

Untersuchungen zum endogenen Stoffwechsel von Mykobakterien

2. Mitt.: Über den Einfluß von Fermentinhibitoren und antituberkulös wirksamen Stoffen auf den ^{32}P -Einbau

H. IWAINSKY, H. REUTGEN und R. KALICH

Forschungsinstitut für Tuberkulose und Lungenkrankheiten Berlin-Buch
(Direktor: OMR Prof. Dr. med. habil. P. STEINBRÜCK)(Z. Naturforsch. **23 b**, 211—216 [1968]; eingegangen am 26. Juni 1967)

1. Der Einfluß von Fermentinhibitoren auf den ^{32}P -Einbau in Mykobakterien unter Bedingungen der endogenen Atmung wird untersucht.
2. Arsenat stimuliert bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen den ^{32}P -Einbau. Bei Erhöhung der Hemmstoffkonzentration wird die Incorporation des radioaktiven Isotopes durch die untersuchten Fermentinhibitoren gehemmt.
3. Ähnliche Ergebnisse werden auch beim Einsatz von antituberkulös wirksamen Stoffen erhalten. So bewirken z. B. niedrige Konzentrationen von Äthioniamid eine Stimulierung, höhere Konzentrationen eine Hemmung des Einbaues.
4. Für Isoxyl läßt sich eine eindeutige Wirkung nachweisen. Sie entspricht in ihrer Beziehung zur Konzentration der des Äthioniamides. Die Wirkung von Ethambutol ist abhängig von der Inkubationsdauer.
5. Sensible und resistente Bakterien verhalten sich unterschiedlich gegenüber dem die Resistenz verursachenden Mittel. Der ^{32}P -Einbau in die resistente Population wird kaum beeinflusst.
6. Auf Grund dieses Verhaltens wird eine Differenzierung zwischen sensiblen und resistenten Keimen versucht. Die optimalen Reaktionsbedingungen werden festgelegt.
7. Die für INH und Sm erhaltenen Ergebnisse werden denen gegenübergestellt, die mit mikrobiologischen Verfahren erhalten wurden. Das Verfahren wird zur raschen Resistenzbestimmung vorgeschlagen.

Unter Bedingungen einer endogenen Atmung wird die Sauerstoffaufnahme von Mykobakterien durch Fermentinhibitoren in gleichartiger Weise beeinflusst wie die Ruhe- und die Vermehrungsatmung. Um einen in quantitativer Hinsicht annähernd gleichen Hemmeffekt zu erzielen, muß jedoch die Inhibitormenge erhöht werden¹.

Für Tuberkulostatika ist vorwiegend ein Angriff auf sich vermehrende Bakterien postuliert worden²⁻⁵. Allerdings bewegen sich die bei dem überwiegenden Anteil der Untersuchungen angewendeten Inhibitor-Konzentrationen nur in einem für die Hemmung proliferierender Keime notwendigen Bereich. Eine zu den genannten Untersuchungen mit Fermentinhibitoren analoge Erhöhung der Hemmstoffkonzentration ist selten — dann allerdings auch mit deutlicher Wirkung — vorgenommen worden^{6, 7}.

Um einen tieferen Einblick in die Beziehungen zwischen Stoffwechsellaage und Angriff antituberku-

lös wirksamer Stoffe zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. unter welchen Bedingungen der ^{32}P -Einbau durch Fermentinhibitoren beeinflusst wird,
2. unter welchen Bedingungen der ^{32}P -Einbau durch antituberkulös wirksame Stoffe beeinflusst wird. Die bereits geklärten bzw. postulierten Wirkungsmechanismen schließen einen Eingriff unter Bedingungen der endogenen Atmung bzw. bei ruhenden Keimen nicht aus.

Durchführung der Versuche

Anzüchtung der Bakterien: Zu den Versuchen werden *Myc. tub.* var. *hominis* H₃₇Ra, H₃₇Rv und aus Patientenmaterial isolierte Stämme eingesetzt. Die Bakterien werden auf festen industriell hergestellten Nährböden (Ogawa-Medium bzw. Eigelbnährboden = modifiziertes Medium nach Gottsacker) an-

¹ G. MÜLLER, H. IWAINSKY u. K. TÄUFEL, Z. Naturforschg. **15 b**, 180 [1960].

² E. SUTER, Fortschr. Tbk.-forsch. [Basel] **3**, 210 [1950].

³ W. B. SCHAEFER, Amer. Rev. Tubercul. **69**, 125 [1954].

⁴ K. BARTMANN, Fortschr. Tbk.-forsch. [Basel] **10**, 127 [1960].

⁵ M. L. COHN, C. L. DAVIS u. G. MIDDLEBROOK, Amer. Rev. Respirat. Diseases **86**, 95 [1962].

⁶ W. TYSAROWSKI, Bull. Acad. polon. Sci., Cl. II **11**, 141 [1954].

⁷ H. IWAINSKY, H. REUTGEN u. R. KALICH, Naturwissenschaften **53**, 209 [1966].

gezüchtet und auf HOHN IV subkultiviert^{8, 9}. Im Rahmen der Sensibilitätssteste werden auch Subkulturen auf Eigelb-Medium mit LÖWENSTEIN-JENSEN-Salzlösung durchgeführt¹⁰.

Herstellung der Bakteriensuspension: Die 21–28 Tage alten Bakterien werden unter sterilen Bedingungen vom Nährboden abgenommen und in üblicher Weise¹¹ in einem 0,1-m. Citratpuffer suspendiert, größere Zellverbände durch Filtration (Glasfiliertiegel G 2, Schott & Gen. Jena) abgetrennt und die Bakterieneinsaat durch Bestimmung des Zellvolumens im Hämatokritröhrchen auf $2,4 \cdot 10^{-3}$ ml Bakterienzellvolumen/ml Bakteriensuspension eingestellt.

Markierung der Bakterien: ^{32}P wird den Keimen in Form von $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ angeboten. Die angelieferten Präparate mit wechselndem Anteil an inaktivem Phosphat werden hydrolysiert und auf eine konstante spezifische Aktivität gebracht. Fermentinhibitoren bzw. antituberkulös wirksame Stoffe werden in Form wäßriger steriler Lösungen (Sterilfiltration durch Glasfiliertiegel G 5) zugegeben und anschließend die Keime bei 37°C incubiert^{11–13}.

Auftrennung und Aufarbeitung der Bakterien: Nach beendeter Incubation werden die Bakterien durch Zentrifugieren bei 0°C vom Suspensionsmedium abgetrennt und zur Entfernung der anhaftenden Radioaktivität viermal unter Resuspension mit dest. Wasser gewaschen.

Messung der ^{32}P -Aktivität: Der ^{32}P -Einbau wird entweder durch Messung des radioaktiven Isotopes im Kulturfiltrat oder in der mit Perchlorsäure aufgeschlossenen Bakterienmasse verfolgt. Dazu werden aliquote Mengen auf Polystyrolschälchen aufgebracht, soweit notwendig neutralisiert und die Proben als Trockenpräparate mit Hilfe eines Kernstrahlungsmeßgerätes (FH 49, Friesecke & Höpfner) in Kombination mit Probenwechsler und Zeitdrucker gemessen. Die Bestimmung des Gesamt-Phosphates erfolgt kolorimetrisch nach der Methode von FISKE und SUBBAROW¹⁴ in der Modifikation von ALLEN¹⁵.

⁸ A. KREBS, Leitfaden für bakteriologische Untersuchungen bei Tuberkulose, Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1964, Kap. 17, S. 161 ff.

⁹ R. KALICH, II. Internat. Symposium über Bakteriologie und Biochemie der Mykobakterien, Berlin 21.–24. 10. 1963.

¹⁰ A. KREBS, II. Internat. Symposium über Bakteriologie und Biochemie der Mykobakterien, Berlin 21.–24. 10. 1963.

Ergebnisse

a) Einfluß von Fermentinhibitoren

Aus den Abb. 1–3 ist zu entnehmen, daß der Zusatz von Fermentinhibitoren zu einer von der In-

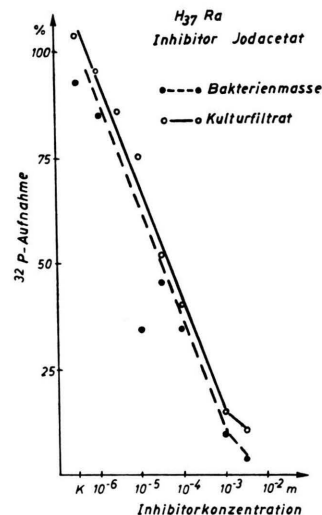


Abb. 1. Hemmung des ^{32}P -Einbaues in Mykobakterien (*Myc. tub. H₃₇Ra*) unter Bedingungen der endogenen Atmung (Inhibitor Jodacetat).

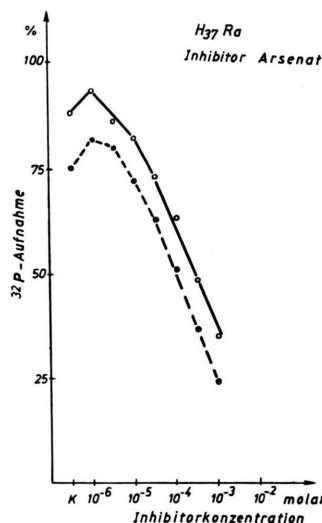


Abb. 2. Hemmung des ^{32}P -Einbaues in Mykobakterien (*Myc. tub. H₃₇Ra*) unter Bedingungen der endogenen Atmung (Inhibitor Arsenat).

¹¹ J. POKORNY, H. IWAINSKY u. H. REUTGEN, Naturwissenschaften 51, 316 [1964].

¹² H. IWAINSKY, H. REUTGEN u. J. POKORNY, Nuclear Med. [Stuttgart] 3, 426 [1963].

¹³ H. REUTGEN, Inaug.-Diss. Math.-Naturw. Fak. Humboldt-Universität, Berlin 1965.

¹⁴ C. H. FISKE u. J. SUBBAROW, J. biol. Chemistry 66, 375 [1925].

¹⁵ R. J. L. ALLEN, Biochem. J. 34, 858 [1940].

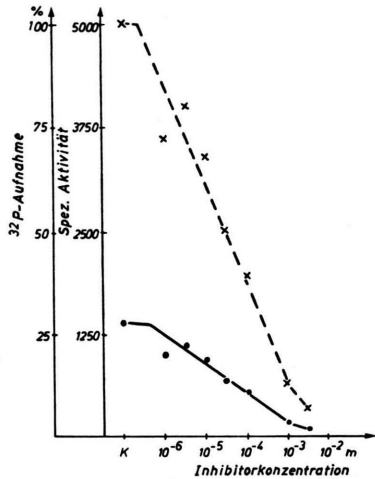


Abb. 3. Hemmung des ^{32}P -Einbaues in Mykobakterien (*Myc. tub. H₃₇Ra*) unter Bedingungen der endogenen Atmung (Inhibitor Azid).

hibitorkonzentration abhängigen Hemmung des ^{32}P -Einbaues führt. Bei niedrigen Arsenat-Konzentrationen ist eine Stimulierung der Incorporation des radioaktiven Phosphates festzustellen. Aus der gleichlaufenden Beeinflussung des ^{32}P -Einbaues und der spezifischen Aktivität ist zu entnehmen, daß es sich um Veränderungen des Stoffwechsels und nicht um eine generelle Schädigung der Bakterien handelt. Bei allen Versuchen ist eine signifikante Erniedrigung des Phosphatgehaltes und der Bakterienmasse während der gewählten Incubationszeit nicht festzustellen.

Wie bereits früher gezeigt¹², sind die Vorgänge mit gleicher Genauigkeit durch Messung der ^{32}P -Aktivität in der Bakterienmasse oder durch Bestimmung des radioaktiven Anteils im Kulturfiltrat zu erfassen (vgl. Abbn. 1 und 2). Auftretende Streuungen sind, wie die Ermittlung der spezifischen Aktivität erkennen läßt, durch Verluste beim Abtrennen der Bakterienmasse vom Kulturfiltrat (Dekantieren) bedingt.

b) Einfluß von Tuberkulostatika

Eine Veränderung des ^{32}P -Einbaues ist bei allen untersuchten antituberkulös wirksamen Stoffen – Isonicotinsäurehydrazid (INH), Streptomycin (Sm), *p*-Aminosalicylsäure (PAS), Äthioniamid* (1314 Th), Cycloserin* (Cs), Isoxyl* und Ethambutol*

* Äthioniamid = 2-Äthylisonicotinithioamid, Cycloserin = D-4-Amino-3-isoxapolidinon, Isoxyl = 4,4'-Diisoamyloxythiocarbanilid, Ethambutol = (+)-N,N'-Bis-[1-(hydroxymethyl)-propyl]-äthylendiamin.

– festzustellen. Ein 10^{-6} -m. Zusatz ist bei Sm, PAS und Cs noch ohne Effekt. Mit steigender Konzentration (geprüft 10^{-5} bis 10^{-2} -m.) wird der ^{32}P -Einbau in zunehmendem Maße gehemmt (Tab. 1 als Beispiel).

Tuberkulostatikum	eingesetzte Konzentration [— m.]	^{32}P -Einbau [Imp/min · ml]	in % zum Kontrollansatz
INH	10^{-6}	20800	135
	10^{-5}	19600	127
	10^{-4}	14600	95
	10^{-3}	9900	64
	10^{-2}	7200	47
Sm	10^{-6}	62200	108
	10^{-5}	43200	75
	10^{-4}	30200	52
	10^{-3}	26500	46
	10^{-2}	20700	36
PAS	10^{-6}	50200	109
	10^{-5}	48900	106
	10^{-4}	51400	112
	10^{-3}	34400	75
	10^{-2}	2500	5

Tab. 1. Einfluß von Tuberkulostatika auf den ^{32}P -Einbau in Mykobakterien (*Myc. tub.*, aus Patientenmaterial isolierte Stämme) unter Bedingungen der endogenen Atmung.

Bei Wiederholungsversuchen sind die Hemmquoten für PAS schwer reproduzierbar. Bei INH (vgl. Tab. 1) und Äthioniamid tritt bei niederen Inhibitor-Konzentrationen (10^{-6} bis 10^{-4} -m.), ehe es zu einer Inhibition des ^{32}P -Einbaues kommt, eine beträchtliche Stimulierung ein. Bei 24^h-Markierung ist eine gleiche Beschleunigung der Incorporation des radioaktiven Isotopes auch bei Isoxyl nachweisbar (vgl. Abb. 4), wird dagegen die Incubation auf 48^h

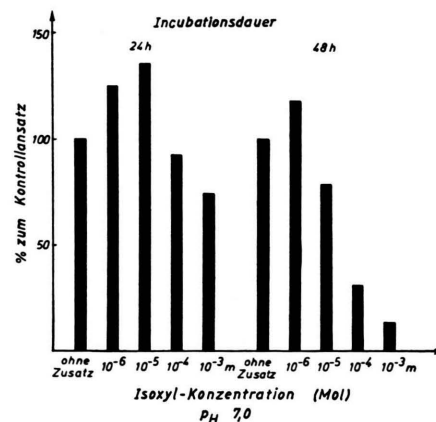


Abb. 4. Einfluß der Isoxyl-Konzentration auf den ^{32}P -Einbau in Mykobakterien unter Bedingungen der endogenen Atmung.

ausgedehnt, dann manifestiert sich der Eingriff in den Stoffwechsel vorwiegend als Hemmung.

Die Wirkung des Ethambutols ist relativ gering und wie Abb. 5 zeigt von der Einwirkungsdauer abhängig. Der stärkste Effekt ist bei 8-stdg. Incubation erreicht. Danach wird die Differenz zwischen dem Kontrollansatz und der Ethambutol enthaltenden Probe wieder geringer.

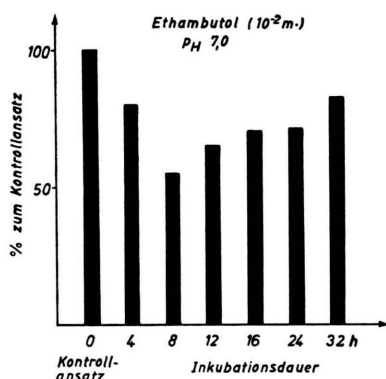


Abb. 5. Einfluß der Incubationszeit auf den ^{32}P -Einbau in Mykobakterien in Gegenwart von Ethambutol.

c) Einfluß antituberkulös wirksamer Stoffe auf Arzneimittel-sensible und -resistente Mykobakterien

Aus den Ergebnissen ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob es sich bei der Hemmung des ^{32}P -Einbaues um einen unspezifischen, allgemein toxischen Effekt oder um einen spezifischen — der antituberkulösen Wirkung im Proliferations-Stadium analogen — Eingriff in die Bakterienzelle handelt. Werden aber Arzneimittel-sensible und -resistente Stämme vergleichend untersucht, dann antworten beide Populationen in unterschiedlicher Weise auf die Einwirkung des antituberkulös wirksamen Mittels. Wie Abb. 6 als Beispiel für Sm erkennen läßt, bleibt der ^{32}P -Einbau bei den resistenten Keimen im geprüften Konzentrationsbereich weitgehend unbeeinflusst, während der sensible Stamm mit fortschreitender Erhöhung des Sm-Zusatzes eine annähernd proportionale Inhibition der ^{32}P -Incorporation erkennen läßt.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Einsatz der Mittel INH, PAS, 1314 Th und Cs erzielt werden. Es handelt sich demnach bei den unter b geschilderten Versuchen um einen für das jeweilige Mittel spezifischen Eingriff in den Phosphatstoffwechsel der Mykobakterien, der von dem gegenüber diesem Mittel sensiblen und resistenten Stamm in unterschiedlicher Weise beantwortet wird.

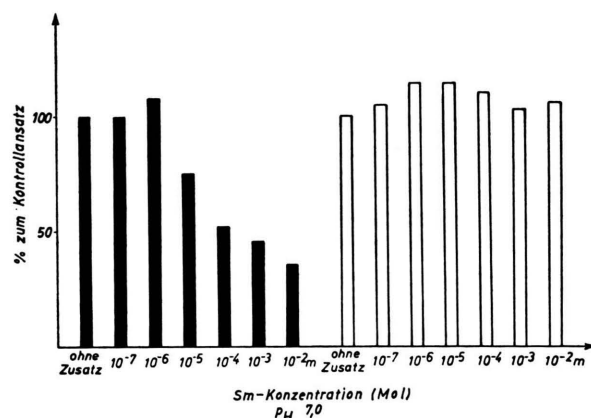


Abb. 6. ^{32}P -Einbau in Sm-sensible und -resistente Mykobakterien in Gegenwart von Sm. ■ Sm-sensibler Stamm, □ Sm-resistenter Stamm.

Wird auf Grund dieses Verhaltens eine Differenzierung zwischen sensiblen und resistenten Keimen versucht, dann können zur Erhöhung der Treffsicherheit die sich ergebenden Differenzen durch Variation des pH-Wertes des Suspensionsmediums oder der Incubationszeit vergrößert werden. Veränderungen des pH-Wertes über den Bereich von 5 bis 7 hinaus oder eine Verlängerung der Incubationszeit über 48 h sind aber wenig zweckmäßig. Bei pH-Werten um 4 verwischen bei erhöhter Einbaureate die Differenzen zwischen sensiblen und resistenten Keimen. Bei einer Incubationsdauer von 70 h und mehr kommt es zu deutlichen Autolyseerscheinungen. In Tab. 2 sind die für die Testung der einzelnen Mittel als zweckmäßig erkannten Reaktionsbedingungen wiedergegeben.

Zur Differenzierung zwischen sensiblen und resistenten Populationen kann folgendermaßen vorgegangen werden: Eine Suspension der zu untersuchenden Keime wird unter entsprechenden, aus Tab. 2 zu entnehmenden Bedingungen mit ^{32}P incubiert, nach

Tuberkulostatikum	Incubationszeit [h]	pH-Wert des Mediums
INH	24	5,0
Sm	48	7,0
1314 Th	48	5,0
PAS	24	6,0
Cycloserin	36	5,5
Isoxyl *	48	7,0

Tab. 2. Reaktionsbedingungen (Incubationszeit und pH-Wert) für die Differenzierung zwischen arzneimittelsensiblen und -resistenten Mykobakterien (eingesetzte Tuberkulostatika-Konzentrationen 10^{-2} - und 10^{-6} -m.). * Mittel in äthanolischer Lösung und 10^{-3} -m. Konzentration eingesetzt.

Ablauf der festgelegten Zeit zentrifugiert oder mit Hilfe eines Glasfildertiegels (G 5) filtriert. Im Überstand bzw. im Filtrat wird die ^{32}P -Aktivität bestimmt und durch Differenzbildung die ^{32}P -Aufnahme berechnet. Der Quotient der zwei erhaltenen Werte (Einbau bei 10^{-6}-m. Zusatz/Einbau bei 10^{-3} bzw. 10^{-2}-m. Zusatz) stellt ein Maß für die Beeinflussung durch das Mittel dar. Er liegt bei sensiblen Stämmen über 1, bei resistenten Populationen um oder unter 1. In den Abbn. 7 und 8 werden die mit mikrobiologischen Methoden (Vertikaldiffusionstest, in

Einzelfällen Reihenverdünnungstest¹⁶⁻¹⁸) und dem geschilderten Verfahren erhaltenen Ergebnisse bei der Resistenzbestimmung verglichen.

Wie aus Abb. 7 zu entnehmen ist, differieren von 36 Untersuchungen zur INH-Resistenz bei Festlegung eines Grenzwertes von 1,2 die Werte in 4 Fällen von den auf mikrobiologischem Wege ermittelten Urteilen. Stämme mit verminderter Empfindlichkeit (schwach resistent) gegenüber INH verhalten sich wie INH-resistente Populationen. Bei Sm ergeben sich, wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, zwischen sensiblen Keimen und Populationen mit verminderter Empfindlichkeit keine Unterschiede. Eine Abgrenzung der resistenten Stämme ist aber bei der Annahme eines Faktors von 1,8 als Grenzwert möglich. In 9 von 72 Untersuchungen stimmen die Ergebnisse nicht mit den bakteriologischen Befunden überein.

Auswertung der Ergebnisse

Fermentinhibitoren wirken unter Bedingungen der endogenen Atmung in gleichartiger Weise wie auf ruhende oder sich vermehrende Bakterien. Ihr Einfluß ist mit Hilfe der Messung des Gasaustausches¹⁹ ebenso zu erfassen wie an Hand der ^{32}P -Aufnahme. Im allgemeinen hemmen die untersuchten Fermentinhibitoren in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration den ^{32}P -Einbau. Beim Einsatz von Arsenat kommt es aber bei niedrigen Konzentrationen zu einer Stimulierung, ehe bei Erhöhung der Konzentration der Hemmeffekt in den Vordergrund tritt.

Angesichts der aus der Literatur zu entnehmenden Postulate ist die gute Erkennbarkeit des Einflusses antituberkulös wirksamer Substanzen überraschend. Bei niedrigen Konzentrationen von INH, Äthionamid und Isoxyl tritt wie nach Zusatz von Arsenat eine Erhöhung des Einbaues ein. Auf die generellen Aspekte dieses auch bei anderen Objekten und Hemmstoffen beobachteten Phänomens ist kürzlich von RAUEN und NORPOTH²⁰ hingewiesen worden. Bei Isoxyl kommt die mit anderen Methoden gezeigte Wirksamkeit^{21, 22} auch unter diesen Bedingungen

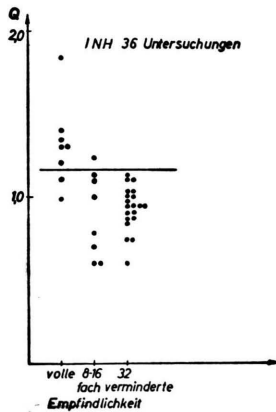


Abb. 7. ^{32}P -Einbau INH-sensibler und -resistenter Stämme in Gegenwart von INH.



Abb. 8. ^{32}P -Einbau Sm-sensibler und -resistenter Stämme in Gegenwart von Sm.

¹⁶ A. SCHMIEDEL, Beitr. Klin. Tuberkul. **112**, 475 [1954].

¹⁷ A. SCHMIEDEL, Z. Tuberkulose **112**, 48 [1958].

¹⁸ A. KREBS, Leitfaden für bakteriologische Untersuchungen bei Tuberkulose, Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1964, Kap. 9, S. 81.

¹⁹ G. MÜLLER, Inaug.-Diss. Math.-Naturw. Fak. Humboldt-Universität, Berlin 1959.

²⁰ H. M. RAUEN u. K. NORPOTH, Arzneimittel-Forsch. **16**, 1001 [1966].

²¹ J. MEISSNER, Beitr. Klin. Tuberkul. **132**, 322 [1965].

²² H. U. GUBLER, G. FAVEZ, N. BERGIER, J.-M. MAILLARD u. T. FRIEDRICH, Beitr. Klin. Tuberkul. **133**, 126 [1966].

deutlich zum Ausdruck. Die bisher bei Ethambutol gefundene Beziehung zwischen Einwirkungsdauer und Wirksamkeit²³ läßt sich unter den Bedingungen der endogenen Atmung bestätigen.

Die Grenzen des experimentellen Vorgehens sind relativ eng. Eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 4 hat zwar einen verstärkten ³²P-Einbau zur Folge, die Unterschiede zwischen Arzneimittel-sensiblen und -resistenten Stämmen sind dann aber weitgehend aufgehoben. Ein Ausschalten bestimmter Regulationsmechanismen könnte dafür die Ursache sein²⁴. Die Markierungszeit ist so kurz wie möglich zu halten, da die in einem Mangelmedium sich befindenden Keime zunehmend an verwertbaren Substanzen verarmen. Verbunden damit ist ein Absinken der Geschwindigkeit des ³²P-Einbaues. Bei einer Ausdehnung der Markierungszeit über 72^h hinaus ist außerdem ein zunehmender Zellzerfall festzustellen.

Das unterschiedliche Ansprechen sensibler und resistenter Keime bei Einwirkung des die Resistenz bedingenden Mittels entspricht den allgemeinen Vorstellungen über die Resistenzausbildung. Zu entsprechenden experimentellen Ergebnissen kam TRNKA²⁵ bei Untersuchungen über den ³²P-Einbau in die Nucleinsäuren bei *Myc. tub.* unter der Wirkung von INH.

Biologische Methoden zur Resistenzbestimmung haben den Vorteil, daß sie nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip das Wachstum der sensiblen Population völlig unterbinden können. Bei den vorliegenden Verfahren ist versucht worden, durch möglichst genaue Bestimmung der nur in quantitativer Hinsicht bei der Resistenzausbildung erfolgten Stoff-

wechseleränderungen diesen Vorteil auszugleichen. Hierzu ist die Untersuchung des von allen antituberkulös wirksamen Substanzen mittel- oder unmittelbar beeinflussten Phosphatstoffwechsels^{26–28} sehr geeignet, zumal das dabei als Indikator eingesetzte Isotop ³²P außerordentlich empfindlich ist und wenig meßtechnische Probleme aufwirft.

Unter Beachtung bestimmter Kriterien wurde die Leistungsfähigkeit dieses Vorgehens bei routinemäßiger Überprüfung der Resistenz gegenüber INH und Sm erprobt. Die Zahl der Versager bewegt sich in dem bei biologischen Methoden üblichen Rahmen²⁹. Entsprechend der bei INH-Resistenz registrierten starken Veränderungen des Stoffwechsels^{30–35} verhalten sich bei diesem Test Stämme mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber INH wie resistente Populationen. Die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Sm hat dagegen erst bei hohen Resistenzgraden deutlicher werdende Veränderungen des Phosphatstoffwechsels zur Folge. Populationen mit verminderter Empfindlichkeit verhalten sich noch wie sensible Keime. Damit ist über die sich für Stoffwechseluntersuchungen an Mykobakterien ergebenden Möglichkeiten hinaus ein Weg zu einer rasch durchführbaren Resistenzbestimmung (Incubationsdauer maximal 48^h) geöffnet. Er weist allerdings hinsichtlich der Einordnung von Stämmen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Sm nicht die gleichen Möglichkeiten auf wie eine mehrere Wochen dauernde mikrobiologische Bestimmung.

Frl. I. SESSER, Herrn C. BERNHARDT und Herrn G. HOINKIS sei auch an dieser Stelle für die verantwortungsbewußte und freudige Mitarbeit gedankt.

²³ M. FORBES, E. A. PEETS, N. A. KUCK, Effect of Ethambutol on Mycobacteria, Academic of Sciences, New York 1966, S. 726.

²⁴ Vgl. J. O. LAMPEN, E. R. MORGAN u. A. SLOCUM, J. Bacteriol. **74**, 297 [1957].

²⁵ L. TRNKA, Vortrag auf dem 2. Internat. Symposium „Über die Anwendung radioaktiver Isotope in der Tuberkulose-Forschung“, Forschungsinstitut Borstel 1. u. 2. 10. 1965.

²⁶ H. POPE, Amer. Rev. Tubercul. **73**, 735 [1956].

²⁷ P. R. J. GANGADHARAM, F. M. HAROLD u. W. B. SCHAEFER, Nature [London] **198**, 712 [1963].

²⁸ M. TSUKAMURA, S. TSUKAMURA, S. MIZUNO u. E. NAKANO, Amer. Rev. Respirat. Diseases **89**, 933 [1964].

²⁹ A. SCHMIEDEL, Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Lungenkrankheiten und Tuberkulose und der Arbeitsgemeinschaft Bronchologie in der DDR, Berlin 12. – 14. 4. 1967.

³⁰ B. KREIS, Fortschr. Tbk.-forsch. **IX**, 178 [1958].

³¹ M. O. TIRUNARAYANAN u. W. A. VISCHER, Naturwissenschaften **43**, 476 [1956].

³² E. FREERKSEN u. G. MEISSNER, XIV. Conf. int. Tubercul. Bull. Un. int. Tubercul. **26**, 248 [1956].

³³ R. BÖNICKE, Naturwissenschaften **44**, 619 [1957].

³⁴ R. BÖNICKE, Beitr. Klin. Tubercul. **117**, 171 [1957].

³⁵ C. J. WOODS, Amer. Rev. Respirat. Diseases **84**, 913 [1961].