关系和IC50。本标准的制定可为监管部门提供技术支撑以及为以次生代谢产物为活性成分的产品研发提供活性测定和评价方法。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》，标准编写内容参考了与抑菌活性测定标准相关的文献。

1. 供试菌株具代表性

抗细菌活性测定时，供试的细菌种类很多，有农业上引起植物病害的病原细菌、食品中引起腐败变质的细菌以及医学上的病原细菌等。考虑到选择的供试菌株应具有代表性，标准起草小组分别选取了革兰氏阳性菌和阴性菌作为供试菌。这充分体现了标准的通用性特点。

2. 高效性

为了注重评价的高效性，供试菌株应尽量选择易培养，代时短的菌株。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考我国与抑菌活性测定相关的标准，包括《微生物源酶制剂抗菌活性的测定》和《纺织品 抗菌性能的评价 第1部分：琼脂平皿扩散法》等等。

四、标准主要技术内容

本标准内容主要包括7个部分：范围、术语和定义、原理、仪器设备及器具、试剂与材料、操作步骤、结果判定。

本标准中主要技术指标说明如下：

**（一）供试菌选择**

抑菌圈法测定常用的指示菌有金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）和枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。等。结合起草组前期制定的标准编制原则，将金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）ATCC6538和大肠杆菌（*Escherichia coli*）ATCC11229，主要理由如下：

（1）金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）ATCC6538和大肠杆菌（*Escherichia coli*）ATCC11229分别是革兰氏阳性菌和阴性菌的典型代表。

（2）这两种菌的代时短，易培养。

根据微生物源抗生素类次生代谢产物应用领域的不同，也可以采用其它菌株作为供试菌，如农业领域可以采用丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae* van Hall pathovar lachrymans）ATCC 7386为供试菌株，它是引起植物角斑病的病原细菌。具体可按照实际情况进行选择。

**（二）培养基选择**

实验室常用培养细菌的培养基有LB培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和营养肉汤培养基等。其中LB培养基更常用，主要理由如下：

（1）该培养基可以提供细菌生长的全部营养，也就是能确保细菌良好生长。

（2）有市售的商业培养基，且相比其它培养基价格上有优势。

**（三）微生物源次生代谢产物浓度选择**

本标准中IC50值是根据回归方程计算获得，所以为了使方程更准确，至少需要配置5个不同的浓度，分别测定它们对供试菌的抑制作用。但抗菌物质浓度选择上应注意浓度过高或过低引起的抑菌效果差异不明显。最理想的结果是回归方程中既有抑制率大于50%分布的点，也有抑制率小于50%分布的点，需要避免所有的点都分布在50%以上或者以下。得出的毒力学方程相关系数应R2≥0.95。

**（五）试验方法和结果**

1、冻干菌活化

将冻干菌融化分散在5 mL 的LB液体培养基中成悬浮状，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。

用接种环取菌悬液以划线法接种到LB固体平板上，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。

从培养皿上挑取典型菌落接种在LB固体培养基斜面试管内，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。

将斜面试管贮存于冰箱内（5 ℃~10 ℃），作为保存菌，保存期不超过一个月，每月传代一次，传代次数不超过10代。

2、试验菌悬液制备

用接种环取保存菌，以划线法接种到LB固体平板上，37 ℃±2 ℃下培养24 h。

取LB液体培养基20 mL放入100 mL的三角烧瓶内，用接种环取LB固体平板上生长的典型菌落接种在LB液体培养基内培养。培养条件为：温度37 ℃±2 ℃，振动频率110 min-1，时间18~24 h。

用蒸馏水20倍稀释LB液体培养基，用其调节培养后的菌浓度为1×108 CFU/mL~5×108 CFU/mL，作为试验菌液。采用分光光度计测定OD值，检测波长为600nm。

3、供试样品制备

将硫酸链霉素配置成0.16 μg/mL的母液，并用无菌水将母液按2倍浓度稀释，制备成5个不同浓度的待测溶液（0.16 μg/mL，0.08 μg/mL，0.04 μg/mL，0.02 μg/mL 和0.01 μg/mL），当天配置当天使用。

4、 检测平板制备

倾注融化并冷却至55 ℃左右的LB固体培养基10 mL于无菌培养皿内，待其凝固后制成LB平板，备用。

将制备好的试验菌液分别用冷却至55 ℃左右的LB固体培养基按1∶10的比例稀释，充分混匀后各取5 mL至上述已制备好的LB平板内，轻轻摇动平板使菌液均匀铺平，待其凝固后制成检测平板，备用。

5、 抑菌活性测定

分别将牛津杯轻轻地放在制备好的检测平板中，而后用无菌吸管分别将不同浓度的供试样品溶液加入牛津杯中，空白对照组加入200 μL无菌水，每个处理三个重复。将平板正置于36 ℃±1℃恒温培养箱中培养12h，取出，用测量仪测量待测样品和空白对照形成的抑菌圈直径。

6、 结果判定

6.1 计算方法

抑制率按式（1）计算：

抑制率（%）=$ \frac{CK\_{处理}-CK\_{对照}}{CK\_{对照}}×100$ （1）

式中：

*CK*处理——供试硫酸链霉素平板中形成的抑菌圈直径。

*CK*对照——空白对照平板中形成的抑菌圈直径。

6.2 结果分析

根据药剂浓度对数值与对应抑制率的几率值作回归分析，得到硫酸链霉素对大肠杆菌的回归曲线为Y=0.591X+5.6689，R2为0.9634，其中Y为抑制率的几率值，X为硫酸链霉素药剂浓度对数值，计算出硫酸链霉素对大肠杆菌的IC50值为0. 074 μg/mL。

得到硫酸链霉素对金黄色葡萄球菌的回归曲线为Y=0.9011X+4.368，R2为0.9700，计算出硫酸链霉素对金黄色葡萄球菌的IC50值为5.0281 μg/mL。

同时在该标准研制过程中，进行了中生菌素（一种广谱杀菌剂）对丁香假单胞菌的抗细菌活性测定，具体步骤和结果如下：

供试菌株为丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae* van Hall pathovar lachrymans）ATCC 7386，将中生菌素样品配置成32 μg/mL的母液，并用无菌水将母液按2倍浓度稀释，制备成5个不同浓度的待测溶液（32 μg/mL，16 μg/mL，8 μg/mL，4 μg/mL 和2 μg/mL），当天配置当天使用。抑菌活性测定时培养时间为24 h，其它操作均同硫酸链霉素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌活性测定。得到回归曲线Y=0.4433X+4.5077，R2为0.9812，其中Y为抑制率的几率值，X为中生菌素药剂浓度对数值，计算出中生菌素对丁香假单胞菌的IC50值为12.90 μg/mL。

**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2016年6月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了标准的总体框架和制定原则。

2、文献资料的收集

为制定本标准，起草组收集和查阅了与抗菌活性测定方法和抗菌效果评价相关的材料，其中包括《微生物源酶制剂抗菌活性的测定》和《纺织品 抗菌性能的评价 第1部分：琼脂平皿扩散法》、日本抗菌检测标准JIS Z 2801、《国内外标准基础知识大全》、《临床合理应用抗菌药物的质量评价标准与方法探讨》、《我国抗菌产品性能检测标准体系现状》等等，为标准草案的制定奠定了基础。

3、开展相关调研情况

2016年8月，在前期资料分析的基础上，课题组又针对项目的特点有针对性地选择了从事抗菌活性评价相关的单位进行了调研，吸收了其在实践中的经验和做法，并融入到标准草案当中。通过前期的基础研究，起草组对微生物源抗生素类次生代谢产物抗菌活性评价的现状有了清晰的认识。

4、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《微生物源抗生素类次生代谢物抗细菌活性测定方法 菌丝生长速率法》标准开展了研制工作，确定了本标准方法的重要参数，开展了实际样品的抗细菌活性检测。2017年6月起草工作小组完成了《微生物源抗生素类次生代谢物抗细菌活性测定方法 抑菌圈法》国家标准（草案）。2017年8月，起草组为了提高标准的科学性和适用性，分别邀请了中国标准化研究院、中国测试技术研究院、浙江中医药大学、江南大学和浙江省农业厅等科研机构和有关高校的多名专家召开了标准草案讨论会，从标准工作方案、技术路线、主要研究方法等方面，对标准草案提出了完善建议。在此基础上，2019年1月征求了专家意见，起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

具体工作过程如下：

2016年6月，成立了标准起草工作组，安排了工作进度。

2016年6月至2016年9月，起草工作组查阅了国内和国外与抗菌活性测定方法和抗菌效果评价相关的材料，并且有针对性地选择了从事抗菌活性评价相关的单位进行了调研。

2016年10月至2017年5月，开展研究性工作。

2017年6月至7月，完成标准草案。

2017年8月至9月，对标准草案进行了讨论，形成第二稿。

2017年10月，标准草案研制推进会，对研制过程中的问题进行讨论，商讨解决方案。

2017年12月，邀请中国标准化研究院专家对标准草案提供意见，对标准草案撰写中的一些问题进行了修订，形成第三稿。

2018年5月，本标准经国家标准化管理委员会批准，获得立项。

2018年8月，完成标准征求意见稿和编制说明的初稿。

2019年1月，完成三方论证，召开专家征求意见会，根据专家意见修改和完善征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

为了验证本标准制定的微生物源次生代谢产物抗细菌活性测定方法的准确性，分别委托杭州师范大学、浙江理工大学、浙江工商大学三家单位进行了验证，结果如下：

**表1 硫酸链霉素对大肠杆菌的抑制效果**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **委托单位** | **杭州师范大学** | **浙江理工大学** | **浙江工商大学** | **标准研制单位** |
| IC50 （单位：μg/mL） | 0.076 | 0.077 | 0.089 | 0.074 |
| 平均值  | 0.079±0.0068 μg/mL |

**表2 硫酸链霉素对金黄色葡萄球菌的抑制效果**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **委托单位** | **杭州师范大学** | **浙江理工大学** | **浙江工商大学** | **标准研制单位** |
| IC50值（单位：μg/mL） | 5.0000 | 5.6240 | 5.5880 | 5.0281 |
| 平均值  | 5.3171±0.3340 μg/mL |

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

 无