

J i n d ř i c h H e s s :

Stanovení účinnosti streptomycinu a dihydrostreptomycinu difusní metodou na kovových plotnách

(Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy)

Vypracování dostatečně přesné a rutinně použitelné metody pro stanovení účinnosti antibiotik je prvním a nezbytným požadavkem pro jejich výzkum, vývoj a výrobu. I když v některých případech lze nahradit metodu biologického stanovení zpravidla rychlejší metodou chemickou nebo fyzikálně chemickou, není tím dotčen význam metody biologické. Chemických metod nelze zpravidla použít pro stanovení účinnosti nečistých preparátů, t. j. lze jich použít pouze s určitými výhradami. Na druhé straně však jest metoda stanovení obsahu antibiotika většinou hlavní pomůckou, která umožňuje vypracování vyhovujícího fermentačního postupu. Zavedení příslušné metody musí tedy předeházeti pracím, které jsou spojeny se stanovením vyhovujícího postupu fermentačního.

Při zavádění biologické metody pro kvantitativní stanovení streptomycinu jsme jako základu použili postupu, který publikoval L o o se sp. (1945). Pro rutinní používání jsme tuto v podstatě plotnovou difusní metodu upravili podle dosavadních zkušeností a místních možností. Tak na př. předepsané kotoučky filtračního papíru byly nahrazeny běžně používanými nerezovými cylindříky, masový výtazek v testovací půdě byl nahrazen masovou vodou atd. Postup, který vyhovoval svou přesností, vyžadoval pro jeden vzorek preparátu (na př. koncentráty nebo krystalické látky) 8 Petriho misek, zkrácený postup, používaný pro titraci fermentačních půd, 2 Petriho misky, při čemž každá byla osazena čtyřmi cylindříky.

Podobně jako u ostatních difusních plotnových metod zůstávala i u této metody nevýhodou nutnost používání Petriho misek, jejichž počet při našem provozu dosahoval počtu několika set denně. Nahrazení Petriho misek plotnami o podstatně větších rozměrech, které jest uvedeno v literatuře (S m i t h 1945, B e a d l e se sp. 1945) má některé nevýhody, vyplývající z konstrukcí ploten (skleněné desky se snímatelnými kovovými rámy).

Protože bylo zřejmé, že nahrazení Petriho misek plotnami o několikrát větší ploše má řadu výhod, jak co do finančního nákladu hmotného i personálního, tak co do přesnosti, vypracovali jsme postup, který dále popisujeme. Tento postup považujeme pro současnou dobu za dostatečně vyhovující a používáme jej rutinně. Osvědčuje se nejen u nás, ale i na některých dalších pracovištích, kterým jsme tuto metodu předali.

Popis metody

Uvedenou metodou lze prováděti stanovení streptomycinu i dihydrostreptomycinu ve fermentační půdě, koncentrátech i konečných produktech.

K u l t u r a. — Jako testovacího organismu používáme *Bacillus subtilis* FDA 6633.

Kultivační půda:	pepton	6,— g
	kvasniční extrakt	3,— g
	masová voda	250 ml
	kasein pankr. hydrol.	4,— g
	glukosa	1,— g
	agar řasový	30,— g
	destilovaná voda	750 ml; pH 7,0

Takto připravená půda se rozleje do Rouxových lahví po 300 ml. Stejnou půdu používáme pro udržování organismu ve zkumavkách.

Dobře narostlou kulturu na šikmém agaru smyjeme pomocí kličky do 7 ml destilované vody a 5 ml této suspence očkujeme Rouxovu láhev. Inkubujeme při teplotě 37 °C. Je-li kultura podle mikroskopického vyšetření dobře vysporulovaná (což trvá nejméně 14 dnů), smyje se 200 ml destilované, sterilní vody. Získanou suspensi pasteurisujeme 30 min. při 65 °C ve vodní lázni, centrifugujeme a usazené spory promyjeme sterilní destilovanou vodou. Pasteurizační suspence opakujeme třikrát. Takto připravenou kulturu uchováváme v lednici při +3 až +5 °C a používáme až 30 dnů k očkování testovací půdy pro povrch.

Příprava ploten. — Plotny rozměrů 350 × 350 × 50 mm jsou vyrobeny z hliníkového plechu o síle 2 mm. Vnitřek nádoby jest opatřen tmavým nátěrem, vzdorujícím teplotě, s bílými značkami pro umístění kovových cylindříků na povrch půdy. Víka jsou vyrobena z tenkého nerezavějícího plechu a přesahují asi 10 mm okraj plotny.

Částečná sterilisace se provádí v horkovzdušném sterilisátoru asi 45 min. při 150 °C.

Sterilisované plotny rozložíme na skleněné srovnávací desky do vodorovné polohy. Abychom vyrovnali případně nerovná dna některých ploten, polijeme plochu tenkou vrstvou rozehřátého agaru (40 g agaru na 1 l destilované vody). Po ztuhnutí této vrstvy nalijeme na plotnu 500 ml základní živné půdy.

Živná půda pro základ:	pepton	6,— g
	masová voda	250 ml
	agar řasový	25,— g
	destilovaná voda	750 ml
	pH po sterilisaci	7,9 ± 0,1

Po vychladnutí přelijeme 100 ml naočkované povrchové půdy. Množství sporové suspence pro zaočkování povrchové půdy si vždy po přípravě nové kultury určíme předběžným testem (0,5—2 ml sporové suspence na 100 ml povrchové půdy).

Živná půda pro povrch je totožná se základní, ale s 10 g agaru na 1000 ml.

Po ztuhnutí povrchové půdy pokládáme sterilisované nerezové cylindříky (válečky o vnitřním průměru 6 mm a výšce 10 mm) pinsetou na příslušné značky označené na dně plotny.

Příprava standardu. — Navážku standardního streptomycinu nebo dihydrostreptomycinu naředíme 0,5 M fosf. pufrům o pH 7,00 na 5000 j/ml. Tento základní roztok přechováváme v lednici a používáme až 14 dnů. Ze

základního roztoku ředíme denně potřebné množství standardu k testování v odměrných baňkách 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,9. Užíváme hodnoty 32, 16, 8, 4 j/ml. Pro zkrácený způsob stanovení 32, 16, 12, 8, 6, 4, 2 j. na ml.

Příprava vzorku. — Vzorky ředíme podle očekávané účinnosti 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,9 na 32, 16, 8, 4 j. na ml. Provádíme-li stanovení účinnosti zkráceným způsobem, ředíme vzorek podle předpokládaného obsahu streptomycinu pouze do jednoho stupně v rozmezí hodnot 2—32 j. na ml. Tato zkrácená metoda umožňuje stanovit více než čtyřnásobné množství vzorků, jest však nutno počítati s poněkud menší přesností provedených stanovení. Používáme ji pro testování velkých serií vzorků fermentační půdy z laboratorní fermentace.

VZOREK č.	STANDARD j/ml	
1	32	3
	16	
	8	
	4	
2	32	4
	16	
	8	
	4	

Schema I: Plnění cylindříků při nezkráceném postupu.

Plnění cylindříků. — Plnění cylindříků provádíme Pasteurovými pipetami, které si předem připravíme. Pro každou koncentraci použijeme vždy novou, suchou pipetu. Na plotnu plníme standard do tří řad cylindříků ve středu plotny. Po obou stranách standardu plníme do čtyř cylindříků vzorky, odpovídající příslušnému ředění standardu. Na plotně jsou tedy testovány současně čtyři vzorky podle schematu I.

Při zkráceném postupu pipetujeme celkem sedm hodnot standardu do čtyř cylindříků od každé koncentrace křížem do středu plotny. Vzorky pipetujeme vždy po dvou cylindřících od stejného vzorku na protilehlou stranu plotny podle schematu II (obr. 1).

Při plnění cylindříků nutno dbáti toho, aby naplnění na jednu plotnu netrvalo déle než patnáct minut. Trvá-li pipetování déle, vznikají rozdíly mezi počátečními a naposled pipetovanými vzorky.

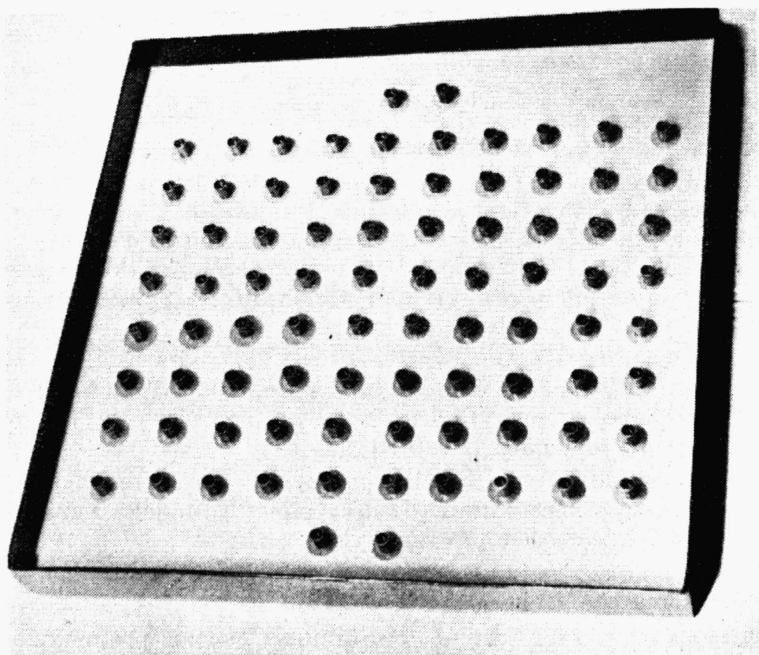
Po ukončení pipetování ukládáme nepříkryté plotny k inkubaci do thermostatu. Inkubujeme 15—20 hodin při teplotě 32 °C.

Odečítání vzorků. — Po inkubaci měříme průměry inhibičních zón. Měření provádíme co nejpečlivěji, při čemž odhadujeme desetiny mili-

STANDARD j/ml

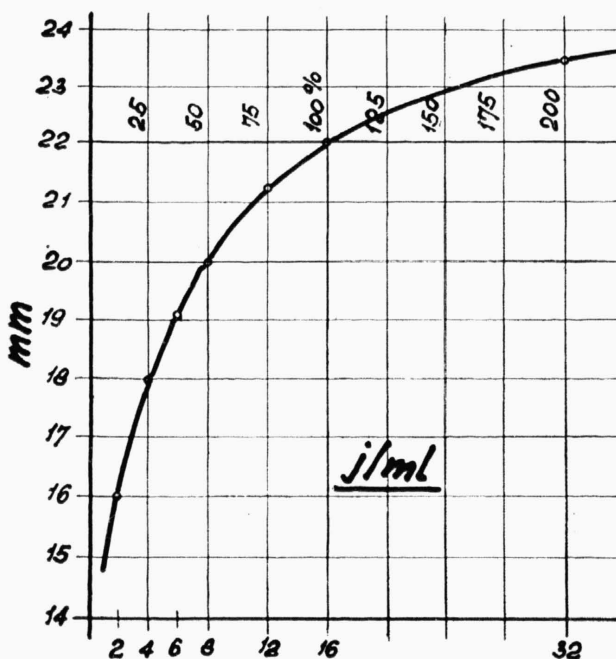
VZOREK Č.				○	○					
○ 1 ○	○ 2 ○			○	○	○ 13 ○	○ 14 ○			
				16	12			○ 11 ○	○ 12 ○	
○ 3 ○	○ 4 ○			○	○					
○ 5 ○	○ 6 ○			○	○	○ 9 ○	○ 10 ○			
○ 7 ○	○ 8 ○			○	○	○ ○ 2 ○ ○				
				4						
○ ○ 32 ○ ○				○	○	○ 7 ○	○ 8 ○			
○ 9 ○	○ 10 ○			○	○	○ 5 ○	○ 6 ○			
○ 11 ○	○ 12 ○			○	○	○ 3 ○	○ 4 ○			
				8	6					
○ 13 ○	○ 14 ○			○	○	○ 1 ○	○ 2 ○			
				○	○					

Schema II: Plnění cylindříků při zkráceném postupu.



Obr. 1: Kovová titrační plotna po inkubaci (zkrácený postup).

metru. Po odečítání stanovíme průměr jednotlivých koncentrací a sestojíme křivku. Na milimetrový papír nanášíme na osu x jednotky (1 j. = 2,5 mm), na osu y průměrné velikosti zon (1 mm = 10 mm v grafu). Spojením bodů získáme křivku standardu. Nanesením průměrů jednotlivých ředění vzorku na křivku vyjádříme u každého ředění hodnotu v procentech. Toto provádíme pomocí vhodně upraveného měřítka (graf 1). Účinnost vzorku v procentech stanovíme pak průměrem těchto percentických hodnot. Průměr násobíme odhadem, z kterého jsme vycházeli při ředění vzorku, dělíme stem a získáme skutečný počet jednotek. Při zkráceném postupu sestojíme křivku ze sedmi standardních hodnot. Průměrnou hodnotu odečteného vzorku nanese na křivku, odečteme na ose x jednotky a násobíme ředěním, čímž dostaneme účinnost v jednotkách.



Graf 1: Křivka standardu s přikresleným procentickým měřítkem pro ředění vzorku na 16 j/ml.

Zhodnocení metody

V souběžně prováděných stanoveních roztoků streptomycinu o známé hodnotě zkráceným postupem jsme zjistili, že průměrná chyba stanovení při dřívějším postupu na Petriho miskách i při novém postupu na velkých kovových plotnách činí zhruba 10 %. K tomu nutno však uvážit, že k stanovení jednoho vzorku na Petriho miskách při normálním postupu bylo zapotřebí včetně standardu celkem 32 hodnot (t. j. cylindříků), při postupu zkráceném 8 hodnot. Při testování na velkých plotnách uvedeným postupem jest však zapotřebí k stanovení 1 vzorku při normálním postupu 22 hodnot, při postupu

zkráceném 6 hodnot. Při titraci na velkých plotnách jest tedy dosaženo stejné přesnosti výsledků při celkově asi o 25 % nižším počtu potřebných hodnot. Toto snížení jest umožněno podstatně menší nestejností sobě odpovídajících inhibičních zon.

Při zavádění titrační techniky na velké plotny jsme z počátku měli potíže s „kontaminací“ připravených ploten antibiotiky rozprášenými ve vzduchu. Máme za to, že tato obtíž je však specifická pro naše pracoviště. Odstranili jsme ji zvýšenou pečlivostí při přípravě a manipulaci s připravenými plotnami. Jak jest uvedeno v popisu metody, jest nutno cylindříky jedné plotny plniti v co nejkratším časovém intervalu. Nedodržení tohoto požadavku jest jednou z hlavních příčin, které vedou k nepřesným výsledkům.

Kromě pravidelného zkoušení každé šarže sporové suspense se osvědčilo důsledné přezkoušení každé várky titračních půd. Tímto způsobem lze zajistiti pravidelný a dokonalý nárůst a ostrost zon, takže provádění analys nepřichází nazmar případně nevyhovující kvalitou používaných půd nebo surovin, zejména masové vody.

Nahrazení Petriho misek uvedeným způsobem přináší značné jak finanční, tak časové úspory. Odpadá mytí Petriho misek a jejich příprava. Značnou položku rozpočtu činilo nahrazování ztrát, vznikajících jejich rozbitím. Kovové plotny jsou prakticky nerozbitelné. Konečně i provádění titrace samé vyžaduje kratší doby vzhledem k menšímu počtu zpracovávaných hodnot.

V titrační laboratoři mikrobiologického oddělení VÚA, kde provádíme denně úhrnem asi 200—300 stanovení různých antibiotik, jsme po převedení veškeré práce na kovové plotny uspořili denně asi 12 hod. pracovního času (mytí a příprava ploten). Kromě toho však bylo možno zvýšit počet analys, prováděných každou z pracovnic, v průměru (podle druhu stanovení) o 25 až 30 %.

Pro lepší vyjádření celkových úspor podotýkáme, že uvedený postup mikrobiologické titrace antibiotik na velkých kovových plotnách byl předmětem zlepšovacího námětu, jehož využití činilo jen na našem pracovišti celkovou roční úsporu ve výši cca 80 000 Kčs.

Souhrn

Mikrobiologická titrace antibiotik difusní plotnovou metodou jest zpravidla prováděna na Petriho miskách. Při větším počtu prováděných analys jest pak nutno pracovati s rozsáhlým počtem misek, které nutno jednotlivě mytí a připravovati pro titrace.

Modifikovali jsme proto difusní plotnovou metodu pro stanovení streptomycinu tak, že místo Petriho misek používáme čtverhranných hliníkových, celokovových táců o rozměrech 350 × 350 mm. Tím odpadá práce spojené s mytím a přípravou jednotlivých Petriho misek a odpadá finanční náklad na nahrazování ztrát, vznikajících jejich rozbitím. Protože velikosti sobě odpovídajících zon na velkých plotnách jsou daleko stejnoměrnější, bylo možno omeziti celkový počet hodnot nutných pro stanovení jednoho vzorku, takže provádění vlastního stanovení jest asi o jednu čtvrtinu kratší. Průměrná chyba při tomto postupu stanovení je totožná s průměrnou chybou při stanovení na Petriho miskách a činí asi 10 %.

- B e a d l e G. W. se sp. (1945): Improvements in the cylinder-plate method for penicillin assay. — J. Bact. 49 : 101—104.
- L o o J. H. se sp. (1945): Assay of streptomycin by the paper — disc plate method. — J. Bact. 50 : 701—709.
- S c h m i d t W. H. (1945/46): Une modification de la methode des cylindres sur plaques pour le titrage de la pénicilline. Bull. Health Org. 12 : 272—281.

И. Г е с с :

Определение активности стрептомицина и дигидрострептомицина методом диффузии на металлических чашках

Микробиологическая титрация антибиотиков методом диффузии проводится нормально на чашках Петри. При большем количестве анализов приходится работать с большим количеством чашек, которые требуют индивидуального мытья и подготовки к титрации.

Поэтому была проведена модификация диффузионного метода определения стрептомицина так, что чашки Петри были заменены четырехугольными алюминиевыми мисками 350×350 мм. Таким образом, отпадает работа, соединенная с мытьем и подготовкой отдельных чашек Петри, а также отпадает денежный расход, связанный с битьем стекла. Так как размеры соответствующих зон на больших чашках более стандартны, стало возможным ограничение отдельных определений, необходимых для анализа одного образца, так что проведение собственного анализа сократилось приблизительно на одну четверть. Средняя ошибка при данном методе определения остается такой-же, как и при методе, использующем чашки Петри, т. е. приблизительно 10%.

Общая годовичная экономия, возникающая при замене чашек Петри металлическими чашками для всех видов определения отдельных антибиотиков, составляет в нашем отделении сумму, равную приблизительно 80 000 кр. новой мены.

J. H e s s :

Die Bestimmung der Wirksamkeit von Streptomycin und Dihydrostreptomycin nach der Diffusionsmethode in Metalltassen

Die mikrobiologische Titration antibiotischer Stoffe nach der Diffusionsmethode wird üblicherweise in normalen Petri-Schalen durchgeführt. Ist die Anzahl der regelmässig auszuführenden Bestimmungen gross, muss mit einer bedeutenden Menge Petri-Schalen gearbeitet werden, die einzeln gewaschen, sterilisiert und für die Titration vorbereitet werden müssen. Wir haben daher die Diffusionsmethode zur Bestimmung von Streptomycin dahingehend ab-

geändert, dass wir statt Petri-Schalen Ganzmetalltassen aus Aluminium in der Grösse 350×350 mm verwenden. Dadurch werden erhebliche finanzielle Ersparnisse erzielt, da der Arbeitsaufwand mit dem Waschen und der Vorbereitung der einzelnen Petri-Schalen sowie die hohen Ersatzkosten der beim Waschen zerbrochenen Schalen wegfallen.

Da die Streuung der Durchmesser einander entsprechender Inhibitionszonen bei Verwendung der grossen Platten wesentlich geringer ist, kann die Zylinderanzahl, die zu einer Bestimmung notwendig ist, herabgesetzt werden. Dadurch wird der Zeitaufwand für eine Bestimmung um ungefähr ein Viertel geringer.

Der durchschnittliche Fehler ist bei dieser Arbeitsweise annähernd gleich gross wie bei der Titration in Petri-Schalen und beträgt etwa 10 %.

In unseren Laboratorien wurden die beschriebenen grossen Metalltassen statt der bisher verwendeten Petri-Schalen zur Bestimmung sämtlicher Antibiotika, mit denen bei uns gearbeitet wird, eingeführt und dadurch Ersparnisse erzielt, die sich jährlich auf etwa 80 000 Kčs neuer Währung belaufen.