SAMMELREFERAT

Mikrobiologische Bestimmungsmethoden der Antibiotica

Theodor Elsässer und Brigitta Mattern

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

Eingang des Manuskri.: 15. 5. 1962

Die Methoden zur Wertbestimmung der Antibiotica und zur Resistenzbestimmung von Mikroorganismen sind in erster Linie für den human- und veterinärmedizinischen Gebrauch entwickelt worden. Wenn im folgenden hauptsächlich auf diese Methoden eingegangen wird, so aus dem Grunde, daß sie sich ohne Schwierigkeiten ohne oder mit geringen Abwandlungen auf die neuen Anwendungsgebiete der Antibiotica, wie Futter-, Pflanzenschutz- und Lebensmittel übertragen lassen. Die neuen Probleme erstrecken sich größtenteils auf die Abtrennung der Antibiotica von Futter-, Pflanzen- oder Nahrungsmitteln zum Zwecke der Bestimmung. Hierfür stehen aus der pharmazeutischen Industrie Modelle zur Verfügung, die modifiziert angewendet werden können (Brunner u. a. 1955, Edwards u. a. 1955). Dabei sind grundsätzlich die möglichen Interferenzen mit Substanzen, die im Futter vorhanden sind, von Bedeutung.

Allg. muß noch voraus bemerkt werden, daß bei der Auswertung biol. Meßergebnisse die Anwendung mathematischer Methoden, wie Biometrik und Statistik, unerlässlich ist. In der Praxis werden diese Methoden oft noch nicht im wünschenswerten Umfang angewendet, obgleich zahlreiche Lehrbücher und Übersichten veröffentlicht worden sind, von denen als Beispiele hier nur das Lehrbuch von Weber (1961) und die Übersicht von Wasserfall (1959) erwähnt werden sollen. An Hand von Penicillinbestimmungen konnte Oberzill (1961) zeigen, daß die volle Auswertung von Versuchsreihen nur mit biometrischen Methoden möglich ist.

Bei den mikrobiol. Bestimmungsmethoden (Gavin 1956, 1957 a, b, 1958) bedient man sich eines Mikroorganismus, auf den das zu untersuchende Antibioticum hemmend wirkt. Für die praktische Ausführung sind zahlreiche Methoden ausgearbeitet und variiert worden, je nach den Anforderungen, die an den einzelnen Test gestellt werden. In diesem Bericht setzen wir die techn. Durchführung der mikrobiol. Tests als bekannt voraus. Man kann sich heute aus Sammeldarstellungen über die Technik bequem orientieren (Henneberg 1949, Grove und Randall 1955, Köhler 1956, Klein 1957, Otte und Köhler 1958, Welsch 1960). Eine tabellarische Übersicht über 36 verschiedene Methoden für die biol. Bestimmung der 17 häufigsten Antibiotica geben Kirshbaum u. a. (1959).

Der Grundgedanke der mikrobiol. Bestimmungsmethoden ist, den Testkeim verschiedenen Konzentrationen des Antibioticums auszusetzen, entweder in Form abgestufter Lösungen oder durch Erzeugung eines Konzentrationsgefälles. Durch Vergleich mit einer Parallelbestimmung einer bekannten Substanz lassen sich Schlüsse auf die Menge des Antibioticums in der zu untersuchenden Probe ziehen. Gemessen wird entweder die Hemmung des Wach-

tums unmittelbar, etwa nephelometrisch oder durch Auszählung, oder es werden Stoffwechselvorgänge erfaßt, deren Messung direkt, z. B. wie bei Atmung (Kraushaar 1959), oder indirekt durch Reaktion mit vorher zugegebenen Stoffen, wie Indikatoren oder Blut, erfolgt. Alle derartigen Reaktionen müssen qualitativ möglichst spezifisch und quantitativ erfaßbar sein.

Ein Konzentrationsgefälle wird bei allen **DIFFUSIONSTESTEN** benutzt. Bringt man an einem Punkt eines mit Agar gesteiften Nährbodens das Antibioticum auf, so diffundiert es nach allen Seiten, es entsteht ein radialer Gradient. In einer solchen Nährbodenplatte wachsen die Mikroorganismen nicht bei den höheren Konzentrationen des Antibioticums nahe dem Diffusionszentrum; erst von einer bestimmten Zone an beginnt kreisförmig um dieses Zentrum das Wachstum. Aus der Größe der entstehenden Hemmhöfe kann die Menge bzw. die Konzentration des Antibioticums berechnet werden.

Meistens wird der Diffusionstest als **PLATTENTEST** durchgeführt, bei dem eine Agarschicht in eine flache Schale ausgegossen wird. Allg. üblich ist die Zweisichtenplatte, bei der der Testkeim sich nur in der oberen, möglichst dünnen Schicht befindet. Um gute Ergebnisse zu erzielen, muß die gesamte Schicht sehr gleichmäßig dick sein, und die Dicke muß klein gegen die zu messende Hemmzone sein, damit nur die zweidimensionale (radiale) Diffusion berücksichtigt wird. Brock (1957) verlangt eine nur 1 mm dicke Agarschicht; wir haben mit der üblichen 2 mm dicken Schicht auch gute Ergebnisse erzielt. Um einwandfrei zu diffundieren, muß das Antibioticum in vollkommen gelöster Form vorliegen. Bei sehr leicht in Wasser löslichen Antibiotica, z. B. Penicillin, Streptomycin u. a., kann das Antibioticum in fester Form auf den Agarnährboden gebracht werden, etwa bei dem noch zu erläuternden Blättchentest. Ist die Menge des Antibioticums nicht zu groß, so wird sie sich ganz in dem im Agar enthaltenen Wasser lösen. Meistens wird jedoch vorher eine Lösung des Antibioticums hergestellt, entweder in Wasser oder unter Zuhilfenahme eines biol. unwirksamen Lösungsvermittlers, z. B. Dimethylformamid. Die Lösung darf mit dem Nährboden nicht reagieren und soll gut und möglichst lange diffundieren. Daher ist es oft vorteilhaft, die Testplatte bis zur Beendigung der Diffusion im Kühlschrank aufzubewahren und erst anschließend zu bebrüten. Entspr. Vorschriften findet man im Deutschen Arzneibuch (1959, S. 217, 219), in der British Pharmacopoeia (1953) und in anderen Arzneibüchern. Eine 24stündige Diffusionszeit empfiehlt Thomsen (1962).

Eine langandauernde Diffusion sichert gut abgestufte Hemmhöfe. Durch Zusätze von NaCl, KCl oder CaCl₂ konnten Brock (1957) und Iwanizkaja (1961) die schlechte Diffusion des Neomycins und anderer Antibiotica und Ehrenkranz u. a. (1959) die Wirkung des Chloramphenicols verbessern. Ähnliche Beobachtungen beschreiben bei Colistin Sous u. a. (1961) und bei Thiostrepton Levin u. a. (1960).

Drushinina (1959) gibt einen Nährboden an, in dem die Tetracycline sehr lange diffundieren. Durch derartige Maßnahmen wird der Test empfindlicher und genauer.

Zur Testung von schwer löslichen antibiotischen Substanzen schlägt Kuhfuß (1957) vor, als Träger der Antibiotica Baumwollfäden zu benutzen und diese auf den beimpften Agar aufzulegen.

Für die Untersuchung zahlreicher gleichartiger Proben hat man die Durchführung der Diffusionsteste auf großen Platten (30 × 40 cm und größer) vorgeschlagen (Ševčík 1954, Hess 1955, Lees u. a. 1955). Der Vorteil eines hohen Durchsatzes ist aber mit geringerer Genauigkeit verbunden. Die Schwankungsbreite der Werte kann durch eine auf der Zufallsverteilung beruhenden systematischen Anordnung der Standard- und Probenverdünnungen auf der Platte vermindert werden (Lightbown u. a. 1957). Diese Methode ist für orientierende Reihenuntersuchungen sehr geeignet.

Der für eine genaue Bestimmung wichtige Hemmhofdurchmesser läßt sich bei scharfem Rand bis auf $\pm 0,3$ mm messen. Bei unscharfen Rändern muß man darauf achten, daß bei allen Hemmhöfen die gleiche Stelle der Übergangszone gemessen wird, am günstigsten i. allg. der innere Rand.

Die Benutzung von Glaslinealen, Projektionseinrichtungen u. ä. ist mehr oder weniger zeitraubend. Für Routineteste hat man Apparate konstruiert, die auf der Messung über einem Millimeternetz beruhen und eine schnelle Ableseung ohne Minderung der Genauigkeit gestatten (Isenberg u. a. 1958). Auch handelsübliche Photoretuschiergeräte werden hierfür benutzt (Bradler 1961).

Der Diffusionstest in der Platte wird als Zylinder-, Loch-, Blättchen- und Tropfentest durchgeführt. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Der ZYLINDERTEST wird wegen seiner verhältnismäßig einfachen Technik noch häufig angewendet. Nachteilig ist die gegenüber dem Lochtest etwas geringere Genauigkeit. Unregelmäßigkeiten in der Diffusion treten bei verschiedenen tiefem Einsinken der Zylinder in den Agar ein, die sich bes. bei dünnen Agarschichten auswirken, ebenso bei Flüssigkeiten, die sedimentieren, so daß der Zylinderboden, durch den allein die Flüssigkeit diffundieren kann, weniger durchlässig wird. Auch das Material der Zylinder kann die Ergebnisse beeinflussen (Snell u. a. 1959).

Der LOCHTEST hat nach unseren Erfahrungen die gleiche oder eine etwas höhere Genauigkeit als der Zylindertest. Da die Testflüssigkeit nur durch die Lochwand diffundiert, ist die Methode immer dann angebracht, wenn die zu testende Flüssigkeit zum Sedimentieren neigt, wie z. B. Körper- und Fermentationsflüssigkeiten. Die schwierigere Handhabung kann mehr als bei dem Zylindertest durch manuelle Geschicklichkeit ausgeglichen werden.

Eine vereinfachte Methode ist der BLÄTTCHENTEST. Filterpapierscheiben, die auf den Agar aufgelegt werden, dienen anstelle der Zylinder oder Stanzlöcher zur Aufnahme der Probe. Diese Methode hat in der Praxis weite Verbreitung gefunden. Für die Kontrolle in der Therapie und bei pharmakologischen Untersuchungen haben Topley u. a. (1951) und Bykova u. a. (1959) vorgeschlagen, Filterpapierplättchen auf die Wunde oder das Organ aufzulegen, so daß sie vom Blut oder von der Organflüssigkeit durchtränkt werden. Danach wird im Diffusionstest getestet. Die gleiche Methodik wenden Kelch u. a. (1959) für die Prüfung von Fleisch- und Organproben von Schlachttieren und Cerny u. a. (1955) und Shahani u. a. (1958) für die Untersuchung von Milch auf Antibiotica an.

Eine Weiterentwicklung dieses Testes beruht darauf, daß Filterpapier bestimmter Fläche mit der Probe getränkt und getrocknet wird und aus diesem Papier Scheiben bestimmter Größe ausgestanzt und auf den Agar aufgelegt werden (Pridal u. a. 1958, Walter u. a. 1958). Ein Vorteil ist der Fortfall oder die erhebliche Verminderung der Anzahl der Verdünnungen. I. allg. erreichen diese Tests nicht die Genauigkeit des Lochtestes, jedoch haben Balan und Betina (1959 a, b, c) in letzter Zeit die Fehlermöglichkeiten durchgearbeitet. Bei Anwendung ihrer Methode geben sie außer erheblich leichter Handhabung auch größere Genauigkeit an. Wir konnten das erste bestätigen, fanden jedoch gegenüber dem Lochtest nur die gleiche Genauigkeit. Die Verwendung von antibiotischen Testtabletten hat sich in der Praxis nicht bewährt (Burian u. a. 1960).

Ebenfalls ohne Verdünnungen arbeitet der TROPFENTEST. Iyengar (1959) gibt 2 Mikrotropfen von 0,4 und 1,6 μ l der Probe und der Standardlösung auf den Agar. Von großem Vorteil sind bei dieser Methode die sehr geringen Probenmengen, die benötigt werden, jedoch ist die Genauigkeit etwas geringer.

Außer als Plattentest kann der Diffusionstest auch als Capillartest durchgeführt werden. Man läßt das Antibioticum durch enge Röhren diffundieren,

die mit beimpften Agarnährboden gefüllt sind (Davis 1950). Diese Testmethode ist wenig gebräuchlich, da sie umständlich und ungenau ist. Im Gegensatz zu den Diffusionstesten, die mit einem kontinuierlichen Gefälle arbeiten, werden bei den REIHENVERDÜNNUNGSTESTEN die Mikroorganismen verschiedenen abgestuften Konzentrationen des Antibioticums im Nährboden ausgesetzt und die Abhängigkeit des Wachstums von der Konzentration bestimmt. Diese Tests werden meistens in flüssigen Nährböden durchgeführt, jedoch sind auch Methoden auf festen Nährböden beschrieben worden (Henneberg 1949). Die Reihenverdünnungstests sind umständlich und zeitraubend und erfordern großen Aufwand, daher vermeidet man sie gern bei Routineuntersuchungen. Um die genannten Schwierigkeiten einzuschränken, geben Ryan u. a. (1961) eine Apparatur zum schnellen Ansetzen von Reihenverdünnungstesten in flüssigen Medien an. Als weitere Nachteile des Reihenverdünnungstestes ergeben sich die sterile Kulturführung; die nephelometrische Auswertung ist bei trüben oder gefärbten Medien eingeschränkt oder unmöglich (Schmidt u. a. 1961). Ferner stören Reste org. Lösungsmittel mehr als im Diffusionstest. Jedoch kann mit dem Reihenverdünnungstest die Resistenzgrenze eines Keimes genauer bestimmt werden als mit den Diffusionsmethoden, so daß man ihn bei solchen Resistenzuntersuchungen, die eine größere Genauigkeit erfordern, dem Diffusionstest vorziehen wird. Bei allen mikrobiol. Testen ist die WAHL DES TESTKEIMES (Gavin 1956) von großer Bedeutung. Die Hauptforderungen an den Testkeim sind: möglichst spezifische Empfindlichkeit gegen das zu untersuchende Antibioticum und Stabilität gegen Mutationen und Modifikationen. Hohe Empfindlichkeit wird meistens, jedoch nicht immer, erwünscht sein. So konnte Oberzill (1960) durch Wahl eines wenig empfindlichen Testkeimes (*Escherichia coli*) bei der Bestimmung konzentrierter Penicillinlösungen (500–5000 IE/ml) die sonst nötigen Verdünnungen vermeiden, dadurch die Arbeitszeit abkürzen und die Genauigkeit des Testes steigern. Ferner wird man apathogene Arten i. allg. den pathogenen vorziehen (Wakulenko 1959 a, b), ebenso schnell wachsende den langsam wachsenden. Zur Bestimmung bactericider und bacteriostatischer Antibiotica verwendet man Bakterien; Bowman (1957) gibt eine Liste der 19 in den USA gebräuchlichsten Testorganismen an. Um diese Vielzahl zu vermindern, hat man jedoch auch Keime gesucht, die zur Testung mehrerer Antibiotica geeignet sind (Wintermere u. a. 1957). Für die Testung fungistatischer Antibiotica werden wegen der günstigeren mikrobiol. Kultureigenschaften meistens Hefen (Bradler 1959, Carlson u. a. 1959, Tebjakina u. a. 1959 a), jedoch gelegentlich auch mycelbildende Pilze (Betina 1958) gebraucht. Die Unterdrückung der Phagenwirkung gegen einen Staphylococcus durch das Antibioticum benutzen Dmitrijewa u. a. (1960) zur Fumagillinbestimmung. Die Dichte der Einsaat des Testorganismus hat auch einen gewissen Einfluß auf den Test (Linton 1958). Werden die Keime sehr dicht eingesät, so macht sich die Absorption des Antibioticums durch die Organismen störend bemerkbar (Simon 1959), zu geringe Dichte verzögert das Wachstum und vermindert die Genauigkeit des Testes. Die optimale Dichte ist von Keim zu Keim und von Antibioticum zu Antibioticum verschieden und wird zweckmäßig in jedem Fall experimentell ermittelt (Julius u. a. 1958). Die Wahl des Testorganismus spielt eine bes. Rolle bei der Untersuchung von Antibioticagemischen (Stapley 1958). Es gilt hierbei, einen Mikroorganismus zu finden, der nur auf eines der Antibiotica des Gemisches anspricht und gegen die übrigen unempfindlich ist. Diese unterschiedliche Resistenz kann von Natur aus vorliegen, z. B. bei *Escherichia coli* oder *Klebsiella pneumoniae* (Hitzenberger 1961), die gegen Penicilline weitgehend resistent, gegen Streptomycin und die Tetracycline empfindlich sind. Man kann aber auch einen Mikroorganismus für einen solchen Test vorbereiten, indem man ihn

durch Einwirken steigender Mengen eines Antibioticums gegen dieses resistent macht, wobei i. allg. die Empfindlichkeit gegen andere Antibiotica erhalten bleibt. Hierzu werden bes. gern die leicht resistent werdenden Staphylokokken verwendet (Friedman u. a. 1954, Awerjanowa 1957, Ritzerfeld 1958, Tebjakina u. a. 1959b, de Nunzio u. a. 1954, Bujanowskaja u. a. 1961). Jedoch eignen sich auch andere Bakterien hierfür, z. B. *Bacillus subtilis* (Sella 1954). Kowalenkowa (1958) gibt eine Übersicht über dieses Gebiet. Diese Methode versagt natürlich, wenn Kreuz- oder Gruppenresistenz vorhanden ist, z. B. bei den Gemischen der Tetracycline untereinander. Durch Verwendung resistenter Bakterienstämme läßt sich auch der störende Einfluß der Antibiotica bei der mikrobiol. Vit.-Bestimmung ausschalten. Princivalle und von Lorch (1957) verwenden gegen Antibiotica resistent gemachte *Lactobacillen*, die gegen Vit. empfindlich geblieben sind.

Außer unterschiedlich resistenten Testorganismen kann auch verschieden starke Diffusion im Agar zur Bestimmung mehrerer Antibiotica nebeneinander benutzt werden. Neben Neomycin, das infolge schlechter Diffusion im Agar fast keine antibiotische Wirksamkeit zeigt, konnten Sokolski u. a. (1960, 1961) andere Antibiotica (Endomycin) quantitativ nachweisen. Auch konnten sie auf diese Weise Synergismus und Antagonismus mit Neomycin untersuchen.

Das für die kombinierte therapeutische Anwendung mehrerer Antibiotica wichtige synergistische oder antagonistische Zusammenwirken wird i. allg. im Diffusionstest in vitro durch gekreuztes Auflegen zweier mit den zu untersuchenden Antibiotica getränkten Filterpapierstreifen untersucht (Knapp u. a. 1955). Je nachdem, ob an den Kreuzungsstellen, an denen sich beide Antibiotica im Agar befinden, eine gesteigerte, eine verminderte oder eine normale Wirkung der Antibiotica auftritt, ist auf Synergismus, Antagonismus oder bloße additive Wirkung zu schließen. Eine Erweiterung dieser Methode geben Chabbert u. a. (1960) an. Sie legen auf den Agar antibioticahaltige Streifen auf und entfernen diese wieder nach Beendigung der Diffusion. Nach Auflegen einer Cellophanmembran wird diese beimpft und kann nach Bebrüten abgehoben und gesondert untersucht werden, auch durch Auflegen auf eine antibioticafreie Agarplatte. Auf diese Weise kann bactericide und bacteriostatische Wirkung unterschieden werden.

Gelingt es auf diese Weise nicht, Gemische von Antibiotica zu analysieren, z. B. solche, die Kreuzresistenz hervorrufen, so müssen andere Methoden zur Trennung der Komponenten angewendet werden. Eine der üblichen Methoden hierfür ist die CHROMATOGRAPHIE. Mit ihrer Hilfe lassen sich die einzelnen Antibiotica bei Wahl eines geeigneten Lösungsmittelgemisches trennen (Sokolski u. a. 1954, Stephens u. a. 1955, Fischer u. a. 1961) und störende Begleitstoffe absondern (Hartwig u. a. 1956). Aus den Rf-Werten ist auch die Identifikation möglich (Stephens u. a. 1955). Bes. gelingt die sonst schwierige Trennung nahe verwandter Antibiotica, z. B. der Tetracycline (Hickey u. a. 1954, Bird u. a. 1954, Fischbach u. a. 1955, Seelzer u. a. 1957, Kelly u. a. 1960). Zur Analyse wird hauptsächlich die Papierchromatographie angewendet, gelegentlich auch die Chromatographie auf dünnen Kieselgelschichten (Fischer u. a. 1961, Stahl 1959), zu präparativen Zwecken die Säulenchromatographie (Roth 1959) oder die Gegenstromverteilung (Hickey u. a. 1954, Mistretta 1958). Die Chromatogramme werden mikrobiol. entwickelt durch Auflegen der Papierstreifen auf große Agarplatten, die den Testkeim enthalten. Diese Platten sind qualitativ meist leicht, quantitativ jedoch schwierig auszuwerten, da die Hemmhöfe häufig unregelmäßig geformt sind. Die Auswertung kann auch physikalisch (Seelzer u. a. 1957) oder chemisch (Fischbach u. a. 1955, Fischer u. a. 1961) erfolgen. Man hat sich weiterhin bemüht, die Schnelligkeit, die Empfindlichkeit und die Genauigkeit der Tests, bes. der Diffusionstests, zu steigern. Oft stehen

diese Forderungen im Gegensatz zueinander. So setzt Lagodsky (1957, dem Nährboden unterschwellige Mengen des zu testenden Antibioticums zu) Dadurch können noch sehr geringe, sonst nicht mehr erfaßbare Konzentrationen des Antibioticums, wenn auch nur ungenau, nachgewiesen werden. Eine Beschleunigung und eine Erhöhung der Genauigkeit kann der Zusatz eines Indikators bringen. Methylenblau, Triphenyltetrazoliumchlorid (Neal u. a. 1955, Gillissen u. a. 1957, Jeney u. a. 1958, Ryan u. a. 1959, Igarashi u. a. 1961), Wasserblau (von Vietinghoff-Scheel u. a. 1951 a, b) Lackmus (Diernhofer u. a. 1955), Resazurin (Pital u. a. 1956, Shahani u. a. 1958), Phenolrot (Jermolewa u. a. 1952, Hitzenberger 1961, Schmidt u. a. 1961), 2,6-Dichlorphenolindophenol (Lorian 1957) u. a. Farbstoffe werden dem Nährboden vor oder nach dem Bebrüten zugesetzt. Deren Verfärbung zeigt Bakterienwachstum oft früher und genauer an als die Trübung durch die Bakterien. Da es meistens pH- oder rH-Indikatoren sind, kann ein in dieser Hinsicht extremer anfänglicher Zustand des Nährbodens eine Verzögerung oder Verschiebung des Farbumschlags mit sich bringen und zu Fehlern führen (Royl 1952).

Bei festen Nährböden wird der Indikator auch aufgesprüht oder als getränkter Filterpapierstreifen aufgelegt. Auch für Untersuchungen der Antibiotica in Milch ist der Zusatz von Triphenyltetrazoliumchlorid vorgeschlagen worden (Kennedy u. a. 1960). Zum Nachweis der Antibiotica in Milch schlägt Shahani (1961) den Zusatz von indifferenten Farbstoffen zu den verabreichten Antibiotica vor, gibt jedoch selbst kritisch die Grenze der Methode an.

Auch Blut kann als Indikator dienen. Die Verfärbung des hellroten Oxyhämoglobins zu dem violetten Hb durch wachsende Bakterien benutzten Roth (1960) und Fust u. a. (1961) zu Antibiotica- und Resistenzbestimmungen. Auch die Hämolyse der roten Blutkörperchen kann bei Benutzung eines hämolytischen Testkeimes, z. B. *Streptococcus* Aronson benutzt werden. Ihr Auftreten oder Ausbleiben wird ausgewertet (Henneberg 1949). Jedoch ist diese Art des Testes heute nicht mehr sehr gebräuchlich.

Bei der Bestimmung der Antibiotica in Milch läßt sich bei Verwendung antibioticaempfindlicher Säurebildner die Menge der entstandenen Säure als Maß für den Antibiotica-gehalt nehmen (Berridge 1956, Schmidt u. a. 1961). Mattick u. a. (1955) haben vorgeschlagen, die colorimetrisch erfaßbare Umwandlung von Nitrat zu Nitrit durch penicillinempfindliche Micrococci zur Bestimmung von Penicillin zu benutzen. Die CO₂-Bildung einer *Saccharomyces*-Kultur messen Gerke u. a. (1960) zur Bestimmung von Fungiciden in einer sehr einfachen Apparatur (Injektionsspritze).

Die Beschleunigung der Tests läßt sich weiterhin durch Zusatz wachstumsfördernder Substanzen zum Nährboden erreichen. Durch Zusatz von Folsäure oder Indolylessigsäure wird die Wachstumszeit mancher Testkeime verkürzt und damit die Testzeit herabgesetzt (Nyiri 1958, Laszlo 1958). Die Benutzung schnell wachsender, thermophiler Keime wie *Bacillus cereus* zur Penicillinbestimmung und *Bacillus stearothermophilus* zur Bestimmung von Penicillin und Oxytetracyclin (Igarashi u. a. 1961) bringt ebenfalls Beschleunigung, hat sich aber in größerem Umfang nicht durchsetzen können.

Bei der Durchführung der biol. Tests verdient der Einfluß der SERA auf die Antibiotica bes. Beachtung. Sera können Antibiotica — meistens reversibel — binden, wobei der gebundene Teil biol. unwirksam ist. Die Bindung erfolgt an die Proteinfractionen und ist für jedes Antibioticum und für jede Art von Serum unterschiedlich (Chow u. a. 1945, Lund 1956, Kraushaar 1959). So fanden wir andere Bindungen des Penicillins durch Pferde- und Kaninchenserum und dementspr. Beeinflussung des Testes als sie beispielsweise Smith u. a. (1957) durch menschliches Blutplasma gefunden haben. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, für Tests in Blut und Serum vergleich-

bare Versuchsbedingungen festzulegen. Bes. ist darauf zu achten, daß jede Verdünnungsstufe die gleiche Konzentration des Serums oder einer äquivalent wirkenden Substanz enthält. Daher schlagen Bunn u. a. (1961) als Verdünnungsflüssigkeit eine 1%ige oder 1,75%ige Lösung von Rinderalbumin vor, die in bezug auf den Test dem Serum äquivalente Eigenschaften haben soll. I. allg. leisten jedoch auch Rinder- und Pferdeserum gute Dienste. Die gleichen Schwierigkeiten treten auf, wenn man die in der Bakteriologie üblichen Nährböden mit Blut- oder Serumzusatz zum Testen von Antibiotica verwendet (Lightbown u. a. 1957, Ševčík 1958). Daher schlägt Danila (1957) für Tests Nährböden ohne Serumzusatz vor. Berti u. a. (1957) berichten über die Bindung des Chlortetracyclins an das Serum. Die in der Literatur als „Blutspiegel“ angegebenen Werte beziehen sich i. allg. auf den für den Kliniker interessanten freien Anteil des Antibiotiums im Blut.

Da die Bindung an die Proteinfractionen erfolgt, sind die Antibioticateste in anderen proteinhaltigen Körperflüssigkeiten wie Milch, Frauenmilch (Schmidt u. a. 1960) und in eiweißhaltigen Futtermitteln (Tanguay u. a. 1959) sowohl in bezug auf die Verdünnungsmittel wie auch auf die Ergebnisse mit der nötigen Kritik durchzuführen.

Außer den Sera können auch METALLE, AMINOSÄUREN u. a. Substanzen die Tests erheblich beeinflussen. Ca^{++} und Mg^{++} senken die Wirkung der Tetracycline (Harcourt u. a. 1956), des Streptomycins u. a. Antibiotica durch Chelatbildung (Fusillo u. a. 1957, Tanguay u. a. 1959, Kiser 1961) oder durch kompetitive Besetzung der Oberfläche des als Testkeim dienenden Bacteriums (Price u. a. 1957 a, b).

Derartige Beeinflussungen sind vom Ionencharakter des Antibiotiums abhängig, der sich durch Zusätze von Kationen- bzw. Anionenaustauschern zum Nährboden nachweisen läßt (Ševčík u. a. 1957, Ševčík 1959). Bei der Testung kalkhaltiger Futtermittel mit Antibioticazusatz ist diese Einwirkung — bes. auf die Tetracycline — zu berücksichtigen.

Von den Aminosäuren zeigt Cystein einen wirkungshemmenden Einfluß auf Streptomycin (Weinberg 1960). Durch Cystein wird ebenfalls die Fähigkeit des Kobalts, die Penicillinwirkung zu steigern, gemindert. Unter Berücksichtigung dieser Fehlermöglichkeiten beschreibt Wright (1960) Bestimmungsmethoden für das nematocide Hygromycin und für Oleandomycin und kündigt weitere Methoden für zahlreiche andere Antibiotica und Antibiotica-gemische in Futtermitteln an.

Bei der zunehmenden Bedeutung und Verbreitung der Antibiotica als Futtermittel muß mit dem Auftreten resistenter Bakterienstämme gerechnet werden. Bes. Beachtung verdienen resistent werdende Krankheitserreger, die auch bei der Bekämpfung der tierischen Infektionskrankheiten eine bedeutende Rolle spielen. Daher soll kurz über die Probleme der RESISTENZBESTIMMUNG berichtet werden.

Die Resistenzgrenze, d. h. die geringste noch hemmende Konzentration eines Antibiotiums, ist von Keim zu Keim und von Antibioticum zu Antibioticum verschieden und kann mit den oben für die Wertbestimmung der Antibiotica angeführten Methoden bestimmt werden. Der Reihenverdünnungstest, der mit flüssigen Nährböden sehr zeitraubend ist, wird bei wissenschaftlichen Arbeiten angewendet, da mit ihm die sicherste und genaueste Bestimmung möglich ist, routinemäßig wird er auch auf festen Nährböden durchgeführt. Die Technik im Laboratorium ist in letzter Zeit erheblich verbessert worden, bes. in Hinsicht auf schnelle Ablesbarkeit (Ryan u. a. 1959, Włodawez 1959, Foltz u. a. 1960, Koopmans 1960, Brown u. a. 1961, Kretschmar u. a. 1961, Wlassowa 1961).

Gebräuchlicher, bes. im klinischen Bereich, ist der Diffusionstest, der nach Hermann (1954) mit Substanzen, meist aber als Blättchentest durchgeführt wird. Man verwendet Blättchen mit nur einer (Bauer u. a. 1960) oder mehre-

ren abgestuften Antibioticamengen (Balows u. a. 1955, Morenz 1958). Bei aller Kritik dieser Testmethode (Borchardt u. a. 1960, Branch u. a. 1960, Naumann 1962) ist man heute der Ansicht, daß dieser Test, richtig angewendet, für Routineuntersuchungen der zweckmäßigste ist (Welch 1956, Andrischock u. a. 1959, Borchardt u. a. 1959, Jesselewitsch u. a. 1959, Anderson u. a. 1960, Erichsson u. a. 1960, Kirshbaum u. a. 1960, Murayama 1960, Steers u. a. 1960, Djalow 1961).

- 1) Anderson, Th. G. und Troyanosky, A. *Antibiotic Ann.* 1959/60 S. 587-595. — 2) Andrischock, H. O. und Boese, W. *Arch. Hyg. Bakteriologie* 143 (1959) S. 287-304. — 3) Averjanova, L. L. (Awerjanowa, L. L.) *Antibiotiki, Moskva* 2 (1957) Nr. 3. S. 53-55, zit. n. *Chem. Zbl.* (1955) S. 6319. — 4) Balan, J. und Betina, V. *Fourth International Congress of Biochemistry*. Vol. V. London, New York, Paris, Los Angeles 1959a S. 203-205. — 5) Balan, J. und Betina, V. *Symposium on Antibiotics, Abstr. of Communications Prague 1959b*. — 6) Balan, J. und Betina, V. *Biologia (Bratislava)* 14 (1959c) S. 513-522. — 7) Balows, A. und Barker, A. *Antibiotics and Chemotherapy* 5 (1955) S. 551-554. — 8) Bauer, A. W., Roberts jun., C. E. und Kirby, W. M. M. *Antibiotics Ann.* 1959/60 S. 574-580. — 9) Berridge, N. J. *J. Dairy Res.* 23 (1956) S. 336-341. — 10) Berti, T. und Cima, L. *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.* 33 (1957) S. 1481-1482, zit. n. *Chem. Zbl.* (1959) S. 15759. — 11) Betina, V. *Naturwissenschaften* 45 (1958) S. 342. — 12) Bird, H. L. und Pugh, C. H. *Antibiotics and Chemotherapy* 4 (1954) S. 750-752. — 13) Borchardt, K. A. und Andrews, D. H. *Antibiotics and Chemotherapy* 9 (1959) S. 596-599. — 14) Bowman, F. W. *Antibiotics and Chemotherapy* 7 (1957) S. 639-640. — 15) Bradler, G. *Mber. dtsh. Akad. Wiss. Berlin* 1 (1959) S. 7-10. — 16) Bradler, G. *Personl. Mitt.* 1961. — 17) Branch, A., Starkley, D. H. und Power, E. E. *Antibiotics Ann.* 1959/60 S. 581-586. — 18) Brock, Th. D. *Antibiotics and Chemotherapy* 7 (1957) S. 243-246. — 19) Brown, J. R., Beck, R. W., Woodward, J. M. und Porter, R. P. *Amer. J. clin. Pathol.* 35 (1961) S. 10, zit. n. *Bull. of Hyg.* 36 (1961) S. 582. — 20) Brunner, R. und Margeiter, H. *Osterr. Chemiker-Ztg.* 56 (1955) S. 36-38. — 21) Bunn, P. und Knight, R. *Antibiotics and Chemotherapy* 11 (1961) S. 190-195. — 22) Burian, V., Vysoka-Burianova, B. und Padour, Fr. *CS. EMT, IX*, 2 (1960) S. 122, zit. n. *Zbl. f. Bakt. I. Ref.* 150 (1961) S. 439. — 23) Bujanovskaja, I. S., Sneerson, A. N. und Andreeva, N. A. (Bujanowskaja, I. S., Schneerson, A. N. und Andreeva, N. A.) *Antibiotiki, Moskva* 6 (1961) Nr. 3. S. 255-258. — 24) Bykova, M. A. und Awerjanowa, L. L. (Bykova, M. A. und Awerjanowa, L. L.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959) Nr. 6. S. 96-100. — 25) Carlson, J. R. und Snyder, J. W. *Antibiotics and Chemotherapy* 9 (1959) S. 139-144. — 26) Cerny, J. und Morris, R. L. *J. Milk Food Technol.* 18 (1955) S. 281-283. — 27) Chabbert, Y. A. und Patte, J. C. *Appl. Microbiol.* 8 (1960) S. 193-199. — 28) Chow, B. F. und McKee, C. M. *Science (Washington)* 101 (1945) S. 67-68. — 29) Danila, P. *Žurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii, Moskva* 28 (1957) Nr. 1. S. 107-110, zit. n. *Chem. Zbl.* (1958) S. 1105. — 30) Davis, W. W. und Parke, T. V. *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* 39 (1950) S. 327-333. — 31) Diernhofer, K. und Scharfen, E. *Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig.* 163 (1955) S. 342-345. — 32) Dmitrieva, V. S. und Semenov, S. M. (Dmitrijeva, W. S. und Semjonow, S. M.) *Antibiotiki, Moskva* 5 (1960) Nr. 4. S. 46-50. — 33) Družinina, E. N. (Drushinina, Je. N.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959) Nr. 3. S. 109-112. — 34) Djalov, F. G. (Djalow, F. G.) *Antibiotiki, Moskva* 6 (1961) Nr. 4. S. 342-346. — 35) Edwards, S. J. und Haskins, M. D. *J. Sci. Food Agric.* 6 (1955) S. 218-223, zit. n. *Chem. Zbl.* (1958) S. 11102. — 36) Ehrenkranz, N. J. und Rommel, F. A. *Antibiotics and Chemotherapy* 9 (1959) S. 459-463. — 37) Ericsson, H., Tunevall, G. und Wickman, K. *Scand. J. clin. Lab. Investig.* 12 (1960) S. 414-422. — 38) Ermoleva, Z. V. und Vedmina, E. A. (Jermolewa, S. W. und Wedmina, Je. A.) *Trudy Akademii nauk SSSR Antibiotiki i ich primenienie* 22 (1952) Nr. 1. S. 131-133, zit. n. *Chem. Abstr.* 50/5 (1956) S. 3550. — 39) Ešelevič, A. Ja. und Krasnosčekova, E. E. (Jesselewitsch, A. Ja. und Krasnosčekowa, Je. E.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959) Nr. 6. S. 100-104. — 40) Fischbach, H. und Levine, J. *Antibiotics and Chemotherapy* 5 (1955) S. 640-642. — 41) Fischer, R. und Lautner, H. *Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 294 (1961) S. 1-7. — 42) Friedman, S. und Kirshbaum, A. *Antibiotics and Chemotherapy* 4 (1954) S. 1216-1221. — 43) Foltz, E. L., Steers, E., Graves, B. S. und Suriano, H. J. *Antibiotics Ann.* 1959/60 S. 596-603. — 44) Fust, B. und Böhm, E. *Pathol. Microbiol. (Basel)* 24 (1961) S. 378-383. — 45) Fusillo, M. H., Weiss, D. L. und Posschl, C. D. *Amer. J. clin. Pathol.* 27 (1957) S. 534-538, zit. n. *Kongressbl. ges. Inn. Med.* 186 (1958) S. 10. — 46) Gavin, J. J. *Appl. Microbiol.* 4 (1956) S. 323-331. — 47) Gavin, J. J. *Appl. Microbiol.* 5 (1957a, b) S. 25-33, 235-243. — 48) Gavin, J. J. *Appl. Microbiol.* 6 (1958) S. 80-85. — 49) Gerke, J. R., Gentile, J., Stander, H. und Pagano, J. F. *Antibiotics Ann.* 1959/60 S. 563-568. — 50) Gillissen, G. und Becher, E. *Arch. Hyg. Bakteriologie* 141 (1957) S. 403-420. — 51) Grove, D. C. und Randall, W. A. *Assay methods of antibiotics*. New York: Med. Encyclopedia Inc. 1955. — 52) Harcourt, R. M. und Hamburger, M. J. *Lab. clin. Med.* 48 (1956) S. 815. — 53) Hartwig, H. und Seitz, U. *Z. Tuberkulose* 109 (1956) S. 142-150. — 54) Henneberg, G. *Einführung in die bakteriologische Untersuchungstechnik zur Penicillintherapie*. Jena: Gustav Fischer Verlag. 1949. — 55) Hermann, W. *Med. Mschr. R.* (1954) S. 192. — 56) Hess, J. *Preslia (Prag)* 27 (1955) S. 49. — 57) Hickey, R. J. und Phillips, W. F. *Analyt. Chem.* 26 (1954) S. 1540-1542. — 58) Hitzengerber, G. *Med. Klin.* 56 (1961) S. 964-967. — 59) Holdowski, S. *Antibiotics and Chemotherapy* 7 (1957) S. 49-54. — 60) Igarashi, R. T., Baughman, R. W., Nelson,

- F. E. und Hartman, P. A. J. Milk Food Technol. 24 (1961) S. 143-146. — 61) Isenberg, H. D. und Shapiro, S. Antibiotics and Chemotherapy 8 (1958) S. 466-469. — 67) Ivanickaja, L. P. (Iwanickaja, L. P.) Antibiotiki, Moskva 6 (1961) Nr. 3. S. 252-255. — 63) Iyengar, M. R. S. Nature [London] 183 (1959) S. 684. — 64) Jeney, E. und Horváth, E. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 5 (1958) S. 205-208. — 65) Julius, H. W. und Gaikhorst, G. Antibiotics and Chemotherapy 8 (1958) S. 287-296. — 66) Kelch, F. und Coretti, K. Fleischwirtschaft 11 (1959) S. 358-359. zit. n. Chem. Zbl. 1959, 16504. — 67) Kelly, R. G. und Buyske, D. A. Antibiotics and Chemotherapy 10 (1960) S. 604-607. — 68) Kennedy, H. E. und Harper, W. J. J. Dairy Sci. 43 (1960) S. 999-1000. — 69) Kirshbaum, A. und Arret, B. Antibiotics and Chemotherapy 9 (1959) S. 613-617. — 70) Kirshbaum, A., Kramer, J. und Arret, B. Antibiotics and Chemotherapy 10 (1960) S. 249-258. — 71) Kiser, J. S. Antibiotics and Chemotherapy 11 (1961) S. 261-266. — 72) Klein, P. Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Berlin; Göttingen; Heidelberg: Springer-Verlag. 1957. — 73) Knapp, W. und Jacherts, D. Zbl. Bakteri. Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt. Orig. 162 (1955) S. 474-478. — 74) Köhler, H. Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung. Akademie-Verlag, Wiss. Abh. (1956) Nr. 13. — 75) Koopmans, R. K. Antibiotics and Chemotherapy 10 (1960) S. 612-622. — 76) Kowalenkova, V. K. (Kowalenkova, W. K.) Antibiotiki. Sb. perev. obz. i ref. in. period. lit., Moskva 11 (1958) Nr. 1. S. 3-11. — 77) Kraushaar, A. Arzneimittel-Forsch. 9 (1959) S. 736-740. — 78) Kretzschmar, W. und Placht, G. Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete 16 (1961) S. 608-614. — 79) Kuhfuß, K. H. Phytopathol. Z. 28 (1957) S. 281-284. — 80) Lagodsky, H. C. R. Soc. Biol. [Paris] 161 (1957) S. 1736. — 81) Lagodsky, H. C. R. Soc. Biol. [Paris] 154 (1960) S. 1435. — 82) László, N. Nature [London] 181 (1958) S. 648-649. — 83) Lees, K. A. und Tootill, J. P. R. Analyst 80 (1955) S. 95-110.; 110-123.; 531-535. — 84) Levin, J. D., Stander, H. und Pagano, J. F. Antibiotics and Chemotherapy 10 (1960) S. 422-429. — 85) Lightbown, I. W. und Sulitzanu, D. Bull. Wld. Health Organization 17 (1957) S. 553-567. — 86) Linton, A. H. J. Bacteriol. 76 (1958) S. 94-103. — 87) Lorian, V. (Lorian, W.) Antibiotiki, Moskva 2 (1957) Nr. 3. S. 49-53, zit. n. Chem. Zbl. (1958) S. 6285. — 88) Lund, E. Acta pathol. microbiol. scand. 39 (1956) S. 421-429. — 89) Mattick, L. R., Anderson, E. O. und Wildasin, H. L. J. Dairy Sci. 38 (1955) S. 829-834. — 90) Mistretta, A. G. Antibiotics and Chemotherapy 8 (1958) S. 392-393. — 91) Morenz, I. Z. ges. Hyg. Grenzgebiete (1958) 4. S. 21. — 92) Murayama, O. J. Antibiotics (Tokyo) 12 (1960) S. 263-284. — 93) Naumann, P. Zbl. Bakteri., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg., I. Abt., Orig. 184 (1962) S. 392-399. — 94) Neal, C. E. und Calbert, H. E. J. Dairy Sci. 38 (1955) S. 629. — 95) Nunzio, J. C. de, Bowman, F. W. und Kirshbaum, A. Antibiotics and Chemotherapy 4 (1954) S. 300-303. — 96) Nyiri, L. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 5 (1958) S. 147-150. — 97) Oberzill, W. Sci. pharm. (Wien) 28 (1960) S. 102-123. — 98) Oberzill, W. Zbl. Bakteri., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg., I. Abt. Orig., 181 (1961) S. 532-538. — 99) Otte, H. J. und Köhler, W. Die Praxis der Resistenz- und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag. 1958. — 100) Pital, A., Disque, D. T. und Leise, J. M. Antibiotics and Chemotherapy 6 (1956) S. 351-359. — 101) Price, K. E., Zolli jun., Z., Atkinson, J. C. und Luther, H. G. Antibiotics and Chemotherapy 7 (1957a, b) S. 672-688.; 689-701. — 102) Pfidal, L., Vavrečka, J. und Hlava, H. Acta Univ. Palackianae Olomucensis 14 (1958) S. 215. — 103) Princivalle, M. und Lorch, L. von. Rend. Ist. super. Sanità 20 (1957) S. 32-38. — 104) Ritzlerfeld, W. Arzneimittel-Forsch. 8 (1958) S. 397-400. — 105) Roth, L. Microchim. Acta. [Wien] 1959 S. 582-585. — 106) Roth, W. Pathol. Microbiol. [Basel] 23 (1960) S. 555-560. — 107) Royle, A. Z. Haut- u. Geschlechtskrankh. 13 (1952) S. 23-24. — 108) Ryan, W. L., Igel, H. J. und Williams, P. T. J. Amer. med. Assoc. 170 (1960) S. 1528-1530. — 109) Ryan, W. L., Williams, P. T. und Igel, H. J. Antibiotics and Chemotherapy 11 (1960) S. 307-311. — 110) Schmidt, B. und Modde, H. Arzneimittel-Forsch. 11 (1961) S. 806-807. — 111) Schmidt, B., Modde, H. und Dinter, W. Arch. Hyg. Bakteri. 144 (1960) S. 433-441. — 112) Seelzer, G. B. und Wright, W. W. Antibiotics and Chemotherapy 7 (1957) S. 292-296. — 113) Sella, F. Boll. Ist. sieroterap. milanese 33 (1954) S. 421-428. — 114) Ševčík, V. Úvod do biochemické analýzy mikroorganismu. Praha: 1954. — 115) Ševčík, V. Mikrobiologija Moskva 28 (1959) Nr. 1. 105-111. — 116) Ševčík, V. Naturwissenschaften 45 (1958) S. 132. — 117) Ševčík, V. und Podojil, M. Naturwissenschaften 44 (1957) S. 93. — 118) Shahani, K. M. J. Milk Food Technol. 24 (1961) S. 138-142. — 119) Shahani, K. M., und Badami M. C. J. Dairy Sci. 41 (1958) S. 1510-1517. — 120) Simon, A. Antibiotiki, Moskva 4 (1959) Nr. 1. S. 108-112. — 121) Smith, C. I., Levin, J. D. und Embody, D. R. Antibiotics Annu. 1956/57 S. 306-310. — 122) Snell, N. S. und Lewis, J. C. Antibiotics and Chemotherapy 9 (1959) S. 609-612. — 123) Sokolski, W. T. und Burch, M. R. Antibiotics and Chemotherapy 10 (1960) S. 157-162. — 124) Sokolski, W. T., Burch, M. R. und Whitfield, G. B. Antibiotics and Chemotherapy 11 (1961) S. 103-106. — 125) Sokolski, W. T., Ullmann, S., Koffler, H. und Tetrault, P. A. Antibiotics and Chemotherapy 4 (1954) S. 1057-1060. — 126) Sous, H., Löschner, H., Lagler, F. und Mückter, H. Arzneimittel-Forsch. 11 (1961) S. 395-400. — 127) Stahl, E. Chemiker Ztg. 82 (1959) S. 323-329. — 128) Stapley, E. O. Appl. Microbiol. 6 (1958) S. 392-398. — 129) Steers, E., Foltz, E. L., Graves, B. S. und Suriano, H. J. Antibiotics Annu. 1959/60 S. 604-613. — 130) Stephens, J. und Grainger, A. J. Pharmacy Pharmacol. 7 (1955) S. 702-705. — 131) Tanguay, A. E., Gobert, A. B. und Blanchard, M. H. Antibiotics and Chemotherapy 9 (1959) S. 167-175. — 132) Tebjakina, A. E. und Čajkovskaja, S. M. (Tebjakina, A. Je. und Tschajkovskaja, S. M.) Antibiotiki, Moskva 4 (1959a) Nr. 2. S. 18-21. — 133) Tebjakina, A. E., Truščinina, E. N. und Čajkovskaja, S. M. (Tebjakina, A. Je., Drushinina, Je. N. und Tschajkovskaja, S. M.) Antibiotiki, Moskva 4 (1959b) Nr. 1. S. 92-96. — 134) Thomsen, V. F. Acta pathol. microbiol.

- scand. 54 (1962) S. 107-120. — 135) Topley, E., Lowbury, E. J. L. und Hurst, L. *Lancet* 260 (1951) S. 87. — 136) Vakulenko, N. A. (Wakulenko, N. A.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959a) Nr. 5. S. 79-83. — 137) Vakulenko, N. A. (Wakulenko, N. A.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959b) Nr. 6. S. 104-107. — 138) Vietinghoff-Scheel, O. v. und Hagendorff, E. *Arch. Hyg. Bakteriol.* 135 (1951a) S. 311-313. — 139) Vietinghoff-Scheel, O. v. und Hagendorff, E. *Klin. Wschr.* 29 (1951b) S. 703-704. — 140) Vlasova, I. V. (Wlassowa, I. W.) *Antibiotiki, Moskva* 6 (1961) Nr. 6. S. 513-516. — 141) Vlodavec, V. V. (Wlodawez, W. W.) *Antibiotiki, Moskva* 4 (1959) Nr. 5. S. 76-79. — 142) Walter, A. und Marget, W. Z. *Hyg. Infektionskrankh.* 145 (1958) S. 320-330. — 143) Wasserfall, F. *Kieler milchwirtsch. Forsch.-Ber.* 11 (1959) S. 341-356. — 144) Weber, E. *Grundriß der biologischen Statistik* 4. Aufl. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag. 1961. — 145) Weinberg, E. D. *Antibiotics Annu.* 1959/60 S. 569-573. — 146) Welch, H. *Antibiotics and Chemotherapy* 6 (1956) S. 321-323. — 147) Welsch, M. *Die bakteriologischen Untersuchungen und die Resistenzprüfungen gegen Antibiotika.* Stuttgart: Thieme-Verlag. 1960. — 148) Wintermer, D. M., Eisenberg, W. H. und Kirshbaum, A. *Antibiotics and Chemotherapy* 7 (1957) S. 189-192. — 149) Wright, W. W. *J. Assoc. off. agric. Chemists* 43 (1960) S. 209-210. zit. n. *Fres.Z.f. Anal. Chem.* (1961) 178 S. 400. — 150) *Brit. Pharmacopoeia* 1953. S. 796-797. — 151) *Deutsches Arzneibuch*, 6. Ausg., Nachtr. 1959. Berlin (DDR) 1959. S. 217. 219. — 152) *Pharmakopoe der USA (USP XIV)* 1950. — 153) *Pharmakopoe der UdSSR*, Nachtr. 1952. — 154) *Pharmakopoe der USA (USP XV)* 1955.