

# Über die Bestimmungen antibiotisch wirksamer Substanzen. 1. Mitteilung

Autor(en): **Allemann, Otto**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **40 (1949)**

Heft 3-4

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983798>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Zur Erzeugung des Wasserdampfes hat man CO<sub>2</sub>-freies Wasser zu verwenden; andernfalls muss das Destillat vor der Titration durch Erhitzen bis zum beginnenden Sieden von Kohlensäure befreit werden.

Der Gehalt an Säure wird als Essigsäure berechnet. 1 cm<sup>3</sup> 0,1 n-NaOH = 0,006 g Essigsäure.

Der Säuregehalt wird in g pro l absolutem Alkohol mit einer Dezimale angegeben.

### *Zusammenfassung*

1. Für die Bestimmung der flüchtigen Säure in Branntwein ist die amtliche Methode nicht geeignet, weil sie nur etwa die Hälfte der anwesenden flüchtigen Säure erfasst.

2. Um richtige Resultate zu erhalten, muss die flüchtige Säure mit Wasserdampf übergetrieben werden.

### *Résumé*

1. Le dosage de l'acide volatile dans l'eau de vie d'après la méthode officielle donne de résultats insuffisants.

2. Pour obtenir des résultats justes il est nécessaire de séparer l'acide volatile par entraînement à la vapeur d'eau.

## **Über die Bestimmungen antibiotisch wirksamer Substanzen**

1. Mitteilung von Dr. *Otto Allemann*

(Hygienisch-Bakteriologisches Institut der Universität Bern)

### *Die theoretischen Grundlagen der Agar-Cup-Methode*

Bis jetzt haben die chemischen Methoden für die Auswertung von antibiotisch wirksamen Substanzen versagt, sie eignen sich nur bei ganz reinen Penicillinen. In einer späteren Mitteilung werden wir darauf zurückkommen.

In unserer ersten Mitteilung liegen die Erfahrungen über die Auswertung von Antibiotikas nach der Agar-Cup-Methode zu Grunde. Diese Methode wurde von *Chain* und Mitarbeiter für die Prüfung antibiotischer Substanzen eingeführt; sie eignet sich aber auch vorzüglich zur Prüfung wachstumsfördernder Substanzen sowie zur Prüfung von gewissen Desinfektions- und Konservierungsmitteln.

---

Herrn P. D. Dr. med. B. Fust möchte ich herzlich danken für seine wertvollen Ratschläge und für seine Anleitungen. Ferner danke ich Frau E. Gunst-Wilsdorf für ihre Mithilfe bei den Auswertungen und Versuchen.

*Die Agar-Cup-Methode wird wie folgt ausgeführt:*

*a) Teststamm:*

Zur Prüfung von Penicillin verwenden wir unsern Stamm von *Staphylococcus aureus haemolyticus* 2395.

Zur Prüfung auf Streptomycin einen Stamm von *Klebsiella ocaenae* 443.

Für die Prüfung von Streptomycin neben Penicillin verwenden wir den Stamm 2395 A. Es ist dies der Stamm, der für die Penicillin-Prüfung verwendet wird. Durch die Züchtung von über 20 Passagen steigender Mengen Streptomycin verlor er die ursprünglich vorhandene Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin, während die Penicillinempfindlichkeit voll erhalten blieb.

Diese Züchtung ist notwendig, da uns bis jetzt kein natürlicher Testkeim bekannt ist, der diese erwähnten Eigenschaften besitzt, da alle von uns geprüften Testkeime, die penicillinempfindlich sind, ebenfalls streptomycinempfindlich sind. Wir verfügen heute noch über kein anderes Verfahren, um Streptomycin neben Penicillin unwirksam zu machen.

Die Testkeime werden auf geeigneten Nährböden während 20 Stunden bei 37° C gezüchtet. Wir züchten den Testkeim *Staph. aureus haem.* 2395 und den Testkeim *Klebsiella ocaenae* 443 auf Ascites-Schrägagar. Der Testkeim 2395 A in Bouillion, dem 0,25 mg pro cm<sup>3</sup> Streptomycin beigelegt wurde.

*b) Herstellung der Suspension:*

Der Bakterienrasen wird nach der Bebrütung mit 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer nach *Sörensen* (pH 7 \*) abgeschwemmt. Die Suspension wird nun durch Mullergaze steril filtriert. Die Dichtigkeit der filtrierten Suspension wird sodann unter Zusatz von Phosphatpuffer auf eine Magermilchsuspension 1 : 100 eingestellt. Die Einstellung erfolgt zweckmässig mit einem Komparator nach *Michaelis*.

Nun werden die Agarplatten gegossen. Als Petrischalen verwenden wir Schalen mit planem Boden. Dann wird der Agar (zirka 20—25 cm<sup>3</sup>) in die Platte gegossen, und man lässt den flüssigen Agar bei Zimmertemperatur erstarren. Als Nährboden verwenden wir einen Agar folgender Zusammensetzung:

Agar	15,0
Pepton	5,0
Hefeextrakt	3,0
Fleischextrakt	1,5
Glukose	1,0
Aqua dest ad	1000,0

Die Platten werden darauf im Thermostat bei 37° während zirka 1/2 Stunde getrocknet, wobei der Deckel nur leicht zu öffnen ist, um Fremdkeime fernzuhalten.

\*) 61,2 Teile m/15 sek. Natriumphosphat (11,8760 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)  
38,8 Teile m/15 prim. Kaliumphosphat (9,0780 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Mit 0,1 cm<sup>3</sup> der hergestellten Bakteriensuspension werden die Platten nach dem Trocknen beimpft und die Suspension mit Hilfe eines Drigalski-Spatels gleichmässig verteilt. Nach dem Beimpfen werden die Platten nochmals wie oben im Thermostat getrocknet.

Aus den mit der Bakteriensuspension beimpften und getrockneten Platten wird mit einem sterilen Korkbohrer in der Mitte ein Loch gestanzt und die ausgestanzte Scheibe entfernt.

Es sind je 3 Serien von 5 Platten mit einer Kontrolle pro Versuch vorzubereiten.

In den ausgestanzten Bezirk werden 0,1 cm<sup>3</sup> Pufferlösung mit steigenden Dosen des Antibiotikums gegeben. Für die Kontrolle wird 0,1 cm<sup>3</sup> Pufferlösung ohne Antibiotikum verwendet.

Die Versuchsanordnung ist aus folgender Darstellung ersichtlich:

c) *Anlegen des Versuches*

*Penicillintitration:*

	Platte Nr.	1	2	3	4	5	6
I. E. Penicillin in 1 cm <sup>3</sup> Pufferlösung		0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	—
I. E. Penicillin effektiv in 0,1 cm <sup>3</sup> Pufferlsg.		0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	—
Phosphatpuffer ohne Penicillin in cm <sup>3</sup>							0,1

Eine Serie wird für den Standard, während 2 Serien für das zu prüfende Präparat verwendet werden.

*Streptomycintitration:*

	Platte Nr.	1	2	3	4	5	6
mg Streptomycin in 1 cm <sup>3</sup> Pufferlösung		20	10	5	2,5	1,25	—
mg Streptomycin effektiv in 0,1 cm <sup>3</sup> Pufferlsg.		2	1	0,5	0,25	0,125	—
Phosphatpuffer in cm <sup>3</sup>							0,1

Eine Serie von 5 Platten dient als Standard, während je 2 Serien für das zu prüfende Präparat verwendet werden.

Die Bebrütung der Platten erfolgt bei beiden Titrationen während 16—18 Stunden bei 37° C.

Nach dieser Zeit wird die Grösse der Hemmungshöfe abgelesen, indem mit einem Maßstab die Durchmesser der Hemmungshöfe gemessen werden. Die Messung eines Hemmungshofes wird so ausgeführt, dass man den Durchmesser des Hofes 4 mal über das Kreuz ermittelt, die ermittelten Durchmesser in mm zusammenzählt und durch 4 dividiert. Die sich daraus ergebende Zahl ist der ermittelte Durchmesser des Hemmungshofes. Die mittleren Durchmesser sind kurvenmässig aufzuzeichnen, wie dies am folgenden Beispiel der Berechnung ersichtlich ist.

#### d) Herstellung der Penicillinverdünnung:

Als Standard wird das Natriumsalz \*) des G-Pencillins verwendet (International Working Standard for Penicillin), herausgegeben von «Held for the World Health Organisation by the National Institute for Medical Resarch, London». 0,0006 mg entsprechen einer Internationalen Einheit oder einer Oxford-Einheit. Von diesem Penicillin werden z.B. 0,6 mg = 1000 Einheiten auf einer analytischen Waage abgewogen und in 2 cm<sup>3</sup> Pufferlösung gelöst. 1 cm<sup>3</sup> obiger Lösung = 500 Einheiten, wird in 9 Pufferlösungen gebracht, so dass 1 cm<sup>3</sup> 50 Einheiten enthält. 1 cm<sup>3</sup> dieser Lösung wird sodann in 11,5 Puffer gebracht, so dass 1 cm<sup>3</sup> noch 4 Einheiten enthält. Nun wird die Verdünnungsreihe angelegt, so dass in einem cm<sup>3</sup> 2, 1, 0,5, 0,25 Einheiten sind.

Pufferlösung ohne Penicillin dient als Kontrolle.

Analog werden die Verdünnungen des Präparates gemacht.

#### e) Die Herstellung der Streptomycinverdünnung

200 mg Streptomycin \*\*) werden auf der analytischen Waage abgewogen und in 10 cm<sup>3</sup> Pufferlösung gelöst. 1 cm<sup>3</sup> enthält somit 20 mg Streptomycin. Mit diesem Röhrchen werden die Verdünnungen gemacht, so dass pro 1 cm<sup>3</sup> Pufferlösung 10, 5, 2,5 und 1,25 mg Streptomycin enthalten sind.

Pufferlösung ohne Antibiotikum dient als Kontrolle.

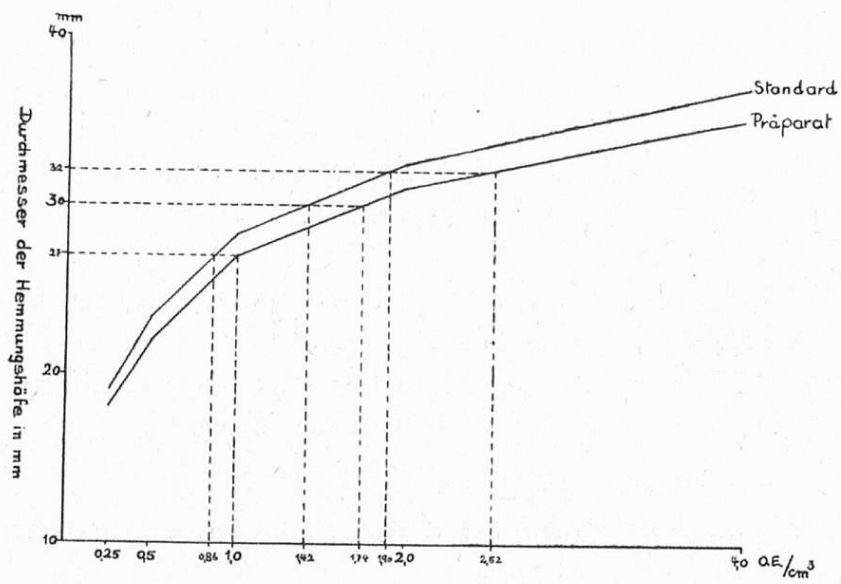
#### f) Auswertung der Bestimmungen

Werden die mittleren Durchmesser der Hemmungshöfe der einzelnen Dosen graphisch dargestellt, wobei die mittleren Durchmesser der Hemmungshöfe auf der Abzisse und die Dosen des Antibiotikums auf der Ordinate aufgetragen werden, so entsteht eine Kurve, die die Beziehung zwischen der antibiotischen Wirkung und Dosis darstellt. Graphisch werden dann die Werte abgelesen und mit dem Standard verglichen (vgl. Kurvenbild 1).

Stellt man nun aber die Beziehung des Logarithmus der Dosis des Antibiotikums zur Durchschnittswirkung (gemessen am Durchmesser der Hemmungshöfe) der Dosis graphisch dar, so findet man, dass die Punkte auf einer Geraden liegen, die sogenannte Regressionslinie (vgl. Kurvenbild 2).

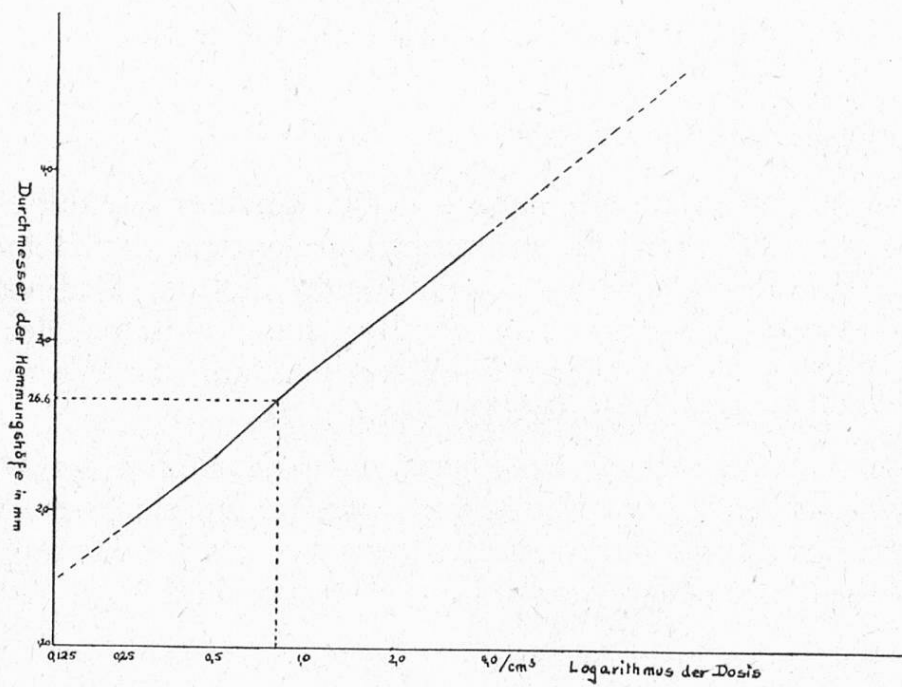
- 
- \*) 1. Int. Einheit = 0,600  $\gamma$  Penicillin-Natrium  
1. Int. Einheit = 0,628  $\gamma$  Penicillin-Kalium  
1. Int. Einheit = 0,629  $\gamma$  Penicillin-Calzium  
1. Int. Einheit = 0,793  $\gamma$  Pencillin-Barium

- \*\*) 1 g Einheit Streptomycin = 1 g krist. Streptomycin-Base  
1 g Streptomycin-Trichlorat = 0,8 g krist. Streptomycin-Base  
1 g Streptomycin-Sulfat = 0,85 g krist. Streptomycin-Base



Kurvenbild 1

Beziehung zwischen Durchmesser der Hemmungshöfe und Penicillinmenge



Kurvenbild 2

Beziehung zwischen Durchmesser der Hemmungshöfe und den Logarithmen der Penicillinmenge

Für eine solche Gerade gilt folgende Gleichung:

$$y = Y + b (x - X)$$

wobei Y der Mittelwert von y und X der Mittelwert von X (Logarithmus) der Dosis ist und

$$b = \frac{\sum y (x - X)}{\sum (x - X)^2}$$

Wendet man diese Formel auf die Standardkurve an, so ergeben sich folgende aus der unterstehenden Tabelle ersichtlichen Werte:

Dosis in O. E. pro 1/10 cm <sup>3</sup>	Log. Dosis x	Mittlerer Durchmesser der Hemmungs- höhe = y	(x-X)	(x-X) <sup>2</sup>	y (x-X)
0,05	$\bar{2},6990 = -1,3010$	23,23	-0,4517	0,2040	-10,4930
0,10	$\bar{1},0000 = -1,0000$	28,20	-0,1507	0,0227	-4,2497
0,20	$\bar{1},3010 = -0,6990$	32,28	+0,1507	0,0227	+4,8659
0,40	$\bar{1},6021 = -0,3979$	36,80	+0,4514	0,2037	+16,6115

Daraus folgt  $X = -0,8493$  ;  $Y = 30,13$

$$\sum (x - X)^2 = 0,4531; \sum y (x - X) = 6,7346$$

Also ist 
$$b = \frac{6,7346}{0,4531} = 14,80$$

und die Gleichung ist  $y = 30,13 + 14,80 (x + 0,8493)$   
oder  $y = 42,70 + 14,80 x$

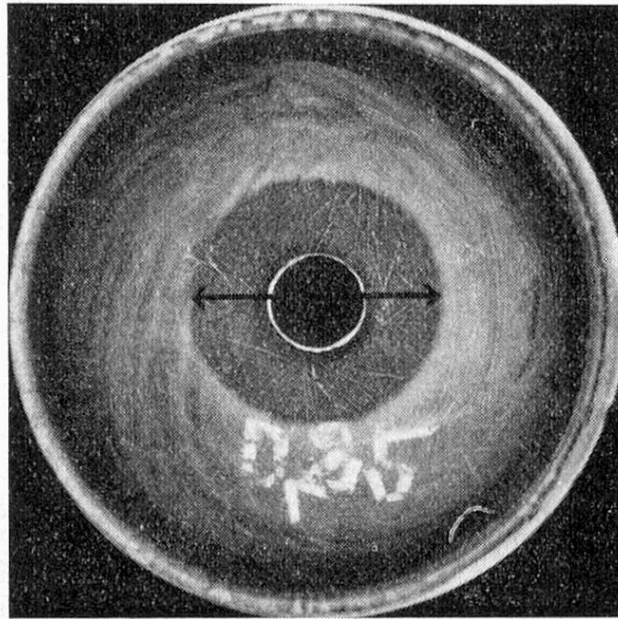
Wenn y bekannt ist, so kann nach dieser Gleichung das x, das heisst der logarithmische Wert der Dosis, bezogen auf den Standard, berechnet werden.

Selbstverständlich muss von Zeit zu Zeit und von Laboratorium zu Laboratorium die Gleichung für die Standardkurve berechnet werden.

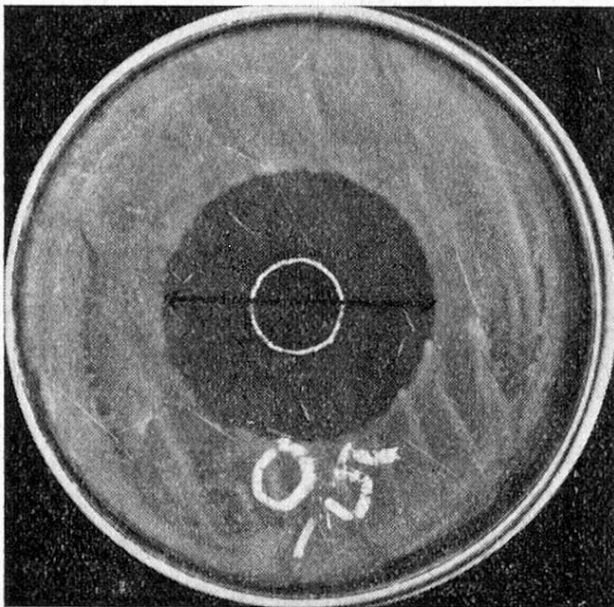
Die logarithmische Auswertung hat auch den Vorteil für die Kontrolle, da die erhaltenen Werte auf einer Geraden liegen müssen. Ist dies nicht der Fall, so stimmt die Kurve nicht, das heisst es sind Fehler bei der Titration erfolgt.

Über die praktische Auswertung und den Gebrauch der Gleichung gibt das folgende Beispiel Aufschluss: Das b gibt uns aber auch Aufschluss über die Empfindlichkeit eines Erregers auf das Antibiotikum, indem nämlich das b den Neigungswinkel der Geraden zur X-Achse ausdrückt. Je kleiner der Wert von b ist, desto empfindlicher ist der Erreger, und je höher der b-Wert ist, desto empfindlicher ist der Erreger gegen das Antibiotikum.

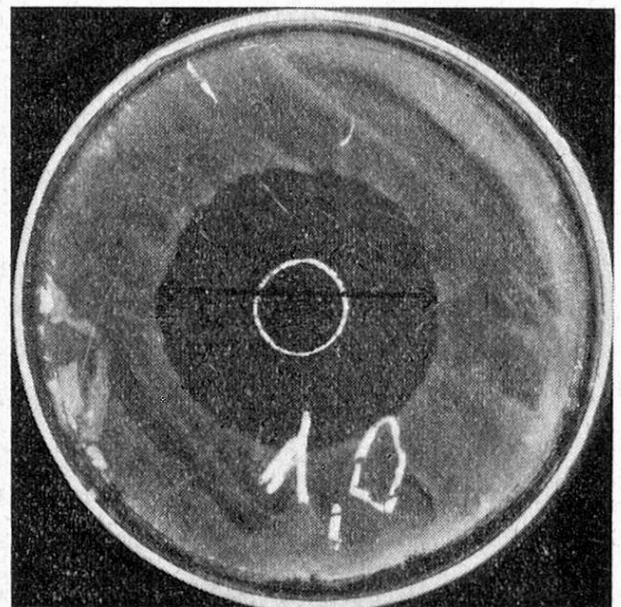
*Penicillintitration nach der Agar-Cup-Methode*



Penicillinmenge 0,25 I.E.  
Mittlerer Durchmesser des Hemmungshofes  
19,04 mm

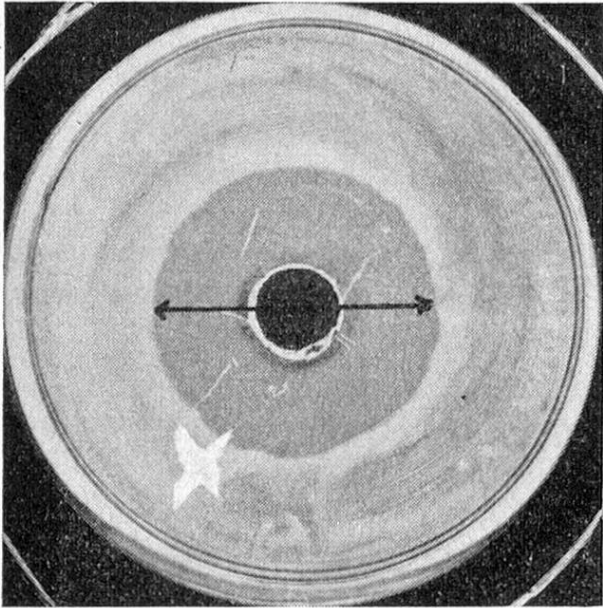


Penicillinmenge 0,5 I.E.  
Mittlerer Durchmesser des Hemmungshofes  
23,23 mm



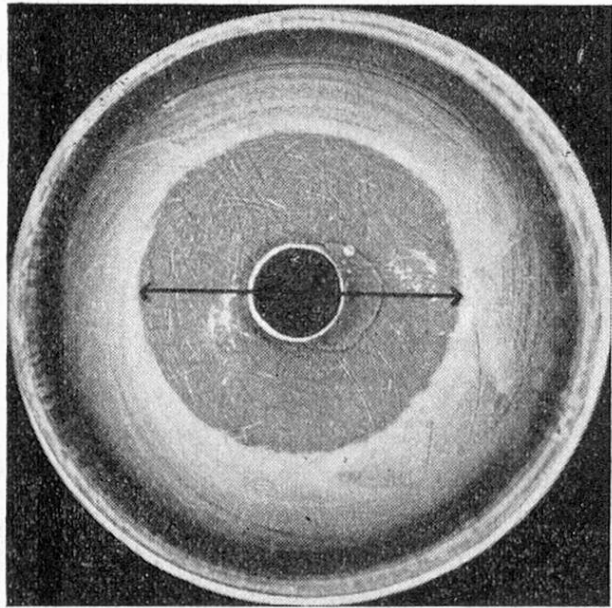
Penicillinmenge 1,0 I.E.  
Mittlerer Durchmesser des Hemmungshofes  
28,20 mm





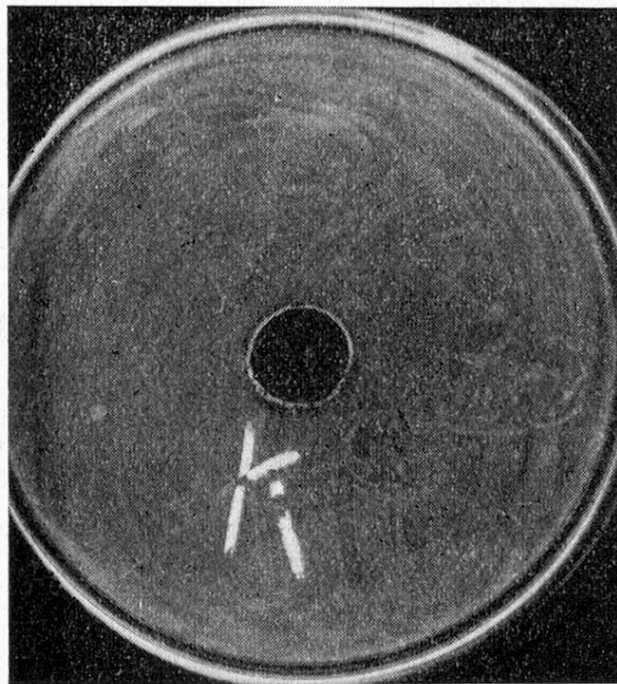
Penicillinmenge 2,0 I.E.

Mittlerer Durchmesser des Hemmungshofes  
32,28 mm



Penicillinmenge 4,0 I.E.

Mittlerer Durchmesser des Hemmungshofes  
36,80 mm



Kontrolle

Kein Hemmungshof

So fanden wir bei der Resistenzprüfungen gegenüber Penicillin folgende Werte von b:

Staphylococcus aureus haemolyticus	Nr. 2395	14,80
Staphylococcus aureus haemolyticus	Nr. 1700	10,18
Streptococcus pyogenes	Nr. 2010	12,23
Escherichia coli	Nr. 1928	2,30
Escherichia coli	Nr. 2025	0,00
Neisseria gonorrhoeae		18,45

Wir bringen ein Beispiel für die graphische Rechnungsauswertung. Die Ausmessung der Höfe ergab beim Standard und bei einem zu untersuchenden Präparat folgende Werte:

*Versuchsprotokoll Nr. 180*

*1. Penicillintitration:*

*Cup-Methode*

Standard	Int. Einh. Penicillin pro cm <sup>3</sup>	0,25	0,50	1,00	2,00	4,0
Mittelwert der Hemmungshöfe mm		19,04	23,23	28,20	32,28	36,80
Präparat (Deklaration 1000 I. E.)						
Mittelwert der Hemmungshöfe mm		18,00	22,00	27,00	31,00	35,00

Die Aufzeichnung der gefundenen Punkte auf einem koordinaten System ergaben die nachstehenden Kurven.

Ihre Berechnung erfolgte, indem wir für die gleichen Hemmungshöfe die zugehörigen Einheiten berechneten, mit dem Standard verglichen und das Resultat mit dem Verdünnungsfaktor multiplizierten.

Durchmesser der Hemmungshöfe mm	O. E. Penicillin cm <sup>3</sup> Standard	O. E. Penicillin cm <sup>3</sup> Präparat
27,0	0,86	1,00
30,0	1,42	1,74
32,0	1,90	2,52
Mittelwert	1,39	1,75

$$\frac{1,39 \cdot 1000}{1,75} = 794 \text{ O. E. resp. Int. Einh. Penicillin}$$

1000 ist der Verdünnungsfaktor.

Das zu untersuchende Präparat enthielt statt 1000 Einheiten 794 Einheiten, verglichen mit dem Internationalen Standard.

Wie wir gesehen haben, ist die Beziehung des Logarithmus der Penicillindosen zum Durchschnittseffekt der Hemmungshöfe in mm linear.

Die Berechnung des vorliegenden Beispiels erfolgt wie folgt:

Die Gleichung der Geraden für die Standardkurve ist:

$$y = 42,70 + 14,80 \times x$$

y ist der Durchschnitt sämtlicher Hemmungshöfe des Präparates und beträgt:

$$\frac{18,00 + 22,00 + 27,00 + 31,00 + 35,00}{5} = \frac{133}{5} = 26,60$$

Das y, eingesetzt in die obige Gleichung der Standardgeraden, ergibt:

$$26,60 = 42,70 + 14,80 \times x$$

$$-16,10 = 14,80 x$$

$$\frac{-16,10}{14,80} = x$$

$$x = -1,08783 = -0,91217$$

Dies ist der Logarithmus von 0,8169.

Das untersuchte Präparat enthielt somit  $0,8169 \times 1000 =$

$$\underline{816,9 \text{ Int. Einh. Penicillin.}}$$

Aus diesen Berechnungen geht hervor, dass das untersuchte Präparat zu schwach ist und nur rund 80 % der deklarierten Menge an antibiotisch wirksamen Substanzen, verglichen mit dem Internationalen Standard, enthält.

Um nun zu entscheiden, ob die verminderte Wirksamkeit wirklich vorhanden ist, oder ob dieses Resultat zufällig ist, wird eine neue Versuchsserie eingeleitet. Dabei wird das Präparat so weit verdünnt oder konzentriert, dass sie dieselben Werte wie der Standard aufweisen.

Aus diesem Grunde wird der Standard, wie gewohnt, in der Pufferlösung gelöst, während die zu untersuchende Substanz nur in 80 % Puffer gelöst wird.

Bei diesem Versuch wurden folgende durchschnittlichen Hemmungshöfe bei den verschiedenen Dosen Penicillin gefunden:

## 2. *Pencillintitration* nach der Cup-Methode:

Standard	Int. Einh. Penicillin pro cms	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
Mittelwert der Hemmungshöfe mm		19,00	22,88	28,00	32,38	36,88
Präparat	Int. Eint. Penicillin pro cm <sup>3</sup> in 80 % Puffer gelöst					
«berechnet»		0,31	0,65	1,25	2,50	5,00
effektiv		0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
Mittelwert der Hemmungshöfe mm		19,13	22,88	27,88	32,38	36,75

Aus obiger Darstellung geht hervor, dass die berechneten erhöhten Werte von Penicillin ungefähr die gleichen Hemmungshöfe erzeugen wie der Standard.

7,750 I. E. Penicillin des Standardes erzeugen einen Gesamthof von 139,14 mm Durchmesser.

9,685 I. E. Penicillin laut Deklaration erzeugen einen Gesamthof von 139,04 mm Durchmesser.

Also müssen die berechneten Penicillin einheiten laut Deklaration mit 0,8 multipliziert werden, um auf die effektiven Einheiten des Standardes zu kommen.

Das Präparat enthält somit 800 Einheiten Penicillin, gegenüber dem Internationalen Standard.

Somit wurde das bei der ersten Titration gefundene Resultat bestätigt.

Die Werte der Cup-Methode sind nach unseren Erfahrungen sehr gut reproduzierbar und weisen bei genauer Einhaltung der Versuchsbedingungen eine Fehlerquelle von maximal  $\pm 8\%$  auf \*).

Wir prüften in der Folge die Faktoren, die bei der Bestimmung nach der Cup-Methode grössere Fehlerquellen bedeuten könnten.

#### a) Der Einfluss der Agarmenge:

Wir verwendeten Petrischalen und gaben verschiedene Mengen Agar dazu. Die Impfung erfolgte normal und die Einheiten Penicillin blieben konstant, das heisst, wir gaben 5 I. E./cm<sup>3</sup> Penicillin-Pufferlösung.

Der Versuch ergab folgende Werte:

Agarmenge in der Platte	Mittlerer Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin 0,1 cm <sup>3</sup>
5 cm <sup>3</sup>	nicht ablesbar	—
10 cm <sup>3</sup>	38,0	0,48
15 cm <sup>3</sup>	38,0	0,48
20 cm <sup>3</sup>	38,0	0,48
25 cm <sup>3</sup>	37,5	0,44
30 cm <sup>3</sup>	37,2	0,43
35 cm <sup>3</sup>	36,0	0,35
40 cm <sup>3</sup>	35,5	0,33

Diese Versuche zeigen, dass die Agarmenge einen Einfluss auf die Auswertungsergebnisse hatten. Um vergleichbare Hemmungshöfe zu erhalten, müssen gleiche Mengen Agar verwendet werden.

#### b) Einfluss der Keimdichte auf die Bildung der Hemmungshöfe:

Wir verwendeten für diesen Versuch 20 cm<sup>3</sup> Agar pro Platte und gaben 0,5 Einheiten Penicillin in 0,1 cm<sup>3</sup> Pufferlösung und beimpfen die Platten mit einer Bakteriensuspension verschiedener Keimdichte.

\*) Berechnet auf Grund von 140 Bestimmungen nach der Fehlerrechnung von Gauss.

Keimdichte Keime pro cm <sup>3</sup>	Mittlerer Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
10 000 000	38,0	0,48
1 000 000	38,0	0,48
100 000	38,0	0,48
10 000	38,2	0,50
1 000	38,4	0,51
100	38,6	0,53

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Keimmenge nur einen ganz geringen Einfluss auf die Grösse der Hemmungshöfe hat.

*c) Der Einfluss des Alters der Kulturen auf den Durchmesser der Hemmungshöfe:*

Bei diesen Versuchen verwendeten wir als Impfkulturen Kulturen verschiedenen Alters. Penicillinmenge, Agarmenge und Suspensionsdichte erfolgte wie nach Vorschrift.

Alter der Kultur	Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
12 Stunden	38,1	0,48
24 Stunden	38,0	0,48
48 Stunden	38,2	0,50
1 Woche	37,4	0,44
2 Wochen	37,0	0,41

Der Einfluss des Alters der Kulturen spielt für die Praxis in der Auswertung des Testes keine grosse Rolle. In der Praxis wird man immer von 12—24 Stunden alten Kulturen ausgehen.

*d) Der Einfluss der Stämme auf den Durchmesser der Hemmungshöfe:*

Diese Eigenschaft ist bekannt und man weiss, dass es z. B. Penicillin empfindlichere und weniger empfindlichere Stämme gibt. Diese Eigenschaft ist auch beim Streptomycin bekannt. Immerhin sei dies der Vollständigkeit halber dargestellt, wie folgende Tabelle zeigt:

Stamm Staph. aureus haem.	Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
Stamm 2395 Bern	38,0	0,48
Oxford	37,0	0,41
1700 Bern	35,4	0,32
2780 Bern	45,0	1,03

Diese Versuche bestätigen das Gesagte. Es ist in der Praxis streng darauf zu achten, dass die Stämme rein bleiben und durch keine Fremdinfectionen verunreinigt werden.

*e) Der Einfluss des Nährbodens auf die Ausbildung der Hemmungshöfe*

Verwendet wurden zu diesen Versuchen verschiedene bakteriologische Nährböden. Die zusammenfassenden Resultate sind aus der Tabelle ersichtlich.

Nährboden	Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
Normal Agar lt. Vorschrift	38,0	0,48
Blutagar-Schottmüller	38,0	0,48
Blutagar-Lewinthal	37,2	0,43
Ascitesager	39,2	0,58
Maltoseagar	36,4	0,38

*f) Der Einfluss der Wasserstoffjonenkonzentration des Nährbodens auf die Ausbildung der Hemmungshöfe.*

Diese Versuche wurden laut Vorschrift mit 0,5 I. E. Penicillin in 0,1 cm<sup>3</sup> ausgeführt, geändert wurde das pH des Normal-Agars mit NaOH bzw. HCl.

Die Resultate sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Wasserstoffjonen- konzentration pH	Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
9,5	31,5	0,17
9,0	31,0	0,16
8,5	31,5	0,18
8,0	35,0	0,30
7,5	37,5	0,45
<b>7,2</b>	<b>38,1</b>	<b>0,49</b>
6,8	<b>37,9</b>	0,47
6,0	37,9	0,47
5,5	37,4	0,44
5,0	37,2	0,43

Diese Zahlen beweisen, dass einerseits die Art des Nährbodens für die Ausbildung der Grösse der Hemmungshöfe einen bedeutenden Einfluss ausüben und, dass andererseits die Wasserstoffjonenkonzentration im Nährboden ebenfalls einen wichtigen Faktor bedeutet für die Grösse der Hemmungshöfe. Offenbar wird das

Penicillin im alkalischen Milieu empfindlich geschwächt, während es gegenüber der Säure resistenter erscheint. Unsere Nährböden weisen ein pH von 7—7,2 auf.

*g) Der Einfluss der Bebrütungsdauer auf die Ausbildung der Hemmungshöfe*

Die Versuchstechnik war wie gewöhnt, die Messung der Höfe erfolgte alle 3 Stunden.

Zeit nach der Impfung Stunden	Durchmesser der Hemmhöfe in mm	Entspricht Int. Einh. Penicillin
3	keine	—
6	34,0	0,27
12	35,2	0,31
17	<b>38,0</b>	<b>0,48</b>
24	38,0	0,48
48	38,0	0,48
72	37,4	0,44
1 Woche	37,2	0,43

Die Zeit der Ablesung darf nicht zu früh erfolgen, da sich die Höfe noch nicht voll ausgebildet haben; ferner beobachtet man sogenannte Pseudohöfe. Eine spätere Ablesung spielt auf das Resultat keine sehr grosse Rolle.

*h) Der Einfluss der Menge Pufferlösung, in denen 0,5 I. E. Penicillin gelöst sind, auf die Ausbildung der Hemmungshöfe*

Menge Pufferlösung, in denen 0,5 I. E. Penicillin enthalten sind	Durchmesser der Hemmungshöfe in mm	Entspricht {Int. Einh. Penicillin
0,15 cm <sup>3</sup> Pufferlösung	41	0,77
<b>0,10</b>	<b>38,1</b>	<b>0,49</b>
0,05	34,0	0,27
0,01	28,4	0,11

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Menge Lösungsmittel, in welchem das Penicillin gelöst wird, von ausschlaggebender Bedeutung ist für die Ausbildung der Hemmungshöfe. Daher benützen wir genau geeichte Präzisionsmikropipetten für die Abmessung der Penicillinlösungen. Ohne Einfluss bleibt, ob man das Penicillin in Wasser oder physiol. Kochsalzlösung oder in Pufferlösung löst. Die Ausbildung der Hemmungshöfe ist bei den von uns geprüften Lösungsmitteln für das Penicillin überall dieselbe.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bestimmung von antibiotischen Substanzen nach der Agar-Cup-Methode. In dieser ersten Mitteilung wurde die Durchführung dieser Methode eingehend beschrieben und die mathematische Auswertung gegeben. Die Dosis des Antibioticums kann in eine quantitativ fassbare Beziehung mit der Wachstumshemmung des Testkeimes gebracht werden. Die mathematische Formulierung dieser Beziehung lautet:

$$y = Y + b(x - X)$$

wobei  $Y$  der Mittelwert von  $y$  (Durchmesser des Hemmungshofes) und  $x$  der Mittelwert von  $X$  (Logarithmus der Dosis) ist.

Das  $b$  drückt den Neigungswinkel der Geraden zur  $x$ -Achse aus und gibt uns Aufschluss über die Empfindlichkeit resp. Resistenz eines Erregers gegenüber dem Antibioticum.

Auf Grund dieser Standardkurve, die mit dem Internationalen Standard für jedes Laboratorium bestimmt und berechnet werden muss, kann der wachstumshemmende Effekt eines unbekanntes Präparates bestimmt und mit dem Standard verglichen werden. Es wurde ferner gezeigt, welche Faktoren als Fehlerquellen bei der Agar-Cup-Methode auftreten können.

## Résumé

Le présent travail traite du dosage de substances antibiotiques d'après la méthode «Agar-Cup». On décrit cette méthode d'une façon détaillée dans cette première communication et l'on en donne l'interprétation mathématique. Il y a une relation, que l'on peut mesurer quantitativement, entre la dose de l'antibiotique et l'inhibition de la croissance du germe de l'essai.

Mathématiquement cette relation est exprimé par l'équation:

$$y = Y + b(x - X)$$

dans laquelle  $Y$  est la moyenne de  $y$  (diamètre de la zone d'inhibition) et  $x$  la moyenne de  $X$  (logarithme de la dose).

$b$  exprime l'angle d'inclinaison des droites par rapport à l'axe des  $x$ ; il nous renseigne sur la sensibilité, respectivement la résistance, d'un germe envers l'antibiotique. L'effet d'inhibition de la croissance dû à une préparation inconnue peut être déterminé et comparé avec l'étalon, en se basant sur une courbe étalon qui doit être déterminée et calculée avec l'étalon international pour chaque laboratoire.

On a montré ensuite quels sont les facteurs qui peuvent intervenir comme causes d'erreur dans la méthode «Agar-Cup».