

A Plate Test with Oxacillin and Penicillinase

Oxacillin, or 5-methyl-3 phenyl-4 isoxazolil penicillin, belongs to the group of penicillins resistant to penicillinase.

Resistance to penicillin G as shown clinically by staphylococci is due to the penicillinase produced in large quantities by these resistant micro-organisms¹.

To check the effect of penicillinase on penicillin G as compared with Oxacillin², the following experiment was carried out.

Material and Method. Place 20 ml 'Biosat-Agar' (BBL) in a 10 cm Petri dish. Allow to solidify. With a sterile scalpel cut the agar along a diameter and slide off one half.

Add 1 ml of penicillinase, 50,000 u/ml (BBL) to 10 ml of 'Biosat-Agar' dissolved and cooled to 50°C; shake well and place in the empty part of the dish, filling to the level of the other half. The result is a dish of agar, one half with penicillinase and one half without (the penicillinase diffuses very little into the agar).

Seed whole surface (streaking technique) with a staphylococcus sensitive to penicillin G. Place a disc with sodium penicillin G (2 µg) and a disc with Oxacillin (2 µg) at two points on the dividing line between the two semicircles of the agar surface (with and without penicillinase). Place in incubator at 37°C and read after 20 h.

Results. As may be seen from the Figure, the disc with Oxacillin (P12) produces a perfectly circular inhibition zone. The disc with penicillin G (P) produces a semicircular inhibition zone only on the part of the agar without penicillinase; on the part with penicillinase the growth around the disc is equal to the rest of the surface of the dish.

Discussion. The plate test with two zones of agar, with and without penicillinase, demonstrates the resistance of Oxacillin to penicillinase. The inhibition zone around the P12 disc forms a perfect circle, showing that a concentration of 5000 U penicillinase per ml of agar does not modify the activity of Oxacillin discs. The inhibition zone around the disc with penicillin G, showing a semicircle situated on the side of the agar without penicillinase, demonstrates the effectiveness of penicillin G against the staphylococcus tests; but the growth around the disc of penicillin on the part where penicillinase was added to the agar shows total destruction of the penicillin G.

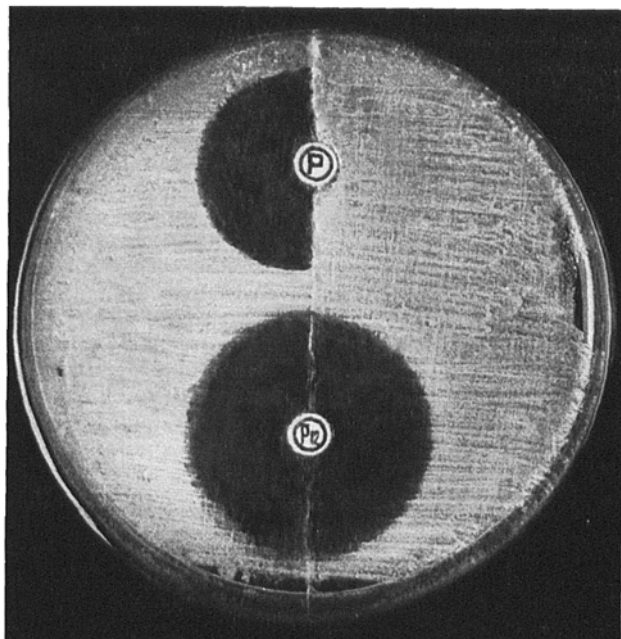


Plate test with two zones of agar, right with, and left without, penicillinase, showing inactivation of the penicillin (disc P, above) and the circular zone produced by Oxacillin (disc P12, below).

Résumé. La résistance de la penicilline P-12 à la penicillinase a été démontrée grâce à une technique sur plaque à deux zones d'agar, avec et sans penicillinase.

V. LORIAN

Laboratório Central de Tuberculose, Cajú, Rio de Janeiro (Brazil), July 30, 1963.

¹ M. BARBER, *Drug Resistance of Staphylococci with Special Reference to Penicillinase Production*, Ciba Foundation Symposium on Drug Resistance (London 1957), p. 262.

² The Oxacillin was kindly supplied by Laborterapica Bristol; the trade mark for Oxacillin is Prostaphlin.

Immunoélectrophorèse par application directe de l'antigène à la surface du gel

Depuis la description par GRABAR et WILLIAMS de l'immunoélectrophorèse¹, d'intéressants perfectionnements et diverses variantes de cette méthode ont été proposés²⁻⁸.

L'objet de cette note est de montrer certains avantages d'une technique d'application directe, à la surface du gel, de l'antigène (ou éventuellement de l'anticorps) dont on veut obtenir la résolution électrophorétique.

Le réservoir de départ étant supprimé, la couche de gélose ne présente aucune solution de continuité; ce qui favorise, lors de la migration, une répartition plus uniforme du champ électrique et se prête ensuite particulièrement bien au développement sélectif des arcs de précipitation.

Technique. Le gel est formé de 0,8 g% de gélose, soigneusement purifiée et d'un tampon véronal de pH 8,6 (soit tampon Michaelis dilué au demi, soit tampon Dur-

rim additionné de lactate de calcium⁹). Le gel est coulé sur des lames de verre 24 h avant l'électrophorèse, de façon à obtenir une très légère déshydratation destinée à faciliter l'absorption de l'échantillon. Les lames de verre utilisées

¹ P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* 10, 193 (1953).

² P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* 17, 67 (1955).

³ J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955).

⁴ J. URIEL et J. J. SCHEIDEGGER, *Bull. Soc. Chim. biol.* 37, 165 (1955).

⁵ CH. WUNDERLY, *Exper.* 13, 421 (1957).

⁶ R. J. WIEME, *Studies on Agar Gel Electrophoresis* (Arscia, Bruxelles 1959).

⁷ J. URIEL, in *Analyse Immunoélectrophorétique* (Ed. P. GRABAR et P. BURTIN; Masson, Paris 1960), p. 33.

⁸ J. HEREMANS, *Les globulines sériques du système gamma* (Arscia et Masson, Bruxelles et Paris 1960).

⁹ W. B. YEOMAN, *Clin. chim. Acta* 4, 523 (1959).

sont des plaques de verre de 18×3 cm, ou des lames porte-objet; les quantités de gélose coulées sur chaque lame sont respectivement de 9 ml et 3,5 ml. Le sérum ou tout autre échantillon est déposé directement sur la surface de la gélose à l'aide d'une micropipette graduée, à extrémité coudée et à pointe fine et rodée (Figure 1). La longueur du trait de dépôt est de 5 à 8 mm. Il est possible de répartir de façon homogène 1 à 20 μ l de l'échantillon, en ayant soin de laisser absorber progressivement le liquide. Dans le cas du sérum humain utilisé comme antigène, les quantités déposées sont généralement de 6 μ l pour les lames de 18×3 et de 3 μ l pour les lames porte-objet. La migration électrophorétique s'effectue dans une enceinte à atmosphère humide et réfrigérée, selon un dispositif analogue à ceux classiquement décrits. Après développement des arcs



Fig. 1

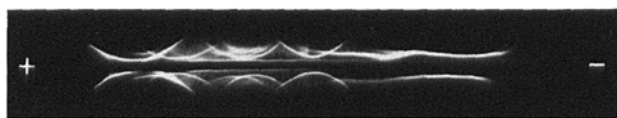


Fig. 2

de précipitation, les plaques de gel sont lavées, desséchées⁴, puis colorées selon la méthode d'URIEL⁷.

Résultats. La méthode d'application directe est utilisable pour l'étude immunoelectrophorétique de nombreuses variétés de protéines. Elle peut se prêter, par exemple, à la séparation des Immunglobulines (β 2A, β 2M et γ Globulines). La Figure 2 reproduit deux immunoelectrophorèses. [Plaques 18×3 , tampon Michaelis dilué, immunsérum équin antisérum humain normal N° 223 (Serpasteur), coloration par l'azocarmin.] – En bas: sérum provenant d'un sujet normal (ligne de la β 2A, bien distincte de celle des γ globulines). – En haut: sérum d'un malade présentant une macroglobulinémie (double courbure de la β 2M, ligne de la β 2A peu visible)¹⁰.

Summary. A method of immunoelectrophoresis by direct application of the antigen on the surface of the gel is described. By this mode of procedure, the layer of gel presents no break. Consequently the electrophoretic migration and immunodiffusion are improved.

PH. GOULLET

Laboratoire de la M.G.E.N., Service H. Kaufmann,
Institut prophylactique¹¹, Paris (France),
le 27 septembre 1963.

¹⁰ Nous remercions vivement Mesdames J. CHAPELLIER et C. GAILLARD de leur collaboration.

¹¹ 36, rue d'Assas.

STUDIORUM PROGRESSUS

Der Einfluss der experimentellen Leberschädigung auf Gesamtfett und ungesättigte Fettsäuren in Serum und Leber

Über die Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren bei der Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose ist in den letzten Jahren sehr viel veröffentlicht worden. Die Zahl der Arbeiten, in denen, sei es auf experimentellem, sei es auf klinischem Gebiet eine Herabsetzung des Blutcholesteringehaltes und der Neutralfette durch exogene Zufuhr von Fettsäuren mit zwei oder mehreren Doppelbindungen behauptet wurde, überwiegt bei weitem diejenige, in denen eine solche Wirkung bezweifelt oder gar bestritten wird. In dieser Situation scheint es besonders wichtig, auf die grossen Lücken hinzuweisen, die heute noch in unseren Kenntnissen über Stoffwechsel und Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen bestehen. Weder ist eindeutig festgelegt, wo der Ort der Sättigung bzw. Entsättigung der Fettsäuren im Organismus zu suchen ist – die Leber als das zentrale Stoffwechselorgan mit den meisten Fermenten gilt als wahrscheinlichster Sitz dieser biochemischen Prozesse – noch ist geklärt, welche Rolle der Grad der Entsättigung der Fettsäuren im Stoffwechsel spielt.

Es ist bekannt, dass die einfach ungesättigte Ölsäure vom Organismus synthetisiert werden kann und dass die zweifach ungesättigte Linolsäure, auch als essentielle Fettsäure bezeichnet, nicht im intermediären Stoffwechsel gebildet wird, sondern mit der Nahrung zugeführt werden muss. Auch ist für die vierfach ungesättigte

Arachidonsäure die endogene Bildungsmöglichkeit aus Linolsäure, nicht aber aus Ölsäure, erwiesen. Für die Linolsäure, auch eine sogenannte essentielle Fettsäure mit 3 Doppelbindungen, ist ungewiss, wie weit ihre Zufuhr lebensnotwendig bzw. wie weit sie den anderen ungesättigten Verbindungen gleichwertig ist. Das gleiche gilt für die hohen ungesättigten Säuren mit 5 und mehr Doppelbindungen.

Im folgenden soll über Experimente berichtet werden, in denen das Verhalten der zwei- bis vierfach ungesättigten Fettsäuren, quantitativ bezogen auf das Gesamtfett, nach experimenteller Leberschädigung untersucht worden ist. Dabei interessierte einerseits der Effekt der Leberschädigung selbst auf den Fettstoffwechsel, der durch Erfassung der Totalfette, des Cholesterins, und der Linol-, Linolen- und Arachidonsäure verfolgt wurde. Andererseits erwarteten wir, aus der parallelen Bestimmung dieser Stoffwechselgrössen im Serum und in der Leber Anhaltspunkte über die Herkunft der im Blut kreisenden Fettsubstanzen zu gewinnen. Auch schien es aufschlussreich, die Beziehungen zwischen Grad der Entsättigung der Fettsäuren und Schädigung ihres mutmasslichen Herkunftortes zu verschiedenen Zeitpunkten zu studieren. Schliesslich haben wir durch gleichsinnige Untersuchungen bei Tieren, die vor 2 Monaten einer akuten Leberschädigung ausgesetzt waren, die Spätfolgen dieser Vergiftung auf den Fettstoffwechsel geprüft.

Als Lebergift wurde von uns Tetrachlorkohlenstoff verwendet. Der Angriffspunkt dieser für experimentelle Leberschädigung oft benutzten Substanz, die je nach Dosierung von reversiblen Zellveränderungen bis zu ausgehenden Nekrosen führen kann, wurde früher in den Mito-