

Untersuchungen zur Stabilität von Antibiotika in festen Nährmedien in Abhängigkeit von deren Lagerzeit

U. Ullmann

Abteilung Medizinische Mikrobiologie, Universität Kiel

Zusammenfassung:

Es wurde die Stabilität von Ampicillin, Mezlocillin, Cefoxitin und Cefsulodin in den drei Testmedien Mueller-Hinton (MH), Diagnostic Sensitivity Test Agar Base (DST-Agar) und Iso-Sensitest-Agar (Iso) über einen Zeitraum von 7 Monaten untersucht. Als Kriterium der Degradation der Antibiotika wurde die Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration von 14 internationalen Referenzstämmen (Enterobacteriaceae, Ps. aeruginosa, Micrococcaceae) gewertet. Die Degradation nach dem 7monatigen Untersuchungszeitraum war für Cefsulodin am größten, die minimale Hemmkonzentration stieg um den Faktor 16 an. Sie erwies sich ferner als medienabhängig. Die geringste Degradation wurde in Mueller-Hinton-Agar beobachtet, die größte in DST-Agar. Antibiotika-haltige Nährböden zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mit dem Agardilutionstest können luftdicht verschlossen bei Kühlschranktemperatur unbedenklich 2 bis 3 Wochen gehalten werden. Mit einem Aktivitätsverlust ist während dieses Lagerzeitraums nicht zu rechnen. Zur Qualitätssicherung sollten jedoch stets internationale Referenzstämme mit bekannter minimaler Hemmkonzentration mitgeführt werden.

Schlüsselwörter:

Agardilutionstest – Stabilität von Antibiotika in festen Nährmedien (Mueller-Hinton-, DST-, Iso-Sensitest-Agar)

Summary:

The stability of ampicillin, mezlocillin, cefoxitin and cefsulodin was investigated using the test media Mueller-Hinton (MH), Diagnostic Sensitivity Test Agar Base (DST) and Isosensitest Agar (Iso). The increase of the MICs against 14 international reference strains (Enterobacteriaceae, Ps. aeruginosa, Micrococcaceae) was determined as the criterion for the inactivation of the antibiotics. Cefsulodin showed the highest inactivation after 6 months; the MIC increased by a factor of 16. The inactivation was also depending on the media used. The lowest degradation has been observed with Mueller-Hinton agar, the highest with DST-agar, respectively. Media for the agar dilution test can be stored in a refrigerator for 2 to 3 weeks without hesitation, because there is no loss of activity. International reference strains with well known MICs, however, should always be tested for internal quality control.

Keywords:

Agar dilution test – stability of antibiotics in solid media (Mueller-Hinton-, DST-, Iso-Sensitest-Agar)

Einleitung

Neben der semiquantitativen Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien mit dem standardisierten Agardiffusionstest werden zunehmend quantitative Verfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Antibiotika (AB) herangezogen, wie Mikro-, Makrodilutions- oder Agardilutionsverfahren. Die quantitativen Testmethoden haben dazu geführt, die Wirksubstanzen so vorzubereiten, daß sie entweder lyophilisiert oder bereits Bestandteil flüssiger oder fester Nährmedien sind, die dann im Sinne einer Ökonomisierung längere Zeit bei Kühlschranktemperatur (feste Nährmedien) beziehungsweise tiefgekühlt bei -20°C oder -80°C (flüssige oder lyophilisierte Substrate) aufbewahrt werden.

Neben anderen bei der MHK-Bestimmung vorkommenden Fehlerfaktoren, wie unterschiedliche Inokulumgröße, Antagonisten in Nährmedien, führt auch die längere Lagerzeit der präfabrizierten Testsubstrate zu einer Verminderung der antimikrobiellen Aktivität und damit zu möglicherweise fehlerhaften Resultaten. Wenngleich die Degradation von Chemotherapeutika sowohl in Trockensubstanz als auch in Lösung bei längerer Lagerung und verschiedenen Temperaturbereichen schon bekannt ist, werden für den Agardilutionstest zum Teil kommerziell erhältliche oder selbst hergestellte Antibiotika-haltige Nährmedien bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt und sukzessive für die Empfindlichkeitsprüfung herangezogen (2). Untersuchungen über die Haltbarkeit dieser Testmedien liegen jedoch kaum vor.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Stabilität von vier Antibiotika in drei verschiedenen gebräuchlichen festen Testmedien mit Hilfe des Agardilutionstests während eines Lagerzeitraums von 7 Monaten bei 5°C untersucht, wobei internationale Referenzstämme mit zuvor ermittelter minimaler Hemmkonzentration als Indikator-Stämme dienten.

Materialien und Methoden

Referenzstämme: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter hafniae* ATCC 11604, *Serratia marcescens* DSM 30121, *Klebsiella pneumoniae* DSM 30104, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Klebsiella ozaenae* ATCC 11298, *Klebsiella rhinoscleromatis* ATCC 13884, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* DSM 30083, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Staph. aureus* ATCC 25923, *Staph. aureus* ATCC 12600, *Staph. epidermidis* ATCC 14990.

Antibiotika: Ampicillin, Mezlocillin, Cefoxitin, Cefsulodin.

Nährmedien: Mueller-Hinton-Agar (MH), Diagnostic Sensitivity Test Agar Base (DST), Iso-Sensitest-Agar (Iso) (CM 337, CM 261, CM 471, Fa. Oxoid, Wesel).

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Konzentrationsstufen: Ampicillin 0,125 bis 128 mg/l, Mezlocillin, Cefoxitin und Cefsulodin 0,25 bis 128 mg/l.

Untersuchung der Stabilität in festen Nährmedien: Die Antibiotika wurden in den angegebenen Konzentrationen in den drei Nährmedien gelöst; für jede Konzentrationsstufe der einzelnen Antibiotika wurden 300 ml der drei Testmedien benötigt und in 20 ml-Portionen in jeweils 15 Plastik-Petrischalen (Durchmesser 90 mm) gegossen. Die Antibiotika-haltigen Substrate wurden mit Leukoflex® luftdicht verschlossen, mit dem Deckel nach unten in Kühlschränken über einen Zeitraum von 7 Monaten bei 4°C gelagert und nach einem feststehenden Zeitplan untersucht. Bei Versuch 1–7 betrug das Zeitintervall 7 Tage, bei Versuch 8–10 jeweils 14 Tage und bei Versuch 11–15 jeweils 21 Tage. Pro Antibiotikum und Konzentrationsstufe wurde je eine Testplatte des Nährmedi-

Tab. 1: Minimale Hemmkonzentration (mg/l) der untersuchten Antibiotika mit verschiedenen Testmedien gegenüber den verwendeten Referenzstämmen

Antibiotika Testmedien	Cefsulodin			Cefoxitin		
	MH	Iso	DST	MH	Iso	DST
Referenzstämme						
<i>Pseudom. aeruginosa</i> ATCC 9721	0,5	0,25	0,5	>128	>128	128
<i>Enterob. cloacae</i> ATCC 13047	>128	>128	128	>128	>128	>128
<i>Enterob. hafniae</i> ATCC 11604	8	4	4	0,5	0,5	0,5
<i>Serr. marcescens</i> DSM 30121	>128	>128	128	4	4	4
<i>Klebs. pneumoniae</i> DSM 30104	>128	>128	128	4	4	4
<i>Klebs. pneumoniae</i> ATCC 27736	>128	128	128	1	1	0,5
<i>Klebs. ozaenae</i> ATCC 11298	64	64	64	0,5	0,5	0,5
<i>Klebs. rhinoscleromatis</i> ATCC 13884	128	>128	>128	2	2	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>128	128	128	2	2	2
<i>Escherichia coli</i> DSM 30083	>128	128	128	0,5	1	1
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	>128	128	128	0,5	0,25	0,5
<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	2	2	1	1	0,5	0,5
<i>Staph. aureus</i> ATCC 12600	4	2	1	1	0,5	1
<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 14990	4	2	2	1	0,5	1

Tab. 1 (Forts.)

Antibiotika Testmedien	Ampicillin			Mezlocillin		
	MH	Iso	DST	MH	Iso	DST
Referenzstämme						
<i>Pseudom. aeruginosa</i> ATCC 9721	128	128	32	16	32	16
<i>Enterob. cloacae</i> ATCC 13047	>128	>128	>128	32	32	32
<i>Enterob. hafniae</i> ATCC 11604	0,5	1	1	4	4	8
<i>Serr. marcescens</i> DSM 30121	>128	128	64	4	4	8
<i>Klebs. pneumoniae</i> DSM 30104	>128	>128	128	16	16	16
<i>Klebs. pneumoniae</i> ATCC 27736	32	128	128	32	32	64
<i>Klebs. ozaenae</i> ATCC 11298	8	32	16	8	16	8
<i>Klebs. rhinoscleromatis</i> ATCC 13884	>128	128	>128	4	4	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	8	4	2	2	2
<i>Escherichia coli</i> DSM 30083	2	8	4	0,5	1	1
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	64	64	64	0,5	0,5	0,25
<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	0,125	0,125	<0,125	0,25	0,25	<0,25
<i>Staph. aureus</i> ATCC 12600	0,5	0,125	<0,125	0,25	<0,25	0,25
<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 14990	0,5	0,5	0,125	0,5	1	0,5

ums mit einem Multipoint-Inokulator mit den 14 Referenzstämmen beimpft. Das Inokulum betrug 5×10^5 KBE/ml. Nach einer Inkubationszeit von 18 bis 20 Std. bei 37°C wurden die minimalen Hemmkonzentrationen bewertet und dokumentiert.

Ergebnis und Besprechung

In der Tab.1 sind die minimalen Hemmkonzentrationen der verwendeten Referenzstämmen auf den drei Antibiotika-haltigen Testmedien dargestellt. Differenzen, die außerhalb der Toleranzgrenze von $\pm 1-2$ Titerstufen lagen, wurden nicht beobachtet.

Während der ersten beiden Untersuchungswochen blieben die minimalen Hemmkonzentrationen der untersuchten Antibiotika gegenüber den Referenzstämmen bei allen drei Testmedien konstant. In den folgenden Untersuchungsserien war ein individuell unterschiedlicher Anstieg der minimalen Hemmkonzentration in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium aber auch von der Bakterienspezies festzustellen. Um Unterschiede in der Degradation der Antibiotika aufzuzeigen, wurden in die Auswertung nach 2 Wochen nur Stämme einbezogen, die gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum eine minimale Hemmkonzentration von ≤ 16 mg/l aufwiesen. In Tab.2 sind die Ergebnisse während der 7monatigen Lagerzeit für die einzelnen Antibiotika und Testmedien zusammengestellt. Cefsulodin zeigte bei allen drei verwendeten Substraten eine in etwa gleichmäßige Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration, die zwischen 4 und 7 Titerstufen schwankte. Cefoxitin dagegen erwies sich in den Medien am stabilsten. Die Verschiebung der minimalen Hemmkonzentration betrug 2-3 Titerstufen. Ampicillin und Mezlocillin erwiesen sich in Mueller-Hinton-Agar im stabilsten, die Veränderung der minimalen Hemmkonzentration betrug hier zwischen 2 und 4 Titerstufen, während in Iso-Sensitest, vor allem aber in DST-Agar wesentlich höhere Änderungshäufigkeiten auftraten, die zwischen 4 und 7 Titerstufen lagen und in diesen beiden Medien nach 1- bis 2monatiger Aufbewahrungszeit eintraten und dann auch für die einzelnen Bakterienspezies constant blieben.

Tab.2: Änderungshäufigkeit der Titerstufen der minimalen Hemmkonzentrationen der untersuchten Antibiotika in den 3 Testmedien gegenüber den Referenzstämmen während 7monatiger Lagerung (absolute Zahlen)

	Titerstufen					
	2	3	4	5	6	7
<i>AB in Mueller-Hinton-Agar</i>						
Cefsulodin			2	2	1	
Cefoxitin	4	8				
Ampicillin		6	1			
Mezlocillin	3	7	2			
<i>AB in Iso-Sensitest-Agar</i>						
Cefsulodin			1	2	2	
Cefoxitin	4	7	1			
Ampicillin		1	1	3	2	
Mezlocillin	3	5	2	2		
<i>AB in DST-Agar</i>						
Cefsulodin			1	1	2	1
Cefoxitin	5	7				
Ampicillin			1	2	2	2
Mezlocillin				9	3	

Während für neu einzuführende Antibiotika in physiologischen Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten (4, 5), in Infusionslösungen (8), in flüssigen Nährsubstraten (9), in Zellkulturen (1) sowie in Körperflüssigkeiten (11) Untersuchungen vorliegen, finden sich in der Literatur kaum vergleichbare Angaben über die Stabilität von Antibiotika in festen Nährmedien. Barry und Badal (3) untersuchten die Stabilität von Tetracyclinen in festen Medien und fanden einen Aktivitätsverlust für Minocyclin von mehreren Verdünnungsstufen innerhalb 2 Wochen. Für neuere Antibiotika werden entsprechende Daten vermisst, wenngleich der Agardilutionstest vor allem aufgrund der Mechanisierung durch Vielfachpunktbeimpfungsgeräte ein für die quantitative Empfindlichkeitsprüfung von Mikroorganismen weltweit häufig angewandtes und empfohlenes Verfahren ist (6, 7, 10). Von den nationalen Standardisierungskommissionen werden für den Agardilutionstest in unterschiedlicher Weise jeweils eines der drei hier untersuchten Substrate empfohlen, so beispielsweise vom DIN und NCCLS Mueller-Hinton-Agar. Aus den eigenen Untersuchungen geht hervor, daß alle 3 Testsubstrate während einer 2wöchigen Lagerungszeit bei Kühlschranktemperatur vergleichbare Ergebnisse liefern. Eine teilweise Inaktivierung von „labilen“ Antibiotika während dieses Zeitraumes tritt sicherlich ein, das Testergebnis dürfte jedoch korrekt bleiben, da die Verdünnung der Testsubstanzen nach internationalen Richtlinien in $\log_2$ -Schritten erfolgt und erst eine Degradation von 50% und mehr den Endpunkt der minimalen Hemmkonzentration beeinflusst. Bei gealterten Medien erweist sich, zumindest bei den untersuchten Antibiotika, Mueller-Hinton-Agar den beiden anderen Substraten etwas überlegen.

Für die Qualitätssicherung zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mit dem Agardilutionstest gilt:

1. Keine selbsthergestellten Testmedien verwenden, die länger als 2 Wochen bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt wurden.
2. Die Testmedien sind luftdicht verschlossen aufzubewahren, um Austrocknung zu verhindern, was einen Konzentrationsanstieg des Antibiotikums im Medium zur Folge hätte.
3. Kontrollstämmen mit bekannter minimaler Hemmkonzentration sind stets mitzuführen. Sie dienen als Indikator für eine eventuelle Aktivitätsminderung der verwendeten Testsubstanzen.
4. Bei kommerziell erhältlichen Agardilutionsplatten muß das Herstellungsdatum auf dem Boden der Petrischale angegeben sein.
5. Bei Einführung neuer Antibiotika in die mikrobiologische Empfindlichkeitsprüfung sollte deren Stabilität in den Testmedien mit Referenzstämmen bekannter minimaler Hemmkonzentrationen untersucht werden.

Schrifttum:

1. ANDRESEN, B. H.: Einfluß von Antibiotika auf die mitogen induzierte und nicht stimulierte Transformation muriner Milzlymphozyten in vitro. Inauguraldissertation, Abt. Med. Mikrobiologie Univ. Kiel (1986).
2. BARRY, A. L.: Procedure for testing antibiotics in agar media: Theoretical considerations. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, ed. V. Lorian. Williams and Wilkins, Baltimore 1981, 1-23.
3. BARRY, A. L., BADAL, R. E.: Stability of minocycline, doxycycline and tetracycline stored in agar plates and microdilution trays. Current Microbiol. 1, 33-36 (1978).
4. BORNSCHEIN, M., VOIGT, R.: Beiträge zur Analytik und Stabilität von Rifamycin SV. 1. Mitteilung: Analytik. Pharmazie 30, 527-529 (1975).
5. DENNEN, D. W.: Degradation kinetics of 6-amino-penicillanic acid. J. Pharm. Sci. 56, 1271 (1967).

6. DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG: Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Agar-Verdünnungsmethode. DIN 58940, Teil 6 (1979).
7. GRADUS, M. St., BAKER, C. N., THORNSBERRY, C.: Antimicrobial susceptibility testing systems past and present: a documented overview. Part I. Antimicrob. Newsletter 2, 66-70 (1985).
8. LODE, H., KUEPPER, G.: Aktivitätsverluste von Antibiotika in Infusionslösungen. Infection 1, 151-156 (1973).
9. NAG BISWAS, A., DASTIDAR SUJATA, G., CHAKRABARTY, A. N.: Deterioration kinetics of antibiotics in different antibiotic media. Indian J. Med. Res. 69, 598-604 (1979).
10. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Tentative standard. M7-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1983.

11. ULLMANN, U., BIELENBERG, U.: Standardisierung und Automatisierung des Monitoring antimikrobieller Wirkstoffe mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie beim Menschen. Fortschritte der Antimikrobiellen und Antineoplastischen Chemotherapie. Monographie: Futuramed Verlag, München, im Druck.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. med. U. Ullmann
Abt. Med. Mikrobiologie
Universität Kiel
Brunswiker Straße 2-6
2300 Kiel 1

Buchbesprechungen

Richtwerte für das kinderärztliche Laboratorium

Von H. Struckmeyer, H. Haid, 89 Seiten. Med. Verlagsges. Marburg, 1986. ISBN 3-921320-14-3.

Das Buch bringt eine Zusammenstellung der Referenzwerte von etwa 80 Laboranforderungen, wobei z.B. Aminosäuren im Urin gleichsam der AP im Serum als jeweils eine Anforderung gezählt wurden. Jedem Blut- oder Harnbestandteil ist eine Seite gewidmet mit der Untergliederung in Bestimmungsmethode, Untersuchungsmaterial und Referenzbereich. Angegeben sind für jeden Parameter die Verteilung, Angabe der Werte bei den Perzentilen sowie die Untergliederung in männlich und weiblich. Fernerhin sind die Werte graphisch in Abhängigkeit vom Alter aufgeführt.

Demjenigen, der sich täglich mit Referenzwerten bei Kindern befassen muß, ist das Buch eine wertvolle Hilfe, denn die Entscheidung normal/pathologisch kann unter Kenntnis der Verteilung getroffen werden.

Bei einer Neuauflage ist den Autoren zu empfehlen, für einige Untersuchungen eine weitere methodische Differenzierung vorzunehmen. So sind z.B. für die Saure Phosphatase keine Referenzwerte angegeben, für das Substrat α -Naphthylphosphat. Auch ist bei einigen Substratbestimmungen nicht aufgeführt, für welche Temperatur die angegebenen Referenzwerte gültig sind.

Das vorliegende Büchlein ist in der geschilderten Aufmachung das erste seiner Art im deutschsprachigen Raum. Es ist vorwiegend den Kinderärzten, aber auch Labormedizinern und teilweise Allgemeinärzten zum Nachschlagen wärmstens zu empfehlen.

L. Thomas