

# 管碟法测定抗生素效价中的影响因素分析及对策

唐靓, 盛清, 朱染枫(浙江省医学科学院 浙江 杭州 310013)

**摘要:**目的 提高管碟法测定抗生素效价的准确性。方法 按操作步骤逐步分析,并提出合理的解决方案。结果 减少外界因素与人为因素给试验带来的误差。结论 可以提高测定结果的准确性。

**关键词:**管碟法; 抗生素; 效价; 抑菌圈

## Analysis and countermeasures of influencing factors in antibiotics titer evaluation by cylinder-plate method

Tang Liang, Sheng Qing, Zhu Ran-feng( *heJiang Academy Of Medical Sciences, HangZhou 310013, China* )

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To improve the veracity of antibiotics titer evaluation by cylinder-plate method. **METHOD** According to the process of test, analyze the test and offer a proper measure to avoid influencing factors. **RESULTS** Reduce the errors caused by environmental and artificial factors. **CONCLUSION** This can improve the veracity of test results.

**KEY WORDS:** cylinder-plate method; antibiotics; titer; bacterial inhibition ring

管碟法是国内外常用的抗生素微生物检定法<sup>[1]</sup>,利用管碟法测定抗生素效价,具有准确、直观、重复性好等优点,因而被广泛采用。但是整个试验过程中影响结果的因素很多,任何一个环节操作不当或者忽略就会造成很大误差,导致整

组试验失败。根据实际操作中的积累经验,对管碟法中影响试验结果的因素进行如下分析及提出解决的方法。

### 1 实验器材的准备

#### 1.1 实验器材的选择

**作者简介:**唐靓,男,25岁,于2002年毕业于浙江大学生命科学院生物技术系毕业,理科学士,研究实习员,现于浙江省医学科学院从事微生物方面的研究工作。对厂家委托检测的克拉霉素、罗红霉素等多种抗生素药物样品做过效价测定,在试验中积累了丰富的经验。

试验应该选择底面平整的玻璃双碟,避免底面的凹凸影响琼脂层的厚度。可将双碟放置在水平台上,下垫一层白纸,加入 3mL 水,再滴加蓝墨水,根据蓝色是否深浅一致来判断双碟底面平整程度。小钢管则应该选择加工精细的同一批产品,这样才能保证管壁厚薄与重量均匀一致,使得小钢管在培养基中下陷相同的深度,抗生素溶液扩散均匀有可比性。如果小钢管两端不够平,就应予剔除,否则会使抗生素溶液漏出,破坏均匀扩散现象。

## 1.2 实验器材的清洗

抗生素试验中,玻璃双碟、小钢管往往会连续使用。由于清洗方面的原因,它们还是容易残留上次试验中的抗生素(庆大霉素、争光霉素、链霉素等)或者被清洗用的杀菌剂(如新洁而灭、洗洁精、去污粉等)污染,以至于在下次试验中造成抑菌圈不正常的现象。因此,在清洗时要尤为注意多用流水冲洗。160℃干热灭菌 2h 后备用。

## 2 配制试验所需的样品、标准品、缓冲液与培养基

### 2.1 样品与标准品溶液的配制

标准品与样品从冰箱取出后,使与室温平衡。供试品应放于干燥器内至少 30min 方可称取。称量最好为一次取样称量,动作迅速,不得反复称取,取样后立即将称量瓶瓶盖盖好,以免吸水。标准品的称量最好用 1/100,000 克的分析天平,样品称量不得低于 1/10,000 克的分析天平。天平中的干燥剂应保持经常注意更换。称量结束后,加入超声波处理后的磷酸缓冲液,定容至刻度,过滤并稀释。稀释时,都应采用容量瓶,每一步稀释取样量不得少于 2mL。用刻度吸管吸取溶液前,要用待稀释液冲洗吸管 2~3 次,吸取溶液后,要用滤纸把刻度吸管外壁多余液体擦去,再从起始刻度开始放溶液。把稀释后的抗生素溶液分装至干燥灭菌试管待用。在称量抗生素样品过程中,操作者的工作服上有可能沾染抗生素粉末,在配培养基、加底层培养基、加菌层培养基或滴加抗生素溶液时,会随衣袖的抖动落入培养基,造成破圈或者无抑菌圈。所以配制抗生素溶液应单独使用一套工作服。

### 2.2 培养基与缓冲液的配制

配制培养基与缓冲液时要按照文献的配比用量,配制后调节其 pH 值。因为在 pH 值、盐浓度的影响下,即使琼脂培养基上的两个相邻的小管距离足够,还是可能会出现卵圆形抑菌圈。例如四环素易受 pH 值影响,链霉素易受盐浓度影响<sup>[2]</sup>。培养基可以购买厂家生产的产品,因为大批量产品中的成分比较稳定,可比性较强。116℃湿热灭菌 20min 后备用。

## 3 加注培养基

### 3.1 加注底层培养基

无菌室工作台面可能因为使用时间已久,变得凹凸不平或者倾斜,会影响培养基菌层的厚度均匀性。菌层越薄,形成的抑菌圈越大,会给试验造成很大的误差。我们可以在桌面上放置一块足够大的玻璃平板,保证双碟放置区域的平整。在双碟底部预先标记样品的高低浓度区域,在加注培养基底层的时候,有顺序地按照一致方向排列。接下来加注培

养菌层的时候,仍然按照原来的位置与方向排列。这样,即使桌面不够水平,还是能够保证培养基菌层是在水平的培养基底层上铺开,达到消除误差的目的。

试验中加注的培养基如果温度太低,就容易在内部结块,或者加注到双碟之后不能及时铺开,使得培养基表面为非水平面,会给试验带来误差。加注 60~80℃的培养基底层之后,不应立即给双碟加盖。因为温度过高的培养基会形成大量的水蒸气,在双碟盖上凝集并滴落在已经凝固的培养基底层上,会给培养基菌层的加注带来影响。

### 3.2 加注培养基菌层

制备琼脂培养基菌层时,培养基温度过高或者受热时间太长都会导致试验菌死亡。当菌种为非芽孢杆菌的时候,现象尤为明显,甚至会出现无菌生长。因此,培养基应放在 50℃水浴中保温。当加入试验菌种混匀后,应尽快加注到底层培养基上。在试验的时候,如果从大瓶内用刻度吸管吸取带菌培养基,吸管中培养基量少极易冷却,加在底层培养基上就不易均匀铺开,导致菌层厚度不均,影响到抑菌圈的直径。因此可以事先把配制好的培养基分装在具塞试管内,每管 5mL,湿热灭菌后放在 50℃水浴锅内保温。试验中,再分别加入菌液混匀,配制成带菌琼脂。震荡混匀后继续保温 5min 使培养基温度回升,然后直接倒在底层培养基上,转动双碟使培养基均匀铺开。

## 4 放置小钢管

放置小钢管时,注意管与管之间不能太靠近,否则会引起相邻的两个抑菌圈之间的抗生素扩散区中的浓度增大,相互影响形成卵圆形或椭圆形抑菌圈。管与双碟边缘同样也不能太靠近,因为液面浸润作用,边缘的琼脂培养基菌层为非平面,会影响抑菌圈的形状。可在试验前在双碟的底上用尺测量,作好标记,试验中可以按照双碟底面标记放置小钢管,避免放置位置不恰当产生的问题。小钢管放置时,要小心地从同一高度垂直放在菌层培养基上,不得下陷,不得倾斜,不能用悬空往下掉的方法。放置之后,不能随意移动,要静置 5min,使之在琼脂内稍下沉降稳定后,再开始滴加抗生素溶液。

## 5 滴加抗生素溶液

滴加抗生素要按照 SH→TH→SL→TL(二剂量法)或者 SH→TH→SM→TM→SL→TL(三剂量法)<sup>[3]</sup>的顺序滴加。滴加之前,滴管至少要用被滴液体冲洗 3 次。在滴加抗生素到小钢管的时候,由于毛细管内抗生素溶液往往会有气泡或者毛细管开口端有液体残留,继续滴加容易造成气泡膨胀破裂,使溶液溅落在琼脂培养基表面造成破圈。因此一旦毛细管中出现气泡或者残留,就重新吸取抗生素溶液进行滴加,毛细管口应避免太细,滴加的时候离开小钢管口距离不要太高。滴加中若有溅出,可用滤纸片轻轻吸去,不致造成破圈。在滴加中还有可能出现抗生素溶液滴入小钢管后,没有与琼脂培养基菌层接触,有一段空气被压在溶液与培养基之间,这样是不会产生抑菌圈的。此时可以小心的用滴管吸出小钢管内的抗生素溶液,弃去。换滴管重新滴加。抗生素溶液

滴加后,液面应该与小钢管管口齐平,液面反光呈黑色。(抗生素液体加入量不能按滴计算,即使同一滴管,每滴的量也有差异。)如果抗生素溶液滴加过满,可以用无菌滤纸片小心吸去多余部分。

## 6 双碟中菌株的培养

滴加了抗生素溶液后的双碟忌震动,要轻拿轻放。在搬运到培养箱的过程中,可以预先在培养箱中垫上报纸铺平,再把双碟连同垫于桌上的玻璃板小心运至培养箱,缓慢推入箱内。双碟在 37℃ 下培养约 16h。时间太短会造成抑菌圈模糊,太长则会使菌株对抗生素的敏感性下降,在抑菌圈边缘的菌继续生长,使得抑菌圈变小。在培养过程中,如果温度不均匀(过于接近热源),会造成同一双碟上细菌生长速率不等,使抑菌圈变小或者不圆。所以把双碟放入培养箱时,要与箱壁保持一定的距离,双碟叠放也不能超过 3 个。培养中,箱门不得随意开启,以免影响温度。应经常注意温度,防止意外过冷过热。

## 7 抑菌圈测量

7.1 试验结果中抑菌圈直径不应该过大或者过小,在试验之前,可以先做一个关于用不同浓度菌液配制的琼脂培养基菌层预试验,选择抑菌圈直径在 18 ~ 22mm 的菌液浓度为试验用浓度(菌液浓度约为  $10^6$  个/mL)。批量试验中后期,菌液保存的时间过久,菌株就会逐渐衰亡,生长周期不一致,影响其对抗生素的敏感度,导致抑菌圈变大、模糊或者出现双

圈。如若菌株不纯,也会造成这样的结果。因此,菌液在使用一段时间后,可以重新配制纯化或者减小原来菌液在使用中的稀释倍数。

7.2 用游标卡尺测量抑菌圈直径,可以在双碟底部垫一张黑纸,在灯光下测量。不宜取去小钢管再测量,因为小钢管中残余的抗生素溶液会流出扩散,使抑菌圈变得模糊。不能把双碟翻转过来测量抑菌圈直径,因为底面玻璃折射会影响抑菌圈测量的准确度。记录测量结果后进行效价计算。

## 8 讨论

试验中,往往会出现异常情况,使得试验结果与预期出现很大差异。因此抗生素试验的每一步都需要仔细谨慎,严格按照操作规范,才可以得到准确的检测结果。准确测定抗生素效价,对评价抗生素的治疗效果,指导临床应用都有着重要意义。

## 参考文献

- [1] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 科学出版社. 2001:229-268.
- [2] 张治锁. 抗生素药品检验[M]. 第一版. 人民卫生出版社, 1987: 12-21.
- [3] 中国药典[M]. 二部. 2000 版. 附录 XI A: 376-383.

收稿日期:2003-10-29