

当前畜禽养殖临诊病例多以混感为主,选择高敏抗菌药物,多用于防止继发感染和降低患禽的死淘率为目的。应引起基层兽医注意的是,在做药物敏感性试验时若在一些关键环节未把握准确,极易给投医问药的养殖场(户)在使用抗菌药物治疗细菌性传染病过程中造成用药不对路,既误病误时又浪费大量药物,还严重延误了治疗最佳时期的严重后果。

## 如何才能找到对症的药

### ——药物敏感试验的常见问题及其应注意事项

抗菌药物敏感性试验是指某种细菌对药物的敏感程度的试验,可以检测和判断药物是否具有抗菌作用以及抗菌作用的强弱,利用微生物学方法进行,其用量极微,而实验仪器的规格和精确度会直接影响试验结果。抗菌药物敏感性试验具有操作简便、容易掌握等优点,应成为基层临床工作中必不可少的重要内容。但应引起基层兽医注意的是,若在一些关键环节未把握准确,极易给投医问药的养殖场(户)在使用抗菌药物治疗细菌性传染病过程中造成用药不对路,既误病误时又浪费大量药物,还严重延误了治疗的最佳时期。因此,从事基层临床工作的兽医在实际操作过程中应特别注意以下几个方面的问题:

**1 采集病料** 采集病料最好是典型的急性病畜禽,原则上是采集的时间越早越好,特别是夏季,如果时间过长会发生质变,影响试验结果的准确性。通常采集病料要在5份以上,使其具有代表性,同时做好记录。

**2 实验室操作要求** 进入实验室必须穿工作服,进入无菌室接种样品时,必须穿专用的工作服、鞋、帽和戴好口罩。而这些专用的工作服、鞋、帽、口罩必须在工作前经紫外线消毒后使用。非工作人员不得入内。接种样品,所使用的剪刀或手术剪必须用酒精灯或紫外线消毒,但注意在切口时一定要不要过热,否则会烫死细菌,涂布时一定要均匀,接种环和针在接种细菌前,用火焰烧灼全部金属丝,严格执行标准要求,试管、吸管、培养皿和其他器皿,尤其是定量的吸管,均须选用中性、硬质一级品,必须经过彻底灭菌、烘干,方可使用。

**3 培养基成分和配制** 培养基是供细菌在其中生长繁殖的,是试验成功的第一步。在制作过程中确保无菌操作,在加入的培养基内的各种化学药物必须是化学纯的,称量要准确,准确的测定它的PH值,使其符合生长。培养基的成分不但影响敏感菌株的生长繁殖,并影响到抑菌圈的直径。不同批号的蛋白,所含的氨基酸和总氮量不同,因而抑菌圈的大小有一定差别。氯化钠、琼脂中的钙镁离子影响链霉素、新霉素的扩散,尤其是氯化钠,对链霉素的影响最大,含量越高,抑菌圈越小,甚至不出现反应,但氯化钠对多粘菌素反面有助于扩散,琼脂层过厚或过薄对试验结果也有较大影响。一般细菌,如大肠杆菌及葡萄球菌可选用普通营养琼脂;链球菌和巴氏杆菌可用绵羊血琼脂平板,一般细菌用肉浸液或肉膏液培养基,测定细菌对磺胺类药物敏感性,应用无蛋白肉浸液或肉膏液培养基,必要时可以进行细菌分离培养,常将一份病料同时接种几种培养基,如固体的可用普通琼脂、血琼脂,液体的可用普通肉汤、血清肉汤等进行需氧、厌氧培养。药敏试验一般在直径在9厘米或12厘米的平皿内进行,每个贴6~7个纸片,琼脂层厚度大约在4~6毫米厚薄适中,一般倾注培养基18~20毫升,培养基占容器的三分之一处即可,待培养基在无菌净化工作器中凝固后放入培养箱,24小时无菌后放入冷藏内

保存以备。

**4 选用敏感菌株** 菌种的敏感度差别较大,如金黄色葡萄球菌对青霉素最敏感,四联杆菌对四环素最敏感,大肠杆菌对链霉素、多粘菌素敏感,往往我们在实际工作中对各种菌种的特性不了解时,会产生一些菌种对药物不敏感的情况发生误解。另外,接种量要适宜,如果接种量多,即使最敏感的菌株也不能抑制其发育,影响实验结果,如果接种量过少,那么同样也会影响实验结果。一般使用经培养6~20小时的肉汤培养物,用肉汤或灭菌生理盐水1:10的倍数进行稀释。被检验的药物原液的配制要根据其药物的实际含量配成所需要的浓度。对于易潮的药物,称量和配制操作过程要迅速,防止药物吸水潮解,初次配制者可在熟练技术操作人员的指导下进行。

**5 确定培养时间和温度** 在无菌室内进行,用酒精灯灼烧铂耳接种,无菌操作挑取菌落放入灭菌生理盐水中充分溶解后,再用灭菌吸管加入0.1~0.5毫升,用灭菌L棒均匀涂布,注意涂布时用力要均匀,不要划破培养基的表面,涂布结束后再用灭菌镊子夹取药敏纸片贴在培养基的表面,用玻璃棒轻轻压下,使其紧贴于培养基的表面,注意一定不要过密(一般中间1个周边6个),否则会影响抑菌圈的生长,造成抑菌圈重叠,无法判断结果。细菌在发育过程中,对初期繁殖最快,以后处于稳定期和衰落期,必须掌握这一特性和规律,以达到所需试验的目的。如果时间过短,则细菌不繁殖;若时间过长,则敏感受性过低,抑菌圈不清楚,一般放在37℃培养箱内倒置,底部朝上18~24小时为宜。

**6 药敏纸片的质量和制备使用** 用纸片法操作简单,使用最为普遍,可以自己制作,也可以买成品包装的,但一定要注意有效日期和保存温度。自己在制备过程中,要取1号定性滤纸,用打孔机(市面有售)打成5~6毫米直径的圆形纸片,取50片作为一组放入一洁净干燥的青霉素空瓶内,瓶口以单层牛皮纸包扎,切不可用普通薄纸张或薄膜袋,防止在高压灭菌后会发生破裂。高压灭菌后放在37℃恒温箱内(也可用干烤箱)中数天,使其完全干燥,取出观察直至纸片完全片片分开,已表示完全干燥,没有水分。进入无菌室后,在无菌净化工作器中,向瓶内加入药液时,要不断用灭菌镊子搅拌纸片,使各纸片充分渗透药液,搅拌时要小心,动作要轻柔,切不可用力将纸片捣烂,同时在瓶的上面粘贴药名标签后连瓶放入37℃恒温培养箱内过夜,干燥后即行密封盖,如果有条件的话可以将瓶子放入加有干燥剂的玻璃真空干燥器内,用真空泵抽气使瓶内纸片迅速干燥,待完全干燥后取出加盖,保存于阴暗干燥处,切勿受潮,有效期一般在3~6个月。抑菌环直径的大小与纸片中药物含量有关。若在贮存期间,由于药物变质使其效能降低,则抑菌圈变小,一定要在有效日期内使用,一般密封贮存在2℃~8℃或零下20℃无霜冷冻箱内保存。使用前将贮存容器移至室温平衡1~2小时,避免开启时药敏纸片产生冷凝

水。在贴纸片过程中位置一定要安排适中,防止出现抑制圈重叠。

**7 判定结果** 经过培养,在具有抗菌能力的药敏试纸片周围便出现一个无菌生长的透明圈,称为抑制圈。抑制圈的大小,说明了该抗生素的效果的高低。若无抑制圈,则说明该药物有耐药性。根据试验不同的要求,并严格遵守细菌生化实验的观察结果时间要求,多在24小时内判定,注意时间过长或过短都会影响抑制圈的正常结果,根据提供的标准,应该按照测量的抑菌圈直径大小(以毫米为单位)作为敏感度高低判定标准。精确做出“高敏”“中敏”和“低敏”的判断结果,抑菌圈直径大于20毫米为极敏,抑菌圈直径在15~20毫米为高敏,抑菌圈在10~15毫米为中敏,抑菌圈小于10毫米或没有出现的为低敏或不敏。往往在试验过程中有些纸片周围的抑菌圈内会出现零星菌落,说明在操作过程中消毒灭菌不够全面或某些灭菌器具已过期,出现这种情况时应更换仪器重新操作,使试验结果准确。同时在试验过程中一定要坚持作对照试验,即在无药物的情况下,应能够在培养基内正常生长。抗菌药物对照药物原液应该具有明显的抑菌作用,稀释液对照制抗菌药物的稀释液应无抗菌作用,力求实验结果的准确性。

**8 用药处方,全面综合** 当前畜禽养殖临诊病例多以混感为主,畜禽养殖的细菌性传染病种类也有所增多,选用高效的抗生素防治畜禽的细菌性传染性病就显得特别重要,但有些畜禽养殖(企业)户由于滥用抗生素,造成耐药菌株越来越多,如有的养殖(企业)户在治疗大肠杆菌、葡萄球菌等病时,轮流应用多种抗生素都无效,这样盲

目的使用抗生素,一是耽误了畜禽病的治疗,二是浪费了大量的药物和财力,造成了极大的经济损失,为了尽快有效的防治细菌性传染病,对从病死畜禽体内分离出的细菌作药物敏感试验,选用细菌具有高抑制能力的药物是非常重要的。如大肠杆菌、葡萄球菌等对多种抗生素(如庆大霉素、链霉素、卡那霉素、新霉素、氯霉素及四环素)、磺胺类和呋喃类药物都较敏感,其他药物的敏感度就较低,但是经常使用这些药物,容易致使大肠杆菌对这些药物产生耐药性,降低治疗效果,因此在用药治疗之前,最好对分离出的大肠杆菌、葡萄球菌做药敏试验,选用高效最敏感的药物进行治疗,效果较好,同时还要根据各类药物的停药期说明进行选择。选择高敏抗菌药物,多用于防止继发感染和降低患禽的死淘率为目的。在选择抗菌药的同时,要因畜制宜、因病制宜的选用抗病毒及抗应激、保肝护肾、促生长繁殖等药物进行配伍使用,才能达到预期目的。

总之,只有掌握住正确的药敏试验及其关键环节,才能从中获得准确的信息,即高敏、中敏、低敏,为养殖企业(户)选取到高效的治疗药物,以达到帮助养殖生产者将疫病损失降到尽可能低的水平。然而,这就要求基层从事临床工作的兽医在平时多作药敏试验,多注意观察,积累经验,掌握技巧,“战时”就能在实际生产中真正发挥作用,提高工作效率和准确性。

山东诸城绿安检测有限公司

王润东

山东省畜牧兽医职业学院

温敬龙

(06D3670)

养殖场中猪、鸡群疾病的治疗十分重要,而治疗中的药敏试验非常关键。由于兽药新品种的不断涌现,市场上又买不到制作好的药敏纸片,这给药敏试验工作带来了一定的难度。针对这种情况,笔者查阅了有关资料,结合本地实际,利用兽药的使用说明浓度,自制药敏纸片,通过数十次临床实践,效果较好,现介绍如下。

#### 1 纸片的制作及灭菌

选用质量较好的滤纸片(定量滤纸),用打孔器打成直径为6毫米的圆片,每100片放入一小瓶中,160℃干热灭菌1~2小时或高压灭菌后,在60℃条件下烘干备用。

#### 2 抗菌药物浓度的配制

**2.1 计算最小浓度值** 按药物使用说明上的配料或饮水比例换算成一个基本单位药量(以能准确称量药品的最小值为宜,如0.5克、1克、2克等),而需要配多少料或饮多少水,则相当于配制浸泡药片的药品浓度时所加蒸馏水的毫升数。例如,药品使用说明上标明5克本品可拌50千克饲料,其换算方法为1克本

品可拌10千克饲料,也就是1克本品拌10000克饲料,相当于药品浓度为1克本品加10000毫升蒸馏水。

**2.2 浓度配制** 准确称取上述基本单位药量(片剂要研磨成粉末后再行称量),在无菌条件下,按下列分列项用蒸馏水进行倍比稀释。根据以上换算1克本品加10000毫升蒸馏水,即1克本品加10×10×10×10毫升蒸馏水。如出现1克本品拌320克饲料等情况,可改成1克本品拌320克饲料,即加10×4×8毫升蒸馏水。这样改动易形成分列项,并不影响实际效果。因为在配料时可按纸片浓度1克本品拌320克饲料进行拌料。如果所加蒸馏水量较少或现场蒸馏水充足,可不按上述倍比稀释法稀释,而直接按配料或饮水比例一次稀释而成。

#### 3 药敏纸片的浸泡及保存

取1毫升已配制好的药液注入已灭菌的含100片纸片的小瓶中,置冰箱内浸泡1~2小时后取出烘干,并置冰箱中保存备用(可保存6个月)。

(06D800)

兽医临床药敏试纸的制作