

KRYSTYNA WOŹNIAK

Przyczynek do kontroli jałowości surowic leczniczych

Zakład Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych Instytutu Weterynarii
Kierownik: doc. mgr Z. SYNOWIEDZKI

Ocena jałowości biopreparatów jest sprawą dosyć trudną, ponieważ dotychczas nie ma metod pozwalających na stwierdzenie absolutnej ich jałowości. Zagadnienie to było zresztą referowane na międzynarodowej konferencji poświęconej standaryzacji biopreparatów (3). Zgodnie z obowiązującymi w tym zakresie wymaganiami biopreparaty powinny odpowiadać określonym warunkom czystości, jałowości i ogólnego wyglądu (1, 2, 3).

Założeniem niniejszej pracy było zbadanie w jakim stopniu ilość wysiewanego preparatu w stosunku do objętości użytych podłoży ma wpływ na możliwość wykazania w nim zakażeń, oraz jakie najmniejsze stężenie drobnoustrojów zawarte w biopreparatach, daje się wykryć przy zastosowanych metodach.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono z niekonserwowaną normalną surowicą końską, oraz z kilkoma konserwowanymi surowicami leczniczymi (Antimix seria 20664; Biotropina, seria 131165; Bovicolin, seria 20264; Boviforin, seria 40964; 40366; 90864; Bovityphin, seria 10464; Polisepsin, seria 9665; Polityphin, seria 10164 i 10165 i Suiforin, seria 60564).

Normalną surowicę końską otrzymano z Drwalewskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego, a zakażone surowice lecznicze z Zakładu Rozpoznawczego IW w Puławach, odrzucone w toku kontroli na jałowość.

Do zakażenia normalnej surowicy końskiej używano standardowego szczepu *Staphylococcus aureus* 209-P, pochodzącego z Muzeum Szczepów PZH i zliofilizowanego w tutejszym Zakładzie. Szczep ten był wrażliwy na fenol, tak że w surowicach konserwowanych nie dawał żadnego wzrostu.

Badania własne

100 ml niekonserwowanej surowicy końskiej zakażono dodając 1 ml 24-godzinnej hodowli bulionowej wymienionego szczepu. Surowice te przechowywano w temperaturze +4°C przez 3 dni, następnie obliczano, metodą płytkową Kocha, ilość drobnoustrojów w 1 ml surowicy. Tą samą metodą obliczano ilość drobnoustrojów w zakażonych surowicach leczniczych. Następnie surowice te rozcieńczono płynem fizjologicznym, tak aby w 1 ml znajdowało się 1 do 10 bakterii i powyżej. Przygotowane rozcieńczenia surowic wysiewano na bullon cukrowy i półpłynny agar z żelatyną zachowując następujące warunki:

- na różne ilości podłoża (od 10 do 50 ml) wysiewano badane surowice w ilości 1/100 objętości podłoża;
- na stałą ilość podłoża (wynoszącą 10 ml) wysiewano zmienną ilość od 0,1 do 0,5 ml zakażonych surowic leczniczych.

Wzrost obserwowano w dwóch różnych temperaturach: w 37°C i w 16—18°C przez okres 2 tygodni, zgodnie z obowiązującymi w tym zakresie przepisami (3).

Wyniki

Wyniki badań zestawiono w tabelach. Tabela 1 przedstawia procent wykrytych zakażeń przy

stałej ilości *inoculum* wynoszącej 1/100 objętości podłoża, a tabela 2 — przy zmiennej ilości *inoculum* i stałej ilości podłoża.

W przeprowadzonych badaniach z zakażonych surowic zawierających powyżej 10 drobnoustrojów w 1 ml wzrost otrzymano w każdym przypadku niezależnie od wielkości i jakości użytego podłoża, ani od ilości wysiewanego materiału.

Z surowic wykazujących 2—5 bakterii w 1 ml uzyskano różny procent wzrostu zależnie od wielkości użytego podłoża oraz ilości wysiewanego *inoculum*. Najwyższy procent (66,6%) uzyskano na podłożu wynoszącym 50 ml pożywki bulionowej, oraz przy 40 ml (83,3%) półpłynnego agaru z żelatyną (tab. 1).

Tabela 1.

Ilość podłoża w ml	Ilość inoculum w ml	Stężenie bakterii w 1 ml					
		10 i więcej		2—5		1	
		procent wykrytych zakażeń					
		I	II	I	II	I	II
10	0,1	75,0	73,3	10,0	44,0	0	0
20	0,2	93,3	96,6	20,6	33,3	0	0
30	0,3	100,0	88,8	22,2	44,4	0	0
40	0,4	91,6	91,6	50,0	83,3	0	0
50	0,5	100,0	100,0	66,6	66,6	0	0

Objaśnienie: I — wzrost na bullonie cukrowym;
II — wzrost na półpłynnym agarze z żelatyną

Na podłożach 10 ml z surowic zawierających 2—5 bakterii w 1 ml, na pożywce bulionowej nie uzyskano w ogóle wzrostu przy zastosowanych ilościach *inoculum* od 0,1 do 0,5 ml, podczas gdy na półpłynnym agarze z żelatyną wzrost otrzymano we wszystkich przypadkach, z tym, że najwyższy stopień wykrytych zakażeń (70%) uzyskana przy *inoculum* wynoszącym 0,4 ml (tab. 2).

Tabela 2.

Ilość podłoża w ml	Ilość inoculum w ml	Stężenie bakterii w 1 ml					
		10 i więcej		2—5		1	
		procent wykrytych zakażeń					
		I	II	I	II	I	II
10	0,1	50,0	100	0	30,0	0	0
10	0,2	50,0	100	0	30,0	0	0
10	0,3	50,0	100	0	20,0	0	0
10	0,4	50,0	100	0	70,0	0	0
10	0,5	50,0	100	0	60,0	0	0

Objaśnienie: I — wzrost na bullonie cukrowym;
II — wzrost na półpłynnym agarze z żelatyną

Z zakażonych surowic rozcieńczonych do 1 bakterii w 1 ml, przy zastosowanych metodach i podłożach nie uzyskano wzrostu w żadnym przypadku.

Z przeprowadzonych badań wynika co następuje:

— jeśli w zakażonej surowicy było 10 lub więcej bakterii w 1 ml, to zakażenie takie można było wykryć w każdym przypadku;

— przy 2—5 bakteriach w 1 ml w wyższym procencie (20—83%) uzyskano wzrost na półpłynnym agarze z żelatyną, niż na bulionie cukrowym (0—66%);

— zakażenie wykazujące 1 bakterię w 1 ml,

przy zastosowanych metodach nie było wykrywalne.

Z zastosowanych różnych ilości wysiewanego *inoculum*, optymalną ilością, przy której uzyskano najwyższy procent wzrostu (70—83%) było w naszych badaniach 0,4 ml, czyli większe od przewidzianego w normie, które wynosi 0,3 ml.

Piśmiennictwo

1. Farmacopea Polska III 1954.
2. Pharmacopeia of the United States (XVI) 1960 r.
3. Materiały z IV Międzynarodowego Kongresu Standaryzacji Biopreparatów 1958 r.

Adres autora: Krystyna Woźniak, Warszawa, ul. Strubiechów 3 m. 8.

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

EWA OŹDZYŃSKA, STANISŁAW KAFEL

Badania korelacji pomiędzy wytwarzaniem koagulazy oraz lipazy u gronkowców

Zakład Higieny Produktów Zwierzęcych Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr Z. GAUGUSCH

Przegląd piśmiennictwa wykazuje, że gronkowce chorobotwórcze mogą wytwarzać strefę zmętnienia („opacity”) dookoła kolonii przy wzroście na pożywkach agarowych zawierających żółtko jaja, a czynnik enzymatyczny powodujący występowanie powyższej reakcji określany jest mianem „egg yolk factor” (1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15). Shah i Wilson (14) wykazali, że „egg yolk factor” jest lipazą która działa na cząsteczkę lipidu powodując zmiany w rozpuszczalności lipowitelleniny. Istotę omawianego zjawiska u gronkowców badali również Tirunarayanan i Lundbeck (15). Określili oni substrat biorący udział w reakcji jako lipowitelleninę, a jako końcowe produkty tej reakcji — kwasy tłuszczowe (palmitynowy, stearynowy i olejowy), które występowały jako nierozpuszczalne sole wapnia i magnezu precipitujące w podłożu.

Adler i wsp. (1) sugerują, że „staphylococcus egg yolk factor” podobnie jak koagulaza pozostaje w związku z chorobotwórczością tego drobnoustroju, a Richou i wsp. (13) przy określaniu właściwości chorobotwórczych gronkowców uważają powyższy czynnik za równorzędny z wytwarzaniem koagulazy. Z drugiej strony, istnieją doniesienia o braku korelacji pomiędzy wytwarzaniem koagulazy i lipazy przez gronkowce. Tak np. Jay wykazał, że nie wszystkie szczepy lipazododatnie wytwarzały koagulazę (8, 9). Przy badaniu 162 szczepów stwierdził on, że 99% było lipazododatnich z czego tylko 87% koagulazododatnich. Clark i wsp. (4) również nie stwierdzili korelacji po-

między lipolitycznymi właściwościami gronkowców z innymi cechami tych bakterii, jak wytwarzanie koagulazy, hemolizyn i fermentacja mannitolu. Autorzy ci wykazali, że na 21 szczepów koagulazododatnich 10 było lipolitycznych, a 11 nie wytwarzało lipazy. Według danych Munch-Petersena (11) wśród koagulazododatnich gronkowców tylko 63% wytwarzało lipazę. Zdaniem niektórych autorów, procentowe różnice dodatnich reakcji lipolitycznych wśród koagulazododatnich gronkowców są prawdopodobnie spowodowane użyciem różnych substratów i metod (10). Alford i wsp. (2) zauważyli, że aktywność lipazy gronkowcowej zależy od temperatury. Vadehra i Harmon (16) badali wpływ temperatury na aktywność lipazy i stwierdzili, że optymalna temperatura dla tego enzymu wynosiła 45°, ze znaczną aktywnością pomiędzy 30° i 60°. Raj i Liston (12) stwierdzili również, że inkubacja gronkowców w temp. 45° zamiast 37° na podłożu z żółtkiem jaja przyspiesza reakcję „opacity”. Potwierdziły to także własne obserwacje prowadzone przy diagnostyce szczepów gronkowcowych wyosobnionych od ludzi oraz ze środków spożywczych. Przy inkubacji gronkowców lipazododatnich w temp. 37° niekiedy nie stwierdzano stref zmętnienia na podłożu z żółtkiem lub też omawiane strefy były wyraźnie mniejsze niż w przypadku inkubacji w temp. 44°. Powyższe obserwacje nasunęły więc przypuszczenie, że w temp. 44° może zachodzić ściślejsza korelacja pomiędzy wytwarzaniem lipazy i koagulazy u gronkowców.