

Kost. Es steht also fest, dass sehr geringe Mengen des Sulfons verhältnismässig viel besser resorbiert werden als grössere Mengen. Diese Beobachtung stimmt mit denen von *Marshall* und seinen Mitarbeitern gut überein.

Die Ergebnisse zusammenfassend, lässt sich folgendes feststellen: 1. *Die Resorption des mit der Nahrung gemischten Sulfanilamid hängt hochgradig von der Zusammensetzung der Nahrung ab*, wahrscheinlich deshalb, weil der Tagesbedarf entsprechend den einzelnen Nahrungsmitteln veränderlich ist. 2. *Die Sulfanilamidkonzentration des Blutes hängt mit dem Sulfanilamidgehalt der Nahrung zusammen, so dass aus dem Wert des letzteren die erste errechnet werden kann.* 3. *Der Zusammenhang ist, abhängig von dem Präparat, von verschiedenem Typ und ist nicht immer linear.* 4. *Unser Verfahren bedeutet gegenüber dem der amerikanischen Verfasser technische Vorteile, da die individuelle Unterbringung der Tiere und die Messung der verzehrten Nahrung sich erübrigen.*

### III. Kapitel.



## In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate.

### 1. Die die In-vitro-Wirkung beeinflussenden Versuchsfaktoren.

Es ist kein Zufall, dass die unmittelbar auf die Krankheitserreger ausgeübte Wirkung der Sulfanilamidderivate gerade Londoner Bakteriologen nachweisen konnten. Die antibiotische Wirkung der Sulfanilamidderivate kann nämlich mit der groben Wirkung der gewöhnlichen Desinfizienzien, die sich schon bei den einfachsten Versuchsbedingungen merkbar macht, nicht verglichen werden. Zum Nachweis dieser Wirkung bedarf es solch feiner Methoden, die damals nur den Schülern von *A. E. Wright* zur Verfügung standen.

Die Entdeckung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wollen wir nicht noch einmal erörtern, nur so viel sei erwähnt, dass die 1937 veröffentlichten Ergebnisse von *Colebrook, Buttle* und *O'Meara*<sup>57</sup> noch im selben Jahr oder Anfang des nächsten Jahres von zahlreichen Forschern (*Nitti, Bovet* und *Depierre*,<sup>287</sup> *Long* und *Bliss*,<sup>232</sup> *Hoare*,<sup>150</sup> *Finklestone-Sayliss*, *Paine* und *Patrick*,<sup>95</sup> *Gay* und *Clark*,<sup>122</sup> *Buttle*<sup>42</sup> und seinen Mitarbeitern) bestätigt wurden. Sie haben ausnahmslos festgestellt, dass das dem Blut oder der Fleischbrühe im Verhältnis 1:1000—1:10.000 hinzugefügte Sulfanilamid das Gedeihen von einigen abgeimpften Kokken verhindert oder die Kokken gerade tötet. *Helmholtz*<sup>144</sup> berichtete noch im Jahre 1937 über die starke bakteriostatische Wirkung des Urins von Personen, die mit Sulfanilamid behandelt wurden.

Es scheint weniger interessant, die Ergebnisse dieser übereinstimmenden Versuche zu besprechen, als die diesen widersprechenden Beobachtungen. *Bürgers*<sup>45</sup> schreibt über die Versuche *Colebrooks* und seiner Mitarbeiter (1937) wie folgt: „Neuere Versuche von *Domagk* und mir können allerdings diese Tatsache nicht bestätigen.“ Die Ein-

zelheiten seiner eigenen Versuche werden nicht erwähnt, so dass ein Rückschluss auf ihre Art nur auf Grund der Arbeit *Domagks* möglich ist. *Domagk*<sup>76</sup> lehnt die direkte („desinfizierende“) Wirkung des Sulfanilamid auf Grund des nachstehenden Versuchs ab: 50 ccm 48 Stunden alte Streptokokken-Bouillonkultur wurde mit 0,5 g Sulfanilamid versetzt und 48 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Bei der Weiterimpfung machte er die Beobachtung, dass selbst der kleinste Tropfen dieser Kultur zahlreiche lebende Kokken enthielt. *Bürgers*<sup>46</sup> beharrte auch im Jahre 1939 noch auf dem Standpunkt, dass dem Sulfanilamid und dem Uliron keine wesentliche bakteriumschädigende Wirkung zukommt. Auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse ist nicht der Umstand auffallend, dass in den Versuchen *Rosenthal's*<sup>313</sup> der Versuch, die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid gegen Colibazillen und Streptokokken nachzuweisen, fehlgeschlagen hat, sondern die Tatsache, dass diese Wirkung mit seiner Methode gegen 6 verschiedene Pneumokokkenstämme erwiesen werden konnte. Der Erfolg des Versuchs dürfte im letzten Falle dadurch bedingt sein, dass er zur Impfung der sulfanilamidhaltigen Nährböden 18 Stunden alte Kulturen verwendete; bekanntlich erfahren in solch alten Kulturen die Pneumokokken oft eine Spontanschädigung infolge der Autolyse. *Britton*<sup>35</sup> impfte sulfanilamidhaltige Fleischbrühe mit 0,4 ccm Bouillonkultur verschiedener Bakterien ein. Obwohl er eine geringfügige Hemmung beobachtete, hielt er dieser für derart unbedeutend, dass er schliesslich nur äusserte: die Sulfanilamide haben gar keine bakteriostatische Wirkung. *Fischer*<sup>99</sup> beobachtete, dass die Streptokokken in der 1% Sulfanilamid enthaltenden Fleischbrühe nicht gedeihen; niedrigere Konzentrationen aber waren unwirksam. Nähere Angaben über die Versuchsmethode fehlen aus der Arbeit, weshalb nicht festgestellt werden kann, warum seine Versuche zum Teil erfolglos waren. Dem Umstand, dass das Sulfanilamid und das Sulfapyridin in den Versuchen von *Burton*<sup>38</sup> und seinen Mitarbeitern unwirksam befunden wurden, liegt wahrscheinlich das zu grosse Inoculum zugrunde.

Die Tatsache, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide von den einzelnen Verfassern derart verschiedentlich beurteilt wird, kann durch die Verschiedenheit der Versuchsbedingungen erklärt werden. *Die Veranschaulichung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung hängt nämlich hochgradig von der Versuchstechnik ab.* Im folgenden wollen wir uns mit diesem theoretisch und praktisch gleichweise wichtigen Problem befassen. Zunächst sei auf die Bedeutung der Inoculumgrösse hingewiesen.

Bei der Prüfung der antibiotischen Eigenschaften der in der Praxis bewährten Antiseptica trachtete man früher, ihre desinfizierende Wirksamkeit festzustellen. Erst seit Kurzem wird auch der bakteriostatischen Wirkung Beachtung geschenkt. Über den bakteriostatischen Wert der einzelnen Desinfizienzien äussern sich die einzelnen Verfasser sehr verschiedentlich, so weichen z. B. die Ansichten über die bakteriostatische Wirksamkeit des Phenyl-mercurinitrates<sup>21, 371</sup> voneinander stark ab. *Garrod*<sup>119</sup> legt den Meinungsunterschieden die Verschiedenheit der in den Versuchen verwendeten Inoculumgrösse zugrunde. Er fand nämlich den bakteriostatischen Titer des Phenyl-mercurinitrates nach 0,1 ccm Inoculum bei  $1,28 \times 10^{-6}$

nach  $10^{-7}$  ccm bei  $5 \times 10^{-7}$ . Ähnliche, obwohl geringere Unterschiede beobachtete er auch bei der Ermittlung der bakteriostatischen Wirkung des Phenols. Die ausserordentliche Bedeutung der Inoculumgrösse kommt besonders bei der Prüfung der Sulfanilamidderivate zur Geltung. *Im Falle eines grossen Inoculums zeigen diese Mittel anscheinend überhaupt keine, nach der Abimpfung von wenigen Bakterien aber eine bedeutende bakteriostatische Wirkung.* Dies geht aus einem grundlegenden Versuch *Colebrooks*<sup>57</sup> und seiner Mitarbeiter besonders klar hervor. In diesem Versuch wurde die Fleischbrühe mit Sulfanilamid im Verhältnis 1:10.000 versetzt und mit 35—50 Streptokokken geimpft. In diesem Nährboden konnten die Kokken nicht gedeihen, während ihr Wachstum in der mit 300 Millionen Kokken geimpften Bouillon selbst durch 1% Sulfanilamidzusatz nicht verhindert werden konnte. Die Beziehungen zwischen Inoculumgrösse und Sulfanilamidwirkung wurden seitdem von zahlreichen Forschern bestätigt, die die Frage auch in ihren Details studierten (*Nitti, Bovet und Depierre*,<sup>297</sup> *Long und Bliss*,<sup>232</sup> *Finklestone-Sayliss*<sup>98</sup> und Genossen, *Lockwood*,<sup>227</sup> *MacIntosh* und *Whitby*,<sup>246</sup> *Green*,<sup>127</sup> *Hirsch*,<sup>148</sup> *Rose* und *Fox*.<sup>311</sup>

Für die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate ist die Bedeutung der Zusammensetzung des verwendeten Nährbodens kaum geringer als die der Inoculumgrösse. Die bakteriostatische Wirkung kann in einem sehr verschiedenen Ausmasse zur Geltung kommen, abhängig davon, ob das Präparat defibriniertem Blut oder leukozytenfreiem Blut hinzugefügt wird. Auch die das Blut liefernde Tierart ist wichtig;<sup>57, 118, 150, 328</sup> im Blut des Menschen oder des Affen ist das Sulfanilamid ziemlich wirksam, im Kaninchen-, Meerschweinchen- oder Mäuseblut erheblich weniger. Nach *Winkler* und *Julius*<sup>389</sup> enthalten die Blutkörperchen der Pferde einem Stoff, der die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid fördert. Die die Wirksamkeit des Sulfanilamid herabsetzende Wirkung ganz keiner, dem menschlichen Blut hinzugegebener Peptonmengen (0,6 mg pro ccm) wurde zum ersten Male von *Lockwood*<sup>227, 228</sup> nachgewiesen; die Antisulfanilamid-Wirkung der Peptone wurde auch durch andere Forscher<sup>102, 148, 246, 252</sup> bestätigt. Die bakteriostatische Wirkung wird auch von der Art des Peptons beeinflusst: *Long* und *Bliss*<sup>231</sup> beobachteten eine verschiedene Wirkung des Sulfanilamid auf einen zur Gruppe G gehörenden Streptococcus abhängig davon, ob die Fleischbrühe mit Proteose- oder Neopepton hergestellt wurde. Merkwürdigerweise fanden *Weld* und *Mitchell*<sup>374</sup> — im Gegensatz zu den vorigen — die Peptonhemmung im *Kaninchenserum* für unbedeutend. Die zur Herstellung der Fleischbrühe verwendeten Organe und der Grad ihrer Autolyse können gleichfalls eine Rolle spielen.<sup>252, 349</sup>

Dem Alter der Bakterienkultur kommt schon eine geringere Bedeutung zu, als der Inoculumgrösse. *Finklestone-Sayliss*<sup>98</sup> und seine Mitarbeiter impften 1:10.000 Sulfanilamid enthaltendes Menschenblut ungefähr mit der gleichen Zahl von Kokken, die verschiedenaltigen (8, 12, 16, 24 und 26 Stunden) Kulturen entnommen wurden. Am Anfang des Versuches entstanden aus je 1 ccm Röhreninhalt 100—200 Kolonien. Im Falle des 8 Stunden alten Inoculums entwickelten sich nach 4 Stunden aus derselben Menge 2500 Kolonien, von diesem Zeitpunkt an hat sich die Zahl der Kokken rasch verringert. Bei Ver-

wendung der aus älteren Kulturen gewonnenen Inocula war der anfängliche Anstieg, parallel zum Alter der Kultur, immer weniger steil. Nach Anwendung der 26 Stunden alten Kultur wurde das Phänomen nicht mehr beobachtet. *Der Umstand, dass die Sulfanilamid-derivate das Wachstum der in den Nährboden geimpften Bakterien erst nach Ablauf einer gewissen Zeit (2—5 Stunden) wesentlich zu hemmen beginnen, wurde auch von zahlreichen anderen Verfassern*<sup>53, 227, 232, 246, 311, 328</sup> beobachtet. Will man den Grad des Gedeihens aus der Trübung mit unbewaffneten Augen beurteilen, so kann dieses anfängliche Gedeihen nur im Falle eines grossen Inoculums bemerkt werden.<sup>311</sup>

Der Einfluss von scheinbar belanglosen Nebenumständen auf die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamid-derivate erhellt aus einer Beobachtung von *Mellon* und *Shinn*,<sup>274</sup> wenn sie zur Verdünnung des Inoculums verschiedene Medien verwendeten (Kochsalzwasser oder Fleischbrühe), war auch die bakteriostatische Wirkung verschieden. Es scheint darum zweckmässig, im Falle empfindlicher Erreger (z. B. Strepto- und Pneumokokken) die Verdünnungen mit dem bei den Versuchen auch sonst verwendeten Nährboden herzustellen.

Vom Gesichtspunkte der bakteriostatischen und noch mehr der „bakteriziden Wirkung“ kommt es auch darauf an, bei welcher Temperatur die Versuche angestellt werden.<sup>34, 38, 127, 374, 382</sup> Bei 39—41° ist die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid erheblich stärker als bei 37°. *Frisk*<sup>113</sup> erklärt diese Erscheinung mit der Tatsache, dass die Bakterien bei höheren Temperaturen auch sonst schlechter gedeihen als bei der optimalen. Es hat aber den Anschein, dass geringe Temperaturunterschiede belanglos sind; so ist die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid gegen Streptokokken bei 37° und 38° die gleiche.<sup>164</sup>

Wie ersichtlich, wird die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamid-derivate von den Versuchsbedingungen hochgradig beeinflusst. Man soll deshalb darauf gefasst sein, dass in den zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellten Fleischbrühen ein und dasselbe Präparat verschiedene bakteriostatische Werte aufweisen wird. Verwendet man Peptonwasser, so lassen sich die Versuche unter besser standardisierbaren Bedingungen ausführen. In diesem Fall ist aber die hemmende Wirkung des Peptons zu berücksichtigen, die die bakteriostatischen Eigenschaften dieser Präparate nur zum Teil zur Geltung kommen lässt. Aus diesem Grunde ist man vielmehr bestrebt, diese Versuche in pepton- und fleischextraktfreien Nährböden durchzuführen. Im Falle von wenig anspruchsvollen Mikroorganismen, z. B. bei den Colibazillen, wird man dieser Bedingung durch die Verwendung synthetischer Nährböden leicht gerecht. Der Stickstoffbedarf anspruchsvollerer Bakterien kann derart verwickelt sein, dass er nur mit einer grossen Zahl verschiedener Aminosäuren oder mit Eiweisshydrolysaten gedeckt werden kann. Von den Hydrolysaten kommt das Caseinhydrolysat an erster Stelle in Betracht, da das Casein leichter gereinigt werden kann, als z. B. das Serumalbumin oder die Gelatine. Die mit Caseinhydrolysaten hergestellten sog. halb-synthetischen Nährböden sind einfach und billig herzustellen, weshalb sie sich in der Praxis besser bewähren, als die aus reinen

Aminosäuren hergestellt. In letzter Zeit werden immer öfter Versuche veröffentlicht, die mit synthetischen oder halbsynthetischen Nährböden durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang möchten wir erwähnen, dass *Domagk*<sup>75</sup> die hohe Bedeutung der synthetischen Nährböden bei der chemotherapeutischen Forschung schon 1936, unmittelbar nach der Entdeckung des Prontosil, betonte. Bisher wurden Untersuchungen mit dieser Methodik mit *Coli*-<sup>36 112 148 166 252 289 391</sup> Ruhr-,<sup>159</sup> <sup>166</sup> Typhus- und Paratyphusbazillen,<sup>159</sup> <sup>282</sup> Strepto-<sup>165</sup> und Pneumokokken,<sup>112</sup> Lactobazillen,<sup>281</sup> *Cl. acetobutylicum*<sup>319</sup> usw. durchgeführt.

## 2. Messung der In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate.

Die Einfachheit der Reagenzglasversuche hat dazu beigetragen, dass nach der Entdeckung *Colebrooks* und seiner Mitarbeiter die direkte (in vitro) Wirkung der Sulfanilamidderivate von zahlreichen Forschern geprüft wurde. Nichts ist ein besserer Beweis für die Berechtigung der Reagenzglasversuche, als die Tatsache, dass schliesslich derartige Versuche zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Sulfanilamidderivate führten. Vom Gesichtspunkte der direkten Wirksamkeit aus sind nicht nur die qualitativen, sondern auch die quantitativen Verhältnisse wichtig, so ist es begreiflich, dass zur Beseitigung der oben besprochenen störenden Umstände bisher zahlreiche Versuche gemacht wurden. Die genaue Kenntnis der quantitativen Wirksamkeit ist schon deshalb wichtig, weil eine Antwort auf die Frage, ob den therapeutischen Eigenschaften der einzelnen Sulfanilamide allein die direkte Wirkung zugrunde liegt, nur auf diese Weise erteilt werden kann. Im folgenden wollen wir die zur Verfügung stehenden Verfahren im allgemeinen besprechen, mit besonderer Rücksicht auf die Frage, wie weit diese Methoden zur quantitativen Bestimmung und zahlenmässigen Angaben der direkten Wirkung geeignet sind. In Verbindung mit diesem Problem soll auch die von uns verwendete Technik besprochen werden.

Früher wurde die In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate vorwiegend in defibriniertem Menschenblut gemessen. Das Blut wird mit einer gewissen Menge des Präparates und dann mit einer bekannten Zahl von Bakterien versetzt. Das Gedeihen der Bakterien — bzw. ihre Hemmung — wird mit Hilfe der zeitweise vorgenommenen Bakteriumzählung oder der *Wrightschen*<sup>395</sup> „slide cell“-Technik verfolgt. Von den zahlreichen Versuchen dieser Art soll auf die von *Colebrook*<sup>57, 58</sup> und seinen Genossen, *Long* und *Bliss*,<sup>232</sup> *MacIntosh* und *Whitby*,<sup>240</sup> *Hoare*,<sup>150</sup> *Fleming*,<sup>101</sup> *Finklestone-Sayliss*,<sup>98</sup> ferner *Rammelkamp*<sup>306, 307</sup> und seinen Mitarbeitern, *Grumbach*<sup>136</sup> und zahlreichen anderen, die hier nicht angeführt werden können, verwiesen werden.

Obwohl die im Blut angestellten Versuche den im Organismus bestehenden Verhältnissen am nächsten stehen und aus diesem Grunde für gewisse Studien unentbehrlich sein dürften, ist diese Methode zur quantitativen Bestimmung der direkten Wirkung einzelner Präparate wenig geeignet, da das Verfahren zahlreiche Fehlerquellen hat: 1. Die Versuche können unter identischen Bedingungen kaum wiederholt werden; verwendet man das Blut derselben Tierart,

so weist ein Mittel in den Blutproben die von verschiedenen Individuen zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen werden, nicht immer dieselbe Wirkung auf. 2. Die bakteriostatische Wirkung ist im Blut wegen der im Blut befindlichen Hemmstoffe schwächer als in Wirklichkeit. 3. In den Leukozyten<sup>57, 150</sup> und im Serum<sup>308</sup> befinden sich bakterizide Stoffe, die die Wertbestimmung in der anderen Richtung stören. 4. Die Verteilung der einzelnen Präparate zwischen Serum und Formelementen ist nicht identisch; z. B. das Sulfanilamid befindet sich in den roten Blutkörperchen in einer wesentlich höheren Konzentration als im Plasma; mit dem Sulfamethylthiazol verhält es sich umgekehrt.<sup>113</sup> 5. Geringere Unterschiede der Wirksamkeit kommen bei dieser Methode nicht zum Ausdruck. 6. Die quantitativen Verhältnisse lassen sich schwer zahlenmässig ausdrücken.

Der Urin kommt als Nährboden zur theoretischen Erforschung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wegen der in ihm enthaltenen Hemmstoffe gleichfalls nicht in Frage. Dagegen gelangten mit dieser Methode *Helmholtz*,<sup>144</sup> *Cokkinis*,<sup>56</sup> *Rammelkamp* und *Juwel*,<sup>306</sup> *Vetro*<sup>365</sup> und andere zu praktisch wichtigen Ergebnissen.

Die Zahl der in Peptonwasser und Fleischbrühe ausgeführten Versuche<sup>35, 53, 57, 102, 212, 313, 328, 349, 380, 390</sup> ist schon heute fast unübersichtlich hoch. Selbsttendend können auch bei diesen Nährböden die in ihnen befindlichen Hemmstoffe Verhältnisse vortäuschen, die den wahren nicht entsprechen. Viele verwenden zur Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung der Sulfanilamidderivate Agar, Serumagar oder Blutagar.<sup>38, 80, 158, 186, 328</sup> Auch in diesen Fällen werden die Ergebnisse von den Hemmstoffen, die sich im Ausgangsmaterial der Agarnährböden befinden, beeinflusst. Nach unserer Ansicht gibt es bei der Anwendung fester Nährböden ausser den erwähnten auch andere Umstände, die die Ergebnisse in einem falschen Licht erscheinen lassen. Vor allem soll man bedenken, dass die Bakterien auf einem festen Nährboden sich nie in einer derart direkten, unbeschränkten und engen Berührung mit den Nährstoffen und den Chemotherapeutica befinden, wie im Falle eines flüssigen Nährbodens. Wir glauben, dass infolge dieser Verhältnisse die Diffusion der Präparate nach dem Zellinneren von zahlreichen Umständen, vom kolloidartigen Agar-Agar, Serum oder Blut, beeinflusst wird. Es wurden Beobachtungen gemacht, die für diese Annahme sprechen. *Kimmig* und *Weselman*<sup>187</sup> haben in Kataphoreseversuchen festgestellt, dass die Sulfanilamidderivate von den Serumeiweisskörpern, besonders dem Albumin, adsorbiert werden. Nach *Davis*<sup>68</sup> werden diese Mittel in irgend einer Form an die Plasmaproteine gebunden. Dennoch sind die festen Nährböden trotz dieser Nachteile für die Versuche mit Gono- und Meningokokken unentbehrlich, weil sie auf festen Nährböden erheblich besser gezüchtet werden können. Eine bessere Lösung kommt auch deshalb nicht in Frage, weil ein synthetischer Nährboden, der die Züchtung dieser ausserordentlich anspruchsvollen Erreger gestattet, vorläufig nicht zur Verfügung steht.

Zur Veranschaulichung der Technik der Agarplattenversuche dient folgender Meningokokkenversuch.<sup>158</sup>

Ein 45—47° warmer, 20% Aszitesflüssigkeit enthaltender Agarnährboden wird mit verschiedenen Mengen der Natriumsalzlösungen von Sulfamethylthiazol, Sulfapyridin und Sulfanilamid versetzt und zu Platten gegossen. Jetzt

wurde die 8 stündige Aszites-Schrägagarkultur von Meningococcus Typ Gordon I. mit 5 ccm Fleischbrühe abgeschwemmt, aus der Suspension verschiedene Verdünnungen hergestellt und in einer Menge von je 1 Öse voll zur Impfung der verschieden konzentrierten Agarplattensektoren verwendet. Als Inoculumeinheit gilt 1 Öse voll der 1:10.000 verdünnten Suspension; diese Menge entspricht ungefähr 3500 Kokken. Die nach 24 Stunden beobachteten Ergebnisse sind aus Tabelle 11. ersichtlich.

Tabelle 11.

*Bakteriostatische Wirkung verschiedener Präparate gegen Meningokokken auf einem 20% -igen Aszitesagar.*

Konz. des Mittels mg %	S. methylthiazol				S. pyridin				Sulfanilamid			
	Zahl der abgeimpften Inocula											
	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
0,0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0,1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0,2	0	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0,5	0	0	0	1	4	4	4	4	4	4	4	4
0,8	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	2
1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Erklärung: 0 = kein Wachstum; 1 = 1—3 Kolonien; 2 = 4—8 Kolonien; 3 = 9—15 Kolonien; 4 = über 15 Kolonien oder zusammenhängender Kokkenbelag.

Die Überlegenheit des Sulfamethylthiazol gegenüber den zwei anderen Mitteln wird auf den ersten Blick klar. Auch die zwei anderen sind nicht gleich wirksam, ihr Unterschied aber ist erheblich geringer. In dem Versuch mit 10.000 Inoculumeinheiten war die Grenzkonzentration des Sulfamethylthiazol 0,5, die des Sulfapyridin und des Sulfanilamid 0,8 bzw. 1 mg %. Im Falle von 10 Inoculumeinheiten sind die entsprechenden Grenzkonzentration 0,1; 0,5 und 0,5 mg %. *Auf Grund der Ergebnisse steht also fest, dass die Präparate verschiedentlich wirksam sind, aber den Unterschied mit Ziffern anzugeben ist eine sehr verwickelte Aufgabe, die höchstens mit Hilfe von Indexen auf dem Wege über arbiträre Berechnungen gelöst werden kann.*

Wenn die verwendete Methodik nicht sehr genau ist, dann kann der Unterschied zwischen zwei beinahe gleichwirksamen Präparaten — unabhängig davon, ob der Versuch in einem festen oder flüssigen Nährboden durchgeführt wird — entweder nicht nachgewiesen werden oder infolge eines Zufalls grösser erscheinen als er in Wirklichkeit ist. Zur Veranschaulichung der zweiten Möglichkeit dient nachstehendes Beispiel: Verglichen werden zwei Mittel, deren Wirkungsunterschied mit der bakteriostatischen Methode gemessen z. B. 33% beträgt, in den Konzentrationen 0,2; 1,0; 5,0; 25 und 50 mg %. Es kann vorkommen dass das Wachstum der Bakterien von dem stärkeren Präparat genau bei der Konzentration von 4,7 mg % vollkommen gehemmt wird. Dementsprechend wird man in der 5 mg % enthaltenden Röhre kein Wachstum feststellen, in der Röhre mit 1 mg % Konzentration wird aber noch Wachstum beobachtet. Hieraus folgt, dass das schwächere Mittel das Bakterienwachstum nur in einer um ein Drittel höheren Konzentration, bei 6,3 mg % hemmen wird. In der Röhre von 5 mg % werden also die Bakterien noch gedeihen. Sicher wird dieses Wachstum nicht so lebhaft sein wie in der 1 mg % -Röhre des stärkeren Mittels; dieser Unterschied wird aber nicht

ausgedrückt, da das Resultat auf Grund der Grenzkonzentration zahlenmässig angegeben wird. Man wird also sagen, dass die vollkommen hemmende Konzentration für das eine Mittel bei 5 mg % für das andere bei 25 mg % liegt. Diese Angabe lässt das eine Mittel fünfmal so stark wie das andere erscheinen, obwohl es zwischen ihnen kaum einen Wirksamkeitsunterschied gibt.

Wegen dieser Schwierigkeiten ist der genauen bakteriostatischen Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate eine Titrierung zugrunde zu legen, wo die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern gering sind, ferner empfiehlt es sich, das Gedeihen der Bakterien quantitativ zu messen. Auf Grund dieser Daten wird eine Kurve gezeichnet, von der die geringste das Wachstum vollkommen hemmende Konzentration abgelesen werden kann. Unter solchen Bedingungen machten *Möller* und *Schwarz*,<sup>281</sup> ihre Versuche, ferner *Auhagen*,<sup>5</sup> mit dem Stereptobakterium *plantarum* und verschiedenen pathogenen Keimen (*Ivanovics*<sup>159, 164, 165</sup>). Unser Verfahren ist folgendes:

Die Züchtung der Staphylokokken, Coli-, Dysenterie-, Typhus-, Paratyphus- und Milzbrandbazillen und anderen mässig anspruchsvoller Mikroorganismen erfolgt in einem aus Caseinhydrolysat hergestellten Nährboden, der unter Beobachtung der Erfahrungen *Knights*<sup>195</sup> folgendermassen hergestellt wird.<sup>159</sup>

50 g Casein (nach *Hammerstein*) werden in 250 ccm 4. n Schwefelsäure suspendiert, zwei Stunden im Wasserbad erhitzt, dann der Kolben mit einem Rücklaufkühler versehen, über einem Sandbad weitere 6 Stunden gekocht. Nun wird die Lösung mit 1 Liter dest. Wasser verdünnt, mit heissem, konzentriertem Barytwasser genau neutralisiert, der Niederschlag über einem Büchner—Trichter abgesogen, nach gründlichen Auspressen in 2 Liter heissem Wasser wieder suspendiert und wieder abgesogen. Diese Operation wird mit 1 Liter Wasser wiederholt und die gewonnenen Filtrate werden vermengt. Dem Filtrat fügt man so viel 5. n Schwefelsäure hinzu, dass es auf Kongopapier gerade sauer reagiert. Der stark trüben Lösung wird 1 Esslöffel voll Tierkohle beigegeben, umgerührt, zum Sieden gebracht und in heissem Zustand durch Faltenfilter filtriert. Eine wasserklare, gelbliche Lösung wird gewonnen, der man folgende Stoffe hinzugibt: 3 g Asparagin, 5 g Glutaminsäure, 0,4 g dl-Cystin, 15 g Natriumzitat, 16 g Glucose, 20 g Kochsalz, 2 Natr. sulfat kryst. Nach Auflösung dieser Stoffe löst man 0,5 g Magnesiumsulfat und 0,02 g Ferriammoniumnitrat getrennt in geringen Wassermengen und fügt diese Lösungen der ersten hinzu. Das pH des Nährbodens wird auf 7,5 eingestellt. Schliesslich wird die Lösung mit 5 mg Aneurinchlorhydrat und 30 mg Nikotinsäureamid versetzt und mit dest. Wasser auf 6 Liter ergänzt. Der Nährboden wird in je 500 ccm Mengen 30 Min. bei 105°, am anderen Tage noch 40 Min. in strömendem Dampf sterilisiert. Von dieser Lösung verdünnt man die gerade nötige Menge mit der gleichen Menge m/15 Phosphatpuffer von pH 7,5 und sterilisiert in Reagenzröhren zu 4 oder 8 ccm in der erwähnten Weise.

Dieser Nährboden gestattet das Gedeihen auch von wenigen Keimen und die Entwicklung der Kultur erreicht ihr Maximum nach 24 Stunden. Die Verdünnung mit dem Phosphatpuffer erhöht die Pufferkapazität des Nährbodens, überdies gewährt der verdünnte Nährboden eine mehr homogene Entwicklung der Bakterien als der konzentrierte. Der bedeutende Zitatgehalt des Nährbodens übt eine Pufferwirkung aus, ferner verhindert dieses Salz die Ausscheidung des Eisens. Selbstverständlich kommt die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate in diesem halbsynthetischen Nährboden besser zur Geltung als in der Fleischbrühe. Dies ersieht man aus Tabelle 12.

Tabelle 12.

*Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol gegen Staphylokokken in Fleischbrühe und Caseinnährboden.*

Konz. des Mittels mg 0,0'	Sulfanilamid		Sulfamethylthiazol	
	Fleischbr.	Caseinnährb.	Fleischbr.	Caseinnährb.
0,0	++++	++++	++++	++++
2,0	++++	++++	++++	++++
4,0	++++	++	++++	—
8,0	++++	±	++++	—
16,0	++++	—	++	—

Bemerkung: Die Kreuze bedeutung den Grad des Wachstums.

Der Unterschied ist noch grösser, wenn die einzelnen Nährböden mit Colibazillen beimpft werden. Dies geht aus Tabelle 13. hervor, wo der Versuch ausser in dem Caseinnährboden und in der Fleischbrühe auch in dem nach den Vorschriften von *Sahyun*<sup>320</sup> und seinen Mitarbeitern hergestellten Glucose und Ammoniumsulfat-Nährboden durchgeführt wurde.

Tabelle 13.

*Bakteriostatische Wirkung des Sulfamethylthiazol gegen Colibazillen in verschiedenen Nährböden.*

Konz. des Mittels	Das Wachstum in versch. Nährböden		
	Synthetischenährb.*	Caseinnährb.	Fleischbr.
mol/10 <sup>3</sup>	—	—	—
mol/10 <sup>4</sup>	—	—	++
mol/5. 10 <sup>4</sup>	—	—	+++
mol/10 <sup>5</sup>	—	—	+++
mol/2. 10 <sup>5</sup>	—	++++	++++
0 (Kontrolle)	++++	++++	++++

Bemerkung: Die Kreuze bedeuten den Grad des Wachstums.

\* nach *Sahyun* und Mitarbeiter.

Wie ersichtlich, ist die bakteriostatische Wirkung in dem synthetischen aminosäurefreien Nährboden noch ausgeprägter als in dem Caseinnährboden. Dennoch glauben wir, dass man die bakteriostatische Wirkung dieser Mittel selbst im Falle von Colibazillen zweckmässigerweise im Caseinnährboden prüfen soll. Auf die Gründe dieser Ansicht kommen wir später zurück.

Die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate wird nun wie folgt genau titriert: Nachdem die grösste Verdünnung, die das Wachstum der Bakterien vollkommen verhindert, in orientierenden Versuchen annähernd bestimmt wurde, versetzt man vom 8-10-fachen dieser Konzentration die je 4 ccm Casein-nährboden enthaltenden Röhren mit 1,0; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15 und 0,1 ccm Lösung. Der Röhreninhalt wird mit dest. Wasser auf 5 ccm ergänzt. Von den schlechtlöslichen Sulfanilamidderivaten verwendet man die Lösung: in ihrer Natriumsalze. Zur Beimpfung der Röhren wird zunächst eine normal Öse der 24stündigen Schrägagarkultur in 5 ccm Nährlösung suspendiert und aus der Suspension eine Verdünnung von 1:10.000 hergestellt, 0,1 ccm dieser Verdünnung dient als Inoculum. Wir glauben die Inoculummenge mit diesem Verfahren hinreichend standardisiert zu haben. Laut mehreren Bestimmungen bedeutet diese Menge bei Staphylokokken 6.000—8.000, bei Colibazillen 3.000—3.500, bei Ruhrbazillen 6.000—10.000 Keime. Demnach ist die Ordnungsgrösse von dem Stamm und der Spezies unabhängig. Es wäre ganz verfehlt, die Inoculumgrösse in jedem Versuch durch Aussaat über einer Agarplatte mit der Keimzahl anzugeben, zumal über die wirklichen Verhältnisse selbst diese Methode keinen richtigen Aufschluss gibt, da die erhaltene Keimzahl nicht nur von der Art des Bakteriums und dem Stamm, sondern auch davon abhängt, in welchem Ausmass die Suspension homogenisiert werden konnte.

Die beimpften Röhren werden nach gründlichem Schütteln 20—30 Stunden in einem Brutschrank aufbewahrt. Der bakteriostatische Titerwert hängt auch von der Züchtungsdauer hochgradig ab. Im kürzeren Versuch (z. B. 14—20 Stunden) erhält man höhere Werte als bei einer längeren Versuchsdauer. Die über 24 Stunden dauernden Versuche liefern aber genauere Ergebnisse, weil die Streuung der Werte, aus denen die die Hemmung darstellende Kurve zusammengestellt wird, geringer ist. Bei homogen wachsenden Stämmen wird der Wachstumsgrad nephelometrisch gemessen. Zu diesem Zweck wird bei uns das Leitzsche Universalkolorimeter verwendet. Als Kontrolle dient eine Kultur, die mit dem Präparat nicht versetzt wird. Der Wachstumsgrad wird in Hundertsatz, auf diese Kontrolle bezogen, angegeben.

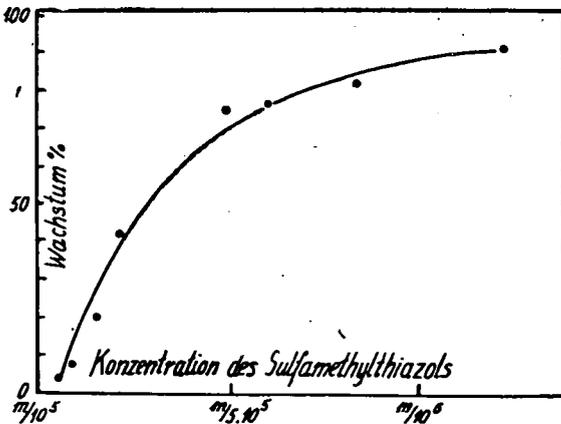


Abb. 5.

Die bakteriostatische Wirkung  
des Sulfamethylthiazols auf *Staphylococcus*.

Abb. 5. stellt die Ergebnisse eines Sulfamethylthiazolver-suches dar.

Die bakteriostatische Wirksamkeit der Präparate kann verschiedentlich ausgedrückt werden. Früher nannten wir Titerwert die grösste Verdünnung, die eine 66% ige Wachstums-hemmung bedingt. Es schien aber zweck-mässiger, jene höchste Verdünnung als Titer anzusehen, in der das Wachstum

nephelometrisch überhaupt nicht nachgewiesen werden kann. Selbst-rendend ist dieser Wert niedriger als der ersterwähnte.

In Tabelle 14. sind die bakteriostatischen Titerwerte des Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol auf Grund von *Staphylo-coccus*versuchen verzeichnet. Um die Wirkung dieser Verbindungen anschaulicher zu machen, wurden in der Tabelle auch die Ergebnisse von Versuchen mit einigen allbekanntem Desinfizierungsmitteln angegeben.

Tabelle 14.

**Bakteriostatischer Titer des Sulfanilamid, Sulfamethylthiazol  
und verschiedener Benzolderivate gegen *Staphylococcus aureus*.**

(Der Titer ausgedrückt auf Grund der 66%-igen Hemmung.)

Das Mittel	Bakteriostatischer Titer
Natriumbenzoat	mol/200
Natriumsalicylat	mol/1.000
Benzolsulfamid-p-carbonsäure	mol/600
m-Dihydroxybenzol (Resorcin)	mol/50
Phenol	mol/70
Sulfanilsäures Natrium	mol/700
Sulfanilamid	mol/20.000
Sulfamethylthiazol	mol/330.000

Wie ersichtlich, wirkt das Sulfanilamid im Caseinnährboden 20-mal, das Sulfamethylthiazol ungefähr 300-mal stärker als das Natriumsalicylat.

Für die Züchtung empfindlicherer Mikroorganismen ist der oben beschriebene Nährboden nicht geeignet. Mit einer Modifizierung ist es aber gelungen, die Mehrheit der von *Lancefield* in die Gruppen B, C und D eingereihten *Streptococcus haemolyticus*-Stämme zu züchten und die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate, ähnlich wie in den obigen Versuchen, auch auf diese Erreger zu bestimmen.

Herstellung des Nährbodens (s. auch *Ivánovics* und *Föllös*<sup>169</sup>) **Nährboden I.:** 50 g Casein werden, in der oben beschriebenen Weise hydrolysiert; die von dem Barium vollkommen befreite Lösung wird auf 3 Liter ergänzt. Aus dieser Stammlösung wird der Nährboden wie folgt zusammengestellt; 200 ccm Hydrolysat, 1 g Glucose, 2 g NaCl, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0,8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 H<sub>2</sub>O, 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sörensen*), 0,005 g Ferriammoniumziträt, 0,5 g dl-Cystin, 0,04 g l-(-)-Tryptophan, Aqu. bideest. ad 1000, pH 7,6. Jetzt wird der Nährboden mit 1 mg Nikotinsäureamid und je 0,2 mg Adermin und Aneurinhydrochlorid versetzt und in 7,8 ccm Mengen schonend sterilisiert. Vor dem Gebrauch gibt man dem Röhreninhalt noch 1 mg Thioglykolsäure und 1 $\gamma$  Ca-pantothenat in je 0,1 ccm Volumen hinzu. **Nährboden II.:** Einem Liter Nährboden wurden ausser den erwähnten akzessorischen Stoffen 0,2 mg Lactoflavin, 0,4 mg Pimelinsäure, je 2 mg  $\beta$ -Alanin, Uracil, Inulin und 1 mg Cholinhydrochlorid hinzugefügt.

Die in die Gruppe B gehörenden *Streptococcus haemolyticus*-Stämme gedeihen schon in dem verhältnismässig einfachen Nährboden I. ganz gut. Für die Züchtung der Gruppe C und D ist nur Nährboden II. geeignet.

Die Messung der bakteriostatischen Wirkung wird wie oben ausgeführt (s. auch *Ivánovics*<sup>169</sup>), mit der Abweichung, dass der Röhreninhalt hier 10 ccm beträgt. Zur Beimpfung der Nährböden wird eine 6-8-stündige Bouillonkultur verwendet. Die noch verhältnismässig homogen wachsenden Stämme werden mit dem auch zu Versuchszwecken verwendeten Caseinnährboden entsprechend verdünnt und aus der Verdünnung in jede Röhre 0,1 ccm eingeführt. Zur Bestimmung des Wachstumsgrades ist hier die Nephelometrie nicht zweckmässig, da die Streptokokkenkulturen nicht entsprechend homogenisiert werden können. Anstatt den Grad der Trübung zu messen, kann auf den Entwicklungszustand der Kultur aus der im

Laufe des Gedeihens entstandenen Säuremenge geschlossen werden. Zu diesem Zweck setzt man nach Ablauf der Versuchsperiode den Kulturen je 2 Tropfen aus einer 0,1%-igen alkoholischen Thymolblaulösung hinzu und titriert mit  $n/10$  NaOH. Aus dem Laugeverbrauch wird die von dem unbeimpften Nährboden verbrauchte Laugemenge abgezogen und aus den Differenzwerten eine die bakteriostatische Wirkung darstellende Kurve gezeichnet. Diese Bestimmungsmethode hat sich als sehr verlässlich erwiesen: In 9 verschiedenen Versuchen mit demselben Streptococcus haemolyticus-Stamm Gruppe B ergaben die Parallelversuche die Extremwerte  $\text{mol}/19000$  und  $\text{mol}/25000$ . Der die Streuung der einzelnen Bestimmungen ausdrückende Mittelfehler (Standarddeviation) wurde  $\pm 11,6\%$  gefunden. Auf Grund von 9 Bestimmungen beträgt der mittlere bakteriostatische Titerwert des Sulfanilamid und sein Mittelfehler  $\text{mol}/21.722 \pm 832$ . — Wir möchten erwähnen, dass unter ähnlichen Umständen der Titerwert in der Fleischbrühe für  $\text{mol}/900$  gefunden wurde.

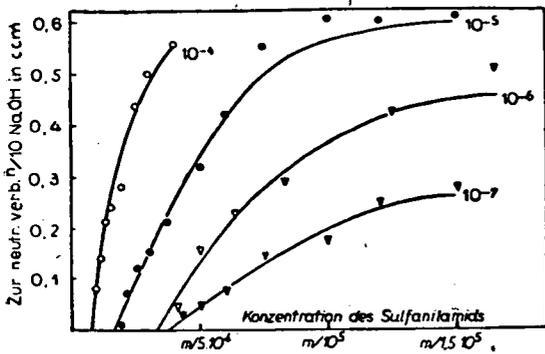


Abb. 6.

*Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid bei verschiedener Inoculumgröße. (Str. h. B Nr. 102, im 20stündigen Versuch.)*

Bemerkung: Die neben den Kurven angeführten Ziffern geben die Inoculumgröße (ccm Bouillonkultur) an.

Der Zusammenhang zwischen dem bakteriostatischen Titer und der Inoculumgröße wird auf Abb. 6. dargestellt.

Als Versuchsdauer wurden 20—48 Stunden gewählt. Die optimale Versuchsdauer ist, abhängig von der Art des Versuchs, verschieden. Z. B. entspricht den in Gruppe C gehörenden Stämmen der zweitägige Versuch besser als der eintägige, weil der Eintagsversuch zu grosse Streuungen und hierdurch auch eine grössere

Versuchsfehler liefert. Dies erhellt aus Abb. 7.

Das oben beschriebene Verfahren kann nicht nur zur Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung, sondern auch zu Versuchen über

Bakterizidie verwendet werden. Man bestimmt in diesem Fall den sog. Desinfizientitert, d. i. die grösste Verdünnung der Sulfanilamidderivate, die die auf den Nährboden abgeimpften Bakterien ausnahmslos vernichtet. Bei der Titrierung werden, ähnlich wie bei der Bestimmung des bakteriostatischen Titers, verschiedene Konzentrationen des Präparates dem Caseinnährboden hinzugegeben

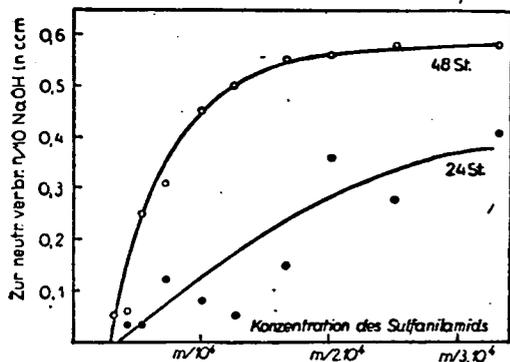


Abb. 7.

*Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamids in dem 24- und 48stündigen Versuch im Falle von Str. h. C Nr. 170. (Inoculum:  $10^{-6}$  ccm)*

und die Röhren nach Beimpfung 20—40 Stunden in einem Brutschrank gehalten. Dann werden die Röhren, in denen kein Wachstum erfolgte, mit 1 ccm m/1000 p-Aminobenzoensäure versetzt und weitere 48 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Auf Grund des jetzt abgelesenen Resultates erhält man den „Desinfizientstiter“ des Präparates. Aus Tabelle 15. sind die Einzelheiten des Verfahrens zu sehen.

Tabelle 15.

„Desinfizientstiter“ des Sulfanilamid gegen einem zur Gruppe B gehörenden *Streptococcus haemolyticus*.

Inoculum (ccm Bouillon Kultur)	Züchtungs- dauer	Einmessung der p-Amino- benzoensäure	Konz. des Sulfanilamid					
			mol 1.000	mol 2.000	mol 5.000	mol 10.000	mol 15.000	mol 20.000
10 <sup>-6</sup>	20 <sup>h</sup>	vor	—	—	—	—	—	—
		nach	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	40 <sup>h</sup>	vor	—	—	—	—	—	—
		nach	—	—	—	+++	+++	+++
10 <sup>-5</sup>	20 <sup>h</sup>	vor	—	—	—	—	—	—
		nach	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	40 <sup>h</sup>	vor	—	—	—	—	—	+++
		nach	—	—	+++	+++	+++	+++
10 <sup>-4</sup>	20 <sup>h</sup>	vor	—	—	±	+	++	+++
		nach	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	40 <sup>h</sup>	vor	—	—	+	+	+++	+++
		nach	—	+++	+++	+++	+++	+++

Die Kreuze bedeuten den Grad des Wachstums.

Hieraus ersieht man, dass nach 20 Stunden die Kokken selbst in Anwesenheit von überschüssigem Sulfanilamid nicht getötet wurden, dagegen war in den Röhren nach 40 Stunden selbst im Falle des grössten Inoculums kein einziger lebender Coccus vorhanden. Die Tötung der eingepfunden Kokken erfordert eine zwei-viermal grössere Konzentration als die Bakteriostase.

Aehnliche Versuche wurden auch mit Coli-, Dysenterie-, Typhus- und Paratyphusbazillen vorgenommen, deren Erörterung wir an dieser Stelle unterlassen möchten.