

Institut für Informatik  
SoSe 2010  
Exposé zur Studienarbeit

## Implementierung eines Tools zur statistischen Auswertung von Experimenten zur Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen

Betreuer: Prof. Dr. Ulf Leser, Silke Trißl, Dr. Bartetzko  
Autor: Alexander Hein

### Hintergrund

Die "Umwelttechnik Dr. Bartetzko GmbH" möchte in Zukunft 18 verschiedene Antibiotika auf deren Wirksamkeit untersuchen. Grundlage für die Wirksamkeitsbestimmung bei Antibiotika ist deren Eigenschaft, bestimmte Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder abzutöten (bakterizide Wirkung). Ein Vergleich der Wachstumshemmung Antibiotika-sensibler Mikroorganismen durch bestimmte Konzentrationen des zu prüfenden Antibiotikums mit der Wachstumshemmung, die durch Konzentrationen eines Standards hervorgerufen wird, liefert quantitative Aussagen über die Wirksamkeit des Prüfantibiotikums [1]. Das europäische Arzneibuch [2] (im Folgenden Ph. Eur.) schreibt zwei mikrobiologische Methoden für die Wirksamkeitsprüfung vor: die Diffusionsmethode und die turbidimetrische Methode. In der vom Unternehmen genutzten Diffusionsmethode wird ein geeignetes Nährmedium verflüssigt und mit einer bestimmten Menge eines gegen das Antibiotikum empfindlichen Mikroorganismus beimpft. Das beimpfte Nährmedium wird dann in eine Petrischale gegossen, so dass eine gleichmäßige dicke Schicht zwischen 2 und 5 mm erreicht wird. Nach völligem Erkalten und Verfestigen werden mit Hilfe eines Korkbohrers Löcher in das Medium gestanzt und gleichartige Verdünnungsstufen<sup>1</sup>, im

---

<sup>1</sup>Die Verdünnungsstufen sollten so gewählt werden, dass sie einer geometrischen Reihe folgen.

folgenden Dosen, von Prüf- und Referenzsubstanz in die Löcher pipettiert. Die Prüfsubstanz ist dabei das zu untersuchende, die Referenzsubstanz ein bekanntes Antibiotikum. Die Testplatten werden 18 Stunden bebrütet. Ist das Bakterium gegenüber dem Antibiotikum empfindlich, so wird das Bakterienwachstum gehemmt und es entstehen sichtbare Hemmhöfe, in denen kein Erregerwachstum stattfindet. Je höher die Konzentration des Antibiotikums, desto größer sollte der entsprechende Hemmhof sein. Quantifiziert wird die Wirksamkeit der Antibiotika anhand der Durchmesser der Hemmhöfe. Durch die erlangten Messwerte der Referenz- und Prüfsubstanz ergeben sich Dosis-Wirkungsbeziehungen, welche statistisch in einer Varianzanalyse untersucht werden.

## Statistische Auswertung

Ziel der statistischen Auswertung ist es, die relative Wirkung jeder Prüfsubstanz im Verhältnis zur Referenzsubstanz zu berechnen. Die Angabe der relativen Wirkung erfolgt in einem Vertrauensintervall. Ph. Eur. gibt hierfür das 95-Prozent-Vertrauensintervall vor. Diese Grenzen werden in der Varianzanalyse berechnet, um die Aussage abzusichern, dass die Grenzen mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit das wahre Wirkungsverhältnis einschließen. Ph. Eur. gibt für die Berechnung des relativen Wirkungsverhältnisses zwei statistische Modelle vor: das Parallelenmodell (Modell der parallelen Geraden) und das Steigerungsverhältnismodell (Geraden mit ungleichen Steigungen).

### Parallelenmodell

Das Parallelenmodell ist in Abbildung 1 dargestellt und dient in dieser statistischen Auswertung als Grundlage. Auf der Abszisse wird der Logarithmus der Dosis, mit wachsenden Konzentrationen von links nach rechts, aufgetragen. Auf der Ordinate wird die Wirkung<sup>2</sup> aufgetragen. Die einzelnen Wirkungen für jede Versuchseinheit<sup>3</sup> werden durch schwarze Punkte dargestellt. Die Referenzsubstanz besitzt eine zugeordnete Wirkung, die bereits bekannt ist. Die Prüfsubstanz besitzt eine vermutete Wirkung, die in allen Verdünnungstufen der zugeordneten Wirkung entsprechen sollte. Die wahre Wirkung und das relative Wirkungsverhältnis kann nach dem Parallelenmodell nur berechnet werden, wenn alle Kriterien im Abschnitt Prüfungen auf Gültigkeit erfüllt sind. Für eine zufriedenstellende Wertbestimmung muss die vermutete Wirkung der Prüfsubstanz nahe bei der wahren Wirkung liegen und das relative Wirkungsverhältnis  $\approx 1$  sein. Beide Geraden liegen dann nahe beieinander. Falls die Gerade der Prüfsubstanz rechts von der der Referenzsubstanz liegt, war die vermutete Wirkung überschätzt worden und das relative Wirkungsverhältnis wird kleiner 1 sein. Umgekehrt, falls die

---

<sup>2</sup>Hemmhofdurchmesser in mm x 10.

<sup>3</sup>Referenz- oder Prüfsubstanz in einer bestimmten Verdünnungsstufe.

Gerade der Prüfsubstanz links von der der Referenzsubstanz liegt, war die vermutete Wirkung unterschätzt worden und das relative Wirkungsverhältnis wird größer 1 sein.

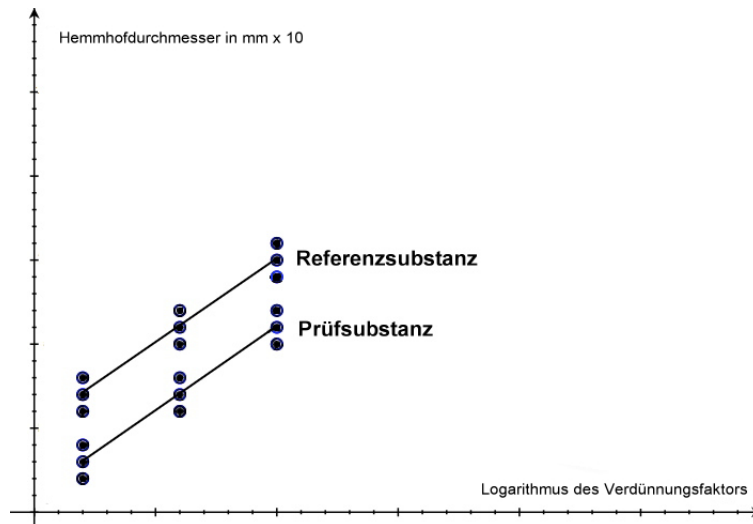


Abbildung 1: Das Parallelenmodell für eine 3+3-Wertbestimmung

### Prüfungen auf Gültigkeit

Um das Parallelenmodell anwenden zu können, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Verteilung der Einheiten von jeder Dosis der Prüf- und Referenzsubstanz auf dem Nährmedium sollte nach einem ausgewählten Versuchsplan erfolgen.
2. Die Messwerte der Prüf- und Referenzsubstanz sind normalverteilt.
3. Die Standardabweichungen der Messwerte innerhalb jeder Behandlungsgruppe (Einheiten mit gleicher Dosis- und Zubereitungsbezeichnung) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.
4. Die Beziehung zwischen dem Logarithmus der Dosis und der Wirkung kann über den Bereich der eingesetzten Dosen durch eine Gerade dargestellt werden.
5. Die Gerade einer Prüfsubstanz ist parallel zu der der Referenzsubstanz.

Nach Erhalt der Messwerte bei einer Wertbestimmung und vor Berechnung des relativen Wirkungsverhältnisses einer jeden Prüfsubstanz wird eine Varianzanalyse ausgeführt, um zu prüfen, ob die Bedingungen 4 und 5 erfüllt sind. Dazu wird die Gesamtsumme der Quadrate  $SS_{ges} = \sum (y - \bar{y})^2$  entsprechend der auftretenden Variationsursachen (siehe Abschnitt Versuchspläne) aufgespalten.

Für folgende Variationsursachen werden die Quadratsummen und Freiheitsgrade nach den Formeln in Ph. Eur. 3.2.3-I berechnet: Zubereitungen, Lineare Regression, Nichtparallelität, Nichtlinearität, Behandlungen, Zeilen (nur für lateinisches Quadrat und randomisierten Blockplan), Spalten (nur für lateinisches Quadrat). Die verbleibende Quadratsumme stellt den experimentellen Restfehler dar. Jede Summe der Abweichungsquadrate wird durch die zugehörige Anzahl Freiheitsgrade geteilt, um das jeweilige mittlere Quadrat zu ergeben. Das mittlere Quadrat einer jeden zu testenden Variablen wird durch den Restfehler geteilt und die Signifikanz dieser F-Werte anhand der F-Verteilung<sup>4</sup> beurteilt.

Ist der Ausdruck für die lineare Regression signifikant (Wahrscheinlichkeit  $< 0.05$ ), der Ausdruck für die Nichtparallelität nicht signifikant (Wahrscheinlichkeit  $\geq 0.05$ ) und der Ausdruck für die Nichtlinearität nicht signifikant (Wahrscheinlichkeit  $\geq 0.05$ ), so können Wirksamkeitsverhältnisse und Vertrauensgrenzen nach Ph. Eur. 3.2.5 berechnet werden.

## Versuchspläne

Umweltfaktoren können das Wachstum der Bakterien beeinflussen und damit die Messung der Wirksamkeit der Antibiotika. Solche Faktoren sind beispielsweise unterschiedliche Temperaturen im Inkubator, inhomogene Verteilung der Mikroorganismen oder unterschiedliche Dicke des Nährmediums. Je nach angenommenen Umweltfaktoren können unterschiedliche Versuchspläne erforderlich sein. Ph. Eur. gibt dafür den vollständig randomisierten Versuchsplan, den randomisierten Blockplan und das lateinische Quadrat vor.

### Vollständig randomisierter Versuchsplan

Falls die Gesamtheit der experimentellen Einheiten ziemlich homogen erscheint und man annimmt, dass es keine Variationsursachen gibt, die die Messwerte beeinflussen, so können Einheiten von jeder Dosis der Prüf- und Referenzsubstanz zufällig auf dem Nährmedium verteilt werden.

### Randomisierter Blockplan

Existiert eine Variationsursache, welche die Messwerte beeinflusst, so kann diese mit dem randomisierten Blockplan ausgeschaltet werden. Dazu werden Blöcke gebildet. Jeder Block muss jede Dose von Prüf- und Referenzsubstanz genau

---

<sup>4</sup>Die F-Verteilung ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilung.

einmal enthalten. Die Anordnung der Proben innerhalb des Blocks ist dabei zufällig. Im Versuch werden  $n$  Blöcke erzeugt.

1	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>
2	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
3	T <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>
4	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	T <sub>2</sub>
5	S <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>
6	T <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>

Tabelle 1: Versuch zu 3 Dosen in randomisierten Blöcken

### Lateinisches Quadrat

Werden die Wirkungswerte von 2 verschiedenen Variationsursachen beeinflusst, von denen jede  $k$  verschiedene Ausprägungsmerkmale annehmen kann, dann erfolgt die Anordnung innerhalb einer  $k \times k$ -Matrix, so dass jede Behandlung innerhalb eine Zeile und Spalte nur einmal vorkommt. Bedingung für diesen Versuchsplan ist, dass die Anzahl der Zeilen (Anzahl der Versuchseinheiten pro Dosis) und Spalten (Anzahl der Zubereitungen  $\times$  Anzahl der Dosen) gleich ist.

	1	2	3	4	5	6
1	S <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
2	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
3	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>
4	S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
5	S <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>
6	T <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>

Tabelle 2: Lateinisches Quadrat zu 3 Dosen

### Zielstellung

Die Ziel der Studienarbeit ist es, ein Programm in Java zu entwerfen, dass die vorgestellte statistische Auswertung vornimmt. Das Programm liefert für die Interaktion mit dem Benutzer eine grafische Oberfläche. Folgende Felder stehen dem Benutzer zur Eingabe zur Verfügung: Projektnummer, externe Probennummer, interne Probennummer, Bakterienstamm, Nummer des Bakterienstammes,

verwendetes Antibiotikum, zu erwartende Dosis, verwendetes Nährmedium, verwendetes Verdünnungsmittel, Auswahl des Versuchsplans, Anzahl der Dosen für Standard- und Prüfzubereitung (mindestens 3), Anzahl der Versuchseinheiten pro Dosis, Verhältnis benachbarter Dosen. Die vorgestellten Versuchspläne können von dem Programm generiert werden. Falls der Benutzer eigene Versuchspläne erstellt hat, können diese dem Programm übergeben werden. In die Versuchspläne wird dann für jede Behandlung (Prüf- oder Referenzsubstanz mit Dosisbezeichnung) der zugehörige Messwert (Hemmhofdurchmesser in mm) eingetragen. Aufgrund des gewählten Versuchsplans wird die entsprechende statistische Auswertmethode gewählt. In diese gehen die Hemmhofdurchmesser für die verschiedenen Dosen der Prüf- und Referenzsubstanzen ein. Das Java-Programm berechnet daraus die statistischen Kenngrößen wie Varianz, Quadratsummen und Freiheitsgrade nach Ph. Eur. Die Aussage über das Ergebnis wird dem Prüfer überlassen, daher erfolgt eine Ausgabe der Eingabedaten und der statistischen Kenngrößen in Excel.

Das Programm liefert 4 Ausgaben, die in Excel exportiert werden.

1. Eine graphische Ausgabe beider Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als parallele Geraden aufgefasst werden können.
2. Eine nach den Behandlungen geordnete Ausgabe aller Messwerte mit den zugehörigen Mittelwerten.
3. Eine Varianzanalyse für das Parallelenmodell nach den Formeln in Ph. Eur. 3.2.3-I.  
In Abhängigkeit von der Variationsursache werden Freiheitsgrade, Summe der Quadrate, Mittleres Quadrat, F-Quotient und Fehlerwahrscheinlichkeit berechnet.
4. Eine Abschätzung der Wirkung und Vertrauensgrenzen der Prüfsubstanz nach den Formeln in Ph. Eur. 3.2.5

## Literatur

- [1] Berthold Göber, Peter Surmann: Arzneimittelkontrolle, *Grundlagen und Methoden der Prüfung und Standardisierung von Arzneimitteln*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2005.
- [2] Europäisches Arzneibuch, 6.Ausgabe, Grundwerk 2008, Deutscher Apotheker Verlag, 2008.