

抗生素微生物检定法技术交流

王彦娥

(榆林市药品检验所 陕西榆林 719000)

摘要:目的 分析抗生素微生物检定法中相对应的影响因素及解决方法。方法 依据各类资料及文献,对于抗生素微生物检定进行数据统计分析,并且对临床中的经验进一步进行整理总结。结果 依据不同研究文献进行数据分析,对于抗生素微生物检定方法应用管碟法的方式,也就是琼脂扩散法,其具有灵敏度很高的特点,虽说步骤整体较繁琐,但只要严格的控制,都会较为接近正确。影响抗生素微生物检定的因素较多,包括对于抑制圈的控制,抑菌圈边缘清晰度控制以及细菌生长情况等。结论 检验人员一方面要熟练掌握微生物及化学知识,另一方面需要熟悉抗生素的性质,才能将微生物检定运用充分,并且得出精确的检结果。

关键词:抗生素;微生物检定法;误差;解决方法

抗生素微生物检定法是国际上通用的、经典的抗生素效价测定方法。自20世纪40年代建立至今,在各国药典中被普遍采用。虽然伴随着HPLC等化学分析技术的发展,一些抗生素品种的效价测定已被化学方法所取代,但由于以下原因,抗生素微生物检定法,目前在全国药典中仍占有重要地位。

(1)微生物检定法可直观、特异地反映出抗生素药品的抗菌活性。

(2)多组分抗生素由于不同活性组分生物活性的差异,化学测定结果难以准确表征组分的组成、含量和生物活性间的关系。

(3)许多抗生素品种由于各种原因目前没有适当的化学分析方法表征其活性,同时微生物法所需要的仪器设备简单,成本低。

所以抗生素微生物检定法目前在各国药典中仍占有重要地位,且短期内化学分析法不可能取代微生物检定法。

抗生素微生物检定是利用抗生素在低微浓度下有选择地抑制或杀死微生物的特点,以抗生素的抗菌活性为指标,来衡量抗生素中的有效成分效力的方法。该方法是与临床要求相符,更能确定抗生素的临床医疗价值。

目前《中国药典》中抗生素微生物检定法常用的方法有管碟法和浊度法,管碟法为仲裁的方法所以在此主要阐述一下管碟法材料、仪器及试剂的准备、基本要求注意事项及操作要点:

1.操作间:要求净化级别达到B级,安装紫外线杀菌灯,紫外灯距离工作台面积约1.2米,安装空调设备,能控制室温在20~25℃之间。

2.双碟:为硬质玻璃或塑料培养皿,内径约90mm,高16~17mm,碟底厚度均匀一致。使用前应清洗干净后置150~160℃干热灭菌2小时或者121℃高压蒸汽灭菌30分钟。

3.陶瓦盖:内径约103mm,外径108mm,平坦,吸水性强,应定期清洗、干燥。

4.牛津杯(小钢管):内径(6.0±0.1)mm,外径(7.8±0.1)mm,高(10.0±0.1)mm,光洁平坦,管壁应厚薄一致,重量差异不超过±0.01g,每次使用后应置1:1000新洁尔灭溶液内浸泡2个小时以上,进行灭菌后再进行洗涤,在160~190℃干热灭菌2小时备用。

5.钢管放置器:有全自动和半自动之分,一般为四孔,要求钢管下落时应垂直平稳、位置正确。应定期用75%酒精擦拭。如果没有钢管放置器,也可用干热灭菌过的镊子放置钢管。

6.恒温培养箱:有隔水式、电热式。要求温度控制在35℃~37℃,隔板要求水平,用于细菌培养。

7.抑菌圈测定仪:用于测定细菌所致抑菌圈直径。

8.生物安全柜:用于菌种的接种、传代和菌悬液的制备。生物安全柜应放在洁净工作间或半无菌室内。

9.磷酸盐缓冲液:根据《中国药典》现行版标准或者各品种项下要求的配方进行配制、分装、灭菌后备用。常用的缓冲液pH值有6.0、7.0、7.8等。缓冲液的pH值对样液液的稳定性、细菌生长

速度和抑菌圈边缘清晰等有影响。

10.培养基:尽量购置质量稳定的干粉培养基(如:环凯、陆桥、海博)。常用的培养基有I、II、III、IV、V号等培养基,使用前应按照使用说明书进行配制,注意调节培养基pH值。

11.菌种:菌种应有中国食品药品检定研究院等国家法定的菌种保藏中心提供,常用的菌种包括:

枯草芽孢杆菌 [CMCC(B)63501]

短小芽孢杆菌 [CMCC(B)63202]

藤黄微球菌 [CMCC(B)28001]

金黄色葡萄球菌 [ATCC 29213]等。

12.标准品:是指用于生物检定或效价测定的标准物质,一般以效价单位表示,标准品应由国家法定的单位制备、标定和供应,一般常用的标准品来源于中国食品药品检定研究院,标准品与供试品溶液浓度的比值应控制在±2%以内,以保证两者的浓度偏差在一定的范围内。

一. 试验前准备:

(1)供试品第一步一般应制成500或1000单位/毫升的溶液,以后逐步稀释至供试浓度的溶液,每步稀释的量取量以不少于2ml为宜,稀释步骤应少于3步。

(2)溶解:对于需用乙醇溶解的样品,由于溶解样品时所用乙醇量较大,加灭菌水后溶液放热,因此需充分摇匀后加灭菌水至接近容量瓶刻度,待冷至室温后再稀释至刻度。

(3)双碟的制备:铺双碟底层培养基时,培养基的温度不宜过高,一般将融化后的培养基在室温冷至约70℃时加入双碟中为宜,否则加双碟盖后,底层培养基上会出现冷凝水。当铺菌层培养基时,由于冷凝水的局部冷却和稀释作用,可使菌层培养基凝固后表面不平。菌层培养基定要铺均匀,这是决定抗生素效价测定的关键。故要求铺菌层时一定要与铺底层时双碟的位置、方向相一致。制备菌层时,培养基的温度不要过高,受热时间也不宜过长,特别是对热敏感的试验菌更要注意。否则,可使试验菌部分或全部被杀死,导致抑菌圈破裂或甚至无抑菌圈形成。因此,一定要按规定控制菌层培养基的温度。

(4)在制备菌层培养基时,将菌液加入菌层培养基后,立即充分摇匀,但应避免产生气泡。培养基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(水浴温度:细菌为48~50℃,芽孢可至60℃)。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。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。

(5) 培养: 加液完毕后, 用陶瓦盖覆盖, 平稳地移入培养箱中, 至 35℃-37℃ 培养至所需的时间。

(6) 高剂量抗生素溶液所形成的抑菌圈直径 20-24mm, 个别抗生素的抑菌圈可在 18-24 mm; 高、低剂量所形成的抑菌圈之差最好大于 2 mm, 有些抗生素的差数可较小, 高、低剂量之比一般用 2:1, 当高、低剂量所致的抑菌圈差别较小时, 可用高低剂量之比为 4:1 的比率。

二. 注意事项及操作要点:

(1) 采用胶头滴管或者移液枪向钢管中加溶液。由于滴加先后顺序及时间的不同, 抗生素在培养基内扩散有差异, 在滴加抗生素溶液时采用 $S_2 \rightarrow T_2 \rightarrow S_1 \rightarrow S_1$ (标准品高浓度、样品高浓度、标准品低浓度、样品低浓度) 的顺序滴加, 以减少试验误差。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。

(2) 双碟在培养时, 不要使双碟靠近培养箱热源较近处, 以免造成培养箱温度不均匀, 使同一双碟上细菌生长速度不一致, 造成抑菌圈变小或抑菌圈不圆。

三: 影响因素:

(一) 影响抑菌圈大小和清晰度的因素:

(1) 抑菌圈的半径 (大小) 与最小抑菌浓度 C , 琼脂层厚度 H , 抗生素在琼脂内扩散系数 D , 抗生素在小钢管中的量 M , 以及抗生素的扩散时间 T 有关: 这些因素的改变, 常会影响抑菌圈的大小和清晰度。

(2) 培养基的 pH 值, 对试验结果影响很大, 使用时培养基的 pH 值应调节到适合该品种试验的最佳范围。通常灭菌后的 pH 值范围为 7.8~8.0 或 6.5~6.6 对碱性抗生素而言, 在偏碱性条件下它的抗菌活力强, 如氨基糖苷类的链霉素在 pH 值 7.8 以上时活力强, 抑菌圈清晰, 当抑菌圈偏小时, 可考虑把培养基的 pH 值适当调高至 8.0 或更高些。对酸性或两性抗生素, 在酸性条件下它的抗菌作用强, 使用 pH 值 6.5~6.6 培养基为合适。通常灭菌后 pH 值会下降 0.2 左右, 因此 pH 值应略高 0.2~0.4。调节时要注意逐渐加碱, 防止过量, 否则再加盐酸矫正, 将会增加培养基的含盐量, 从而降低培养基的使用效果。

(3) 抑菌圈质量的控制: 抑菌圈的性状试验中, 常有抑菌圈破裂, 不圆, 甚至破圈的情况, 其原因是多方面的:

a. 在滴加抗生素溶液时, 药液溅出、毛细滴管碰到钢管壁使抗生素溶液漏出, 出现不圆等;

b. 双碟、钢管、钢管放置器内有残留抗生素污染:

c. 试验菌菌龄过老, 菌层培养基加菌液时培养基温度过高, 将检定菌烫死等;

d. 稀释抗生素溶液所用缓冲液 pH 值和盐浓度也可影响抑菌圈的圆整。

(4) 试验菌种: 当试验菌种中含有对抗生素敏感度不同的两种或两种以上的菌株时, 由于各菌株的最低抑菌浓度不同, 在形成抑菌圈时可能出现双圈及边缘模糊不清, 影响测量抑菌圈的准确度。因此, 应定期将试验菌种进行平板分离, 经涂片镜检后, 挑选典型的单个菌落作为工作菌种。陈旧的试验菌培养物也会使抑菌圈边缘模糊, 故试验时应用新鲜制备的试验菌液, 传代最好不超过 5 次, 以防止菌种老化变异。芽孢杆菌培养物用灭菌水洗下后, 应在 65℃ 加 30 分钟, 使菌体的菌龄一致, 用革兰氏染色, 应有芽孢 85% 以上。

(二) 无抑菌圈形成的原因:

大多由于抗生素污染所致。因此, 在进行抗生素效价测定时, 要严防抗生素污染。防止的办法是将配置和稀释抗生素溶液所用的容器与制备培养基所用的容器严格分开, 切不可将抗生素溶液撒于地面, 以免抗生素附着在微小尘埃上随风飘落在双碟琼脂培养基上, 而造成抑菌圈破裂或无抑菌圈形成。在双碟培养基上放置小钢管的距离要合适。当距离太小而抑菌圈又太大时, 则相邻两个抑菌圈之间的抗生素扩散区中抗生素的浓度增大, 形成互相影响的卵圆形或椭圆形抑菌圈。在滴加抗生素溶液至小钢管时, 若毛细滴管口不圆整或有小缺口, 或管内有气泡, 均可使抗生素溶液从管口溅出: 若加液太满, 溶液会从小钢管口溢出: 小钢管底部不平, 溶液会从底部漏出。以上原因均会造成抑菌圈不圆整或破裂成桃形。防止的办法是滴管口要圆整, 管口不能太细, 管内不能有气泡, 加液时滴管口离钢管的距离不能太高, 小钢管两端面要平。

(三) 抑菌圈边缘清晰度的控制:

抑菌圈边缘清晰度是影响测定结果的重要因素之一, 导致抑菌圈边缘不清晰的原因有多种:

a. 在抑菌圈形成过程中抗生素的扩散系数紊乱、不均一一, 不符合动力学公式中各项之间的关系或各扩散系统交叉所致。

b. 如试验菌种放置时间过长, 菌群中个体的生长周期不同, 对抗生素的敏感度不同, 往往使抑菌圈形成双圈或多圈, 使边缘模糊不清。

c. 培养基原材料的成分及质量、pH 值、盐浓度及培养时间均可影响抑菌圈边缘的清晰度。

d. 多组分抗生素中, 各组分抗菌活性的不同, 扩散系数也不同, 其交叉作用影响抑菌圈边缘的清晰度。

总结: 抗生素微生物检定法虽然操作繁琐, 需培养有经验的操作人员, 整个操作过程需时较长, 影响因素多, 可信限率高, 误差相对较大, 但在各国药典中仍为不可缺少的部分。

通过仪器精度的提高、培养基质量达到标准化, 则微生物检定法的误差会大大降低。

参考文献

[1] 王欣放, 王雅静. 如何提高抗生素效价管碟测定法的准确性 2015, 第 22 卷, 第 008 期

[2] 吕虹静. 探讨抗生素微生物检定法的误差因素及解决对策 2015, 第 030 卷, 第 001 期

[3] 常艳, 姚尚辰, 胡昌勤. 影响抗生素微生物检定法(管碟法)测定准确性的常见原因分析 2018, 第 7 期

作者简介

王彦娥, 女, 汉族, 1982 年 1 月生。陕西榆林人, 大专 文化。主要研究方向: 抗生素及化学药品检验