

浅析纸片法药敏试验结果的影响因素

武晓燕¹, 冀晓林², 牛艺儒¹, 宁官保¹

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 河北远征药业有限公司, 石家庄 050000)

关键词: 细菌; 药物敏感试验

纸片法药敏试验是将抗菌药物吸收到特定的纸片中, 然后将临床采集的病料经过选择性增菌, 选择性分离培养, 细菌生化鉴定, 血清学鉴定, 最终鉴定出病原菌。再将病原菌均匀涂布于琼脂平板上, 按要求贴上药敏纸片, 经 37℃ 恒温培养后, 抗菌药物通过纸片上弥散作用而形成浓度梯度, 在抗菌药物有效敏感的范围, 细菌生长受到抑制, 范围之外, 细菌仍能生长。由此观察各种抗菌药物纸片周围有无抑菌圈以及抑菌圈的大小, 来确定病原菌对某种抗菌药物是否敏感。这种菌——药的判断原则, 对临床正确使用抗菌药物大有帮助, 避免了“经验用药”和过多的使用广谱抗菌药物。而且这种方法可用于多种抗菌药物对一种细菌的抗菌作用进行同时测定, 有利于临床选择抗菌药物。

纸片扩散法(简称 K-B 法)是 40 年代建立的, 操作方便, 费用不多, 测定的药物随意可变, 灵活性强。然而, 纸片法药物敏感性试验只是一种药物敏感性定性试验, 在试验中容易受到诸多因素的影响。临床中该试验主要受到抗菌药物、培养基、细菌以及试纸片等诸多因素的影响。本文就以上影响因素加以阐述, 以提高药敏试验结果的准确性, 为临床合理用药提供可靠依据。

1 药物因素

纸片法药敏试验的结果主要受到药物理化性质以及作用特点等因素的直接影响。

1.1 药物理化性质 药物理化性质影响药敏结果的因素有: 药物溶解性、稳定性等。

1.1.1 药物溶解性 药物的溶解性从易溶到极微溶于水不等, 易溶于水的药物制成药敏片后在培养基上很容易均匀扩散, 而极微溶于水的药物制成药敏片后则很难完全溶解于培养基中并扩散。当药敏片放置到培养基上后, 不同溶解

性的药物在规定的培养时间内扩散到培养基中的程度是不相同的, 有的能完全扩散到培养基中, 而有的却不能完全扩散, 这必然导致该药物的抑菌效果低于真实值。所以, 药物溶解性的高低可以影响药物敏感性试验的结果的真实性, 极微溶于水的药物的抑菌圈可能低于其真实抑菌效果。常用溶解度较高的药物有: 氨基糖苷类药物的盐类、头孢霉素盐类、喹诺酮类等; 而常用的低溶解度的药物有: 氟苯尼考、北里霉素等。

1.1.2 药物稳定性的影响 临床中常用的药敏片一般是事先加工好的, 所以药敏片中药物含量必然受到其稳定性的影响。有些药物如: 青霉素类、红霉素等在自然条件下非常不稳定, 它们的效价易受到光照、溶剂、pH 值以及温度等诸多因素的影响而降低。如青霉素钠或钾无论在酸性还是在碱性溶液中都会迅速分解, 所以在加工药敏片过程中以及将药敏片放置到培养基上时, 溶剂和培养基的 pH 值都会造成药物效价的降低和药敏结果的降低。红霉素也是一种很不稳定的药物, 它在弱碱情况下较为稳定, 但是当 pH 小于 6 时, 红霉素会很快分解, 导致药敏试验结果的降低。

1.2 药物作用特点 药物敏感试验结果还受到药物本身作用特点的影响, 如药物抗菌作用机理、药物作用适宜 pH 值以及各种离子的影响等。

1.2.1 药物抗菌作用机理 临床中的抗菌药物可以简单地分成抑菌药物和杀菌药物两种。杀菌药物是指药物可以直接作用于细菌静止期和繁殖期将细菌杀灭; 而抑菌药物是通过竞争抑制或其它机理只杀灭处于繁殖期的细菌, 而对静止期的细菌没有杀灭作用。由于抑菌药物和杀菌药物对细菌的作用机理不同, 所以纸片法药敏试验时产生的抑菌圈的边沿是不相同的。杀菌药物产生的抑菌圈边沿一般是非常清楚, 而

尾蚴。在检查咽喉内淋巴结, 剖检淋巴结时, 有白色结节, 可初步诊断为结核; 如果见到下颌、眼眶有鸡蛋大的硬节, 可初步诊断为放线菌, 此头销毁处理。

(2) 内脏检验 胃肠脾检验: 在开膛后先不摘除胃肠而将肠露于腹腔外, 先检视胃肠的外形, 浆膜有无出血、充血现象, 先用刀划破肠系膜淋巴结进行肠炭疽检验。在检验胃肠的同时还要对脾脏进行检验(败血型炭疽, 脾脏肿大 3-5 倍), 再将胃肠脾割交另一人进行胃肠的常规检验, 必要时切开胃肠检验, 视肠粘膜有无充血、溃疡、脓肿、糜烂等病变。心肝肺检验: 把心肝肺挂在检验架上对心肝肺进行常规检查。肺的检验: 检查肺脏有无充血、出血、化脓、结节、肿瘤、坏死等变化, 必要时切开肺的实质并剖检支气管淋巴结及纵膈

淋巴结。心脏的检验: 用刀剖开心肌, 检验是否有牛囊虫和心包虫, 有时可见膈肌上粘连物质, 可能判断此牲畜有胸膜炎的病史。肝脏的检查: 先看肝整体状态, 是否有疫病造成的肝肿大、充血、出血、坏死等, 是否有肝片吸虫、棘球蚴等寄生虫病导致的胆管慢性增生性炎症和肝实质变性。

(3) 淋巴结检验 在牛宰后检验中, 一般检验肩前淋巴结、腹股沟淋巴结、髂外淋巴结。常见淋巴结的几种病理变化有充血、水肿、浆液性炎、出血性淋巴炎、化脓性淋巴炎、急性增生性淋巴炎、慢性增生性淋巴炎。

总之, 在肉牛屠宰过程中, 要严格按照以上流程进行肉牛的屠宰, 这样才能保证肉品的质量, 确保人的身体健康, 让老百姓吃上“放心肉”。

抑菌药物产生的抑菌圈边沿是模糊的,并且随着培养时间的延长和药物的失效,抑菌药物抑菌圈边沿未被杀死的细菌有可能又恢复生长,从而导致抑菌圈的进一步缩小。所以在药敏试验结果判断上,药物的抑菌与杀菌作用可以导致药敏试验结果判断的不准确性。

1.2.2 作用适宜 pH 值 临床中许多药物的疗效很大程度上受到溶剂 pH 的影响。药物的作用可能因为溶剂 pH 值的改变而加强或减弱。当然这类药物的试纸片也很容易受到培养基 pH 值的影响。如:氨基糖苷类在弱碱情况下抗菌作用稍有增强;而呋喃妥因和呋喃坦啶在酸性条件下比碱性条件下杀菌作用强。

1.2.3 离子的影响 常用的许多药物可以受到各种离子的影响而导致抗菌作用降低甚至丧失。如:喹诺酮类药物、氨基糖苷类、土霉素等药物在 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等阳离子的作用下(一般是形成不溶性络合物)抗菌作用降低或丧失;许多重金属离子(铜、锌、汞)等可以破坏青霉素钠(或钾)的活性,使其抗菌作用降低。在药敏试验培养基中如果含有大量这些阳离子就可以直接导致以上药物的抑菌圈减小甚至消失,所以在进行药物敏感性试验时应该选用无离子水和高质量的营养琼脂。

2 培养基

2.1 培养基的种类 药敏试验所用的培养基种类较多,WHO 要求统一使用 Mueller-Hinton(M-H)琼脂作为纸片法药敏试验的常规用培养基,该培养基中含有的低量胸腺嘧啶或胸腺嘧啶核苷是与磺胺类药物和甲氧苄啶竞争的物质,若过量可能会逆转磺胺类和甲氧苄啶的抑菌效应,使得抑菌圈变小,甚至消失,从而导致假耐药报告。该培养基中还有适量的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子,在培养基中起到溶酶的作用,其含量的变化,可影响氨基糖苷类和四环素对铜绿假单胞菌的试验结果,含量过高,抑菌圈会变小,含量过低,抑菌圈会大得不可接受。另外,锌离子会影响细菌对碳头孢烯的敏感性。但是,对于某些苛养菌,需要在 M-H 琼脂中添加其他物质或用其他培养基方可进行药敏试验,如流感嗜血杆菌应选用嗜血杆菌试验培养基(HTM),肺炎链球菌和其他链球菌所用培养基是在 M-H 琼脂中加入 5%脱纤维羊血。

2.2 培养基的质量 当购入新批号培养基后,应检验其与以前的是否相似,即:将新、旧批号培养基在相同条件下同时进行试验,除普通质控菌外,还应包括苛养质控菌。新批号的培养基的检测应包括全部常用抗生素。培养基溶化后在室温下的 pH 值为 7.2~7.4, pH 过高会使青霉素类和四环素抑菌圈变小,而氨基糖苷类与大环内酯类抗生素的抑菌圈增大,相反的现象则表明 pH 过低。新批号的培养基只有在获得满意结果后方能使用。

3 细菌因素

3.1 细菌的纯度 由于各种细菌对药物的敏感性不同,产生的抑菌圈大小不同,若菌种不纯,试验中产生的抑菌圈大小与该菌纯培养状态下产生的抑菌圈存在较大差异,影响结果的准确性,因此必须提纯各种致病菌,分别对其进行不同的药敏试验,临床上才能综合药敏试验结果选择用药。

3.2 菌液的浓度 对于任何细菌的药敏试验,将提纯的细菌配制成适当浓度是得到正确结果的基本保证。根据 WHO

制订的标准,要求菌液浓度为 0.5 麦氏比浊管。若菌液浓度偏低,导致接种菌量太少,抑菌圈直径常增大,易将耐药药物误判为敏感药物,相反,有可能将敏感药物误判为耐药药物。

3.3 细菌培养时间 培养时间过长,细菌能恢复生长,使抑菌圈变小,培养时间过短,抑菌圈还未最终形成,这都可能影响药敏试验结果的判定,有可能将敏感药物与耐药药物混淆。

4 试纸片因素

4.1 药敏纸片的药量和 pH 值 用半饱和法制作的药敏纸片含药量一般为 10g,饱和法药敏纸片含药量为 20g。药敏纸片的 pH 值一般要求为中性,这样适合药物的活度。

4.2 药敏纸片的规格 药敏纸片的厚度要求在 1mm 左右,这样适合药物的扩散速度和细菌的生长。药敏纸片的直径为 6.00~6.35mm。无论药敏纸片的厚度过厚、过薄或者直径过大、过小,均会影响药敏试验的结果。

4.3 药敏纸片的保存 药敏纸片的质量是做好药敏试验的关键。药敏纸片应注意保存,常规用量之外的药敏纸片最好放于 -20℃ 保存。纸片保存应用过程中有些纸片对光不稳定,如喹诺酮类药物,应注意避光保存。青霉素类、含有 β-内酰胺抑制剂的纸片受潮湿后易降低其药物的活性,应加入干燥剂保存。盛药敏纸片的小瓶从低温保存处取出后,应在室温平衡至少 10min 后再打开,避免冷凝水影响药效。

5 其它因素

5.1 在配制琼脂平板时,要注意严格无菌操作,定量分装琼脂液时以 50~60℃ 左右为宜,若温度过高,使平皿内凝水过多,易致污染;若温度偏低,琼脂易发生凝固而使培养基表面不平滑;应注意避免气泡产生,放置待用空平皿的台面必须水平,否则都会影响琼脂介质的均一性而影响药敏试验的结果。琼脂平板的厚度要求为 4mm 左右,如果制作平板太厚,抑菌圈会变小,会出现假性耐药,若平板厚度小于 4mm,抑菌圈会变大,则会出现假性敏感。

5.2 贴药敏纸片时,不管是单个加还是用分配器加,都应均匀分布,使其中心间距不小于 24mm,距平板边缘不小于 15mm。单个加药敏纸片时每取一种药敏纸片必须烧一下镊子尖,冷却后再取一种,这样既避免药敏纸片之间相互混淆,又防止高温使药物失活,以提高结果的准确性。一般情况下,标准直径 90mm 的平板放置药敏纸片不要多于 5 个,以保持纸片周围浓度梯度的相对稳定,避免不同药物相互干扰,防止抑菌圈边缘交叉,以免影响结果判读。

5.3 根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的要求,满足培养条件和时间,才能准确读取药敏结果。一般情况下,孵育 16~18h 后,检查每一块平板,若接种平板满意,抑菌圈应为正圆形,菌落应相互融合生长。但葡萄球菌对苯唑西林或肠球菌对万古霉素的药敏试验,应在培养满 24h 后观察结果,以免漏检那些生长缓慢的异质性耐药菌株。准确读取抑菌圈直径后,依据 NCCLS 抗菌药物药敏纸片判断标准和解释,来报告结果为敏感(S)、中介(I)或耐药(R)。

以上是细菌药敏试验中的几个比较主要的影响因素,试验中必须引起高度重视,确保药敏试验结果准确无误,给临床用药提供可靠的治疗依据,以避免用药不当产生耐药菌株。

(参考文献从略)