

## Das Problem der Sulfanilamidresistenz.

Im Besitz einer entsprechenden Methode zur Untersuchung der bakteriostatischen Wirkung des Sulfanilamid wurde bald festgestellt, dass gegenüber dem Sulfanilamid nicht nur die Streptokokken sondern auch die verschiedenen anderen Bakterien empfindlich sind. Der Enterococcus bildet vielleicht die einzige Ausnahme. Von einzelnen Stämmen dieses Erregers wurde schon 1937 von *Bliss*<sup>26</sup> und *Long* festgestellt, dass seine Entwicklung selbst von einer mehrere Hundert mg % betragenden Sulfanilamidkonzentration nicht verhindert wird. Seitdem hat es sich herausgestellt, dass diese Eigenschaft nicht nur der eine oder andere Stamm sondern die ganze Abart (Streptococcus D) aufweist. Infolge der Sulfanilamidresistenz des Enterococcus wird bei anhaltender und energischer Sulfanilamidbehandlung die ganze Stuhlflora des Menschen oder des Tieres verändert. Die Zahl der empfindlichen laktosefermentierenden Bakterien nimmt hochgradig ab, während die der Enterokokken unverändert bleibt; hierdurch besteht die aerobe Flora des Stuhls fast ausschliesslich aus grampositiven Kokken (*Stickl* und *Gaertner*,<sup>348</sup> *Ivánovics*<sup>167</sup>). Anscheinend können auch andere Streptokokkenstämme widerstandsfähiger sein als der Durchschnitt: *Francis*<sup>110</sup> konnte aus den Kranken einer chirurgischen Abteilung Stämme isolieren, die selbst auf einem 20 mg % Sulfanilamid enthaltenden Blutagar lebhaft wuchsen. Diese resistenten Stämme gehören in die *Lancefield'sche* Gruppe A Typ 12. Ähnliche Beobachtungen machten *Colebrook*<sup>59</sup> und seine Mitarbeiter mit einzelnen Stämmen der Streptokokkentypen 11, 12 und 25. Hinsichtlich der Sulfanilamidempfindlichkeit verhalten sich die Streptococcusgruppen B und C verschiedenlich: letztere sind widerstandsfähiger als die erstgenannten (*Ivánovics*<sup>164</sup>).

Empfindlichkeitsunterschiede lassen sich nicht nur bei den Streptokokken, sondern auch bei den verschiedensten anderen Erregern nachweisen. Die Unterschiede stellen zumeist Eigenschaften der Stämme dar; es wurde nämlich festgestellt, dass auch jene Stämme verschiedenlich empfindlich sind, die aus einer Periode vor der Sulfanilamidära stammen. Die Sulfanilamidempfindlichkeit der Pneumokokkenstämme wurde zuerst von *MacLean*, *Rogers* und *Fleming*<sup>249</sup> (1939) eingehend geprüft. Mit der „slide cell“-Technik wurde für die einzelnen Stämme eine wechselnde, vom Typ unabhängige Sulfapyridinempfindlichkeit gefunden. Ähnliche Beobachtungen machten auch *Schmith*,<sup>328</sup> *Cotler*, *Kirchner* und *Romano*,<sup>64</sup> *Moore*, *Thomas* und *Hoyt*,<sup>279</sup> *Grumbach* und *Heggin*.<sup>137</sup> Dagegen fanden *Lowell*<sup>237</sup> und seine Mitarbeiter bei den Pneumokokkenstämmen Typ 3,5 und 25 einen über dem Durchschnitt liegenden Widerstand.

Von den übrigen Krankheitserregern des Menschen können die Gonokokken,<sup>186</sup> <sup>328</sup> Pneumokokken,<sup>326</sup> Colibazillen<sup>365</sup> und einzelne Staphylokokkenstämme<sup>159</sup> verschiedene Grade der Sulfanilamidempfindlichkeit aufweisen. Die Gono- und Meningokokken sind vielleicht am meisten empfindlich, während die Empfindlichkeit der

Colibazillen durchschnittlich vielleicht niedriger ist als die der anderen erwähnten Bakterien.

Zweifelsohne beruht die Sulfanilamidempfindlichkeit zum Teil auf einer genetischen Basis, d. h. die Arzneiempfindlichkeit stellt eine ursprüngliche Eigenschaft der Spezies, Typen bzw. Stämme dar. Andererseits können aber empfindliche Stämme in resistente übergeführt werden. Diese Umwandlung wurde bei dem mit Sulfanilamid behandelten kranken Menschen zuerst von Ross<sup>317</sup> erwiesen. Er fand, dass die am Anfang der Krankheit gewonnene Pneumococcuskultur gegenüber dem Arzneimittel empfindlicher war als die später gezüchtete. Die Anführung der klinischen Erfahrungen ist nicht unsere Aufgabe, an ihrer Stelle möchten wir die Frage nur mit den Daten der experimentellen Chemotherapie beleuchten. *Die Versuche haben nämlich schon bisher über jeden Zweifel hinaus bewiesen, dass die verschiedenen Krankheitserreger sowohl in vivo als auch in vitro in widerstandsfähigere Formen als die ursprüngliche übergeführt werden können.*

Mit Hilfe der Dauerzüchtung in sulfanilamidhaltigen Nährböden lassen sich die Bakteriumstämme an das Arzneimittel gewöhnen, wodurch ihr Widerstand zunimmt. Auf diese Weise gelang es MacLeod und Daddi<sup>253</sup> (1939) zum ersten Mal, widerstandsfähige Pneumokokken zu gewinnen. Sie impften ihren Pneumococcusstamm Typ 1 auf Nährböden weiter, die das Sulfapyridin in steigenden Konzentrationen enthielten und erzielten nach 33 Passagen einen Stamm, dessen Resistenz die ursprüngliche zehnfach überstieg. Gegen diese modifizierten Stämme konnten die Mäuse nicht geschützt werden. Andere Verfasser (Harris und Kohn,<sup>140</sup> Lowell, Strauss und Finland,<sup>237</sup> Schmith,<sup>328</sup> Schmidt, Sesler und Dettwiler,<sup>327</sup> Ivánovics<sup>159</sup>) erhöhten mit dieser Methode die Sulfanilamidresistenz der verschiedensten Bakterien. Zur Gewöhnung eignet sich jedes Sulfanilamidderivat. Die im Reagenzglas widerstandsfähigeren Stämme sind auch im tierischen Organismus in jedem Fall widerstandsfähiger als der ursprüngliche Stamm. Auch die umgekehrte Regel ist gültig: der im Organismus resistenter gewordene Stamm verhält sich auch in vitro resistenter. Merkwürdigerweise hat die Aenderung der Sulfanilamidresistenz keine Virulenzänderung zur Folge und die erhöhte Resistenz wird zu einer bleibenden Eigenschaft des Stammes. Schmidt, Sesler und Dettwiler trugen ihre in vitro resistent gemachten Pneumokokken Typ 1 und 3 durch 200 Mäusepassagen, ohne eine Abnahme der Arzneiresistenz beobachtet zu haben.

Schon bisher wurde des öfteren darauf hingewiesen, dass die zu Beginn der Sulfanilamidepoche derart erfolgreiche Gonorrhöebehandlung weniger aussichtsreich geworden sei. Den Grund hierfür erblickt man in der Sulfanilamidresistenz der Gonokokken. Zweifellos ist die Arzneiempfindlichkeit der Gonokokken veränderlich und sie lässt sich in vitro steigern (Westfal, Charles und Carpenter,<sup>376</sup> Schmith,<sup>328</sup> Domagk,<sup>79</sup> Kimmig<sup>186</sup>). Die Pathogenität der künstlich resistenter gemachten Gonokokkenstämme erscheint im Gefolge der Beobachtungen Kimmigs in einem sehr interessanten Licht. Er fand nämlich, dass der auf Cibazol enthaltendem Aszitesagar gezüchtete Gonococcusstamm nach der 17. Überimpfung oder später, während seine Arzneiverträglichkeit erheblich zunahm, seine men-

schenpathogene Eigenschaft einbüsste; die mit solchen Stämmen experimentell infizierten Menschen erkrankten nicht an Gonorrhöe. Die Einbüssung der Pathogenität war vom Cibazolgehalt des Nährbodens bedingt: die nur auf Aszitesagar gezüchteten Stämme waren selbst nach der 70. Überimpfung infektionstüchtig.

Wie erwähnt, lässt sich der Widerstand der verschiedensten Bakterien (Pneumococcus, Coli, Streptococcus, Typhus, B. paramelitensis usw.) gegenüber den Sulfanilamidderivaten durch Gewöhnung erhöhen. Dagegen fanden wir keine einzige Literaturangabe über die künstlich herbeigeführte Resistenz des Streptococcus haemolyticus. Vielleicht kann die Arzneiempfindlichkeit dieses Mikroorganismus schwerer beeinflusst werden als die der anderen Krankheitserreger. Die Versuche von *Bordás*<sup>30</sup> sprechen wenigstens für diese Annahme; er versuchte die Sulfanilamidresistenz des Stammes Richard in der Weise zu steigern, dass er die mit diesem Stamm infizierten Tiere vorsichtig mit methylsulfoxysaurem Sulfanilamidnatrium behandelte. Trotz der zahlreichen Passagen konnte in der Empfindlichkeit des Stammes keine Änderung festgestellt werden. Auch die mit splenektomierten Mäusen durchgeführten Versuche waren erfolglos. Diese Beobachtung liefert vielleicht die Erklärung dafür, dass Kliniker, meines Wissens, nie über arzneifest gewordene Streptococcusinfektionen berichteten.

Für das Resistenzproblem kommt dem Umstand, dass *die Arzneifestigkeit hinsichtlich der einzelnen Sulfanilamidderivate nicht spezifisch ist, eine ausserordentliche Wichtigkeit zu. Demnach besitzt der gegenüber einem Sulfanilamidderivat resistent gewordene Stamm einen grösseren Widerstand auch den anderen Sulfanilamiden gegenüber.* Bei dem bekannten Mechanismus der Sulfanilamidwirkung ist diese Tatsache eher selbstverständlich als überraschend, da die Sulfanilamide bekanntlich in der nämlichen Weise wirken, weshalb auch der Resistenz eine gemeinsame Ursache zugrunde liegen müsste. Die einfachste Erklärung der Arzneifestigkeit wäre durch die Annahme gegeben, dass die arzneifesten Stämme mehr p-Aminobenzoensäure erzeugen als die ursprünglichen. Wir wollen nun diese Annahme auf ihre Richtigkeit hin prüfen.

Im Kap. IV. wurde schon erwähnt, dass die Bakterien ihren Bedarf an p-Aminobenzoensäure mit wenigen Ausnahmen selbst decken. Ausser einem Hinweis auf die Ergebnisse von *Stamp*,<sup>340</sup> *Green*<sup>127</sup> und anderen ist hier auch die Frage zu besprechen, wie sich die Stoffe mit einer Antisulfanilamidwirkung in den Kulturen der einzelnen Bakteriumarten mengenmässig verteilen. *MacLeod*<sup>252</sup> prüfte in flüssigen Kulturen von empfindlichen und arzneifesten Bakterien die Frage, ob sich der Hemmstoff vorwiegend in den Bakteriumkörpern oder im Nährboden befindet. Bei den im synthetischen Nährboden gezüchteten Colibazillen fand er den Hemmstoff nur in den Zellen, die nach Abzentrifugieren zurückbleibende Flüssigkeit war vollkommen frei von dem Stoff. Diese Beobachtung wurde von *Kohn* und *Harris*<sup>197</sup> restlos bestätigt. Ähnliche Verhältnisse fand *MacLeod* im Falle des Streptococcus D (Enterococcus). Bei der Züchtung verwendete er einen Leberextraktnährboden. Ähnlich verfuhr er mit dem Pneumococcus Typ 1, dennoch fand er den Hemmstoff nicht im Bakteriumleib, sondern ausschliesslich in der Nährbodenflüssigkeit.

Ferner fand er, dass *die Kultur des resistenten Stammes mehr Hemmstoff enthielt als der ursprüngliche Stamm des Pneumococcus Typ 1*. Für diesen Fall scheint also obige Annahme gültig zu sein. Desgleichen erzeugt ein resistenter Stamm von *Bac. paramelitensis* mehr Hemmstoff als der ursprüngliche Stamm (*Green und Bielschowsky*<sup>128</sup>); dies bezieht sich aber nur auf das Zentrifugat, da die Autolysate in beiden Fällen gleich wirksam waren.

Nach *Green und Bielschowsky*<sup>128</sup> (1942) gäbe es theoretisch mehrere Wege zur Sulfanilamidresistenz eines gegebenen Stammes. 1. Der arzneifeste Stamm führt die Synthese der p-Aminobenzoensäure rascher durch als der empfindliche. 2. Die erzeugte p-Aminobenzoensäure bleibt in den Zellen eingeschlossen. 3. Die zwei Faktoren können kombiniert wirken. 4. Der arzneifeste Stamm hat einen geringeren p-Aminobenzoensäurebedarf.

Unsere 1941 veröffentlichten Versuche<sup>159</sup> haben Beweise für die Annahme geliefert, dass im Mechanismus der Sulfanilamidresistenz wenigstens zwei Faktoren mitspielen. Da uns ähnliche Versuche im Schrifttum nicht begegneten, scheint die ausführliche Besprechung unserer eigenen angebracht zu sein. Die Sulfamethylthiazolempfindlichkeit der ursprünglichen und der arzneifest gewordenen Stämme sowie der in ihrer Anwesenheit festgestellte p-Aminobenzoensäureantagonismus ist aus Tabelle 27. ersichtlich.

Tabelle 27.

*Die antagonistische Wirkung der p-Aminobenzoensäure auf Sulfamethylthiazol bei Verwendung verschiedener Staphylokokkenstämme.*

(Konzentration des Sulfamethylthiazol: mol/1000).

Bezeichnung des Stammes	Original-Stamm		Resistent-Stamm	
	Bakteriostat.-titer	Qu	Bakteriostat.-titer	Qu
Stamm B	mol/323.0.0	14	mol/10.000	220
Stamm IX	mol/480.000	31	mol/21.000	66
Stamm VI	mol/550.000	7	mol/15.000	133
Stamm X	mol/60.000	21	mol/8.300	35

Wie die Tabelle zeigt, kam es bei zwei Stämmen zu einer Aenderung des die tatsächliche p-Aminobenzoensäurewirkung ausdrückenden Qu-Wertes. 1 mol p-Aminobenzoensäure vermochte im Falle des Stammes B die Wirkung von 14 mol Sulfamethylthiazol aufzuheben, im Falle der arzneifesten Variante genügte diese Menge von p-Aminobenzoensäure für 220 mol des Präparates. Eine ähnliche Aenderung erfuhr auch der Stamm VI. Bei zwei anderen Stämmen blieb der Qu-Wert im wesentlichen unverändert.

Parallel mit diesen Versuchen bestimmten wir auch die Antisulfanilamidwirkung der resistenten Kulturen im Vergleich mit den ursprünglichen. Um den Hemmstoff aus dem Nährboden und dem Bakteriumleib gleichweise ohne Verlust erhalten zu können, wurden die im gereinigten Caseinnährboden gezüchteten Bakterien einer Kombination der Autolyse und der Ammoniumhydroxydextraktion

unterzogen. Auf diese Weise wurden hinsichtlich der Antisulfanilamidwirkung je drei ursprüngliche und arzneifeste Stämme untersucht.

Je 100 ccm Caseinnährboden wurden mit den betreffenden Stämmen beimpft und sechs Tage bei 37° bebrütet. Nun wurde den Kulturen Ammoniumhydroxyd bis zur Konzentration mol/25 gegeben und nach Versetzung mit einigen Tropfen Toluol weitere 3 Tage im Brutschrank gehalten. Nach drei Tagen wurden die Kolben 30 Minuten in ein 65° Wasserbad gestellt, die Zellen abzentrifugiert, die Flüssigkeit mit Salzsäure sorgfältig neutralisiert und über Wasserbad auf 30 ccm eingedampft. Nach Entfernung des unlöslichen Teils wurde der Extrakt bei 105° 30 Min. sterilisiert.

Zur Untersuchung des extrahierten Antisulfanilamid wurden in eine Reihe von Röhrcchen je 4 ccm Caseinnährboden, je 0,1 ccm mol/100 Sulfanilamidlösung und verschiedene Mengen der Extrakte eingetragen und nach Ergänzung des Röhrccheninhaltes auf 5 ccm mit dest. Wasser mit einigen Tausend Staphylokokken beimpft (Stamm B.) Die nach 24 Stunden abgelesenen Ergebnisse sind in Tabelle 28. enthalten.

Tabelle 28.

*Die antagonistische Wirkung der Extrakte aus verschiedenen Staphylokokkenstämmen auf Sulfanilamid.*

(Konzentration des Sulfanilamid: mol/5000).

Menge des Extrakts (ccm)	Staph. Nr IX		Staph. Nr VI		Staph. B	
	Orig.	Resist.	Orig.	Resist.	Orig.	Resist.
0,9	—	+++	—	+++	—	—
0,7	—	+++	—	+	—	—
0,5	—	+++	—	—	—	—
0,3	—	+++	—	—	—	—
0,2	—	+++	—	—	—	—
0,2	—	+	—	—	—	—
0,0	—	—	—	—	—	—

Anmerkung: Orig. = Originalstamm; Resist. = resistenter Stamm. Die kein Sulfanilamid enthaltende Kontrolle zeigt ein +++ Wachstum.

Die Tabelle zeigt, dass sich die Extrakte der einzelnen Stämme hinsichtlich der Antisulfanilamidwirkung sehr verschiedentlich verhalten. In den Extrakten der ursprünglichen Kulturen konnte eine Antisulfanilamidwirkung nicht nachgewiesen werden, hingegen war die resistente Variation des Stammes IX. äusserst wirksam. Von den zwei anderen resistenten Stämmen erwies sich nur der mit VI. bezeichnete als wirksam, seine Wirkung aber war recht gering. Die resistente Variante des Stammes B war in diesen Versuchen vollkommen unwirksam. Dies bedeutet, dass *die Sulfanilamidfestigkeit eines Staphylokokkenstammes nicht unbedingt auf einer erhöhten p-Aminobenzoesäureproduktion fusst.*

Wir müssen bemerken, dass diese Beobachtung mit der von MacLeod,<sup>252</sup> wonach von den Staphylokokkenstämmen ein Stoff mit intensiver Antisulfanilamidwirkung reichlich sezerniert wird, nicht in Einklang steht. Wir glauben aber diesen Unterschied auf technische Momente zurückführen zu können, da die Nachweisbarkeit der Antisulfanilamidwirkung einer Bakteriumkultur hochgradig von den technischen Umständen bestimmt wird. MacLeod verwendete als Nährboden

frische Leberauszüge; obwohl dieser Nährboden in seinen Vorversuchen keine Antisulfanilamidwirkung aufwies, kann das Freiwerden der evtl. gebundenen p-Aminobenzoesäure im Laufe der Bakterientwicklung nicht ausgeschlossen werden. Einen wesentlichen Unterschied bedeutet der Umstand, dass MacLeod die Antisulfanilamidwirkung der Kulturen in synthetischem Nährboden an Colibazillen prüfte, während unsere Versuche in Caseinnährboden an Staphylokokken ausgeführt wurden. Die Methode von MacLeod ist unserer Ansicht nach — hierauf wurde bereits wiederholt hingewiesen — zum spezifischen Nachweis der p-Aminobenzoesäure ungeeignet. Der Grund dafür, dass wir in der Kultur des ursprünglichen Stammes keine Antisulfanilamidwirkung nachweisen konnten, kann auch in der verhältnismässig kleinen Menge des Extraktes und des verhältnismässig grossen Sulfanilamidüberschusses liegen.

Auf Grund unserer Versuche kann der resistente Stamm des *Staphylococcus aureus* sich von dem ursprünglichen auf zweierlei Art unterscheiden: 1. Entweder erzeugt der resistente Stamm mehr p-Aminobenzoesäure als der ursprüngliche, 2. oder der resistente Stamm ist gegenüber der p-Aminobenzoesäure in gesteigertem Masse empfindlich. Diese zwei Eigenschaften können — entsprechend den einzelnen Stämmen — gesondert oder kombiniert (z. B. Stamm VI.) auftreten. Die Bedeutung der erhöhten p-Aminobenzoesäureerzeugung für die Resistenz braucht nicht dargelegt zu werden. Das Wesen der anderen Eigenschaft kann auch so bestimmt werden, dass der resistente Stamm die p-Aminobenzoesäure besser ausbeutet als der ursprüngliche. Bei der besseren Ausbeutung der p-Aminobenzoesäure kommt es wahrscheinlich darauf an, dass das Apoferment des resistenten Bakteriums eine grössere Affinität zu diesem Stoff besitzt als ursprünglich. Betrachtet man Formel (III) auf Seite 85 so wird sofort klar, dass der die Sulfanilamidwirkung ausdrückende Wert  $k_s$  von dem Synplex, den das Apoferment (P) mit dem Sulfanilamid bzw. der p-Aminobenzoesäure bildet, bzw. von der Dissoziationskonstante des Synplexes bestimmt wird. Demnach kann als variabler Faktor auch die Eigenschaft des Apofermentes eine Rolle spielen. Die nähere Natur des Apofermentes konnte noch nicht ermittelt werden, es ist aber fast bestimmt ein Stoff von Eiweisscharakter, also ein Teil des Bakteriumplasmas. Mit Rücksicht auf die hochgradige Variations- und Adaptationsfähigkeit der Bakterien dürfte demnach angenommen werden, dass das Apoferment sich entsprechend den Umständen modifiziert. Das Wesen dieser Modifizierung besteht vielleicht in einer stärkeren Affinität zur p-Aminobenzoesäure oder aber darin, dass das modifizierte Plasma mit dem Sulfanilamid einen lockereren Synplex bildet. Wie dem auch sein mag, das Ergebnis ist dasselbe: die Fermentfunktion nimmt ab, und es bedarf einer höheren Sulfanilamidkonzentration, um die Bakteriostase zustande zu bringen.

Wir sind demnach der Ansicht, dass bei der Entstehung der Sulfanilamidresistenz mehrere Faktoren mitspielen dürften: die eine ist die veränderte Zellfunktion, die gesteigerte Erzeugung von p-Aminobenzoesäure, die andere die Aenderung der Plasmastruktur, die gesteigerte Affinität zur p-Aminobenzoesäure. Die Aenderung der Struktur bzw. der Funktion kann selbständig oder kombiniert auftreten. Es ist nicht ausgeschlossen — obwohl hierfür unserer Ansicht nach nur wenig Wahrscheinlichkeit besteht — dass im Mechanismus der Sulfanilamidfestigkeit ausser diesen auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen.