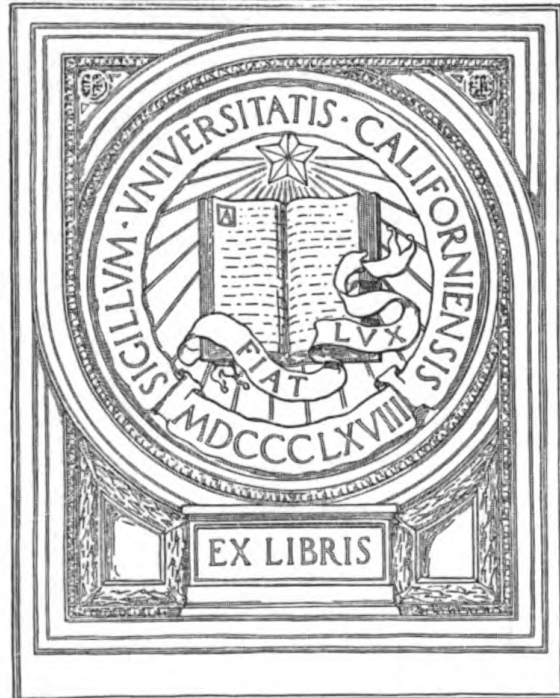


UC-NRLF



B 3 789 188

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



Gift of
HOOPER FOUNDATION

ZENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel,
Geh. Obermed.-Rat in Jena

Prof. Dr. R. Pfeiffer
Geh. Med.-Rat in Breslau

und

Prof. Dr. M. Braun
Geh. Reg.-Rat in Königsberg

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm und Präsident Dr. A. Weber
Geh. Reg.-Rat in Bamberg in Dresden

Erste Abteilung. 86. Band

**Medizinisch-hygienische Bakteriologie
und tierische Parasitenkunde**

Originale

Mit 65 Abbildungen im Text und 5 Tafeln



Jena

**Verlag von Gustav Fischer
1921**

WUJ 370 VIBS
1774 9 2001 7

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 1.

Ausgegeben am 15. März 1921.

Nachdruck verboten.

Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen¹⁾.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Universitäts-Institutes in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. M. Neisser).]

I. Mitteilung.

Die Nahrungsbedürfnisse des Paratyphus B-Bazillus; sein Wachstum und seine Eigenschaften beim Aufbau aus einfachen chemischen Verbindungen.

Von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Im Reiche der Bakterien spielt der Stoffwechsel für die Forschung eine noch viel bedeutsamere Rolle als bei allen anderen Lebewesen. Schon für die Unterscheidung der einzelnen Arten muß hier im Gegensatz zur Zoologie und Botanik weniger die Form, als besonders die physiologische Leistung herangezogen werden; was für Pflanze und Tier die anatomische Zergliederung des Körpers bedeutet, das ist für die Bakterien die physiologische Zergliederung des Stoffwechsels: denn dieser ist bei ihnen häufig die einzige prüfbare Lebensäußerung. Trotzdem kennen wir bei den pathogenen Bakterien meist nur die Endresultate, nicht den Ablauf der Stoffwechselprozesse. Denn das ganze bakteriologische Arbeiten baut sich auf den von Pasteur, Robert Koch und ihren Schülern angegebenen Nährböden und Züchtungsmethoden auf; diese Nährböden aber sind so kompliziert und, da sie aus Fleisch oder anderen tierischen Stoffen bereitet werden, in ihrer Abhängigkeit vom jeweiligen Ausgangsmaterial so wenig konstant zusammengesetzt, daß dadurch die chemischen Verhältnisse des Bakterienstoffwechsels unübersichtlich werden. Wo so viele und zum Teil in ihrer chemischen Struktur unbekannt Substanzen im Spiele sind, ist ein Einblick in die Ernährungsbedürfnisse der Bakterien und den Ablauf ihres Stoffwechsels entweder überhaupt nicht oder nur für einzelne Phasen möglich. Deshalb wissen wir auch über den Stoffwechsel der pathogenen Bakterien und besonders über ihre synthetischen Fähigkeiten bisher nur recht wenig. Was wir in solchen Nährböden beobachten können, sind vor allem Vorgänge dissimilatorischer Art.

Aus diesen Gründen hat sich schon Pasteur²⁾ bei seinen Untersuchungen über die Gärung Nährböden hergestellt, die einfach gebaute Substanzen als Stickstoff- und

1) Eine Uebersicht über diese Versuchsergebnisse wurde in der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte, Oktober 1920 in Bad Nauheim vorgetragen.

2) Pasteur, zitiert nach Friedberger u. Reiter, Handb. d. pathog. Mikroorgan. v. Kolle u. Wassermann. Bd. 1. 1912.

Kohlenstoffquelle enthielten. Ihm sind die Botaniker Naegeli¹⁾ und Ferdinand Cohn²⁾ mit ihren Untersuchungen über Pilze und Bakterien gefolgt. Uschinsky³⁾ hat dann mit seinen Züchtungsversuchen in eiweißfreien Nährböden, trotzdem seine Resultate zum Teil nicht bestätigt werden konnten, den Anstoß zu neuen Untersuchungen gegeben. So haben Kühne⁴⁾ und dann aus dem Institut von Robert Koch in einer chemisch wie bakteriologisch besonders sorgfältigen und systematischen Form Proskauer und Beck⁵⁾, Capaldi und Proskauer⁶⁾ und schließlich C. Fränkel⁷⁾ auf diesem Gebiet erfolgreich weiter gearbeitet.

Während aber seitdem die Ernährungsphysiologie der nicht pathogenen Bakterien auf das gründlichste bearbeitet worden ist und zu wichtigsten biologischen Beobachtungen und praktischen Ergebnissen z. B. für die Agrikultur geführt hat, sind solche Untersuchungen an pathogenen Keimen meist nur vom Standpunkt der Differentialdiagnose der Bakterien angestellt worden. Auf alle die zahlreichen Angaben über Züchtungen von pathogenen und nicht pathogenen Keimen in einfachen Nährböden hier einzugehen, ist uns unmöglich. Die notwendige Kürze verbietet eine Diskussion der öfters widerspruchsvollen Resultate, zumal sie an verschiedenen Bakterienarten und in verschiedenen zusammengesetzten Nährböden gewonnen wurden und also gar nicht vergleichbar sind. Zahlreiche in der Mikrobiologie aufgetauchte neuartige Fragestellungen, wie z. B. gewisse Immunitätsprobleme, sind mit diesen Züchtungsversuchen noch kaum in experimentellen Zusammenhang gebracht worden. Und doch ergaben sich von vornherein schon rein logischer Weise aus der Züchtung in Nährböden mit wenigen chemisch bekannten Substanzen zahlreiche Ausblicke.

Wir entschlossen uns deshalb, die Frage der Ernährungsphysiologie der pathogenen Bakterien einer systematischen Bearbeitung zu unterziehen. Unser Plan war, zunächst die Ernährungsbedürfnisse einer Bakterienart und ihrer Verwandten eingehend zu studieren. Wir wendeten uns zunächst der Aufgabe zu, das für eine Bakterienart Unentbehrliche und dieses in der einfachsten chemischen Form festzustellen.

Für diese Versuche haben wir den Paratyphus B-Bazillus gewählt; denn er gilt als ein in künstlich zusammengesetzten Nährgemischen züchtbares Bakterium. Er zeigt in den üblichen Nährböden wohlcharakterisierte Eigenschaften: seine Beweglichkeit, sein Vermögen, Kohlehydrate zu spalten, seine Pathogenität und Giftbildung sollten unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen geprüft werden; außerdem gelten die Typhus-, Paratyphus-, Coli-Bazillen als seine näheren und ferneren Verwandte, und wir wollten deren Gemeinsamkeiten und Verschiedenheiten bei differenten Ernährungsverhältnissen untersuchen.

Allgemeines über die Methodik.

Um dem Leser die Beurteilung unserer Versuche zu ermöglichen, müssen wir genauere Angaben über die Methodik machen. Der Plan, sich Nährböden zu verschaffen, die lediglich nach Qualität und Quantität bekannte chemische Stoffe enthalten, verlangt peinlichste Reinheit aller Nährbodenbestandteile und aller mit diesen in Berührung kommenden Gegenstände. Denn wir wissen ja, welche Spuren, z. B. von

- 1) Naegeli, Unters. üb. niedere Pilze. München-Leipzig 1882.
- 2) Cohn, Beitr. z. Biol. d. Pflanz. 1872.
- 3) Uschinsky, Centralbl. f. Bakt. Bd. 14. Nr. 10.
- 4) Kühne, Zeitschr. f. Biol. Bd. 30.
- 5) Proskauer u. Beck, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 18. 1894.
- 6) Capaldi u. Proskauer, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 23. 1896.
- 7) Fränkel, C., Hyg. Rundsch. 1894. Nr. 17.

Metallen, schon für das Bakterienwachstum eine Rolle spielen. Alle benützten Salze stammen in der reinsten käuflichen Form von der Firma Merck in Darmstadt, zum Teil noch aus den Jahren 1913—1915. Dem verwendeten Wasser schenken wir besondere Aufmerksamkeit; das übliche destillierte Wasser wurde noch 2mal in Glasgefäßen und dieses dann zum dritten Mal in einem Bergkristallapparat destilliert und in sorgfältig gereinigten Gefäßen aus Jenaer Glas aufgefangen; damit sind wir an die Grenze der zurzeit möglichen Maßnahmen zur Erlangung reinen Wassers herangekommen. Trotzdem kann nicht behauptet werden, daß nicht Spuren von aus dem Glase gelösten Stoffen, wie z. B. Magnesium und Eisen, und die unvermeidlichen Verunreinigungen auch der allerreinsten Chemikalien in den Nährlösungen vorhanden gewesen seien, und wir werden uns hüten, in dieser Beziehung zu weitgehende Schlüsse zu ziehen.

Die als Nährstoffe dienenden Substanzen wurden genau abgewogen, in dem Wasser gelöst und durch 1-stündiges Kochen sterilisiert. Dabei ist natürlich darauf zu achten, daß nicht Stoffe zusammengegeben werden, die beim Kochen miteinander in Reaktion treten; solche chemischen Umsetzungen lassen sich dadurch vermeiden, daß man die Substanzen einzeln sterilisiert und erst nach dem Erkalten zusammen gießt, Trübungen der Nährböden durch Ausfällungen schwerlöslicher Salze sind gelegentlich unvermeidbar, wie z. B. beim Zusammentreffen von Natriumsulfat und Kalziumchlorid. Wir haben solche Niederschläge durch kleine eingebrachte Mengen der löslichen Salze möglichst verringert, sie im übrigen aber am Boden der Vorratskolben dauernd mit der Flüssigkeit in Berührung gelassen. Durch vorsichtiges Abgießen vom Bodensatz in die zur Züchtung benützten Gefäße haben wir auch in diesen Fällen völlig wasserklare Nährlösungen vor uns gehabt.

Besonders sorgfältig muß in diesen Nährböden auf die Reaktion geachtet werden. Optimal ist für den Paratyphus B-Bazillus und fast alle anderen untersuchten Bakterien, wie in Bouillon, ein Gehalt von 7 pro Mille einer Normalsodalösung vom Lackmusneutralpunkt ab. Geht der Alkaligehalt auch nur wenig darüber hinaus, so verschlechtert sich in diesen Nährböden das Wachstum der allermeisten Bakterien sehr schnell und hört bald ganz auf.

Am besten geht man so vor, daß man vor dem Sterilisieren, evtl. die getrennt zu sterilisierenden Teile einzeln für sich, mit dem reinsten Natriumbikarbonat in Substanz genau gegen Lackmus neutralisiert. Solchen Substanzen, die beim Kochen mit Soda lösung zersetzt werden, z. B. den Nitriten, darf diese erst nach der Sterilisation zugesetzt werden. Nach 1-stündigem Kochen werden mit steriler Pipette 7 ccm vorher keimfrei gemachter Normalsodalösung einem Liter Nährboden zugefügt.

Das Natriumbikarbonat erwies sich dafür am zweckmäßigsten; wollten wir das Karbonat als solches ausschalten, dann haben wir Normalnatron- oder Normalkalilauge benützt, doch treten hierbei sehr bald nach Ueberschreiten des Alkaleszenzoptimums Entwicklungshemmungen der Bakterien auf. — So gestaltet sich, trotzdem einige Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden müssen, die Herstellung dieser Nährböden sehr einfach und rasch; sie sind in etwa 1 $\frac{1}{2}$ Std. gebrauchsfertig.

Bei der erstmaligen Beimpfung dieser aus Stoffen bekannter chemischer Struktur zusammengesetzten Nährböden aus den üblichen Fleischbouillonährböden muß man darauf bedacht sein, möglichst wenig Nährmaterial mitzuübertragen. Deshalb haben wir nur vom festen gewöhnlichen Nähragar aus überimpft. Die erste Einsaat darf aber auch nicht zu klein sein, weil bekanntlich zahlreiche Keime bei der Uebertragung in ein ganz andersartiges Kulturmedium absterben.

Es hat sich uns aus diesem Grunde am besten bewährt, eine Platinöse zuerst durch Eintauchen in den zu beimpfenden flüssigen Nährboden mit Flüssigkeit zu füllen; durch rasches Auftupfen dieser Oese auf den Rasen eines Schrägagarröhrchens bildet sich in der Flüssigkeitlamelle eine feine Bakterienemulsion; damit haben wir unsere einfachen Nährböden beimpft. Beim Anlegen von Passagen in diesen einfachen künstlichen Nährböden genügen 1—2 Oesen als Einsaat.

Die Bebrütung erfolgte in der Regel bei 37°. Da wir aus später eingehend zu besprechenden Gründen nicht in Reagenzröhrchen, sondern mit geringen Flüssigkeitsmengen in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen arbeiteten, mußten die Nährböden, besonders bei längerer Bebrütung, vor Eintrocknung geschützt werden, wodurch sich ja die Konzentration der Nährstoffe und ganz besonders die Reaktion verändern würden. Die Kölbchen wurden deshalb in dickwandigen Glasbehältern, deren Boden mit wassergetränkter Watte ausgelegt war, aufeinandergebaut, und damit, abgesehen von der bedeutenden Platzersparnis im Brutschrank, der Wasserverlust in genügendem Maße verhindert.

Das Bakterienwachstum gibt sich an einer Trübung der wasserklaren Nährböden zu erkennen, die von Opaleszenz bis zu milchiger Aufschwemmung mit dichtem Bodensatz fortschreitet. Da es sich um flüssige Nährböden handelt, ist die

Möglichkeit bakterieller Verunreinigung besonders leicht gegeben. Wir müssen bei jedem Versuch sicher sein, eine Reinkultur der eingesäten Keime vor uns zu haben. Der Reinheit haben wir uns durch morphologische und kulturelle Prüfung vergewissert; die aus unseren flüssigen Nährböden zu diesem Zwecke beimpften Agarplatten haben wir bei 37° und 22° bebrütet, da gelegentlich verunreinigende Luftkeime bei 37° zu langsam wuchsen, so daß sie unbemerkt bleiben konnten, während sie sich bei 22° schnell vermehrten. Die geringste Verunreinigung durch fremdartige Keime kann die Ernährungsbedürfnisse einer Bakterienart auch in künstlichen Nährlösungen im günstigen Sinne ändern, wie wir das schon bei den üblichen Nährböden, z. B. von Influenzabazillen wissen, die sich nur zusammen mit Staphylokokken und Xeroebazillen auf gewöhnlichem Nähragar vermehren [Grassberger¹⁾, M. Neisser²⁾]. Außer der Reinheitsprüfung haben wir in jedem Versuch die herangewachsenen Bakterien kulturell und event. auch serologisch identifiziert.

Trotz der erhöhten Gefahr solcher bakteriellen Verunreinigungen haben wir diese systematischen Versuche ausschließlich mit flüssigen Nährböden ausgeführt; denn nur da kann man chemisch-reine Verhältnisse annehmen.

Die viel bequemeren festen Nährböden lassen sich so herstellen, daß man Stangenagar mehrere Tage lang mit oft. gewechseltem destilliertem Wasser extrahiert und dann zu 2 $\frac{1}{2}$ Proz. dem flüssigen Nährboden zusetzt. Solche Nährsubstanzen, die das hierbei notwendige längere Kochen nicht vertragen, müssen für sich kurz sterilisiert und später zugesetzt werden. Wir haben prinzipielle Unterschiede zwischen diesen festen, agarhaltigen und flüssigen Nährböden von sonst gleicher Zusammensetzung, die auf irgendwelche wachstumbeeinflussende Beimengungen des von uns benutzten Stangenagars schließen lassen, nicht beobachtet. Trotzdem haben wir feste Nährböden nur zu Ergänzungsversuchen herangezogen, um von vornherein der Gefahr, mit dem Agar chemische Verunreinigungen zugesetzt zu haben, zu entgehen.

Die Ernährungsbedürfnisse des Paratyphus B-Bazillus.

Alles Unentbehrliche findet der Paratyphus B-Bazillus bereits in einem aus wenigen einfachen Substanzen zusammengesetzten Nährboden.

Er kommt aus mit

Sauerstoff der Luft,
 0,5 Proz. Kochsalz,
 0,2 „ Kaliumbiphosphat,
 0,6 „ Ammoniumlaktat in Wasser.

Bei der Herstellung dieses Nährbodens geht man am besten so vor, daß man Kochsalz und Kaliumbiphosphat z. B. in 75 ccm Wasser löst, diese saure Lösung mit Natriumbikarbonat neutralisiert, ferner das schwachsaure Ammoniumlaktat in 25 ccm Wasser, ohne es zu neutralisieren, löst, beide Lösungen 1 Std. durch Kochen sterilisiert und nach dem Erkalten zusammengießt; dann stellt man mit steriler Normalsodalösung wieder lackmus-neutrale Reaktion her und gibt dazu noch 0,7 ccm Normalsodalösung.

Das milchsaure Ammonium und das Kaliumbiphosphat finden sich häufig bereits in den früher angegebenen Nährgemischen, nur sind dort noch andere Stickstoff- oder Kohlenstoffverbindungen gleichzeitig vorhanden. Wir wissen bereits aus älteren Arbeiten, z. B. von Fischer³⁾, daß die Bakterien der Paratyphus-Coli-Gruppe mit Ammoniumsalzen als einziger Stickstoffverbindung auskommen können.

Zu diesen Züchtungsversuchen wurden 6 Stämme, die teils aus Stühlen, teils aus Blut frisch gezüchtet waren, und außerdem ein alter, von Prof. Schottmüller in Hamburg stammender Laboratoriumsstamm benutzt. Alle 7 Stämme waren kulturell und serologisch typisch. Sie zeigten, wie vorweg genommen werden mag, unter den

1) Grassberger, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 25. 1897.

2) M. Neisser, Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 29. 1903.

3) Fischer, A., Vorlesung. üb. Bakterien. Jena 1903.

eben angeführten und den später zu besprechenden Ernährungsbedingungen untereinander gleiches Verhalten.

In dem oben angegebenen Nährboden sind das Kochsalz und das Kaliumbiphosphat die einzigen mineralischen Bestandteile, das Ammoniak ist die einzige Stickstoffquelle, die Milchsäure die einzige Kohlenstoffquelle. Wir haben also ernährungsphysiologische Verhältnisse von größter Durchsichtigkeit vor uns. Diese einfachen künstlichen Nährböden mögen der Kürze halber unter Weglassung des in jedem derartigen Nährboden enthaltenen Kochsalzes und Kaliumbiphosphates nach der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle benannt werden; demnach ist dieser erste Nährboden als „Milchsäure-Ammoniaknährboden“ zu bezeichnen.

Der Paratyphus B-Bazillus wuchs in einem mit diesem Nährboden beschickten Reagenzröhrchen an der Oberfläche, und die Flüssigkeit trübte sich in der Tiefe nur langsam, eine Beobachtung, die bei anderen Bakterien und in anderen zum Teil ähnlichen Nährböden, z. B. Fränkel¹⁾ und van Loghem²⁾ gemacht haben. Gleichzeitig fiel auf, daß auf einem Schrägagarröhrchen mit den gleichen Nährstoffen ein üppigeres Wachstum als in der Flüssigkeit stattfand. Dies letztere konnte natürlich in irgendwelchen wachstumsbefördernden Agarverunreinigungen seinen Grund haben; bald aber erwies sich, daß die ungehemmte Sauerstoffzufuhr an der Oberfläche des festen Nährbodens der Grund für das ausgiebigere Wachstum war. Denn es stellte sich heraus, daß der Paratyphus B-Bazillus in diesem Nährboden ohne freien Sauerstoff überhaupt nicht gedeihen kann. Versucht man, ihn im flüssigen Milchsäure-Ammoniaknährboden unter anaëroben Verhältnissen, z. B. unter Pyrogallol-Kalilauge, zu züchten, so tritt auch nach wochenlanger Bebrütung kein Wachstum ein. Oeffnet man aber nach einigen Tagen das Gefäß, so daß der Luftsauerstoff wieder Zutritt hat, so beginnt das Bakterium alsbald zu wachsen. Auch in einer aus diesem Nährboden hergestellten Agarschüttelkultur vermehren sich die Keime nur an der Oberfläche, nicht aber in der Tiefe. So wird unter diesen Ernährungsbedingungen der als fakultativer Anaërobier bekannte Paratyphus B-Bazillus zu einem strengen Aërobier.

Da wir aus diesen Versuchen erkannten, welche Bedeutung der Sauerstoff für das Bakterienwachstum in diesen einfachen Nährböden hat, suchten wir seine Zufuhr zu erhöhen; wir lernten ihn durch die Höhe der Flüssigkeitsschicht gewissermaßen zu dosieren. Am Boden kleiner 50 oder 100 ccm fassender Erlenmeyer-Kölbchen breiteten wir ungefähr 5 ccm des flüssigen Nährbodens zu einer etwa 1 cm hohen Schicht aus. Erst mit diesem Kunstgriff gelang es, in diesen einfachen Nährböden ein wirklich üppiges und schnelles Wachstum, ähnlich dem in einer Bouillon, zu erzielen; nur so ließen sich die Bakterien von Passage zu Passage zur Vermehrung bringen. Bei einer solchen reichlichen Sauerstoffzufuhr durch Züchtung in flacher Schicht vermehrt sich der Paratyphus B-Bazillus in 24 Std. von wenigen eingesäten Keimen auf Milliarden. Dazu bedarf es nicht einmal der Temperatur von 37°; sogar unter diesen primitiven Ernährungsverhältnissen wächst er sowohl bei 22° wie, wenn auch langsam, bei ca. 15° (Zimmer-

1) Fränkel, l. c.

2) van Loghem, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911.

temperatur). So lebt jetzt einer unserer Stämme seit über $1\frac{1}{2}$ Jahren in diesem Milchsäure-Ammoniaknährboden und hat über 100 Passagen durchgemacht.

Dieses Wachstum in beliebig zahlreichen Passagen, wobei die Bakterien jedesmal ihre Substanz, von wenigen Keimen ausgehend, wie Zählungen ergaben, in 1–2 Tagen mindestens um das Millionenfache vermehren, gibt uns erst das Recht, zu behaupten, daß nicht irgendwelche von der Beimischung vom gewöhnlichen Fleischbouillonagar stammende Beimengungen als Nährmaterial dienen; nur dadurch können wir weiterhin beweisen, daß die Bakterien nicht mit Hilfe irgendwelcher Reservestoffe, die sie während ihres Lebens in Bouillon in ihrem Leibe aufgespeichert haben, gewisse Bedürfnisse decken und dadurch ihr Leben fristen. Den uns besonders wichtig erscheinenden Nachweis des Wachstums in Passagen vermissen wir in so gut wie allen bisherigen Arbeiten, und es lassen sich dadurch Widersprüche in den Resultaten der einzelnen Autoren leicht erklären. Denn gelegentlich können sich Bakterien, wie später gezeigt wird, bei reichlicher 1. Einsaat zunächst in einem Nährboden noch vermehren, sogar nach kräftiger Beimischung der 2. Passage dort noch etwas zu wachsen beginnen, erst in der 3. Passage kann es sich zeigen, daß sie mit den dargebotenen Nährstoffen auf die Dauer nicht auskommen. Sogar in destilliertem Wasser kann der Paratyphus B-Bazillus, vom Nähragar abgeimpft, zunächst noch eine geringe Vermehrung zeigen, in Passagen aber natürlich nicht wachsen.

Wir haben uns ganz besonders bemüht, den Beweis zu erbringen, daß der Paratyphus B-Bazillus im Milchsäure-Ammoniaknährboden wirklich allein von den 3 eingebrachten Salzen lebt und daraus sein Körperweiß aufbaut. Denn wir haben uns, trotz aller Bemühungen um reinstes Wasser und reinste Chemikalien, doch den Einwand machen müssen, daß die geringsten unvermeidbaren chemischen Verunreinigungen für das Bakterienwachstum noch in Betracht kommen könnten. Ganz sicher konnte es sich dabei nur um Spuren handeln, und diese müßten, wenn sie vom Paratyphus B-Bazillus benützt würden, bei der enormen Vermehrung seiner Leibessubstanz sehr rasch verbraucht werden. Es ließ sich zeigen, wie das Wachstum von den bekannten eingebrachten Substanzen abhängig ist. Die schrittweise quantitative Reduktion des Nährbodens verschlechtert stufenweise das Wachstum des Paratyphus B-Bazillus: Wenn die Menge des Kaliumbiphosphats nur $\frac{1}{4}$ und die des Ammoniumlaktates nur $\frac{1}{3}$ von der oben angegebenen, für üppiges Wachstum ausreichenden Menge beträgt, so tritt nur noch langsames, spärliches Wachstum auf; wenn die Menge auf $\frac{1}{10}$ resp. $\frac{1}{6}$ herabgesetzt wird, so vermag sich der Paratyphus B-Bazillus überhaupt nicht mehr zu vermehren. Dem Einwand, daß man mit der Herabsetzung der Salze auch die eventuell vorhandenen unbekanntenen Beimengungen vermindert hat, versuchten wir zu begegnen: Läßt man eine der Substanzen ganz weg, so tritt kein Wachstum mehr auf; fehlt allein das phosphorsaure Salz, oder bleibt das Ammoniak oder die Milchsäure allein weg, so tritt, auch wenn die anderen Substanzen jeweils in größerer Menge vorhanden sind, keine Vermehrung auf, ein Beweis dafür, daß der Paratyphus B-Bazillus jeden dieser 3 Stoffe braucht. Wir sehen also, daß das Bakterienwachstum der schrittweisen quantitativen und qualitativen Reduktion des Nährbodens gleichsinnig folgt. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, daß irgendwelche unbekanntenen chemischen Beimengungen das Wachstum unterhalten.

Entbehrlich sind in diesem oben angegebenen Milchsäure-Ammoniaknährboden nur das Kochsalz und das zur Alkalisierung verwendete Natriumbikarbonat. Das kohlensaure Salz kann durch Natron- oder Kalilauge als Alkalisierungsmittel ersetzt werden; dabei gedeiht der Paratyphus B-Bazillus in diesem Nährboden zwar nicht ganz so gut wie mit der Sodalösung, da sich hier schon in ganz geringen Verdünnungen die entwicklungshemmende Wirkung der Laugen bemerkbar macht. Was das Kochsalz anbelangt, so kann es fehlen, und zwar sowohl wenn noch andere Natriumverbindungen, als auch wenn sonst nur Kaliumsalze zugesetzt worden sind; der Paratyphus B-Bazillus wächst also auch in einem Nährboden, der nur 0,3 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat und so viel Kalilauge enthält, daß das stark saure Biphosphat neutralisiert und eine Alkaleszenz von 0,7 Proz. Normalkalilauge vorhanden ist. Hierin ist sein Wachstum langsamer und schlechter als bei Kochsalzzusatz, ist aber von Passage zu Passage zu erzielen. Auch die umgekehrte Beobachtung, daß der Paratyphus B-Bazillus in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden, der nur Natriumsalze und keine Kaliumsalze enthält, dauernd von Passage zu Passage wächst, soll nur erwähnt werden. Wir führen diese Befunde nur an, um die Ernährungsbedingungen des Paratyphus B-Bazillus so vollständig wie möglich darzustellen, denn es finden sich Angaben, daß ganz allgemein ein Bakterienwachstum ohne Natrium keine Verschlechterung, ohne Kalium aber einen Stillstand erfahren kann (z. B. Benecke)¹⁾.

Wir werden uns hüten, unsere Nährböden als kalium- oder gar natriumfrei zu bezeichnen, was ja schon allein der Glasgefäße wegen unmöglich ist. Wir wollen vielmehr aus diesen Versuchen nur 2 Schlüsse ziehen: 1) sind die Paratyphus B-Bakterien nicht an ein bestimmtes Verhältnis zwischen Natrium- und Kaliumionen gebunden, wie dies für die Zellen der niederen Tiere und für die einzelnen Pflanzenarten angenommen wird. 2) können wir schon in diesem allereinfachsten Nährboden unterscheiden: Nährstoffe im engeren Sinne, das sind hier Ammoniak, Milchsäure und Phosphorsäure; diese können nicht beliebig verringert werden, sondern die Herabsetzung eines von ihnen bis unterhalb einer gewissen Grenze läßt kein Wachstum mehr aufkommen, auch wenn die anderen in unveränderter Menge vorhanden sind; es gilt also für diese das Gesetz des Minimums. Diesen gegenüber stehen andere Stoffe, hier Natrium, Kalium und Chlor, deren Herabsetzung zwar das Wachstum verschlechtert, die wir aber beliebig sogar bis unter die Grenze chemischer Nachweisbarkeit verringern können, ohne daß deshalb das Wachstum aufhört.

Dieser prinzipielle Unterschied zwischen dem Phosphor einerseits, Chlor, Natrium, Kalium andererseits, hat sich auch gezeigt bei Versuchen zur Beantwortung der Frage, ob in dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden einzelne chemische Elemente durch andere zu ersetzen sind. Natrium und Kalium ersetzen sich gegenseitig weitgehend; das Kochsalz ist durch Bromkali ersetzbar; in einem Nährboden, der 0,5 Proz. Bromkali, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat und Natriumbikarbonat als Alkalisierungsmittel enthält, wächst der Paratyphus B-Bazillus besser als mit Kochsalz, jedenfalls weit besser als ohne Kochsalz, während mit Jodkali kein Wachstum zu erzielen ist. Ob das Brom tatsächlich verwendet wird, oder nur das Wachstum im

1) Benecke, Bau u. Leben der Bakterien. 1912.

Gegensatz zum Jod nicht stört, bleibt vorläufig offen, denn der Paratyphus B-Bazillus wächst ja auch, allerdings wesentlich schlechter, wenn weder Chlor noch Brom zugegen ist. Der Phosphor dagegen erwies sich natürlich als unersetzbar. Phosphorsaures Salz durch schwefelsaures Salz zu ersetzen, ist, wie zu erwarten war, nicht gelungen. Nach der 1. Beimpfung eines solchen phosphorfreien Nährbodens aus einem Fleischbouillonagarröhrchen kann man gar nicht selten eine Vermehrung beobachten, hintereinandergefügte Passagen sind aber nicht zu erzielen. An diesem Beispiel, wo neben den bei der Beimpfung eingebrachten Beimengungen wahrscheinlich Reservestoffe für das anfängliche, gelegentlich sogar in der 2. und 3. Passage auftretende Wachstum verantwortlich zu machen sind, ersieht man die Notwendigkeit, zahlreiche Passagen in demselben Nährboden hintereinander anzulegen, wenn man nicht zu falschen Schlußfolgerungen kommen will.

Der oben angegebene, üppiges Wachstum gestattende Milchsäure-Ammoniak-Nährboden enthält von anorganischen Substanzen nur Kochsalz und Kaliumbiphosphat. Es fehlen also eine ganze Reihe chemischer Elemente, die man allgemein als Protoplasmabestandteile aufgeführt findet, so in erster Linie der Schwefel, dann Kalzium, Magnesium und Eisen. Offensichtlich genügen dem Paratyphus B-Bazillus davon die ja nie ganz auszuschließenden Spuren. Wir haben diese Elemente einzeln dem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden zugesetzt, zunächst 0,2 Proz. Natriumsulfat, dann 0,05 Proz. Kalziumchlorid, dann 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, dann Spuren von Eisensulfat oder Eisenchlorid. Diese Salze wurden dann weiter so kombiniert, daß einmal Kalziumchlorid, das andere Mal Magnesiumsulfat mit Eisen, dann Magnesiumsulfat und Kalziumchlorid, schließlich alle genannten Verbindungen gleichzeitig vorhanden waren. Dabei entstanden natürlich bisweilen Niederschläge, wie z. B. Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat usw., doch wurde die Zusammensetzung und Alkaleszenz nach Möglichkeit so gewählt, daß von allen Substanzen etwas in Lösung blieb. In allen diesen Nährböden wächst der Paratyphus B-Bazillus gut, aber keiner von ihnen befähigt ihn zum anaëroben Wachstum. Daß er unter diesen einfachen Ernährungsbedingungen den Sauerstoff nicht entbehren kann, geht also nicht darauf zurück, daß ihm zur Bildung irgendeiner Substanz oder Ausübung irgendeiner Funktion ein chemisches Element fehlt. Es ließ sich nicht einmal einwandfrei feststellen, daß der Paratyphus B-Bazillus bei aëroben Wachstum mit diesen mineralischen Zusätzen besser wächst als ohne sie. Es kommt besonders in den kalziumhaltigen Nährböden zwar schneller zu einer stärkeren Trübung der Nährlösung, doch ist diese darin nicht allein auf die Vermehrung der Keime zurückzuführen, sondern die durch das Bakterienwachstum zunehmende Alkaleszenz bedingt eine Trübung des Nährbodens.

Wir haben durch Zählungen den Keimgehalt von 4 unter gleichen Bedingungen, besonders in gleich hoher Flüssigkeitsschicht gehaltenen Milchsäure-Ammoniak-Nährböden verglichen: an mineralischen Substanzen enthielt einer von ihnen nur Kochsalz und Kaliumbiphosphat, der 2. und 3. dazu Kalziumchlorid, resp. Magnesiumsulfat, und der 4. die 4 genannten Salze gleichzeitig mit Spuren von Eisen. Die Keimzahlen waren alle von derselben Größenordnung (200 Milliarden Keime in 1 ccm 24-stünd. Kultur) und schwankten innerhalb der Fehlergrenzen nach oben und unten auf und ab.

Wir sind also nicht berechtigt, für den Paratyphus B-Bazillus eine Verbesserung des ursprünglichen, Kochsalz und Phosphat enthaltenden Nährbodens durch Zusatz der fehlenden chemischen Elemente zu behaupten. Wir schließen daraus, daß der Paratyphus B-Bazillus diese Elemente, wenn überhaupt, nur in minimalsten Spuren nötig hat.

Was wir bis jetzt festgestellt haben, läßt sich dahin zusammenfassen, daß der Paratyphus B-Bazillus in einem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, der ein phosphorsaures Salz enthält, alles findet, was er zum Aufbau seiner Leibessubstanz braucht. Aus diesen einfachsten Bausteinen vermag er durch weitgehende Synthesen sein Zelleiweiß zu bilden. Der dazu erforderliche große Energieverbrauch drückt sich in dem erhöhten Sauerstoffbedürfnis aus, das bis zur Unentbehrlichkeit des freien Sauerstoffes führt. Es wurde nun diese erstaunliche Leistungsfähigkeit eines einzelligen Organismus in zwei Richtungen weiter untersucht, nämlich wie er seinen Kohlenstoff- und seinen Stickstoffbedarf zu decken vermag.

Ersatz der Milchsäure durch andere Kohlenstoffverbindungen.

Welche Kohlenstoffverbindungen eignen sich als Kohlenstoffquelle für den Paratyphus B-Bazillus? Hierfür wird nicht nur die rein chemische Seite der Frage in Betracht kommen, ob der betreffende Stoff seiner Konstitution nach den Ausgangspunkt einer Synthese darstellen oder nach Spaltung liefern kann, sondern die Energiefrage wird dabei eine wesentliche Rolle spielen. Zweifellos ist im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden die Milchsäure neben der Kohlenstoffquelle gleichzeitig eine Energiequelle. Ob ein Stoff als Kohlenstoffquelle dienen kann, wird deshalb außer von seinen eigenen Eigenschaften auch von der Art der gleichzeitig vorhandenen Stickstoffquelle und von etwa verfügbaren anderen Energievorräten abhängen. In diesen Versuchen ist jedesmal das Ammoniak die Stickstoffquelle und die zu prüfende Kohlenstoffverbindung die einzige Kohlenstoffquelle gewesen. Nur bei Einhaltung solcher konstanten Bedingungen kann man verschiedene Stoffe in ihrer Eignung als Nährstoffe vergleichen, und die Resultate gelten niemals allgemein, sondern nur für die gewählte Nährbodenzusammensetzung. Diesbezügliche Versuche verschiedener Autoren können deshalb auch nur dann miteinander verglichen werden, wenn alle Ernährungsbedingungen die gleichen sind.

Wir haben die Milchsäure zuerst durch Karbonat ersetzt: Der Nährboden enthielt 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumkarbonat und war damit an und für sich deutlich alkalisch. Diesen Karbonat-Ammoniak-Nährboden haben wir auch unter Hinzufügung von schwefelsaurem Salz in der Modifikation: 0,4 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumsulfat, 0,34 Proz. Natriumbikarbonat benützt, wo die sauer und alkalisch reagierenden Salze so zusammengegeben sind, daß die optimale Alkaleszenz erreicht ist. In keinem dieser beiden Nährböden wächst der Paratyphus B-Bazillus. Auch in einem Formiat-Ammoniak-Nährboden mit 0,5 Proz. Kaliumchlorid, 0,6 Proz. Ammoniumphosphat, 0,4 Proz. Natriumformiat, der in dieser Zusammensetzung die gewünschte schwach alkalische Reaktion hat, kann sich der Paratyphus B-Bazillus nicht vermehren. Hier ist weder das Karbonat, noch das Formiat schlechthin als ein für Bakterien unbrauchbarer Baustein zu betrachten, sondern dieser Versuch sagt nur

aus, daß der Paratyphus B-Bacillus außerstande ist, daraus seinen Kohlenstoffbedarf unter den gewählten Bedingungen zu decken; andere Bakterien dagegen können, wie wir später besprechen werden, diese Leistung vollbringen.

Orientierende Versuche mit essigsauerm Natrium als einzige Kohlenstoffverbindung ergaben kein Wachstum. Wir sind deshalb zur zwei-basischen Oxalsäure übergegangen. In einem solchen Oxalat-Ammoniak-Nährboden mit 0,4 Proz. Kaliumchlorid, 0,25 Proz. Natriumbiphosphat und 0,6 Ammonium-Oxalat, der mit Natronlauge alkalisiert ist, wächst der Paratyphus B-Bazillus langsam und kümmerlich. Er zeigt aber das, worauf es uns ankommt, nämlich das Wachstum von Passage zu Passage. Er kann also, wenn auch mühsam, aus oxalsaurem Ammonium seinen ganzen Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiebedarf decken.

Höhere Kohlenstoffverbindungen kann der Paratyphus B-Bazillus unter den festgesetzten Bedingungen leicht zum Aufbau verwenden. Außer der 1-basischen Milchsäure liefern die 2-basische Bernsteinsäure und die 3-basische Zitronensäure gute Wachstumsbedingungen. Die Nährböden enthielten 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumsulfat und 0,6 Proz. Bernsteinsäure resp. Kaliumzitrat, wobei beide Male mit Natronlauge alkalisiert wurde. In diesen Nährböden beobachtet man bei reichlicher Sauerstoffzufuhr in flacher Flüssigkeitsschicht schnelles und üppiges Wachstum.

Man ersieht aus den bis jetzt angeführten verschiedenartigen Nährböden noch folgendes: Als welcherlei Salz die organischen Säuren vorhanden sind, ob das Ammonium, wie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, an die organische Säure, oder, wie im Zitrat-Ammoniak-Nährboden, mit dem Schwefelsäurerest oder, wie wir das versuchten, mit dem Phosphorsäurerest verbunden ist, ob das Phosphat als Kalium-, Natrium- oder Ammoniumsalz auftritt, ist gleichgültig. Wir sehen also, daß das Bakterium bei seiner Synthese wirklich von den allereinfachsten Bausteinen, event. vom Ionenzustand ausgeht. Außerdem aber geht aus den letzten Versuchen hervor, daß der Paratyphus B-Bazillus nicht nur von wenigen, einfachen Bausteinen aus, sondern von ganz verschiedenen Kohlenstoffverbindungen aus auch dann seine Assimilation bewerkstelligen kann, wenn sie jeweils die einzigen Kohlenstoffquellen sind; er zeigt damit ein Verhalten, wie es unter anderen auch für den Tuberkelbazillus aus der Arbeit von Proskauer und Beck¹⁾ hervorgeht.

Schließlich haben wir versucht, ob der Paratyphus B-Bazillus unter diesen einfachen Ernährungsbedingungen den Mannit und die Kohlehydrate zu spalten vermag und aus ihnen allein seinen Kohlenstoffverbrauch bestreiten kann. Wir haben uns Nährböden aus 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumsulfat hergestellt und diesen als einzige Kohlenstoffquelle 0,5 Proz. Mannit, Dextrose, Maltose, Laktose und Saccharose zugesetzt. Dabei ist mit dem Mannit, Traubenzucker und Malzzucker schnelles, kräftiges Wachstum, mit Milch- und Rohrzucker natürlich keine Vermehrung aufgetreten. Die Spaltung der Kohlehydrate geht auch unter diesen Bedingungen bis zur Kohlensäure, wie wir in Gärungsröhrchen feststellen konnten. Dabei findet eine so starke Säurebildung statt, daß sich der Paratyphus B-Bazillus in einem solchen einfachen Traubenzucker-Am-

1) Proskauer u. Beck, l. c.

moniak-Nährboden schon nach 5—6 Tagen durch seine Stoffwechselprodukte abgetötet hat, während die Maltosevergärung in der Beobachtungszeit von 8 Tagen nicht zur Abtötung, also wohl zu langsamerer Säurebildung, geführt hat. Trotzdem also sichersteht, daß auch unter diesen Verhältnissen der Traubenzucker angegriffen und soweit gespalten wird, daß ausgiebig Energie frei wird, tritt auch in diesem Traubenzucker-Ammoniak-Nährboden kein anaërobes Wachstum auf. Die sich aus dieser Beobachtung ergebenden Fragestellungen werden wir später in anderem Zusammenhang eingehend besprechen.

Ersatz des Ammoniaks durch andere Stickstoffverbindungen.

In allen bisher besprochenen Nährböden bildete das Ammoniak die Stickstoffquelle. Wie wir sahen, kann es als Ammoniumsalz mannigfacher Art den Ausgangspunkt der Synthesen des Paratyphus B-Bazillus bilden. Die assimilatorische Fähigkeit dieses Bakteriums ist gerade dadurch charakterisiert, daß er selbsttätig die Bindung von Stickstoff an Kohlenstoff auszuführen vermag. Wir haben versucht, das Ammoniak durch Nitrat oder Nitrit zu ersetzen; ein solcher Nährboden enthielt 0,5 Proz. Kochsalz, 0,4 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Natriumlaktat und 0,5 Proz. Natriumnitrat resp. Natriumnitrit, und wurde mit Natriumbikarbonat schwach alkalisch gemacht. Hierin beobachtet man fast regelmäßig in der ersten, gelegentlich auch in der zweiten und dritten Passage ein Wachstum des Paratyphus B-Bazillus, doch sind uns mehrere Passagen hintereinander niemals geglückt. Wir müssen daher sagen, daß bei unserer Versuchsanordnung sogar dann, wenn noch 1 Proz. Traubenzucker als ausgiebige angreifbare Energiequelle zugesetzt worden war, der Paratyphus B-Bazillus das Nitrat nicht als einzige Stickstoffquelle benutzen konnte. Offenbar kann er unter diesen Ernährungsverhältnissen das Nitrat nicht reduzieren und dabei gleichzeitig seinen Stickstoffbedarf decken. Nur von einer Stickstoff-Wasserstoffverbindung aus war er imstande, seine Synthesen einzuleiten. Wir befinden uns damit in einem Widerspruch z. B. zu Kisch¹⁾, der dem Paratyphus B-Bazillus die Fähigkeit, von Nitrat als einziger Stickstoffquelle zu leben, zuschreibt. Der Widerspruch kann sich dadurch erklären, daß die früheren Versuche nur in wenigen Passagen angestellt wurden, und auch wir, wie gesagt, bis zur dritten Passage Vermehrung gesehen haben; oder aber der Paratyphus B-Bazillus kann, wie auch Kisch hervorhebt, vielleicht in irgendeinem qualitativ und quantitativ anders zusammengesetzten Nährboden doch mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle auskommen.

Dann haben wir Stickstoff-Kohlenstoff-Verbindungen, und zwar Aminosäuren, daraufhin geprüft, ob sie dem Paratyphus B-Bazillus als gemeinsame Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen können. Wir haben also nicht nur das Ammoniak, sondern Ammoniak und Milchsäure durch die Aminosäuren ersetzt. Die Nährböden enthielten also nur 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,5 Proz. Aminosäuren. (Einzig das Tyrosin wurde seiner schweren Löslichkeit halber zu 0,25 Proz. zugesetzt.)²⁾ Da hat sich nun ergeben,

1) Br. Kisch, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919.

2) Diese Aminosäuren sind uns von Herrn Geheimrat Ellinger und Herrn Privatdoz. Dr. Lipschitz in reiner Form zur Verfügung gestellt worden. Wir möchten auch an dieser Stelle beiden Herren unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

daß der Paratyphus B-Bazillus bei reichlicher Sauerstoffzufuhr in flacher Schicht mit Glykokoll nicht leben kann, mit d-Alanin gut wächst, mit l-Leuzin keine Vermehrung zeigt, mit Asparaginsäure und Glutaminsäure üppig gedeiht, mit l-Tyrosin sich gar nicht oder nur so schlecht vermehrt, daß Passagen nicht gelangen, und mit l-Tryptophan nur sehr langsam und spärlich, aber schließlich doch in Passagen zu wachsen vermag. Die Verhältnisse liegen hier also keineswegs einfach und sind nicht schematisch auf eine Formel zu bringen. Der anspruchslose Paratyphus B-Bazillus, der aus Oxalsäure und Ammoniak seine Leibessubstanz aufbauen kann, vermag von Aminoessigsäure und Amino-Isobutyllessigsäure, komplizierteren und sicher energiereicheren Körpern, in denen die Bindung von Stickstoff an Kohlenstoff schon vollzogen ist, nicht zu leben. Ja, er kann zwar aus Alanin Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiebedarf decken, aus dem Tyrosin, dem Oxyphenylalanin aber nicht, trotzdem dieses als Seitenkette das Alanin und außerdem einen Kohlenstoffring vorgebildet enthält; die Bindung an das Phenyl scheint dem Bakterium unter diesen Ernährungsbedingungen die Möglichkeit genommen zu haben, das Alanin anzugreifen. Wenn der Paratyphus B-Bazillus ohne eine andere gleichzeitig vorhandene stickstoff- oder kohlenstoffhaltige Substanz von einer Aminosäure leben kann, so ist es wahrscheinlich, daß er diese zunächst spaltet und dadurch die zum Leben notwendige Energie gewinnt. Offenbar ist ihm diese Spaltung bei einigen Aminosäuren, wenn sie die einzigen oxydierbaren Verbindungen sind, unmöglich. Denn der Zusatz von 0,5 Proz. milchsaurem Natrium zu denjenigen Aminosäuren, von denen allein er nicht leben kann, ruft Wachstum hervor; auch die so spärliche Vermehrung mit Tryptophan wird dadurch so üppig wie in einer Bouillon. Er kann also seinen Stickstoffbedarf auch aus Glykokoll, Leuzin und Tyrosin decken, sobald er noch eine oxydierbare Kohlenstoffverbindung gleichzeitig zur Verfügung hat. Ob erst diese ihm die Spaltung ermöglicht, oder ob vielleicht die Aminosäure, wie gerade das Tryptophan, als solche mit Hilfe der energiespendenden Milchsäure direkt als Baustein verwendet wird, können wir vorläufig nicht entscheiden. Wir machen also auch hier die bekannte Erfahrung, daß eine Substanz, die an und für sich als Nährstoff geeignet ist, nur dann ausgenützt werden kann, wenn noch andere Nährstoffe gleichzeitig vorhanden sind. Außerdem ersehen wir aus diesen Versuchen, wie weit wir noch davon entfernt sind, aus der Konstitutionsformel einer Verbindung einen Schluß auf ihre Nährfähigkeit für Bakterien zu ziehen; denn sogar solche Körper, die als Nährstoffe geeignete Teile, z. B. in Form einer Seitenkette enthalten, wie Alanin und Tyrosin, können ernährungsphysiologisch ganz verschiedenwertig sein.

Wir haben so die primitiven Ernährungsbedürfnisse des Paratyphus B-Bazillus kennen gelernt. In diesen einfachen künstlichen Nährböden ist er zu einem ganz andersartigen Stoffwechsel gezwungen, als z. B. in einer Bouillon. Die überwiegend assimilatorische Tätigkeit mit ihrem großen Verbrauch an Energie hat, wie wir sahen, zu einer völligen Aenderung des Sauerstoffbedürfnisses geführt. Es erhebt sich nun die Frage, ob der veränderte Stoffwechsel sich sonst irgendwie in den Lebensäußerungen der Mikroorganismen ausprägt. Größere Veränderungen ihrer Zusammensetzung werden sich bereits in der äußeren Gestalt bemerkbar machen, die feineren Unterschiede werden aber erst mit bio-

logischen Methoden erkannt werden können. Wir haben also zuerst die morphologischen Eigenschaften verschieden ernährter Paratyphus B-Bazillen untersucht.

Der Einfluß des veränderten Stoffwechsels auf die morphologischen Eigenschaften.

Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden sind die Paratyphus B-Bazillen in den ersten Passagen meist ganz unbeweglich, erst mit steigender Anpassung tritt eine langsame, etwa den Coli-Bazillen ähnelnde Beweglichkeit auf; im hängenden Tropfen sieht man nur das eine oder andere Bakterium langsam an seinen Nachbarn vorbeitaumeln. Dabei fällt auf, daß die einzelnen Keime desselben Stammes schon im lebenden Zustand in diesem Nährboden gegenüber den in einer Bouillon gewachsenen Bakterien verschiedene Form zeigen. Entsprechende Untersuchungen an gleich alten und unter sonst gleichen Bedingungen in Bouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gehaltenen Kulturen zeigten so typische und so konstante Unterschiede, daß man durch einen Blick in das Mikroskop entscheiden konnte, aus welchem der beiden

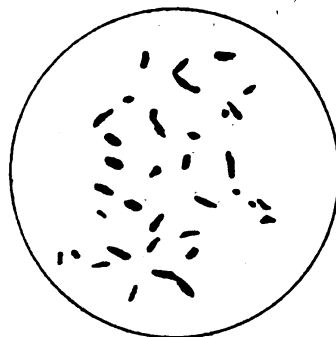


Fig. 1.

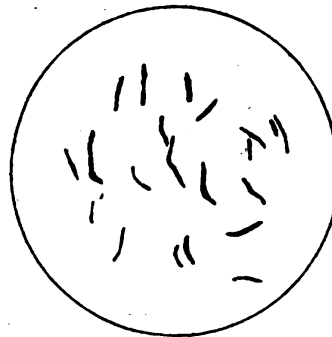


Fig. 2.

Fig. 1. 18-stünd. Kultur von Paratyphus B-Bazillen in Bouillon. Kollargolpräparat.

Fig. 2. 18-stünd. Kultur von Paratyphus B-Bazillen im Milchsäure-Ammoniaknährboden. Kollargolpräparat.

Nährböden die Bakterien stammten. Im Gram-Präparat wie im Kollargol- oder Cyanochin-Umrißpräparat, wie bei der Zettnowschen Geißelfärbung sind die im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gezüchteten Bakterien dünner und länger als die in Bouillon gewachsenen; außerdem sind die ersteren schlank, häufig etwas gebogen und an den Enden zugespitzt, während die letzteren kurz, gerade und an den Enden abgerundet sind; dabei sind im einfachen künstlichen Nährboden die Keime untereinander gleichförmig, während in Bouillon eine gewisse Variationsbreite in bezug auf Länge und Dicke der Bakterien bemerkbar ist (s. Figg.). Wiederholte Färbungen gleichaltriger Kulturen desselben Stammes nach der Zettnowschen Geißelfärbungsmethode ergaben eine sehr reichliche Begeißelung in Bouillon und eine sehr viel spärlichere im einfachen künstlichen Nährboden. Es erhob sich die Frage, ob diese morphologischen Unterschiede durch die Eigenart des überwiegend synthetischen, arbeitsreichen Stoffwechsels bedingt sind oder durch das Fehlen gewisser Elemente, wie Schwefel, Kalzium, Magnesium usw. Deshalb haben wir die Färbungen ausgeführt an Bakterien, welche einem

Milchsäure-Ammoniak-Nährboden entstammten, der einmal nur Kochsalz und Kaliumbiphosphat, daß andere Mal außerdem Kalziumchlorid, Magnesiumsulfat und Eisensulfat enthielt. Es ergab sich, daß die Paratyphus B-Bazillen in diesen beiden Nährböden morphologisch völlig gleich und in beiden gegenüber den in Bouillon gewachsenen Keimen verschieden waren. Es ist also die Eigenart des Stoffwechsels in solchen einfachen künstlichen Nährböden, die, wie es ja auch sonst bei verschiedenen Ernährungsbedingungen bekannt ist, die morphologischen Unterschiede bedingt.

Die Lebensfähigkeit im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden.

Von biologischen Eigenschaften im engeren Sinne haben wir zuerst die Lebensfähigkeit des Paratyphus B-Bazillus im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden mit seinen wenigen und in niederer Konzentration enthaltenen Nährstoffen und knappen Energievorräten untersucht. Sie erwies sich ebenso groß wie in einer Nährbouillon. Nach 6-wöchigem Aufenthalt im Brutschrank waren im flüssigen Nährboden noch reichlich lebende Keime enthalten, im Eisschrank waren 40. und 50. Passagen auf festen Milchsäure-Ammoniak-Nährböden noch nach 5 Mon. am Leben.

Die Virulenz nach 25 Passagen im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden.

Es war von Bedeutung, zu wissen, ob die Virulenz durch die verschiedenartige Ernährung in irgendeiner Form beeinflußt wird. Denn wir wissen ja, daß sie bei manchen Bakterien durch schädigende Einflüsse bestimmter Art herabgesetzt werden kann und nicht gleich nach Wegfall dieser Schädigung zur ursprünglichen Höhe zurückkehrt. Wir haben diese Versuche an weißen Mäusen und im wesentlichen mit Mäusetyphusbazillen ausgeführt. Denn unsere Paratyphus B-Bazillenstämme erwiesen sich als nur wenig mäusepathogen, waren also zu einer exakten vergleichenden Virulenzprüfung ungeeignet. Wenige, trotzdem mit Paratyphus B-Bazillen angestellte Versuche ergaben aber dasselbe Resultat wie die späteren mit Mäusetyphusbazillen durchgeführten. Diese den Paratyphus B-Bazillen sehr nahestehenden Bakterien wachsen ebensogut im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden und sind darin wie jene fast unbeweglich, länger und dünner als in einer Bouillon. Unsere Aufgabe war also, Keime aus einer Nährbouillon und aus einem Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, der 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat enthielt, bezüglich ihrer Virulenz zu vergleichen. Dazu mußten wir die Keimzahl in 1 ccm jedes dieser Nährböden kennen. Zählungsversuche ergaben, daß eine in einem Erlenmeyer-Kölbchen herangewachsene 24-stündige Bouillonkultur, innerhalb der Fehlergrenzen der Zählung schwankend, ebensoviel lebende Keime in 1 ccm enthielt, als eine 48-stündige Kultur im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, bei der die Flüssigkeitsschicht $\frac{1}{4}$ der Höhe der Bouillonkultur betrug. (Die Keimzahl war ungefähr 150 Milliarden in 1 ccm.) Wir konnten also gleiche Mengen 24-stündiger Bouillonkultur mit gleicher Menge 48-stündiger Milchsäure-Ammoniak-Kultur vergleichen.

Dabei hat sich ergeben, daß weder eine einwandfreie Virulenzabnahme noch eine Virulenzsteigerung im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden eintritt. Als Beispiel möge der folgende Versuch dienen:

Je 4 Mäuse erhielten die gleiche Dosis. Verwendet wurde eine 25. Passage im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Die Injektionen erfolgten subkutan.

Von der Bouillonkultur töteten:

0,5 ccm der Verdünnung	1:100 000	zwischen dem 5. und 8. Tag
0,5 " " "	1:1 000 000	" " 5. " 14. "
0,5 " " "	1:10 000 000	innerhalb 14 Tagen nicht " mehr (einmal nur sahen wir eine Maus daran am 22. Tag sterben).

Von der Kultur im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden töteten:

0,5 ccm der Verdünnung	1:100 000	am 6. Tag
0,5 " " "	1:1 000 000	2 Mäuse am 9. Tag, 2 Mäuse nicht mehr
0,5 " " "	1:10 000 000	nicht mehr.

Aus jeder gestorbenen Maus wurden Mäusetyphusbazillen aus dem Herzblut gezüchtet.

In diesem Versuche mag eine geringfügige Abnahme der Virulenz der im einfachen künstlichen Nährboden aufgewachsenen Bakterien angedeutet sein; einwandfrei erwiesen wurde sie durch Wiederholungen der Versuche nicht. Der mit geringen Energievorräten und großem Energieverbrauch sich vollziehende Stoffwechsel beim Aufbau aus nur wenigen einfachen Substanzen hat also die Virulenz des Mäusetyphus- und Paratyphus B-Bazillus nicht nachweislich geändert.

Verschwinden die spezifischen Merkmale von Arten oder Rassen bei Entwicklung aus wenigen einfachen Bausteinen?

Wenn man 2 verschiedene Kulturen des gleichen Paratyphus B-Bazillenstammes, von denen eine in Nährbouillon, die andere im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden herangewachsen ist, mit einem Paratyphus B-Immunserum auf Agglutination prüft, so werden die verschieden ernährten Bakterien gleich hoch agglutiniert. Auf besondere Beobachtungen, die dabei gemacht worden sind, wird an anderer Stelle ausführlich eingegangen (Cahn-Bronner)¹⁾.

Die serologischen Eigenschaften der Bakterien stellen gewissermaßen die letzten Feinheiten ihres Protoplasmas dar. Innerhalb einer Bakterienart sind die verschiedenen Rassen häufig nicht mehr durch ernährungsphysiologische Besonderheiten, sondern nur durch ihre verschiedenen immunisatorischen Eigenschaften unterscheidbar. So zeigen Paratyphus B-Bazillen und Gärtner-Bazillen gleiches kulturelles Verhalten; verschieden sind sie nur in serologischer Beziehung, indem jede Rasse ihre spezifischen Antigene besitzt. Beide wachsen gleich gut im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden. Es fragt sich nun, ob diese subtilen Besonderheiten ihres Zelleibes auch beim Aufbau aus so wenigen einfachen Stoffen zur Ausbildung gelangen. Diese Fragestellung ist um so mehr berechtigt, als wir ja erfahren, daß die äußere Form und die Stärke der Begeißelung unter den verschiedenartigen Ernährungsbedingungen in einem einfachen künstlichen Nährboden und in einer Bouillon Differenzen aufweisen. Und in der jetzigen Zeit, wo sich die seit den Arbeiten Robert Kochs zurückgetretene Tendenz wieder bemerkbar macht, die Umwandlung verwandter Bakterienarten ineinander anzunehmen, halten wir solche Untersuchungen für angebracht. Denn an den serologischen Eigenschaften der Bakterien dürfte sich eine solche Umwandlung zuerst bemerkbar machen. Man könnte sich ja vorstellen, daß in einer Nährbouillon jede Bakterienart aus der Fülle der ihr ge-

1) C. E. Cahn-Bronner: Erscheint in der Zeitschr. f. Immunitätsforsch.

botenen Stoffe eine ihr zusagende Kombination von Nährstoffen aufnimmt und daraus ihr Körpereweiß mit allen Besonderheiten aufbaut, daß aber in einem Nährboden mit ganz wenigen Bausteinen, wo also die verschiedenen darin wachsenden Bakterienarten, von denselben Stoffen ausgehend, ihre Leibessubstanz bilden müssen, diese Besonderheiten nicht zur Ausbildung kommen, und sich so gerade die feinen Unterschiede der nächstverwandten Rassen verwischen. Die Versuche von Braun und Schaeffer¹⁾ und Braun²⁾ und Feiler³⁾ haben gezeigt, daß unter gewissen Umständen, wie z. B. bei Unterernährung, nur die lebensnotwendigen Teile der Bakterien zur Ausbildung gelangen, und ein Teil der Antigene verloren geht. Die Möglichkeit, daß gewisse antigene Eigenschaften bei besonderen Ernährungsverhältnissen unterdrückt werden, ist also gegeben. Dadurch würde es verständlich, wenn Bakterienrassen, die gleichzeitig gemeinsame und verschiedene Antigene haben, ihre Verschiedenheiten verlieren. Das ist aber bei Synthesen aus den gleichen einfachen Bausteinen keineswegs der Fall. Paratyphus B- und Gärtner-Bazillen haben auch, wenn sie im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden, also von den gleichen wenigen Bausteinen ausgehend, herangewachsen sind, ihre typischen serologischen Besonderheiten zur Ausbildung gebracht. Jedes von diesen Bakterien zeigt, gerade wie eine in Nährbouillon gewachsene Kultur, nur mit seinem homologen Serum eine hohe Agglutination, mit dem heterologen Serum nur die übliche Mitagglutination. Die einzelnen Rassen erweisen sich also als derart konstant, daß sie auch unter erschwerten Ernährungsverhältnissen ihre volle Spezifität bewahren. Ueber Unterschiede bei der Agglutination von Bakterien, welche in Nährbouillon und im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden gewachsen sind, wird in der oben erwähnten Arbeit berichtet werden.

So haben wir gesehen, wie erstaunlich die synthetische Leistungsfähigkeit der Paratyphus B-Bazillen ist. Kommt diese in den einfachen künstlichen Nährböden zu voller Auswirkung, so zeigen sich zwar gewisse Unterschiede dieser so ernährten Bakterien gegenüber den in Bouillon gewachsenen; am markantesten kommt dies im Sauerstoffbedürfnis zum Ausdruck; erklärt werden diese Unterschiede durch den verschiedenartigen Ablauf des Stoffwechsels, der in den einfachen künstlichen Nährböden durch weitgehende Synthesen bei knappen Energievorräten, in einer Bouillon durch reichliche Energiebeschaffung mittels weitgehender Spaltungen charakterisiert ist. Aber trotz dieser Schwierigkeit beim Aufbau ihres Zelleiweißes können die Bakterien ihre Leibessubstanz mit allen für Art und Rasse charakteristischen Besonderheiten aufbauen.

1) H. Braun u. H. Schaeffer, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 89. 1919.

2) H. Braun, Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. 19. 1920.

3) M. Feiler, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 29. 1920.

Nachdruck verboten.

Studien über das Vorkommen von diphtherieartigen Bazillen in kindlichen Lymphdrüsen.

[Aus der Universitätskinderklinik in Wien (Vorstand:
Prof. C. Pirquet).]

Von Dr. **Karl Neubauer**, Volontärarzt.

Die Lymphogranulomatose wurde, wie bekannt, ursprünglich für eine „eigenartige, unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Form der Tuberkulose“ gehalten (Sternberg 1898). Dies hatte darin seinen Grund, weil bei der Leiche eines an dieser Krankheit zugrunde gegangenen Individuums tatsächlich so gut wie immer eine Tuberkulose nachweisbar ist (Prym) und das histologische Bild manche Aehnlichkeit mit der Tuberkulose aufzuweisen hat. Aber andererseits zeigte sich gerade im histologischen und im klinischen Bilde eine derartige Abweichung von der lymphoglandulären Tuberkulose, daß schon bald nachher diese Ansicht von Sternberg dahin abgeändert wurde, daß die Bezeichnung „eigenartige Tuberkulose des lymphatischen Apparates“ doch zu weitgehend sei. Die Ansicht, daß es sich um eine chronische Infektionskrankheit mit Bildung von charakteristischen Granulomen handle, wurzelte sich immer tiefer ein. Ueber die Aetiologie und Pathogenese der Lymphogranulomatose hat sich seit dieser Zeit eine überaus reiche Literatur gesammelt und die Berichte von Bazillenbefunden häuften sich in den letzten Jahren immer mehr.

Ueberblicken wir die Ergebnisse dieser Studien, so sehen wir auf der einen Seite, daß Fränkel und Much als erste grampositive und antiforminfeste Stäbchen nachwiesen, welche sie anfangs den Tuberkelbazillen ähnlich, später aber mit den grampositiven und nach Ziehl nicht färbbaren Muchschen Granula identifizierten. In neuerer Zeit gelang es Negri und Mierement zum erstenmale, Stäbchen aus Drüsen zu gewinnen und rein zu züchten, welche sie den Fränkel-Muchschen Granula gleichstellen. Aehnliche Befunde beschrieben noch andere Forscher, unter ihnen Rosenow. Auf der anderen Seite lesen wir über die Befunde von Pseudodiphtheriebazillen, welche sich durch ihr kulturelles und färberisches Verhalten besonders charakterisieren und gleichfalls als Erreger der Lymphogranulomatose angesehen werden (Langford, Hatcher, Lemmon, Jates). Absehen wollen wir hier von jenen Bakterienbefunden, welche so gut wie sicher sekundären Infektionen zuzuschreiben sind und meist aus septischen Infektionen der Schleimhäute stammen (Streptokokken, *Bact. coli* u. a. m.), worauf Ziegler in seiner Monographie über die Hodgkinsche Krankheit hinweist.

Ausgehend von diesen verschiedenartigen Befunden ging unser Bestreben dahin, der bazillären Aetiologie der Lymphogranulomatose dadurch näher zu kommen, daß wir Patienten zur Untersuchung heranzogen, welche an dieser Krankheit litten und keine Tuberkulose klinisch aufzuweisen hatten. Solche Fälle findet man nur im Kindesalter, wo man bei negativem Ausfall der kutanen Tuberkulinreaktion nach Pirquet und der intrakutanen nach Mantoux wohl berechtigt ist, Tuberkulose auszuschließen. Die Drüsen solcher Kinder wurden von uns durch Probeexzision gewonnen und unmittelbar nach der Operation der Untersuchung zugeführt. Dabei kamen uns die Erfahrungen Rosenows sehr zu statten, welche letzterer bei den Untersuchungen über das Maltafieber u. ä. gesammelt hatte.

Da es ja ganz einleuchtend ist, daß die Gewinnung einer bazillären Kultur schwer ist, wenn man bloß eine Schnittfläche einer Drüse mit einem Nährboden in Berührung bringt, um vieles leichter aber, wenn

man die Drüse zerreibt, ersann er sich, um die Hauptfehlerquelle zu beseitigen, nämlich das Hineingelangen der Bazillen während des Zerkleinerns der Drüse zu verhindern, einen eigenartigen Apparat. Der Sinn, der demselben zugrunde liegt, ist die Erlangung vollkommener Asepsis. Wir glaubten diesem Prinzipie zu genügen, wenn wir die Drüse unmittelbar nach der Operation in einem an dem Operationsraum angrenzenden, aseptisch gehaltenen Raum unter den größten Kautelen präparierten, wobei dieselben Anstalten behufs Reinigung, Kleidung usw. getroffen wurden wie zur Operation selbst. Die Drüse wurde zunächst mit heißer physiol. Kochsalzlösung übergossen, die Hälfte für histologische Untersuchung beiseite gebracht, die andere Hälfte unter geringem Zusatz von physiol. Kochsalzlösung sorgfältig präpariert. Schließlich wurde die breiige Masse verimpft.

Der Krankheitsverlauf der Fälle, welche wir zur Untersuchung herangezogen, war folgender:

Franz M., 5 Jahre alt, Masern überstanden. Vor ungefähr 3 Jahren setzten Drüenschwellungen am Halse ein, welche sich mit der Zeit vergrößerten, eine Operation hatte keinen Erfolg; es traten neue Schwellungen auf, nicht nur am Halse, sondern auch in der Achselhöhle. In der Familie kein ähnlicher Krankheitsfall. Stat. praes.: Socratama. Stark erweiterte Venen an der Brust und linken Axilla. Die linken Hals-, Oberschlüsselbein-, Unterkiefer- und Nackendrüsen zu einem großen Drüsenpaket ausgewachsen, die Drüsen einzeln überall deutlich tastbar wie die Beeren an einer Traube. Eine mammaartige Drüsengeschwulst in der linken Achselhöhle. Nirgends Erweichung oder Narben nach früheren Fisteln. Milz als harte Geschwulst deutlich tastbar, 3 Querfinger vor dem Rippenbogen. Blut 8 Proz. Eosinophile. Weiterer Verlauf: Zeitweise Temperatursteigerung bis 38,5 2—3 Tage anhaltend. Einmal ein flüchtiges Hauterythem an der Brust. Histologischer Befund der exstirpierten Drüsen: Die ganze Drüse durchzogen von feinem fibrillärem Bindegewebe (fibröses Stadium des Granuloms). Großkernige Zellen, daneben Riesenzellen mit 2—3 Kernen, spärlich Eosinophile, zerfallende Lymphozyten, Bindegewebsmitosen. (Angef. im path.-hist. Institut Prof. Stoerk.)

Franz Sch., 6. Kind, 8 Jahre alt, Masern überstanden. Vor 3 Jahren in jedem Kieferwinkel eine haselnußgroße Drüse. Vor 1 Jahre begannen die Drüsen zu wachsen. An anderen Körperstellen keine Drüenschwellungen. Vater an Lungensarkom gestorben, 3 Kinder gesund. St. pr.: Socratama. Bedeutende Drüsenpakete an beiden Unterkieferwinkeln, die einzelnen Drüsen bis walnußgroß, derb, gut voneinander zu isolieren. Ebenso supraklavikular, besonders links. Pakete von bohnen großen Drüsen. Röntgen: Mittelschattenhals nicht verbreitert. Blut 6 Proz. Eosinophile. Histologisch: zahlreiche Bindegewebsmitosen, Eosinophile und Riesenzellen.

Die Ergebnisse, zu denen wir gelangten, sind zusammenfassend berichtet folgende:

Nach 24-stünd. Wachstum bei einer Temperatur von 35° C finden wir im Ausstrich auf Ascites-Dextroseagar, der sich uns als der beste Nährboden erwies, makroskopisch ca. stecknadelkopf- bis hirsekorn große, scharfrandige, trockene, an der Oberfläche matt glänzende, weißgraue Kolonien. Bei der mikroskopischen Untersuchung erwiesen sich diese als Reinkulturen gramnegativer Stäbchen. Ihre Anordnung ist unregelmäßig, ihre Länge 3—4 μ , ihre Breite $\frac{3}{4}$ μ . Segmentierung oder Polfärbung fanden wir in diesen frischen Kulturen nicht. Diese Stäbchen zeigen keine Säurefestigkeit nach Ziehl-Nielsen. Stichkulturen gingen nicht an. Verfolgten wir nun das Wachstum durch mehrere Tage, so zeigten sich an diesen Stäbchen Veränderungen. Nach ca. 8 Tagen bemerkten wir an den Enden eigentümlich kolbige oder kugelige Auftreibungen, welches Verhalten bekanntlich auch den Pseudodiphtheriebazillen zukommt. Um diese Zeit beobachteten wir ferner an zahlreichen Stäbchen, daß sie sich nicht mehr gleichmäßig färben, sondern daß einzelne Partien deutlicher, andere schlechter gefärbt sind,

so daß auf den ersten Blick der Eindruck von Körnerreihen hervorgehoben wird. Dieser körnige Zerfall schreitet im Laufe der nächsten Tage vorwärts. Viele von den granulierten Formen haben große Ähnlichkeit mit den Diphtheriebazillen. Auch diese granulierten Formen sind gramnegativ, nach Ziehl und Nielsen nicht färbbar. Schöne Präparate erhält man dagegen bei Färbung mit Methylenblau und verdünntem Fuchsin.

Auf Loeffler-Nährboden gingen ebenfalls nach 2mal 24 Std. in ca. 50 Proz. der angesetzten Röhren Kulturen an, jedoch weniger reichlich als auf A. D. A., welche makro- und mikroskopisch sich ganz gleich den obigen verhalten; im allgemeinen sind jedoch diese Stäbchen um ca. 1μ kürzer. Stichkulturen gingen nicht an. Auf der Platte bilden sich schöne, anfangs graugelbe, später bräunliche Kulturen. Auf alten Nährböden treten wieder jene Körnerreihen, desgleichen Involutionsformen mit Verdickungen, Anschwellungen und Kugelformen auf. Auf Gelatine wachsen die Bazillen ohne Verflüssigung, im Stich gering an der Oberfläche, im Ausstrich weniger reichlich, auf der Platte spärlich, glatt aufliegend.

Die Färbbarkeit der Bazillen ist nach Gram negativ, Säurefestigkeit fehlt auch bei den in älteren Kulturen auftretenden Körnern. Mit der Murchsen Modifikation der Gramschen Methode erzielten wir keine besseren Resultate als mit der Gramfärbung selbst. Die Antiforminfestigkeit ist gering; der größte Teil der Bazillen geht zugrunde, wie wir uns überzeugen konnten, wenn wir die Ausstriche vor und nach der Behandlung des Drüsenextraktes mit Antiformin untersuchten.

Die Bazillen sind fakultativ anaërob, wachsen besser bei Sauerstoffzutritt. Der Nährboden muß schwach alkalisch sein. Die Temperatur ist optimal zwischen 32 und 35°C , bei 40°C hört das Wachstum auf. Beweglichkeit konnten wir nicht beobachten. Empfindlich sind die Bazillen gegen Hitze und Austrocknung, nicht empfindlich gegen Licht.

Neu an unserer Arbeit ist die Gewinnung des Toxins. Zu dessen Darstellung züchteten wir die Stämme auf Plazentabouillon. Es ist dies jener Nährboden, welcher von Groer und Srnka für die Gewinnung von Diphtherietoxin benutzt wurde und sich hierzu glänzend bewährte (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1918). Auf diesem Nährboden wuchsen die Bazillen an der Oberfläche in einer dünnen Haut; die ganze Flüssigkeit trübte sich dabei in den ersten 2—3 Tagen, um sich am 6.—8. Tage etwas aufzuhellen. Die Hautbildung an der Oberfläche zerfällt leicht beim Schütteln; die einzelnen Brocken fallen dann zu Boden und bilden hier einen schleimigen Bodensatz, der sich beim Umschütteln zu einer Säule erhebt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte hier manchmal die Bildung langer Fäden. Ferner beobachteten wir zuweilen, daß sich die Enden der Bazillen stärker färben als die Mitte. Auch hier traten in älteren Kulturen Septierung und Endschwellungen auf. Nach 7—9 Tagen wurden die Bazillen durch Zusatz von 0,5-proz. Phenollösung abgetötet und dann das Toxin dargestellt.

Es zeigte sich, daß die Toxinbildung eine geringe ist. Am Meer-schweinchen erzeugte die Injektion von 0,1 g nach 6 Std. Blässe der Injektionsstelle, nach weiteren 12 Std. deutliche Rötung und Schwellung, welche nach ca. 2—3 Tagen abgeklungen war. Dabei zeigte das Tier

keine wesentliche Temperatursteigerung oder Unruhe. 0,5 g wurden noch gut vertragen, höhere Dosen schädigten das Tier schwer. Ließen wir Diphtherieantitoxin auf unser Toxin 2 Std. bei Bruttemperatur oder 12 Std. bei Zimmertemperatur einwirken und injizierten wir damit das Tier, so trat die obige Reaktion unvermindert stark auf.

Die Agglutination gelang mit dem Blute des Pat. eindeutig bis 1:100; Kontrolle bei Gesunden 1:50.

Die Versuche, beim Meerschweinchen, weißen Mäusen, Kaninchen und Ratten durch Verimpfung von lebenden Bazillen ähnliche Drüsenveränderungen herbeizuführen, fielen negativ aus.

Wir legten uns nun die Frage vor, ob diesen Bazillen, welche ihrem Verhalten nach den Pseudodiphtheriebazillen zuzurechnen sind, tatsächlich eine Bedeutung für die Pathogenese der Lymphogranulomatose zukommt. Vorsichtig bei ihrer Beurteilung mußte ja schon der Umstand machen, daß diphtherieartige Bazillen auch bei anderen Krankheiten unbekannter Aetiologie gefunden und beschrieben wurden, so z. B. von Langford beim Lymphosarkom und von Fränkel und Much bei lymphatischer Leukämie, Erkrankungen, bei denen man der Bakterienflora der Drüsen erhöhtes Augenmerk schenkte. Wir finden auch bereits ein Analogon zu diesen Untersuchungen in der Literatur. Während Conradi und Bierast behaupteten, bei diphtheriekranken Kindern in frisch entleertem Harn Diphtheriekeime nachgewiesen zu haben, gelang es R. Koch kurz darauf, zu zeigen, daß man diphtherieartige Bazillen auch im Harn von nicht an Diphtherie Erkrankten, z. B. bei scharlachkranken Kindern unabhängig von nachweisbaren Nierenveränderungen, finden könne. Haben wir demnach in unserem Falle diese diphtherieartigen Bazillen als die eigentlichen Erreger der Lymphogranulomatose zu betrachten, oder sind es gutartige Saprophyten, die vom Nasen- und Rachenraum in die Lymphbahnen eingedrungen sind und in den Drüsenfiltern haften bleiben?

Diese Frage zu entscheiden, führte uns dazu, die Drüsen von Kindern, welche nicht an Lymphogranulomatose litten, unmittelbar post mortem lebenswarm zu entnehmen und der Untersuchung zuzuführen. Es gelang uns tatsächlich in 2 Fällen, bei Kindern, bei denen keine Spur einer Lymphogranulomatose vorlag, bei denen die Untersuchung der Drüse ein vollkommen normales Bild ergab, bei genau demselben Untersuchungsgange, wie er oben beschrieben wurde, Bazillen zu finden, die sich kulturell und tinktoriell, ferner in bezug auf das Toxin genau so verhielten, wie die oben beschriebenen diphtherieartigen Bazillen.

Es könnte wohl der Einwand erhoben werden, daß diphtherieartige Bazillen in Drüsen als gutartige Saprophyten vorkommen können; ebenso wie im Nasenrachenraum bei Kindern z. B. Diphtheriebazillen vorkommen, und so wie diese virulent werden und zu einer Diphtherie führen, so könnten auch diese Bazillen virulent und zur Bildung von Granulomen, demnach der Lymphogranulomatose führen. Wäre aber dies der Fall, so müßten wir zumindestens fordern, daß bei denjenigen Fällen von Lymphogranulomatose, welche wir zu untersuchen Gelegenheit hatten, erstens der Agglutinationstiter ein höherer hätte sein müssen oder zweitens hätte es wenigstens einem der Untersucher gelingen müssen, die Krankheit auf ein Tier zu übertragen.

Wir glauben daher, daß diphtherieartige Bazillen als gutartige, nicht pathogene Bewohner in menschlichen Lymphdrüsen vorkommen.

Zusammenfassung.

1) Die Befunde über das Vorkommen von diphtherieartigen Stäbchen bei Lymphogranulomatose werden an 2 nicht mit Tuberkulose infizierten, an Lymphogranulomatose leidenden Kindern nachgeprüft und bestätigt. 2) Das morphologische und tinktorielle Verhalten der Bazillen untersucht, das Toxin rein dargestellt und am Tier geprüft. 3) Zur Entscheidung der Frage, ob diese Bazillen tatsächlich nur in Drüsen von Individuen, die an Lymphogranulomatose erkrankt sind, sich finden und nicht auch in anderen Fällen, werden normale Drüsen von Kindern untersucht und in 2 Fällen identische Bazillenkulturen gewonnen. 4) Diphtherieartige Bazillen sind bisweilen als gutartige Saprophyten in normalen Lymphdrüsen zu finden und kein für die Lymphogranulomatose charakteristischer Befund.

Literatur.

Banting, Jates, Kristjanson, Journ. of the Am. med. Ass. Vol. 63. 1914. — Conradi u. Bierast, Ueber Absonderung von Diphtheriekeimen durch den Harn. (Deutsch. med. Wochenschr. 1912.) — Fränkel u. Much, Ueber sogen. Hodgkinsche Krankheit. (München. med. Wochenschr. 1910. Nr. 13; Deutsch. med. Wochenschrift 1910.) — Groer u. Srnka, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. 1918.) — Hatcher a. Lemmon, Journ. of the Am. med. Ass. Vol. 65. 1915. — Hodgkin, Med. chir. Trans. 1832. — Koch, R., Zur Bedeutung des Vorkommens von Diphtheriebazillen im Harn. (Deutsch. med. Wochenschr. 1912.) — Negri u. Mierement, (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 68.) — Prym, Frankf. Zeitschr. f. Pathol. 1915. — Rosenow, Journ. Am. med. Ass. Vol. 63. 1914. — Sternberg, Ueber eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tbc. des lymph. App. (Zeitschrift f. Heilk. 1889.) — Ziegler, Die Hodgkinsche Krankheit.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über den Agglutinationstiter nach Typhusschutzimpfung bei Gesunden und Kranken¹⁾.

Von Reg.-Medizinalrat Dr. W. Lahm,

Vorstand des Laboratoriums der staatlichen Frauenklinik Dresden, ehem. Oberarzt am bakt. Laboratorium der III. Armee.

Mit 2 Kurven im Text.

Zur Unterstützung der Diagnose des Typhus abdominalis war bisher die Bestimmung des Agglutinationstiters im Blutserum, die sogenannte Gruber-Widalsche Reaktion, eine der beliebtesten Untersuchungsmethoden. Wo es infolge äußerer Verhältnisse irgend zugänglich war, ist in den letzten Jahren wohl kaum ein Fall von infektiösem Darmkatarrh nicht in dieser Weise untersucht worden. Wenn auch die Bedeutung dieser Reaktion in vielfachen Angriffen der herbsten Kritik ausgesetzt war, hat sie ihren Platz zur Stützung der Typhusdiagnose nicht nur

1) Die Arbeit ist im Jahre 1916 als Vortrag für eine Monatsitzung deutscher Feldärzte in Douai angefertigt, bisher aus äußeren Gründen nicht publiziert. Das zugrunde liegende Material stammt aus dem Laboratorium der III. Armee (Generaloberarzt Dr. Kießling-Leipzig).

bewahrt, sondern eher noch weiteres Gelände dazu gewonnen, weil sie einfach anzustellen war, relativ eindeutige Ergebnisse zeigte und dadurch in den vielen zweifelhaften Fällen infektiöser Darmkatarrhe klärend und beruhigend zugleich wirkte.

Ganz anders aber wurde das Bild in den Kriegsjahren durch die bereits im Herbst 1914 in Angriff genommene und bald wirksam durchgeführte Typhusschutzimpfung. Sie brachte für den Kliniker und Bakteriologen neue Aufgaben und erschwerte nicht wenig das verständnisvolle Zusammenarbeiten beider, welches auch durch die große Zahl von Arbeiten mit ihren widersprechenden und so ungemein wechselnden Angaben nicht besser wurde. Das klinische Bild des Typhus wurde durch die Impfung vielfach bis zur Unkenntlichkeit verändert und die Gruber-Widalsche Reaktion, i. e. der Bakteriologe, die sich beide im Frieden so gut bewährt hatten, schienen völlig im Stich zu lassen. Die Forderungen des Bakteriologen an den Kliniker bezüglich des einzuliefernden Materials wurden strenger, präziser und umfassender: Blutkulturen, Serumagglutination und Stuhlprobe mußten zur ganz bestimmten Zeit vorgenommen werden, wenn die Aussichten auf Erfolg bzw. auf ein eindeutiges Ergebnis besser werden sollten. Der Kliniker aber sah seine Kurven an, die meist zu einer Zeit angingen, wo der Kranke schon ein paar Tage bei der Truppe und in einem vorgeschobenen Feldlazarett oder einer Ortskrankenstube gefiebert hatte, und kam in Verlegenheit, wenn er sagen sollte, ob der Fall ein frischer sei oder sich schon in der 2. oder 3. Woche befinde. Er verlangte dann von dem Bakteriologen klipp und klar, was es für die Diagnose bedeute Widal 1:400 oder 1:800 positiv, und dieser mußte vielfach die Antwort schuldig bleiben, weil er bei allen Typhusgeimpften positiven Widal sah und ihm noch die Erfahrung fehlte, welcher Grad der Reaktion zu einer sicheren Entscheidung bezüglich der Diagnose notwendig ist. Inzwischen ist diese Erfahrung mehr und mehr dem bedrängten Bakteriologen zu Hilfe gekommen. Zahlreiche Untersuchungen wurden angestellt, die Ergebnisse wurden geprüft und nachgeprüft, mit dem klinischen Material verglichen und Wesentliches und Wertvolles von dem Unwesentlichen und Nebensächlichen abgetrennt.

Mit den wiederholten Impfungen und im Zusammenhang mit den allgemeinen hygienischen Maßnahmen, welche gegen die epidemische Verbreitung des Typhus gerichtet waren, traten neue Krankheitsbilder in Erscheinung, deren Zugehörigkeit zum Typhus nicht immer klar zutage trat. Veröffentlichungen aller Art aus der letzten Zeit aber haben zur weiteren Vertiefung und Klärung der Fragen beigetragen, so daß es heute wohl berechtigt erscheint, gewisse Leitsätze von allgemeiner Gültigkeit aufzustellen. Ich will an dieser Stelle nur von der serologisch-bakteriologischen Seite des Typhus abdominalis sprechen und dabei in erster Linie die Bedeutung der nach der Typhusschutzimpfung auftretenden Agglutination und den praktischen Wert der Gruber-Widalschen Reaktion zu würdigen versuchen.

Um über den Einfluß der Schutzimpfung Anhaltspunkte zu gewinnen — es war schon sehr bald festgestellt worden, daß die Impfung spezifische Agglutinine für die Typhusbazillen erzeugte — wurden von uns im bakteriologischen Laboratorium des beratenden Hygienikers der III. Armee (Generaloberarzt Kießling) sämtliche eingehenden Sera auf ihren Agglutinationstiter geprüft. Diese Sera stammten:

1) von Gesunden: nämlich die Sera der in der Hautklinik (Sedan) liegenden Patienten, von welchen gleichzeitig bei dieser Gelegenheit die Wassermannsche Reaktion gemacht wurde (Tab. I);

2) von Typhuskranken und von Pat., die wegen infektiösen Darmkatarrhs in Behandlung standen (Tab. II).

Als erstes Ergebnis dieser Prüfungen war dabei folgendes festzustellen: Durch die Impfung werden im Serum spezifische Agglutinine erzeugt, welche etwa 8—14 Tage nach der Impfung nachweisbar werden und bereits in dieser Zeit oder im Laufe der

nächsten 2—3 Monate Werte von 1:100 bis 1:400 und 1:1000 und noch höher erreichen.

Es ist vielleicht zweckmäßig, an dieser Stelle eine Bemerkung über diese Zahlen, welche Absolutzahlen zu sein scheinen, und über die Methode, welche bei der Agglutination angewendet wurde, einzuschalten. Es sind im Laufe der letzten 1 $\frac{1}{2}$ Jahre Dutzende von Arbeiten erschienen, die sich mit der Feststellung der Anwesenheit spezifischer Agglutinine im Blute nach Typhusschutzimpfung befaßt haben; das ist also nichts Neues. Und dennoch, wer diese Arbeiten liest, wird, soweit er sich nicht eingehender mit dieser Seite der Typhusfrage beschäftigt hat und beschäftigen kann — ich denke dabei in erster Linie an den Kliniker — kaum irgendein klares Bild daraus entnehmen haben. In der Tat gibt es nichts Widersprechenderes als gerade die Zahlen, welche hier dem Leser mitgeteilt werden. So findet Basten Agglutinationswerte, die niemals 1:200 übersteigen; auch Felke, Klemperer und Oettinger geben ähnliche Zahlen an, oft sogar noch etwas niedriger. Dagegen veröffentlichen Schmitz und Braun Zahlen von 1:20000 und 1:40000. Es ist also undenkbar, daß in diesen Zahlen allein der Schlüssel ruht, der über Wert oder Unwert der Agglutinationsprobe für die Typhusdiagnose entscheidet. Diese Zahlen zeigen nur, mit wie wechselnden Methoden die einzelnen Untersucher und Laboratorien gearbeitet haben. So darf also niemals die Zahl an sich irre machen, da die absolute Zahl, welche in all den Veröffentlichungen angegeben ist, bedeutungslos ist und höchstens einen Maßstab bieten kann für die Feinheit der angewandten Methode. Daß es für eine wirklich einheitliche Verarbeitung des Materials höchst wünschenswert wäre, wenn nach einer gemeinsamen Methode gearbeitet würde (welche Schwierigkeiten dem entgegenstehen, darauf kann hier nicht eingegangen werden) ist ohne weiteres klar.

Die Zahlen, die ich also oben genannt habe, sind daher gleichfalls nicht als Absolutzahlen aufzufassen; sie sollen nur für meine weiteren Ausführungen Anhaltspunkte sein und stellen also Vergleichswerte dar.

Nach 2—3 Mon. nach der Impfung fangen die Werte des Agglutinationstiters an abzusinken und erreichen Ende des 4. oder des 5. oder 6. Mon. einen relativ niedrigen Stand von etwa 1:100 bis 1:200, welcher dann in den nächsten Monaten, falls keine neue Impfung erfolgt, bis zu 1 Jahre fast völlig konstant bleibt.

Man darf sich nun aber keinesfalls vorstellen, daß der Verlauf in allen Fällen derartig schematisch sich gestaltet. Was hier gesagt wurde, sind die Ergebnisse, wie sie an großem Material gewonnen sind. Bemerkenswert ist z. B., daß nicht alle Menschen auf die Impfung mit Bildung spezifischer Agglutinine reagieren; womit das zusammenhängt, wissen wir nicht, denn wenn wir auch von individueller Empfänglichkeit und Empfindlichkeit reden, so ist das keineswegs eine Erklärung. Es ist übrigens nicht selten, eher sogar die Regel, daß dasselbe Individuum auf die Impfung mit anderem Impfstoff dann doch noch reagiert. Individuellen Schwankungen ist auch die Art des Anstieges wie des Abfalls der Agglutinationswerte unterworfen, so daß man sagen kann: Einzelfälle werden immer einmal ein anderes Bild zeigen können, als es der oben aufgestellten Regel entspricht.

In der deutschen Armee war es üblich, daß nach Ablauf von 6 bis 8 Mon. nach der 1. Impfung erneut gegen Typhus geimpft wurde. Das war ein Umstand, der, rein diagnostisch betrachtet, wiederum zur Verwirrung der kaum in Angriff genommenen, an sich schon verwickelten Fragen führte, und zwar vor allem vielleicht dadurch, daß es im gegebenen Falle oft ungemein schwer war, festzustellen, ob der betreffende Pat. diese 2. Typhusschutzimpfung schon erhalten hatte oder nicht. Die Mannschaft selbst rechnete jede einzelne Injektion als Impfung, wobei sie oft nicht einmal mit Sicherheit zwischen Typhus- und Choleraimpfung zu unterscheiden wußte, und Eintragungen im Soldbuch fehlten vor allem in der Anfangszeit gar oft. Einwandfrei aber steht nach Abzug aller zweifelhaften Fälle fest, daß diese 2. oder sogenannte 1. Wieder-

impfung zunächst einen Abfall des etwa noch vorhandenen Agglutinationstiters mit sich brachte, daß dem aber ziemlich prompt ein rascher Anstieg folgte. Diese 2. Impfung hat nach meinen Zahlen, wie sie in Tab. I zusammengestellt sind, eine doppelte Bedeutung:

Tabellen

über die Agglutinationswerte Geimpfter bei Gesunden und Kranken.

Tabell I: Gesunde.

Von 100 Seris reagierten im	negativ	bis $\frac{1}{100}$	über $\frac{1}{200}$
I. Quartal	7 Proz.	50 Proz.	43 Proz.
II. "	12,3 "	40 "	47 "
III. "	3 "	30 "	67 "
IV. " (?)	(24 ")	(37 ")	(39 ")

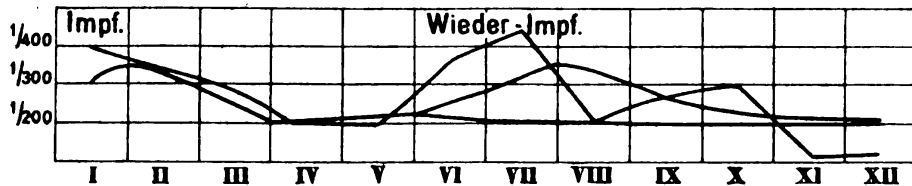
Tabelle II: Infektiöser Darmkatarrh.

Von 100 Seris reagierten im	negativ	bis $\frac{1}{100}$	über $\frac{1}{200}$
I. Quartal	25 Proz.	14 Proz.	61 Proz.
II. "	18 "	26 "	66 "
III. "	23 "	33 "	44 "
IV. "	(44 ")	(33 ")	(23 ")

1) Sie vermindert die Zahl der negativen Fälle, die nach der 1. Impfung noch 7 Proz. betrug und im Laufe des 2. Vierteljahres auf 12,3 Proz. gestiegen war, auf 3 Proz., also weniger als die Hälfte der nach der 1. Impfung scheinbar refraktären Fälle.

2) Sie steigert die Höhe des Agglutinationstiters über die Werte des 1. Quartals, so daß statt 43 Proz. eines Agglutinationstiters von über 1:200 nunmehr 67 Proz. zu zählen sind.

Nach diesem erneuten Anstieg folgt dann, genau wie nach der 1. Impfung, ein Zurücksinken der agglutinierenden Fähigkeit des Blutserums auf etwa 1:100–1:200. Trägt man diese erste Feststellung über den Impfeinfluß in ein Koordinatensystem ein, so ergibt sich die



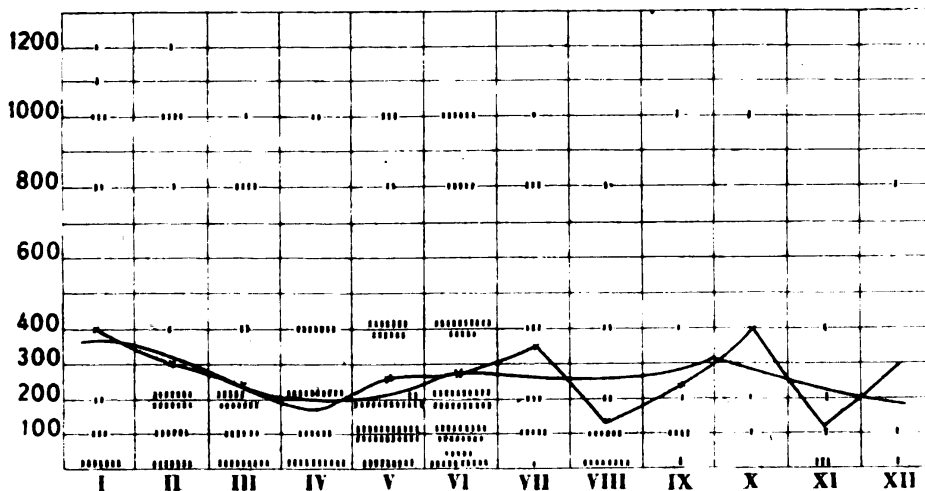
Kurve I. Agglutinationstiter von Gesunden nach der Typhusschutzimpfung im Verlaufe eines Jahres (I–XII).

Kurve, wie sie oben (Kurve I) wiedergegeben ist, und welche so gewonnen wurde, daß für je 1 bzw. 2 Mon. nach der erfolgten Impfung Mittelwerte der Agglutinationshöhe bestimmt wurden. Auf der Abszisse sind die Monate, auf der Ordinate die Höhe der Agglutinationswerte verzeichnet.

So einfach diese hier dargestellte Tatsache erscheint, so hat es doch eine erhebliche Zeit gedauert, bis man sie als ein feststehendes Ergebnis unserer Untersuchungen betrachten konnte. Es ist ja ohne weiteres klar, daß zunächst erst ein paar Monate verstrichen sein mußten, um solche Beobachtungen überhaupt anstellen und zu Ende führen zu können. Der Hauptfehler lag darin, daß man die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse im Anfang zu wenig zueinander in Beziehung brachte.

So ist also die hier wiedergegebene Kurve für die ganze Frage über die Bedeutung der Gruber-Widalschen Reaktion von grundlegender Bedeutung.

Als zweiten Lehr- und Leitsatz kann man nun den folgenden aufstellen: Die Typhusinfektion ist in bezug auf den Agglutinationswert des Blutes einer Wiederimpfung gleichzusetzen. Also zu Beginn der Infektion Abfall des Titers, späterhin meist ein schnelles Ansteigen zu hohen Werten. Aus der Art der Darstellung ist schon zu ersehen, wohin der Weg führt. Wenn man vor dem Kriege, vor der Typhusschutzimpfung, die Gruber-Widalsche Reaktion anstellte, so begnügte man sich, den jeweiligen Zustand des Blutes — sit venia verbo — durch die einmalige Untersuchung festzustellen; heute zielen unsere Bestrebungen dahin, mehrere Einzelbilder zu erlangen, um über den Verlauf der Agglutinationskurve im Blute Klarheit zu erlangen. So kann es notwendig werden, daß einer 1. und 2. Blutuntersuchung die 3. und 4. folgen muß: der Abstand der Untersuchungen soll etwa 8—10 Tage betragen. Wie aber kann nun rein theoretisch der Fall liegen, die Reaktion ausfallen? Da die Typhusinfektion zu jeder beliebigen Zeit, also an jedem beliebigen Punkte der



Kurve II. Mittlere Kurve des Agglutinationstiters bei typhusgeimpften Kranken (infektiöser Darmkatarrh).

hier dargestellten Kurve, einsetzen kann, so sind folgende Möglichkeiten gegeben: es tritt Steigerung oder Abfall oder Konstanz des Agglutinationswertes ein. Es ist ohne weiteres klar, daß das Ansteigen und Abfallen des Agglutinationswertes, soweit sie nicht innerhalb der physiologischen Grenzen liegen (s. Tab. I und Kurve II) den Verdacht auf eine Typhusinfektion nahelegt; aber auch die Konstanz spricht nicht zwingend dagegen, da wir ja sowohl aus unseren früheren Erfahrungen wie aus den oben mitgeteilten Beobachtungen (Tab. I und II) wissen, daß nicht alle Fälle auf das Eindringen des Typhusbazillus in den Körper mit der Bildung von Agglutininen reagieren.

An dieser Stelle will ich kurz auf die Ergebnisse eingehen (Tab. II), wie wir sie bei solchen Patienten gefunden haben, die wegen infektiösen Darmkatarrhs im Lazarett Aufnahme gefunden hatten; es sind darunter vereinzelt echte Typhen, in der Mehrzahl der Fälle aber handelt es sich um Darmkranke, bei welchen eine einheitliche infektiöse und bakterielle Diagnose nicht gestellt werden konnte. Die Prozentzahlen sind in Tab. II zusammengestellt, der Kurvenverlauf ist auf Kurve II, welche Mittelwerte der einzelnen beobachteten Fälle (*) enthält, zu er-

sehen. 25 Proz. aller Fälle besitzen, trotz der Impfung und obwohl dieselbe erst 1—3 Monate zurückliegt, keine Agglutinine, 14 Proz. bis 1:100 und 61 Proz. (!) über 1:200 bis 1:1000 (Kurve II).

Aus dieser starken Vermehrung der negativen und der stark positiven Reaktionen würde zu schließen sein, daß es sich in der Mehrzahl der untersuchten Fälle um Typhen gehandelt hätte, was mit den Fieberkurven, dem Krankheitsbild und dem klinischen Verlauf durchaus gut zusammenstimmen würde. Daraus ist zu ersehen, daß, derartig summarisch betrachtet, der Wert der Agglutinationsprobe durchaus nicht zu verachten ist; sie verliert aber außerordentlich, wenn sie im Einzelfall entscheiden soll, und ich stehe nicht an, der Gruber-Widalschen Reaktion an sich als entscheidendem Faktor in der Typhusdiagnostik jeden Wert abzusprechen: und es scheint mir viel besser, mit einer Untersuchungsmethode wie dieser ganz zu brechen, als sie als durchaus unsicheren Faktor weiterhin in Rechnung zu stellen. Diese Auffassung ist auch zum großen Teil dann noch berechtigt, wenn man die Untersuchungen mehrfach vornimmt. Allerdings spricht, wie die Erfahrung gelehrt hat, ein rapides Steigen der Agglutinationswerte innerhalb von 8—10 Tagen sehr für einen bestehenden Typhus. Herxheimer z. B. gibt an, daß er in 56 Proz. seiner bakteriologisch nachgewiesenen Typhusfälle ein solches rapides Ansteigen, und zwar zu hohen Werten, beobachtet hat; aber trotzdem wird in vielen Einzelfällen — das muß ich dieser Zusammenfassung der Resultate gegenüber immer wieder betonen — auch dieses Kriterium nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein, und zwar vor allem deshalb, weil nicht nur die dem Typhus nahestehenden paratyphösen Erkrankungen, sondern vor allem auch ruhrähnliche Colitiden und ebenso die Flexnerruhr erhebliche, wenn auch oft kurz dauernde, Steigerungen des Agglutinationswertes erzeugen können. Es sieht also fast so aus, als bewirkte die Impfung nur eine gewisse Sensibilisierung des Organismus in der Art, daß Wiederimpfungen und Neuinfektionen — vor allem enterale Infektionen — zur prompten Bildung von Agglutininen führen. Daß ihr Erscheinen im Blute oft etwas verzögert ist, hängt offenbar mit dem Vorhandensein einer Art negativer Phase zusammen.

Indem ich gewissermaßen rekapituliere, betone ich die Bedeutung der Gruber-Widalschen Reaktion vielleicht in etwas schärfer umrissener Weise. Wir haben gesehen, daß infolge der Impfung die Gruber-Widalsche Reaktion positiv wird und zahlenmäßig einen ziemlich bestimmten, charakteristischen Verlauf nimmt in der Weise, daß nach 3 Mon. die anfangs erreichten hohen Agglutinationswerte auf ein niederes Niveau herabsinken, welches in der Mehrzahl der Fälle auf lange Zeit erhalten bleibt. Die Wiederimpfung entspricht dabei ungefähr einer erstmaligen Impfung und stellt andererseits ein ziemlich getreues Abbild einer Typhusinfektion dar — wenigstens was die Agglutinationswerte betrifft.

Wir haben aber weiter gesehen, daß die individuellen Verschiedenheiten ungemein groß sind und von ausschlaggebendem Einfluß auf die Impfkurve des einzelnen ist, daß also die Erfahrungen, welche uns die Sammelbeobachtung und Sammelbetrachtung an die Hand gegeben hat, versagen, sobald am Einzelfall von der Gruber-Widalschen Reaktion eine Entscheidung gefordert wird. Dies war die Ursache dafür, daß

wir der Reaktion als solcher allen Wert absprechen zu müssen glaubten. Weshalb macht man nun aber trotzdem die Reaktion noch immer? Ich will ganz absehen davon, wie weit hier Gewöhnung und Brauch mitsprechen, ich will eine ganz andere und neue Seite der Wichtigkeit der Reaktion beleuchten, nämlich die Gruber-Widalsche Reaktion als Maßstab für die Bedeutung unserer Typhusschutzimpfung.

Die verheerenden Wirkungen, welche die Kriegsseuchen zu allen Zeiten gehabt haben, sind so allgemein bekannt, daß es kaum nötig ist, dafür Zahlen zu nennen.

Die Kriegsseuchen sind verschieden nach ihrer Entstehung und Verbreitung. Des Flecktyphus z. B. ist man völlig Herr geworden, obwohl man den Erreger nicht kannte, einfach dadurch, daß man den Uebertragungsmodus kennen lernte. Die Ruhr ist eine ausgesprochene „Schmutzkrankheit“, gegen die mit sanitären und hygienischen Maßnahmen am einfachsten anzukämpfen ist. Ueber den Typhus wissen wir eigentlich in dieser Hinsicht noch recht wenig, so daß auch seine Bekämpfung etwas im Dunkeln tappt. So gehe ich von dem Standpunkt aus, daß zwar die allgemeinen Maßnahmen den Typhus mildern und niederhalten helfen, ihn aber keineswegs ausrotten, daß also die Möglichkeit der Typhusinfektion für den Soldaten auch heute noch fast genau so besteht, wie z. B. 1870/71. Was in Wegfall gekommen ist, ist höchstens die explosivartig erfolgende Massenerkrankung in Städten durch das Trinkwasser. Sonst aber wird die Möglichkeit der Infektion kaum viel geringer sein als in früheren Zeiten, wobei die dauernde Belegung der Ortschaften und die Vermischung der Verbände nicht wenig dazu beitragen wird, für Verbreitung der Seuche zu sorgen. Tatsache ist nun aber: die Zahl der bakteriologisch nachgewiesenen Typhusfälle ist enorm zurückgegangen; hoch bleibt nur zu gewissen Zeiten des Jahres die Zahl unbestimmter fieberhafter Darmerkrankungen. Und bei diesen verläuft die Kurve der Widalschen Reaktion in einem hohen Prozentsatz so, als ob es Typhen wären. Und ich persönlich glaube, daß es sich zum größten Teil hier tatsächlich um Typhen handelte; und darin erkenne ich den enormen Wert der Gruber-Widalschen Reaktion: Bis heute ist sie meines Erachtens der einzige objektive Maßstab für den ungeheuren Erfolg unserer Typhusschutzimpfung; ohne die letztere wäre die Mehrzahl der infektiösen Darmerkrankungen Typhen, so aber sind es harmlose, kurzfristige Infektionen typhöser Natur, unkenntlich im Einzelfall, kenntlich aber in der Masse durch die spezifische Reaktion und Kurve, wie ich es oben zur Darstellung gebracht habe.

*Nachdruck verboten.***Zur Frage der Schildkrötentuberkulose¹⁾.**

[Aus dem Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover (Direktor: Prof. Dr. Mießner).]

Von **Rudolf Machens**, appr. Tierarzt.

Die Ergebnisse der veröffentlichten Arbeiten über die sogenannte Kaltblütertuberkulose zeigen, daß bei Kaltblütern spontane, der Warmblütertuberkulose in gewisser Hinsicht ähnliche Veränderungen vorkommen, in denen säurefeste, den Warmblütertuberkelbazillen in mancher Beziehung ähnliche Mikroben nachgewiesen wurden; so die sogenannte Fischtuberkulose (Bataillon-Dubard-Terre), die sogenannte Froschtuberkulose (Küster), die Schildkrötentuberkulose (Friedmann) etc. Experimentell konnte durch zahlreiche Forscher bei Kaltblütern eine „Knötchenkrankheit“ durch parenterale Applikation zum Teil erheblicher Dosen der sogenannten Kaltblütertuberkelbazillen wie auch der Tuberkelbazillen vom Typus humanus, bovinus und gallinaceus in manchen Fällen hervorgerufen werden. Auf die Schwierigkeit der Frage, inwieweit es sich in diesen Fällen teils um „echte Tuberkulose der Kaltblüter“, hervorgerufen durch spezifische Erreger, teils um „Pseudotuberkulose“, die event. als aspezifische resp. gruppenspezifische Fremdkörperwirkung anzusprechen ist, handelt, wirft die Durchsicht der Literatur besonderes Licht, zumal es verschiedenen Forschern gelang, auch durch parenterale Applikation von Reinkulturen säurefester Saprophyten bei Kaltblütern eine ausgesprochene Knötchenkrankheit zu erzeugen.

Hinsichtlich der Frage der Umwandlung der Warmblütertuberkelbazillen durch Kaltblüterpassage in sogenannte Kaltblütertuberkelbazillen dürfte neben Berücksichtigung der Fehlerquellen etc., die zu Fehlschlüssen mitunter Veranlassung gaben, die Tatsache, daß Warmblütertuberkelbazillen durch sehr langen Aufenthalt und mehrfache Passagen in Kaltblütern unbeeinflusst geblieben sind, zur berechtigten Skepsis gegen alle bisher mitgeteilten positiven Umzüchtungsversuche mahnen und für die Konstanz der Arten sprechen. Dasselbe dürfte andererseits auch für die echten Tuberkuloseerreger der Kaltblüter gelten.

Eigene Untersuchungen.

Durch das „Friedmannsche Tuberkuloseschutz- und Heilmittel“ wurde bei der Schildkröte (*Testudo graeca*) eine generalisierte Miliartuberkulose hervorgerufen. Nach subkutaner Injektion von dem gleichen Schkr.T.B.-Material konnten beim Kalb, Schaf, Ziege, Meerschwein keine tuberkulösen Veränderungen, sondern nur in einigen Fällen aspezifische, eitrig-eitrige, abszedierende, in Heilung übergehende Herde an der Injektionsstelle nachgewiesen werden. — Das tierpathogene Verhalten der Schildkrötentuberkelbazillen spricht für ihre strenge Spezifität; es handelt sich offenbar um ein Bakterium sui generis. Morphologisch und kulturell zeigten die Schkr.T.B. im allgemeinen das charakteristische Verhalten der Schkr.T.B., die von Friedmann seinerzeit eingehend beschrieben worden sind; sie ließen sich sowohl bei Brutschrank- (37,5°) als auch bei Zimmertemperatur auf den üblichen Nährböden züchten.

1) Auszug aus der Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines doctor medicinae veterinariae durch die Tierärztliche Hochschule zu Hannover.

Ueber die Zahl der intra- und extraleukozytären Gonokokken.

[Aus der Dermatologischen Klinik der Universität Leipzig (Direktor:
Obermedizinalrat Prof. Dr. Rille).]

Von Dr. med. Meta Oelze-Rheinboldt, Städtische Hilfsassistentin.

Zahlenmäßige Untersuchungen über die Anhäufung des Gonococcus Neisser innerhalb von Leukozyten liegen bis jetzt nicht vor.

Nur wenige Autoren aus der Anfangszeit der Gonokokkenära haben lediglich durch Schätzung gewonnene Werte angegeben. Leistikow (4) sagt, „es mögen 2–300 sein“, Bumm (1) schließt sich dieser Ansicht an, während Scholtz (3) nur gelegentliches Vorkommen von etwa 100 intrazellulären Gonorrhöepilzen annimmt. Die vagen Berichte hängen wohl zum größten Teil zusammen mit der Unvollkommenheit der Mikroskopier- und Färbetechnik in der damaligen Zeit.

Eine Auszählung so kleiner Körperchen wie der Gonokokken im direkt gesehenen mikroskopischen Bilde ist nicht möglich. Auch die Anwendung eines sehr vollkommenen Meßinstrumentes wie des Zeißschen Okular-Schraubenmikrometers erlaubt nicht, die Gonokokken bei der Auszählung mit genügender Sicherheit voneinander zu unterscheiden. Man kann sich durch den Versuch leicht überzeugen, daß die Scheidung von auch nur etwa 50 intraleukozytär gelegenen Gonokokken eine Unmöglichkeit ist. Denn da man die bereits ausgezählten Gonokokken nicht von den noch nicht ausgezählten unterschiedlich bezeichnen kann, sind Irrtümer unvermeidlich.

Ich habe daher einen anderen Weg eingeschlagen: Das Präparat wurde mit einer Bogenlampe beleuchtet. Als optische Ausrüstung fand ein Immersionskondensor von Zeiß, der auch als solcher verwandt wurde, und apochromatische Oelimmersion numerischer Apertur 1,3 Verwendung. Das Bild wurde auf die Mattscheibe der Zeißschen Vertikalkamera zur Mikrophotographie projiziert. Mit Hilfe der beschriebenen Einrichtung kann man je nach Okular und Balkenauszug geradezu beliebig hohe Vergrößerungen erzielen. Wobei natürlich für das Auflösungsvermögen über die förderliche Vergrößerung hinaus nichts gewonnen werden kann. Die Erfahrung zeigte, daß für die Auszählung die Vergrößerung am günstigsten ist, bei der die Leukozyten auf der Mattscheibe etwa haselnußgroß abgebildet werden. Die Messung mit dem Objektmikrometer ergab dabei eine Vergrößerung von 1300.

Man kann nun auf der Mattscheibe, deren matte Seite sich oben befindet, jeden bereits gezählten Gonococcus mit einem Bleistiftpunkt kennzeichnen. Auf diese Weise ist sehr genaue Auszählung möglich. Unter 1 Gonococcus ist dabei ein Diplokokkenpaar verstanden.

Außer der objektiven Feststellung des Sachverhaltes habe ich versucht, durch Zählungen zu entscheiden, in welchen Formen von Leukozyten die meisten Gonokokken enthalten sind, um so wenigstens mit Wahrscheinlichkeit zu eruieren, ob eine Vermehrung innerhalb der Leukozyten stattfindet oder nicht. Die Leukozyten wurden in segment-

kernige, zu denen ich die Zellen mit leicht eingedelltem, nierenförmigem und perlschnurartig zusammenhängendem oder sonstwie vielgelapptem Kern zähle, und in polynukleäre in wahrstem Wortsinne geschieden. Formen mit Stabkernen waren nicht in der Versuchsreihe.

Das anfänglich von mir untersuchte Material war mit Methylenblau gefärbt; bald ging ich aber zur Methylgrün-Pyroninfärbung über, weil diese kontrastreichere Bilder liefert und somit durch deutlicheres Hervortretenlassen der Gonokokken deren Auszählung sehr erleichtert. Die in der Folge angegebenen Resultate beziehen sich also ausschließlich auf letztere Tinktionsart.

Von 600 ohne Auswahl ausgezählten Leukozyten enthielten 1—10 Go.-Diplokokken 124 Zellen, 10—20 Gk. 150 Zellen, 20—30 Gk. 102 Zellen, 30—50 Gk. 161 Zellen, 50—80 Gk. 50 Zellen, 80—100 Gk. 8 Zellen, 100—120 Gk. 2 Zellen, 120 bis 150 Gk. 1 Zelle.

Das Material stammte von floriden Gonorrhöen (bei Männern und Kindern) auf der Höhe der Eiterung. Die polymorphkernigen Leukozyten standen zu den polynukleären etwa im Verhältnis 1 : 2.

Es entfielen 1—10 Gk. auf 69 Zellen, 10—20 Gk. auf 52 Zellen, 20—30 Gk. auf 40 Zellen, 30—50 Gk. auf 30 Zellen, 50—80 Gk. auf 3 Zellen, 80—150 Gk. auf keine Zelle von 194 polymorphkernigen Leukozyten.

Die beiden Zahlenreihen, miteinander verglichen, zeigen somit ein umgekehrtes Verhältnis, häufiges Vorkommen weniger Gonokokken in den jugendlichen Formen, vieler Gonokokken in den Endformen der Leukozyten. Das ist auch ersichtlich aus den Mittelwerten von 32 Gonokokken in polynukleären und 18 Gonokokken in polymorphkernigen Leukozyten.

Dieser Befund spricht auch dafür, daß die Gonokokken sich im Verlauf ihres intrazellulären Daseins vermehren und die sie beherbergende Zelle gelegentlich sprengen. Das Auftreten ungerader Zahlen darf dabei nicht verwunderlich sein, da die Weiterteilung wohl nicht streng synchron vor sich geht. Es wurden auch Leukozyten mit 3 oder 5 intrazellulär gelegenen Gonokokken gelegentlich beobachtet. Natürlich kann durch Phagozytose eine ungerade Anzahl von Gonokokken aufgenommen werden. Eine reine Phagozytose wird auch durch die tadellose Färbung der intrazellulären Gonokokken unwahrscheinlich, die bei absterbenden Pilzen gewisse Abweichung von den frischen Formen zeigen würde. Eine definitive Feststellung ist indessen erst möglich, wenn man die intrazelluläre Vermehrung im Mikroskop direkt beobachtet hat.

Was nun die Kapazität eines Leukozyten in bezug auf die Gonokokken betrifft, so war die Höchstzahl, die ich bei meinen Zählungen fand, 122. Es wird zugegeben, daß der eine oder andere der Mikroorganismen übersehen wird bei Verdeckung durch den Zellkern, was durch Drehen der Mikrometerschraube meist aber ausgeglichen wird. Ich gehe aber wohl nicht fehl, wenn ich 150 als äußerste Grenze annehme für intraleukozytäre Gonokokken. Zum Vergleich habe ich große, extrazelluläre Gonokokkenrasen herangezogen. Da waren Konglomerate von 162, 180, 195 Diplokokken, die auch bei engerer Lagerung, wie sie in den Leukozyten die Regel ist, unmöglich in einen solchen sich hätten hineinpassen lassen.

Zusammenfassung.

- 1) Die Höchstzahl der intraleukozytären Gonokokken betrug 122.
 2) der Mittelwert in den segmentkernigen Leukozyten 18, 3) der Mittelwert in den polynukleären Leukozyten 32.

Literatur.

1) Bumm, E., Beitr. z. Kenntnis d. Gonorrhöe. (Arch. f. Gynäk. 1884.) — Der Mikroorganismus d. gonorrhöisch. Schleimhautrekrankungen „Gonococcus-Neisser“. Wiesbaden 1885. 2) Koch, Jos., Gonorrhöe. (Handb. d. pathogen. Mikroorganism. v. Kolle u. Wassermann. 2. Aufl. Bd. 4. Kap. IX. 1912). 3) Neisser, A., u. Scholtz, W., Handb. d. pathogen. Mikroorganism. v. Kolle u. Wassermann. Bd. 3. Kap. IV. 1903. 4) Leistikow, Ueber Bakterien bei den venerischen Krankheiten. (Charité-Ann. Jahrg. 7. 1882; Refer. Berl. klin. Wochenschr. 1882. S. 500.)

Nachdruck verboten.

Beobachtungen über Culiciden.

[Hygienisch-parasitologisches Institut der Universität Lausanne.]

Von B. Galli-Valerio.

Die folgenden Beobachtungen wurden in den Umgebungen von Lausanne, einige auch in der übrigen Schweiz, von Ende Oktober 1918 bis Ende Oktober 1920 gemacht:

a) Beobachtungen in den verschiedenen Jahreszeiten.

Die Larven der Culiciden *A. bifurcatus* und *Sayomya* waren in Vidy im Winter 1918/19 und 1919/20 zahlreich, und zwar auch unter Eis. Puppen von *Th. annulata* waren noch am 7. Dez. 1918 (Lufttemp. +5°, Wassertemp. +6°) und am 8. Nov. 1919 (Lufttemp. +8°, Wassertemp. +8°) vorhanden. Diese Puppen waren speziell sehr zahlreich am 29. Okt. 1920 (Lufttemperatur +6°, Wassertemp. +7°): Eine kleine Pfütze von 29×20 cm und 5 cm Tiefe wimmelte von ihnen, die im allgemeinen Weibchen entwickelt haben.

In den Wäldern von Sauvabelin und Rovéréaz überwinterten auch die Larven von *C. ornata* und *A. nigripes*. Junge Larven von *C. pipiens* und *Th. annulata* habe ich noch am 22. Okt. 1919 (Lufttemperatur +8°, Wassertemp. +9°) und am 29. Okt. 1920 (Lufttemp. +6°, Wassertemp. +7°) in Vidy gefunden.

Die ersten Ausschlüpfungen von *Th. annulata* bemerkte ich in Vidy am 29. März 1919 (Lufttemp. +4°, Wassertemp. +6°), diejenigen von *A. bifurcatus* am 13. Mai 1920 (Lufttemp. +19°, Wassertemp. +16°) und die von *C. ornata* (Sauvabelin) am 19. April 1919.

Die ersten Culicidenpuppen habe ich am 10. April 1919 (Lufttemp. +10°, Wassertemp. +12°), von *A. bifurcatus* am 16. April 1919 und 1920 die ersten Puppen von Culiciden und *A. bifurcatus* am 4. Juni (Lufttemp. +14°, Wassertemp. +16°) gefunden.

1919 und 1920 waren in Vidy *C. pipiens*, *Th. annulata* und *A. bifurcatus* sehr zahlreich, dagegen selten *A. maculipennis*. Puppen von dieser Art habe ich speziell im September gefunden.

b) Beobachtungen über die Brutplätze der Culiciden.

Als die Gemeinde Lausanne viele Pfützen von Vidy zugeschüttet hatte, haben sich die Culiciden an das Leben in einigen Gewässern gewöhnt, wo sie früher sehr spärlich waren. So z. B. haben Culicidenlarven sich entwickelt in Abflußkanälen mit sehr spärlicher Vegetation und Larven von *A. maculipennis* in sehr schmutzigen Gewässern.

Stehende Gewässer, die mit kleinen Stücken von Schilf und Holz bedeckt waren, enthielten keine oder sehr wenige Larven von Culiciden. Das sprach für die Annahme von Thiebault, daß es möglich sei, die Culiciden in den Pfützen mit Pflanzenstäuben zu vernichten¹⁾.

Th. annulata verbreitet sich mehr und mehr in Vidy: Kleine Bodenvertiefungen mit abgestorbenem Laube und sehr wenig Wasser wimmeln von ihren Larven. Sie entwickeln sich auch sehr gut in alten Behältern, deren Wasser infolge Rostes ganz gelb ist; sehr oft nehmen auch die Larven und die Puppen diese Farbe an.

c) Beobachtungen über die Biologie und die Verbreitung der Culiciden.

C. ornata und *A. nigripes* spielen eine große Rolle in der menschlichen Pathologie, weil die 2 Arten eine wahre Plage sind. So z. B. wurde ich um 6 Uhr abends am 17. Aug. 1919 in den Wäldern von Champ-Babau (900 m am Genfer See) von so vielen *C. ornata* gestochen, daß es mir unmöglich war, dazubleiben. *A. nigripes* kann auch die Malaria übertragen, wie ich vorausgesetzt hatte²⁾, und jetzt hat Blacklock experimentell bewiesen, daß *Plasmodium vivax* bei *A. nigripes* sich entwickeln kann³⁾. Daß der Wind keine wichtige Rolle bei der Verbreitung der Culiciden spielt, habe ich auch im Kanton Wallis bewiesen, wo in ruhigen Nächten *C. pipiens* ganz nahe dem Bahnhof von Martinach eine Plage war, während in windigen Nächten man ganz ruhig auf der Straße bleiben konnte.

Für die Verbreitung der Culiciden in der Schweiz kann ich die folgende neue Beobachtung veröffentlichen: *C. ornata* findet sich auch in Champ-Babau (900 m) und Tour de Gourze (860 m), *C. nemorosus* in Ferrett (1696 m, Ferretttal), *C. hortensis* am Chalet de Jor (1179 m, Les Avants), *Aedes gallii* in Grubensee (Turtmantal, 1847 m). *C. hortensis* fand ich in einem Brunnenbecken als Puppen am 21. Sept. 1919. Diese waren hellgrau und sehr beweglich und entwickelten Imagines, die Martini als *C. hortensis* erkannte⁴⁾. *Aed. gallii* fand ich als Puppen in den grünen Algen von Grubensee am 7. Aug. 1919 (Lufttemp. +18°, Wassertemp. +17°). Diese Puppen waren schwarz und außerordentlich beweglich, und entwickelten Imagines, die ich als dieselbe Varietät von *C. nemorosus*, die ich im Rognedasee (Veltlin) schon gefunden hatte, betrachte⁵⁾. Aber Martini⁶⁾ betrachtet die Formen aus Gruben (Zocca- und Rognedaseen) als eine neue Art, die er als *Aed. gallii* Mart. bezeichnet. Diese Art scheint also nur in den Alpenseen zu leben, und bis jetzt habe ich sie im Veltlin (Rognedasee, 2390 m, und Zoccasee, 1800 m) und im Kanton Wallis (Grubensee, 1847 m) ge-

1) Bull. de l'off. internat. d'Hygiène. 1918. p. 956.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 79. 1917. S. 142.

3) Journal of tropic. Med. 1920. p. 99.

4) Ueber Stechmücken. (Beih. z. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Leipzig 1920. S. 162.)

5) Dieses Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 43. 1907. S. 470.

6) zit. Arbeit S. 110.

funden. Im August 1920 wurde ich von dieser Art am Ufer des Grubensees in der Sonne gestochen. Es wäre interessant, *A. ed. gallii* auf der ganzen Alpenkette zu suchen, wo sie wahrscheinlich eine Rolle bei der Uebertragung der Hämospodien der Alpenvögel spielt.

Bekämpfung der Culiciden.

Wie schwer es ist, das Publikum über die Rolle von Regentonnen bei der Entwicklung der Culiciden zu unterrichten, hatte ich nochmals zu beobachten Gelegenheit. In einigen Orten, wo seitens der Gemeinden nichts geschah, um die Culicidenplage zu bekämpfen, hatten die Leute selbst in ihren Gärten Regentonnen ganz voll mit Larven und Puppen von *C. pipiens*. Infolgedessen muß die Bekämpfung der Mückenplage resultatlos bleiben, wenn die Privatgärten nicht überwacht werden¹⁾.

In Vidy habe ich nochmals bemerkt²⁾, wie gefährlich es ist, alte Kochgeschirre und Konservenbüchsen unter dem übrigen Material nicht zu vergraben, wenn man Pfützen mit Kehrlicht zuschüttet, weil diese mit Regenwasser gefüllten Geschirre sehr gute Brutplätze für die Culiciden sind. Nicht nur Culiciden, sondern auch *A. bifurcatus* und *A. maculipennis* habe ich in Vidy in solchen Geschirren gefunden. Eine kleine Sardinenbüchse war ganz voll von Mückenlarven!

Die Wichtigkeit eines guten Abflusses der Kanäle bei der Bekämpfung der Culiciden war in diesem Jahre in Vidy zu bemerken, wo einige Abflußkanäle, deren Mündung in den See mit Sand versperrt worden war, große Mückenbrutplätze geworden sind.

1919 hatte ich geschrieben³⁾, daß in Zonen, wo man die Mücken vernichten will, es nützlich wäre, eine wenige stehende Gewässer übrig zu lassen, um dort die Culiciden in großen Mengen anzulocken und sie dann als Larven und Puppen zu vernichten. Meine diesbezüglichen Untersuchungen in Vidy bestätigten meine Vermutung, weshalb ich es für möglich halte, weil solche wertvoll sind, Geld und Zeit zu ersparen. Daß auch in unseren Gegenden die Bekämpfung der Culiciden der Mühe wert ist und sehr gute Resultate geben kann, hat Dr. Lardy am Neuenburgersee gezeigt, wie er mir schreibt.

Nachdruck verboten.

Die Entkeimung von Obst und Gemüse durch Chlorkalk.

[Aus der Abteilung Untersuchungsstation (Leiter: Prof. Dr. C. Prausnitz) des Hygienischen Instituts der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. **Heinrich Herfarth**, Volontärassistent am Institut.

Bevor man an die Desinfektion von Obst und Gemüse geht, ist es wichtig zu erfahren, mit welchen Keimen diese für gewöhnlich behaftet sind.

Bessel (9), der daraufhin Untersuchungen anstellte, konnte auf 59,6 Proz. vom Obst und Gemüseproben, die im Laden gekauft waren, *Bacterium coli* nachweisen.

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. S. 128.

2) Ebenda. Bd. 72. 1914. S. 531.

3) Corr.-Blatt f. Schweizer Aerzte. 1919. Nr. 19.

Er schließt aus seinen Untersuchungen, daß die Beschmutzung, speziell die fäkale Verunreinigung, erst in den Obst- und Gemüseläden erfolgt, wahrscheinlich durch beschmutzte Behälter, durch das Betasten der Ware beim Aussuchen durch den Käufer, dessen Hände oft mit Fäkalkeimen beschmutzt sein mögen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Georg Neumann (10). Er untersuchte von Obst: Äpfel, Birnen, Pflaumen, Weintrauben. Während Weintrauben stets frei von *Bacterium coli* gefunden wurden, enthielten die anderen Früchte stets Coli-Bakterien, wenn sie durch die Hände des Bauern oder Verkäufers gegangen waren, waren aber stets frei von *Bacterium coli*, wenn die Untersuchungen unmittelbar nach dem Pflücken erfolgten. Dies war sogar der Fall, wenn sie von stark bestaubten Bäumen an viel befahrenen Landstraßen bei warmem Wetter gepflückt waren. Sicherlich spielte hier die bakterizide Wirkung der direkten Sonnenbestrahlung eine große Rolle. Auf im Laden gekauften Äpfeln fand er dagegen an allen 6 untersuchten Proben, auf Birnen und Pflaumen auf je 5 unter je 6 Proben das *Bacterium coli*. Durch Waschen unter der Wasserleitung konnten die Keime nicht immer entfernt werden. Neumann kommt daher zu dem Ergebnis, daß „überall, wo die menschliche Hand hinlangt, auch *Bacterium coli* zu finden ist“. Auch H. Clauditz (11) wies nach, daß diese Keime an der Oberfläche von Gemüse und Obst äußerst festhaften und trotz kräftigen Abspülens und Abwaschens in der Küche nicht zu entfernen sind. Der Unterschied in der Keimzahl der Früchte, die gerade frisch vom Baum entnommen oder in den verschiedensten Obstläden gekauft wurden, ist nach B. Ehrlich (7) und Satory-Filassier (8) sehr beträchtlich.

Meine Untersuchungen waren zunächst darauf gerichtet, diese Ergebnisse an den hiesigen Verhältnissen nachzuprüfen, vor allem festzustellen, ob typisches *Bacterium coli*, der sichere Indikator für fäkale Verunreinigung, regelmäßig auf der Oberfläche von Obst und Gemüse angetroffen wird. Das zu untersuchende Material (einzelne Salatblätter, Kirschen, Walderdbeeren, Pflaumen, Weintrauben) wurde teils sofort, teils nach vorheriger kräftiger Spülung in fließendem Wasser — das Breslauer Leitungswasser ist fast steril, jedenfalls stets frei von Coli — in Bouillonkolben gebracht, 24 Std. bebrütet, davon je eine Normalplatinöse auf eine Endo-Platte ausgestrichen. Die verdächtigen Kolonien wurden stets auf Differenziernährböden (Lackmustraubenzuckerlösung, Lackmusmilchzuckerlösung, Saccharose, Neutralrotagar, Gelatine) identifiziert.

Beim Händler gekaufter Salat wurde, trotzdem nur die inneren Blätter zu den Versuchen entnommen wurden, von 14 Versuchen nur 2mal frei von *Bacterium coli* gefunden. Wurde der Salat vor der Untersuchung tüchtig abgewaschen, so fanden sich unter 14 Proben noch 10 mit Coli infiziert. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Kirschen. Von diesen waren von 5 Proben sämtliche mit *Bacterium coli* behaftet, nach dem Waschen war Coli noch auf 2 Proben nachzuweisen. Bei Walderdbeeren war von 6 Proben nur eine einzige ohne Coli-Keime. Von 8 beim Händler gekauften Pflaumenproben fanden sich alle mit *Bacterium coli* hochgradig infiziert. Man konnte sich des Eindruckes nicht erwehren, als ob Pflaumen von den untersuchten Obstarten am meisten den fäkalen Verunreinigungen ausgesetzt sind. Von den unter der Wasserleitung kräftig abgespülten Pflaumen waren von 8 Proben nur 3 frei von Coli. Von 7 Proben mit Weintrauben, die bei den verschiedensten Händlern gekauft waren, fand sich Coli auf 5 vor; im Gegensatz zu Neumann (10), der Weintrauben immer frei von Coli gefunden hatte. Von einer quantitativen Feststellung, wieviel Coli-Keime auf der Oberfläche der einzelnen Salatblätter oder Früchte sich befanden, wurde abgesehen: da von mehreren Blättern bzw. Früchten einige auch bei dieser feinen Untersuchungsmethode Coli-frei befunden wurden, war von vornherein anzunehmen,

daß es sich in der Regel nur um vereinzelte Coli-Keime handeln würde.

Da natürlich ebenso leicht wie das *Bacterium coli* z. B. auch der Typhus- und Ruhrbazillus und Choleravibrionen auf Gemüse und Obst übertragen werden können, so darf man annehmen, daß die Infektionsgefahr durch Genuß von rohem Obst und Gemüse besonders zu Epidemiezeiten relativ groß ist. Da Gemüse und Obst meist in feuchten Kellern und dunklen Räumen aufbewahrt wird, wo die pathogenen Keime vor Sonnenlicht und Eintrocknen hinreichend geschützt sind, können sich die Krankheitskeime noch länger darauf halten.

Infolge der Düngung auf dem Felde hat besonders das Gemüse reichlich Gelegenheit, mit Fäzespartikelchen in direkte Berührung zu kommen und auf diese Weise unter Umständen Typhus, Ruhr oder Cholera zu übertragen, während beim Obst wohl meist — worauf später noch hingewiesen wird — die Berührung beschmutzter menschlicher Hände die Infektionsquelle darstellt. Kayser (1) weist darauf hin, daß bei der Typhusausbreitung in einer Stadt Köchinnen, Dienstmädchen usw. auch durch das Hantieren mit rohem, ungeschältem Obst und Salat aus frisch gedüngten Gärten besonders gefährdet sind. Nach meiner Auffassung sind aber in gleichem Maße alle Personen gefährdet, welche Nahrungsmittel genießen, die an der Oberfläche mit infektiösen Keimen beladen sind. — Die Desinfektion aller infizierten menschlichen Abgänge ist nicht ausführbar. In Kot und Dünger halten sich Typhusbazillen viele Monate lang [Levy und Kaiser (2)]. Wenn auch nach den Erfahrungen von Gaillard (3), Janowski (4), Dieudonné (5), Billings und Penkham (6) direktes Sonnenlicht mehr oder weniger stark die Lebenskraft von Mikroorganismen abschwächt, sie sogar relativ rasch abtötet, so ist doch keine Sicherheit geboten, daß auch versteckter liegende Typhus-, Ruhr-, Cholerakeime vom Licht erreicht werden. So dürften beim Gemüse, z. B. beim Salat, mit seinen Falten und Fältchen, kaum alle Keime diffusem Tageslicht, viel weniger direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Erwiesen ist ferner die Tatsache, daß Gemüse, welches auf Rieselfeldern gebaut ist, eine Infektionsquelle bilden kann. Clauditz (11) kommt auf Grund seiner experimentellen Untersuchungen zu dem Schluß, daß der Boden von Rieselfeldern des öfteren von Typhuskeimen durchsetzt ist, zumal viele derartige Krankheitsfälle unerkannt ablaufen, oder auch die Exkremente von Bazillenträgern ohne vorherige Keimtötung den Rieselfeldern zugeführt werden.

Wohl viel größer als diese Gefahr ist diejenige der Infektion des Gemüses und des Obstes nach der Ernte auf dem langen Wege vom Bauern durch den Groß- und Kleinverkäufer hin zum Konsumenten, wo fast jedes einzelne Stück von stets ungewaschenen, oft fäkal verunreinigten Händen mehrfach berührt wird. Die oben angeführten Erfahrungen beweisen ferner, daß einmal auf die Oberfläche dieser Nahrungsmittel gelangte fäkale Keime sehr festhaften und selbst durch kräftiges Waschen nicht zu beseitigen sind.

Sind sie erst einmal auf die Oberfläche dieser Nahrungsmittel gelangt, so können sie sich dort sehr lange halten, vergleiche nachstehende Tabelle (S. 36).

Die Haltbarkeit der Keime scheint besonders groß zu sein, wenn das Obst unversehrt ist, wie z. B. B. Friedrich (12) beobachtet hat. Die Erklärung liegt wohl in der bakteriziden Wirkung des sauren Frucht-

Tabelle I.

Untersucher	Nahrungsmittel	Keime	Lebenszeit	Bemerkungen
Babes (zit. nach 12)	frisches Gemüse	Cholera vibrionen	48 Std.	
Celli 1889 (21)	Aepfel, Birnen (Schnittfläche)	"	2 1/2 Min.	
Uffelmann (zit. nach 12)	Aepfel	"	30 Std.	trocken aufbew.
dgl.	"	"	4 Tage	unter Glasglocke
A. Friedrich 1893 (12)	Kirschen	"	5 "	feuchte Kammer
dgl.	" (Schnittfl.)	"	3—48 Std.	Zimmertemper.
"	Pflaumen	"	1 Tag	feuchte Kammer
"	" (Schnittfl.)	"	6 Std.	Zimmertemper.
"	"	"	2 "	Sonnenlicht
"	Spinat	"	12 Tage	feuchte Kammer
"	"	"	6 "	Zimmertemper.
W. Hesse 1889 (20)	Kerbelrüben	Typhusbazillen	42-57 Tag.	
H. Clauditz 1904 (11)	Radieschen	"	4 Tage	
dgl.	Erbsen	"	14 "	
Bindseil 1917 (22)	Aepfel	"	20 "	Zimmertemper.
dgl.	" (Schnittfl.)	"	12 "	"
"	Weintrauben	"	50 "	"
"	" (Schnittfl.)	"	10 "	"
"	Kirschen	"	16 "	"
"	" (Schnittfl.)	"	8 "	"

saftes. Bindseil (22) kommt bei seinen Versuchen zu dem Ergebnis, daß „Obst und Gemüse ein Hauptvehikel zur Typhusverschleppung sind“, und findet, daß sich Typhusbazillen an Obst und Rohgemüse so lange halten, „bis diese Waren für den menschlichen Gebrauch als völlig verdorben zu bezeichnen sind“.

Allerdings ist es meist kaum möglich, eine Infektionsübertragung durch Obst oder Gemüse sicher nachzuweisen, wenn auch z. B. bei den auf den Pflaumengenuß zurückgeführten Sommerdiarrhöen der Verdacht recht begründet erscheint. Die Angaben darüber sind äußerst gering. Newman (40) hat in London mehrere Typhusinfektionen mit Sicherheit auf den Genuß roher Brunnenkresse, die aus fäkal verunreinigten Tümpeln gewonnen war, zurückgeführt. Obst und Gemüse wird in derartigen Mengen verzehrt und durch Groß- und Kleinhandel derartig über das Land verteilt, daß ein Nachweis gemeinschaftlicher Infektion verschiedener Fälle äußerst schwierig sein dürfte. Bekannt ist die Steigerung der Typhusfälle im Sommer und Herbst, welche von v. Drigalski (13) mit dem in dieser Zeit reichlicheren Obst- und Gemüsegenuß in Verbindung gebracht wird, eine Ansicht, der sich Bormans (14) anschließt.

Aus diesen Tatsachen folgt die Notwendigkeit, wenigstens in Zeiten drohender oder herrschender Typhus-, Ruhr-, Choleraepidemien das roh verzehrte Obst und Gemüse desinfizieren zu können. Wesentlich für die Desinfektionsversuche ist die von Laurent, Duclaux, Fernbach und Buchner festgestellte Tatsache, daß stets nur die Oberfläche infiziert ist, wenn nicht durch eine Verletzung, z. B. einen Stich, eine Infektion tiefer gelegener Teile stattgefunden hat. Fazio (15), Remlinger und Nouri (16) stellten fest, daß Typhusbazillen niemals in das Innere der Pflanzen eindringen, und daß die unverletzte Ober-

Tabelle II.

Name des Untersuchers	Menge des einwirkenden Chlors ¹⁾	Menge und Art des Desinfektionsmittels	Wirkung, Menge u. Art des zu desinfizierenden Wassers	Einwirkung	Neutralisationsmittel
Traube 1894 (30)	0,0001065	0,0004260 Chlorkalk	100 ccm stark bakterienhalt. Wasser wird keimfrei	2 Std.	Na ₂ SO ₃
Karliński 1894 (24)	0,001	.	Wasser mit Cholera- und Typhuskeimen	.	.
Sickenberger und Kaufmann 1894 (38)	0,002	NaOCl	Keimverminderung 1 l Nilwasser	1/2 Std.	.
dgl.	0,005	"	Abtötung dgl.	5 Min.	.
Kratzschmer 1894 (24)	0,003	.	Milzbrandsporen	.	.
Bassenge 1895 (25)	0,0652	.	1 l m. pathog. Keim.	12 Min.	} Calcium- bisulfit
dgl.	0,0978	0,15 Chlorkalk	dgl.	10 Min.	
"	0,0108	.	"	2 Std.	
Lode 1895/99 (28, 33)	0,03	.	1 l Abtötung vegetativer Formen von Mikroorganismen	10 Min.	0,3 g Na ₂ SO ₃
Kaeß 1900 (34)	.	0,15 Chlorkalk	1 l Keimfreiheit	1/2 Std.	8 Tr. Salzsäur.
Ballner 1900 (35)	.	2,25 "	15 l Wassergraben	.	4,5 g Na ₂ SO ₃
Schumburg 1900 (36)	0,06	.	1 l Spreewasser	.	.
Hünemann und Deiter 1901 (29)	0,04	0,4 NaOCl	1 l Abtötung von Typhus, Cholera, Coli	10 Min.	0,14 g Na ₂ SO ₃
Engels 1902 (26)	0,106	0,45 Chlorkalk	dgl.	10 Min.	.
Thumm u. Schide 1907 (38)	5,0	15—20 g Chlorkalk	1 cbm Leitungswasser	.	.
Hetsch 1906 (37) (Angaben aus Paris)	.	5 g Chlorkalk + 30 g Eisenchlorid	1 cbm Seiwasser keimfrei	.	.
Hetsch 1906	0,2343	0,2 ccm 25-proz. Chlorkalklös. + 0,9 ccm 33-proz. Eisenchloridlösung	5 l Wasser mit Cholera vibrionen, nicht abgetötet	.	.
Bruns 1912 (38)	0,002	.	1 l	3—6 Std.	.
Langer 1913 (27)	0,12	0,5 Chlorkalk	1 l Abtötung in stark verunrein. Wasser	.	Natriumperkarbonat
Antonowsky (32)	0,008	" + H ₂ O ₂	starke Keimverminderung	10 Min.	.
Kruszewski 1911 (39)	0,2	.	1 l Abtötung aller Bakterien	.	.
Thresh 1910 (38)	0,001	.	1 l starke Keimverminderung. Keine Abtötung	.	.
Woodhead 1910 (38)	0,0015	.	dgl.	.	.
Clark u. de Gage 1909 (38)	0,01	.	"	.	.
Phelps 1910 (38)	0,00025— 0,0004	.	"	.	.

1) Der Gehalt an wirksamem Chlor beträgt bei Chlorkalk 25 Proz., bei Natriumhypochlorit rund 15 Proz.

haut ein gutes Schutzmittel der Pflanzen darstellt, ein Ergebnis, zu dem auch Grancher und Dechamps (17) und Clauditz (11) gekommen sind. Genauere Untersuchungen über den Schutz der intakten Oberhaut machten Lominsky (18) und Russel (19), die beide in ihr einen tadellosen Schutz gegen das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen sehen. Remlinger und Nouri (16) zogen sogar Zwiebeln in verunreinigtem Wasser und fanden keine Keime in ihrem Innern vor. Clauditz fand nicht einmal bei Wurzelverletzungen auf Typhus-infiziertem Boden gezogener Pflanzen Bakterien im Innern vor.

Das erleichtert die Aufgaben der Desinfektion. Wir brauchen ein Desinfektionsmittel, das die an der Oberfläche des Obstes oder Gemüses haftenden Keime möglichst radikal abtötet, das rasch und sicher wirkt, nicht giftig ist, nicht schlecht schmeckt und riecht, die Küchengefäße nicht angreift, billig und einfach in der Anwendung ist. Selbstverständlich kann man eine derartige Desinfektion nicht in normalen Zeiten in der Küche vornehmen, es soll aber jeder Haushalt in die Lage gesetzt werden, in Epidemiezeiten und zu Zeiten großer Epidemiefahr einigermaßen oder gänzlich keimfreies Gemüse und Obst genießen zu können, ohne sich der Infektionsgefahr auszusetzen.

Es lag nahe, Chlorkalk, der sich bereits in der Wassersterilisation bewährt hat, auch für den Zweck der Obst- und Gemüsedesinfektion zu verwenden. Diese Frage habe ich nun im Hygienischen Institut der Universität Breslau auf Anregung und unter gütiger Mithilfe von Herrn Prof. Dr. Prausnitz näher untersucht. Die Wirkung des Chlorkalks in wässriger Lösung wird jetzt meist dem freiwerdenden Sauerstoff zugesprochen, während man früher annahm, daß das freiwerdende Chlor die Desinfektionswirkung hervorbringe. Es kann aber auch die entstehende unterchlorige Säure in Chlor, Sauerstoff und Wasser gespalten werden, und so Sauerstoff und Chlor vereint wirken.

Es wurde bei den Versuchen von den Ergebnissen der Wassersterilisationsversuche mit Chlorkalk ausgegangen. Es folgt nun eine Tabelle der erwähnenswertesten bisher gemachten Versuche dieser Art.

Die Zusatzmenge von Chlorkalk zu dem Trinkwasser in den Leitungen nordamerikanischer Städte und in den Angaben der eben erwähnten amerikanischen Autoren sind bei weitem geringer als diejenigen, welche von den genannten deutschen Forschern als notwendig bezeichnet wurden, um im Wasser pathogene Keime abzutöten. Je mehr organische Stoffe im Wasser sind, desto unverhältnismäßig mehr Chlor muß zugesetzt werden. Die Amerikaner pflegen ihr Wasser vor der Chlorung durch Schnellfilter von allen suspendierten Stoffen und etwa 90 Proz. der Bakterien zu befreien und konnten sich daher mit einer weit geringeren Menge begnügen als die deutschen Autoren, die restlose Desinfektion selbst kleiner suspendierter Kotklümpchen bezweckten. In Columbus (38) werden z. B. nur 0,1 mg wirksamen Chlors pro Liter Wasser angewandt. Andererseits wird dort der Hauptwert nicht auf direkte Keimabtötung, sondern nur auf eine Keimverminderung gelegt. Auch in Breslau sind Einrichtungen getroffen, daß im Falle einer Epidemie das städtische Leitungswasser nach der Filtration durch Chlor entkeimt werden kann. Im Kriege hat sich die Chlorkalkdesinfektion des Trinkwassers auf verschiedenen Kriegsschauplätzen gut bewährt und zweifellos ihren Anteil an der Seuchenbekämpfung gehabt [Kranz (41), K. Jötten (42), Wesenberg (43)].

Die größte angewandte Chlor- resp. Chlorkalkmenge findet man bei Langer (27). Er steigerte im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen die Menge des wirksamen Chlors bis 0,12 g; was einer Chlorkalkmenge von 0,5 g entspricht, und kommt zu dem Resultat: „Ein Chlorkalkzusatz von 0,5 g pro Liter gibt selbst bei Wässern mit starker Verunreinigung eine hinreichende Sicherheit für die Abtötung pathogener Bakterien, namentlich wenn durch Vermischen des Chlorkalks mit gleichen Mengen Kochsalz für feinere Verteilung gesorgt wird.“ Um das Wasser wieder trinkbar zu machen, ist bei allen diesen Versuchen eine Neutralisation mit Natriumsulfit, Natriumkarbonat oder mit Calciumsulfit nötig. Bei den Desinfektionsversuchen an Obst und Gemüse dagegen stellte es sich heraus, daß eine Neutralisation als Geschmacks-korrigens sich meistens erübrigte, wenn man der Desinfektion eine genügende Abspülung mit Wasser folgen ließ.

Ich begann nun meine Versuche mit den von den oben genannten Autoren bei der Wasserdesinfektion angegebenen größten Mengen Chlorkalk, indem ich von der Ueberlegung ausging, daß man doch beim Salat z. B. mit seinen Falten und Fältchen mit einer größeren Beschmutzung und einer überaus festsitzenden Verunreinigung rechnen muß. Ich begann also die Versuche mit der von Langer angegebenen Menge von 0,5 g pro Liter und steigerte dann je nach Bedarf die angewandte Chlorkalkmenge, da sich 0,5 g als kaum wirksam erwies. Die Hauptaufmerksamkeit wurde auf die Abtötung von *Bacterium coli* gerichtet, das ich als widerstandsfähigsten Vertreter der in Betracht kommenden Angehörigen der Ruhr-Typhus-Coli-Gruppe wählte, und dessen Abtötung oder Keimverminderung einen Schluß ziehen läßt auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der genannten Infektionserreger. Selbstverständlich ist es wünschenswert, alle Coli-Bakterien abzutöten, aber allein schon eine wesentliche Verringerung der Zahl der Coli würde eine Herabsetzung der Infektionsgefahr durch Keimverminderung und vielleicht gleichzeitig durch Virulenzverminderung der überlebenden Keime bedeuten.

Vor Beginn der Versuche wurde die Wertigkeit des Chlorkalkes festgestellt. Es wird 50 ccm Chlorkalkmilch — 10 g Chlorkalk auf einen Liter — mit 1/10 norm. Calciumarsenitlösung so lange titriert, bis sie frisch hergestelltes Jodkaliumstärkepapier als Indikator nicht mehr bläut. Es wurde bei der Titrierung 0,2485 g freien Chlors pro Gramm des verwandten Chlorkalks gefunden, eine Zahl, die wohl die normale sein dürfte und der von Langer (27) angegebenen entspricht.

Die Versuche wurden zunächst eingehend mit Salat vorgenommen, ferner mit Pflaumen und Weintrauben. Sie wurden in der Weise angestellt, daß der Salat zuerst infiziert wurde. Diese künstliche Infektion geschah in der Weise, daß der grüne frische Salat regelrecht mit Fäzes bestrichen wurde, so daß man deutlich kleine Spuren daran haften sah. Dieser infizierte Salat wurde nun im Abzug 24 Std. stehen gelassen, um die Fäzes eintrocknen zu lassen und dadurch den von der Natur gegebenen Verhältnissen annähernd gleichzukommen. Es ist wohl klar und durch Untersuchungen von B. Ehrlich (7) bewiesen, daß frische Verunreinigungen längst nicht so festhaften wie alte eingetrocknete.

Dem Beispiele Langers folgend, wurde der Chlorkalk zum Zwecke der schnelleren und feineren Verteilung jedesmal mit derselben Gewichtsmenge Kochsalz gemischt und dann in Wasser aufgelöst. Diese

fertige Lösung wurde sofort zum Versuche verwandt. Für jeden Versuch wurden frische Lösungen hergestellt. Bei jeder Versuchsanordnung wirkte die angesetzte Chlorkalklösung je 10, 20 oder 30 Minuten auf den künstlich infizierten und auf den nicht künstlich infizierten Salat ein. Entsprechende Salatproben (mit und ohne künstliche Infektion) wurden gleich lange in sterilem Wasser gehalten und danach ebenfalls auf ihren Keimgehalt untersucht. Jedes Salatblatt wurde in ein Bouillonröhrchen gebracht und nach dem oben beschriebenen Verfahren auf Anwesenheit von Coli untersucht. Sämtliche Versuche wurden in mehreren Parallelreihen angesetzt. Bei dem ersten Versuch wurde dem Salat 0,5 g Chlorkalk pro Liter zugesetzt. Es ergab sich dabei folgendes, nicht zufriedenstellendes Bild:

Tabelle III.

	Chlorkalk- menge im Liter	Zeit Min.	Bouillon	Zahl der Coli- Keime auf der Endo-Platte
Künstlich infizierter Salat	0,5	10	stark getrübt	∞
” ” ”	0	10	” ”	∞
” ” ”	0,5	20	” ”	∞
” ” ”	0	20	” ”	∞
” ” ”	0,5	30	” ”	∞
Nicht künstlich infizierter Salat	0,5	20	” ”	∞
” ” ” ”	0	20	” ”	∞

Eine Abtötung der Coli-Keime des nicht künstlich infizierten Salates gelang oft, aber nicht immer, erst bei 1,0, regelmäßig bei 1,5 g Chlorkalk im Liter. Schon bei der Konzentration von 1 g war eine Hemmung der Coli-Entwicklung deutlich erkennbar. Die Endo-Platte zeigte eine geringere Zahl von Coli-Keimen als in den entsprechenden Versuchen mit kleinerer Konzentration, während die Kontrollplatte — künstlich infizierter Salat ohne Desinfektion — immer von unendlich vielen Coli-Kolonien bedeckt war.

Die nunmehr folgenden Versuche mit höheren Konzentrationen folgen in der Tabelle (S. 41).

Dieser letzte Versuch, der 10mal wiederholt wurde, ergab in 7 Fällen schon bei 20 Min. Einwirkungsdauer Coli-Kolonienfreiheit. Ständig frei von Coli-Kolonien blieben die Platten bei einer Konzentration von 4,0 und 4,5 pro Liter und 30 Min. Einwirkungsdauer. Bei derselben Einwirkungsdauer zeigt sich schon bei 3,5 g eine überaus starke Keimverminderung. Eine Konzentration von 5,0 pro Liter ergab schon nach 10 Min. Einwirkungsdauer ein Freisein von Coli-Kolonien, im übrigen annähernd dasselbe Resultat.

Selbst wenn alle Coli getötet waren, blieben naturgemäß noch manche resistente Sporenbildner aus der Heubazillengruppe am Leben, die den hier angewandten Desinfektionslösungen widerstanden hatten. Auch diese abzutöten, kann nicht das Ziel unserer Desinfektionsmaßnahmen sein.

Um dem Einwand zu begegnen, zu grob gearbeitet zu haben, wurde noch ein abgeänderter Versuch gemacht, indem die Salatblätter dadurch infiziert wurden, daß sie in Wasser gelegt wurden, in dem Fäzes fein zerrieben war. Sie blieben etwa 15 Min. darin liegen, wurden dann

Tabelle IV.

	Chlorkalk- menge im Liter	Zeit Min.	Bouillon	Zahl der Coli- Kolonien auf der Endo-Platte
Künstlich infizierter Salat	3,5	10	leicht getrübt	sehr zahlreich
" " "	0	10	stark "	∞
" " "	3,5	20	leicht "	zahlreich
" " "	0	20	" "	∞
" " "	3,5	30	Leicht "	spärlich
Nicht künstlich infizierter Salat	3,5	20	klar	Platte steril
" " "	0	20	getrübt	vereinzelt
Künstlich infizierter Salat "	4,0	10	leicht "	zahlreich
" " "	0	10	" "	∞
" " "	4,0	20	leicht "	spärlich
" " "	0	20	" "	∞
" " "	4,0	30	wenig "	0
Nicht künstlich infizierter Salat	4,0	20	klar	Platte steril
" " "	0	20	getrübt	vereinzelt
Künstlich infizierter Salat "	4,5	10	leicht getrübt	spärlich
" " "	0	10	" "	∞
" " "	4,5	20	" "	0 oder ganz ver- einzelt
" " "	0	20	" "	∞
" " "	4,5	30	" "	0
Nicht künstlich infizierter Salat	4,5	20	klar	Platte steril
" " "	0	20	getrübt	zahlreich

herausgenommen und 24 Std. trocknen gelassen. Es wurde dabei in 12 Versuchen ein nur wenig günstigeres Resultat erreicht. Es zeigte sich eine restlose Abtötung der Coli bereits bei 3,5 g Chlorkalkkonzentration in 30 Min., bei 4,5 g in 20 Min. (vgl. Tab. IV).

Der Einwand lag nahe, daß in diesen Versuchen die Chlorwirkung noch bei der Uebertragung des Salates auf die Bouillon und selbst noch auf der Endo-Platte fort dauern könnte, daß also die hier gewonnenen Ergebnisse nicht eine Abtötung, sondern nur eine Entwicklungshemmung der Coli-Keime beweisen. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe nach beendeter Desinfektionszeit der Salat in einer zur Chlorneutralisierung gerade genügenden 4¹/₂-prom. Na₂SO₃-Lösung ausgeschwenkt und dann wie oben weiterbehandelt.

12 derart vorgenommene Versuche zeigten in den höheren Konzentrationen folgendes Bild:

Tabelle V.

	Chlorkalk- menge im Liter	Zeit Min.	Bouillon	Zahl der Coli- Kolonien auf der Endo-Platte
Künstlich infizierter Salat	4,5	10	getrübt	reichlich
" " "	4,5	20	" "	spärlich
" " "	4,5	30	" "	0
" " "	5,0	10	" "	spärlich
" " "	5,0	20	" "	0
" " "	5,0	30	leicht getrübt	0
" " "	5,5	10	" "	0
" " "	5,5	20	" "	0
" " "	5,5	30	klar	0

Es zeigt sich, daß bei der Desinfektion mit nachfolgender Neutralisation jedesmal eine um etwa 1 g im Liter höhere Menge Desinfektionsmittel bei gleichbleibender Einwirkungsdauer notwendig ist. Die Hauptergebnisse der Tab. IV und V sind in nachfolgender Tab. VI zusammengefaßt:

Tabelle VI.

Behandlungsdauer	Chlorkalkmenge ohne nachfolgende Neutralisation	Chlorkalkmenge mit nachfolgender Neutralisation
10 Min.	4,5 g	5,5 g
20 „	4,0 „	5,0 „
30 „	3,5 „	4,5 „

Die Zahlen der ersten Spalte geben also die Chlorkalkmengen an, die bereits sehr tiefgehende Schädigungen der Coli-Keime hervorrufen, die Zahlen der letzten Spalte diejenige Konzentration, die mit Sicherheit jeden Coli abtötet und daher für praktische Versuche empfohlen wird. Für die Praxis der Entkeimung des Salates genügt nach meinen Erfahrungen die einfache Behandlung mit Chlorkalk. Während bei der Trinkwassersterilisation nach Zusatz größerer Chlorkalkmengen die nachherige Neutralisierung des Chlorüberschusses nötig ist, um den Geschmack des Chlors zu beseitigen und das Wasser trinkbar zu machen, genügt beim Salat eine kurze Abspülung in Wasser, um die letzten anhaftenden Chlormengen zu beseitigen. Der Salat schmeckt genau so frisch und angenehm wie nach einfacher Wasserspülung ohne vorherige Chlorbehandlung.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde die Desinfektionswirkung des Chlors gegenüber verschiedenen Obstarten geprüft. Es ergaben sich hierbei im großen und ganzen die gleichen Werte.

Bei künstlich infizierten Pflaumen wurde ohne nachherige Neutralisation durch 20 Minuten lange Einwirkung von 4,5 g Chlorkalk im Liter Coli-Freiheit der Kulturen, bei nachfolgender Neutralisierung erst durch 20 Min. lange Einwirkung von 5,5 g Chlorkalk im Liter erzielt.

Durchaus entsprechende Ergebnisse wurden bei Kirschen, Walderdbeeren und Weintrauben erzielt.

Bei nicht künstlich infiziertem Obst genügten wie beim Salat viel geringere Chlorkonzentrationen (1,5—2,0 g Chlorkalk im Liter) regelmäßig zur Coli-Abtötung. Aber für praktische Zwecke wird es sich empfehlen, die Konzentration zu verwenden, welche selbst eine so ungeheuer grobe Infektion, wie sie in meinen Versuchen verwendet wurde, sicher unschädlich macht.

Der Geschmack der mit 5,5 g Chlorkalk im Liter desinfizierten Pflaumen, Kirschen und Walderdbeeren war wie beim Salat nach kurzer Wasserspülung in keiner Weise beeinträchtigt. Bei Weintrauben dagegen blieben anscheinend an der rauhen Oberfläche der Stengel Chlorreste, die störend rochen. Bei einzelnen Weintrauben war dies nicht der Fall. Zur Traubendesinfektion wird es also auch in der Praxis nötig sein, das Chlor durch nachherige kurze Behandlung mit einer 4,5‰ Na_2SO_3 -Lösung zu neutralisieren und erst dann die endgültige Spülung vorzunehmen.

Zusammenfassung.

1) Beim Händler gekauftes Gemüse und Obst (Salat, Pflaumen, Kirschen, Walderdbeeren, Weintrauben) ist regelmäßig mehr oder weniger mit *Bacterium coli commune* beladen. Man muß also stets damit rechnen, daß es fäkal infiziert ist. Infolge der langen Lebensdauer der pathogenen Keime auf diesen Nahrungsmitteln besteht daher dauernd die Möglichkeit einer Uebertragung von Typhus, Ruhr, Cholera durch den Genuß von rohem Gemüse und Obst.

2) Eine sichere Desinfektion von Salat, Pflaumen, Kirschen, Walderdbeeren, Weintrauben wird erzielt:

bei 30 Min. langer Einwirkungsdauer von	1,183 g	freien Chlors =	4,5 g	Chlorkalk pro l
oder „ 20 „ „ „ „	1,2425 g	„ „	= 5,0 g	„ „ 1
„ 10 „ „ „ „	1,3667 g	„ „	= 5,5 g	„ „ 1

Für praktische Zwecke wird man die Zahlen der mittleren Reihe bevorzugen.

3) Salat, Pflaumen, Kirschen und Walderdbeeren können nach der Chlorbehandlung durch kurzes Waschen in Wasser von den letzten anhaftenden Spuren des Desinfektionsmittels befreit werden und zeigen danach vollkommen normalen, frischen Geschmack. Bei Weintrauben bleibt leicht etwas Chlor in der Tiefe der Traube, besonders am Stiel, zurück; hier ist es nötig, zwischen Chlorung und Spülung eine Neutralisierung durch kurzes Ausschwenken in einer 4,5‰ Natriumsulfidlösung einzuschieben. Sonst aber kann von der immerhin umständlichen Neutralisierung abgesehen werden.

Verzeichnis der benutzten Bücher und Schriften.

- 1) Kayser, H., Ueber die Art der Typhusausbreitung in einer Stadt. (München. med. Wochenschr. 1909. S. 1066 u. 1130.) — 2) Levý, E., u. Kaiser, K., Ueber die Lebensdauer von Typhusbazillen, die im Stuhl entleert wurden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 33. 1903. S. 489.) — 3) Gaillard, zit. nach 5. — 4) Janowski, Th., Zur Biologie der Typhusbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Bd. 8. 1890. S. 167.) — 5) Dieudonné, A., Beiträge zur Beurteilung der Einwirkung des Lichtes auf Bakterien. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 9. 1894. S. 405.) — 6) Billings u. Penkham, The influence of certain agents in destroying the vitality of the typhoid and of the colon bacillus. (Science. Vol. 7. p. 169; Baumgartens Jahresber. Bd. 11. 1895. S. 288.) — 7) Ehrlich, B., Die Reinigung des Obstes vor dem Genuß. (Arch. f. Hyg. Bd. 41. 1901. S. 152.) — 8) Satory-Filassier, Les fruits porteurs des microbes. (Compt. rend. Soc. de Biol. T. 67. 1909. p. 445; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Ref. Bd. 47.) — 9) Ressel, Ueber fäkale Verunreinigung auf Obst und Gemüse. Dissert. Berlin 1907. — 10) Neumann, G., Der Nachweis des *Bacterium coli* in der Außenwelt, besonders auf Nahrungsmitteln. (Dtsch. med. Wochenschr. 1910. S. 2046.) — 11) Clauditz, H., Typhus und Pflanzen. Hyg. Rundsch. Bd. 18. 1904. S. 865. — 12) Friedrich, A., Beiträge zum Verhalten der Cholerabakterien auf Nahrungs- und Genußmitteln. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 8. 1893. S. 465.) — 13) v. Drigalski, Uebertragungsweise der Typhusbazillen von Mensch auf Mensch. (Ebenda. Bd. 41. 1912. S. 228.) — 14) Bormans, Alfonso, L'ileotifo in Torino. (Riv. d'Ig. san. pubbl. T. 19. p. 553; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 43.) — 15) Fazio, E., Concorrenza vitale fra i batteri della potrefazione e quelli del carboncio e del tifo. (Riv. intern. d'Ig. 1890; Ref. Baumgartens Jahresber. Bd. 6. 1890. S. 540.) — 16) Remlinger, P., u. Nouri, O., Les microbes pathogènes du sol peuvent-ils être entraînés à la surface des végétaux. (Compt. rend. Soc. de Biol. T. 68. 1909. p. 105; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 46. 1910.) — 17) Grancher et Dechamps, Arch. de méd. expér. d'anat. path. 1889. p. 33; Ref. Baumgartens Jahresber. Bd. 5. 1889. S. 195. —

18) Lominsky, Th., Ueber den Parasitismus einiger pathogener Mikroorganismen auf lebenden Pflanzen. (Wratsch. 1890. p. 133; Ref. in Baumgartens Jahresber. Bd. 6. 1890. S. 568. — 19) Russel, H. L., [Diss.] Baltimore 1892; Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. 15. 1894. S. 823. — 20) Hesse, W., Unsere Nahrungsmittel als Nährböden für Typhus und Cholera. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 5. 1889. S. 527.) — 21) Celli, A., Delle nostre sostanze alimentari considerato come terreno di cultura di germi patogeni. (Ann. dell'Istit. d'Ig. exper. dell'Univers. di Roma. 1889; Ref. Baumgartens Jahresber. Bd. 5. 1889. S. 514.) — 22) Bindseil, Ueber die Haltbarkeit der Typhusbazillen an Nahrungs- und Genußmitteln. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 84. 1917. S. 181.) — 23) Filow, A., Wie lange können die Entleerungen von Cholerakranken als Infektionsquelle dienen? (Wratsch. 1909. Nr. 27; Ref. Hyg. Rundschau. Bd. 20. 1910. S. 1000.) — 24) Karliński, Wien. klin. Wochenschr. 1895. S. 195. Kongreßber. — 25) Bassenge, Zur Herstellung keimfreien Trinkwassers durch Chlorkalk. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 20. 1895. S. 227.) — 26) Engels, Weitere Studien über die Sterilisation von Trinkwasser auf chemischem Wege. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 32. 1902. S. 495.) — 27) Langer, H., Ein neues Verfahren der Chlorkalksterilisation kleiner Trinkwassermengen. (D. med. Wochenschr. 1913. S. 1837.) — 28) Lode, A., Die Gewinnung von keimfreiem Trinkwasser durch Zusatz von Chlorkalk. (Arch. f. Hyg. Bd. 24. 1895. S. 236.) — 29) Hünermann u. Deiter, Ueber die Desinfektion des Trinkwassers mit Natriumhyperchlorid. (Deutsch. med. Wochenschr. 1901. S. 391.) — 30) Traube, M., Einfaches Verfahren, Wasser in großen Mengen keimfrei zu machen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.-Krankh. Bd. 16. 1894. S. 149.) — 31) Schüder, Ueber das Hünermannsche Verfahren der Wasserdesinfektion. (Ebenda. Bd. 39. 1902. S. 379.) — 32) Antonowsky, Zur Frage der Desinfektion des Trinkwassers mittels minimaler Chlorkalkmengen. (Ebenda. Bd. 72. 1912. S. 421.) — 33) Lode, A., Weitere Studien über die Sterilisierung des Wassers durch Zusatz von Chlorkalk. (Hyg. Rundschau. Jahrg. 9. 1899. S. 859.) — 34) Kaeß, Ueber die Sterilisation von Wasser durch Jod, Chlor und Brom. (Pharm. Zeitschr. 1900. S. 471.) — 35) Ballner, Zur Gewinnung von keimfreiem Trinkwasser durch Zusatz von Chlorkalk und Brom. (Wien. med. Wochenschr. 1901. Nr. 31. 32. 33.) — 36) Schumburg, Die Methoden zur Gewinnung keimfreien Trinkwassers durch chemische Zusätze. (Veröffentl. a. d. Geb. d. Milit.-San.-Wes. 1900. S. 29; Ref. Hyg. Rundsch. 1900. S. 729.) — 37) Hetsch, zit. nach Steffenhagen (44). — 38) Zit. nach Steffenhagen (44). — 39) Kruszewski, zit. nach Steffenhagen (44). — 40) Newman, zit. nach Kolle-Wassermann. — 41) Kranz, W., Künstliche Trinkwasserbereitung. (Intern. Zeitschr. f. Wasservers. 1917; Ref. Hyg. Rundsch. Bd. 28. 1918. S. 433.) — 42) Jötten, K., Selbstbereitung von einwandfreiem Trinkwasser im Felde. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 81. 1917. S. 208.) — 43) Wesenberg, G., Die Trinkwassersterilisation mit Chlorkalk im Felde. (Hyg. Rundschau. Bd. 25. 1915. S. 273.) — 44) Steffenhagen, K., Ueber die Behandlung des Trinkwassers mit Chlorkalk. (Ebenda. Bd. 24. 1914. S. 185.)

Nachdruck verboten.

Ueber die desinfizierende Wirkung der Kupfersalze.

[Aus der Lupusheilstätte Gießen (Direktor: Prof. Dr. Jesionek) und dem Hygienischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. med. et phil. R. O. Neumann).]

Von Hildegard Mittelbach.

In der Literatur finden wir zahlreiche Angaben sowohl über die toxische, wie über die desinfizierende Wirkung des Kupfers.

Nach Kobert sind die löslichen Kupfersalze nicht ungiftig, doch rufen sie, per os eingenommen, keine wesentlichen Gesundheitsstörungen hervor. Jedenfalls gilt das für die Mengen, die gelegentlich mit der Nahrung aufgenommen werden. Größere Kupfermengen, per os aufgenommen, können „gastrisch“ wirken; das Quantum, das eventuell tödliche Wirkung haben kann — eine eigentliche letale Dosis ist nicht bekannt — wird in den seltensten Fällen wegen des ekelhaften Metallgeschmacks unbenutzt aufgenommen. Giftig gestalten sich die Kupfersalze, besonders die nichtätzenden Salze, erst dann für den menschlichen Organismus, wenn sie in die Blutbahn gebracht werden.

Ueber die desinfizierende Wirkung des Kupfers erhalten wir in der Hauptsache Aufschluß durch die Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Metalle im allgemeinen. So untersuchte Miller (1) 1889 Metalle, insonderheit Goldpräparate, die zur Zahnfüllung benutzt wurden, auf ihre bakterienschädigende Wirkung. Auch Poetschke (2) untersuchte Zahnzemente, die kupfer- und zinkhaltig waren. Er fand, daß Kupfer eine ausgesprochen keimtötende Kraft besitze. Behring (3) bestätigte die Angaben Millers. Er prüfte eine ganze Reihe von Metallen, darunter auch Kupfer. Er beurteilte den Grad der bakterienschädigenden Wirksamkeit je nach der Größe der wachstumsfreien Zone, die sich um das auf eine beimpfte Agarplatte gelegte Metallstückchen bildete. Dabei beobachtete er, daß nicht alle Bakterien sich dem gleichen Metallstückchen gegenüber in derselben Weise verhalten; die eine Art wird mehr im Wachstum behindert als die andere. Während Miller der Meinung ist, die antiseptische Wirkung der Metalle komme dadurch zustande, daß sich der Luftsauerstoff auf dem Metall verdichte, glaubt Behring, daß die Metalle durch den Einfluß der Stoffwechselprodukte der Bakterien im Nährboden zur Lösung gelangen und dadurch antiseptisch wirken. Wolf und Thiele (4) bekennen sich zu der Auffassung von Behring. Sie beobachteten gleichfalls die bakterizide Eigenschaft des Kupfers. Desgleichen Natonek (5), Disider und Reitmann, welche Kupfermünzen auf Nährböden legten. Aehnliche Versuche stellte Messerschmidt (6) an. Er benutzte französische Kupfergeschosse, Gebrauchsgegenstände aus Kupfer und sonstiges technisches Kupfer. Er fand, daß das Kupfer unter geeigneten Versuchsbedingungen keimtötend wirke. Diese Wirkung komme aber nur dann zustande, wenn das metallische Kupfer im Nährboden gelöst werde, zum Kupfersalze werde. Credé und Beyer (7), die es sich zur Aufgabe stellten, metallisches Silber und andere Silberpräparate in die chirurgische Desinfektionspraxis einzuführen, schreiben wiederum die Desinfektionswirkung der Metalle vorausgehendem, wenn auch nur kurz andauerndem Wachstum der Keime zu, was Säurebildung veranlasse, wie z. B. beim Silber die Bildung von milchsauerm Silber. Aber auch den Eiweißverbindungen, die Metalle mit Nährboden eingehen, schreiben sie die keimtötende Eigenschaft zu; dieser Ansicht ist auch Bohtz (8); er streute das pulverisierte Kupfer auf Kolonien. Saxl (9) ist der Ansicht, daß die bakterizide Eigenschaft der Metalle nicht auf der Lösung der Metalle im Nährboden, sondern auf physikalischer Energie beruhe, die sich auf der Oberfläche der Metalle abspiele. Iwanoff (10) stellte bei seinen Untersuchungen über die Einwirkung der Metallsalze auf die Entwicklung der Schimmelpilze fest, daß die Giftigkeit der Metallsalze mit dem Atomgewicht steige. Bolton (11) sah bei einer über 50 Min. andauernden Einwirkung von Kupferstückchen auf besäte Agarplatten eine totale Abtötung der Keime. Desgleichen konnte Christian (12), der eine große Anzahl von Metallen untersuchte, feststellen, daß das Kupfer eine erhebliche bakterizide Kraft besitze. Clark und Gage (13) berichten ebenfalls von dieser Eigenschaft. Sie halten Kupfersulfat für weniger wirksam als metallisches Kupfer. Kraemer gab eine Kupferplatte von 1 qcm auf 1 l Wasser und konnte damit schon innerhalb von 2 bis 4 Std. Typhus- und Coli-Bakterien zur Abtötung bringen. Deutlich wachstumshindernd erwies sich das Kupfersulfat, das Fregonneau (14) Nährboden, auf dem er *Proteus* züchtete, zusetzt. Springer und Springer jun. (15) versetzten wässrige Lösungen von Eiern und Bluteiweiß, Fleisch, Wasser, Abwasser mit Kupfersalzen und beobachteten in sämtlichen Fällen eine gehemmte Entwicklung der Fäulnisbakterien.

Auch über die praktische Verwertung der Kupfersalze in der Desinfektion und über das verschiedenartige Verhalten der einzelnen Bakterienarten gegenüber finden wir mancherlei Angaben. Milardet und Gajou (16) verhinderten das Keimen von *Petersonspora*-Konidien im Wasser durch eine Zugabe von nur ca. 0,0000002 Kupfersulfat. Das Gleiche berichtet Hesse (17). Charrin und Netter (18) machen den Vorschlag, beim Cholerakranken und dessen Umgebung Kupfersulfatlösungen zur Desinfektion zu benutzen; eine Lösung von 50,0:1000,0 für die Desinfektion der schmutzigen Wäsche, eine Lösung von 12,0:1000,0 für das Waschen von Gesicht und Hände. Auch Arnould (19) empfiehlt das Kupfersulfat, das in Mengen von 6—7 g 1 l Stuhl zugesetzt, vollkommene Desinfektion bewirke. Green (20) dagegen empfiehlt das *Cuprum bichloratum*, das deshalb dem Kupfersulfat vorzuziehen sei, weil es keine Eiweißverbindung eingehe. Von Gerloeczy (21) schlägt wiederum den Behörden vor, mit *Cuprum sulfuricum* im größeren Maße Versuche anzustellen, da seine Untersuchungen ergeben haben, daß es in einer Quantität von 1,0:1000,0 die Kanalflüssigkeit vollkommen reinigte, geruchlos und dauernd steril machte, ferner auch in gehöriger Menge angewandt, den Inhalt von Senkgruben und frische Exkremente gründlich desinfizierte. Hoffmann (22) hält die Methode der Trinkwassersterilisation für die Truppen mittels Kupfersulfat für vielversprechend. Zu gärendem Harn setzte Kühl (23) Spuren von Kupfersulfat (0,125 Proz.) und beobachtete, daß die Keime dadurch zur Abtötung gelangten. Lösungen von 1,0:100000,0 töten nach Perkins (24) Angaben Algen voll-

kommen ab. Thomas, Stanley und Judson (27) gebrauchten das Kupfersulfat zur Desinfektion von Schwimmbädern. Wüthrich (25) empfiehlt das Kupfersulfat als wirksamstes Mittel, parasitäre Pilze der Kulturpflanzen zu beseitigen; er hatte eine Reihe von Metallsalzen daraufhin untersucht.

Auch für die Therapie versuchte man die bakterizide Wirkung des Kupfers auszunutzen. So behandelte Schlosberg (26) mit sehr gutem Erfolg Gonorrhöe mit *Cuprum citricum sol.* Wilcke (28) verabreichte Typhusbazillenträgern *Cuprum aceticum* in Pillenform und stellte eine Abtötung der Typhusbazillen innerhalb kurzer Zeit dadurch fest. Guéguen (29) behandelte eine durch einen *Bazillus* hervorgerufene Haarkrankheit mit einer schwachen Kupfersulfatlösung (0,5-proz.). Grysez (30) stellte auf Grund der Beobachtung, daß Kupferarbeiter höchst selten an Tuberkulose erkranken, Heilversuche an bei tuberkulösen Menschen mittels Inhalation von feinpulverisiertem Kupferazetat. Auch Gräfin v. Linden (31) und A. Strauß berichten von der bakteriziden Kraft des Kupfers; sie bauen auf diese Eigenschaft ihre Tuberkulose-therapie auf. De Witt, Lydia (31) und Sherman fanden, daß Tuberkelbazillen von einer 5-proz. Kupferchloridlösung innerhalb von 24 Std. abgetötet werden.

Wenn wir uns trotz aller dieser vielen Arbeiten dazu entschlossen, vorliegende Untersuchungen anzustellen, so geschah das, um exakte Werte über die bakteriziden Eigenschaften der verschiedenen Kupfersalze zu erhalten, außerdem, um festzustellen, ob bei der verhältnismäßig geringen Giftigkeit den Kupfersalzen nicht eine größere Aufgabe in der Desinfektion zugewiesen werden könnte.

Von den löslichen Kupfersalzen wurden in den Kreis der Untersuchung gezogen *Cuprum aluminatum*, *C. chloratum*, *C. formicicum*, *C. sulfuricum*, *C. nitricum*, *C. sulfo carbolicum*. Ihre Wirkung wurde nachgeprüft durch Repräsentanten von 5 verschiedenen Bakteriengruppen, die für die Pathologie in erster Linie in Betracht kommen, nämlich *Micrococcus pyogenes aureus*, *Bacterium coli*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae* und die vegetativen Zellen von Milzbrand.

Ehe ich zur Beschreibung der Versuchsanordnung übergehe, sei kurz das Verhalten der Kupfersalze in eiweißhaltigen Substanzen erwähnt. Aehnlich wie das Sublimat, bringen auch die Kupferlösungen das Eiweiß zur Fällung. Dies geschieht in ziemlich gleicher Stärke durch sämtliche 6 oben aufgezählten Kupfersalze. Wir mußten deshalb, um sichere Werte zu erhalten, diese unlöslichen Eiweißverbindungen ausschalten und die Versuche in möglichst eiweißfreien Medien anstellen; würden doch sonst einerseits die Kupfermengen, die zur Sättigung des Eiweißes nötig sind, gar nicht zur desinfizierenden Wirkung gelangt und andererseits der Nährboden nicht konstant der gleiche geblieben sein, d. h. sich je nach der verwendeten Stärke der Konzentration der Kupfersalze verändert haben.

Die Versuche wurden deshalb folgendermaßen angestellt: Von 24 Std. alten Kulturen — bei Milzbrand nur von 8—10-stünd. Kulturen — wurde in physiol. Kochsalzlösung eine Aufschwemmung hergestellt, die der Konzentration einer mäßig getrübbten Bouillonkultur entsprach. Von dieser Aufschwemmung wurde jedesmal 0,1 ccm in die Röhren mit den verschiedenen Konzentrationen der Kupfersalzlösungen, die mit destilliertem Wasser hergestellt, sterilisiert und zu je 5,0 ccm Volumen abgefüllt waren, hinzugefügt. Nach gutem Durchschütteln kamen sie in den Brutschrank zu 37° C. Nach bestimmten, aus den Tabellen ersichtlichen Zeitintervallen wurde mittels steriler Pipette aus den verschiedenen — gleichfalls aus den Tabellen ersichtlichen — Konzentrationen minimale Mengen in sterile Bouillonröhren gebracht. Selbstverständlich wurde für jede Konzentration und jedes Zeitintervall eine frische sterile Pipette genommen. Die beschickten Bouillonröhren

kamen dann sogleich in den Brutschrank. Um möglichst wenig von der Kupferlösung, dem Desinfiziens, in den Nährboden, d. h. in die Bouillonröhrchen, zu bringen, kamen ausschließlich Kapillarpipetten zur Verwendung. Bei den konzentrierteren Lösungen, wie 1,0:10,0 und 1,0:100,0 wurde außerdem die genannte Gefahr dadurch vermieden, daß 2 Bouillonröhrchen gebraucht wurden, d. h. ich verfuhr so, daß ich von den zu untersuchenden Kupferlösungen erst ein Bouillonröhrchen beimpfte und aus diesem nach gutem Durchschütteln das eigentliche Bouillongläschen beimpfte. Nach 24 Std. wurden die Resultate von den Bouillonröhrchen mit Leichtigkeit abgelesen. Denn das Klarbleiben der Bouillon bedeutete Abtötung der Keime in dem dazu gehörigen Kupferröhrchen, das Getrübtsein Wachstum der Keime, bzw. Nichtabtötung der Keime.

I. *Micrococcus pyogenes aureus.*

Abgetötet durch	Cupr. alum.	Cupr. chlor.	Cupr. form.	Cupr. nitr.	Cupr. sulf.	Cupr. sulfocarb.
	in Zeit von					
Lösungen:						
1:10 ¹⁾	3 Std.	10 Min.	30 Min.	10 Min.	30 Min.	30 Min.
1:100	3 "	10 "	30 "	45 "	30 "	2 Std.
1:1000	3 "	2 Std.	2 Std.	1 Std.	2 Std.	4 "
1:10 000	5 "	3 "	3 "	3 "	4 "	5 "
1:100 000	8 "	4 "	5 "	5 "	7 "	9 "
1:1 000 000	9 "	4 "	6 "	5 "	8 "	10 "

II. *Bacterium coli.*

Abgetötet durch:	Cupr. alum.	Cupr. chlor.	Cupr. form.	Cupr. nitr.	Cupr. sulf.	Cupr. sulfocarb.
	in Zeit von					
Lösungen:						
1:10 ¹⁾	45 Min.	10 Min.	45 Min.	30 Min.	45 Min.	10 Min.
1:100	2 Std.	30 "	1 Std.	45 "	45 "	1 Std.
1:1000	3 "	2 Std.	1 "	2 Std.	2 Std.	1 "
1:10 000	6 "	3 "	2 "	3 "	3 "	4 "
1:100 000	10 "	4 "	4 "	9 "	5 "	7 "
1:1 000 000	11 ²⁾ "	6 "	5 "	10 "	8 "	9 "

III. *Bacillus anthracis.*

Abgetötet durch:	Cupr. alum.	Cupr. chlor.	Cupr. form.	Cupr. nitric.	Cupr. sulf.	Cupr. sulfocarb.
	in Zeit von					
Lösungen:						
1:10 ¹⁾	—	—	—	30 Min.	10 Min.	10 Min.
1:100	45 Min.	—	10 Min.	1 Std.	45 "	2 Std.
1:1000	2 Std.	30 Min.	45 "	3 "	3 Std.	3 "
1:10 000	5 "	2 Std.	2 Std.	5 "	7 "	7 "
1:100 000	11 ²⁾ "	4 "	6 "	6 "	8 "	9 "
1:1 000 000	11 ²⁾ "	8 "	7 "	7 "	10 "	10 "

IV. *Vibrio cholerae.*

Abgetötet durch:	Cupr. alum.	Cupr. chlor.	Cupr. form.	Cupr. nitric.	Cupr. sulf.	Cupr. sulfocarb.
	in Zeit von					
Lösungen:						
1:10 ¹⁾	10 Min.	—	—	—	—	—
1:100	10 "	—	—	—	—	—
1:1000	10 "	—	—	—	—	—
1:10 000	45 "	—	—	—	1 Std.	1 Std.
1:100 000	3 Std.	1 Std.	4 Std.	45 Min.	4 "	4 "
1:1 000 000	4 "	2 "	5 "	2 Std.	5 "	5 "

1) Bei Cupr. alum. 1:17.

2) Bis nach 20 Tagen geprüft.

V. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> .						
Abgetötet durch:	Cupr. alum.	Cupr. chlor.	Cupr. form.	Cupr. nitric.	Cupr. sulf.	Cupr. sulfocarb.
Lösungen:	in Zeit von					
1:10 ¹⁾	1 Std.	—	—	—	10 Min.	—
1:100	4 "	—	—	—	10 "	30 Min.
1:1000	5 "	—	30 Min.	10 Min.	30 "	45 "
1:10 000	6 "	30 Min.	45 "	30 "	45 "	1 Std.
1:100 000	7 "	45 "	1 Std.	1 Std.	1 Std.	3 "
1:1 000 000	7 "	1 Std.	1 "	1 "	2 "	4 "

Wie wir aus den Tabellen entnehmen können, besitzen die Kupfersalze tatsächlich eine erhebliche bakterienschädigende, d. h. desinfizierende Wirkung.

Eigentümlich ist, daß die verschiedenen Bakterienarten sich nicht alle in der gleichen Weise denselben Salzen gegenüber verhalten. Am resistantesten zeigen sich die vegetativen Zellen des Milzbrand, ihnen folgt das *Bacterium coli*, *Micrococcus pyogenes aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* und vor allem *Vibrio cholerae* erwiesen sich am wenigsten widerstandsfähig.

Von den Kupfersalzen selbst lieferte die beste Desinfektionskraft das *C. chloratum*, dann folgt, der Wirksamkeit nach aufgezählt, das *C. formicum* und *C. nitricum*, die fast einander gleichwertig sind, dann das *C. sulfuricum*, *C. sulfo-carbolicum* und das *C. aluminatum*. Das in praxi gebräuchlichste Kupfersalz, das Kupfersulfat, steht also erst an 4. Stelle in seiner Wirksamkeit, wird vom *C. chloratum* weit übertroffen!

Als erklärende Ursache der verschiedengradigen Wirksamkeit der einzelnen Kupfersalze kommt einzig und allein ihr Gehalt an Kupfer in Betracht. Es enthält nämlich das

<i>C. chloratum</i>	in 100 Teilen = 37,13 Teile Kupfer
<i>C. formicum</i>	" 100 " = 27,95 " "
<i>C. nitricum</i>	" 100 " = 26,80 " "
<i>C. sulfuricum</i>	" 100 " = 25,36 " "
<i>C. sulfo-carbolicum</i>	enthält als Doppelsalz natürlich wenig Cu.
<i>C. aluminatum</i>	in 100 Teilen = 8,26 Teile Kupfer.

Auf diese Weise zusammengestellt, erhalten wir die gleiche Reihenfolge, die sich für die Größe ihrer Wirksamkeit als Desinfiziens ergibt.

Zusammenfassung.

1) Die löslichen Kupfersalze besitzen eine erhebliche desinfizierende Eigenschaft. 2) Nicht alle Bakterien verhalten sich ein und demselben Kupfersalz gegenüber gleich. 3) Die Wirksamkeit des Kupfersalzes richtet sich nach seinem Gehalt an metallischem Kupfer. 4) In der Praxis sollte man das *C. chloratum* dem bisher gebräuchlichsten Kupfersalz, dem Kupfersulfat, vorziehen. 5) In eiweißfreien Medien sind die Kupfersalze bei weitem wirksamer als in eiweißhaltigen:

Literatur.

1) Miller, Deutsch. Odontol. Gesellsch. 18. Dez. 1889. — 2) Poetschke, Keimtötende Wirkung von Zahnzementen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 64. 1916.

- 1) Bei Cupr. alum 1:17.
- 2) Bis nach 20 Tagen geprüft.

S. 480.) — 3) Behring, Ueber Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. (Zeitschrift f. Hyg. Bd. 9. 1890.) — 4) Thiele u. Wolf, Ueber bakterienschädigende Einwirkungen der Metalle. (Arch. f. Hyg. Bd. 34. 1889.) — 5) Natonek, Disider, Reitmann, Beobachtungen über die antibakterielle Wirkung von Münzen auf Nährböden. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 97. 1915. S. 345.) — 6) Messerschmidt, Das Desinfektionsvermögen der Metalle und seine Ursachen, mit besonderer Berücksichtigung der Wirkung des Kupfers. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 82. 1916. H. 2.) — 7) Credé u. Beyer, Silber und Silbersalze als Antiseptika. 1896. — 8) Bohtz, Untersuchungen über die Einwirkungen von Metallpulvern auf Bakterien. [Inaug.-Diss.] Giessen 1904. — 9) Saxl, Ueber die keimtötende Fernwirkung von Metallen. (Wien. klin. Wochenschrift. 1917. S. 714.) — 10) Iwanoff, Ueber die Wirkung der Metallsalze auf die Entwicklung von Schimmelpilzen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904.) — 11) Bolton, The effects of various metals on the growth of certain bacteria. (Trans. Americ. Assoc. of Physic. Vol. 9. 1894.) — 12) Christian, Die Bedeutung der Metalle als Desinfektionsmittel. (Desinfekt. 1911. S. 217.) — 13) Clark a. Gage, On the bactericidal action of the copper. (Journ. inf. Dis. Suppl. No. 2. p. 175.) — 14) Frégonneau, Weisen die in verschiedenen Substraten gefundenen Proteus-Bakterien biologische Unterschiede auf und welche? [Inaug.-Diss.] Bern 1908. — 15) Springer a. Springer jun., Antiseptic action of copper. (Journ. of ind. a. engin. Chem. 1909. p. 676.) — 16) Millaret et Gayon, Recherches nouvelles sur l'action des composés cuivreux sur le développement du Peronospora de la vigne. (Compt. rend. Ac. de Paris. 1887, 1885.) — 17) Hesse, Jahresber. d. Ges. f. Natur- u. Heilk. Dresden. 1892. S. 61.) — 18) Charrin et Netter, Les mesures prises contre la choléra. (Ann. d'Hyg. et de méd. lég. 1890.) — Arnould, La désinfection des selles. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 61. 1914.) — 20) Green, Ueber den Wert der Kupfersalze als Desinfektionsmittel. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 13. 1893.) — 21) v. Gerlocy, Versuche über die prakt. Desinfektion von Abfallstoffen. (Dtsch. Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspf. Bd. 21. 1889.) — 22) Hoffmann, Rückblick und Ausblick auf dem Gebiete der prakt. Desinfektion. (Dtsch. militärärztl. Zeitschr. 1913.) — 23) Kühl, Beiträge zur Kenntnis der chem. Desinfektionsmittel. (Apothekerztg. Bd. 24. 1909.) — 24) Perkins, The desinfection of water. (Sanit. Rec. Vol. 27. 1911.) — 25) Wüthrich, Ueber die Einwirkung von Metallsalzen und Säuren auf die Keimfähigkeit der Sporen einiger der verbreitetsten parasit. Pilze unserer Kulturpflanzen. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 13. 1893.) — 26) Schosberg, Zur Frage von der Heilbarkeit der Gonorrhöe bei Prostituierten. (Derm. Zeitschr. Bd. 20. 1913. S. 593.) — 27) Thomas, Stanley, Judson, The practical use of coppersulphat in swimming pools. (Journ. of the Amer. med. Ass. Vol. 66. 1915.) — 28) Wilcke, Versuch einen Typhusbazillenträger frei von Typhusbazillen zu machen. (Zeitschr. f. Med.-Beamte. 1913. S. 713.) — 29) Guéguen, Sur une alopecie en aieres prurigineuses à bacilles intrapilaires. (Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 59. 1911.) — 30) Grysez, Sur le traitement de la tuberculose pulmonaire par les inhalations de verdet. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 52. 1912.) — 31) De Witt, Lydia, a. Sherman, Tuberc. actions of certain chemical desinfections. Stud. of the biochemistry and chemotherapy of tubere. IX. (Journ. infect. Dis. Vol. 15. 1914. p. 245.) — 32) v. Linden, Gräfin, Ueber die bisherigen Tatsachen und die therapeutischen Aussichten der Kupfertherapie. (Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. Bd. 17. 1919.) [Zahlreiche Literaturangaben!]

Nachdruck verboten.

Ueber die Entkeimung der Kälberlymphe mit Trypaflavin.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Instituts der Universität Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. M. Neisser).]

Von Dr. Ernst Illert, Assistent am Institut.

Die Einführung des Glyzerins als Verdünnungs- und Konservierungsmittel für animale Vakzine durch E. Müller (1866) bedeutete einen wesentlichen Fortschritt in der Praxis der Impfstoffbereitung. Die Eigenschaften dieses Zusatzes, die Virulenz des Impfstoffes mehrere Monate hindurch nicht wesentlich zu beeinträchtigen, dabei gleichzeitig

die zahlreichen Keime des Rohstoffes größtenteils abzutöten, unter günstigsten Bedingungen sogar völlige Keimfreiheit der Lymphe nach einigen Wochen zu erzielen, verschafften dem Glycerin bis zum heutigen Tage die erste Stelle in der Reihe ähnlich wirkender Mittel.

Wenn es trotzdem nicht an Versuchen gefehlt hat, einen keimfreien und wirksamen Impfstoff durch chemische und physikalische Behandlungsmethoden zu erzielen, so sind solche Bestrebungen aus Erwägung der Vorzüge begreiflich, die keimfreie Lymphe für die Schutzimpfung hätte. Die Vorteile einer zuverlässigen Vermeidung von Staphylo- und Streptokokkeninfektionen der Impfwunden, also vor allem des Erysipels, des Vakzinegeschwürs und fortgeleiteter eiteriger Prozesse, wie der gelegentlich beobachteten Lymphangitis und Lymphadenitis purulenta, sowie von Phlegmonen, lassen die Versuche gerechtfertigt erscheinen, die der Gewinnung bakteriell steriler Lymphe dienen. Die mögliche Abschwächung des Vakzinevirus durch Stoffwechselprodukte der Lymphebakterien wäre gleichzeitig ausgeschaltet und die Immunisierung der Impflinge durch subkutane Injektion des Impfstoffes (Knöpfelmacher) gefahrlos auszuführen. Wurden auch die von Leoni und Landmann gegen die Lymphebakterien erhobenen Anschuldigungen, daß sie die starken entzündlichen Reaktionen verursachten, als zu weitgehend zurückgewiesen, so beweisen solche Beschuldigungen im Zusammenhang mit dem Bestreben, günstigere Ersatzmittel für das Glycerin zu finden, doch so viel, daß wir das Ziel, einen allen Anforderungen genügenden Impfstoff herzustellen, noch nicht erreicht haben.

Ueberblicken wir kurz die an Stelle des Glycerins empfohlenen Ersatzmittel und die Methoden der Sterilisierung von Kälberlymphe auf mechanischem Wege. Die Kerzenfiltration des verriebenen Hautmaterials lieferte ein zu wenig ergiebiges Filtrat. Die Ozonisierung tierischer Lymphe führte zwar zur Keimfreiheit, gleichzeitig aber auch zur Aufhebung der vakzinalen Virulenz. Die Greensche Chloroformmethode, Sterilisierung des Rohstoffes durch mehrstündige Einwirkung eines Chloroformluftstromes erzielte rasch Bakterienfreiheit; dennoch machte sich bei längerer Lagerung solcher Lymphe eine deutliche Abnahme der Virulenz gegenüber Glycerinlymphe bemerkbar. Carini benutzte zum gleichen Zweck das Toluol. Neuere Versuche in dieser Richtung waren unter anderen die Aetherbehandlung des Rohstoffes von Fernet und die von Friedberger und Mironescu angegebene Bestrahlung der Lymphe mit ultraviolettem Licht. Beide Autoren erzielten bakterielle Sterilisierung. Wie aber die Nachprüfungen von Gins und Lentz bei der Aetherbehandlung ergaben, tritt eine wesentliche Schädigung des Vakzinevirus ein. Seifert und Hüne glaubten, durch Chinisolzusatz das gewünschte Ziel zu erreichen. Ein Chinisolgehalt von 3 Promille sollte in 4–5 Tagen völlige Keimfreiheit erzielen und trotzdem eine ausreichende vakzinale Virulenz noch nach 74 Tagen nachweisbar sein. Von den neuesten Versuchen zur Keimfreimachung der Lymphe seien noch die Untersuchungen von Kirstein mit den Morgenrothschen Chininderivaten angeführt, unter denen er besonders das Eukupinotoxin in einer Konzentration 1:5000 als Zusatz zur Glycerinlymphe geeignet fand. Die Keimabnahme der Lymphe sollte hierdurch wesentlich rascher erfolgen als durch Glycerin allein. Wenn es auch durch die eben angeführten Methoden gelang, keimfreie Lymphe zu erzielen, so haftete den meisten von diesen Verfahren der Nachteil an, daß die vakzinale Virulenz des Impfstoffes zu sehr geschädigt wurde und die erhaltene Lymphe für die Schutzimpfung nicht brauchbar war. Ueber Kirsteins Methode läßt sich bei Fehlen ausgedehnter Nachprüfungen ein abschließendes Urteil noch nicht fällen.

Unter den neueren chemischen Antiseptieis spielt neben den Chininderivaten das Trypaflavin (Ehrlich-Benda) eine bedeutende Rolle. Dieser Farbstoff ist bis jetzt noch nicht zur Sterilisierung von Kälberlymphe benutzt worden. Die abtötende Kraft des Trypaflavins gegenüber Staphylokokken und Streptokokken, vor allem aber seine starken entwicklungshemmenden Eigenschaften, die sich bei vielen pathogenen Bakterien in vitro feststellen ließen, sind unter anderen durch die Arbeiten von Browning, Keysser, Braun, Burkard und Dorn, Neufeld und Schiemann nachgewiesen worden. Nach den Untersuchungen, die Burkard im hiesigen Laboratorium ausführte, tötet das Trypaflavin, in Kochsalz gelöst, in der Konzentration 1:100 Sta-

phylkokken spätestens in 24 Std. ab, Streptokokken wurden wesentlich rascher vernichtet. Hier genügt die $\frac{1}{2}$ -stünd. Einwirkung einer 1-prom. Lösung. In derselben Konzentration und nach gleich langer Einwirkungszeit tötet der Farbstoff Diphtheriebazillen, Schweinerotlauf- und Coli-Bazillen ab. Sehr viel widerstandsfähiger erwiesen sich die sporentragenden Stäbchen, z. B. Milzbrandbazillen. Antiseptisch wirksame Verdünnungen des Trypaflavins fand Burkard gegenüber Staphylokokken in einer Konzentration von 1:50 000—1:100 000, gegenüber Streptokokken in der Verdünnung 1:500 000—2 000 000. Diphtheriebazillen wurden noch bei der Konzentration von 1:1 000 000, Coli bei 1:5000, Milzbrand- und Schweinerotlaufbazillen bei 1:500 000 im Wachstum gehemmt. Aus diesen Zahlen geht die starke entwicklungshemmende Kraft des Trypaflavins gegenüber diesen pathogenen Bakterien hervor. Ein wesentlicher Vorteil des Farbstoffes im Vergleich mit anderen Antiseptics ist die von Browning bereits gefundene Tatsache, die durch die Arbeiten von Braun, Burkard und Dorn, Neufeld und Schiemann bestätigt wurde, daß seine antiseptische und desinfektorische Wirkung in eiweißhaltigen Körperflüssigkeiten und Geweben nicht aufgehoben wird. Diese beiden Eigenschaften, antiseptische Wirkung gegenüber den meisten pathogenen Bakterien und Wirksamkeit im Serum, ließen vermuten, daß es ein gutes Wunddesinfektionsmittel sein würde. Abgesehen von den klinischen Erfahrungen, die diese Vermutung bestätigen (Burkard und Dorn), brachten im hiesigen Laboratorium von Feiler ausgeführte Versuche bei der experimentellen Wundinfektion des Meerschweinchens mit Diphtheriebazillen den Nachweis, daß die tödliche Wundinfektion durch Uebergießen der schwer infizierten Wunde 30—60 Min. nach der Infektion mit 1-proz. Trypaflavin in allen Fällen verhindert wurde, während sämtliche Kontrolltiere starben.

Die eben geschilderten bakterienfeindlichen Wirkungen des Trypaflavins legten den Gedanken nahe, diesen Farbstoff auch zur bakteriellen Sterilisierung von Kälberrohstoff zu verwenden. Da sich das Pockenvirus durch erhebliche Resistenz gegenüber den verschiedenen Desinfizientien auszeichnet — 1-prom. Sublimat tötet in Vakzinekrusten in 24 Std. den Erreger nicht vollkommen ab — haben wir auf Anregung von Herrn Dr. L. Benda, dem Darsteller des Trypaflavins, Versuche darüber angestellt, ob sich der Farbstoff zur Keimfreimachung von Kälberrohstoff eignet, ohne die Vakzinevirulenz zu schädigen.

Zur Beantwortung dieser Fragen prüften wir zunächst die abtötende Wirkung des Trypaflavins gegenüber den Bakterien des Kälberrohstoffes. Durch das bereitwillige Entgegenkommen der Herren Prof. Dr. Paschen und Dr. H. A. Gins war es uns möglich, sowohl frischen, nur 3 bis 4 Tage alten Rohstoff, als auch ältere Proben zu verarbeiten. Die älteste Rohstoffprobe (aus der Berliner Impfanstalt) war 2 Jahre alt und hatte diese Zeit ohne Glycerinzusatz in der Kältemaschine eingefroren gelagert. Die Keimzahlen der zu Versuchen ausgewählten 9 Rohstoffproben waren immer sehr groß; sie schwankten zwischen 100 Millionen und 4400 Millionen Keimen in 1 g Rohmasse. Die bakteriologische Untersuchung ergab in allen Fällen das Vorkommen von *Staphylococcus aureus*. Von Keimen, die zur Klasse der pathogenen Bakterien gehören, konnten wir außer gelben Eiterkokken einmal *Streptococcus longus* nachweisen. Außerdem in 4 Proben *Bact. coli*, schließlich in einer Probe *Paracoli*. Von saprophytischen Keimen fanden sich am konstantesten winzig kleine, kokkenförmige Stäbchen, oft in ähnlicher Lagerung wie Streptokokken, außerdem Saprophyten (Kokken und Stäbchen).

Die Trypaflavinkonzentration, welche am schnellsten zur bakteriellen Sterilisierung des Rohstoffes führte und sich dem 80-proz. Glycerinwasser überlegen zeigte, war die 1-proz. Lösung des Farbstoffes. Folgende Versuche sollen im einzelnen zeigen, wie sich die 1-proz. Trypaflavinlösung hinsichtlich ihrer keimtötenden Wirkung zu 80-proz. Glycerinwasser verhält:

Versuch 1: 1,5 g Rohstoff (Kalb 69, 1919) werden im Mörser mit 7 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung zu einer feinen Emulsion verrieben und davon folgende Verdünnungen hergestellt:

1 ccm der Emulsion wird mit 1 ccm 2-proz. Trypaflavins und nach 24-stünd. Aufbewahrung im Eisschrank mit 18 ccm physiol. Kochsalzlösung verdünnt = Probe Ia (siehe Tab. I).

1 ccm Emulsion wird mit 9 ccm 1-prom. Trypaflavinlösung verdünnt, nach 24 Std. Zusatz von 10 ccm 1-prom. Trypaflavinlösung = Probe Ib (Aufbewahrung aller Proben stets im Eisschrank). 1 ccm Emulsion mit 9 ccm 80-proz. Glycerin; nach 24 Std. nochmaliger Zusatz von 10 ccm 80-proz. Glycerin ergibt Probe II a. In 1 ccm der mit physiol. Kochsalzlösung verriebenen Rohstoffemulsion werden 103 Millionen Keime gezählt.

Tabelle I (Protokoll Vers. I).
Versuch angesetzt 16. Dez. 1919, Rohstoff K. 69 (1919).

Datum	Ia = 1 ccm A ¹⁾ + 1 ccm 2-proz. Trypaflavins. Nach 24 Std. mit 18 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt	Ib = 1 ccm A + 9 ccm 1-prom. Trypaflavin. Nach 24 Std. mit 10 ccm 1-prom. Trypaflavin verdünnt	II = 1 ccm A + 9 ccm 80-proz. Glycerinkochsalzlösung. Nach 24 Std. mit 10 ccm 80-proz. Glycerinkochsalzlösung verdünnt
Keimzahl in 1 ccm:			
	Ia	Ib	II
17. Dez.	0	257 600	101 200
26. „	0	42 000	200
5. Jan.	0	86 000	0
1. Febr.	0	140 000	0
20. „	0	24 000	0

1) A = Aufschwemmung, gewonnen durch Verreiben von 1,5 g Rohstoff mit 7 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung. 1 ccm enthält 103,8 Millionen Keime.

Wie Tab. I zeigt, ist die mit 1-proz. Trypaflavinlösung behandelte Rohstoffaufschwemmung nach 24-stünd. Aufbewahrung und nachfolgender Verdünnung auf 1 Prom. (auf die Farbstoffkonzentration bezogen) steril, bei der unter gleichen Bedingungen mit 80-proz. Glycerin behandelten Probe sind noch über 100 000 Keime nach 24 Std. nachzuweisen und erst bei der Untersuchung 20 Tage nach Versuchsbeginn ist die Glycerinprobe steril.

Um nachträgliche Verunreinigungen des Impfstoffes zu verhindern, behielten wir in den späteren Versuchen die 1-proz. Trypaflavinkonzentration der Lymphe dauernd bei und unterließen die Verdünnung auf 1 Prom. nach 24 Std., weil sich Rohstoffmengen, die nur mit 1-prom. Trypaflavinlösung behandelt werden (siehe Tab. I, Ib), keimreicher erwiesen als entsprechende Glycerinrohstoffmischungen. Wir unterließen auch die Verdünnung der Rohmasse mit physiolog. Kochsalzlösung wie bei Versuch I und verrieben den Rohstoff unmittelbar mit der 1-proz. Trypaflavinlösung bzw. dem Glycerinwasser. Folgendes Versuchsprotokoll (4) soll als Beleg für die Art der Verdünnung ausführlich wiedergegeben werden:

1,5 g der Rohmasse (K 16, 17, 1920) wird mit 4,5 ccm 1-proz. Trypaflavinlösung verrieben = Probe I.

0,8 g Rohstoff mit 2,4 ccm 80-proz. Glycerinwasser verrieben = Probe II. Nach 24-stünd. Aufbewahrung beider Proben werden 2,0 ccm der Probe I mit 8,0 ccm 1-proz. Trypaflavins verdünnt, so daß eine 20-fache mit 1-proz. Trypaflavin verdünnte Lymphe entsteht = Probe Ia. In Tab. II entspricht Probe Ib 2 ccm der Probe I, die nach 24 Std. mit 8 ccm physiol. Kochsalzlösung verdünnt wird (20-fach verdünnte 2-prom. Trypaflavinlymphe).

Die kulturelle Untersuchung der zu diesem Versuch verwendeten beiden Rohstoffproben (K 16, 17, 1920, Alter des Rohstoffes 6 Tage) ergab unter anderem sehr reich-

lich *Staphylococcus aureus*, spärlicher weiße Staphylokokken und *Bact. coli*. Streptokokken wurden nicht gefunden. Die Keimzahl betrug in 1 g 460 Millionen Keime.

Tabelle II (Protokoll Vers. 4).

Versuch angestellt 20. April. Rohstoff K 16 u. 17 vom 14. April 1920, eingetroffen 17. April 1920.

In 1 g Rohstoff waren 460 Millionen Keime.

	Ia = mit 1-proz. Trypaflavin 20-fach verdünnter Rohstoff	Ib = nach 24-stünd. Einwirkung von 1-proz. Trypaflavin auf 2 Prom. verdünnt	IIa = mit 80-proz. Glycerin 20-fach verdünnter Rohstoff
	Keimzahl in 1 ccm der Aufschwemmung:		
	Ia	Ib	IIa
22. April	0	0	910 000
3. Mai	0	400	27 000
12. „	0	8000	8 000
18. „	0	0 ¹⁾	3 000
2. Juni	0	0 ²⁾	3 000

Tab. II zeigt eindeutig die Ueberlegenheit des 1-proz. Trypaflavins über das Glycerinwasser. Probe Ia ist nach 48 Std. steril und bleibt während der ganzen Versuchsdauer keimfrei, die Glycerinlymphe enthält dagegen nach 48 Std. noch über 900 000 Keime, nach 6-wöchentlicher Lagerung noch 3000 Keime in 1 ccm. Ein ebenso günstiges Resultat wie in dem eben beschriebenen Versuch — Sterilisierung des Rohstoffes mit 1-proz. Trypaflavin in 48 Std. — konnten wir bei Wahl des gleichen Verdünnungsgrades wiederholt feststellen. Bei stärkeren Rohstoffkonzentrationen, z. B. nur 5—6-facher Verdünnung mit 1-proz. Trypaflavinlösung, wurde das erstrebte Ziel der bakteriellen Sterilisierung ebenfalls erreicht, wenn auch nicht so schnell wie bei dem oben gewählten Verdünnungsgrad. Aber auch hier war die desinfizierende Wirkung der 1-proz. Trypaflavinlösung stärker als die abtötende Kraft des 80-proz. Glycerinwassers. Als Beispiel diene noch folgender Versuch (Protokoll Vers. 5):

0,5 g Rohstoff (K 18, 1920) werden mit 2,5 ccm 1-proz. Trypaflavins verrieben und aufbewahrt, ebenso 0,5 g Rohmasse mit 2,5 ccm 80-proz. Glycerinwassers verarbeitet. In 1 g Rohstoff finden sich 100 Millionen Keime. Kulturell ist von Bakterien aus der Klasse der pathogenen Keime nur *Staphylococcus aureus* nachweisbar. Bei der 6-fach verdünnten Trypaflavinlymphe war der Impfstoff nach 4 Wochen steril, die Glycerinlymphe enthielt nach 7 1/2 Wochen noch über 10 000 Keime in 1 ccm.

Aus den hier angeführten Versuchen geht die Ueberlegenheit der desinfizierenden Wirkung von 1-proz. Trypaflavin über das 80-proz. Glycerinwasser deutlich hervor. Die Entkeimung der Rohmasse gelingt rascher mit Hilfe des Farbstoffes als mit Glycerin.

Wesentlich günstiger wäre die Wirkung des Trypaflavins auf die Rohstoffkeime zu beurteilen, wenn sich nachweisen ließe, daß beim Ausbleiben der Sterilität von Trypaflavinlymphe innerhalb kurzer Zeit, die nicht abgetöteten Keime Saprophyten sind, daß mit anderen Worten der Farbstoff pathogene Keime im Rohstoff in wenigen Tagen elektiv vernichtet. Bei der keimreichsten unserer Rohstoffproben (K 9, 1920), der in 1 g über 4000 Millionen Keime enthielt, soll die Beantwortung dieser Fragestellung mitgeteilt werden.

1) 2 Oberflächenkolonien auf einer Zählplatte. Da es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung handelte, ist das Material als steril anzusehen.

2) Auf einer Platte eine Oberflächenkolonie.

Die bakteriologische Untersuchung dieses Rohstoffes ergab sehr reichlich *Staphylococcus aureus*, *Bact. coli*, vereinzelt *Paracoli*, farbstoffbildende Kokken und kokkenförmige Stäbchen. Bei gleicher Versuchsanordnung wie bei Versuch der Tab. II waren bei der Trypaflavinlymphe auf den Zählplatten (0,1 ccm der Verdünnung 1:100 wurde verarbeitet) noch 14 Kolonien gewachsen; es entspricht dies einer Keimzahl von 7000 Keimen in 1 ccm der Lymph. Die bakteriologische Identifizierung dieser 14 Kolonien ergab für alle das gleiche Resultat. Es handelte sich um sehr kurze kokkenförmige Stäbchen, die wir in jedem Rohstoff fanden und deren große Widerstandsfähigkeit wir wiederholt feststellten. Dagegen waren *Staphylokokken* und *Coli* nach 24 Std. abgetötet. Im Gegensatz dazu erwies sich nach gleicher Zeit die Glycerinlymphe noch sehr keimreich, in 1 ccm waren noch 8 000 000 Keime nachweisbar. Hier ergab die kulturelle Untersuchung von 20 beliebig aus den Zählplatten abgestochenen Kolonien 7mal *Staphylococcus aureus*, 4mal *Bact. coli*, 9mal saprophytische, kokkenförmige Stäbchen.

In diesem Versuch erwies sich die 1-proz. Trypaflavinlymphe bereits nach 72 Std. steril, die Glycerinlymphe enthielt nach 3-wöchentlicher Lagerung noch über 200 000 Keime in 1 ccm. Dieser Versuch zeigt, daß die 1-proz. Trypaflavinlösung auch infolge ihrer vorwiegenden Abtötung der Rohstoffkeime aus der Klasse der pathogenen Bakterien dem 80-proz. Glycerin überlegen ist.

Um schließlich unter ungünstigen Bedingungen die keimtötende Kraft von Trypaflavin und Glycerin vergleichen zu können, infizierten wir künstlich Rohstoffproben mit pathogenen Keimen und wählten dabei folgende Versuchsanordnung:

0,9 g Rohstoff werden mit je 4 Tropfen einer mit 1 ccm physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmten Loeffler-Serum- bzw. Schrägagarkultur von *Streptococcus longus* (aus Mastoiditiseiter), *Staphylococcus pyogenes aureus* (aus Furunkel-eiter) und *Bact. coli* (aus Harn) versetzt, die ganze Masse im Mörser verrieben und folgende Verdünnungen hergestellt: I. 0,3 g künstlich infizierte Rohmasse werden mit 5,7 ccm 1-proz. Trypaflavins verrieben. II. Ebenso wird die gleiche Rohstoffmenge mit 80-proz. Glycerinwasser verarbeitet und im Eisschrank aufbewahrt. Die Keimzahl der Rohmasse vor der künstlichen Infektion betrug in 1 g 354 Millionen Keime (kulturell reichlich *Staphylococcus aureus*), nach dem Keimzusatz 1400 Millionen Keime. Die Keimzählung der Trypaflavinlymphe (I) und der entsprechenden Glycerinlymphe mit ihren Resultaten veranschaulicht Tab. III (Protokoll, Vers. 8).

Tabelle III (Vers. 8).

Künstlich infizierter Rohstoff K 7. Versuch angesetzt am 3. Juni 1920.

	I = 1-proz. Trypaflavin- lymphe	II = Glycerin- lymphe
	Keimzahl in 1 ccm der Aufschwemmung:	
	I.	II.
4. Juni	60 000	81 100 000
6. „	37 000	10 200 000
15. „	0	432 000
17. „	0	22 000
25. „	0	3 500

Wie in den vorhergehenden Versuchen tötet das 1-proz. Trypaflavin trotz der starken Infektion des Rohstoffes mit pathogenen Keimen die Bakterien in der Rohmasse wesentlich schneller ab als das Glycerin. Schon nach 11 Tagen ist die Trypaflavinlymphe steril, während die Glycerinlymphe nach dieser Zeit noch 432 000 Keime in 1 ccm enthält. Nach 3 Wochen ließen sich in letzterer noch 3500 Keime in 1 ccm nachweisen.

Von Interesse war auch bei diesem Versuch die Feststellung von Art und Menge der nicht abgetöteten Keime bei Glycerin- und Trypaflavinlymphe.

Bei der Trypaflavinlymphe ließen sich nach 24 Std. noch gelbe und weiße Staphylokokken sowie saprophytische, kokkenförmige Stäbchen nachweisen. Streptokokken und *Bact. coli* wurden nicht mehr nachgewiesen. Nach 72 Std. finden sich aber bei der Identifizierung von 20 beliebig von den Zählplatten abgestochenen Kolonien nur je 1 gelber und 1 weißer Staphylococcus; alle anderen Kolonien entsprechen saprophytischen, kokkenförmigen Stäbchen. Im Gegensatz dazu lassen sich bei der Glycerinlymphe dieses Versuches nach 24 Std. neben Saprophyten noch *Staphylococcus pyogenes aureus* und *Bact. coli* feststellen; nach 72 Std. entsprechen 20 beliebig abgestochenen Kolonien 8 *Bact. coli*, 3 gelben Eiterkokken, die übrigen saprophytischen Keimen. Dieser Versuch zeigt also wieder die bei der Entkeimung des natürlichen Rohstoffes beobachtete Tatsache, daß das Trypaflavin, im Gegensatz zum Glycerin, die Bakterien aus der Klasse der pathogenen Keime bei der Abtötung bevorzugt. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die abtötende Kraft der 1-proz. Trypaflavinlösung auf die Bakterien des natürlichen und künstlich infizierten Rohstoffes eine größere ist, als die desinfizierende Wirkung 80-proz. Glycerinwassers.

Sporenbildende Bakterien waren in unseren Rohstoffen nicht vorhanden. Nach den Ergebnissen der Reagenzglasversuche (Burkard und Dorn) mit solchen ist zu erwarten, daß deren Abtötung auch im Rohstoff nicht gelingt. Die Anwendung des Trypaflavins würde deshalb die Rohstoffprüfung auf Tetanusbazillen nicht überflüssig machen.

Bei der starken keimtötenden und entwicklungshemmenden Kraft des Trypaflavins, die sich auch, wie wir eben gezeigt haben, bei den in Gewebsbestandteilen und Körperflüssigkeiten eingeschlossenen Bakterien der Rohmasse bewährte, war die Beantwortung der Frage von Wichtigkeit und für die praktische Verwendbarkeit des Verfahrens entscheidend, wie sich der Vakzineerreger unter dem Einfluß des Farbstoffes verhält, ob eine Schwächung oder Abtötung des Virus eintritt und nach wie langer Zeit, ob das Trypaflavin hinsichtlich seiner konservierenden Fähigkeit dem Pockenerreger gegenüber dem Glycerin unterlegen ist oder nicht? Zur vergleichenden Virulenzprüfung der Trypaflavin- und Glycerinlymphe konnten wir keine Versuche am Menschen ausführen, sondern wählten die Impfung der Kaninchenhornhaut.

Die Technik der Impfung gestalteten wir nach der von Paul für den Kornealversuch angegebenen Methode. Nach Kokainisierung der Hornhaut werden mit der Impf Lanzette gitterförmige Skarifikationen im Abstand von 1 mm angelegt, dann mehrere Tröpfchen der zu prüfenden Lymphe eingeträufelt. Der Lidschlag sorgt dabei für eine ausreichende und wiederholte Verteilung des Impfstoffes in die gesetzten Wunden. Je nach der Beschaffenheit der makroskopisch auftretenden Reaktion, der histologischen Veränderungen am Epithel und der Zahl der Guarnierischen Körperchen, lassen sich genügende Anhaltspunkte für den Virulenzgrad der Lymphe gewinnen. Wir töteten die Kaninchen meist 48 Std. nach Einbringung des Materials in das Hornhautepithel, in einzelnen Fällen wurden die Tiere erst nach 3 und 4 Tagen getötet. Vorteile für die Beurteilung des Virulenzgrades ergaben sich hieraus nicht. Unmittelbar nach dem Tode des Versuchstieres wurden die Bulbi enukleiert, in Sublimatalkohol fixiert, dann nach Notierung des makroskopischen Befundes in Paraffin eingebettet und im Schnitt untersucht. Zur Färbung der Einschlüsse und zum Studium der übrigen Zellveränderungen bedienten wir uns der von Unna angegebenen Hämalaun-Safraninfärbung, die Hammerschmidt für die Färbung der Guarnierischen Körperchen empfohlen hat. Bei fraglichen Zellgebilden im Hornhautepithel, die wir gelegentlich beobachteten,

benutzten wir außerdem noch die Eisenhämatoxylinmethode nach Heidenhain sowie Färbungen mit Eosin-Hämalaun und nachfolgender Tanninbeize.

Die Trypaflavin- und Glycerinlymphproben wurden stets zu gleicher Zeit auf ihre Virulenz untersucht und die gleiche Tropfenzahl der gut aufgeschüttelten Proben eingeträufelt.

Die Ergebnisse der Hornhautimpfungen seien bei zwei Versuchen ausführlich wiedergegeben, bei den übrigen Lymphproben im Zusammenhang angeführt.

Versuch 1 (Protokoll, Vers. 1, Keimzahlentab. I). Kornealinfektion mit 7 Wochen alter 1-proz. Trypaflavinlymphe und entsprechend verdünnter Glycerinlymphe. Bei Sublimatfixation der Bulbi (48 St. post infect.) zeigen sich auf der Trypaflavinkornea 7 umschriebene, prominente Epitheliosen, außerdem sieht man eine ringförmig angeordnete Epithelverdickung zwischen Hornhautmitte und Rand. Bei der Glycerinkornea finden sich 4 Epitheliosen, sonst überall gleichmäßige Trübung des Epithels. Entsprechend dem makroskopischen Befund finden sich bei der mikroskopischen Untersuchung sehr viel reichlicher Guarnierische Körperchen in der Trypaflavinhornhaut als in der Glycerinkornea. Mit dem gleichen Material stellten wir nach über 4 Monate langer Lagerung der Proben (132 Tage) einen erneuten Tierversuch an. Dabei ließen sich in der Trypaflavinkornea, wenn auch sehr spärlich, noch Einschlusskörper nachweisen, in der Glycerinkornea dagegen nicht mehr; das Trypaflavin zeigt also in diesem Versuch bezüglich seiner konservierenden Fähigkeit gegenüber dem Vakzinevirus eine gewisse Ueberlegenheit über das Glycerin.

Versuch 4 (Keimzahlen cf. Tab. II). Kornealinfektion mit 1-proz. Trypaflavinlymphe und entsprechender Glycerinlymphe nach 8-tägiger Lagerung der Proben. Bei Sublimatfixation der Bulbi bei beiden Tieren makroskopisch zahlreiche, prominente Epitheliosen sichtbar mit zahlreichen Guarnierischen Körperchen im Schnitt. Ein Unterschied in der Virulenz beider Lymphproben ist nach 8 Tagen nicht nachweisbar. Wiederholung des Kornealversuches nach 7 Wochen hatte folgendes Ergebnis:

Bei der Glycerinkornea sieht man bei Fixation des Bulbus im Zentrum der Hornhaut eine umschriebene, etwa stecknadelkopfgröße, wenig prominente Epithelverdickung (mikroskopisch enthielt sie ganz vereinzelt Einschlüsse), sonst nirgends spezifische Veränderungen. Im Gegensatz dazu ist bei der Trypaflavinkornea das Hornhautepithel zentral abgestoßen, so daß die Bindegewebslamellen frei liegen, in dem noch erhaltenen Randepithel sind zwar makroskopisch keine umschriebenen Epitheliosen sichtbar (ähnlich wie bei Hornhautimpfungen mit unverdünntem Rohstoff), mikroskopisch finden sich aber reichlich Einschlusskörper vornehmlich in den Epithelrändern, die den zentralen Hornhautdefekt begrenzen. Wir sehen also auch hier eine gewisse Ueberlegenheit des Trypaflavins über das Glycerin.

Fassen wir das Ergebnis dieser Kornealimpfungen und der übrigen nicht mitgeteilten Tierversuche zusammen, so konnten wir bei diesen zwar nicht immer erkennen, daß die konservierenden Fähigkeiten des Trypaflavins bezüglich des Vakzinevirus dem des Glycerins überlegen waren, doch konnten wir feststellen, daß die 1-proz. Trypaflavinlösung die Virulenz der Lymphe nicht stärker beeinträchtigt als 80-proz. Glycerinwasser. Eine allmähliche Herabsetzung der vakzinalen Virulenz tritt bei Trypaflavin- wie bei der Glycerinkonservierung hervor.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der Schnitte von Trypaflavinhornhäuten zeigten sich an den Guarnierischen Körperchen keinerlei Veränderungen in bezug auf die morphologische Beschaffenheit der Einschlüsse, wie wir sie als Folge der Farbstoffeinwirkung für möglich erachtet hatten.

Wir beobachteten dagegen im Kornealepithel Gebilde, die wir in mit Glycerinlymphe geimpften Hornhäuten niemals sahen. In Schnitten solcher Hornhäute, die mit Trypaflavinlymphe geimpft waren, sahen wir neben den Epithelzellen, die bei Hämalaun-Safraninfärbung Kerne mit lockerer Struktur des Kernchromatins von violett beziehungsweise violettroter Farbe enthielten, zahlreiche, gleichmäßig in den obersten Epi-

thelschichten verteilte Zellen mit dickbalkiger Kernstruktur und grobem, verklumptem Chromatin von intensiv dunkelrotvioletter Farbe. Ob es sich hier um intravitale Färbung von Epithelzellen mit Trypaflavin handelt und die Addition der angewandten Farben die besondere Kernfärbung dieser Zellen hervorruft, sei dahingestellt. Um die Frage zu beantworten, ob diese Gebilde mit der Trypaflavinimpfung in Beziehung stehen, wurden skarifizierte Hornhäute nur mit 1-proz. Trypaflavinlösung ohne Vakzinevirus behandelt. Auch solche Corneae wiesen die gleichen Zellen auf. Es handelt sich also um einen Befund, der durch den Farbstoff, nicht das Vakzinevirus ausgelöst wird.

Schließlich suchten wir noch an der Kaninchenhornhaut festzustellen, ob die prophylaktische Anwendung einer 1-proz. Trypaflavinlösung vor Einbringung des Impfstoffes in die Schnittwunde die Pockeninfektion beeinträchtigt oder nicht? Zu diesem Zweck wurde nach Skarifikation der Kornea die Epithelwunde wiederholt mit 1-proz. Trypaflavinlösung aus einer Kapillare übergossen, dann die Lymphe eingebracht. Trotzdem ging die Infektion ebenso stark an, wie auf der nicht mit Trypaflavin vorbehandelten Kontrollkornea.

Die Möglichkeit der praktischen Verwendbarkeit des Trypaflavins zur prophylaktischen Wunddesinfektion beim Impfgeschäft vor Einbringung der Lymphe ist durch das positive Ergebnis dieses Versuches gegeben. Wundinfektionen der Impfschnitte, vor allem mit Streptokokken, Staphylokokken und Diphtheriebazillen, würden sich vermeiden lassen, ohne den Impferfolg in Frage zu stellen.

Ueberblicken wir das Resultat der bakteriologischen Untersuchungen und der Tierversuche mit Trypaflavinlymphe, so sehen wir einerseits, daß das 1-proz. Trypaflavin den Kälberrohstoff rascher entkeimt als Glycerin (bei 20-facher Rohstoffverdünnung ist das Material meist nach 24—48 Std. steril) — andererseits erweist sich die Trypaflavinlymphe im Tierversuch ebenso brauchbar wie entsprechende Glycerinlymphe. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die Trypaflavinlymphe auch für den Menschen verwendbar sein wird, da sie sich im Tierversuch der Glycerinlymphe bezüglich ihrer Virulenz ebenbürtig zeigte, und entsprechende Versuche sind deshalb erforderlich.

Wesentliche Vorteile der Trypaflavinlymphe wären die Freiheit des Impfstoffes von Eitererregern und das gleichzeitige Einbringen eines Wundantiseptikums in die Impfschnitte, wodurch Sekundärinfektionen ohne Beeinträchtigung des Impferfolges vermieden werden könnten. Außerdem spricht die rasche Entkeimung des Rohstoffes durch Trypaflavin zugunsten des Farbstoffes. In Zeiten unerwartet großen Lymphbedarfes gestattet die Verwendung des Trypaflavins eine rasche Herstellung größerer, von pathogenen Keimen freier gebrauchsfertiger Lymphmengen.

Literatur.

- 1) Tomarkin u. Carrière, Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorganismen. 2. Aufl. Bd. 8. — 2) Paul, G., in Kraus u. Levaditi, Handb. d. Techn. u. Method. d. Immunitätsforsch. — 3) Seiffert u. Hüne, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71. 1913. — 4) Kirstein, Deutsch. med. Wochenschr. 1919. H. 40. — 5) Burkard u. Dorn, Bruns Beitr. z. klin. Chirurg. Bd. 119. H. 3. — 6) Hamerschmidt, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 89. H. 1. — 7) Friedberger u. Mironescu, Deutsch. med. Wochenschr. 1914. Nr. 24. — 8) Paschen, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung. Herausgegeben von R. Kraus und C. Levaditi. Erster Ergänzungsband. 1911. — 9) Braun, H., Med. Klin. 1920. Heft 15. p. 406. — 10) Feiler, M., Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. Bd. 30. 1920. Heft 1.

*Nachdruck verboten.***Zum Nachweis von Phenol in Bakterienkulturen.**

[Aus dem städtischen Hygienischen Universitäts-Institut Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Neisser).]

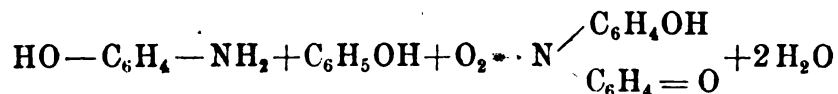
Von Dr. Walther Frieber.

Ueber Phenolbildung bei Bakterien ist im Vergleich zur Indolbildung wenig bekannt, weil diese eine unter den Bakterien viel seltener anzutreffende Eigenschaft ist. Auch sind die produzierten Mengen gering und die Phenolreaktionen nicht so scharf und charakteristisch wie die p-Dimethylamidobenzaldehyd-Reaktion auf Indol. Wenn die Phenolbildung zunächst auch keine große Bedeutung hat, so ist es doch interessant, daß es Bakterien gibt, die einen so stark bakteriziden Körper selbst bilden. Ferner bietet die Phenolbildung Interesse als Parallele zur Indolbildung insofern, als beide Stoffe aus analogen zyklischen Eiweißbausteinen, Indol aus dem Indol-Alanin (Tryptophan) und Phenol aus dem Phenol-Alanin (Tyrosin), abgespalten werden. Die Alaninseitenkette des Benzolkerns wird angegriffen, bzw. verschwindet, so daß sich letzten Endes mit Hilfe chemischer Reaktion ein Stoff nachweisen läßt, der vorher in gebundener Form und nicht reaktionsfähig vorhanden war. Nachdem die Entstehung des Phenols aus dem Tyrosin erkannt war, bedeutete es einen Fortschritt, als Rhein in Anlehnung an die Zipfelsche Tryptophanlösung, für phenolbildende Bakterien eine synthetische Lösung mit Tyrosinzusatz angab, welche zwar pathogenen Bakterien keine günstigen Wachstumbedingungen bietet, aber wenigstens den zur Paracoli-Gruppe gehörenden hauptsächlichsten Vertretern der phenolpositiven Bakterien hinreichendes Fortkommen gestattet. Die Schwierigkeit besteht nun darin, den neuentstandenen Phenolkörper in einfacher Weise nachzuweisen.

Mit den gewöhnlichen Reagentien, Millon und Bromwasser läßt sich ohne weiteres der Nachweis nicht erbringen. Diese Reaktionen, die wohl für rein wässrige Lösungen genügen, erfordern, da auch das Tyrosin selbst reagiert, Destillation, welche umständlich und lästig ist. Wesentlich bequemer ist eine Reaktion, die den Nachweis des Phenols in der Kulturflüssigkeit ermöglicht. Rhein empfiehlt den Nachweis nach Marquis: Auftreten eines violettroten Ringes, nach Unterschichten der formaldehydhaltigen Flüssigkeit mit konzentrierter Schwefelsäure.

Ich möchte auf eine andere Reaktion hinweisen, auf die uns Dr. Benda (Farbwerke Cassella) aufmerksam gemacht hat, die sich uns als geeignet erwies und die wir seit 1 Jahre im Hygienischen Institut

zu Frankfurt a. M. in der Originalkulturflüssigkeit anstellen. Sie beruht darauf, daß Phenol und p-Amidophenol bei gemeinsamer Oxydation mittels Hypochlorit einen grünblauen bis tiefblauen Farbkörper, Indophenol, einen Diphenylaminfarbstoff geben, nach nebenstehender Formel:



Die Reaktion wird folgendermaßen angestellt: Zu etwa 10 ccm mindestens 2—3 Tage alter Kulturflüssigkeit (Tyrosinwasser nach Rhein, enthaltend in 1000 ccm dest. Wasser: 0,3 g l-Tyrosin; 5,0 g Ammonium lacticum; 5,0 g Asparagin, 2,0 g sek. Kaliumphosphat; 0,2 g Magnesiumsulfat) gibt man 1 ccm 10-proz. Natronlauge, sodann 0,5 ccm einer frisch bereiteten Lösung von p-Amidophenolchlorhydrat¹⁾ (0,1 g in 100 ccm dest. Wasser) und unterschichtet mit 2—3 Tropfen Natriumhypochloritlösung (Liquor Natrii hypochlorosi 19° Bé. Merck), die man vorsichtig an der Röhrenwand hinabgleiten läßt. Es sei besonders hervorgehoben, daß die Kulturflüssigkeit vor Zugabe der Reagentien durch kaltes Wasser oder Eis bis auf etwa 10° C gekühlt werden muß. Dadurch wird die Reaktion sicherer, schöner und beständiger.

Zunächst oberhalb der Schichtgrenze entsteht je nach Phenolgehalt eine hell- bis tiefblaue Färbung, die auf die ganze Flüssigkeit übergeht und später unter Verfärbung nach braun verschwindet. Tyrosin gibt die Reaktion nicht, dagegen kommt aber auch p-Oxybenzoesäure diese Reaktion zu.

Ob demnach die Zerlegung des Tyrosinmoleküls durch phenolpositive Bakterien nur bis zur p-Oxybenzoesäure geht, oder ob das Endprodukt der bakteriellen Spaltung tatsächlich C₆H₅—OH, Oxybenzol, Phenol ist, bleibt zunächst unentschieden; wichtiger ist die Tatsache, daß das Tyrosinmolekül überhaupt von einzelnen Bakterienarten abgebaut wird, so daß die Reaktion mit p-Amidophenol positiv wird, und daß andere Bakterien dazu nicht imstande sind. Somit lassen sich phenolpositive und phenolnegative Bakterien unterscheiden²⁾.

Außer dem von M. Rhein beschriebenen *Bact. coli phenologenes* zeigte noch das *Bact. coli mutabile* (Neisser-Massini) Phenolbildung. Und zwar gaben sowohl die auf Endo-Agar weißen, wie auch die abgespaltenen Milchzucker vergärenden und dauernd rot wachsenden Kolonien kräftige Phenolreaktion. Auch ein in lebenswürdiger Weise aus von Herrn Prof. K. Wolf, Tübingen, überlassenes, aus Phlegmoneeiter isoliertes *Bacterium coli* bildete bei der Prüfung Phenol. Die genannten Stämme sind ihrem kulturellen Verhalten nach *Paracoli* und zeigten keine Spur von Indolbildung.

Die Phenolkonzentration in den Kulturen ergab sich aus Vergleichen mit künstlichen Phenollösungen zu etwa 1:5000.

Es sei noch besonders erwähnt, daß die angegebene Reaktion nichts mit der von M. Rhein in der Arbeit: „Die diagnostische Verwertung

1) Auch das p-Amidophenolchlorhydrat wurde dem Hygienischen Institut in lebenswürdiger Weise von Herrn Dr. Benda überlassen, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei.

2) Weitere Angaben finden sich in der Arbeit von M. Neisser und W. Frieber „Indol- und Phenolbildung bei Bakterien“ in dem demnächst erscheinenden Handbuch der Bakteriologischen Technik von Kraus-Uhlenhuth, Berlin und Wien (Urban u. Schwarzenberg).

der durch Bakterien hervorgerufenen Indophenolreaktion“ (Dtsch. med. Wochenschr. 1917, S. 871; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69; 1920. S. 131) erwähnten Indophenolreaktion zu tun hat. Die Reagentien, Farbreaktion und Zweck sind ganz andere.

Literatur.

Rhein, M., Ueber die Bildung von Phenol im menschlichen Darm. (Biochem. Zeitschr. Bd. 84. S. 246.) — Ueber den Abbau des Tyrosins durch *Bact. coli phenologenes*. (Ebenda. Bd. 87. 1918. S. 123.)

Nachdruck verboten.

Versuche mit der Verdauungsbrühe nach Hottinger. [Aus dem Hygienischen Institut Erlangen.]

Von Dr. Karl v. Angerer.

Mit 6 Abbildungen im Text.

Der gegenwärtige Mangel an Rohstoffen nötigt dazu, den Betrieb eines bakteriologischen Laboratoriums nach Möglichkeit zu verbilligen; insbesondere der hohe Preis des Peptons hat schon verschiedene Vorschläge zum Ersatz bewirkt. Als solche sind zu nennen die Alkali-albuminatnährböden nach Klein¹⁾, E. Czaplewski²⁾, die Verwendung von Tropon³⁾, die Selbstherstellung von Pepton nach Z. Steusing⁴⁾.

Als ich von Herrn Prof. L. Heim den Auftrag erhielt, Untersuchungen über billigere Nährböden anzustellen, zog ich in erster Linie die Hottingersche Technik⁵⁾ der Herstellung von Verdauungsbrühe mittels Pankreatin in Betracht. Ich hatte während des Krieges von diesem Verfahren weitgehend Gebrauch gemacht, im Anschluß an die Technik der Agarwiederherstellung nach Baerthlein⁶⁾ (vgl. hierzu K. v. Angerer, Arch. f. Hyg. Bd. 87. S. 316), und hatte den Eindruck gewonnen, daß die Methode von Hottinger für den Betrieb einer Untersuchungsanstalt vorzügliche und billige Nährmittel ergibt. Die jetzigen Untersuchungen sollten zeigen, ob diese Technik auch den Ansprüchen für feinere wissenschaftliche Untersuchungen genügt.

Ohne Zweifel wird man geneigt sein, in der Herstellung der Verdauungsprodukte von Fall zu Fall einen Umstand zu sehen, der die Einheitlichkeit der Nährmittel beeinträchtigen kann; ist schon die Verschiedenartigkeit der üblichen Fleischwasser ein häufig beklagter Uebelstand, so kann anscheinend der Ersatz des in annähernd gleicher Beschaffenheit erhältlichen technischen Peptons durch eine wenig definierte Verdauungsbrühe im Fall mehr und weniger gründlicher Verdauung noch größere Schwankungen bedingen. Es schien daher erwünscht, eine einfache Methode zur Messung der in Lösung gehenden Verdauungsprodukte zu finden. Am bequemsten erschien die Beobachtung des

1) Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 297.

2) Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 829.

3) B. Bitter, Ibid. S. 830.

4) Wiener klin. Wochenschr. 1919. S. 858.

5) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 67. S. 178.

6) München. med. Wochenschr. 1917. S. 465.

spezifischen Gewichtes der Verdauungsbrühe. Wenn die durch Hitze koagulierten Eiweißstoffe durch Verdauung in Lösung gehen, muß ein Ansteigen des spezifischen Gewichtes der Lösung stattfinden. Weiterhin kommt die Beobachtung der optischen Drehung in Frage; da Eiweißkörper, Polypeptide und Aminosäuren optisch aktiv sind, wird die Verdauung sich in einer Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes äußern.

Keine dieser beiden Methoden gibt uns Aufschluß über die Natur, insbesondere über die Molekulargröße der in Lösung gehenden Spaltprodukte. Das spezifische Gewicht verzeichnet lediglich das Uebergehen löslicher Körper aus dem Bodensatz in die darüber stehende Schicht; auch das Polarisationsverfahren, das beim Arbeiten mit definierten Substanzen vielfach bewährt ist, gibt nur ungenügende Aufschlüsse über die chemische Beschaffenheit der drehenden Substanzen. Die Größe der Drehung hängt nämlich vielfach von den sonstigen Bestandteilen der Lösung, insbesondere von deren Reaktion ab; Aenderung der Reaktion kann daher das Polarisationsergebnis beeinflussen. Angaben über die Drehung von Eiweiß und seinen Spaltprodukten finden sich in Oppenheims Handbuch der Biochemie. I. S. 266—302, ferner 376—437; angeführt mag werden, daß 1-Asparaginsäure in alkalischer Lösung den Drehungswinkel $-2,37^{\circ}$, in saurer $+26,47^{\circ}$ aufweist (l. c. S. 383), Tryptophan in alkalischer Lösung $+6,3^{\circ}$, in Wasser gelöst etwa -30° , in saurer Lösung $+1,31^{\circ}$ (l. c. S. 403); auch die Drehung der Eiweißkörper ist stark beeinflussbar. Es ist deshalb wohl kaum angängig, Bouillonkulturen, in denen Säure gebildet worden ist, polarimetrisch auf Eiweißspaltung zu untersuchen, abgesehen von der Drehungsänderung durch das Wegfallen des Zuckers und die Entstehung von Milchsäure (vgl. W. Weichardt, Arch. f. Hyg. Bd. 73. S. 153).

Hier ist die Frage aufzuwerfen, ob es für die Bakterienernährung gleichgültig ist, wieweit das Eiweiß abgebaut ist. Hottinger spricht die Ansicht aus, daß gerade die niederen Spaltprodukte für die Ernährung am geeignetsten sind, was hinsichtlich der weniger anspruchsvollen Bakterien, etwa der Typhusgruppe, durch das erfahrungsgemäß gute Wachstum auf weit abgebauten Nährlösungen, und auch allgemein aus physikalisch-chemischen Gründen mit Rücksicht auf die raschere Diffusion akzeptiert werden muß. Andererseits aber gibt es Arten, welche Eiweiß oder Hämoglobin zur Ernährung brauchen; man wird zunächst die Möglichkeit nicht verneinen dürfen, daß etwa die eine Gruppe genuines Eiweiß, die andere etwas abgebautes Eiweiß, eine dritte die niedrigen Spaltprodukte vorzieht. Um so wünschenswerter schien es, eine Methode anzuwenden, welche einen annähernden Einblick in die Molekulargröße der Verdauungsprodukte gestattet. Vielleicht hätte sich hierzu die Messung der Gefrierpunktserniedrigung zusammen mit der Messung des spezifischen Gewichtes bewährt, indessen ist die Gefrierpunktsbestimmung für die allgemeine Laboratoriumspraxis zu schwierig, und auch in dieser Arbeit konnte sie aus äußeren Gründen nicht angewendet werden. Einen notdürftigen Ersatz bot die Biuretreaktion; bekanntlich gibt Kupfersulfat mit einer alkalischen Lösung von wenig verdaulichem Eiweiß eine blaue Färbung, während niedrig molekulare Spaltprodukte Rotfärbung bewirken. Störend ist dabei, daß schon im Anfang der Verdauung neben hochmolekularen auch niedrig molekulare Teile entstehen, welche zuerst mit dem Kupfer reagieren und die blaue Farbe verdecken. Abderhalden (Zeitschr. f. physiol. Chem.

Bd. 71. S. 315) hat die Biuretreaktion quantitativ zu gestalten versucht, indem zu einer abgemessenen Menge einer Lösung von Eiweißspaltprodukten von bestimmter Alkaleszenz tropfenweise Kupfersulfatlösung zugesetzt wird, bis der Umschlag in Blau erfolgt. Diese Methode wurde im folgenden mehrfach verwendet, ohne daß sie wesentliche Resultate ergeben hätte.

Schließlich wurde noch eine Methode angewendet, die geeignet war, über den Gehalt der Verdauungslösung an Ampholyten überhaupt Aufschluß zu geben und die zugleich das Problem der Reaktionseinstellung in Nährlösungen berührt. Sie gründete sich auf die Verwendung mehrerer Indikatoren zu derselben Titration.

Es ist bekannt, daß Indikatoren Körper sind, welche bei bestimmten Wasserstoffzahlen die Farbe ändern. So liegt der Umschlagspunkt des Methylorange auf stark saurem Gebiete ($H = 7,9 \cdot 10^{-4}$ bis $4,0 \cdot 10^{-5}$), der des Methylrot auf weniger stark saurem Gebiet ($H = 6,3 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-7}$). Der Umschlag des Lackmusfarbstoffes entspricht annähernd dem physikalisch-chemischen Neutralpunkt. Gerötetes Phenolphthalein ist bereits stark alkalisch ($H = 5 \cdot 10^{-9}$ bis 10^{-9}); bei weiterem Alkalizusatz schlägt Thymolphthalein aus farblos in blau um ($H = 5 \cdot 10^{-10}$ bis $3,1 \cdot 10^{-11}$). Setzt man zu destilliertem kohlesäurefreiem Wasser eine Spur karbonatfreie Natronlauge, etwa 1 Tropfen der n/10-Lösung, so ist diese Lösung alkalisch für Phenolphthalein; der Zusatz einer außerordentlich geringen Menge von n/10-Salzsäure über die neutralisierende Dosis genügt, um in dieser Lösung eine Wasserstoffzahl zu erzeugen, bei der Methylrot, vielleicht sogar Methylorange schon Säure anzeigt, und das entstandene Kochsalz hat auf die Wasserstoffzahl und Hydroxylionenzahl in diesem Intervall so gut wie keinen Einfluß. Ganz anders dagegen ist der Verbrauch an Lauge und Säure, wenn man bei der Wiederholung des Versuchs eine neutrale Lösung eines Ampholyten verwendet. Während beim ersten Versuch der Abstand vom Umschlagspunkt des Phenolphthalein zu dem des Methylrots nur 1 oder 2 Tropfen Säure betrug, und während schon der erste Laugentropfen Alkaleszenz bewirkte, muß diesmal bis zur Rötung des Phenolphthalein eine erheblich größere Menge Lauge zugesetzt werden, und um vom Phenolphthaleinpunkt zum Methylrotspunkt zu gelangen, sind unter Umständen einige Kubikzentimeter Säure erforderlich. Diese Erscheinung beruht darauf, daß die Ampholyte Basen- und Säureeigenschaften vereinigen, d. h. sowohl Säure als Alkali zu binden vermögen, und die Dissoziation der überschüssigen freien Säure oder Lauge zurückdrängen, weshalb sie auch als Puffersubstanzen bezeichnet werden; die Folge davon ist, daß ein Säurezusatz die Wasserstoffzahl in einer ampholythaltigen Lösung viel langsamer ansteigen läßt wie in destilliertem Wasser, und der Umschlagspunkt des Indikators wird erst später erreicht.

Man kann diese Verhältnisse sinnfällig durch eine andere Anordnung demonstrieren. Setzt man einer alkalischen phenolphthaleinhaltigen Wasseragargallerte Methylrot zu, so wird die Rotfärbung durch die gelbe Farbe des alkalischen Methylrots kaum verändert; mit dieser Gallerte wird ein Reagenzglas in hoher Schicht gefüllt und erstarren lassen. Dann werden einige Kubikzentimeter etwa einer n/50-Salzsäure darauf geschichtet. Die Salzsäure diffundiert in den Agar, neutralisiert das Alkali und erzeugt schließlich eine saure Reaktion, deren Wasserstoffzahl um so höher ist, je mehr Säure eindiffundiert ist. Es bildet sich daher bald nach dem Ueberschichten zu oberst in der Agarsäule eine

ganz schmale Zone, die blaßgelb gefärbt ist; hier ist die Reaktion sauer für Phenolphthalein und noch alkalisch für Methylrot. Ueber ihr erscheint dann eine 3. Zone, welche wieder rot, und zwar durch saures Methylrot bedingt ist. Der gelbe Ring wandert mit abnehmender Geschwindigkeit und unter gleichzeitiger Verbreiterung abwärts die Agarsäule hinunter. Wiederholt man den Versuch mit Nähragar, so wird die gelbe Zone breiter und ihre Bewegung langsamer; ein Zeichen, daß mehr Salzsäure erforderlich ist, um die Wasserstoffzahl vom Phenolphthaleinpunkt auf den Methylrotpunkt zu bringen.

Auf der Pufferung beruhen verschiedene Erscheinungen, die für die Reaktion der Nährmittel von Wichtigkeit sind. Da infolge der Pufferung die Wasserstoffzahl bei Säure- und Alkalizusatz nur langsam verschoben wird, ist der Farbenwechsel aller Indikatoren in Nährböden weniger scharf als in reinem Wasser. Man kann leicht beobachten, wie wenig die Rotfärbung zunimmt, wenn man einer für Phenolphthalein schwachalkalischen Fleischwasser-Peptonbouillon noch einen Tropfen $n/10$ -Natronlauge zusetzt, während destilliertes kohlenstofffreies Wasser unter gleichen Bedingungen durch einen Tropfen schon tiefrot wird; ebenso bleibt in solcher Bouillon die Rotfärbung beim Stehen an der Luft noch unverändert, während Wasser alsbald durch Kohlenstoffaufnahme entfärbt wird. Ferner ist es nicht richtig, ohne Rücksicht auf den Gehalt an Puffern einem Nährboden etwa eine bestimmte Menge Alkali über den Lackmusneutralpunkt hinaus zuzusetzen, da sich verschiedene Wasserstoffzahlen, je nach dem Puffergehalt, ergeben können.

Da nun voraussichtlich die bei der Verdauung entstehenden, als Nährstoffe wichtigen Aminosäuren und sonstigen Eiweißspaltprodukte durch die Titration von einem sauren zu einem alkalischen Indikator annähernd bestimmt werden konnten, und da diese Indikatortechnik zugleich einen Einblick in die Beweglichkeit der Wasserstoffzahl und in die Bedingungen zur Ermöglichung einer konstanten Reaktion ergeben mußte, wurde diese Technik in erster Linie angewendet. Es wurden zu diesem Zweck jeweils 10 ccm der zu untersuchenden Lösung in ein Becherglas abgemessen und mit $n/10$ -Natronlauge bis zur beginnenden Rotfärbung von Phenolphthalein titriert. Dann wurden einige Tropfen einer alkoholischen konzentrierten Methylrotlösung zugesetzt und mit $n/10$ Salzsäure titriert, bis die Farbe aus Phenolphthaleinrot über Methylrotgelb in Methylrot-Rot umgeschlagen war. Der Titer ist im folgenden stets ausgedrückt in Kubikzentimeter $n/10$ -Säure oder Lauge pro 10 ccm der Lösung; der Umschlagspunkt des Phenolphthaleins soll mit Ph, der des Methylrots mit M, der Ausgangspunkt mit A bezeichnet werden.

Die Wahl fiel auf die beiden oben erwähnten Indikatoren, weil sie verhältnismäßig scharf umschlagen. Zwar durchläuft Methylrot bei zunehmender Säuerung auch einige gelbrote Mischöne, indessen kann man mit leidlicher Genauigkeit einen bestimmten konstanten Farbenton erhalten, wenn man sich einer Vergleichslösung bedient; und zwar beendete ich den Säurezusatz noch bevor der letzte, hochrote Ton erreicht war, und machte bei Gelbrot Halt. Zu den Vorversuchen wurden auch Methylorange und Thymolphthalein verwendet, bei denen der Abstand noch größer gewesen wäre als bei Methylrot und Phenolphthalein. Indessen ist der Umschlag des Methylorange gänzlich unscharf, und auch Thymolphthalein, das in pufferfreier Lösung bei hoher Alkaleszenz sehr schön aus farblos in Blau umschlägt, reagierte träger als Phenolphthalein und ergab in gelblichen Lösungen ungünstige grünliche Mischöne; des-

halb wurden Phenolphthalein und Methylrot gewählt, um so mehr, als ja diese beiden Indikatoren das Reaktionsintervall einschließen, in dem sich das Bakterienleben, seine Säuerung und Alkalibildung im wesentlichen abspielt.

Da die Versuche in eine Zeit fielen, wo Fleisch selten erhältlich war, begann ich nach einem Vorschlag von Herrn Prof. Heim mit Verdauungsversuchen mit Fisch, und zwar wurde zunächst Stockfisch verwendet.

1. Versuch.

500 g Stockfisch wurden mit 1 l Wasser gekocht, das Filtrat war stark trüb und ziemlich viskös, stark alkalisch; spez. Gewicht = 1,021, A bis Ph = 0,3 ccm Säure, Ph bis M = 0,3; der ausgekochte Rückstand wog 415 g; er wurde mit 1 l Wasser der Verdauung unterworfen, und zwar wurde in eine 1 l-Flasche mit eingeschlifftem Stopfen 277 g Fisch + 666 ccm Wasser (1) in eine andere, 138 g Fisch + 333 ccm Wasser (2), gegeben. Zunächst wurden beide Flaschen ohne Pankreatin (aber mit Chloroform) bei 37° bebrütet, um festzustellen, wiewiel lösliche Substanzen noch darin seien; nach 4-stünd. Extraktion wurde der Flasche 1 1,0 g, der Flasche 2 0,5 g Pankreatin Rhenania zugesetzt. Halbtägig wurden der Flasche 1 je 100 ccm entnommen, filtriert und nach Sterilisieren und Verjagen des Chloroforms untersucht. Nach der 6. Entnahme wurden beide Flaschen zusammengewaschen und mit der Entnahme fortgefahren.

			Spez. Gew.	Drehung	A—Ph	Ph—M
I	4 Std. ohne Pankr. extraktiert		1,008	(trüb)	0 ccm n/10 Na	0,4
II	12 „ „ verdaut 37°		1,037	—0,24	0,2	1,5
III	24 „ „		1,058	—0,36	0,5	2,1
IV	36 „ „		1,058	—0,40	0,5	2,1
V	48 „ „		1,058	—0,40	0,6	2,1
VI	60 „ „ (Misch. beider Flaschen)		1,063	—0,47	0,9	2,7
VII	72 „ „		1,046	—0,22	0,9	2,2
VIII	84 „ „		1,049	—0,40	1,0	2,4
IX	104 „ „		1,053	—0,40	1,0	2,4
X	128 „ „		1,057	—0,40	1,0	2,4
XI	172 „ „		1,057	—0,38	1,0	2,4

Die Tryptophanreaktion war bis nach 60 Std. negativ, nach 48 Std. schwach, von 104 Std. an deutlich. Die Biuretreaktion ergab in Probe I beim 1. Tropfen einer 1-proz. Kupfersulfatlösung (zu 1 ccm der Verdauungsbrühe + 2 ccm Natronlauge) dunkelblaue Farbe (Ammoniak); bei den folgenden Proben trat zunächst Rotfärbung ein, die bei II nach 3, bei III und den folgenden nach 7 Tropfen sehr unscharf in Violett überging.

Zur kulturellen Prüfung wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ ihres Volumens einer 5-proz. Kochsalz- und 1-proz. Kaliumphosphatlösung versetzt und zu $\frac{2}{3}$ gegen Phenolphthalein neutralisiert; beim Kochen entstanden starke Niederschläge. Die einzelnen Proben wurden zu je 5 ccm in Reagenzgläser abgefüllt und jeweils mit Pneumokokken (aus Bouillonkultur vom Seidenfaden, mit Blut einer Pneumokokkenmaus getränkt), Streptococcus longissimus (aus Mundhöhle), Streptococcus pyogenes (aus Eiter), Milchsäurestreptokokken, Staphylokokken (Abszeßeiter), Pyocyaneus, Milzbrand, Diphtherie, Shiga-Ruhr und Schweine-

rotlaufbazillen beimpft. Von diesen wuchsen Pneumokokken und Streptococcus pyogenes überhaupt nicht; Streptococcus longissimus wuchs in IV und V kümmerlich, in den folgenden Proben etwas besser; Milchsäurestreptokokken von der IV. Probe ab; alle übrigen wuchsen gut und typisch von II an, Bac. diphtheriae schien in Probe V ein schwaches Optimum zu haben. Die Wiederholung des Versuches mit einer Mischung von gleichen Teilen der Abkochung und der Proben ergab ein ähnliches Resultat.

Dieser Versuch, der durch das schlechte Wachstum der empfindlicheren Bakterienarten an Wert verliert, zeigt, daß die fortschreitende Verdauung sowohl durch die Messung des spezifischen Gewichts als durch die Indikatorenmethode verfolgt werden kann; der Verlauf der Verdauung zeigt Unregelmäßigkeiten. Auch die Polarisation gibt (anscheinend durch Fehler entstellt) Ausschläge. Die Biuretreaktion bewährte sich nicht. Das Wachstum der anspruchsloseren Arten war gnt, dagegen das der Organismen aus der Streptokokkengruppe ungenügend. Eine Abhängigkeit des Wachstums von einer bestimmten Verdauungsperiode ergibt sich nicht; in den ersten Proben dürfte der Gesamtgehalt zu gering gewesen sein. Als empfindlichste Arten erwiesen sich Pneumokokken, Eiter- und Zahnstreptokokken. Der Vergleich mit den folgenden Versuchen zeigt, daß die Verdauung überhaupt sehr gering gewesen war. Alles in allem muß Stockfisch als ungeeignet zur Hottingerschen Technik bezeichnet werden.

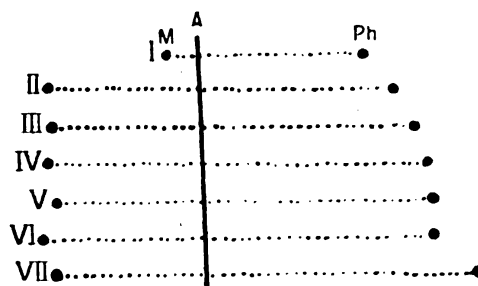


Fig. 1.

2. Versuch.

225 g Schellfisch (gekocht und grätenfrei durch die Fleischhackmaschine getrieben) werden mit 670 ccm Wasser, 0,5 g Pankreatin Rhenania und Chloroform angesetzt; Natronlauge wurde bis zu beginnender Phenolphthaleinrötung zugesetzt. Probcntnahme anfangs halbtägig, später täglich einmal (Fig. 1).

		Spez. Gew.	Drehung	A—Ph	Ph—M	Tryptophan
I	12 Std. bis 37° verdaut	1,070	trüb	2,3	2,8	—
II	22 „ dgl.	1,108	—2,5°	2,7	4,9	—
III	36 „ „	1,109	—2,5°	3,0	5,2	Spur
IV	46 „ „	1,118	—2,5°	3,2	5,4	„
V	60 „ „	1,119	—2,55°	3,3	5,4	deutlich
VI	84 „ „	1,125	—2,60°	3,3	5,6	„
VII	132 „ „	1,147	—3,0°	3,9	6,0	„

Die Verdauung ergab eine klare und fast völlig farblose Lösung, welche sich zu Untersuchungen mit Indikatoren vorzüglich eignete. Das spezifische Gewicht ist in diesem Versuch bedeutend höher als beim vorigen; der Anstieg ist unregelmäßig, und zwar fielen die Perioden des Anstiegs auf die Tages-, die des Gleichbleibens auf die Nachtstunden, was wohl den Einfluß des Umschüttelns zu bedeuten hat. Probe VII wurde mit viel Bodensatz gekocht und zeigt wohl deshalb ein unregelmäßiges Verhalten (auch in den anderen Spalten der Tab.). Die Biuretreaktion ergab kein wesentliches Resultat, höchstens in Probe I war die Farbe reiner blau als in den übrigen.

In der Spalte A—Ph zeigt sich eine anfangs rasche, dann langsame Zunahme der bis zum Phenolphthaleinpunkt erforderlichen Alkalimenge. Würde man etwa in einer Bakterienkultur einer derartigen Zunahme des Titors begegnen, so würde wohl meistens eine Säurebildung vermutet werden. Demgegenüber ist darauf hinzuweisen, daß hier eine Bildung freier Säuren zwar stattgefunden haben kann, aber nicht ausschließlich stattgefunden haben muß; denn der gleiche Effekt kann auch durch die Entstehung von Puffersubstanzen bewirkt sein. Daß in zuckerhaltigen Bakterienkulturen eine Abspaltung von Puffersubstanzen aus Pepton in wesentlichem Umfange nicht stattfindet, konnte ich bei elektrometrischen Untersuchungen über die Wasserstoffzahl in Kulturen zeigen.

Mit dem Phenolphthaleintiter steigt auch die Größe Ph-M, und zwar, abgesehen von Probe I, genau parallel mit ihr. Für die Proben II—VII behält der Wert A-M (= M-Ph minus A-Ph) ziemlich genau konstant den Wert 2,2. Es ist darauf hinzuweisen, daß diese Titration mit mehreren Indikatoren Berührungspunkte mit der weit genaueren, aber auch viel umständlicheren elektrometrischen Titration hat, die wohl zuerst von Böttcher (Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 24. S. 253) angewendet worden ist; für ihre Theorie ist die Arbeit von Koppel und Spiro (Biochem. Zeitschr. Bd. 65. S. 409) wesentlich (vgl. auch L. Michaelis, Biochem. Zeitschr. Bd. 79. S. 1). Beobachtet man die Wanderung der Wasserstoffzahl als Funktion der zugesetzten Säure oder Lauge, so kann man die Stärke der Pufferung für verschiedene Wasserstoffzahlen beobachten und, da eine Säure bei derjenigen Wasserstoffzahl, die ihrer Dissoziationskonstante numerisch gleich ist, am stärksten puffert, Rückschlüsse auf die Dissoziationskonstanten und aus diesen zuweilen auf die Säuren selbst ziehen. Schon bei diesem Versuch hier können wir beobachten, daß die Pufferung vor allem auf alkalischem, weniger auf saurem Gebiet zunimmt; die später ausgeführten Versuche mit drei Indikatoren würden ein schärferes Bild der Pufferung ergeben, das sich durch Vermehrung der Indikatoren vermehren ließe. Da für viele Ampholyte Säure- und Basen-Dissoziationskonstanten gemessen sind (z. B. Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51. S. 219; A. Kowitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47. S. 476), kann man einen teilweisen Rückschluß auf die chemische Zusammensetzung des Verdauungsgemisches machen; im übrigen muß Pufferung nicht nur der H-, sondern auch der OH-Ionen berücksichtigt werden; die OH-Konzentration ergibt sich als Quotient aus der Dissoziationskonstante des Wassers und der Wasserstoffzahl. Für diesen Versuch lassen sich vermuten Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Arginin, ferner Ammoniak und Trimethylamin; die Puffereigenschaften der Phosphate und Karbonate kommen als konstant weniger in Rechnung; im übrigen soll auf diese Probleme bei dieser vorwiegend praktische Zwecke verfolgenden Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Weiterhin wurde die Qualität des Wachstums untersucht; die Proben wurden zu $\frac{1}{10}$ ihres Volumens mit 5 Proz. Kochsalz und 1 Proz. Kaliumphosphatlösung versetzt und gegen Phenolphthalein zu $\frac{2}{3}$ alkalisiert, gekocht, filtriert und zu 5 ccm abgefüllt. Dieses Mal zeigten *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus longissimus* schon in Probe I gutes, von Probe IV an sehr gutes Wachstum. Diphtheriebazillen waren in I nicht, in allen folgenden Proben gleichmäßig und gut gewachsen. Shiga-Ruhr-, Schweinerotlauf- und Coli-Bazillen waren überall gleich, und zwar üppig gewachsen.

An diesen Kulturversuch schloß sich noch eine andere Prüfungs-

methode an, nämlich die Bestimmung der Säurebildung durch *Bact. coli*. Michaelis und Marcorca (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 14. S. 170) glaubten zeigen zu können, daß die Säuerung bis zu einer bestimmten Wasserstoffzahl ansteigt, welche nicht überschritten wird, und zwar soll diese Wasserstoffzahl die höchste sein, welche *Bact. coli* noch ohne Schaden vertragen kann (zit. nach Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914. S. 113). Demgegenüber konnten Clark und Lubs (Journ. of inf. Dis. Vol. 17. p. 160) zeigen, daß für einen bestimmten *Coli*-Stamm und für ein und denselben Nährboden die Wasserstoffzahl sich zwar auf einen annähernd konstanten Wert einstellt, daß aber andere Nährböden und andere Stämme verschiedene Wasserstoffzahlen ergeben. Ich beobachtete gleichfalls Schwankungen in der schließlichen Wasserstoffzahl je nach dem Chemismus des Nährbodens, übrigens zuweilen auch rasches Absterben von *Bact. coli* in gesäuerten Bouillonproben. Immerhin wird die Wasserstoffzahl bei der Säurebildung auf einen leidlich konstanten Wert sich einstellen, und um diesen Wert zu erreichen, wird um so mehr titrierbare Säure erforderlich sein, je mehr Puffersubstanzen die Nährlösung enthält; man wird also durch die Titrierung der Säurebildung auf biologischem Wege die Pufferung beurteilen können, und wenn außerdem aus nicht physikalischen, biologischen Gründen in einem Nährboden eine höhere Wasserstoffzahl ertragen wird als im anderen, so wird man wohl dem ersten den Vorzug geben. Infolgedessen erscheint die Messung der Säurebildung als gute biologische Kontrolle des Nährbodens. Zu diesem Zweck wurden von den gesalzenen und alkalisierten Proben I—VII je 9 ccm abgefüllt, mit 1 ccm einer 10-proz. Traubenzuckerlösung versetzt und mit *Bact. coli* beimpft. Noch nach 16-stündiger Bebrütung bei 37° war die Gasbildung sehr stark, nach 24 Stunden noch deutlich. Gleichwohl wurde schon nach 24 Std. titriert wegen der Befürchtung, daß etwa sekundäre Alkalibildung einsetzen möchte. Es ergab sich ein Verbrauch von n/10 NaOH für 10 ccm Bouillon bis zum Phenolphthaleinpunkt:

I	II	III	IV	V	VI	VII
4,4	5,0	5,4	5,8	6,0	6,2	7,2 ccm.

Man beobachtet hier einen ausgesprochenen Parallelismus zwischen den Säuremengen und den Werten A-Ph; die Differenz: Säure minus (A-Ph) beträgt in ccm bei:

I	II	III	IV	V	VI	VII
2,1	2,3	2,4	2,6	2,7	2,9	3,3;

die Differenz nimmt langsam und (innerhalb der Fehlergrenzen) regelmäßig zu. Man kann rechnerisch dartun, daß die entwickelte Säure eine Funktion der Pufferung ist. Sind nämlich in einer Lösung eine schwache Säure und ihr Salz gleichzeitig zugegen, so ist die Wasserstoffzahl proportional dem Quotienten aus der Säure- und der Salzkonzentration; führt man die Rechnung hier aus, indem man als Säurekonzentration den Säuretiter, als Salzkonzentration den Wert A-Ph einsetzt, so ergibt sich ein mit geringen Schwankungen konstanter Wert, der mindestens nicht mehr den „Gang“ der Titer aufweist.

I	II	III	IV	V	VI	VII
1,92	1,85	1,80	1,80	1,80	1,88	1,85

Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die — übrigens unbekannte — Wasserstoffzahl in allen Proben gleich war.

Der Versuch ergab: gutes Wachstum auch der anspruchsvollen Arten, Fortschreiten der Ausbeute mit der Dauer der Verdauung; keine scharfe Abhängigkeit der Wachstumsintensität von einer bestimmten Verdauungsperiode, abgesehen von den ersten Stunden.

3. Versuch.

Zu diesem Versuch stand zufällig ausgekochtes Rindfleisch (Ueberrest von der üblichen Bouillonbereitung) zur Verfügung. Von diesem wurden 225 g + 750 ccm Wasser, alkalisiert, mit 0,8 g Pankreatin zur Verdauung angesetzt und fortlaufend Proben entnommen.

	Verdauungszeit	Spezif. Gewicht	Drehung	A—Ph	Ph—M	Coli-Säure	Tryptophan
I	7 Std.	1,024	trüb	0,4	0,8	3,6	—
II	21 "	1,045	—1,2°	1,0	1,8	4,3	—
III	45 "	1,098	—3,5°	2,9	4,4	6,0	Spur
IV	69 "	1,139	—3,7°	4,8	6,3	7,1	Spur
V	93 "	1,161	—3,8°	6,0	7,9	8,1	deutlich
VI	117 "	1,189	—4,1°	7,4	10,0	9,5	deutlich

Das Rindfleisch zeigt in diesem Versuch (Fig. 2) zunächst ein Zurückbleiben gegenüber dem Fischfleisch hinsichtlich spezifischem Gewicht, Pufferung im Intervall A—Ph und Ph—M und in der Säurebildung

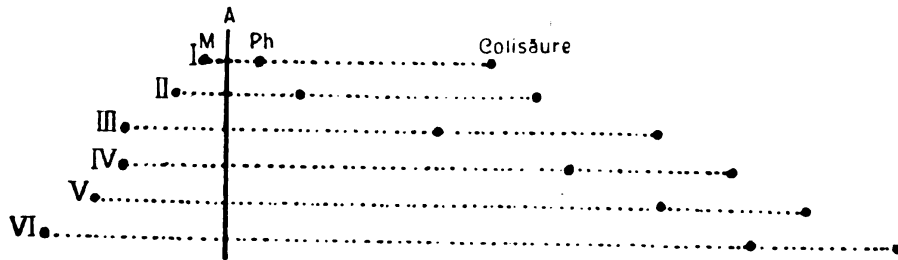


Fig. 2.

durch *Bact. coli*. Nach 2—2½ Tagen wird der Vorsprung indessen eingeholt und sogar wesentlich überschritten. Die letzten Werte dieses Versuchs sind überall wesentlich höher als im vorigen Versuch. Der Wert M—A ist diesmal nicht konstant, sondern wächst etwas und nicht ganz regelmäßig mit fortschreitender Verdauung. Die Säurebildung in den einzelnen Proben ist gleichfalls um so größer, je länger die Verdauung eingewirkt hat. Auch in diesem Versuch nimmt der Säurewert etwas rascher zu als A—Ph und Ph—M; die Quotienten aus Säure, dividiert durch A—Ph oder Ph—M oder A—M, sind nicht konstant (am ehesten noch die letzten), woraus wohl der Schluß zu ziehen ist, daß innerhalb des ziemlich großen Spielraums, den die gebildete Säure umfaßt, die Pufferung nicht konstant war. Die Differenz Säure minus (Ph—M) ergibt, wenn man als Abszisse die Stundenzahlen einträgt, eine ziemlich genaue Gerade, welche der Säurekurve etwa parallel geht.

Die Biuretreaktion ergab in der ersten Probe ein Vorwiegen von Blau, im übrigen keine scharfen Differenzen.

Der Kulturversuch ergab in allen Proben vorzügliches Wachstum, und zwar mit Eiterstreptokokken, *Strept. longissimus*, Diphtherie- und Schweinerotlaufbazillen; höchstens *Strept. longissimus* wies in der ersten Probe ein etwas geringes Wachstum auf.

4. Versuch.

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Ausbeute an Nährstoffen durch Entfernung der Verdauungsprodukte gesteigert wird. Die Anhäufung von Umsatzprodukten, welche durch ein Ferment gebildet worden sind, hemmt meistens die weitere Fermenttätigkeit; auch für Trypsin ist dies beschrieben worden (vgl. F. Samuely in Oppenheimers Handb. d. Biochem. I. S. 531 u. 552). Zu diesem Zweck wurden 240 g grätenfreies, gekochtes und gemahlenes Fischfleisch mit 1 g Pankreatin und 240 ccm Wasser unter Alkalizusatz verdaut. Da die Lösung rasch vor sich ging, wurde die ganze Masse schon nach 7 Stunden auf ein Filter gebracht; es liefen 270 ccm ab. Da die breiige Masse sich vom Filter schlecht entfernen ließ, wurde das ganze Filter in die Flasche zurückgebracht, mit 270 g Wasser, 0,5 g Pankreatin und Alkali versetzt, und nach 15 stündiger Verdauung abermals filtriert. Das Filtrat betrug 280 ccm; wie zuvor wurde das abfiltrierte Quantum mit Wasser, Pankreatin und Alkali versetzt, und noch 2mal nach je 24-stündiger Bebrütung filtriert. Es filtrierten 240 bzw. 220 ccm; vermutlich hielten die in dem Brei zerschüttelten Filter die Filtration auf. Die Proben wurden in der üblichen Weise untersucht. Außerdem wurde diesmal das Verhalten gegen Lackmus festgestellt, und zwar in der Form von Lackmus- und Duplitestpapier durch Tüpfelung, eine ebenso zeitraubende als ungenaue Methode. Der Lackmusumschlagspunkt wurde einmal bei Alkalizusatz bestimmt, soweit die Proben nicht lackmusalkalisch waren, ein zweites Mal bei der Rücktitration mit Säure; die unten angeführten Zahlen sind die Mittelwerte aus beiden Bestimmungen, die nicht immer genau übereinstimmen. L bezeichnet Lackmus, D Duplitestpapier, minus (links vom Nullpunkt) bedeutet Säurezusatz (Fig. 3).

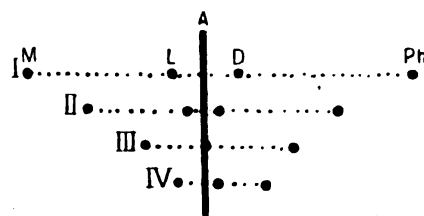


Fig. 3.

Verdauungszeit	A—L	A—D	A—Ph	PH—M	A—M	Spezif. Gewicht	Tryptophan	Drehung
I 7 Std.	—,5	+0,4	2,9	5,4	—2,5	1,118	Spur	—2,75
II 15 „	—	+0,1	1,8	3,5	—1,7	1,080	deutlich	—1,59
III 24 „	0	0	1,2	2,1	—0,9	1,039	stark	—0,56
IV 24 „	+0,2	0	0,8	1,2	—0,4	1,021	„	—0,25

Die Biuretreaktion ergab — mit unscharfen Grenzen — in Probe I bis zum 13. Tropfen CuSO_4 Rotfärbung; beim 15. war die Farbe mehr rotviolett geworden und ging etwa bei 24 Tropfen in Blau über; Probe II schlug bei 13 Tropfen in violett um und einige Tropfen später in Blau. Bei III und IV trat der Umschlag in blau etwa beim 10. Tropfen ein.

Der Versuch zeigt, daß der Gehalt an Verdauungsprodukten in jedem folgenden Aufguß rasch geringer wird. Hottinger weist darauf hin, daß der Filtrerrückstand noch viel gelöste Stoffe enthält, die auszuwaschen hier nicht möglich war; wären sie entfernt worden, so wäre der Gehalt noch rascher gesunken. Die hier gewählte Methode der Erschöpfung bot also keine Vorteile. Uebrigens waren auch hier, wie bei den früheren Versuchen, im Rückstand noch unverdaute Muskelteilchen mikroskopisch nachweisbar.

Lackmus- und Duplitestpapier zeigen verschiedene Umschlagspunkte, und zwar schlägt ersteres bei niedrigerer Alkaleszenz um. Im ganzen

ist die Verschiebung dieser beiden Proben, im Vergleich zu Phenolphthalein und Methylrot, ziemlich gering; das beruht darauf, daß Lackmus, wenigstens als Tinktur, in der Nähe des physikalischen Neutralpunktes umschlägt. Beide Umstände empfehlen Lackmus als Ausgangspunkt für die Reaktionsbestimmung. (Ich fand übrigens bei elektrometrischen Messungen den Umschlagspunkt von Duplitestpapier mit Nährbouillon auf ganz schwach saurem Gebiete und ziemlich unabhängig vom Peptongehalt.)

Die Proben wurden sodann mit den Salzen versehen, zu $\frac{2}{3}$ gegen Phenolphthalein alkalisiert, gekocht, filtriert und nochmals titriert; sie waren sämtlich lackmusalkalisch, weshalb die Titration gegen Lackmus nur bei der Rücktitration erfolgte.

	A—Ph	Ph—D	Ph—L	Ph—M	A—M	A—L	A—D
I	1,2	2,6	3,5	5,7	4,6	-2,4	-1,5
II	1,1	2,1	2,7	4,2	3,0	-1,5	-0,9
III	0,7	1,2	1,4	2,4	1,7	-0,7	-0,5
IV	0,5	0,8	1,2	1,8	1,3	-0,5	-0,3

Es zeigt sich zunächst die Verschiebung nach der alkalischen Seite zu; der Abstand Ph—M hat gemäß der Pufferwirkung des Phosphats zugenommen. Die Ausgangsreaktion liegt in der Mitte zwischen Lackmus und Phenolphthalein, was sicher günstig ist. Immerhin hätte die jetzige Reaktion, der Rechnung nach, stärker alkalisch sein müssen. Anscheinend haben die Lösungen nachgesäuert. Die Verschiebung der Lackmuspapiere ist auch hier gering. Es darf darauf hingewiesen werden, daß die Neutralisierung zu $\frac{2}{3}$ oder $\frac{3}{4}$ von A—Ph keine exakte Methode ist; da der Ausgangspunkt A nicht definiert ist, wird auch der Endpunkt eines Titers von A—Ph nicht bestimmt sein, vielmehr von Säuregrad und Pufferung des Fleischwassers abhängen. Immerhin werden diese beiden zumeist nicht so stark variieren, daß nicht der Endpunkt auf alkalisches Gebiet zu liegen käme, was die Hauptsache ist. Korrekter ist es, den beiderseits durch einigermaßen definierte Wasserstoffzahlen begrenzten Wert D—Ph zu wählen und bis zu einem bestimmten Punkt dieses Abstandes zu neutralisieren, und auch hier kann man noch den Einwand machen, daß die Pufferung längs dieses Intervalls nicht konstant sein muß.

Das Wachstum von *Strept. pyogenes* und *longissimus* war in I und II sehr gut, in III und IV merklich geringer, Schweinerotlaufbazillen zeigten, bei sehr gutem Wachstum in I und II, in IV einen deutlichen Rückgang. Auch Diphtheriebazillen waren in den ersten beiden Proben stärker als in den folgenden gewachsen, sie schien in II ein Optimum zu haben. Das Wachstum aller Stämme, außer Rotlaufbazillen, war in IV noch durchaus gut. Die 4 Proben, zu gleichen Teilen miteinander gemischt (spez. Gewicht = 1,065, Drehung = $1,3^{\circ}$, A—Ph = 1,7, Ph—M = 3,2) ergaben überall sehr gutes Wachstum.

Versuch 5.

Der 2. Teil des im 4. Versuch verwendeten Fischfleisches wurde gebraucht, um die Verdünnung zu untersuchen, bis zu welcher noch gutes Wachstum eintritt. Hottinger verwendete zur Prüfung seiner Nährmittel *Bact. coli*, *Pyocyanus*, *Bact. prodigiosum*, Milzbrand- und Diphtheriebazillen; das sind bis auf den letzten Stamm anspruchslose Arten, welche wohl auch in weitgehend verdünnter Peptonbouillon gediehen wären. In diesem Versuch sollten pathogene und nicht patho-

gene Streptokokken geprüft werden, die sich z. B. im ersten Versuch als die empfindlichsten Arten erwiesen, wenn wir von den — eine Ausnahmestellung einnehmenden — Gono- und Meningokokken absehen.

Hiermit sollte ein anderer Versuch verbunden werden. Es ist bekannt, daß Streptokokken verschiedener Art, aber auch zahlreiche andere Mikroorganismen, durch Kohlehydratgehalt des Nährbodens wesentlich begünstigt werden; indessen kann die aus den Zuckern entstehende Säure nachträglich die Bakterien schädigen. Die Schädigung beruht — nicht ausschließlich, aber größtenteils — auf der die Neutralität überschreitenden Anhäufung von Wasserstoffionen. Es ist nun möglich, auf Grund der chemischen Formeln der Zuckerzersetzung zu berechnen, wie viel Säure aus einer bestimmten Menge Zucker entsteht. Andererseits läßt sich aus den Puffereigenschaften des Nährbodens angeben, wie viel Säure der etwa zu $\frac{2}{3}$ oder $\frac{3}{4}$ des Abstandes L—Ph alkalisierte Nährboden verträgt, ohne sauer für Lackmus zu werden. Auf diesem Wege findet man eine bestimmte Zuckermenge, welche auch bei quantitativer Ueberführung in Säure den Nährboden alkalisch läßt. Die Frage war, ob diese voraussichtlich kleine Zuckerkonzentration das Wachstum begünstigen würde.

Die Rechnung verläuft folgendermaßen: Traubenzucker (Molekulargewicht wasserfrei = 180) enthält im Molekül 6 Kohlenstoffe und kann somit bei der Vergärung maximal 6 Moleküle einer Säure mit einem C (etwa H_2CO_3) oder 3 Moleküle einer Säure mit 2 C (etwa Essigsäure, Molekulargewicht = 60) oder 2 Moleküle einer Säure mit 3 C (etwa Milchsäure, Molekulargewicht = 90) liefern. Fall 1, vollständige Verbrennung des Zuckers kommt nicht, oder nur auf Umweg über höhere Säuren vor; Fall 2 und 3 kommen wohl am häufigsten gemischt vor. 1 g Zucker ergibt 1 g Essigsäure oder 1 g Milchsäure. Bei der quantitativen Vergärung einer 1-proz. Traubenzuckerlösung würde also 1 Proz. Milch- oder Essigsäure entstehen, und aus den Molekulargewichten ergibt sich, daß die entstehende Säure im Fall der Essigsäuregärung $\frac{1}{6} = 0,167$ normal, im Falle der Milchsäuregärung $\frac{1}{9} = 0,11$ normal wäre. Die Zahlen für Milchzucker (mit 2 Kristallwassern Molekulargewicht = 378) sind diesen sehr nahe. Für gewöhnlich verläuft die Zersetzung längst nicht quantitativ; wird z. B. Säure gebildet bis zum Verbrauch von 5 ccm n/10 NaOH pro 10 ccm Bouillon, so ist die Konzentration der Säure in der Bouillon nur 0,05 normal. Im folgenden Versuch sollte nun angestrebt werden, denjenigen Zuckerzusatz zu finden, bei welchem die maximal entstehende Säure von der Pufferung noch vor Eintritt der lackmussauren Reaktion neutralisiert würde.

240 g Fisch wurden mit 720 ccm Wasser, 0,4 g Soda und 1 g Pan-
kreatin verdaut, und zwar nur 24 Std., da die Verdauung rasch vor
sich ging und die Tryptophanreaktion bald positiv wurde. Dann wurde
filtriert, der Rückstand mit Wasser versetzt und nochmals 2 Tage ver-
daut.

	A—L	A—D	A—Ph	Ph—M	Spez. Gewicht	Drehung	Tryptophan
1. Filtrat	—0,7	0,8	3,5	6,2	1,131	—2,6°	stark
2. „	—0,2	0,3	2,0	3,2	1,056	—0,85°	sehr stark

Das 1. Filtrat wurde mit den Salzen versehen, zu $\frac{3}{4}$ gegen Phenol-
phtalein alkalisiert, gekocht, filtriert und dann im Verhältnis 1:10,
1:5, 1:2 mit Kochsalzlösung verdünnt; eine weitere Probe blieb kon-
zentriert. Die abermalige Titration ergab folgende Werte:

	A—Ph	Ph—D	Ph—L	Ph—M	A—D
Verdünnung 1:10	0,1	0,3	0,5	1,1	0,2
„ 1:5	0,2	0,7	0,9	1,8	0,5
„ 1:2	0,3	1,5	2,0	3,8	1,2
konzentriert	1,3	2,6	3,1	6,1	1,3

Strenge Proportionalität zwischen Verdünnung und Indikatorenabstand besteht nicht; die Verschiebung der Lackmuswerte ist, obgleich nicht unbedeutend, geringer als die von Ph und M. Die Ph—L-Spalte enthält das Intervall, das für die Absättigung der aus Zucker entstehenden Säuren zur Verfügung steht. Die Werte der letzten Verdünnungen sind sehr klein; z. B. für den Wert 0,2 der Verdünnung 1:10 berechnet sich als Zuckertoleranz für reine Essigsäurebildung 0,12 Prom. Traubenzucker, für reine Milchsäurebildung 0,18 Prom. In Wirklichkeit wurde etwas mehr Zucker zugesetzt, da angenommen wurde, daß bei diesen geringen Zuckermengen die (bei viel Zucker enthaltenden Nährböden nur unerhebliche) Alkalibildung doch größeren Umfang erreichen würde, daß ferner die entstehende Säure bei alkalischer Reaktion wieder verzehrt werden und vielleicht die Zuckervergärung gar nicht quantitativ verlaufen würde. Die Verdünnung 1:10 erhielt deshalb 0,2 Prom., die von 1:5 0,5 Prom., die 1:2 und die konzentrierte Probe 1 Prom. Traubenzucker. Mit zuckerfreien Verdünnungen wurde ein Parallelversuch angestellt. Die Beimpfung geschah mit *Strept. longissimus*, Milchsäurestreptokokken und *Bact. coli*.

		<i>Strept. longissimus</i>	Milchsäurestrept.	<i>Bact. coli</i>
konzentriert	ohne	gutes Wachstum	schwaches Wachstum	gutes Wachstum
	mit Zucker	stärker; klumpiger Bodensatz	sehr starkes Wachstum	viel stärker
Verdünnung 1:2	ohne	gutes Wachstum	sehr schwach	gutes Wachstum
	mit Zucker	viel stärker als obige Proben	sehr stark	viel stärker
Verdünnung 1:5	ohne	Spur	fast unbewachsen	gutes Wachstum
	mit Zucker	gutes Wachstum	stark	viel stärker
Verdünnung 1:10	ohne	eben erkennbare Spur	unbewachsen	geringes Wachstum
	mit Zucker	deutliches Wachstum	schwach	etwas stärker

Die Reaktion war überall alkalisch für Lackmus. *Coli* und Milchsäurestreptokokken waren frisch isoliert und zeigten im Kontrollversuch kräftige Säurebildung. *Strept. longissimus* besitzt nur mäßige Gärkraft.

Die Grenze des guten Wachstums in zuckerfreier Lösung liegt für *Bact. coli* etwa bei 1:5, für *Strept. longissimus* bei 1:2, für Milchsäurestreptokokken in der Ausgangskonzentration, doch wachsen diese letzteren auf allen zuckerfreien Lösungen nur schwach. Nach diesem Versuch hätten aus 1 kg Fischfleisch etwa 15 l *Coli*-Nährboden, 6 l Streptokokkennährboden und etwa 3 l Lösung für Milchsäurestreptokokken hergestellt werden können. Bemerkenswert ist, daß die geringfügigen Zuckermengen die Nährlösung erheblich verbessern; die Unterschiede waren überall sehr auffällig, und bei Zuckerzusatz hätte die Verdünnung auch für *Strept. longissimus* und Milchsäurestreptokokken

auf 15 l pro Kilogramm getrieben werden können. Trotzdem gelang es, die Reaktion alkalisch zu erhalten.

6. Versuch.

In diesem Versuch wurde getrachtet, eine möglichst konzentrierte Nährlösung herzustellen. 170 g Fischfleisch wurde ohne Wasserzusatz gekocht und mit 0,7 g Pankreatin (in 20 ccm Wasser aufgeschwemmt) verdaut. Zur Erreichung einer lackmusalkalischen und phenolphthaleinsäuren Reaktion wurden 5 ccm n-Sodalösung zugesetzt. Nach 2 Tagen wurde filtriert; es ergaben sich 80 ccm einer gelblichen, etwas viskösen Flüssigkeit. 5 ccm davon wurden titriert, es ergaben sich, umgerechnet auf 10 ccm, folgende Werte:

A—Ph	Ph—D	Ph—L	Ph—M	A—M	A—D	A—L
12,0	10,4	14,0	20,8	8,8	1,6	—2,0

Die Umschläge waren stets unscharf, namentlich bei Phenolphthalein und Methylrot. Die Lösung wurde mit den Salzen versehen und zu $\frac{2}{3}$ gegen Phenolphthalein neutralisiert; 4 Röhrchen zu je 3 ccm wurden abgefüllt, ferner wurden 20 ccm mit 0,3 g Agar gekocht und hiervon ohne Filtration eine Platte gegossen. Die Beimpfung ergab unerwartete Resultate. Statt des erwarteten ungewöhnlich starken Wachstums blieben die mit Strept. pyogenes und longissimus und Pneumokokken geimpften Röhrchen steril, gewachsen waren nur Diphtheriebazillen, diese allerdings außerordentlich üppig. Auf der Agarplatte wuchsen gar nicht Streptococcus pyogenes und longissimus; Pneumokokken wuchsen spurenweise, Milchsäurestreptokokken etwas besser. Schweinerotlaufbazillus etwickelte sich gut. Xerosebazillen bildeten eben erkennbare Kolonien, Diphtheriebazillen dagegen wuchsen sehr kräftig, noch üppiger als auf Loeffler-Serum. Unter den Impfstrichen von Xerose, Diphtheriebazillen, Milchsäurestreptokokken und Pneumokokken lagen massenhaft Krystalle, welche denen von phosphorsaurem Ammoniakmagnesia glichen und bei Pneumokokken besonders groß waren. Sie fehlten bei Schweinerotlaufbazillen und auch in den unbeimpften Teilen der Platte. Mikroskopisch zeigten die Diphtheriebazillen normale Stäbchen, jedoch gaben sie keine Neisser-Färbung. Xerose zeigte kümmerliche, sehr kurze Stäbchen, gleichfalls ohne Körnchen; die Weiterimpfung auf Loeffler-Serum ergab bei beiden wieder typische Bazillen. Bei den Pneumokokken fanden sich viel Involutionsformen, bei Schweinerotlaufbazillen viel Fäden; die Milchsäurestreptokokken waren normal.

Einige Tage später bildeten sich auf der ganzen Platte reichlich Tyrosinkrystalle.

Nachdem von den hier untersuchten Arten eigentlich nur Diphtheriebazillen kräftig gewachsen waren, mußte man daran denken, dieses Verhalten zur Anreicherung, allenfalls zur Differentialdiagnostik auszunutzen. Da man im Rachen bei der Diphtherieuntersuchung neben Streptokokken häufig Staphylokokken findet, wurde das mit Pneumokokken geimpfte Bouillonröhrchen nachträglich mit Staphylokokken geimpft; diese entwickelten sich immerhin leidlich gut. Die Aussichten für ein Anreicherungsverfahren sanken dadurch, um so mehr, als diese Nährlösung ziemlich teuer ist.

Die konzentrierte Lösung wurde zu je 6 ccm verdünnt, und zwar je 4 Lösung + 2 Kochsalzlösung, 3 + 3, 2,5 + 3,5, 2 + 4, 1 + 5, 0,5 + 5,5; von jeder Probe wurden 3 Reagenzgläser zu je 2 ccm abgefüllt. In

diesen wuchsen Diphtheriebazillen überall gut, in den konzentrierten vielleicht etwas stärker; Xerosebazillen wuchsen gleichfalls gut, schon in der ersten Verdünnung, wenngleich schwächer als Diphtheriebazillen. *Strept. longissimus* wuchs in den beiden ersten Röhrchen sehr stark, in den beiden folgenden gut, in den beiden letzten weniger gut.

An diesem Versuch ist das Verhalten von Diphtherie- und Xerosebazillen bemerkenswert. Der Gegensatz dieser beiden Stämme beruht möglicherweise auf einer verschiedenen Toleranz gegen den in dieser Lösung vermutlich sehr hohen osmotischen Druck, welche vielleicht mit der verschiedenen Gram-Beständigkeit dieser beiden Arten, die ja mit der Durchlässigkeit in Zusammenhang stehen soll, in Verbindung gebracht werden kann. Weitere Versuche, bei denen gewöhnliche Bouillon durch Salzzusatz auf hohen osmotischen Druck gebracht wurde, ergaben kein deutliches Resultat; Zuckersatz zu Verdünnungen dieser konzentrierten Verdauungsbrühe schien das Verhältnis umzukehren.

Im übrigen ist die Herstellung der konzentrierten Verdauungslösung nicht empfehlenswert. 170 g Fisch ergaben nur 80 ccm Lösung, bei welcher in der Verdünnung 0,5:5,5 das Wachstum bereits schwächer wurde. 1 kg Fisch hätte demnach nur 5,6 l Bouillon ergeben. Allerdings enthielt der Filtrerrückstand noch viel Nährstoffe.

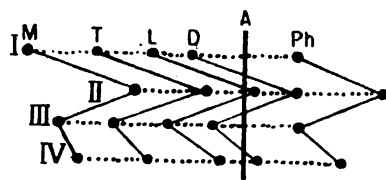


Fig. 4.

des Krieges die Beobachtung gemacht, daß Blutkuchen, roh und gekocht, sehr schlecht verdaut wurde.

7. Versuch.

Die Originalvorschrift von Hottinger schreibt vor, die Verdauung durch Ansäuern zu unterbrechen. Dieses Verfahren schien bedenklich, da Fleischwasser, das mit Säure versetzt wird, um feine Trübungen zur Ausscheidung zu bringen, einen großen Teil seines Nährwertes verliert; es sollte nachgeprüft werden, ob die mäßige Ansäuerung auch die Verdauungsbrühe schädigt. Bei Fleischwasser pflegt eine wesentliche Flockung erst in der Gegend des Umschlagspunktes von Methylrot einzutreten.

170 g Fischfleisch wurden mit 500 ccm Wasser 2 Tage verdaut: dann wurden zweimal je 100 ccm abgehoben, von welchen die ersten alkalisch blieben, während die zweiten mit konzentrierter Salzsäure bis zu deutlich lackmussaurem Reaktion versetzt wurden („1“ und „2“). Danach wurde der Bodensatz aufgewirbelt und zweimal je 150 ccm abgemessen. Auch von diesen Proben, die noch den unverdauten Rückstand enthielten, wurde die eine alkalisch belassen, die andere angesäuert („3“ und „4“). Alle vier wurden gekocht, filtriert und untersucht. In der folgenden Tabelle, die, soweit als möglich, auf den Ausgangspunkt bezogen ist, bedeutet + den Alkali-, — den Säurezusatz. T bedeutet den Umschlagspunkt von Azolithminlösung, die hier neben Duplittest- und Lackmuspapier verwendet wurde, in der Hoffnung, künftig die lästige Tüpfelprobe zu sparen (Fig. 4).

schiedenen Arten aufhört, ferner auch, ob etwa eine bestimmte Menge Nährlösung stets den gleichen Titer ergibt, unabhängig davon, mit wieviel Wasser sie verdünnt ist. Die folgende Tabelle bringt einmal die beobachteten Werte, dann die Zahlen, welche sich aus den beobachteten für 10 ccm unverdünnten Bouillon ergeben:

Bouillon + Kochsalzlösung			Ph—M		Ph—T	
ccm		ccm	beob.	berechnet f. 10 ccm	beob.	berechnet f. 10 ccm
10	+	0	4,3	4,3	2,4	2,4
8	+	2	(4,3	5,4)	2,1	2,6
6	+	4	2,8	4,7	1,8	2,8
4	+	6	2,0	5,0	1,3	3,3
2	+	8	1,1	5,5	0,7	3,5

Die Wachstumsgrenze für Streptokokken liegt etwa bei Ph—M = 2,8, für Diphtheriebazillen bei 2,0. Da indessen der Titer mit der Verdünnung sich ändert, und zwar im Sinne eines Anstiegs bei beiden Indikatoren mit fortschreitender Verdünnung (abgesehen von dem eingeklammerten, wohl durch einen Fehler entstellten Wert), ist es nicht möglich, aus dem Titer der Stammlösung die zulässige Verdünnung durch Rechnung zu finden.

8. Versuch.

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Wassermenge, mit welcher das Fleisch verdaut wird, von Einfluß auf die Ausbeute ist. Hottinger schreibt vor, das Fleisch mit $1\frac{1}{2}$ -facher Menge Wasser der Verdauung zu unterwerfen; in Versuch 6 dieser Arbeit war das Gesamtvolumen wesentlich verkleinert, die Ausbeute dadurch aber verschlechtert worden; dies kann auf die hemmende Wirkung der sich stark anhäufenden Verdauungsprodukte bezogen werden. Vergrößert man andererseits das Volumen, so verdünnt man das Ferment und ist außerdem genötigt, mit großen Verdauungsgefäßen zu arbeiten, was lästig ist. Es schien wünschenswert, die Lage des Optimums zu bestimmen.

Je 137 g gekochtes und gemahlens Fischfleisch wurden mit der 5-fachen Menge Wasser (685 ccm), mit der 3-fachen (411 ccm) und der 1-fachen (137 ccm) versetzt, alkalisiert und mit Pankreatium activum Merck der Verdauung unterworfen. Die Verdauung verlief langsam, obwohl das Pankreatin bei einer quantitativen Prüfung sich als wirksam erwies; nach 3-tägiger Verdauung bei 37° war die Tryptophanreaktion noch negativ und der Phenolphthalein- und Methylrottiter niedrig. Die Verdauung wurde nach erneutem Zusatz von Alkali und Trypsin noch 3 Tage bei hoher Zimmertemperatur fortgesetzt, nach welcher Frist die Tryptophanreaktion schwach positiv wurde. Hierauf wurden die 3 Proben schwach angesäuert, mit dem Rückstand aufgeköcht und filtriert. Die Filtrerrückstände wurden mit je 150 ccm Wasser angerührt und abermals filtriert:

	I	II	III
	5-faches Volumen	3-faches Volumen	1-faches Volumen
Vol. d. ersten Filtrats	580 ccm	300 ccm	75 ccm
Vol. d. zweiten Filtrats	60 „	150 „	130 „

Die Filtration war also ungleichmäßig, möglicherweise bestanden Verschiedenheiten der Teilchengröße in den Filtrerrückständen und dadurch bedingte Verschiedenheiten der Wasserkapazität. Die Untersuchung der Filtrate ergab (Fig. 5 u. 6:

	Spez. Gew.	A—T	A—L	A—D	A—Ph	A—M	Ph—M
I ₁	1,102	—1,3	—1,0	(—0,6)	1,0	—2,2	3,2
I ₂	1,053	—0,7	—0,6	—0,1	0,7	—1,3	2,0
II ₁	1,202	—2,2	—1,2	—0,1	2,8	—2,9	5,7
II ₂	1,084	—0,6	—0,4	+0,3	1,2	—1,4	2,6
III ₁	1,393	—2,4	—1,5	—0,1	4,9	—3,4	8,3
III ₂	1,176	—1,5	—0,5	+0,5	2,5	—2,1	4,6

Naturgemäß ist Titer und spez. Gewicht um so größer, je kleiner das Volumen der Verdauungsmischung war. Strenge Proportionen bestehen nicht. Beispielsweise verhalten sich die ersten Filtrate der 3 Proben statt wie 5:3:1 in Wirklichkeit wie 5:2,6:0,65 und die zugehörigen Phenolphthalein- und Methylrottitler umgekehrt wie 5:3,45:1,9. Verdünnte Lösungen haben also einen relativ zu großen Titer, eine Erscheinung, die bereits im 7. Versuch beobachtet ist, und hier somit nicht als vermehrte Ausbeute gedeutet werden kann. Die zweiten Filtrate enthalten, wie schon von Hottinger angegeben, noch viel Nährstoffe, und zwar enthält z. B. die Probe III₂ mehr davon als Probe I₁.

Um zu sehen, wo die Gesamtausbeute maximal war, wurden Mischungen der ersten und zweiten Filtrate hergestellt, und zwar jeweils vom Gesamtvolumen 100 ccm. Probe I hätte 640 ccm der Mischung ergeben, es wurden daher 90,8 ccm von 1 und 9,2 ccm von 2 gemischt. Probe II hätte, um gleichfalls 640 ccm zu ergeben, noch einen Zusatz

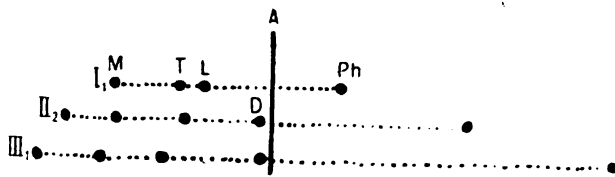


Fig. 5.



Fig. 6.

von 190 ccm Wasser erfordert, es wurden deshalb, um das Verhältnis zu wahren, das bei der Mischung der beiden Filtrate von II entstanden wäre, 46,8 ccm von 1, 24,6 ccm von 2 und 28,6 ccm Wasser gemischt. Die Mischung III bestand entsprechend aus 11,6 ccm von 1, 20,6 ccm von 2 und 67,8 ccm Wasser. Die Untersuchung dieser Mischungen ergab:

	Spez. Gew.	A—Ph	A—T	Ph—M
Mischung I	1,100	0,9	—1,1	3,1
„ II	1,110	1,3	—1,0	3,1
„ III	1,027	1,0	—0,3	2,0

I und II sind einander fast gleich, III ist wesentlich weniger konzentriert. In Wirklichkeit hätte sich das Resultat wohl noch etwas verändern lassen; eine zweite Auswaschung von III hätte wohl noch Nährstoffe ergeben, und wenn das zweite Filtrat von I reichlicher filtriert hätte, wäre durch den größeren Anteil des gehaltarmen Spülwassers der Gehalt auch der Mischung noch tiefer gesunken. Praktisch dürfte somit das Optimum bei II liegen.

Von diesen Mischungen wurden Verdünnungen austitriert, und zwar in der Weise, daß fallende Mengen der Mischung mit Wasser zu 10 ccm aufgefüllt und titriert wurden. Die eine Spalte der Tabelle gibt den beobachteten Wert an, die andere denjenigen, welcher sich für 10 ccm der konzentrierten Mischung berechnet:

				A—Ph		Ph—M	
				beobachtet	berechnet	beobachtet	berechnet
	10 ccm Mischung	+ 0	ccm Wasser	0,9	0,9	3,1	3,1
	8 " "	+ 2	" "	0,8	1,0	2,5	3,2
	6 " "	+ 4	" "	0,7	1,2	2,0	3,4
	4 " "	+ 6	" "	0,5	1,3	1,5	3,8
	2 " "	+ 8	" "	0,3	1,5	0,9	4,5
	1 " "	+ 9	" "	0,2	2,0	0,8	8,0
II	10 " "	+ 0	" "	1,3	1,3	3,1	3,1
	8 " "	+ 2	" "	1,2	1,5	2,6	3,2
	6 " "	+ 4	" "	1,0	1,7	2,0	3,3
	4 " "	+ 6	" "	0,7	1,8	1,5	3,7
	2 " "	+ 8	" "	0,4	2,0	0,8	4,0
	1 " "	+ 9	" "	0,25	2,5	0,45	4,5
III	10 " "	+ 0	" "	1,0	1,0	2,0	2,0
	8 " "	+ 2	" "	0,9	1,1	1,75	2,2
	6 " "	+ 4	" "	0,7	1,2	1,4	2,3
	4 " "	+ 6	" "	0,55	1,4	1,1	2,7
	2 " "	+ 8	" "	0,35	1,8	0,6	3,0
	1 " "	+ 9	" "	0,15	1,5	0,35	3,5

In allen Proben beobachtet man ein Ansteigen des auf 10 ccm umgerechneten Wertes, d. h. die Pufferung wird in der Verdünnung wirksamer. Der Anstieg ist nicht immer regelmäßig; das beruht wohl auf kleinen Fehlern in der Titration, die in der Berechnung vergrößert erscheinen.

Die Mischungen wurden dann mit den Salzen versehen und zu je $\frac{3}{4}$ des Abstandes T—Ph neutralisiert; es wurden dann die gleichen Verdünnungen wie oben angesetzt, ferner noch eine weitere Probe 0,5 + 9,5. Das Wachstum von *Strept. longissimus* hörte in Probe I bei der Verdünnung 4 + 6 auf, die nur eine Spur Wachstum zeigte; die gleichen Verdünnungen von II und III waren unbewachsen, die vorhergehende in II mäßig, in III spurenweise bewachsen; im allgemeinen war das Wachstum in I besser als in II, dieses wieder besser als in III. Diphtheriebazillen wuchsen nicht mehr in der Verdünnung 2 + 8 der Probe III, 1 + 10 der Proben I und II; die vorhergehenden Röhren waren gut bewachsen, III im allgemeinen schwächer als I und II, von diesen zuweilen II stärker als I. Typhusbazillen wuchsen in der Verdünnung 1 + 10 der 3 Proben nur noch schwach, auch in den nächstvorigen Röhren mäßig; im übrigen gut; zumeist war I stärker als II, dieses stärker als III bewachsen.

Die Grenzen des guten Wachstums liegen für *Strept. longissimus* ungefähr bei der Verdünnung 6 + 4 bis 8 + 2, für Diphtheriebazillen bei 4 + 6, für Typhusbazillen bei 2 + 8 bis 4 + 6; die Unterschiede zwischen I, II und III sind geringfügig. Die Titer der entsprechenden Proben, allerdings vor dem Salzzusatz, sind erheblich niedriger als die analogen Werte in Versuch 7; der Vergleich ist aber nicht ganz zulässig, da Phosphat und Karbonat Puffereigenschaften hat. — Aus dem Ansatz der Verdauung und den Verdünnungen ergibt sich, daß aus 1 kg Fischfleisch bei den hier gewählten Bedingungen etwa 5,9 bis 7,8 Liter Nährlösung für Streptokokken, 11,6 Liter für Diphtherie- und 23,3 Liter für Typhusbazillen hergestellt werden konnten. Diese Zahlen sind größer als die entsprechenden in Versuch 7, was wohl auf die hier vorgenommene Auswaschung des Verdauungsrückstandes beruht.

Weiterhin wurden die Originalfiltrate I₁ und II₁ mit den Salzen versehen und zu $\frac{3}{4}$ des Abstandes T—Ph neutralisiert. Von diesen

Proben wurden Verdünnungen angelegt und mit *Strept. longissimus* und Diphtheriebazillen beimpft; eine weitere Verdünnungsserie erhielt den Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker, um zu sehen, ob die Wachstumsgrenze durch Zuckerzusatz hinausgeschoben werden konnte; die Zuckerserie wurde außer Streptokokken und Diphtherie- auch mit Coli-Bazillen beimpft. Da ferner bei diesen Serien der Abstand A—Ph nicht konstant war, was die Beurteilung des Säuretitors, der ja mit Phenolphthalein festgestellt wurde, stören konnte, wurde eine weitere Zuckerserie zur Beimpfung mit Coli angelegt, in welcher die einzelnen Proben durch Zusatz von n/10 NaOH bis zum Phenolphthaleinpunkt neutralisiert waren. Von Probe I wurden die Verdünnungen auch titriert; es ergab sich:

	Ph—M		Ph—T	
	beobachtet	auf 10 ber.	beobachtet	auf 10 ber.
10 ccm + 0 ccm Wasser	3,6	3,6	1,9	1,9
8 " + 2 " "	3,0	3,7	1,9	2,4
6 " + 4 " "	2,3	3,8	1,5	2,5
4 " + 6 " "	1,4	4,0	1,1	2,7
2 " + 8 " "	1,0	5,0	0,6	3,0

Das Wachstum von *Strept. longissimus* reichte in allen Proben bis zum Röhrchen 3; in den zuckerhaltigen Proben war es wesentlich stärker. Bei Diphtheriebazillen waren die 3 ersten Röhrchen sehr stark, das vierte gut, das fünfte mäßig bewachsen; in den Zuckernährböden hatten sich Flöckchen gebildet und die Bazillen sich vielfach an die Wand angelegt, was die Beurteilung erschwerte; indessen war der begünstigende Einfluß des Zuckers auch hier sichtbar. Allgemein war das Wachstum in II stärker als in I. Eine Verschiebung der Wachstumsgrenzen war somit weder durch den verschiedenen Gehalt von I und II, noch durch den Zuckerzusatz erfolgt. Das Wachstum reichte somit bei *Streptococcus longissimus* bis zum Indikatorenabstand 2,3, bei Diphtheriebazillen bis etwa 2,3—1,4, Zahlen, die etwas niedriger sind als die von Versuch 7; indessen ist es kaum möglich, die Wachstumsgrenze konstant zu fixieren.

Die mit *Bact. coli* beimpften Serien unterschieden sich dadurch untereinander, daß die Alkalisierung bis zur Phenolphthaleinrötung mit n/10 Lauge eine Volumensvermehrung zur Folge hatte; infolgedessen betrug das Volumen:

Röhrchen	1	2	3	4	5
I	11,2	11,0	11,6	10,4	10,2
II	12,8	12,4	12,0	11,2	10,6

Die folgende Tabelle bringt die Säuretiter nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°, und zwar die Titer der zu $\frac{3}{4}$ alkalisierten Bouillon (a), die der phenolphthalein-alkalischen (b), dieser Titer umgerechnet auf 10 ccm der Verdünnung (c).

	I			II		
	a	b	c	a	b	c
1	6,4	5,4	4,8	7,8	8,6	6,7
2	4,4	4,4	4,0	6,6	7,6	6,1
3	3,6	3,6	3,4	5,2	5,0	4,2
4	2,8	2,8	2,7	3,6	4,0	3,6
5	1,8	1,8	1,8	2,4	2,4	2,3

Hier sind allgemein die Titer von II höher als die von I, was zu erwarten war. Alle Serien zeigen weiterhin den Abfall des Titors mit der Verdünnung. Die Säurebildung geht dem Abstand P—M und Ph—T

ungefähr parallel, bis auf eine kleine Abnahme des Abstandes der beiden Kurven mit zunehmender Verdünnung.

Diese Versuche hatten gezeigt, daß die Verdauungstechnik nach Hottinger billige Nährmittel ergibt, auf denen auch anspruchsvolle Mikroorganismenarten gut gedeihen. Außer in den hier angeführten Versuchen wurden die Hottingerschen Nährmittel noch dadurch geprüft, daß die übrigbleibenden Reste zu Kurszwecken verwendet wurden, wobei zahlreiche pathogene und nichtpathogene Stämme kultiviert wurden. Das Wachstum war in allen Fällen gut, zumeist sogar rascher als auf den üblichen Witte-Peptonnährböden; Eigenbewegung, Sporenbildung und Farbstoffbildung waren überall gut, bis auf einen Stamm von *Prodigiosus*, der bei Züchtung auf Agar mit Pepton König sein Farbstoffbildungsvermögen plötzlich verlor und auch auf Hottinger-Nährböden nicht wieder gewann.

Bei der Herstellung von Agar trat anfangs die lästige Erscheinung auf, daß der filtrierte Agar beim abermaligen Kochen sich flockig trübte. Als späterhin die Stammlösung vor der Filtration angesäuert und gekocht wurde, kam dies nicht zur Beobachtung.

Auf der mit Hottinger-Nährböden hergestellten Gelatine war das Wachstum gleichfalls gut, die Verflüssigung normal. Dagegen wuchsen Typhus-, Paratyphus A- und B-, Ruhr- und Coli-Bazillen ohne die gewohnte charakteristische Kolonienform. Deshalb wurde von diesen Nährlösungen Gelatine nicht mehr hergestellt. Uebrigens ergab Witte-Peptongelatine, mit Trypsinnährlösungen versetzt, typische und sehr große Kolonien.

Abgesehen von dieser einen Schattenseite, bewährte sich das Hottingersche Verfahren durchaus und verdient zweifellos eine weitere Verbreitung, als es zurzeit besitzt. Nachdem die ältere physiologische Literatur die durch Trypsinwirkung entstehenden Körper gelegentlich als „Tryptone“ bezeichnet (z. B. Landois, Lehrbuch der Physiol. 8. Aufl. S. 316 oben), erscheint es zweckmäßig, die nach Hottinger durch Trypsinverdauung hergestellten Nährlösungen abkürzend als „Tryptonbouillon“, im Gegensatz zur Peptonbouillon, zu bezeichnen.

Hinsichtlich der Rentabilität ergibt sich folgende Rechnung: Die Preise pro Pfund beliefen sich in Erlangen zur Zeit der Ausführung dieser Versuche bei Pferdefleisch auf 2,40 M., Rindfleisch (von Seuchentieren) 5,50 M., Schellfisch und Kabeljau mit Kopf 2,80 M.—3,50 M.; von diesen war Seefisch stets ein- oder zweimal in der Woche, Fleisch nur unregelmäßig und in längeren Pausen erhältlich. Bei Fischen beträgt der nicht verwendbare Anteil rund 50 Proz., wogegen man das Fleisch für Nährbodenzwecke meist ohne Knochen, Sehnen und Fett verlangt, allerdings nicht immer so erhält. Die Verdaulichkeit des Fischfleisches ist um einen ziemlich belanglosen Teil kleiner als von Warmblüterfleisch (König, Mensch. Nahrungs- und Genußmittel. II. S. 219). Nach den Verdünnungsversuchen Nr. 5, 7 und 8 konnte aus 1 kg Fischfleisch mindestens 5 Liter, bei Auswaschung des Rückstandes 7 l Nährlösung gewonnen werden, in der auch anspruchsvolle Arten vorzüglich wuchsen; das Volumen steigerte sich für Diphtheriebazillen auf 7—12 l, für Typhusbazillen auf 15—23 l. Das hierzu nötige Fischfleisch kostete durchschnittlich, unter Berücksichtigung des Schlachtabganges, etwa 12,6 M., somit durchschnittlich das Liter Bouillon für Streptokokken 2,5 bis 1,8 M., für Diphtheriebazillen 1,8 bis 1,0 M., für Typhusbazillen 0,85 bis 0,55 M. Bei Pferdefleisch betragen die Preise entsprechend

1,0 bis 0,7 M., 0,7 bis 0,4 M., 0,31 bis 0,21 M., bei Seuchenfleisch 2,20 bis 1,60 M., 1,60 bis 0,90 M., 0,90 bis 0,50 M., allerdings unter der Annahme, daß keine Verluste durch Sehnen, Knochen und Fett entstehen. Im Vergleich dazu kostet das Liter Fleischwasser (auf 1 Teil Fleisch 2 Teile Wasser), bei Fisch 6,30 M., bei Seuchenfleisch 5,50 M., bei Pferdefleisch 2,4 M. Da das Gramm Witte-Pepton zurzeit 0,70 M. kostet, steigt der Preis von 1 Liter Fleischwasserpeptonbouillon auf 13,30 bzw. 12,50 bzw. 9,40 M.

Preise von 1 Liter Bouillon (M.).

		Streptokokken	Diphtherie	Typhus	
Tryptonbouillon	Fisch	2,5—1,8	1,8—1,0	0,85—0,55	
	Seuchenfleisch	2,2—1,6	1,6—0,9	0,90—0,50	
	Pferdefleisch	1,0—0,7	0,7—0,4	0,32—0,21	
Fleischwasser	Fisch	6,3	Peptonbouillon	Fisch	13,3
	Seuchenfleisch	5,5	"	Seuchenfleisch	12,5
	Pferdefleisch	2,4	"	Pferdefleisch	9,4

Verwendet man Tryptonbouillon, so wird es von der Finanzlage des Instituts und von den zu kultivierenden Bakterienarten abhängen, wie konzentriert man die Lösung nehmen will; eine Untersuchungsanstalt, bei der Typhusuntersuchungen überwiegen, wird aus dem Kilogramm Pferdefleisch durchschnittlich 20 l Drigalski-Agar herstellen können und daneben für besondere Zwecke eine kleinere Menge höher konzentrierter Nährmittel bereit halten; für Kurszwecke wird die Verarbeitung zu 10 l stets genügen und nur für wissenschaftliche Arbeiten, etwa mit Streptokokken, empfehlen sich konzentriertere Nährböden. Wenn ich demnach die großen Verdünnungen, die Hottinger angibt, nicht ohne weiteres empfehlen möchte, so ergibt sich gleichwohl noch eine durchschnittliche Verminderung des Preises auf etwa ein Zehntel. Fischfleisch, das infolge des hohen Schlachtabganges den teuersten Nährboden ergibt, hat den Vorzug, häufiger erhältlich zu sein als anderes Fleisch, und eine farblose Nährlösung zu ergeben; in vielen Städten mag es außerdem billiger sein. Da seine Verwendung zu Nährboden Zwecken immerhin empfehlenswert ist, soll seine chemische Analyse im Vergleich zu „billigem Rindfleisch“ nach König, Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, aus den Tabellen Bd. I. S. 52 und 60 zusammengestellt werden:

	Wasser- gehalt	N-Sub- stanz	Leim	Extrakt- stoffe	100° Extrakt	Fett	Asche	Phosphor- säure
billig. Rindfleisch	69,22	20,2	2,38	4,65	2,44	9,5	1,04	0,31
Schellfiach	81,5	16,93	2,94	2,5	1,11	0,26	1,31	1,29
Kabeljau	81,85	16,72	—	—	—	0,30	1,28	1,40

Ob und wieviel Zucker das Fischfleisch enthält, scheint nicht bestimmt zu sein. Die große Wirksamkeit auch geringer Zuckermengen (vgl. Versuch 5) läßt daran denken, ob nicht vielleicht die verschiedene Nährkraft der Fleischwässer teilweise durch den verschiedenen Zuckergehalt bedingt ist. Den Wert der übrigen Bestandteile des Fleischwassers schätzt Hottinger gering ein und hält von allen im Kochen löslichen Extraktivstoffen eigentlich nur die Phosphorsäure für wesentlich, eine Auffassung, gegen die einzuwenden ist, daß Fleischwasser beim Ansäuern und Kochen an Nährwert verliert, ohne daß die Phosphorsäure durch diese Vornahme verändert werden kann. Immerhin mag bemerkt werden, daß auch ausgekochtes Fleisch noch gute Tryptonlösungen ergibt. So wuchsen in Versuch 3 Streptokokken und Diph-

theriebazillen in den Tryptonlösungen erheblich besser als in Peptonwasser. Man kann demnach aus Fleisch einmal Fleischwasserpeptonnährböden und dann noch Tryptonnährböden herstellen.

Bei den Versuchen 1—6 wurde ein (10) Jahre altes Pankreatin Rhenania verwendet, das, ohne besondere Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt, sich noch gut wirksam zeigte. In Versuch 7 und 8 kam Pancreatinum activum Merck zur Verwendung, das langsamer, aber auch genügend wirkte. Will man das Ferment selbst herstellen, so ist es wohl nicht zweckmäßig, das Pankreas mit Glyzerin zu extrahieren, da das Glyzerin in den Nährboden mitübergeht und als gärfähiges Kohlehydrat nicht unbedingt erwünscht ist. Besser ist es, die Drüse zu zerkleinern und mit oder ohne Zusatz von Wasser und schwachem Alkali über Chloroform in verschlossenem Gefäß der Autolyse zu überlassen; nach einigen Tagen oder Wochen entsteht unter reichlicher Bildung von Tyrosinkristallen ein dunkelgelber, fermentreicher Saft. Zur Prüfung der tryptischen Kraft kann man die Mettsche Kapillarmethode verwenden, falls man frisches Eiweiß zur Verfügung hat; Versuche, dieses durch Albumen ovi siccum oder Serum zu ersetzen, gelangen mir nicht. Ich prüfte die Wirksamkeit der Fermente schließlich in der üblichen Weise auf Loeffler-Platten, indem je 1 Tropfen von mehr oder weniger verdünnten Ausschwemmungen der Pankreatinpräparate bzw. der Autolysatverdünnungen mit einer Spur Thymol auf die Platte gebracht wurde. Pankreatin Rhenania bewirkte, im Verhältnis 1:100 in Kochsalzlösung suspendiert, in 18 Std. bei Zimmertemperatur eine bis auf das Glas reichende, mit klarer Flüssigkeit gefüllte, von einem aufgehellten Hof umgebene Delle. In der Aufschwemmung 1:1000 war die Delle kleiner und nur durchscheinend, bei 1:10000 zeigte sich nur eine Andeutung von Verdauung. Pancreatinum activum Merck zeigte auf der gleichen Platte in der Konzentration 1:100 etwa die gleiche Wirksamkeit wie Pankreatin Rhenania in der Konzentration 1:1000. Zwei Pankreasautolysate, von denen der eine 3 Wochen, der andere 5 Monate alt war, zeigten in der Verdünnung 1:10 ungefähr gleiche Verdauungskraft wie Pankreatin Rhenania 1:1000. Ein 5 Monate und 1 Woche alter Glyzerinauszug von Pankreas, der einige Zeit nach dem Ansatz wegen Schwefelwasserstoffentwicklung fäulnisverdächtig gewesen war und deshalb nachträglich mit Chloroform versetzt worden war, zeigte sich konzentriert weniger wirksam. Die Originalvorschrift von Hottinger verwendet das Pankreatin ungefähr in der Verdünnung 1:1000.

Zusammenfassung.

Die Hottingersche Technik der Fleischverdauung mit Pankreatin ergibt gute Nährböden, auf denen auch anspruchsvolle Mikroorganismenarten üppig und rasch wachsen; die Nährböden kosten ungefähr den zehnten Teil der Fleischwasserpeptonnährböden. Es wird vorgeschlagen, diese Nährböden als „Tryptonnährböden“, im Gegensatz zu den Peptonnährböden zu bezeichnen.

In Ermangelung von Fleisch kann Seefisch zur Herstellung dieser Nährböden verwendet werden; die Verdauungsbrühe ist dann fast farblos und besonders geeignet zu Untersuchungen mit Indikatoren.

Das optimale Wachstum der Bakterien scheint nicht an eine bestimmte Abbaustufe gebunden zu sein. Auf Tryptongelatine wuchsen

die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe mit uncharakteristischen Kolonien. Im übrigen ist das Wachstum rasch und kräftig, die Verflüssigung normal.

Zur Beobachtung der fortschreitenden Verdauung kann neben der Messung des spez. Gewichtes die Phenolphthalein-Methylrottötitration angewendet werden. Letztere besteht in der Bestimmung derjenigen Menge $n/10$ -Säure, welche hinreicht, um 10 ccm der Tryptonlösung vom Umschlagspunkt des Phenolphthaleins zu dem des Methylrots zu bringen: je mehr Verdauungsprodukte die Lösung enthält, um so mehr Säure ist erforderlich.

Da verschieden konzentrierte Tryptonlösungen verschieden starke Pufferungseffekte ergeben, muß die wechselnde Verschieblichkeit der Wasserstoffzahl berücksichtigt werden. Für Untersuchungen, die bei genau gleicher Ausgangsreaktion angestellt werden sollen, ist es nicht zulässig, bis zu einem bestimmten Bruchteil der Phenolphthaleinneutralität zu alkalisieren, da der Ausgangspunkt nicht definiert ist. Ebenso ist es nicht korrekt, eine bestimmte Menge Alkali über den Lackmusneutralpunkt hinaus zuzusetzen, da die aktuelle Reaktion, welche von dieser Alkalimenge erzeugt wird, von der Pufferung abhängt. Die Alkalisierung auf einen bestimmten Punkt des Abstandes zwischen Lackmus- und Phenolphthaleinpunkt dagegen muß auch bei wechselndem Gehalt an Puffersubstanzen eine annähernd konstante Ausgangsreaktion ergeben.

Die Säuremenge, welche in zuckerhaltigen Tryptonlösungen gebildet wird, hängt gleichfalls von dem Gehalt an Puffersubstanzen ab, da bei der Säurebildung die Wasserstoffzahl bis zu einem annähernd konstanten Wert ansteigt, zu dessen Erreichung eine je nach der Pufferung verschiedene Säuremenge erforderlich ist: Man kann deshalb die Menge der gebildeten Säure als Maßstab für den Gehalt der Lösung an Nähr- und Puffersubstanzen verwenden, was eine biologische Kontrolle der Phenolphthalein-Methylrottötitration ergibt. Andererseits ist für vergleichende Untersuchungen der Säurebildung erforderlich, daß die dazu verwendeten Tryptonlösungen gleiche Pufferung aufweisen, was sich mit Hilfe der Phenolphthalein-Methylrottötitration einstellen läßt; strenge Proportionalität zwischen Pufferung und Verdünnung besteht nicht.

Aus der Pufferung läßt sich diejenige Zuckermenge berechnen, deren Vergärung eine Säuremenge erzeugt, welche, bei einer zwischen Lackmus- und Phenolphthaleinneutralität liegenden Ausgangsalkaleszenz, noch keine lackmussaure Reaktion bewirkt. Diese Zuckermengen sind klein, begünstigen aber schon deutlich das Wachstum. Auf diese Weise kann der Nährwert des Zuckers ausgenutzt werden, ohne daß Schädigung durch saure Reaktion eintritt.

Sehr stark konzentrierte Tryptonbouillon und -Agar brachte nur Diphtheriebazillen zu sehr üppiger Entwicklung, während Schweinerotlaufbazillen gut, Staphylokokken leidlich und Xerosebakterien neben einigen anderen Stämmen (darunter Streptokokken) fast gar nicht wuchsen.

Nachdruck verboten.

Vergleichende Untersuchungen über neuere Spirochätenfärbungen.

[Aus der Abteilung Untersuchungsamt (Leiter: Prof. Dr. C. Prausnitz) des Hygienischen Institutes der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. med. **Erich Schneemann**,
Volontärassistent am Hygienischen Institut.

Von den gebräuchlichen Methoden der Darstellung von Mikroorganismen kommen für die feineren Spirochäten nur in Frage das Dunkel-feld-, das Tuscheverfahren und die Giemsa-Färbung. Das Dunkel-feldverfahren ist für den Praktiker verhältnismäßig kompliziert und liefert keine Dauerpräparate. Auch das Tuscheverfahren ist in der Anwendung gerade bei feineren Gebilden schwierig und bei nicht sehr sicherer Technik (gleichmäßige Ausstriche, Fixierung des Materials mit Osmiumsäuredämpfen, tadellose Tusche) nicht ganz zuverlässig. Die ursprüngliche Giemsa-Färbung liefert zwar äußerst feine Präparate, ist aber subtil und zeitraubend, und in den so hergestellten Präparaten sind die Spirochäten infolge ihrer zarten Färbung nicht immer leicht aufzufinden. Auch der Schnellfärbung nach Giemsa haftet wenigstens der letzte Uebelstand an.

So hat man sich seit längerer Zeit bemüht, Methoden aufzufinden, durch die auch feine Spirochäten schnell und sicher in leuchtenden Farben dargestellt werden können. Die Grundlage aller dieser neueren Methoden ist die Vorbehandlung der fixierten Präparate mit einer Beize und ihre nachherige Färbung mit intensiven Farblösungen, ohne daß durch diese, naturgemäß etwas gröber arbeitenden Färbungen die wesentlichen Charakteristika der Spirochäten verwischt werden sollen. Eine Reihe solcher Verfahren ist bereits veröffentlicht worden. Ich habe auf Anregung von Herrn Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Pfeiffer, dem ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte, ihre kritische Nachprüfung übernommen, wobei mich Herr Prof. Prausnitz in überaus lebenswürdiger Weise unterstützt und beraten hat.

Hauptgegenstand der Untersuchungen waren die Verfahren von Shmamine, Fontana, Hollande und Becker.

Bei der Shmamineschen Färbung wird der über der Flamme oder mit Methylalkohol fixierte Ausstrich mit 3—4 Tropfen 1-proz. Kalilauge-lösung und sofort hinterher etwa 10 Tropfen wässriger Fuchsin-lösung oder konzentrierter wässriger Kristallviolettlösung beschickt. Man läßt die Farblösung 3 Min. einwirken; in dieser Zeit trübt und entfärbt sich die Lösung, dann wird kurz in Wasser gespült und getrocknet.

Mit diesem Verfahren erhielt ich meistens keine guten Resultate, da der Ausstrich eine starke Färbung des Untergrundes und nur spärliche Spirochäten aufwies.

Weit besser haben sich die anderen drei Methoden bewährt, denen allen eine Beizung mit Tannin zugrunde liegt. Fontana behandelte

die Ausstriche zunächst mit der Hugesehen Lösung (Essigsäure und Formalin), wodurch gleichzeitig mit der Fixierung des Präparates eine Auslaugung der roten Blutkörperchen und eines Teiles des Serum-eiweißes erfolgt. Hierdurch wird die Bildung störender Niederschläge verhindert. Dann folgt die Tanninbeizung und zum Schluß die Versilberung des Präparates. Die Vorschrift lautet:

1) Das Material, z. B. syphilitisches Reizserum, ist dünn auszustreichen und an der Luft zu trocknen.

2) Das an der Luft getrocknete, nicht in der Flamme fixierte Präparat wird mit einigen Tropfen Hugeseher Lösung (A):

Essigsäure	1 ccm
Formalin	20 „
Aq. dest.	100 „

übergossen. Diese Lösung ist innerhalb 1 Min. mehrere Male auf dem Präparat zu erneuern.

3) Abspülen während einiger Sekunden unter fließendem Wasser mit nachfolgender Beizung mit Lösung (B):

Karbonsäure	1 ccm
Acid. tannic.	5 g
Aqua dest.	100 ccm

Leichte Erwärmung während etwa 20 Sek. bis zur Entwicklung schwacher Dämpfe. Abspülen unter fließendem Wasser 30 Sek.

4) Uebergießen des nicht getrockneten Präparates mit einigen Tropfen Silberlösung (C):

Silbernitrat	0,25 g
Aqua dest.	100 ccm

dazu konz. Ammoniaklösung in kleinsten Tropfen, bis die Flüssigkeit leicht opaleszent wird.

Schwaches Erwärmen während 20–30 Sek. Abspülen 30 Sek. und Trocknen mit Fließpapier. Kochen ist zu vermeiden. Zur jedesmaligen Frischbereitung der Silberlösung ist erforderlich: Auflösung eines Arg. nitr.-Kristalles in etwa 3 ccm Aqua dest. Zusetzen von Ammoniak mit einer Kapillare bis zur Opaleszenz.

Ich habe mich zunächst streng an die Originalvorschrift gehalten und dabei nachstehende Beobachtungen gemacht:

Zunächst glückte es nicht, die Spirochäten so intensiv schwarz darzustellen, wie sie Fontana und einige andere Autoren gesehen haben. Vielmehr hoben sie sich nur durch eine dunklere Färbung von der an sich hellbraunen Umgebung ab. Auch die Intensität der Färbung war starken Schwankungen unterworfen, so daß ihre Auffindung nicht immer leicht war. Daher konnte ich die Anerkennung, die dieser Methode von einigen Autoren, wie Hage, Oelze, Johan gezollt wird, nicht ohne Einschränkung teilen. Beim Versuch, etwaige Fehlerquellen auszuschneiden, wurden zunächst die Schädigungen, die durch zu starkes Erwärmen der Präparate bedingt werden, dadurch behoben, daß die Färbung der Präparate auf einer etwa 40 cm langen, horizontalen, durch einen Bunsen-Brenner an einem Ende erhitzten Metallplatte geschah. Die Objektträger wurden an die Stelle der Platte gebracht, wo die Platte eine Temperatur von 50–55° hatte. Die Temperatur wurde durch das Schmelzen auf die Platte gelegter Paraffinbröckchen festgestellt. Dadurch wurde eine ganz gleichmäßige Erwärmung der Lösungen erreicht; nunmehr kamen störende Niederschläge kaum noch vor; niemals jedoch gelang eine kräftigere Färbung der Spirochätenleiber. Sodann wurde die Tanninbeize von 5 auf 10 Proz. verstärkt, dabei jedoch kein nennenswerter Unterschied gegen früher festgestellt. Stärkere Konzen-

trationen der Tannin- oder Silberlösungen und die Anwendung des in der photographischen Technik üblichen Sublimatverstärkungsverfahrens waren ebenfalls ergebnislos. Wie schon Oelze angab, fand sich der Schlüssel des Erfolges in der Art des Ammoniakzusatzes. Gute Resultate erhielt ich nämlich mit folgender Modifikation: Der fixierte und gebeizte Ausstrich wurde mit einer 0,25-proz. Silbernitratlösung übergossen; aus einer feinsten Kapillare wurde hierzu sofort ein Tropfen Ammoniaklösung hinzugefügt. Dann wurde das Präparat vorsichtig geschaukelt: die Lösung nahm einen leicht bräunlichen Schimmer an, und in diesem Augenblicke wurde mit der Erwärmung des Präparates begonnen. Nunmehr erschienen die Spirochäten tiefschwarz auf hellbraun gefärbtem Grunde. Für die Darstellung der Spirochäte der Recurrens und der Weilschen Krankheit gibt die vorstehende Modifikation bei Anwendung einer 10-proz. Tanninlösung als Beize noch bessere Resultate.

Die Spirochäten behielten bei diesem Verfahren im großen und ganzen die charakteristischen Formen bei. Zahl und Länge der einzelnen Spiralen wiesen keine Unterschiede auf gegenüber dem Dunkelfeldbilde und Giemsa-Präparaten. Nur erschienen die Spirochäten natürlich in den gebeizten Präparaten infolge der physikalischen Auflagerung kleinster Silberteile dicker, als es im lebenden Zustande und nach der Giemsa-Färbung der Fall war. Da aber alle Spirochäten in gleicher Weise diese Silberauflagerung erfahren, so behalten sie die ihnen eigentümlichen differentialdiagnostischen Merkmale, und ihre Unterscheidung darf dem Untersucher, der an diese Erscheinung denkt, keine Schwierigkeiten bereiten.

Es muß noch erwähnt werden, daß zur Herstellung von Dauerpräparaten die Einbettung in neutralem Kanadabalsam nötig ist, da Zedernöl schon nach etwa 10—14 Tagen eine starke Abblassung der Präparate bewirkt.

Hollande hat die Fontanasche Methode, wie folgt, abgeändert:

1) Fixierung des Ausstriches mit Methylalkohol 2 Min. oder absolutem Alkohol 10—15 Min.

2) Beizung mit:

Tannin	5,0	Alkohol (96 Proz.)	50,0
Acet. glac.	5,0	Aqua dest.	50,0

1 Min. über der Flamme vorsichtig erwärmen, dann mit frischer Beize wiederholen.

3) Abspülen mit Leitungswasser, dann mit Aqua dest.

4) Versilberung mit einer Lösung:

100 ccm 5-proz. wässriger Arg. nitr.-Lösung + 2 ccm Pyridin;

Einige Stunden nach Herstellung wird diese Mischung vom Niederschlag dekantiert. Das Präparat wird dann damit 2mal je 1 Min. bis zur Dampfbildung erhitzt.

In dieser Modifikation ist weder eine Vereinfachung noch eine Verbesserung der Fontanaschen Vorschrift zu sehen. Gerade der Vorteil der von Fontana eingeführten Hugesehen Lösung geht bei dem Holländischen Verfahren verloren. Insofern stellt dieses Verfahren einen Rückschritt in der Technik der Spirochätenfärbung dar. Ich beobachtete oft, daß sich bei der Holländischen Methode die Präparate nach Hinzufügung der Beize selbst bei vorsichtigem Erwärmen sofort mit einer undurchsichtigen, grauweißen Schicht überzogen und somit zur Weiterfärbung unbrauchbar wurden. Diese Niederschläge sind jeden-

falls bedingt durch die dem Präparat anhaftenden Serumreste, welche bei dem ursprünglichen Fontanaschen Verfahren durch die Essigsäure der Hugesehen Lösung zum großen Teil ausgelaugt werden.

Die Benutzung der 5-proz. Silberlösung ist schon deshalb unzweckmäßig, weil der Gesamtaustrich zu rasch eine intensive Braunfärbung annimmt, so daß sich die nur etwas dunkler gezeichneten Spirochäten unscharf von der Umgebung abheben. Die Holländische Färbung erfordert ferner längere Zeit und ist kostspieliger als die Fontanasche, ohne ihr in den Ergebnissen ebenbürtig zu sein.

Eine wesentliche Verbesserung stellt die von Becker angegebene Färbung dar, bei welcher die Fixierung und Beizung nach dem Fontanaschen Prinzip vorgenommen werden; darauf folgt aber nicht eine Versilberung, sondern eine Behandlung mit einem Anilinfarbstoff. Die Färbung geht, wie folgt, vor sich:

- 1) Reizserumpräparate dünn ausstreichen.
- 2) Betropfen mit Hugeseher Lösung (A):

Eisessig	1,0
Formalin	20,0
Wasser	100,0

1–2maliges Erneuern der Lösung während 1 Min., Abspülen.

3) Beizung mit 10-proz. Tanninlösung, der als Konservierungsmittel 1-proz. Karbolsäure zugesetzt wird (Lösung B). Erwärmen über der Flamme bis zum Aufsteigen leichter Dämpfe $\frac{1}{2}$ Min., Abspülen.

- 4) In der Wärme $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ Min. Nachfärben mit Ziehlschem Karbolfuchsin (C):
- | | |
|-----------------------------------|-------|
| 5-proz. Karbolsäure | 100,0 |
| gesättigte alkohol. Fuchsinlösung | 10,0 |

Abspülen, Trocknen mit Fließpapier, Untersuchen in Zedernöl.

Für die Anwendung gerade des Karbolfuchsin zur Färbung der Spirochäten sprechen die guten Erfahrungen, die verschiedene Autoren vor Becker gemacht haben. So empfehlen Ehrlich und Lenartowicz aus einer Reihe geprüfter Farblösungen besonders das Karbolfuchsin als dasjenige, mit dem sich die *Spirochaeta pallida* am leichtesten innerhalb $\frac{1}{2}$ –2 Min. färbt. Zettnow hat gleichfalls bei seinen Färbungen der Recurrensspirochäten das Fuchsin nach vorheriger Tanninbeizung erfolgreich angewandt, und auch Borrel und Burnet berichten über Spirochätenfärbungen mit Karbolfuchsin. Aehnlich haben schon Schaudinn und Paschen bei ihren Versuchen, die Endfäden der *Spirochaeta pallida* sichtbar zu machen, mit Anilinfuchsin gearbeitet.

Becker selbst hat sein Verfahren an verschiedenen Spirochätenarten geprüft und dabei bei der Plaut-Vincentschen Angina, der Recurrensspirochäte und an zahlreichen Ausstrichen von den verschiedensten luetischen Produkten der Primär- und Sekundärperiode gute Bilder bekommen. Die Spirochäten waren leuchtend rot gefärbt und stets deutlich sichtbar. Der Grund der Präparate war höchstens schwach rosa gefärbt, häufig sogar rein weiß. Etwa im Serum noch vorhandenes Hämoglobin war durch die Lösung A ausgezogen, das Stroma der roten Blutkörperchen war nur schwach rosa.

Bei meinen Versuchen, die ich hauptsächlich an den Spirochäten der Recurrens, Syphilis und der Weilschen Krankheit vornahm, fand ich die Angaben Beckers in vollem Maße bestätigt. Immer zeichneten sich die Spirochäten durch eine intensive Rotfärbung aus, die sie aus der matten Umgebung scharf hervortreten ließ. Besonders auffallend

war diese Erscheinung bei der infolge ihrer Feinheit sonst sehr schwer darstellbaren Spirochäte der Weilschen Krankheit, die sich nach Becker ebenso leicht und schnell färben ließ wie die anderen Spirochäten. Vergleichende Untersuchungen mit vorher gebeizten und ungebeizten Ausstrichen ergaben immer starke Unterschiede zugunsten der Ersteren, sowohl was die Intensität der Färbung wie die Darstellung der Einzelheiten der Struktur betrifft. Die Recurrensspirochäte, die ungebeizt einen gleichmäßig dicken, an den Enden sich verjüngenden Körper zeigt, wies in gebeiztem Zustande folgende, bemerkenswerte Erscheinungen auf: Die beiden dünnen Enden waren scharf gegen das starke Mittelstück abgesetzt. Besonders gut waren die der Spirochäte der Weilschen Krankheit eigentümlichen Merkmale ausgeprägt. Hier fand ich bei der Untersuchung von Kulturmaterial eine weitgehende Uebereinstimmung mit den Färbungsergebnissen von Noguchi und Zuelzer, die ihr Material nach Gie m s a behandelt hatten. Wenigstens waren in den von mir nach Becker gefärbten Präparaten gut erkennbar die spiralgige Gestalt des Mittelteiles, die nach denselben oder verschiedenen Seiten gebogenen oder manchmal hakenartig abgeknickten Endfäden, die Endknöpfe dieser Fäden und Teilungsformen der Spirochäten, in denen 1 oder 2 Knöpfe in der Mitte lagen. Rosettenartige Anordnung der Kulturspirochäten wurde ebenfalls häufig beobachtet.

Ebenso wie die Beckersche Methode die Charakteristika der Spirochäten gut wiedergibt, gestattet sie auch ein Urteil über die Zahl der vorhandenen Spirochäten.

Eine Verbesserung der Methode durch Einführung anderer Beizen (Kalium-Alaunlösung nach Tribondeau, Loefflersche Beize) oder anderer Farbstoffe (z. B. Kristallviolett, das nach Krantz eine dunkelviolette, fast schwarze Färbung der Spirochäten geben soll) gelang nicht. Der Krantzsche Vorschlag käme höchstens in Frage, wenn die Untersuchung durch Rotamblyope vorgenommen werden soll.

Der von Saphier gemachte Vorschlag, diese Färbungsmethode am „dicken Tropfen“ zu verwenden, hat sich mir nicht bewährt. Die Auslaugung des dicken Tropfens durch die Hugesehe Lösung erfolgt so unvollkommen, daß die Spirochäten auf dem sehr dunklen Grunde kaum sichtbar sind.

Die Zahl der von mir gefärbten und untersuchten Präparate beläuft sich auf etwa 350; von diesen entfallen gegen 200 auf Spirochäten der Weilschen Krankheit, 100 auf Syphilisspirochäten und der Rest auf Recurrensspirochäten. Das gesamte Material, das mir vom Hygienischen Institut und den Hautpolikliniken der Universitätsklinik und des Allerheiligenhospitals freundlichst zur Verfügung gestellt wurde, habe ich in möglichst gleichmäßiger Verteilung nach den oben beschriebenen Färbemethoden untersucht.

Meine Erfahrungen fasse ich, wie folgt, zusammen: Vergleiche zwischen dem Dunkelfeldverfahren und den Färbungen ergaben im allgemeinen schlechte Uebereinstimmung bei der Fontana'schen Methode. Dabei stellte sich heraus, daß nicht alle Spirochäten dargestellt wurden, ein Befund, der bei spärlichem Vorkommen der Spirochäten leicht zu einer falschen Diagnosestellung führen könnte. Weit besser gestaltete sich das Verhältnis bei den nach Becker gefärbten Präparaten. Hier entsprach die Zahl der gefärbten Spirochäten fast immer der Menge, die bei Untersuchung des frischen Materiales im Dunkelfelde gefunden wurde.

Vom praktischen Standpunkte aus ist die Färbung nach Becker als die billigste, bequemste und schnellste allen anderen bisher bekannten Verfahren vorzuziehen.

Handelt es sich darum, feine Gebilde und Strukturteile der Spirochäten sichtbar zu machen, so steht die Beckersche Methode der Färbung nach Giemsa und dem Fontanaschen Versilberungsverfahren nicht nach.

Da die Technik dieser Färbung bei vorschriftsmäßigem Gebrauch der Lösungen keine Schwierigkeiten bereitet und auch das Auffinden der Spirochäten infolge ihrer scharfen Zeichnung leicht ist, kann diese Methode allgemein empfohlen werden.

Nachtrag.

Folgende Modifikation ist noch von Fontana als Verstärkung seines Verfahrens veröffentlicht worden:

Lösung A: Aqua dest.	50,0
Arg. nitric.	1,0
Ammon. sulfoeyanid	2,4 g
30-proz. wässrige Natriumhyposulfitlösung	8 ccm
flüss. Ammoniak	0,6 "
Natr. sulfit	0,6 g
Ammon. bromid	0,2 "
Lösung B: Pyrogallussäure	5,0
Aqua dest.	100,0
flüss. Natr. bisulfit 32-proz.	0,2 ccm

Zum Gebrauch 10 Tropfen der Lösung A + 1 Tropfen der Lösung B mischen, sofort auf den nach der Fontanaschen Originalmethode gefärbten Ausstrich gießen, 2—5 Min. kalt wirken lassen.

Eine Nachprüfung war mir nicht mehr möglich, da diese Methode erst nach Abschluß der Arbeit zu meiner Kenntnis gelangt ist.

Literatur.

Becker, E., Deutsch. med. Wochenschr. 1920. S. 259. — Borrel, A., u. Burnet, Et., Compt. rend. Soc. biol. Paris. T. 60. 1906. p. 212. — Ehrlich, H., u. Lennartowicz, J. N., Przegląd lekarski. 1908. Nr. 3; ref. Wien. klin. Wochenschr. 1908. S. 233. — Fontana, A., Dermat. Wochenschr. Bd. 55. 1912. S. 1003. — Ders., Bd. 56. 1913. S. 301. — Ders., Pathologica. 1916. S. 118; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 70. 1920. S. 247. — Hage, München. med. Wochenschr. 1916. S. 729. — Hollande, A. Ch., Compt. rend. Soc. biol. Paris. T. 80. 1917. p. 7; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69. 1920. S. 253. — Johan, B., Deutsch. med. Wochenschr. 1917. S. 2131. — Krantz, W., ebenda. 1920. S. 913. — Loeffler, F., Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1890. S. 625. — Neumann, R. O., u. Mayer, M., Lehmanns med. Atlant. Bd. 11. 1914. S. 291. — Noguchi, H., Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *ictero-haemorrhagiae*. Journ. of exper. Med. Vol. 27. 1918. p. 576. — Oelze, F. W., München. med. Wochenschr. 1919. S. 1082 ff. — Paschen, E., Deutsch. med. Wochenschr. 1917. S. 1036. — Saphier, J., München. med. Wochenschr. 1920. S. 1047. — Schaudinn, F., Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 22. 1905. S. 527; Bd. 26. 1907. S. 11. — Shmamine, T., Centralblatt f. Bakt. Abt. II. Orig. Bd. 61. 1912. S. 410. — Tribondeau, Fichet et Dubreuil, Compt. rend. Soc. de Biol. T. 79. 1916. p. 710; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69. 1920. S. 134. — Zabel, A., Med. Klin. 1907. S. 580. — Zettnow, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 30. 1899. S. 95; Bd. 52. 1906. S. 489. — Zuelzer, M., Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 51. 1918. S. 162.

Nachdruck verboten.

Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen.

[Aus dem Schwedischen Seruminstitut in Stockholm (Leiter: Privatdozent
Dr. E. Levin).]

Von Dr. K. A. Fries.

Obwohl die Bakteriologie täglich an Bedeutung gewinnt und in immer höherem Grade ihre Stellung befestigt, nicht allein als eine völlig selbständige Wissenschaft, sondern auch als diejenige medizinische Hilfswissenschaft, von welcher sowohl die Chirurgie wie die interne Medizin augenscheinlich mehr und mehr ebenso abhängig ist, wie auch die allgemeine Hygiene ihr für manche wertvollen Dienste zu danken hat, sind doch kaum bei irgendeiner Wissenschaft die Messungs- und übrigen Bestimmungsmethoden so unvollständig und approximativ resultatgebend wie hier. Nichtsdestoweniger bedarf die Bakteriologie in ebenso hohem Maße wie jede andere, mit absoluten Werten arbeitende Wissenschaft besonderer Methoden, die ein genaues Resultat ergeben.

Insbesondere auf einem gewissen Gebiete der Bakteriologie, nämlich der immunoprophylaktischen und immunotherapeutischen, hat sich der Bedarf an exakten Methoden zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen¹⁾, welche man im gegebenen Falle braucht, bemerkbar gemacht.

Bekanntlich ist ja gerade in den letzten Jahren besonders die sogenannte „Vakzinations“therapie und vielleicht in noch höherem Maße die „Vakzinations“prophylaxe zur Anwendung gekommen. In den unrichtig bezeichneten sogenannten Vakzinen²⁾ — besser Impfstoffen — sind gewöhnlich als wirksamer Bestandteil entweder lebende oder abgetötete Bakterien enthalten. Diese Bakterien finden sich in den einzelnen Impfstoffen oft genug in variierenden Mengen; eine für alle gemeinsame Hauptbedingung ist jedoch, daß die betr. Bakterienmenge genau bekannt ist.

Der Methoden, nach welchen man bisher die in den Impfstoffen enthaltenen Bakterienmengen dosierte, gibt es viele — näher darauf einzugehen verbietet der Raum —; alle haben jedenfalls das gemeinsam, daß sie unzuverlässig sind. Während des Weltkrieges, wo große Mengen, insbesondere von Typhus- und Choleraimpfstoffen, verbraucht wurden, wurde der hier genannte Bakteriengehalt gewöhnlich so bestimmt, daß man, ausgehend von einer Bakteriensuspension mit möglichst bekanntem Bakteriengehalte, nach deren Dichte, d. h. Opazität, die ge-

1) Der Ausdruck „Bakterie“ ist hier wie im folgenden selbstverständlich als Sammelname für Virus verschiedener Art aufzufassen.

2) Nach meiner Meinung kann nicht oft genug darauf hingewiesen werden, daß die Bezeichnung Vakzin nur angewandt werden darf, wenn es sich um animales Vakzin handelt, da Vakzin sich bekanntlich von vacca = Kuh herleitet.

wünschte Verdünnung der resp. Impfstoffe vornahm. Der Gehalt an Bakterien in den sogenannten Standardvakzinen seinerseits wurde auf verschiedene Weise bestimmt. Die am meisten hierbei angewandte Methode war jedenfalls die Wrightsche. Eine andere, schwieriger in der Ausführung, aber genauer betr. des Resultates, besteht in der Zählung der in der Standardflüssigkeit enthaltenen Bakterien mit Hilfe des Thoma-Zeiß- oder eines anderen für Blutkörperbestimmung vorgesehenen Apparates. Nachdem man also auf die eine oder andere Weise den Bakteriengehalt in dem Standardimpfstoff bestimmt hatte, wurde, wie oben gesagt, der Bakteriengehalt der übrigen Impfstoffe durch Vergleich mit der Dichte, resp. Opazität des Standardimpfstoffes bestimmt.

Es würde zu weit führen und dürfte im übrigen auch nicht nötig sein, in dieser Abhandlung ausführlich auf die Anwendungsweise der beiden oben erwähnten Methoden einzugehen. Dagegen kann es vielleicht von Interesse sein, zu hören, daß bislang der Gehalt eines Impfstoffes an Bakterien am genauesten jedenfalls in Uebereinstimmung mit jener Methode bestimmt wurde, welche für die Zählung der Blutkörperchen im Blute in Anwendung kommt, also nach der Thoma-Zeißschen oder einer ähnlichen. Diese Methode ist jedoch so zeitraubend und, besonders wenn es sich um sehr kleine Bakterien handelt, so ermüdend für die Augen, daß sie in der Praxis als unausführbar bezeichnet werden muß.

Soltmann, Assistent am Hygienischen Institute der Universität in Berlin, hat in der Zeitschr. f. Hyg. Bd. 80. H. 2 eine interessante Untersuchungsreihe bekanntgegeben betreffend den Virusgehalt in Choleraimpfstoffen von verschiedenen Instituten in Deutschland. Er hat dabei die verschiedenen Prüfungsmethoden für die Bestimmung des Bakteriengehaltes einer besonders eingehenden und zuverlässigen Kritik unterworfen. Aus seinen Untersuchungen geht hervor, daß, wie ich oben verschiedentlich erwähnte, die Kammerzählung als die alleinige streng wissenschaftliche Methode zur Bestimmung des Gehaltes einer Suspension an Bakterien zu gelten hat.

Um zu untersuchen, bis zu welchem Grade diese Methode sich auch bei der Bereitung von anderen, als den von Soltmann untersuchten Impfstoffen anwenden läßt, habe ich die Kammermethode, wenn ich mich so ausdrücken darf, einer eingehenden Nachprüfung unterzogen. Es hat sich dabei sehr bald gezeigt, daß dieselbe nur in Ausnahmefällen und da besonders, wenn es sich um sehr große Bakterien handelt, von irgendwelcher Bedeutung ist. Handelt es sich nämlich im gegebenen Falle, wo dieselben quantitativ bestimmt werden sollen, um kleine Bakterien, so ist da die Kammermethode so ermüdend für die Augen und außerdem so zeitraubend, daß eine genaue Zählung praktisch genommen sich kaum ausführen läßt.

Ebenso, wenn es sich um Bakterien von ziemlich großem Volumen handelt, ist die Methode nicht so einfach, wie es anfangs erscheint. Das ist im übrigen leicht verständlich, wenn man sich nur erinnert an die ermüdende Arbeit bei wiederholten Blutkörperbestimmungen, wie sie in oben genannter Zählkammer ausgeführt werden. — Den Gehalt einer Suspension an Bakterien ausschließlich nach deren Opazität zu bestimmen, ist nur dann möglich, wenn man sicher ist, daß diese

Opazität nur durch den Gehalt der Flüssigkeit an Bakterien bedingt ist, daß dieselbe also vollständig frei ist von jeder anderen auf die Durchsichtigkeit einwirkenden Substanz. Daß dies aber nur mit seltenen Ausnahmen der Fall ist, weiß jeder, der sich mit der Herstellung von Impfstoffen der hier vorliegenden Kategorie beschäftigt hat. In diesen finden sich nämlich auch andere Stoffe als die angeschlammten Bakterien, so z. B. Abfälle vom Nährsubstrat, von diesem gefärbtes Wasser usw.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß eine zuverlässige und zugleich einfachere Methode als die Kammermethode wünschenswert ist. Nachdem ich nun durch eine lange Reihe von Untersuchungen des Bakteriengehaltes von zahlreichen und verschiedenen Impfstoffen die Genauigkeit der Methode, die ich nachfolgend beschreiben werde, festgestellt habe, bin ich überzeugt, daß es mir gelungen ist, die quantitative Bestimmung des Bakteriengehaltes in Impfflüssigkeiten oder anderen Bakteriensuspensionen so leicht auszuführen, daß ein Mangel an Uebereinstimmung in der „Stärke“ gen. Impfstoffe, wie solcher sich bisher in so hohem Grade und in so lästiger Weise bemerkbar machte, nunmehr nicht mehr in Frage kommen kann. Die Methode erinnert an die Wrightsche, unterscheidet sich aber von dieser hauptsächlich durch die einfache Ausführung sowie auch dadurch, daß die Standardflüssigkeit oder Vergleichsflüssigkeit, wie man dieselbe auch bezeichnen kann, eine bestimmte Anzahl Vergleichskörper enthält, wogegen Wright, wie bekannt, als Standardflüssigkeit Menschenblut verwendet und dessen Gehalt an roten Blutkörperchen auf 5 Millionen berechnet, ein Wert, der jedenfalls nicht genau ist, sondern oft sehr starke Abweichungen zeigt.

Bereitung der Standardflüssigkeit.

Als Standardflüssigkeit verwende ich eine Suspension von Hefepilzen in physiol. Kochsalzlösung, letztere mit 5-proz. flüssiger Karbolsäure versetzt.

Der hohe Gehalt an Karbolsäure ist bedingt durch die Schwierigkeit, die Standardflüssigkeit ohne ein kräftiges Desinfektionsmittel steril halten zu können. Es wäre vielleicht möglich und auch wünschenswert, den Karbolsäuregehalt herabzusetzen; ich ziehe es jedoch vor, denselben, vorläufig wenigstens, beizubehalten, da derselbe, wie gesagt, eine ziemlich sichere Garantie für die Sterilität der Standardflüssigkeit bietet, selbst dann, wenn man, wie es hierbei häufiger geschieht, die Flüssigkeit nicht mit sterilen Instrumenten behandelt, wodurch, was besonders wichtig ist, das Zählresultat in keiner Weise einflußt wird¹⁾.

In der Kochsalz-Karbolsäurelösung löst man ein Stück gewöhnliche Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Diese soll möglichst frisch sein, anderenfalls läuft man Gefahr, daß fremde Bakterien (meist Stäbchenbakterien) darin enthalten sind, und zwar häufig in so großer Menge, daß ihre Gegenwart nachher störend auf die Bakterienbestimmungen einwirkt.

1) Natürlich kann man auch verschiedene andere Konservierungsmittel, wie z. B. Chloroform verwenden.

Den Gehalt an Pilzen in der Standardflüssigkeit halte ich gewöhnlich zwischen 20 und 30 Millionen pro Kubikzentimeter. Um eine Suspension in dieser Stärke zu erhalten, genügt es im allgemeinen, ein haselnußgroßes Stück Hefe in 1 Lit. gen. Kochsalz-Karbolsäurelösung aufzulösen. Das Aufbewahrungsgefäß wird außerdem mit ca. 100 kleinen Glasperlen beschickt. Um gleich im Anfange die gewünschte Menge Pilze pro Kubikzentimeter sicherer zu erhalten, könnte man möglicherweise eine abgewogene Menge Hefe in die bestimmte Wassermenge bringen; da jedoch die im Handel befindliche Backhefe selten einen konstanten Wassergehalt besitzt, so ist es kaum denkbar, daß man dadurch bei der Herstellung der Standardlösung schneller zum gewünschten Resultate kommen würde.

Nachdem man also die Hefe mit der übrigen Lösung gemischt hat, ist die Flasche sorgfältig zu schütteln. Dies kann mit der Hand geschehen, jedoch ist die Anwendung einer Schüttelmaschine vorzuziehen, wodurch eine raschere und leichtere Mischung erzielt wird. Zweck des Schüttelns ist natürlich der, die Pilze so gleichmäßig als möglich in der Flüssigkeit zu verteilen, und hierbei ist es von besonderer Wichtigkeit, daß die Verbände von Hefezellen, die nicht selten zu 4, 5 und 6 Stück auftreten, gut zerteilt werden. Nachdem dies geschehen, schreitet man zur Zählung der in der Flüssigkeit befindlichen Zellen. Man verwendet hierbei entweder die gewöhnliche Thoma-Zeißsche oder aber die Hayem-Nachetsche Kammer, welche sich besser dazu eignet. Eine Kontrollrechnung mit Hilfe beider Apparate ist im übrigen sehr zu empfehlen. Die Anwendungsweise beider Apparate dürfte allgemein genügend bekannt sein und ist im übrigen so leicht zu erlernen, daß eine genauere Beschreibung sich erübrigt. Nur erscheint es mir angebracht, hier darauf hinzuweisen, daß das Resultat um so genauer wird, je mehr Quadrate in der Zählkammer man durchzählt. Bei dem Thoma-Zeißschen Apparat muß man folglich mindestens 100 kleine Quadrate und bei dem anderen Apparate 8—10 Quadrate durchzählen. Ergibt sich bei dieser Zählung, daß die Suspension die gewünschte Anzahl Zellen pro Kubikzentimeter enthält, so hat man demnach die Standardflüssigkeit, wie sie bei den folgenden Bakterienzählungen verwendet werden soll, fertiggestellt. Im allgemeinen dürfte 1 Lit. dieser Flüssigkeit für ca. 500 Bestimmungen ausreichen.

Sollte es sich bei der vorgenommenen Zählung zeigen, daß der Zellengehalt die gewünschte Zahl von 20—30 Millionen pro Kubikzentimeter übersteigt, so bleibt natürlich nichts anderes übrig, als die Flüssigkeit im Verhältnis zum Ueberschuß an Pilzen zu verdünnen. Sollte dagegen der Zellengehalt geringer als oben angegeben sein, so kann man entweder mehr Hefe zufügen, oder man läßt die fertige Suspension einige Tage stehen und sich absetzen, worauf man von derselben so viel dekantiert, als der Mindergehalt an Zellen erfordert, um die gewünschte Konzentration zu erhalten.

Bei der Zählung der Hefezellen zeigt es sich, daß sie sehr leicht auszuführen ist infolge der Größe dieser Zellen, aus welchem Grunde ich natürlicherweise eben den Hefepilz als Vergleichsobjekt bei meiner Methode zur Bestimmung des Bakteriengehaltes in Flüssigkeiten gewählt habe.

Ausführung der Bakterienrechnung.

Mit Hilfe der Standardflüssigkeit kann ich nunmehr leicht und genau den Bakteriengehalt in irgendwelcher Suspension bestimmen. Angenommen, es liegt eine Impflüssigkeit mit unbekanntem Gehalte an Bakterien vor. Aus der Konzentration und Opazität ist zu schließen, daß der Bakteriengehalt ungefähr 1000 Millionen pro Kubikzentimeter beträgt. Nachdem man die Impflüssigkeit sorgfältig (möglichst mit Hilfe der Schüttelmaschine) geschüttelt, entnimmt man davon 0,2 ccm mittels der Pipette in eine kleine Flasche oder Reagenzglas. Darauf werden 2,0 ccm der sorgfältig geschüttelten Standardflüssigkeit so schnell wie möglich in das letzterwähnte, die Impflüssigkeit enthaltende Gefäß pipettiert. Das Mischgefäß wird darauf sorgfältig durchgeschüttelt, worauf mit einer Pasteur-Pipette ein geringer Teil schnell aufgesaugt und ebenso schnell auf ein reines Objektglas getropft, dieses vorsichtig in der Flamme oder an der Luft getrocknet und das Präparat sodann gefärbt wird. Hierzu kann jeder beliebige dazu geeignete Farbstoff genommen werden, ich ziehe jedoch in der Regel eine nicht zu verdünnte Lösung von Fuchsin vor. Infolge des Karbolgehaltes in der Standardflüssigkeit tritt eine Färbung wie mit Karbolfuchsin ein und geht infolgedessen in der Regel sehr schnell vor sich, was ja als ein Vorteil anzusehen ist. Nachdem also der Farbstoff eine kurze Zeit auf das Präparat eingewirkt hat, wird dasselbe abgespült und mit Hilfe der Immersionslinse durchgesehen. Zeigt es sich hierbei, daß die Zellen gut verteilt liegen, wie dies stets nach einer sorgfältig ausgeführten Mischung der Fall ist, sowie daß sowohl Pilze wie Bakterien teils für sich, teils im Verhältnis zueinander in hinreichender Menge vorhanden und genügend gemischt sind, um eine Zählung leicht vornehmen zu können, so kann mit dieser begonnen werden. Findet man dagegen, daß die Zellen zu dicht nebeneinander liegen, um sie zählen zu können, so verdünnt man die Mischung mit einer entsprechenden Menge Wasser oder physiol. Kochsalzlösung, ehe man das Zählpräparat herstellt. Weiterhin kann es vorkommen, daß das Verhältnis der Pilzmenge zu der übrigen Zellenmenge kein solches ist, daß eine Zählung mit Vorteil vorgenommen werden kann, so z. B. daß der Gehalt an Bakterien unverhältnismäßig größer ist als die Pilzmenge. In solchem Falle kann man natürlich in einer weiteren Mischung dieses Verhältnis ändern, indem man z. B. eine geringere Menge von der zur Untersuchung bestimmten Bakteriensuspension nimmt usw. Der Anfänger wird sehr bald den rechten Weg finden und erübrigt sich hier eine weitere Behandlung dieser Details. Als Regel kann jedoch angenommen werden, daß bei einer Zählung mit dem sogenannten Netzmikrometer der Zellengehalt auf dem Präparatenglas konzentrierter gehalten werden kann, als bei einer Zählung der Gesichtsfelder nacheinander. Weiter kann man als Regel aufstellen, daß der Genauigkeit halber nicht weniger als 250 Pilze mit der von dieser Anzahl bedingten Menge Bakterien gezählt werden. Diese 250 Pilzzellen kann man entweder in z. B. 10 verschiedenen Gesichtsfeldern finden, welche in dem Falle vollständig durchgesehen werden, oder nur in einer größeren oder kleineren Zahl von Quadraten des Netzmikrometers, falls solches angewendet wird.

Angenommen nun, daß 10 Gesichtsfelder durchgezählt und in diesen 10 Feldern 256 Pilze und 814 Bakterien gefunden sind, weiterhin, daß

von der Bakteriensuspension, resp. der Flüssigkeit für die Mischung 0,2 ccm und von der Standardflüssigkeit 2,0 ccm angewendet wurden, so entsteht die Frage, wie viel Bakterien die Bakteriensuspension per Kubikzentimeter enthält. Diese gesuchte Menge findet man nach folgender Formel ;

$$\frac{\text{Volumen Pilze}}{\text{Volumen Bakterien}} \cdot \frac{\text{Summa Bakterien}}{\text{Summa Pilze}} \cdot k = x$$

k ist die Konstante, welche angibt, wie viel Millionen Pilze per Kubikzentimeter in der Standardflüssigkeit enthalten sind. Setzt man nun die oben gefundenen Zahlen in diese Formel ein und nimmt den Gehalt der Standardflüssigkeit zu 25 Millionen Zellen per Kubikzentimeter an, so ergibt sich :

$$\frac{2}{0,2} \cdot \frac{814}{256} \cdot 25 = x \quad x = (795) = 800$$

Die gesuchte Menge Bakterien in der Bakteriensuspension resp. Impfflüssigkeit war also 800 Millionen per Kubikzentimeter. Für den Fall, daß die erste Durchsicht des Mischpräparates eine zu große Konzentration der Zellenmischung ergibt, um leicht und mit der erforderlichen Genauigkeit eine Zählung vornehmen zu können, so kann man, wie gesagt, die Mischung beispielsweise mit Wasser verdünnen. Dies wirkt in keiner Weise auf obige Formel ein, in welcher also die zuge setzte Wassermenge keinerlei Rolle spielt.

Wenn auch, wie schon betont, die hier beschriebene Zählmethode besonders einfach ist und sich fast in derselben Zeit ausführen läßt, welche dazu gehört, um diese Beschreibung durchzulesen, so sollen doch noch Einzelheiten erörtert werden :

Um vorerst nochmals auf die Standardflüssigkeit zurückzukommen, so ist bei Zählung derselben in 1. Linie Gewicht darauf zu legen, daß man schnell in seinen Bewegungen ist, wenn man den kleinen Tropfen Suspension auf die karierte Mittelpartie der Zählkammer bringt, und, sobald dies geschehen, sofort von der Seite das Deckglas über den Tropfen und die Kammer selbst schiebt. Führt man nämlich diese Handbewegungen nicht schnell genug aus, so läuft man Gefahr, daß die Zählungen fehlerhaft ausfallen.

Im allgemeinen dürfte es leichter sein und das beste Resultat ergeben, wenn man mit einer nicht zu konzentrierten Suspension einer Bakterien-Pilzmischung arbeitet. Auch kommt man meiner Meinung nach am schnellsten zum Ziele, wenn man Gesichtsfeld nach Gesichtsfeld zählt, an Stelle einer gewissen Anzahl von Quadraten in der Hayem-Nachetschen Kammer. Im allgemeinen pflege ich so zu arbeiten, daß ich, im Falle die Bakterien-„Lösung“ sehr konzentriert ist, z. B. 0,2 ccm von dieser und 2,0 ccm von der Pilzsuspension nehme und beispielsweise 5 ccm Wasser hinzusetze. Nachdem diese Mischung sorgfältig durchgeschüttelt ist, überführe ich mit einer Pasteur-Pipette 6 Tropfen auf das Objektglas, das mit Hilfe der Flamme getrocknet wird. Nach darauf erfolgter Färbung des Präparates in oben beschriebener Weise werden in den 6 Tropfen Pilze und Bakterien Gesichtsfeld nach Gesichtsfeld gezählt. Man könnte vielleicht gegen die hier beschriebene Methode den Einwand erheben, daß das Resultat der Zählungen nicht

so genau wie erforderlich ausfällt, und zwar könnte man sich denken, daß von den großen Pilzen eine Anzahl der weit kleineren Bakterien verdeckt werden. Obwohl dieser Einwand nicht so ohne weiteres von der Hand zu weisen ist, so kann man sich doch durch wiederholte Kontrollzählungen davon überzeugen, daß hierdurch die Genauigkeit der Methode in keiner Weise beeinflusst wird. Nur dann nämlich, wenn das endgültige, für die Zählung bestimmte Objektglaspräparat mittels einer sehr stark konzentrierten Bakterien-Pilzflüssigkeit bereitet wird, ist diese angenommene Eigenschaft der Pilze, die Bakterien zu verdecken, einigermaßen von Bedeutung. In der Konzentration dagegen, wie die Mischungsflüssigkeit bei deren Verwendung für die endgültige Zählung Pilze und Bakterien enthalten soll, verliert die gemachte Einwendung völlig an Bedeutung. Will man sich hiervon überzeugen, so führt man am einfachsten eine Anzahl Kontrollbestimmungen aus und geht dabei am besten so vor, daß man mit verschiedenen Verdünnungen von ein und derselben Bakterien-Pilzsuspension arbeitet.

Sollte im übrigen oben genanntes Verhalten der Pilze überhaupt eine Rolle spielen bei der hier in Frage kommenden Bakterienbestimmung, so würde das in gleicher Weise und in noch höherem Grade bei der Wrightschen Methode der Fall sein. Irgendwelche Einwendungen genannter Art gegen diese letztere Methode habe ich aber trotz eifriger Nachforschungen nirgends finden können. Gegen die letztgenannte hat die hier von mir beschriebene Methode außer anderen leicht ersichtlichen Vorteilen eben den, daß man hier nicht auf Menschenblut angewiesen ist, welches im übrigen recht oft nur mit großen Schwierigkeiten so behandelt werden kann, daß es sich für die hier gedachten Zwecke verwenden läßt.

Außerdem hat man die oben angegebene Standardflüssigkeit immer gleich gebrauchsfertig.

Inhalt.

- | | |
|--|--|
| <p>v. Angerer, Karl, Versuche mit der Verdauungsbrühe nach Hottinger. Mit 6 Abbildungen im Text, S. 60.</p> <p>Braun, H., u. Cahn-Bronner, C. E., Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. I. Mitteilung. Die Nahrungsbedürfnisse des Paratyphus B-Bazillus; sein Wachstum und seine Eigenschaften beim Aufbau aus einfachen chemischen Verbindungen. Mit 2 Abbildungen im Text, S. 1.</p> <p>Frieber, Walther, Zum Nachweis von Phenol in Bakterienkulturen, S. 58.</p> <p>Fries, K. A., Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakterien-suspensionen, S. 90.</p> <p>Galli-Valerio, B., Beobachtungen über Culiciden, S. 31.</p> <p>Herfarth, Heinrich, Die Entkeimung von Obst und Gemüse durch Chlorkalk, S. 33.</p> | <p>Illert, Ernst, Ueber die Entkeimung der Kälberlymphe mit Trypaflavin, S. 49.</p> <p>Lahm, W., Untersuchungen über den Agglutinationstiter nach Typhusschutzimpfung bei Gesunden und Kranken. Mit 2 Kurven im Text, S. 21.</p> <p>Machens, Rudolf, Zur Frage der Schildkrötentuberkulose, S. 28.</p> <p>Mittelbach, Hildegard, Ueber die desinfizierende Wirkung der Kupfersalze, S. 44.</p> <p>Neubauer, Karl, Studien über das Vorkommen von diphtherieartigen Bazillen in kindlichen Lymphdrüsen, S. 17.</p> <p>Oelze-Rheinboldt, Meta, Ueber die Zahl der intra- und extraleukozytären Gonokokken, S. 29.</p> <p>Schneemann, Erich, Vergleichende Untersuchungen über neuere Spirochätenfärbungen, S. 84.</p> |
|--|--|

Nachdruck verboten.

Die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen durch die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe.

Ein neuer, das Wachstum von *Bacterium coli* hemmender Nährboden für Paratyphus B.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. Reiner Müller).]

Von Dr. Karl Pesch.

Die meisten bakteriologischen Nährböden setzen sich nach zwei Prinzipien zusammen. Die 1. Gruppe erstrebt für alle Bakterien optimales Wachstum, wobei unter Umständen durch äußere Anzeichen, wie Farbenumschlag oder Hämolyse, die Diagnose erleichtert werden soll (Blutagar, Drigalski-Agar, Loeffler-Serum). Die 2. Gruppe sucht, durch Zusätze zum Nährboden Begleitbakterien in ihrem Wachstum zu hemmen und, soweit möglich, nur den gesuchten Bakterien zum Wachstum zu verhelfen (Malachitgrünagar für den Nachweis der Typhus- und Paratyphusbakterien, Gallekultur für die Anreicherung der Typhuskeime aus dem Blute).

Eine 3. Methode, Nährböden für die Züchtung pathogener Mikroorganismen herzustellen, hat uns A. Fischer in seinen „Vorlesungen über Bakterien“ zum erstenmal ausführlich beschrieben. Sie beruht darauf, daß pathogene und auch nichtpathogene Keime zum Leben verschiedenartige Stickstoffquellen nötig haben; während die eine Bakterienart sich schon mit einer so einfachen Stickstoffverbindung, wie Kaliumnitrat, begnügt, hat eine andere Bakterienart hochmolekulare Stickstoffverbindungen, z. B. Pepton, zum Aufbau ihrer Leibessubstanz nötig. So kann man einen Nährboden herstellen, dem man zu dem stickstofffreien Agar Salze und Kohlenhydrate und noch jene besondere Stickstoffquelle zusetzt, so daß dann auf diesem Nährboden die Bakterien, die sich mit dieser Stickstoffquelle begnügen, zu wachsen vermögen, während Keime, die in betreff ihrer Stickstoffquelle andere Ansprüche stellen, nicht gedeihen. Wer sich über diese Fragen eingehender unterrichten will, den verweise ich auf Czapeks Werk „Ueber die Biochemie der Pflanzen. Bd. 1 u. 2.“

A. Fischer (zitiert nach Kisch) teilt die Bakterien, je nach ihrem Vermögen, verschiedenwertige Stickstoffquellen zum Körperaufbau benutzen zu können, in 7 Gruppen ein: 1) paratrophe; diese verlangen ein Nährsubstrat von der Zusammensetzung der Säfte desjenigen Körpers, der ihnen als Wirt dient. 2) Peptonbakterien; diesen muß der Stickstoff als Pepton oder Eiweiß dargeboten werden, damit optimales Wachstum erreicht wird. 3) Amidobakterien; sie wachsen noch optimal mit Amidokörpern, zeigen aber bei Ernährung mit Ammoniumsalzen, selbst nach Wochen, kein deutliches Wachstum. 4) Ammonbakterien; sie gedeihen mit Ammoniumsalzen noch üppig, nur zunächst oft etwas langsamer als mit Pepton oder Asparagin. 5) Nitrobakterien; sie können den oxydierten Stickstoff als Nahrung verwenden. 6) Nitrit- und Nitratbakterien; sie verwenden oxydierten Stickstoff oder Ammoniak als Nahrung, decken aber ihren Kohlenstoffbedarf aus der Kohlensäure der Luft. 7) Nitrogenbakterien; für sie kann der elementare Stickstoff der Luft als Stickstoffquelle dienen.

Bruno Kisch hat es in einer sehr eingehenden Arbeit unternommen, Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe auf Unterschiede in der Verwertbarkeit verschiedener Stickstoffquellen zu untersuchen.

Geprüft wurden von Kisch 6 Typhusstämme, 4 Paratyphus A-Stämme, 7 Paratyphus B-Stämme, 1 Coli-Stamm, 2 Gärtner-Stämme, je 1 Stamm von Mäuse-typhusbakterien, Cholera vibriionen und Hühnercholera bakterien, 3 Ruhrstämme vom Typus Shiga-Kruuse, sowie 5 Pseudo-Ruhrstämme (3 Flexner- und 2 Y-Stämme). Der von Kisch verwandte Nähragar hat folgende Zusammensetzung: In 1 l H₂O werden gelöst: 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄, 0,02 g NaCl; eine Spur FeSO₄ und Ca₃(PO₄)₂; 10 g Traubenzucker. Durch Zusatz von Natriumbikarbonat wird der Nährboden schwach

alkalisch gemacht, dann Zusatz von 20 g Stangenagar, der durch starkes Anwässern stickstofffrei gemacht wird. Diesem stickstofffreien Nährboden werden dann verschiedene Stickstoffquellen zugesetzt: Kaliumnitrit, Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumchlorid, kohlensaures Ammonium, milchsaures Ammonium, weinsaures Ammonium, Asparagin, Harnstoff, Nukleinsäure oder Pepton. Kischs Ergebnisse sind etwa folgende: Auf Kischschem Stammagar ohne Stickstoffquelle wächst keiner der geprüften Stämme in nennenswerter Weise. Kaliumnitrit wird als Stickstoffquelle nicht verwertet, scheint sogar als Gift zu wirken; denn auf diesem Nährboden wachsen einzelne Stämme, z. B. Paratyphus B-, coli und Gärtner-Bakterien überhaupt nicht, während sie auf dem Stammagar ohne Stickstoffquelle wenigstens eine Spur Wachstum gezeigt hatten. Bei Kaliumnitrat als Stickstoffquelle zeigen Paratyphus B-, Gärtner- und Coli-Bakterien mehr oder weniger gutes Wachstum; auch bei 2 der 6 geprüften Typhusstämmen sind nach 48- und 72-stünd. Bebrütung einzelne Kolonien gewachsen, während die 4 anderen Typhusstämmen sowie alle Paratyphus A-Stämme keine Spur von Wachstum zeigen. Auf die anderen geprüften Stämme näher einzugehen, würde mich hier zu weit führen, ich verweise auf die Tabellen der Kischschen Arbeit.

Setzt man dem Nährboden Ammoniumphosphat als Stickstoffquelle zu, so zeigen Paratyphus B-, Gärtner- und Coli-Bakterien schon nach 24 Std. ein üppiges Wachstum, Typhus wächst erst nach längerer Zeit und auch dann nur einzelne Kolonien; von den 4 Paratyphus A-Stämmen zeigt keiner auch nur eine Spur von Wachstum. Es besteht bei dieser Versuchsreihe also ein ausgesprochener Unterschied zwischen Paratyphus A-Bakterien einerseits und Paratyphus B-, Gärtner- und Coli-Bakterien andererseits, indem erstere mit den Ammoniumsalzen nichts anzufangen wissen, für letztere aber die Ammoniumsalze eine günstige Stickstoffquelle darstellen. Bei Ammoniumchlorid und Ammoniumkarbonat zeigt sich der gleiche Unterschied. Auch das Ammoniumlaktat und -tartrat zeigen das gleiche Verhalten, indem Paratyphus A-Bakterien gar nicht, Typhusbakterien schwach, Paratyphus B-, Gärtner- und Coli-Bakterien üppig wachsen. Gehen wir nun zu den höhermolekularen Stickstoffverbindungen über, so sehen wir, mit Asparagin als Stickstoffquelle Paratyphus B-, Coli- und Gärtner-Bakterien üppig wachsen, die geprüften Typhusstämmen wachsen auch mehr oder weniger gut und auch die Paratyphus A-Stämme zeigen nun ein, allerdings nur schwaches Wachstum. Ersetzen wir Asparagin durch Harnstoff oder Nukleinsäure, so sehen wir das gleiche Bild. Bei Verwendung von Pepton als Stickstoffquelle gedeihen alle untersuchten Bakterienarten auf das beste. Wir können die Resultate Kischs so zusammenfassen, daß in betreff ihrer Ansprüche an Stickstoffquellen Paratyphus A-Bakterien am anspruchsvollsten sind, Typhusbakterien stehen in der Mitte, Paratyphus B-, Gärtner- und Coli-Bakterien nehmen schon mit sehr einfachen Stickstoffquellen, wie Kaliumnitrat, vorlieb. Auf diesem Verhalten der verschiedenen Stämme gegenüber verschiedenen Stickstoffquellen baut Kisch einen neuen Differentialnährboden zur Unterscheidung von Paratyphus A- und Paratyphus B-Bakterien auf, dem neben Traubenzucker als Kohlenstoffquelle ein Ammoniumsalz als Stickstoffquelle zugesetzt wird.

Auf Anregung von Prof. Reiner Müller habe ich nun die Angaben Kischs nachgeprüft; ich fand sie in allen Punkten bestätigt. Es wurden von mir geprüft: 5 Typhusstämmen, 3 Paratyphus A-Stämme, 5 Paratyphus B-Stämme, 1 Stamm *Bacterium enteritidis* Kaensche-Breslau (dessen kulturelle und epidemiologische Trennung von den echten Paratyphus B-Bakterien sich auch im Kölner Hygienischen Institut bestätigt hat), 1 Gärtner-Stamm, 1 Ratin Stamm (den Gärtner-Bakterien nahe verwandt) sowie 2 Coli-Stämme.

Alle meine Resultate hier anzuführen, erübrigt sich. Ich verweise da auf die zahlreichen Tabellen in Kischs Arbeit. Nur als Beispiel für das verschiedene Wachstum der Angehörigen der Typhus-Coli-Gruppe sei hier eine Versuchsreihe angeführt (Tab. I).

Nun verhalten sich die verschiedenen Angehörigen der Typhus-Coli-Gruppe nicht nur verschiedenen Stickstoffquellen gegenüber verschieden, sondern unterscheiden sich auch, wie wir wissen, in der Verwertung der einzelnen Kohlenhydrate, eine Tatsache, auf der einige Methoden der Diagnose pathogener Keime aufgebaut sind.

Kisch hat zu seinem Nährboden gleichmäßig 1 Proz. Traubenzucker als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Mein Gedanke war es nun, nicht

Stämme	Tabelle I.			Tabelle II.		
	Stammagar + 0,19% Ammonium-sulfat + 1% Traubenzucker			Stammagar + 0,19% Ammonium-sulfat ohne Traubenzucker		
	nach 24 ^h	48 ^h	72 ^h	nach 24 ^h	48 ^h	72 ^h
Typhus I	—	—	—	—	—	—
" II	—	±	±	—	—	—
" III	—	—	—	—	—	—
" IV	—	±	±	—	—	—
" V	—	—	—	—	—	—
Paratyph. A I	—	—	—	—	—	—
" " II	—	—	—	—	—	—
" " III	—	—	—	—	—	—
" B I	+	++	++	—	—	—
" " II	+	++	++	—	—	±
" " III	++	++	++	—	±	±
" " IV	+	++	++	—	—	+
" " V	++	++	++	—	—	—
Breslau	+	+	++	—	±	±
Gärtner	—	±	+	—	—	—
Ratin	+	+	+	—	—	±
Coli 336	++	++	++	—	—	+
" 339	++	++	++	—	—	±

nur die Stickstoffquellen, wie Kisch es getan hatte, zu variieren, sondern auch die Kohlenstoffquelle, um auf diese Weise das Verhalten der Angehörigen der Typhus-Coli-Gruppe gegenüber verschiedenen Kohlenstoffquellen kennen zu lernen. Daß Mikroorganismen zu ihrer Weiterentwicklung überhaupt irgendeine verwertbare Kohlenstoffquelle dargereicht bekommen müssen, ist selbstverständlich. Tab. II zeigt, daß höchstens noch Spuren von Wachstum auftreten, wenn in dem Nährboden der Tab. I der Traubenzucker weggelassen wird. Die Spuren des Wachstums sind wohl darauf zurückzuführen, daß die Agarmasse nicht chemisch rein ist.

Gerhard Wagner hat in seiner Arbeit „Beiträge zur Epidemiologie und Bakteriologie des Paratyphus A, sowie Untersuchungen über das Gärvermögen der Typhoideen“ die Frage der Kohlenhydratvergärung durch die Angehörigen der Typhus-Coli-Gruppe eingehend besprochen und viele verschiedene Stämme qualitativ und quantitativ auf Säure- und Gasbildung geprüft. Auf die Ergebnisse Wagners, die besonders auf eine Differentialdiagnose der Paratyphus A-Bakterien von den Paratyphus B- und Typhusbakterien hinauslaufen, näher einzugehen, ist hier nicht der Platz. Von Interesse ist es nun, daß Wagner die Kohlenhydrate, fußend auf einer Arbeit Neubergs, „Ueber zuckerfreie Gärung“, durch organische Säuren ersetzt. Nach Wagner werden einige organische Säuren, und zwar Ameisensäure, Brenztraubensäure, Glycerinsäure und Weinsäure durch die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe vergoren. Eine besondere Stellung unter den organischen Säuren nimmt die Zitronensäure ein. Während aus den übrigen der genannten organischen Säuren durch Coli-Bakterien Gas gebildet wurde, fand dies bei einer Nährflüssigkeit, der ein Salz der Zitronensäure (Kalium- oder Natriumzitat in 1-proz. Lösung) zugesetzt war, nicht statt.

Dieser Befund Wagners ließ mich vermuten, daß die Zitronensäure den Coli-Bakterien nicht als Kohlenstoffquelle dienen kann. Es war nun von besonderem Interesse, dies auffallende Ergebnis nachzu-

prüfen und es mit den Kischschen Befunden zu kombinieren. Zu diesem Zwecke verwandte ich den oben erwähnten Stammagar mit 0,19-proz. Ammoniumsulfat, dem ich nun als Kohlenstoffquelle verschiedene organische Säuren als Salze in 1-proz. Lösung zusetzte. Als Beispiele seien hier Kaliumtartrat und Natriumzitat angeführt (Tab. III u. IV).

Stämme	Tabelle III.			Tabelle IV.		
	Stammagar + 0,19% Ammoniumsulfat + 1% Kaliumtartrat			Stammagar + 0,19% Ammoniumsulfat + 1% Natriumzitat		
	nach 24 ^h	48 ^h	72 ^h	nach 24 ^h	48 ^h	72 ^h
Typhus I	—	—	—	—	—	—
" II	—	—	—	—	—	—
" III	—	—	—	—	—	—
" IV	—	—	—	—	—	—
" V	—	—	—	—	—	—
Paratyph. A I	—	—	—	—	—	—
" " II	—	—	—	—	—	—
" " III	—	—	—	—	—	—
" " B I	++	+++	+++	+++	+++	+++
" " II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" " III	+	++	+++	++	+++	+++
" " IV	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" " V	+++	+++	+++	++	+++	+++
Breslau	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gärtner	—	±	+	±	±	±
Ratin	+	+	+	±	+	+
Coli 336	+++	+++	+++	—	—	—
" 339	+++	+++	+++	—	—	—
" 541	+++	+++	+++	—	—	—
" 542	+++	+++	+++	—	—	—
" 547	+++	+++	+++	—	—	—

Tab. III zeigt uns, daß sowohl Paratyphus B als auch Gärtner-, Breslau- und Coli-Bakterien die Weinsäure als Kohlenstoffquelle aufs beste verwerten können. Die 5 geprüften Coli-Stämme sind auf diesem Nährboden schon nach 24 Std. üppig gewachsen. Die Befunde stimmen also im großen und ganzen mit den Befunden Kischs überein, nur daß die Typhusbakterien, die ja auch auf dem Kischschen Nährboden nicht oder nur sehr spärlich wachsen (Tab. I), auf diesem neuen, Weinsäure als Kohlenstoffquelle enthaltenen Nährboden überhaupt nicht gewachsen sind.

Tab. IV zeigt uns, im Gegensatz dazu, das gleiche Wachstum der Paratyphus B-, Fleischvergiftungs-, Gärtner- und Ratinstämmen auf dem Ammoniumsulfat-Natriumzitratsnährboden, während die 5 Coli-Stämme auch nach 72 Std. Brutschrankaufenthalt noch kein Wachstum zeigen. Durch meine Versuche werden also die Angaben Wagners bestätigt, daß das *Bacterium coli* die Zitronensäure nicht als Kohlenstoffquelle verwerten kann. Wie ich nachgeprüft habe, ist es dabei gleichgültig, ob man die Zitronensäure als Kalium- oder als Natriumsalz darreicht; auch ergaben andere Stickstoffquellen (Ammoniumphosphat, Ammoniumchlorid, Ammoniumkarbonat), wenn ich sie statt Ammoniumsulfat als Stickstoffquellen benutzte, immer das gleiche Bild. Alle diese Versuchsreihen hier anzuführen, ist unnötig, da sich diese Befunde mit den in Tab. IV angeführten Ergebnissen

decken. Selbstverständlich prüfte ich eine größere Anzahl Coli-Stämme, die ich wahllos aus den dem Untersuchungsamt eingeschickten Stuhl- und Urinproben isolierte, im ganzen 15 Stämme; das Resultat war immer das gleiche. E. Lehmann äußert sich in einer Arbeit „Zur Biologie von Paratyphus A“ ebenfalls über die verschiedene Verwertung der den Bakterien dargereichten Nährstoffe durch die verschiedenen Angehörigen der Typhus-Coli-Gruppe und sagt da (S. 291): „Para B zeigt in seinen Lebensbedingungen eine Mittelstellung (scil. zwischen Typhus und Coli): eine reiche Nützungsmöglichkeit von Eiweißspaltprodukten und Kohlehydraten, wobei allerdings eine gewisse Unterlegenheit gegenüber Coli nicht zu bezweifeln ist.“

Das Verhalten des *Bacterium coli* gegenüber Zitronensäure als Kohlenstoffquelle im Gegensatz zum *Bacterium paratyphi B* zeigt uns nun, daß die Ansicht Lehmanns nicht ganz zu Recht besteht, indem in diesem Einzelfalle *Bact. coli* das anspruchsvollere Lebewesen ist und mit Nährstoffen nicht vorlieb nimmt, bei denen Paratyphus B-, Gärtner-, Breslau- und Ratinbakterien noch aufs beste gedeihen.

Dies differente Verhalten der verschiedenen Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe ist meines Erachtens nicht bloß von theoretischem Interesse, sondern hat auch praktische Bedeutung. Wie wir gesehen haben, wachsen Coli-Bakterien auf diesem Ammoniumsulfat-Natriumzitratsnährboden nicht, während die pathogenen Mikroorganismen: Paratyphus B, Breslau-, Gärtner- und Ratinbakterien darauf recht gut gedeihen. Es ist also leicht möglich, auf diesem, das Coli-Wachstum ausschaltenden Nährboden eine Anreicherung der genannten pathogenen Keime zu erreichen. Besonders dürfte dieser Nährboden in Betracht kommen bei größeren, sichergestellten Paratyphus B- sowie bei Fleischvergiftungsepidemien, sowie zu Umgebungsuntersuchungen bei bakteriologisch sichergestellten Paratyphus B-Erkrankungen; zum Nachweis von Typhusbakterien ist er allerdings nicht geeignet. Auf die Brauchbarkeit dieses Nährbodens für die Praxis beabsichtige ich in einer späteren Arbeit noch zurückzukommen.

Literatur.

- 1) Czapek, F., Biochemie der Pflanzen. Bd. 1a. Jena (G. Fischer) 1919/20. —
- 2) Fischer, A., Vorlesungen über Bakterien. Jena (G. Fischer) 1903 (ref. nach Kisch). —
- 3) Kisch, B., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919. S. 27. —
- 4) Dera., Wien. klin. Wochenschr. Bd. 31. 1918. Nr. 21. —
- 5) Lehmann, E., Zeitschr. f. Hyg. Bd. 81. 1916. S. 274. —
- 6) Neuberg, C., Das Gärungsvermögen und der Zuckerumsatz der Zelle. Jena 1913 (ref. nach Wagner). —
- 7) Wagner, Gerhard, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 90. 1920. S. 37.

Nachdruck verboten.

Die Erreger der „hämorrhagischen Septikämie“.

[Aus dem staatl. Serotherapeutischen Institute in Wien (Vorstand: Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf; aus der bakteriol.-serolog. Abteilung (Abteilungs-vorstand: Dr. B. Busson).]

Von Dr. B. Busson.

1914 und 1919 konnte ich aus 2 Epizootien, denen aus unseren Meerschweinchenbeständen eine größere Anzahl von Tieren zum Opfer

fiel, 2 voneinander differente Erreger züchten, die ich im folgenden kurz beschreiben werde.

Vorausschicken möchte ich, daß die durch diese beiden Stämme hervorgerufenen Krankheitsbilder einander völlig gleich waren; ihr Symptomenkomplex läßt sich, wie folgt, kurz schildern:

Die Tiere erkranken plötzlich unter Schüttelfrost, sträuben die Haare, die Augen sind klein und tränen, aus der Nase rinnt schleimiges oder eitriges Sekret, das an den Nüstern vielfach zu gelblichen Borken eintrocknet. Bald stellen sich Lähmungen ein, die Tiere liegen auf der Seite, vollführen vielfach ruderartige Bewegungen mit den Beinen, der Atem ist beschleunigt bei Zuhilfenahme aller Auxiliärmuskeln und innerhalb weniger Stunden tritt der Tod ein.

Der Sektionsbefund ist der einer ausgesprochenen hämorrhagischen Septikämie; in den Leibeshöhlen findet sich sanguinolentes, leicht getrübt Exsudat, niemals Schwarten oder sonstige Auflagerungen. Nebenniere gerötet, Lunge ödematös mit Ekchymosen und Hämorrhagien, Blutungen im Darms und in den Organen.

Vorwiegend im Exsudat, aber auch in den Organen und im Herzblute, finden sich ovoide Kokkobazillen mit deutlicher Polfärbung vor, die auf fast allen Nährböden leicht und in Reinkultur zur Entwicklung kommen.

Bouillon wird von ihnen gleichmäßig getrübt mit inkonstanter Häutchenbildung, die Bazillen zeigen darin deutliche Stäbchenform, etwa vom Aussehen und der Größe der Typhusbazillen, und sind gut beweglich. Die ersten Bouillonkulturen hatten einen aromatischen Geruch nach frischen Waldschwämmen, der später verloren ging. Gelatine wird niemals verflüssigt, die Kolonien sind rundlich, erst tauartig, dann fein granuliert, die älteren rund, oder etwas gelappt, aber ohne Naben und Leisten, werden undurchsichtig und nehmen einen grauweißen bis graugelben Farbton an. Auf Agar wachsen runde, fettglänzende, weißliche, feingranulierte Kolonien, die im durchfallenden Licht lebhaft opalisieren. In jungen Kolonien sowohl auf Agar als Gelatine finden sich neben Stäbchen vorwiegend Kokkobazillen, und kleinste, bewegliche Individuen, die wie Bruchstücke neben den Bazillen erscheinen.

Die Stäbchen sind gramnegativ, Kapsel und Sporenbildung tritt niemals in Erscheinung.

Auf Blutagar tautropfenartiges Wachstum ohne Hämolyse; auf Blutserum keine Peptonisierung. Milch erst unverändert, später transparent, niemals Gerinnung. Lackmus und Seitzsche Molke werden in den ersten 24 Std. gerötet, dann tritt Alkalibildung und Blaufärbung ein.

Während der Stamm II keine gebräuchlichen Zuckerarten vergärt, verhält sich St. I in allen Einzelheiten genau wie ein typischer Paratyphus B-Stamm. Er vergärt sämtliche Monosaccharide (Dextrose, Lävulose, Galaktose und Mannose), von den Disacchariden (Saccharose, Laktose, Maltose) nur Maltose. Trisaccharide, Polysaccharide, 3- und 4-wertige Alkohole werden nicht angegriffen, dagegen werden Pentosen und Hexosen vergoren. Auf Xylosenährböden, die, wie eigene Versuche zeigen, von Paratyphus A und von typischen Coli-Stämmen immer, niemals aber von B-Stämmen unter Rotfärbung des Nährbodens zerlegt werden, zeigt Stamm I ebenfalls dasselbe Verhalten wie Paratyphus B.

Indolbildung ist weder mit der Ehrlich- noch mit der Nitroso-indolreaktion nachweisbar. Auf der natürlich sauren Kartoffel wächst St. I nicht, St. II als gelbweißer bis rötlich-weißlicher Rasen.

Agglutiniert wurden beide Stämme nur mit ihren isohomologen Seris, blieben unbeeinflusst durch Typhus-, Paratyphus-, Gärtner-, Ratin- und Mäusetyphusseren, zeigten aber deutliche Mitagglutination bis zu $\frac{1}{10}$ der Titerwerte untereinander, und St. I auch gegen Serum, das mit *Bact. septic. hämorrh.* Truthahn dargestellt war (siehe Tab. II).

Stamm I zeigte eine außerordentlich hohe Virulenz, die Infektiosität war eine fast absolute für Meerschweinchen; Verdünnungen, die auf Kontrollplatten nur 1—3 Keime zeigten, hatten stets den Tod der Versuchstiere bei intraperitonealer Einverleibung in 24—48 Std., $\frac{1}{100000}$ Oese in 8—10 Std. zur Folge.

Es gelang, durch Uebertragung auf die Nasenschleimhaut oder in den Bindehautsack Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten nach einer Inkubationsdauer von 4—6 Tagen zu töten; junge Ziegen starben durch Beimischung von Kulturen zur Milch, Tauben und Hühner nach intramuskulärer Injektion, wobei die Umgebung der Impfstelle gelblich gefärbt war. Meerschweinchen starben nach subkutaner Injektion und durch Einreibung in durch Rasieren beschädigte Haut, Mäuse und Ratten erliegen der subkutanen Infektion. Kontaktversuche durch Beisperrung gesunder zu nasal infizierten Tieren sind anfangs mehrfach gelungen und dann durch die Kultur bestätigt worden.

Interessant ist ferner, daß dieser 1914 gezüchtete Stamm, als er 1919 das erste Mal wieder auf Pathogenität geprüft wurde, diese fast unverändert bewahrt hatte, nur war es nicht mehr möglich, von der rasierten Bauchhaut aus das Meerschweinchen tödlich zu infizieren.

Der Sektionsbefund nach künstlicher Infektion war stets gleich jenem nach natürlicher Infektion; stets zeigt sich das Bild einer ausgesprochenen hämorrhagischen Septikämie.

Obwohl von diesen beiden bei hämorrhagischen Septikämien gefundenen Stäbchen resp. Kokkobazillen besonders St. I nach seinem kulturellen Verhalten und seinen chemischen Leistungen (Zuckervergärung, Indol etc.) der Paratyphusgruppe sehr nahe stehen, könnten sie doch beide nach der heute noch bestehenden Nomenklatur für die Gruppe der „hämorrhagischen Septikämie“ ohne weiteres auch in diese Gruppe eingeteilt werden, und dieser Umstand war mir Veranlassung, zugleich mit der Untersuchung der beiden bei Epizootien mit hämorrhagischer Septikämie gefundenen Stäbchen auch eine Reihe anderer Stämme aus der „hämorrhagischen Septikämie“-Gruppe vergleichsweise mitheranzuziehen, für deren Ueberlassung aus der Kräl'schen Bakteriensammlung ich Herrn Prof. Přibram zu Dank verpflichtet bin.

Eben diese Gelegenheit will ich benützen, mich im allgemeinen und im einzelnen etwas ausführlicher mit der Frage der „hämorrhagischen Septikämie“ und ihren Erregern zu beschäftigen, wozu es notwendig ist, einen historischen Ueberblick vorzuschicken:

Bekanntlich wurden die ersten Fälle typischer „hämorrhagischer Septikämie“ bei Laboratoriumstieren durch Injektion faulender organischer Flüssigkeiten hervorgerufen, wobei in den dafür hochgradig empfänglichen Organismen mancher Laboratoriumstiere elektiv Stämme gezüchtet wurden, die man mit erst später bei Epizootien gefundenen identifizieren konnte. Ich erinnere an die Versuche von Coze und Felz, Davaine, Toussaint, Pasteur, Koch, Gaiffy, ferner an die Arbeiten von Semmer, Kitt, Bollinger und anderer Forscher. Diesen Arbeiten reihten sich in kurzer

Folge die Beobachtungen anderer Untersucher an, und bald waren ganze Gruppen natürlicher Epizootieerreger, wie Wild- und Rinderseuchen, Geflügelcholera, die verschiedenen Schweineseuchen, Büffelseuchen, Kaninchen- und Vogelseptikämien aufgestellt, deren ähnliche Krankheitsbilder auch durch ähnliche und im Systeme verwandte, wenn nicht überhaupt identische Erreger bedingt sein sollten. Dazu kommen noch zahlreiche Befunde hämorrhagisch-septikämischer Erkrankungen anderer Tiere, so verschiedenster Vogelarten, der Hunde und Katzen, Meerschweinchen und Frettchen etc., deren Erreger ebenfalls in diese Gruppe eingereiht wurden.

Lignières war wohl einer der ersten, der diese Einzelbefunde summierte und die ganze Gruppe nach dem ersten Vorschlage Trevisans „Pasteurella“-Gruppe, die verschiedenen Krankheiten „Pasteurellosen“ zu Ehren Pasteurs benannte und sie folgendermaßen charakterisierte:

„Unbewegliche, sehr polymorphe und involutionsfähige Kokkobazillen, welche Gelatine nicht verflüssigen, Milch nicht zur Gerinnung bringen und ihre Reaktion nicht verändern, keine sichtbare Kultur auf der natürlich saueren Kartoffel geben, keine Indolbildung zeigen, keine Sporen und keine Geißeln besitzen.“

Dieser immerhin auf das morphologische und kulturelle Verhalten begründeten Charakteristik stellte Hueppe als wesentlich charakterisierendes Moment die Art des durch diese Bakterien hervorgerufenen Krankheitsbildes entgegen, und schlug dafür den Sammelnamen „Septicaemia-haemorrhagica“ vor, ein Name, der sich leider allgemein besonders in die deutsche Literatur eingebürgert hat. Hueppe unterschied weiterhin als ein wesentliches Moment, ob die Infektion auf dem Wege durch die Haut, die Lungen oder den Magen-Darmkanal zustandekommt, und stellte demnach eine „kutane“, „pektorale“, oder „intestinale“ Form der hämorrhagischen Septikämie auf.

Im wesentlichen traten sowohl Lignières als auch Hueppe für die Zugehörigkeit, wenn nicht sogar für die Identität aller bei „septikämischen Prozessen der Tiere“ bis dahin beschriebenen Bakterienformen zu den von ihnen aufgestellten Gruppenbegriff ein. Auch in neuester Zeit charakterisiert Hutyra diese Gruppe im Handbuche von Kollé und Wassermann, wie folgt:

Unter dem Sammelnamen „Septicaemia haemorrhagica“ pflegt man Tierkrankheiten zusammenzufassen, die durch kleine, ovoide, sich eigentümlich bipolar färbende Bakterien hervorgerufen werden, und deren akute Formen sich durch Erscheinungen einer allgemeinen Blutinfektion mit hämorrhagischen Entzündungsprozessen in den inneren Organen kennzeichnen.

Hutyra wendet sich in seinen weiteren Ausführungen gegen die Bezeichnung „Pasteurellosa“, weil das Bakterium dieser Gruppe gar nicht von Pasteur entdeckt wurde, und gegen die Bezeichnung „Septicaemia haemorrhagica“, weil einerseits Septikämien auch durch filtrierbare Erreger hervorgerufen und andererseits durch diese ovoiden, polgefärbten Bakterien häufig nur lokale oder auch chronische Prozesse und Krankheiten hervorgerufen werden können, die mit septikämischen gar nichts zu tun haben.

Hutyra tritt für die Bezeichnung *Bacillus bipolaris-septicus* ein, wobei durch die Vorausstellung des Tiergattungsnamens vor das 2. Beiwort die jeweilige entstandene Varietät leicht und klar bezeichnet werden kann.

Die Gruppe des *Bacillus bipolaris-septicus* Hutyra charakterisiert dieser Autor der Hauptsache nach wie Lignières, nur erweitert er diese Charakteristik dahin, daß auf Endo-Agar und Padlevski-Malachitgrünagar kein Wachstum stattfindet, wogegen die Stämme gut auf Drigalski-Agar gedeihen. Es fehlen ferner Hämolsine; Indolbildung ist dagegen manchmal vorhanden.

Die beiden von mir aus Meerschweinchenepizootien gezüchteten Bakterien sind typische Kokkobazillen, ausgesprochene Gürtelbakterien mit schöner Polfärbung bilden keine Sporen und erzeugen typische hämorrhagische Septikämie auf kutanem, pektoralem und intestinalem Wege. In frischen Agarkulturen finden sich neben kleinsten Stäbchen kleinste kokkenähnliche Gebilde, in älteren Kulturen zeigt sich deutlicher Polymorphismus. Das eine der beiden zeigt auf Kartoffel kein sichtbares Wachstum, das andere wächst ohne weiteres üppig, auch auf saurer Kartoffel in Form eines rötlich-grauen, schleimigen Rasens. Beide Bakterien haben aber Geißeln, sind lebhaft beweglich und vergären gewisse Zuckerarten unter Säurebildung. Sie bilden kein Indol und lassen die Milchreaktion unverändert.

Diese allgemeine Beschreibung und Gegenüberstellung zeigt ohne weiteres, wie unzureichend entweder die Gruppe „Pasteurella“ charakterisiert ist, oder wie groß die Widersprüche sind, wenn beide Nomenklaturen, sowohl jene von Lignières, als auch jene von Hueppe nebeneinander zu Recht bestehen, von denen die eine auf bestimmten charakterisierenden Merkmalen der Bakterien, die andere lediglich auf den Symptomen der Erkrankung aufgebaut sind.

Aehnliche Widersprüche finden wir aber bei Durchsicht der Literatur über die älteren, in dieses System eingereihten und aus verschiedenen Epizootien gezüchteten Bakterien früherer Forschungen ebenfalls vor, und zwar sowohl, wenn wir die einzelnen Angaben untereinander, als auch wenn wir sie mit den diese Gruppe als solche allgemein charakterisierenden Merkmalen vergleichen. Ich will an einigen Beispielen und, soweit mir die Literatur zur Verfügung steht, solche Widersprüche angeben, was in gewisser Beziehung allerdings schwierig ist, weil die Originalangaben oft sehr ungenau und nicht ausführlich genug sind, sich häufig nur auf pathologische Befunde und Angaben über Pathogenität im Sinne der Auffassung Hueppes und weniger auf morphologisches und kulturelles Verhalten der gefundenen Erreger beschränken.

So fand z. B. Galli-Valerio bei Hundestaupe einen bipolaren Ovalbazillus, den er zunächst als grampositiv und gelatineverflüssigend, später als gramnegativ und der Typhus-Coli-Gruppe nahe stehend bezeichnet und mit einem von Lignières bei Septikämie gefundenen Kokkobazillus und mit dem von Phisalis und Wunschheim isolierten *B. cavicida* identifiziert. Er nennt sein Stäbchen *B. cuniculicida* oder *caviperda*. Grampositiv ist ein von Jess bei Staupe isoliertes Stäbchen und kapselbildend der von Piorkowsky gezüchtete Kokkobazillus. Ferry fand einen kurzen, beweglichen Bazillus. Aus typisch septikämischen Erkrankungen des Meerschweinchen isolierte Kovarzik ein Stäbchen, das, obwohl Kokkobazillus, doch auf Grund morphologischer und kultureller Merkmale in die Coli-Gruppe verwiesen werden mußte, und ebenso glaubt Claussen auf Grund seiner Befunde, die Erreger der Geflügelseptikämie als pathogen gewordenen Hühner-Coli-Stämme auffassen zu müssen, wogegen Petrie und O'Brien den bei einer schwersten Septikämie der Meerschweinchen isolierten Bazillus von Aertryk- und supestifer-Stämmen nicht zu unterscheiden vermochten; allerdings glaubten sie, daß der eigentliche Erreger in die Gruppe des invisiblen Virus gehöre. Der von Schwer bei Meerschweinchenseptikämie gezüchtete Kokkobazillus, desgleichen das von Kraus bei Kanincheninfluenza gefundene Stäbchen wuchsen gut auf Kartoffeln; ein von Selter bei einer hämorrhagischen Kaninchenepizootie isoliertes Stäbchen zeigte eine schleimbüllenartige Kapsel und der Katzenscheuchbazillus von Gärtner bildete auffallend kräftig Indol. Die in allen Gruppencharakteristiken gelegnete Kapselbildung sahen Heim, Lehmann und Neumann häufig auftreten. Das von Fränkel und Pielsticker aus Osteomyelitis eines Mannes isolierte und stets in die Gruppe der hämorrhagischen Septikämie eingereihte *B. anthroposepticum* verflüssigte Gelatine, koagulierte Milch und zeigt ausgesprochen hämolytische Eigenschaften. Die von Karliński bei einer Septikämie der Steinhühner gefundenen Erreger, sind grampositiv, die von Klein bei derselben Erkrankung der Moorhühner gefundenen Stäbchen gut beweglich. Ein von Fränkel gezüchteter Stamm bringt Milch zur Gerinnung, ebenso zwei in Gießen gezüchtete Stämme (Lehmann). Beide von mir aus hämorrhagischer Meerschweinchenseptikämie gezüchteten Erreger sind lebhaft beweglich, vergären gewisse Zuckerarten, und einer von ihnen (Stamm II) wächst gut mit rötlich gelber Farbe auf der natürlich sauren Kartoffel.

Ich habe im Vorstehenden an einigen Beispielen von Erregern typischer septikämischer Epizootien Widersprüche mit den für diese Gruppe im allgemeinen als charakteristisch angegebenen Merkmalen hervorgehoben, und es ist dies um so bemerkenswerter, weil eine Reihe anderer, nicht besonders angeführter Eigenschaften doch wieder den für diese Gruppe aufgestellten Merkmalen entspricht. Daß ich hierbei auch einige Befunde bei Hundestaupe mitherangezogen habe, geschah aus

dem Grunde, weil erstens das pathologisch-anatomische Bild der Hundestaube vielfach dem einer hämorrhagischen Septikämie entspricht, andererseits die hierbei gezüchteten Stäbchen und Kokkobazillen, an anderen Laboratoriumstieren geprüft, hier zumeist typische septikämische Hämorrhagie verursachen. Dies führe ich nur an, ohne damit zur Frage der Aetiologie der Hundestaube selbst Stellung zu nehmen.

Auch sehe ich zunächst noch ab von jenen Untersuchungsergebnissen, bei denen die erhobenen Befunde weder unter sich, noch zur Gruppe selbst Widersprüche aufweisen, die vielmehr zur Aufstellung und Vereinigung einer scheinbar einheitlich geschlossenen Gruppe führten, und wende mich den eigenen Ergebnissen der Untersuchung folgender mir zur Verfügung gestandener Stämme zu:

1) *B. septic. haemorrhag.*, Truthahn, Magnusson, 2) *B. cholerae gallinarum*, 3) *B. caccosmus*, 4) *B. septicaem. haem.* L. u. N. *B. chol. gall.* Würzburg, 5) *B. suicida* Migula, Würzburg, 6) *B. phasianacida* Klein, 7) *B. chol. gallin.* Ficker, 8) *B. chol. gallin.* Piorkowski, 9) *B. suisepiticus* Sanfelice, 10) *B. d. südl. Rinderseuche*, Texasfieber, Billings, Piorkowski, 11) *B. suisepiticus* Aujeski, 12) *B. d. Kanarienvogelnekrose I.*, Schnürer, 13) *Coccob. avicida* Piorkowski, 14) *B. d. der Kanarienvogelnekrose*, Pfaff-Zeis, 15) *B. d. Kanarienvogelnekrose III.*, Schnürer, 16) *B. d. Kanarienvogelnekrose II.*, Schnürer, 17) *B. cuniculicida* Aujeski, 18) *B. d. Kanarienvogelseuche*, Pfaff, 19) *B. bronchisepticus* Ferry.

Leider müssen wir bei Beurteilung der Zugehörigkeit eines Stammes zur Gruppe „hämorrhagische Septikämie“ zunächst vom Ausfall der Immunitätsreaktionen, wie in der Coli-Gruppe, völlig absehen, weil ja, wie bekannt, gerade hier diese Reaktionen vielfach versagen und die Stämme meist nur durch ihre isohomologen Sera beeinflußt werden.

Um so mehr Gewicht müssen wir deshalb auf ausgesprochene und einzelnen Vertretern der Gruppe immer wieder gemeinsame und charakteristische, morphologische und kulturelle, biologische und pathogene Merkmale richten, um ihre Zusammengehörigkeit oder Differenzierung begründen zu können. Diese Forderung ist um so dringlicher zu betonen, weil der von Hueppe gewählte Vorgang, zur Aufstellung einer Bakteriengruppe lediglich die pathogenen Merkmale und die in Erscheinung tretenden pathologisch-anatomischen Veränderungen als Grundlage zu benützen, völlig falsch gewesen ist und nur Verwirrung in die Systematik gebracht hat. Dies ergibt sich für den speziellen Fall schon aus der Tatsache, daß nicht nur Bakterien, sondern auch invisible Virusarten im Tierkörper hämorrhagische Septikämie erzeugen können, ja daß vielmehr die von Hueppe selbst in diese Gruppe eingereihten Bakterien dieses Charakteristikum immer dann vermissen lassen, wenn ihre Virulenz abgeschwächt ist, und dadurch protrahierte oder chronische Prozesse entstehen, die höchstens zu eitrigen Peritonitiden, meistens zu rein lokalen Prozessen führen. Andererseits konnte ich mich überzeugen, daß Kapselbazillen aus menschlichem Nasensekret gezüchtet, wie auch Heim-Lehmann und Neumann, ferner Howard beobachtet haben, hämorrhagische Septikämie erzeugen können, ebenso wie eine ganze Reihe tierpathogener Stämme aus der Paratyphusgruppe. Letztere Tatsache führte ja auch zur Aufstellung der sogenannten „Salmonellosen“ oder „Salmonella“-Gruppe, resp. man stellte der „Pasteurellose aviaire“ die „Pasteurellose porcine“ und „Pasteurellose bovine“ gegenüber. Daß man aber trotz dieser Abtrennung zu keiner klaren Einteilung gelangt, zeigt die Stellung des beweglichen Frettchen-

seuchenbazillus Eberth und Schimmelbusch, des Erregers der Kaninchenseptikämie Eberth und Maudwy und vieler anderer.

Es wäre demnach wirklich an der Zeit, daß der Sammelname „hämorrhagische Septikämie-Erreger“ als Bezeichnung für eine bestimmte, im Systeme der Bakterien eingereihte Gruppe fallen gelassen würde, da sie Bakterien künstlich im Systeme vereinigt, die nicht zusammengehören, und daß getrachtet wird, auf Grund der morphologischen, kulturellen und biologischen Eigenschaften die Gruppierung durchzuführen.

Wie verhält es sich nun mit den von Lignières für die „Pasteurella-Gruppe“ gegebenen, charakterisierenden Merkmalen?

Zunächst sei erwähnt, daß schon Voges, obgleich er sehr für die Zusammengehörigkeit dieser Gruppe eintrat, zugeben mußte, daß, im Gegensatze zu den Lignièreschen Angaben, die Unbeweglichkeit kein Charakteristikum darstelle, daß es vielmehr bewegliche und unbewegliche Stämme gebe, und er stellte, entgegen der bisherigen einheitlichen Gruppe 2 Untergruppen der „beweglichen“ und der „unbeweglichen“ Stämme auf.

In neuester Zeit hat Plassay in einer Dissertationsarbeit nachweisen können, daß die Mehrzahl der von ihm untersuchten Stämme aus der „Pasteurella-Gruppe“ Geißeln trägt, auch solche, die oft unbeweglich erscheinen und nur unter gewissen Voraussetzungen ihre Geißeln aktivieren oder deren Beweglichkeit nur auf einzelne Individuen beschränkt bleibt.

Es war eben ein Fehler älterer Forschung, die Beweglichkeit oder Unbeweglichkeit mehr auf Grund sichtbarer Ortsbewegung als auf das Ergebnis exakter Geißelfärbungen zu fundieren, wie die Arbeit Plassays zeigt.

Was die anderen von Lignières für die „Pasteurella-Gruppe“ gegebenen Merkmale betrifft, so finden sich Polymorphismus und Involutionfähigkeit bei den meisten von mir untersuchten, besonders aber auch bei den von mir kultivierten beiden Stämmen von I und II vor. Während diese im Tierkörper meist als polgefärbte, ovoide, kleine Kokkobazillen erscheinen, bilden sie in frischen Agarkulturen oft winzigste, kleine, rundliche oder ovoide Formen aus, die sich neben den übrigen Kokken und Stäbchenformen nur wie Bruchteile derselben ausnehmen. Dagegen wachsen sie in Bouillonkulturen meist zu deutlichen, beweglichen Stäbchenformen aus, etwa in der Größe der Typhusbazillen, und geben die Kokkobazillenform auch in älteren Agarkulturen völlig auf. Gärtner sah seinen polgefärbten, kleinen ovoiden Kokkobazillus der Katzenseuche stets zu größeren Stäbchen auswachsen, wenn er ihn auf Mäuse übertrug, und umgekehrt. Aber diese Eigenschaft, ebenso wie die Polfärbung selbst, ist nicht absolut charakteristisch für Stämme der „Pasteurella-Gruppe“; findet man doch Polfärbung gar nicht selten auch bei tierpathogenen Angehörigen der Paratyphusgruppe.

Gelatine soll nicht verflüssigt, Milch nicht zur Gerinnung gebracht und ihre Reaktion nicht verändert werden. Alle von mir untersuchten Stämme zeigen nun tatsächlich keinerlei peptonisierende Wirkung auf Gelatine, bilden niemals Sporen, aber sie verhalten sich gegenüber der Milch nicht gleichmäßig, insofern zwar keiner der von mir geprüften Stämme die Milch innerhalb 4-tägiger Beobachtungszeit zur Gerinnung bringt, aber dennoch die Reaktion bei Lackmuszusatz deutlich durch roten Farbumschlag verändert, so B. chol. gall. Würzburg, suicida Migula, chol. gall. Ficker, chol. gall. Piorkowski, suisepticus Sanfelice, Bakt. der südl. Rinderseuche (Texasfieber), suisepticus Anjeszki, Coccobac. avicida Piorkowski; demnach 8 von 21 Stämmen.

Auf der natürlich sauren Kartoffel soll keine sichtbare Kultur zustande kommen, doch zeigen eigene Beobachtungen, daß eine ganze

Tabelle 1.

Wachstum, Zuckervergärung und Indolbildung bei verschiedenen Stämmen „hämorrhagischer Septikämie“-Gruppe.

Name des Stammes	Bouillon	Drigalski- Agar	Endo-Agar	Barsiekow				Gasbildung in		Indol		Kartoffel	Milch mit
				Milchzucker	Trauben- zucker	Mannitzucker	Maltose- zucker	Trauben- zuckeragar	Milch- zuckeragar	Ehrlich R.	Nitroso- indol R.		
1. B. septic. haem., Trut- hahn, Magnussen	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot trüb	rot trüb	rot trüb	—	—	—	—	+	—
2. B. cholerae galli- narum	Haut trüb	blau	farb- los	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. B. cacosmus	Haut trüb	röt- lich	röt- lich	—	rot trüb	—	—	+	+	—	Spu	+	—
4. B. septic. haem. L. u. N. B. gallin. Würzburg	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot koag.	rot koag.	rot koag.	—	—	—	—	+	—
5. B. suicida Migula Würz- burg	Haut trüb	rot	rot	rot koag.	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	+	+	+	+	—
6. B. phasaniacida Klein	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot trüb	—	rot trüb	—	—	—	—	—	—
7. B. chol. gallin. Ficker	Haut trüb	rot	rot	rot koag.	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	+	+	+	+	—
8. B. chol. gallin. Pior- kowski	Haut trüb	rot	rot	rot koag.	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	+	+	+	+	—
9. B. suisepiticus Sanfelice	Haut trüb	rot	rot	rot koag.	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	+	+	+	+	—
10. B. der südlichen Rinder- seuche Texasfieber Bil- lings	Haut trüb	rot	rot	rot koag.	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	+	—	—	+	—
11. B. suisepiticus Aujeski	Haut trüb	rot	rot	rot —	rot koag.	rot —	rot klar	+	+	+	+	+	—
12. B. der Kanarienvogel- nekrose I Schnürer	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot klar	rot klar	rot klar	—	—	—	—	—	—
13. Coccob. avicida Pior- kowski	Haut trüb	rot	rot	rot —	rot koag.	rot —	rot —	+	+	+	+	+	—
14. B. d. Kanarienvogelseuche Pfaff-Zeiss	klar Boden- satz	blau	farb- los	—	rot —	—	rot —	—	—	+	+	—	—
15. B. der Kanarienvogel- nekrose III Schnürer	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot —	—	—	—	—	—	—	—	—
16. B. der Kanarienvogel- nekrose II Schnürer	Haut trüb	blau	farb- los	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17. B. cuniculicida Aujeski	Haut trüb	blau	farb- los	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—
18. B. d. Kanarienvogelseuche Pfaff	klar	blau	farb- los	—	rot —	—	rot —	—	—	—	—	+	—
19. B. bronchisepticus Ferry	Haut trüb	blau	farb- los	—	—	blau —	—	—	—	—	—	+	—
20. B. der Meerschweinchen- seuche I Busson	Haut trüb	blau	farb- los	—	rot koag.	rot koag.	rot koag.	+	—	—	—	—	—
21. B. der Meerschweinchen- seuche II Busson	Haut trüb	blau	farb- los	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—

Reihe von Stämmen nach mehrtägiger Bebrütung auch auf der natürlichen Kartoffel wächst, wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist. Es ist möglich, daß einige Stämme diese Eigenschaft erst durch die längere Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden erworben haben, aber der eine der beiden von mir gezogenen Stämme Nr. II wächst, im Gegensatz zu Nr. I, von Anbeginn als rötlich oder gelblich-grauer, mattglänzender

Rasen gut auf der natürlichen, unpräparierten Kartoffelscheibe. Nach Lignières dürfen weiterhin die Angehörigen der „Pasteurella-Gruppe“ weder Indol bilden, noch Sporen und Geißeln besitzen. Was zunächst die Indolbildung betrifft, so liegen im Laufe der späterhin erfolgten genaueren Untersuchungen in der Literatur widersprechende Befunde vor, insbesondere gelang es in vielen Fällen, mit der von Ehrlich angegebenen Methode Indol nachzuweisen, wo die Nitrosoindolreaktion versagte. Aber auch mit der Nitrosoindolreaktion wurden bei typischer Hühnercholera und anderen Stämmen positive Ergebnisse erzielt, so daß das Fehlen der Indolreaktion als ein charakteristisches Merkmal für die Stämme der Pasteurella-Gruppe nicht mehr angesehen werden darf. Ueber die diesbezüglichen Ergebnisse meiner eigenen Untersuchungen gibt ebenfalls Tab. 1 Anschluß, und es zeigt sich, daß beide Untersuchungsmethoden, sowohl die Ehrlichsche, als auch die Nitrosoindolreaktion, in diesem Falle gleichlautende Resultate ergeben haben, und daß diese für eine Reihe von Stämmen positiv lauten, in guter Uebereinstimmung mit den Untersuchungen Plassays, die völlig unabhängig und zeitlich getrennt von meinen durchgeführt wurden.

Die Untersuchung auf Zuckervergärung, Säuerung und Gasbildung ergibt ebenfalls, wie die Tab. I zeigt, ein absolut verschiedenes Verhalten der einzelnen zur Gruppe „hämorrhagische Septikämie“ oder „Pasteurella“-Gruppe vereinigten Stämme, insofern eine größere Zahl derselben nicht nur aus verschiedenen Zuckerarten Säure bildet und das Eiweiß zur Koagulation bringt, sondern auch deutlich Gas bildet. Würde man nach diesem Verhalten Untergruppen aufstellen, so zeigt sich, daß selbst die zuckervergärenden Stämme wieder unter sich selbst deutliche Unterschiede aufweisen im Verhalten zu verschiedenen Zuckerarten.

Auch die von Hutyras gegebene Gruppencharakteristik hilft über diese Schwierigkeiten nicht hinweg. In Ergänzung des Vorausgesagten gibt auch in dieser Richtung wieder die Tab. I Aufklärung, und wir sehen bezüglich des Zuckergärvermögens etc. auch bezüglich des Wachstums auf Endo-Agar die Angaben Hutyras bei den von uns geprüften Stämmen nicht bestätigt.

Wir müssen demnach auf Grund der bisherigen Ergebnisse unserer Untersuchung annehmen, daß die Erreger der „hämorrhagischen Septikämie“ Hueppes und die Angehörigen der „Pasteurella-Gruppe“ Lignières untereinander oft ganz differente, im Systeme abstehende Arten vorstellen, die zwar unter gewissen Umständen gleiche oder ähnliche pathologische Prozesse hervorrufen, aber keine geschlossene Gruppe in der Systematik der Bakterien darstellen. Vielleicht gehören sie zu einem nicht geringen Teile in die großen Gruppen der Typhus-, Paratyphus- und Coli-Gruppe, ähnlich wie dies schon für verschiedene Schweine- und Rinderseuchenerreger tatsächlich nachgewiesen wurde, und dies um so mehr, als die Charakterisierung dieser Gruppe durch Lignières so weit gefaßt ist, daß, mit Ausnahme des geforderten fehlenden Wachstums auf der natürlichen Kartoffel und unter Berücksichtigung der von Voges aufgestellten beweglichen Untergruppe, die charakteristischen Merkmale auch für

die Angehörigen der Paratyphus- und Typhusgruppe angewendet werden könnten.

In Uebereinstimmung mit diesen Ergebnissen auf morphologischem wie biologischem Gebiete und der daraus sich ergebenden Schlußfolgerungen stehen auch die Resultate der serologischen Untersuchung.

Tabelle II. Agglutinationstabelle.

Nr.	Name des Stammes	Agglutinationstiter gegen die diversen Stämme der Sera von									
		Nr. 1	Nr. 5	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10	Nr. 13	Nr. 17	Nr. 20	Nr. 21
1	B. septic. haem. Truthahn, Mag-nussen	1000
2	B. cholerae gal-linarum	—
3	B. cacosmus	200	.
4	B. septic. haem. L. u. N. B. galli-narum Würzburg	200
5	B. suicida Migula Würzburg	.	2000
6	B. phasaniacida Klein
7	B. chol. gallina-rum Ficker	.	.	4000	100
8	B. chol. gallin. Piorkowski	.	.	.	1500
9	B. suisepcticus Sanfelice	1000
10	B. der südl. Rinder-seuche, Texasfieber Billing	500
11	B. suisepcticus Aujeszki	200	.	.	.
12	B. der Kanarien-vogelnekrose I Schnürer	200
13	Coccob. avicida Piorkowski	3000	.	.	.
14	B. d. Kanarienvogel-seuche Pfaff-Zeiss
15	B. d. Kanarienvogel-nekr. III Schnür.	300
16	B. d. Kanarienvogel-nekr. II Schnürer	406
17	B. cuniculicida Aujeszki	10 000	.	.
18	B. d. Kanarienvogel-seuche Pfaff	400
19	B. bronchosepti-cus Ferry	200	.
20	B. d. Meerschwein-chenreuche I Buss.	400	6000	300
21	B. d. Meerschwein-chenseuch. II Buss.	400	3000

Wie aus Tab. II ersichtlich ist, fehlen Verwandtschaftsreaktionen, sogenannte Familien- oder Gruppenreaktionen, bei den von mir untersuchten Stämmen fast vollständig; diese agglutinieren im allgemeinen nicht mit heterologen, sondern nur mit den isohomologen Seren.

Eine Ausnahme in gewissem Grade bildet nur das mit den Stämmen *B. septic. haemorrhag.*, Truthahn Magnussen, hergestellte Immunserum, das merkwürdigerweise außer dem ersten, von mir gezüchteten Stamm I, auch die 3 von Schnürer gezüchteten Kanarienvogelnekrosen und die Kanarienvogelseuche Pfaff mitagglutiniert, und so eine gewisse Zusammengehörigkeit dieser ebengenannten Stämme vermuten läßt, obwohl das mit meinem Stamm I erzeugte Serum die korrespondierende Mitagglutination dieser Stämme wieder vermissen läßt. Plassey hat mit der Komplementablenkungsmethode gearbeitet und ist zu dem Resultate gekommen, daß Gruppenreaktionen fehlen und nur homologe Sera positive Resultate geben.

Diese Befunde kann ich nunmehr auch für die Agglutinationsreaktion bestätigen. Es wurden 10 verschiedene Immunsera gegen 21 verschiedene Stämme geprüft, und das Ergebnis dieser Versuche lautet dahin, daß Verwandtschaftsagglutinationen, sogenannte Gruppenreaktionen, in der Gruppe der „hämorrhagischen Septikämieerreger“ fehlen, ganz in Uebereinstimmung mit den Angaben Chamberlands und Jouans, die selbst bei sehr hochwertigen Immunseris nur die isohomologen wirksam, die heterologen unwirksam fanden. Die Befunde Matsudas, nach denen bei Komplementablenkungsversuchen, allerdings nur mit sehr hochwertigen Immunseris, Gruppenreaktionen vorhanden sein sollen, finden durch die neuesten Untersuchungen Plasseys keine Bestätigung.

Wie verhält es sich nun mit den für die Praxis so wichtigen Fragen der Infektion und Immunität? Daß bei Bakterien, welche hämorrhagische Septikämie erzeugen, ihre Extrakte toxisch wirken können, steht außer Zweifel; aber es ist bisher noch nicht gelungen, diese Gifte darzustellen, ja es ist noch nicht einmal mit Sicherheit entschieden, ob es sich um Toxine resp. um Ekto- oder Endotoxine handelt.

Die ersten Angaben über ein filtrierbares Gift aus Hühnercholera, das Schlagsucht und Trunkenheit bei den Versuchstieren hervorruft, stammen von Pasteur selbst. Salmon und Stang bestätigen diese Befunde, und konnten mit diesen Giften Tauben töten. Das Gift erwies sich gegen thermische und chemische Reize außerordentlich widerstandsfähig.

Klett und Braun hatten ein ähnlich wirkendes Gift in Händen, aber auch ihnen gelang es niemals, mit diesem Gifte Immunität oder ein antitoxisches Serum zu erzeugen; dies war nur möglich, wenn die betreffenden Kulturen selbst zur Injektion benützt wurden, Angaben, die auch von Foà und Bonome bestätigt wurden. Die Giftigkeit der Kulturen als solche wurde wiederholt nachgewiesen und insbesondere von Voges näher studiert. Er fand, daß das Gift der Hühnercholera, Schweineseuche, Wildseuche etc. erst in alten 60-tägigen Kulturen durch Autolyse aus den Bakterienleibern frei wird, und, in die Kulturflüssigkeit übergehend, filtrierbar wird. Es wird durch Toluol, Siedehitze und Alkohol geschädigt. Zwischen Giftbildung und Virulenz besteht keine Parallele. Auch MacFadyean und Seeberg wiesen ähnliche Endotoxine nach, während Novy aus den Bouillonkulturen eine giftige basische Substanz herstellte, die er Susotoxin nannte. In keinem einzigen Falle gelang es aber, mit diesen Giften ein antitoxisches Serum zu erzeugen. Bail und Citron machen für das Zustandekommen der hämorrhagischen Septikämie in erster Linie die Aggressine verantwortlich, die eine negative Chemotaxis, nach Wassermann eine Behinderung der Bakteriolyse hervorrufen, und außerdem primär die Invasion anderer Keime vorbereiten. Calter und Violet erzeugten das typische Bild hämorrhagischer Septikämie durch Aufgüsse fauler oder verdorbener Futterpflanzen, und finden dann ähnliche Toxine im Speichel und im übrigen Körper kranker, aber auch gesunder Rinder vor.

Die Frage nach der Natur der Gifte der hämorrhagischen Septikämie ist demnach bislang wohl noch als ungeklärt anzusehen; vielleicht hatten die Experimentatoren überhaupt nur einen dem Sepsin ähnlichen Körper in Händen gehabt.

Zahlreich sind die Versuche, aktive Immunität durch Vakzination und passiven Schutz durch Immunsera zu erreichen.

Als erster versuchte Pasteur selbst durch Injektion abgeschwächter (Vakzine I) und später mit virulenter Kultur (Vakzine II) Geflügel gegen Hühnercholera zu immunisieren, aber die Methode konnte den Anforderungen der Praxis nicht standhalten. An den Injektionsstellen bildeten sich große Schorfe, die abfielen und Anlaß zu neuen Infektionen gaben, und trotz der Vakzination starben viele Tiere.

Es wurde übrigens vielfach beobachtet, daß auch das Ueberstehen einer natürlichen Infektion mit Geflügelcholera in sehr vielen Fällen an Stelle der erwarteten Immunität gesteigerte Empfänglichkeit für Reinfektionen zurückließ.

An diese ersten Versuche Pasteurs schließt sich eine Reihe von Autoren an, die durch Vakzination mit abgetöteten oder abgeschwächten Kulturen Impfschutz zu erreichen suchten und über günstige Erfolge berichten: außer Lignières, Schwerd und Silberschmidt, dann Hertel und Ferry gegen Staupe, wogegen Jakobitz, Voges, Volk und andere nur negative Resultate erzielen konnten. Die von einigen Autoren beobachtete Gruppenimmunität, insofern Hühnercholeraimpfung auch gegen Schweineseuche, Wildseuche etc. Schutz verleihen soll, und umgekehrt ist nicht ohne beachtenswerten Widerspruch geblieben. Gärtner versuchte mit Bauchhöhlenexsudat gefallener Tiere zu immunisieren.

Allgemein darf man wohl sagen, daß die Vakzination keinen sicheren Schutz bringt, jedenfalls aber den Anforderungen der praktischen Verwendbarkeit nicht entspricht.

Um so zahlreicher waren deshalb die Versuche, die darauf abzielten, auf passivem Wege durch Einverleibung von Immunseris Schutzwirkung zu erzielen. Die große Schwierigkeit, derartige Immunsera herzustellen, hat denn auch zur Anwendung der verschiedensten Antigene geführt, und ebenso verschieden sind die Angaben über den Wert und die Brauchbarkeit der so gewonnenen Sera.

Abgetötete oder abgeschwächte Kulturen verwandten zur Immunisierung Lignières und Spitz, Klett und Braun, Schreiber und Schubert, Schreiber und Landberg, Casper, Hertel, Pierkowski, Jeß und andere. Die Versuche richten sich gegen Geflügelcholera, Schweineseuche, Hundestaupe, Wildseuche etc. Die Ergebnisse lauten im allgemeinen dahin, daß die Sera nur gegen einen oder einige bestimmte Stämme, mit denen sie erzeugt wurden, wirksam sind, weshalb für die Praxis derartige Sera möglichst polyvalent sein müssen, ja daß es oft nötig ist, die Wirkung durch simultane Impfung mit Bazillenextrakt (Wassermann und Oster-tag) oder nachträgliche Kulturinjektion (Kitt, Braun und Klett) zu verstärken, und daß man selbst dann noch mit großen Verlusten rechnen muß: Jeß impfte vor dem Immunserum frisches Pferdeserum bei Hühnercholera, um so Komplement einzubringen und die Wirkung aussichtsreicher zu gestalten. Da die mit Kulturen erzielten Erfolge nur selten einwandfrei befriedigende Resultate gaben, versuchten Gärtner gegen Katzensuche, Huntemüller und Titze gegen Geflügelcholera, Wassermann gegen Schweineseuche mit Bauchhöhlenexsudaten (Aggressinen) Immunsera herzustellen, ferner mit Autolysaten Klett und Braun, mit Bakterienextrakten Citron, ferner Wassermann und Citron und mit Albumosen Schweinitz.

Wie schwierig es ist, ein praktisch brauchbares Serum auch nur gegen eine Gruppe herzustellen, geht aus der Forderung von Wassermann und Citron hervor, die besagen, daß man das Serum mehrerer immunisierter Pferde mischen muß, die ihrerseits wieder mit verschiedenen Stämmen immunisiert wurden, und dazu Serum von Pferden beifügen muß, die nur mit Extrakten behandelt wurden. Bei der Auswertung solcher Seris ergab sich aber immer noch ein großer Spielraum, der in der Individualität der Verruchstiere, selbst solchen der gleichen Art, gelegen ist, so daß oft Tiere mit hohen Serumdosen sterben, solche mit kleinen überleben.

Gegen die Brauchbarkeit von Immunseris gegen Erreger der hämorrhagischen Septikämie im allgemeinen wenden sich vorwiegend Voges, ferner Niebel und Hofmann, Kitt und seine Mitarbeiter und im besonderen bei Schweineseuche Uhlenthuth und Haendel. Die Misserfolge sind ja nicht zu verwundern, da scheinbar ganz verschiedene Erreger die Ursachen der einzelnen Epizootien sind.

Nun geht aber aus den Beobachtungen Kitts bei Geflügelcholera, Gärtners für Katzensuche als unzweifelhaft hervor, daß dem Blute von Tieren, welche entweder die Pasteursche Vakzination oder die natürliche Infektion überstanden haben, eine

deutlich nachweisbare Schutzwirkung bei passiver Uebertragung, aber nur in ein und derselben Epizootie, zukommt, ja daß man überhaupt wiederholt nur dort günstige Erfolge erzielte, wo gegen ein und denselben Erreger eine Immunotherapie, und zwar lediglich mit dem ihm isohomologen Immunserum, versucht wurde. Im gegenteiligen Falle sieht man bei praktischer Anwendung vielfach nur sehr wechselnde Erfolge, und meist nur dort eintreten, wo mit sehr polyvalenten Seris gearbeitet wird, die eben gerade für den betreffenden Erreger abgestimmte Immunkörper enthalten, die bei Anwendung auf einen anderen Fall fehlen.

Alle diese Umstände scheinen unter Berücksichtigung des Vorhergesagten wiederum für die Verschiedenheit der Erreger der hämorrhagischen Septikämie zu sprechen, insofern, als sozusagen fast jede Epidemie, jeder Erreger ihre Eigenheiten haben, ihr eigenes isohomologes Schutzserum verlangen, das nur durch ein sehr polyvalentes Serum in der Praxis ersetzt werden kann. Die hin und wieder beobachteten, wenn auch unbefriedigenden Heilerfolge verlieren überdies sehr an Bedeutung, wenn wir die interessanten Beobachtungen von Voges mit zur Grundlage unserer Beurteilung heranziehen.

Voges konnte zeigen, daß man durch vorausgehende Injektion von Normalserum Meerschweinchen gegen die nachfolgende Infektion schützen kann, und zwar genügt 0,1 ccm, um die 50-fache tödliche Menge hochvirulenter Kultur von Schweineseuche, Hühnercholera, Wildseuche etc. selbst bei intraperitonealer Einverleibung wirkungslos zu gestalten. Voges führt diese Wirkung auf eine Resistenzerhöhung zurück, auf Kräfte, die im Organismus selbst gelegen und erst durch die Seruminjektion ausgelöst und zur Wirkung gebracht werden. Denn daß die schützende Kraft nicht im Normalserum selbst gelegen ist, beweist der Umstand, daß in allen Versuchen, wo dieses direkt der Kultur beigemischt wurde, die Tiere gleich den Kontrollen starben. Auch die Leukozytose hat nach Voges keinen wesentlichen Anteil an diesen Ergebnissen; es sind andere Kräfte, die diese Resistenzerhöhung ausmachen. Diese Befunde stehen in Uebereinstimmung und finden eine neuerliche Stütze durch meine eigenen experimentellen Versuche über die Beeinflussung der Diphtheriegiftempfindlichkeit. Voges nimmt mit Recht an, daß man auch in jenen Fällen nur eine kurzdauernde Resistenzerhöhung erzielt hatte, wo man scheinbar auf aktivem oder passivem Wege Schutzwirkung gegen Septikämieerreger erzielte, die es in Wahrheit nicht gebe, und für welche Annahme schon die außerordentlich kurze und von allen Autoren zugestandene ungenügende Dauer der Schutzwirkungen, die erreicht wurden, sprechen.

Auch nach dieser Richtung hin habe ich eigene Versuche ausgeführt, um so mehr, als der von mir gezüchtete Stamm I, der so hohe Pathogenität für die verschiedensten Arten von Versuchstieren aufwies, ganz besonderes Interesse verdiente und zum Studium dieser Fragen vorweg sehr geeignet schien.

Weiterhin wählte ich zu diesem Zwecke außer dem genannten Stamme noch einen Hühnercholera Stamm (Nr. 2) aus der Krälschen Sammlung, nachdem dieser Stamm für Meerschweinchen pathogen gemacht worden war, in Uebereinstimmung mit den Angaben von Tjaden, Katz und Voges. Auf diese Weise konnte ich zwei verschiedene Vertreter der Septikämiegruppe, von denen einer allen Forderungen Lignières entsprach, und die sich morphologisch und biologisch voneinander unterscheiden, sowohl in ihrem eigenen als auch wechselseitigen Verhalten in bezug auf antitoxische Immunität prüfen. Die Wahl mußte nämlich mit Rücksicht auf die außerordentliche Knappheit der zur Verfügung stehenden Versuchstiere sehr eng begrenzt werden.

Als erstes muß ich erwähnen, daß es mir bei keinem der beiden Stämme möglich war, lösliche Toxine in den Bouillonfiltraten nachzuweisen, wenigstens nicht in einer Menge, die deutliche und spezifisch erscheinende Reaktionen gegeben hätte. Geprüft wurde an Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen. Ja selbst die Filtrate aus mehrere Monate alten Bouillonkulturen erwiesen sich nur wenig toxisch, Meerschweinchen

vertrugen 2—3 ccm intraperitoneal fast ohne wesentliche Störung. Hier steht also tatsächlich die Virulenz in keinem Verhältnis zur Toxizität.

Eine Vakzination von Meerschweinchen mit abgetöteten Kulturen zeitigte gegen meinen Stamm I keinerlei aktive Immunität; bei Hühnercholera trat der Tod um 16—24 Std. später ein. Die Vakzination bestand in 3 aufeinanderfolgenden Injektionen in 3-tägigen Intervallen mit je 250 000 Keimen im Kubikzentimeter, und 8 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Infektion mit virulenter Kultur.

Die Vorbehandlung mit Filtraten mehrere Monate alter und der Autolyse unterworfenen Bouillonkulturen ergab in beiden Fällen eine Verzögerung des Todes der Versuchstiere; die mit Hühnercholera vorbehandelten starben 2—3 Tage, jene mit Filtration Stamm I behandelten Meerschweinchen erlagen der Injektion 5—7 Tage später als die unvorbehandelten Kontrolltiere.

Wenn die Versuchstiere mit Filtraten der Exsudate von Meerschweinchen, die nach Infektion mit Stamm I gestorben waren, vorbehandelt worden waren, war ebenfalls eine Verzögerung des Todes zu konstatieren, von 3 Tieren starb 1 innerhalb 12 Std., das 2. nach 3, das 3. nach 7 Tagen, also eine deutliche Prolongierung des Lebens gegenüber den Kontrolltieren, die stets innerhalb 8—24 Std. derselben Infektion erlagen. Dabei sei erwähnt, daß stets Versuchstiere von annähernd gleichem Gewicht gewählt wurden. Da mir nicht genügend Exsudat von Hühnercholertieren zur Verfügung stand, habe ich bei Infektionsversuchen mit Hühnercholera die Versuchstiere vordem ebenfalls mit Exsudat der Seuche St. I vorbehandelt. Es ergab sich dabei eine ähnliche Verzögerung des Eintritts des Todes, wie im vorstehenden Versuche, wo dasselbe Exsudat und derselbe Stamm verwendet wurden.

Kaninchen, die mit Autolysaten von St. I oder Hühnercholera vorbehandelt worden waren, ergaben ein Serum, das, am Meerschweinchen geprüft und gleichzeitig unmittelbar nach der Infektion in Mengen von 2—3 ccm intraperitoneal injiziert, Verzögerung des Todes um mehrere Tage (4—7) bewirkte, gegenüber Kontrolltieren, die mit Normalkaninchenserum behandelt wurden, bei denen die Verzögerung des Todes gegenüber gewöhnlichen Kontrolltieren aber ebenfalls 1—2 Tage betrug. Wechselwirkend konnte diese ohnehin beschränkte Schutzkraft beider Sera gegenüber dem heterologen Stamm nicht konstatiert werden; die Sera verzögerten dann lediglich den Eintritt des Todes, wie dies im selben Ausmaße auch bei Normalseris beobachtet wurde.

Immunisierung mit Eiweißabbauprodukten wurden ebenfalls versucht. Agarabschwemmungen von Meerschweinchenseuche I wurde nach dem von Joannović für Tuberkulose und maligne Geschwülste angegebenen Verfahren der künstlichen Verdauung unterworfen und ein Teil dieser Produkte wurde durch Kerzenfiltration, der andere durch Kochen sterilisiert. Mit beiden Präparaten wurden sowohl Meerschweinchen als auch Kaninchen injiziert. Beide Präparate erwiesen sich sehr giftig, besonders das nur der Filtration unterworfenen Verdauungsprodukt, von dem 0,25 ccm für 300 g schwere Meerschweinchen intraperitoneal 1 ccm für Hasen, intravenös einverleibt, häufig akut tödlich wirkten. Der Sektionsbefund zeigte gewisse Ähnlichkeit mit dem bei hämorrhagischer Septikämie, insofern Ekchymosen, Petechien etc. allgemeine Hyperämie im Darne und den Organen, sowie etwas blutig-seröses Exsudat in den großen Körperhöhlen nachweisbar waren. Dennoch war es nicht möglich, die Giftwirkung dieser Präparate mit jener bei septikämischen Pro-

zessen sicher zu identifizieren, und es wäre ja immerhin möglich, daß es sich um ein dem Sepsin ähnliches Abbauprodukt handeln könnte. Um dieser Frage näher zu kommen, wurde in gleicher Weise ein Präparat aus Shiga-Kruse-Bazillen und Paratyphusbazillen hergestellt. Das Shiga-Präparat erwies sich, bei intravenöser Injektion an Kaninchen und Meerschweinchen geprüft, als ungiftig, woraus geschlossen werden darf, daß einerseits kein dem Sepsin ähnliches Abbauprodukt durch dieses Verfahren gebildet, andererseits das labile Endotoxin bei der Verdauung zerstört wurde. Das aus Paratyphusbazillen gewonnene Abbauprodukt zeigte deutliche, wenn auch viel schwächere Giftwirkung, wie das aus Meerschweinchenseuche gewonnene, insofern 2 ccm intravenös am Kaninchen, 1 ccm bei Meerschweinchen mit wesentlichen Störungen, aber doch allgemein vertragen wurden. Es dürfte also die Giftigkeit der auf diese Weise gewonnenen Abbauprodukte bei St. I doch vielleicht ähnlich jenen giftigen Autolysaten sein, die Voges nach monatelangem Stehen seiner Bouillonkulturen erhielt.

Möglicherweise liegen bei St. I, der ja auch sonst der Paratyphusgruppe sehr nahe steht, ähnliche Verhältnisse wie bei Paratyphusbazillen vor. Die Gifte der Paratyphusbazillen sind in den Kulturflüssigkeiten bei Laboratoriumsversuchen, selbst bei frisch gezogenen giftigen Stämmen, oft nur schwer nachweisbar, besser wirken Extrakte oder Autolysate der Bakterien selbst. Die Gifte der Paratyphusarten stehen, wie man annimmt, den Peptonen in ihrer chemischen Konstitution nahe, und damit steht einerseits ihre gesteigerte Thermostabilität, andererseits die Schwierigkeit, vielleicht Unmöglichkeit, mit ihnen Antitoxine zu erzeugen, in Zusammenhang. Wenn nun bei den Septikämieerregern ähnliche Verhältnisse, ähnliche Konstitution der Gifte vorliegen würde, dann wäre einerseits erklärt, warum trotz des Verdauungsverfahrens und trotz des Erhitzens des so gewonnenen Präparates noch wirksame Gifte erhalten bleiben, ganz aus demselben Grunde, wie bei Paratyphusarten, weil das den Peptoncharakter tragende Gift weder durch Verdauung noch durch Erwärmen über 70° ganz vernichtet wird.

Mit diesem aus St. I auf dem Wege der künstlichen Verdauung gewonnenen Präparat wurden Meerschweinchen und Kaninchen vorbehandelt, und zwar mit je 3 Injektionen von 0,2 ccm in 6-tägigen Intervallen. Trotzdem starben einige Tiere; 10 Tage nach der letzten Injektion wurden die Meerschweinchen auf aktive Immunität und auch das Kaninchenserum auf antitoxische resp. bakteriolytische Wirkung geprüft. Diese Prüfung geschah in der Weise, daß das Serum $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Std. sowohl vor als auch nach intraperitonealer Infektion der Meerschweinchen in Mengen von 2 ccm injiziert wurde. Alle Versuchstiere sind der Infektion erlegen, sowohl die aktiv vorbehandelten als auch die mit dem Serum der Kaninchen geimpften Meerschweinchen, aber überall trat eine 2—4-tägige Verzögerung des Todes gegenüber den Kontrolltieren ein.

Diese merkwürdige Verzögerung des Eintrittes des Todes gegenüber den Kontrollen, die wir so häufig in unseren Versuchen gesehen haben, die auch immer und immer wieder in der Literatur bei Besprechung des Erfolges einer versuchten Vakzination oder Serotherapie gegen die hämorrhagischen Septikämieerreger eine Rolle spielt, ist so merkwürdig oft und bei verschiedenster Vorbehandlung in Erscheinung getreten, daß ich geneigt wäre, dieses Phänomen weniger mit einer spezifischen Immunwirkung der Vorbehandlung, als vielmehr mit einer

damit zusammenhängenden Resistenzsteigerung in Zusammenhang zu bringen. Welche Rolle der Resistenzsteigerung des Organismus gerade gegenüber der Infektion mit den Erregern der hämorrhagischen Septikämie zukommt, deckte in überzeugender und einwandfreier Weise ja schon Voges mit seinen Normalseruminjektionen in die Nackengegend der Versuchstiere auf. Er konnte nicht nur auf diese Weise Tiere selbst vor 50-fach tödlicher Dosis schützen, sondern tatsächlich den Nachweis erbringen, daß es wirklich die durch die Seruminjektion hervorgerufene Reaktion des Organismus, nämlich die Umstimmung, die Erhöhung der Resistenz ist, welche diese Schutzwirkung erzeugt, und nicht von irgendwelchen im Serum selbst gelegenen Schutzkräften abhängt. Das Serum übt lediglich auf den Organismus eine Reizwirkung aus, die jene Kräfte lebendig werden läßt, die sich als gesteigerte Resistenz gegenüber der Infektion zu erkennen geben. Voges kommt auf Grund seiner ausgedehnten Versuchsreihen mit Hühnercholera, Wildseuche, Hog-Cholera und Schweineseuche zu dem Resultate, daß man weder Kaninchen noch Meerschweinchen aktiv oder passiv immunisieren kann, daß die kurz dauernde scheinbare Immunität, die man durch Vakzination oder Seruminjektionen erzielt, immer nur in einer Resistenzzerhöhung begründet sind. Und es ist auffallend, daß die Epizootien der hämorrhagischen Septikämie am häufigsten nach vorausgegangenen äußeren Schädlichkeiten, wie andauernd feuchtes Wetter, Futterwechsel, oder Verwendung schon verdorbener Futters, wodurch die natürliche Resistenz der Tiere herabgesetzt wird, aufzutreten pflegen.

Wenn ich demnach die letzten Ergebnisse zusammenfasse, so muß ich sagen, daß es mir, wie so vielen Autoren vor mir, ebenfalls nicht gelungen ist, gegen hämorrhagische Septikämieerreger aktiv oder passiv zu immunisieren.

Zusammenfassung.

Die Gruppen „hämorrhagische Septikämie“ Hueppe oder „Pasteurellosa“ Lignières werden in der Systematik der Bakterien als identisch geführt, obwohl beide Autoren ganz verschiedene artcharakterisierende Merkmale für ihre Gruppe angeben.

Dadurch wurden viele Formen zusammengereicht, die wohl der weitgehenden Auffassung Hueppes entsprachen, aber vielfach nicht nur jene von Lignières gestellten Bedingungen nicht oder nur teilweise erfüllen, sondern auch untereinander weitgehende Differenzen aufweisen. Was speziell die bipolare Färbung als Charakteristikum betrifft, so findet sie sich einerseits auch bei Typhus und Paratyphus, insbesondere aber bei Rattinstämmen, andererseits kann sie bei ausgesprochener Septikämieerregern fehlen (Lehmann, Neumann), oder bei älteren Stämmen der Pasteurella-Gruppe auch verloren gehen. Die Polfärbung scheint überhaupt bis zu einem gewissen Grade von der Färbetechnik resp. von der Art der Fixation abhängig zu sein. Dazu kommt noch, daß das pathologisch-anatomische Bild der „hämorrhagischen Septikämie“ auch eine Reihe anderer Bakterien erzeugen kann, wie Pest, Milzbrand, Typhus, Paratyphus und Rattinbazillen, ferner einige Kapsel- und Streptobazillen.

Auch unter Anwendung der Immunitätsreaktionen, soweit dies die Agglutination betrifft, konnten bei den dieser Gruppe zugerechneten Stämmen weder Familien- noch Gruppenreaktionen nachgewiesen werden, in Uebereinstimmung mit den Komplementablenkungsversuchen Plasseys.

Weder auf aktivem noch passivem Wege konnten die Versuchstiere immunisiert werden; dagegen scheint bei der Infektion die Erhöhung oder Herabsetzung der Resistenz eine wesentliche Rolle zu spielen, was sogar Immunität vortäuschen kann, wie Voges zeigte. Dies alles spricht für die Verschiedenheit der Erreger hämorrhagischer Septikämien.

Wenn trotzdem eine der hämorrhagischen Septikämie entsprechende Gruppe im System beibehalten werden soll, dann müßte diese unter Zugrundelegung der von Lignières für die Pasteurella-Gruppe gegebenen und von Voges erweiterten Charakteristik revidiert werden, und alle jene Stämme, die ihrem morphologischen und biologischen Verhalten nach in andere Gruppen gehören und nur fälschlich hier eingereiht wurden, unbeschadet des Umstandes, daß sie auch hämorrhagische Septikämie erzeugen, in jene Gruppen verwiesen werden.

Ein Teil der heute in die Gruppe hämorrhagische Septikämie eingereihten Stämme gehört zweifellos in die Paratyphus- und Coli-Gruppe.

In neuester Zeit haben auch Přibram und Plassey, diesem Bedürfnisse Rechnung tragend, die Gruppe der hämorrhagischen Septikämie einer Revision unterzogen und schlagen dafür, der Nomenklatur Lehmanns folgend, den Namen *Bacteria multoseptica* vor, wobei sie nach Art der Begeißelung und Zuckervergärung der einzelnen Stämme mehrere Untergruppen aufstellen. In diesen werden neben einer der Lignièreschen Auffassung entsprechenden Gruppe auch die paratyphusähnlichen Stämme in eine Untergruppe eingereiht.

Literatur.

Beck, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 15. — Braun u. Klett, Dtsch. tierärztl. Wochenschrift. 1900. — Brieger, Berlin. klin. Wochenschr. 1884. — Bruck, Zeitschr. f. Hyg. 1904. — Busson, Zeitschr. f. die ges. experim. Med. 1919. — Byloff, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. — Casper, Handb. von Kraus-Levaditi. II. — Chamberland u. Jouan, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1906. — Citron, Zeitschr. f. Hyg. 1906; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38, 39, 40. 1905. — Citron u. Putz, Zeitschr. f. Hyg. 1907. — Clausen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 41. — Czaplowski u. Hendel, Dtsch. med. Wochenschr. 1897. — Eberth u. Schimmelbusch, Fortschr. d. Med. 1888; Virch. Arch. 1889. — Ferry, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 48. u. Amer. veterin. Rev. 1910. — Fraenkel u. Pielsticker, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 64. — Frank, Dtsch. Zeitschr. f. Tiermed. Bd. 6. — Galli-Valerio, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 17. — Gärtner, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. — Hertel, Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte. 1903. — Hueppe, Berlin. klin. Wochenschr. 1886. — Huntemüller, Centralbl. f. Bakt. Bd. 36. 1906. — Hutyra, Handb. v. Kolle-Wassermann. VI. — Jakobitz, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 32. — Jensen, Monatsh. f. Tierheilk. 1891. — Jeß, Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1900 u. 1901; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 25. — Karliński, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 7, 25. 1890. — Katz, Baumgartens Jahresber. Bd. 5. — Kitt, Handb. v. Kolle-Wassermann. II. u. VI. — Ders., Monatsh. f. Tierheilk. 1905. — Ders.,

Sitz.-Ber. d. Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol., München 1885. — Klein, Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. — Klett u. Braun, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1904. — Kovarzik, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 33. — Kraus, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24. — Kregonow, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 50. — Leklansche, Ann. de l'Institut. Pasteur. 1894. — Lignières, Laborat. de l'Assoc. des Hacendelos, Buenos Aires. 1900. — Ders. u. Spitz, Rev. vétér. 1902. — Marx, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 47. — Matsuda, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 66. — Niebel u. Hoffmann, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1900. — Novy, Med. News. 1890. — Pasteur, Compt. rend. de l'Acad. de science, Paris 1880. — Petriè and O'Brien, Journ. of Hyg. 1910. — Pierkowski, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1905. — Phisalis, Acad. de scienc. 1901. — Salmon, Foà u. Bonome, Zeitschr. f. Hyg. 1889. — Salmon, Rep. of the Commiss. of Agricult. 1887. — Schantyr, Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 13. — Schreiter, Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1902. — Ders. u. Landsberg, Ebenda 1899. — Schubert, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1904. — Schweinitz, Bur. of animal Industry. 1903 u. 1904. — Semmer, Dtsch. Zeitschr. f. Tiermed. 1875. — Selter, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41. — Silberschmidt, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1895. — Strada, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. — Stang, Inaug.-Dissert., Bern 1901. — Sudmensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38. — Titze, Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. 1906. — Tjaden, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 25. — Uhlenhuth u. Haendel, Handb. v. Kolle Wassermann. VI. — Voges, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 23. — Volk, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 31. — Wassermann, Handb. v. Kraus-Levaditi. II. — Wassermann u. Citron, Dtsch. med. Wochenschr. 1905. — Wunschheim, Baumgart. Jahresber. 1907.

Nachdruck verboten.

Zur Gasbrandfrage.

Von Dr. S. Well, Privatdozent für Chirurgie.

An anderer Stelle habe ich über zahlreiche, am Hygienischen Institut der Universität Breslau ausgeführte Experimente auf dem Gebiete der Gasbrandfrage berichtet^{1) 2)}. Es sei gestattet, hier die Resultate dieser Untersuchung kurz zusammenzufassen:

Das Hauptergebnis dieser Versuche ist, daß das Zustandekommen der Gasbrandinfektion in hohem Maße abhängig ist einerseits vom Zustand des infizierten Gewebes und seiner Fähigkeit, Abwehrkräfte ungehindert in Aktion treten zu lassen, andererseits von der augenblicklichen Virulenz der infizierenden Bakterien. Jede Art der Gewebeschädigung, sei sie chemischer oder mechanischer Natur, hat den Erfolg, daß schon geringe Bruchteile der normal tödlichen Dosis genügen, um den Tod der Versuchstiere herbeizuführen, während umgekehrt ein Vielfaches der tödlichen Dosis von Gasbranderregern, die durch Erhitzen abgeschwächt sind, ohne weiteres ertragen wird. Derartig abgeschwächte Bazillen entfalten aber sofort wieder ihre deletäre Tätigkeit, wenn sie in mechanisch gequetschtes, oder chemisch nekrotisiertes Gewebe gebracht werden, oder wenn sie durch eine beliebige, an sich ungefährliche Mischinfektion oder durch Fremdkörper einen Rückhalt finden.

Eine besonders starke muskelnekrotisierende Wirkung entfaltet nun das Fickersche Toxin des malignen Oedems. Die Experimente berechtigen zu der Auffassung, daß die Infektion in diesem Toxin ihren Schrittmacher findet; sie sprechen dafür, daß die Infektion mit malignen

1) München. med. Wochenschr. 1919. Nr. 37.

2) Bruns' Beitr. z. klin. Chir. Bd. 120. H. 3.

Oedembazillen eine Muskelerkrankung darstellt, weil das Oedemtoxin ein Muskelgift ist. Weitere Experimente beweisen, daß abgeschwächte Gasbranderreger im Tierorganismus nicht völlig abgetötet werden, sondern längere Zeit in Form einer ruhenden Infektion im Gewebe liegen bleiben können, und daß durch neue Eingriffe ein Aufflackern der ursprünglichen Infektion bewirkt werden kann.

Es sei an dieser Stelle gestattet, Herrn Geheimrat Pfeiffer für alle die Förderungen bei diesen Untersuchungen und Fräulein E. Schulz vom Hygien. Institut für ihre unermüdliche Beihilfe bei den Versuchen meinen besten Dank auszusprechen.

Nachdruck verboten.

Das Verhalten der Ruhrbazillen und der Typhus-Coli-Bazillen in eiweißfreien Lackmusnährböden.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes.]

Von Dr. med. **Hans Schmitt.**

In Heft 2 des 84. Bandes dieser Zeitschrift berichteten v. Werdt und Kopatschek über das Verhalten der Ruhrbazillen in eiweißfreien, flüssigen Nährböden, die außer Kochsalz, sekundärem Kaliumphosphat, tertiärem Natriumphosphat und Asparaginsäure die üblichen Zuckerarten bzw. Mannit sowie Lackmustinktur enthielten.

Werden derartige Nährböden mit den verschiedenen Vertretern der Typhus-Coli- und Ruhrgruppe beimpft und im Brutschrank bis zu 8 Tagen gehalten, so beobachteten die genannten Autoren, daß die Bazillen der Ruhrgruppe die Nährböden überhaupt nicht veränderten, während die Vertreter der Typhus-Coli-Gruppe die Veränderungen in derselben typischen Weise wie in Barsiekowschen Nutrosenährböden hervorriefen. Bei Ueberimpfungen aus den eiweißfreien Nährböden auf Endo-Agar und gewöhnlichen Agar wurden die Ruhrbazillen ebenso wie die Typhus-Coli-Bazillen lebensfähig befunden; sie zeigten aber oft ziemlich schwaches Wachstum. Frisch aus dem menschlichen Körper isolierte Stämme gingen aber im eiweißfreien Nährmedium nicht an, sondern mußten erst mehrmals auf gewöhnlichem Agar umgezüchtet werden.

Infolgedessen kann dieses Verfahren für die praktische Diagnosenstellung nicht in Frage kommen. Jedoch sind die von v. Werdt und Kopatschek gemachten Beobachtungen für die Erkenntnis der biologischen Leistungen der beiden Gruppen von solcher Bedeutung, daß eine Nachprüfung angezeigt erschien. Die vorliegenden Untersuchungen wurden in dem der Leitung des Herrn Prof. Dr. E. Gildemeister unterstellten Laboratorium der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes angestellt.

Die Nährbodenbereitung erfolgte nach den Angaben von v. Werdt und Kopatschek; da jedoch zunächst tertiäres Natriumphosphat nicht zur Verfügung stand, wurden zu sekundärem Natriumphosphat die fehlenden Gewichtsteile an Na nach der Gleichung $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH} = \text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt. Bis zur leicht alkalischen Reaktion genügten dann dieselben Mengen von 10-proz. Sodalösung, die v. Werdt und Kopatschek vorschreiben. Bei einer späteren Herstellung des Nährbodens wurden neue Präparate von Asparaginsäure

und tertiärem Natriumphosphat verwendet (Merck-Darmstadt), wobei die angegebenen Mengen von 10-proz. Sodalösung nicht mehr zur alkalischen Reaktion genügten. Diese muß also in jedem Falle eigens nachgeprüft werden.

Die verwendeten Bakterienstämme sind der Sammlung des Reichsgesundheitsamtes entnommen. Es handelt sich durchgehend um ältere Stämme, die wiederholt einer genauen Identifizierung unterzogen sind, so daß sich eine diesbezügliche Zusammenstellung erübrigen dürfte.

Die Stämme wurden in drei Reihen untersucht. Zur 1. und 2. Reihe wurde ein in der oben beschriebenen Weise mit sekundärem Natriumphosphat, jedoch für jede Reihe eigens zubereiteter, zur 3. Reihe ein mit tertiärem Natriumphosphat hergestellter Nährboden verwendet. Die Beimpfung erfolgte für die 1. Reihe, in der Röhrrchen mit 3 ccm Inhalt verwendet wurden, mit einer reichlich vollen Normalöse. Für die 2. und 3. Reihe wurden Röhrrchen zu 5 ccm Inhalt abgefüllt und deshalb 2 Normalösen eingeimpft. Die Beobachtungsdauer betrug für die 1. Reihe 20 Tage, für die 2. Reihe 50 Tage, für die 3. Reihe 30 Tage.

Aus nachstehender Tabelle ist der durch das Zeichen + bezeichnete Eintritt der Veränderung des Nährbodens nach Zeit und Zuckerart für die einzelnen Stämme ersichtlich.

Der Farbenumschlag erfolgte meist in der Weise, daß zunächst eine Violettfärbung eintrat, die sich nach einiger Zeit in eine rote Farbtönung (hellrot, karmoisinrot, bis zu tiefem burgunderrot) umwandelte. Häufig war dann weiterhin eine Reduktion des Farbstoffes zu beobachten, die bis zur völligen Entfärbung gehen konnte, oder es trat allmählich eine stärkere alkalische Bläuung ein. In letzterem Falle hatte dann der Nährboden oft nach einiger Zeit seine Ausgangsfarbe wieder erreicht.

Was das Verhalten der untersuchten Stämme zu Laktose, Maltose und Saccharose anbetrifft, so ersehen wir aus der Tabelle, daß sich weder die Ruhrgruppe noch die Typhus-Coli-Gruppe in den eiweißfreien Lackmus-, Laktose-, Maltose- und Saccharoselösungen immer den Erwartungen entsprechend verhält. Für den Typus Flexner, Y und Strong ist das Abweichen älterer Laboratoriumsstämme ja hinreichend bekannt, und Lentz (2) stellte sein Schema nur für frisch gezüchtete Stämme auf. Lentz fand aber auch frische Y-Stämme (Hagenauer Epidemie), die Lackmus-Laktose-Agar rotviolett veränderten und Lackmus-Maltose-Agar leicht röteten. Letzteres berichten auch Baermann und Schüffner (3) wie O. Mayer (4). Morgan (5) beschreibt einen älteren Strong-Stamm, der Maltose vergärte und Milch gerinnen machte. Nach Hiss (6) spaltet Flexner auch Saccharose. Nach den Untersuchungen von Winter (7) vollends wissen wir, daß sämtliche Vertreter der Ruhrgruppe, Shiga-Kruse sowohl wie Flexner, Y und Strong, Maltose mehr, Laktose weniger zerlegen, aber nicht immer in dem Maße, daß eine Farbenänderung in Lackmusnährböden eintritt. Man muß also annehmen, daß unter gewissen Umständen (Alter der Stämme, reichliche Beimpfung, Einwirkungsdauer) bei der Spaltung der Disaccharide Laktose, Maltose und Saccharose in ihre beiden Molekeln, von denen ja eine, bzw. bei Maltose zwei Molekeln aus Traubenzucker bestehen, auch ein Farbenumschlag eintreten kann, ohne daß die früher festgelegte Art dieser Stämme in Zweifel gezogen zu werden braucht, vorausgesetzt, daß das morphologische und agglutinatorische Verhalten entsprechend ist.

Tabelle.

Art der geprüften Kultur	Dextrose	Laktose	Mannit	Maltose	Saccharose	Art der geprüften Kultur	Dextrose	Laktose	Mannit	Maltose	Saccharose
Ruhr Shiga-Kruse I						Strong I	+	+	+	+	+
" " III						" II	+	+	+	+	+
" " Kotten						Typhus I 404	+	+	+	+	+
" " Leipzig 519	+					" Renken	+	+	+	+	+
" " Koch						" Detmold	+	+	+	+	+
" " Eblers						" Brill	+	+	+	+	+
" " Schneider						" Kaufmann	+	+	+	+	+
" " Geisler						" Stolzer	+	+	+	+	+
" " Linde						" Grade	+	+	+	+	+
Ruhr Flexner Sammlung	+					" Voigt	+	+	+	+	+
" " Riemer	+					" Müller	+	+	+	+	+
" " Ditthorn	+					Paratyphus A 7	+	+	+	+	+
" " Subr	+					" I	+	+	+	+	+
" " Wien	+					" VI	+	+	+	+	+
" " Braunsdorf	+					" 10848	+	+	+	+	+
" " Teichmann	+					" B I	+	+	+	+	+
" " Vey	+					" Storch	+	+	+	+	+
" " Schiemanaki	+					" Barth	+	+	+	+	+
Ruhr Y I						" 217	+	+	+	+	+
" " Altona	+					Gärtner 7	+	+	+	+	+
" " Johann	+					" Kiel	+	+	+	+	+
" " Huber	+					" Brüssel	+	+	+	+	+
" " Pannwitz	+					" Gent	+	+	+	+	+
" " Schladt	+					Coli Hygiene	+	+	+	+	+
" " Giwanski	+					" Haem.	+	+	+	+	+
" " Stolzmann	+					" 21	+	+	+	+	+
" " Schäfer	+					" W	+	+	+	+	+
" " Brandt	+						+	+	+	+	+

Die in Klammern beigefügten Zahlen geben die Zahl der Tage an, nach der der Umschlag erfolgte.

Auffallender ist das Verhalten der Typhus-Coli-Gruppe in der Saccharoselösung. Twort (8) behauptet ja die Anpassungsfähigkeit des Paratyphus B-Bazillus an Saccharose, und vielleicht ist solches Verhalten der Typhus-Coli-Gruppe gegenüber der Saccharose nur deshalb weniger bekannt, weil es praktisch bedeutungslos und wenig untersucht ist. Hier mag erwähnt sein, daß wir in der letzten Zeit bei verschiedenen, sonst sicher identifizierten Stämmen der Typhus- und Paratyphusgruppe, ganz im Gegensatz zu früher, eine Rötung des Lackmus-Nitrose-Milchzuckers beobachteten. Eine Veränderung des Milchzuckers im Sinne einer leichter eintretenden Invertierung durch zu langes Sterilisieren können wir dabei sicher ausschließen, so daß hier nur die Annahme übrig bleibt, daß die Milchzuckerpräparate der Jetztzeit von Hause aus Spuren von Traubenzucker enthalten. Die Frage, ob diese Annahme auch für die beiden anderen Disaccharide zutrifft, oder ob für diese die oben angestellten Erwägungen ausreichen, muß hier offen bleiben. Für die endgültige Entscheidung des hier zu behandelnden Gegenstandes ist sie auch, wie die weiteren Ausführungen ergeben, bedeutungslos.

Wenden wir uns nun zur Bewertung unserer Untersuchungen an Hand der Tabelle, so sehen wir, daß sich unsere Ergebnisse mit den von v. Werdt und Kopatschek gefundenen nicht ganz decken.

Von 31 untersuchten Ruhrstämmen veränderten 20 mehr oder weniger die Nährböden, darunter von 10 Shiga-Kruse-Stämmen 2, von 9 Flexner-Stämmen alle 9, von 10 Y-Stämmen 7, von 2 Strong-Stämmen 2.

Zeitlich traten die ersten Veränderungen ein nach 1 Tage bei 6 Flexner-Stämmen und 1 Y-Stamm, nach 2 Tagen bei 1 Shiga- und 3 Y-Stämmen, nach 3 Tagen bei 2 Y-Stämmen, nach 5 Tagen bei 1 Shiga- und 1 Flexner-Stamm, nach 10 Tagen bei 1 Flexner-Stamm, nach 15 Tagen bei 1 Flexner- und 1 Y-Stamm.

Es läßt sich also aus unseren Befunden auch aus dem zeitlichen Eintreten der Reaktionen keine bestimmte Regel für das Verhalten der Ruhrbazillen in eiweißfreien Nährböden ziehen.

Gehen wir nun dazu über, die Ruhr- und Typhus-Coli-Gruppe vergleichend zu betrachten, um daraus vielleicht ein praktisch verwertbares differentialdiagnostisches Merkmal zu gewinnen, so läßt sich darüber folgendes sagen:

Für die Paratyphus A-, B- und Gärtner-Stämme haben wir zur kulturellen Unterscheidung von Ruhrstämmen das einfache Mittel der Untersuchung auf Gasbildung zur Verfügung, so daß nur die Typhusstämmen zum Vergleich mit den Stämmen der Ruhrgruppe herangezogen zu werden brauchen. Hier sehen wir, daß eine Veränderung des Nährbodens bei den Typhusstämmen keineswegs regelmäßig und zeitlich im allgemeinen später eintritt als bei den Ruhrstämmen. Von 9 Typhusstämmen veränderten nur 5 die Nährböden, dabei traten die ersten Veränderungen bei 1 Stamme nach 7 Tagen, bei 1 nach 10, bei 1 nach 15, bei 1 nach 20 und bei 1 erst nach 30 Tagen auf. Zudem ist die Veränderung durch die Typhusstämmen keine systematische; bei den 5 Stämmen, die überhaupt Veränderung hervorriefen, blieb die Dextroserrötung 4mal aus, die Mannitrötung 3mal. Wenn man nur die Shiga-Kruse und die Typhusstämmen vergleicht und berücksichtigt, daß bei den ersteren nur Dextroserrötung, bei letzteren Dextrose-, Mannit- und Maltoserrötung zu erwarten ist, wird das Verhältnis noch bedeutend ungünstiger.

Es läßt sich also auch aus dieser vergleichenden Betrachtung kein verwertbarer Schluß ziehen.

Gleichzeitig können wir aus dem bisher Gesagten ersehen, daß, wenn wir unter Außerachtlassung der Disaccharide nur das in bezug auf chemische Reinheit unverdächtige Monosaccharid Dextrose und den 6-wertigen Alkohol Mannit den Untersuchungen zugrunde legen, sich nach unseren Ergebnissen auch keine charakteristischen Unterscheidungsmerkmale zwischen Ruhrgruppe und Typhus-Coli-Gruppe feststellen lassen.

Um über die Lebensfähigkeit der Bakterien in den verwendeten Nährböden Aufschluß zu bekommen, wurden aus der 2. Reihe nach 4 Tagen Stichproben gemacht, indem von jedem Stamme abwechselnd aus jeder Zuckerart bzw. Mannit ein Bouillonröhrchen mit 3 Oesen beimpft wurde. Es war dabei der Stamm Shiga-Kruse Kotten aus dem Mannitröhrchen und der Stamm Shiga-Kruse Meister aus dem Dextroseröhrchen nicht mehr wachstumsfähig, alle anderen Stämme gingen noch an. Ferner wurde aus der 2. Reihe nach 30 Tagen aus sämtlichen Dextroseröhrchen auf Bouillon überimpft. Dabei wurden Flexner Riemer und Suhr, Y Altona, Johann und Pannwitz, Typhus I 404 noch wachstumsfähig befunden. Und diese Stämme hatten auch eine Veränderung der Dextrose hervorgerufen. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu folgern, daß manche Stämme in den eiweißfreien Nährböden verhältnismäßig ungünstige Bedingungen für ihr Fortkommen finden und infolge ihres frühzeitigen Absterbens nicht das zu einer Veränderung des Nährbodens nötige Ferment in ausreichender Menge bilden können.

Wir müssen also aus unseren Untersuchungen den Schluß ziehen,

1) daß bei den Bazillen der Ruhrgruppe die Farbstoffänderung in eiweißfreien Lackmus-Zucker- bzw. Mannit-Nährböden nicht prinzipiell ausbleibt,

2) daß bei Vertretern beider Gruppen (hauptsächlich Shiga-Kruse-Bazillen einerseits, Typhusbazillen andererseits) die Farbstoffänderung nicht oder sehr spät eintritt.

Wenn aber auch nach unseren Ergebnissen die Versuche v. Werdt's und Kopatschek's nicht voll bestätigt werden konnten, so scheint doch der Gedanke der Benützung chemisch genau bekannter Nährböden mit einem Farbstoff als Indikator ein glücklicher zu sein. Die bereits erwähnten mannigfaltigen und infolge ihres langsamen Eintritts und Wechsels leicht zu beobachtenden Farbenabstufungen lassen vermuten, daß sich aus ihnen bei genauerem Studium Schlüsse auf den Grad und vielleicht auch auf die Art der Säurebildung und die sonstigen chemischen Leistungen der Bakterien ziehen lassen.

Literatur.

- 1) v. Werdt u. Kopatschek, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. 1920. S. 95. — 2) Lentz, Handb. der pathog. Mikroorg. v. Kolle-Wassermann. 2. Aufl. Bd. 3. 1913. — 3) Baermann u. Schüffner, München. med. Wochenschr. 1909. Nr. 8. — 4) O. Mayer, Klin. Jahrb. Bd. 23. 1910. — 5) Morgan (zit. bei Lentz, l. c.). — 6) Hiss (zit. bei Lentz, l. c.). — 7) Winter, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 70. 1911. — 8) Twort (zit. bei Uhlenhuth u. Hübener, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle-Wassermann. 2. Aufl. Bd. 3. 1913.)

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis des Entwicklungszyklus der Holostomiden. Vorläufige Mitteilung.

Von Prof. Dr. Adolpho Lutz in Rio de Janeiro.

In den letzten Jahren habe ich mich wieder mit helminthologischen Problemen und speziell mit dem Studium der brasilianischen Trematoden befaßt. Beobachtungen, die ich an deren ersten Stadien anstellte, lehrten mich allmählich die wichtigsten der noch unbekanntesten Phasen des Entwicklungszyklus der Holostomiden kennen. Meine Resultate stimmen freilich mit den traditionellen Annahmen keineswegs überein, beruhen indessen auf sorgfältiger Beobachtung und Experimenten, welche während längerer Zeiträume mehrmals wiederholt wurden. Eine mit Zeichnungen und Photographien illustrierte Besprechung soll in den „Memorias do Instituto Oswaldo Cruz“ erscheinen, was aber im besten Falle erst nach längerer Zeit geschehen kann. Ich habe mich daher entschlossen, die wichtigsten Resultate schon jetzt mitzuteilen und hoffe, daß diese vorläufige Mitteilung nicht als eine voreilige aufgefaßt werden möge.

Von den Holostomiden kennen wir bisher erwachsene Formen mit noch unentwickelten Eiern und enzystierte Larvenformen, aus welchen jene hervorgehen. Die anderen Entwicklungsphasen sind so gut wie gänzlich unbekannt geblieben, und namentlich gilt dies von den Cercarien, deren Existenz gewöhnlich in Abrede gestellt wird. Allerdings hat ein Autor neuerdings solche erwähnt, aber soweit es sich um schwanztragende Cercarien handelt, scheint dabei ein Irrtum stattgefunden zu haben. In Wirklichkeit sind die hierher gehörigen Cercarien oft gesehen und beschrieben worden. Sie wurden aber nicht als solche erkannt, und die Gründe dafür dürften aus meiner Darstellung leicht zu erkennen sein.

Ich sende hier voraus, daß der Körper der Cercarien nach dem Eindringen in den Zwischenwirt sich nicht sofort enzystiert. Es geht vielmehr ein längeres präzystisches Stadium voraus, in welchem der Parasit frei in den Geweben lebt und sich unter bedeutenden Veränderungen weiter entwickelt. Erst spät wird eine Zyste gebildet, welche die Larvenform allmählich deutlicher erkennen läßt. Zur Ausbildung der Geschlechtsorgane und definitiven Gestaltung des Körpers ist aber die Uebertragung in den Hauptwirt notwendig.

Eier mit Embryonen und freien Miracidien von Holostomiden scheinen nur selten beobachtet worden zu sein. Ich habe beide, sowohl bei *Holostomum* als bei *Hemistomum*, untersucht und nichts gefunden, was die Annahme einer direkten Entwicklung unterstützen könnte. Letztere bezieht sich auf die Struktur der Miracidien und die Größe der Eier, steht aber auf recht schwachen Füßen. Die Größe, verglichen mit derjenigen einiger zweifellos parthenitenbildender Arten ist durchaus nicht außerordentlich; für die Struktur wird hauptsächlich eine ältere Angabe von v. Linstow zitiert. Die sie begleitende Abbildung kann aber von einem Unbefangenen kaum als Beweis für eine direkte Entwicklung angesehen werden.

Man wird sich erinnern, daß bis vor Kurzem auch für *Schistosomum* vielfach eine Entwicklung ohne Partheniten angenommen wurde, was sich seitdem als falsch erwies. Wenn dies nun auch für die Holostomiden gezeigt werden kann, so gilt für alle Endotrematoden derselbe Entwicklungszyklus, was von vornherein viel wahrscheinlicher ist. Bei der beschränkten Eiproduktion der Holostomen wäre es auch kaum verständlich, daß mancherorts alle Exemplare gewisser Planorbis-Arten zahlreiche Tetracotylen aufweisen, wenn jede derselben von einem separaten Ei abzuleiten wäre. Im Gegensatz dazu zeigen meine Beobachtungen das Vorkommen infizierter Schnecken, die täglich unzählige Cercarien abgeben, wodurch obige Tatsache leicht verständlich wird.

Eine der morphologischen Gruppen, welche zu praktischen Zwecken unterschieden werden, umfaßt die sogenannten furkozerken Cercarien. An Stelle dieser kaum statthaften Bildung schlage ich das Adjektiv dikranozerk und das Substantiv *Dicranocercaria* vor, was auf Deutsch durch gabelschwänzig und Gabelcercaria wiedergegeben werden kann. Für die Formen, bei denen der gäblige Teil nicht (wie bei den Schistosomiden) abgesetzt erscheint, kann man auch Schistocercarien und spaltschwänzige Cercarien sagen.

Trotz der Häufigkeit der Gabelcercarien wurden dieselben bis vor kurzem nur wenig beachtet, weil man über ihr Schicksal ebenso im unklaren war, wie über die Vorstadien mancher Endotrematoden. Eigentlich hätte es nahe gelegen, dieselben in Zusammenhang zu bringen, doch scheint niemand daran gedacht zu haben.

Als Entschuldigungsgrund ist anzuführen, daß die meisten Gabelcercarien sehr klein und wenig entwickelt sind. Ihre schwer zu erkennende und meist ziemlich elementare Struktur erlaubt nur sehr beschränkte Schlüsse über ihre Zugehörigkeit. Doch lassen sich verschiedene Typen unterscheiden. Die Schistosomidencercarien haben, soweit bekannt, keinen Pharynx, dagegen große und weit nach rückwärts gelegene Speicheldrüsen, deren gewundene Drüsenzellen am Vorderende ausmünden, wo sich kleine Stacheln befinden, die zur Einimpfung des Sekrets bestimmt scheinen. Der Schwanz trägt ein verhältnismäßig kurzes und abgesetztes Gabelstück. Die Entwicklung findet in sehr langen Sporozysten statt. Hierher gehört wahrscheinlich auch die *Cercaria cristata* La Valette, bei der die Saugnäpfe zurückgebildet sind, was auch bei Schistosomiden vorkommt.

Die 3 von mir als sicher zu *Holostomum* gehörig erkannten Cercarien haben einen Pharynx, wenig deutlichen und verkürzten Darm, langen und tief gespaltenen Schwanz, dessen Endstücke in ihrer Form veränderlich, aber meist etwas bilateral abgeflacht erscheinen. Augen sind nicht vorhanden und die Entwicklung findet ebenfalls in langen Sporozysten statt. Die Saugnäpfe sind denen der ersterwähnten Cercarien ähnlich, d. h. der Mundsaugnapf oval, das Acetabulum klein und bald ausgestülpt, bald zurückgezogen. Speicheldrüsen und Ausführungsgänge sind nicht deutlich zu erkennen. Die sehr durchsichtigen Gewebe zeigen weder in frischem, noch in fixiertem und gefärbtem Zustande charakteristische Strukturen. Die Hautbestachelung ist, soweit vorhanden, äußerst fein. Trotzdem sind die Cercarien im Gesamthabitus von der 1. Gruppe sehr deutlich und auch unter sich genügend verschieden. Am deutlichsten unterscheiden sie sich aber durch ihr Verhalten zu neuen Wirten.

Es gibt aber auch unter den hiesigen Gabelcercarien solche mit Augenflecken. Eine schon in meiner *Schistosomum*-Arbeit an-

geführte Art aus *Planorbis* entwickelt sich in Redien, eine der 1. Gruppe nahestehende, nur 1mal aufgefundene Art aus *Physa* dagegen ebenfalls in Sporozysten. Bei letzterer scheint der Darm ungegabelt und sackförmig zu sein.

In Sporozysten entwickeln sich ferner 2 sehr auffällige Arten aus einer Melaniide, die in Flüssen lebt und zum Genus *Semisinus* gehört. Die eine hat auffällig weite und lange Coeca, die andere einen einfachen Darm in Form eines großen und weiten Sackes. Dieselbe Schnecke enthält eine 3. Cercarienart, die Ozellen aufweist.

Sofortige Enzystierung scheint bei keiner Gabelcercaria nachgewiesen. Es könnten höchstens sehr feine Zysten gebildet werden, da deutliche zystoplastische Zellen durchweg zu fehlen scheinen. Bei den Holostomiden, die wahrscheinlich die Mehrzahl der Gabelcercarien umfassen, dürfte die Enzystierung durchweg erst längere Zeit nach dem Eindringen in den 2. Wirt stattfinden.

Unter den in der Literatur beschriebenen und den von mir beobachteten Gabelcercarien finden sich zahlreiche Unterschiede, die gestatten, die einzelnen Arten mit einiger Übung zu unterscheiden. Das beste Mittel zur Klassifikation ist unbedingt in ihrem Verhalten beim Wirtswechsel zu finden. Wo es anging, habe ich daher den nächsten Wirt durch Versuch mit den Cercarien festzustellen gesucht und bin auf diesem Wege, allerdings nicht ohne Schwierigkeiten, zu höchst interessanten Resultaten gelangt.

Von den Schistosomiden durfte man erwarten, daß die Cercarien in die Haut von Säugetieren oder Vögeln eindringen werden. Diese Beobachtungen, die ich bei *Schistosomum Mansoni* ohne Schwierigkeit beliebig oft machte, gelang bei keiner der anderen Cercarien. Letztere wurden dann mit kleinen Fischen, Kaulquappen, Wasserschnecken, kleinen Krustern und Insektenlarven aus süßem Wasser zusammengebracht, wobei besondere Formen aus demselben Gebiete gewählt wurden. Manche dieser Tiere, wie Kaulquappen und Insektenlarven, schnappen die Cercarien, wie andere kleine Wassertiere auf; sie können dann massenhaft und oft noch lebend in deren Darm gefunden werden, sind aber in den meisten Fällen schon am nächsten Tage nicht mehr nachzuweisen.

Als erfolgreich galten nur die Experimente, bei denen das Eindringen der Cercarien direkt beobachtet wurde, oder die Versuchstiere nach der Konfrontation reichlich infiziert erschienen. Nachher wurden die eingedrungenen Cercarienkörper in ihrer Weiterentwicklung bis zur Enzystierung verfolgt; das Endresultat war die Bildung typischer Tetrakotylen. Wurden diese aus den Zysten befreit, so zeigten sie deutliche *Holostomum*-Form; in der Zyste waren sie durch die seitlichen, saugnapfähnlichen Bildungen, auf die der Name *Tetracotyle* anspielt, genügend charakterisiert.

Die Versuchstiere wurden entweder aus Eiern gezüchtet, oder aus sicher infektionsfreien Standorten bezogen.

Die von mir beobachteten 3 *Holostomum*-Cercarien verhielten sich insofern verschieden, als die eine (*Dicranocercaria molluscipeta*) nur in Süßwasserschnecken, die 2. (*D. gyrinipeta*) nur in Kaulquappen, die 3. (*D. bdello cystis*) nur in Blutegel eindrang. Das direkte Eindringen durch die äußere Haut wurde bei allen 3 Arten beobachtet, und zwar zuerst bei *D. molluscipeta*. Hier wurde durch einen glücklichen Zufall das Eindringen in die Antenne einer *Physa rivalis* bei schwacher Vergrößerung festgestellt und das befallene Organ sofort

amputiert. Serienschnitte desselben zeigten die Trematodenlarve frei unter der Haut liegend. Hierauf wurde das direkte Eindringen der *D. gyripeta* verfolgt. Die Cercarien drangen durch die Schwanzhaut ein und wanderten in den nächsten Tagen dem Kopfende zu, ohne sich zu enzystieren. Dank einer kleinen Eigentümlichkeit konnte die Identität festgestellt werden. Die große Durchsichtigkeit mancher von mir verwandten Laubfroschlarven gestattete, einen Teil des Prozesses am lebenden Tiere zu verfolgen. Die letzten, aber dafür auch glänzendsten Beobachtungen wurden an Blutegeln der Genera *Haementeria* und *Hemiclepis* gemacht. Hier wurde ein massenhaftes Eindringen unter dem Mikroskope verfolgt. Ganz junge *Hemiclepis triseriata* wurden zwar nicht so lebhaft attackiert wie ältere und größere Exemplare dieser und anderer Arten; dafür gestattete aber die Durchsichtigkeit der Gewebe die direkte Beobachtung jedes eingedrungenen Exemplares. Der Prozeß des Eindringens beansprucht einige Zeit und kann daher leicht in allen seinen Stadien verfolgt werden.

Das Eindringen durch die äußere Haut schließt ein solches von inneren Höhlen nicht aus; letzteres scheint bei *molluscipeta* sogar die Regel. *Planorbis*-, *Spirulina*- und *Physa*-Arten wurden gleichmäßig befallen; auch bei Quappen und Blutegeln wurden verschiedenen Genera und Spezies ohne besondere Auswahl angegriffen. Bei Infektionsversuchen muß man zahlreiche Cercarien anwenden, da immer nur ein Teil derselben eindringt und auch dieser erst einige Zeit nach dem Auswandern aus dem ersten Wirte. Dieser Umstand muß bei den Experimenten berücksichtigt werden. Andererseits führen massenhafte Invasionen leicht zum Tode der Zwischenwirte, entweder sofort oder erst nach einiger Zeit.

Spontane Infektion der Zwischenwirte wurde häufig im Freien beobachtet, und zwar in denselben Gewässern, in denen infizierte Mollusken vorkamen. Solche Infektionen pflegen nicht sehr intensiv zu sein. Werden aber cercarienhaltige Mollusken in kleinen Aquarien längere Zeit mit Zwischenwirten zusammen gehalten, so kann es zu sehr intensiven Infektionen kommen.

Der Uebergang von den eingedrungenen Gabelcercarien zu Tetra-*kotylen* wurde bei Kaulquappen und Süßwasserschnecken durch alle Stadien verfolgt; bei den Hirudineen mußte das Material mehr geschont werden, indessen wurden auch hier alle Stadien beobachtet. Der Vorgang ist überall so ziemlich derselbe. Der Cercarienkörper dringt unter Zurücklassung des Schwanzes in den Zwischenwirt, wo er in den nächsten Tagen frei und nur wenig verändert gefunden wird. Die Bewegungen sind deutlich, aber nicht sehr lebhaft. Die beiden Saugnäpfe sind in ihrer charakteristischen Form und Lokalisation leicht zu erkennen. Die Gewebe sind noch sehr durchsichtig; Darm und Geschlechtsanlagen wenig deutlicher als zuvor. Nun setzt bald ein Wachstum ein, das mehr zur Verbreiterung als zur Verlängerung des Körpers führt. Kleinste Körnchen, offenbar in den Kapillaren des Exkretionssystems gelegen, bilden ein Netzwerk, welches die anderen Strukturen mehr und mehr verdeckt. Die größeren Stämme sind nicht immer injiziert, lassen jedoch manchmal Queranastomosen wahrnehmen. Zystoplastische Zellen, die freilich nicht deutlich zu erkennen sind, tragen wahrscheinlich zur Zunahme der Opazität bei. Es entsteht schließlich ein sehr charakteristisches Bild: Man sieht große und breite, aber nicht sehr dicke, im auffallenden Lichte sehr weiße, im durchfallenden Lichte opake

Trematoden, deren Struktur durch allgemeine Körnung und Trübung verdeckt wird. Beide Enden sind gleich oder 1 derselben zeigt das Rudiment eines 2. Segmentes. Solche Elemente sind offenbar von Faust gesehen und zu den Holostomiden gestellt worden. Er schien sie indessen für Cercarien zu halten. Man kann sie leicht als schwanzlose oder stummelschwänzige Cercarien auffassen, zumal sie mit Vorliebe in die Sporozysten und Redien anderer Trematoden eindringen. Ich habe sie häufig frei oder bereits enzystiert in den Partheniten von Xiphidio- und Echinocercarien, seltener in solchen von Gabelcercarien gefunden, welche selbst zu derselben Art gehören können. Die zu den Partheniten gehörigen Cercarien unterscheiden sich leicht, wenn sie bereits gebildet sind, was aber oft nicht der Fall ist. Wenn man die präzystischen Stadien der Holostomiden einmal als solche anerkannt hat, wird man ihre charakteristische Erscheinung ohne weiteres richtig deuten, wo man denselben auch begegne.

Die flachen präzystischen Stadien erscheinen weit größer, als die zusammengezogenen und abgekugelten enzystierten Formen, die außerdem eine bedeutende Quantität von Zystenmaterial und Exkretionskörnern abgeschieden haben. Sie sind daher weit durchsichtiger und lassen ihre Tetracotylenatur immer deutlicher erkennen. Die äußere Membran ist sehr dick, von gallertigem Aussehen und bei den Zysten der Blutegel deutlich konzentrisch geschichtet.

Daß diese Tetracotylen sich zu Holostomen entwickeln, kann als ausgemacht gelten, da andere erwachsene Trematoden nicht in Frage kommen. Ich habe selbst zahlreiche Fütterungsversuche gemacht, teils mit, teils ohne Erfolg. Mißerfolge lassen sich auf verschiedene Weise erklären: In 1. Linie kann man annehmen, daß das Versuchstier kein richtiger Wirt ist. Dies gilt z. B. für kleine Vögel, bei denen man nach ca. 15 Std. im Darne bewegliche Holostomula findet, ohne daß man auf eine vollständige Entwicklung rechnen konnte. In 2. Linie könnten die Zysten noch nicht genügende Reife erlangt haben, und endlich sind einige Holostomum-Arten so klein, daß sie leicht übersehen werden können, besonders wenn die Infektion nur eine schwache war.

Die Wirte, welche für die Beobachtungszone in Frage kommen, sind in 1. Linie Wasservögel, wie Reiher, Wasserhühner, Möven und Enten, bei denen Holostomen gefunden wurden, wiewohl weder sehr häufig, noch gewöhnlich sehr reichlich. (Es ist indessen wohl möglich, daß diese, besonders die kleineren Arten, nur kurze Zeit im Darm verweilen.) Mit Möven und Reiher konnte ich nur vereinzelte Experimente machen, die erfolglos blieben. Gewöhnlich wurden zahme Enten verwendet, meist junge und einwandfrei aufgezogene Exemplare, die keine Trematodeneier ausschieden. Hier habe ich mit einer Tetracotyle aus Planorbis einen unzweifelhaften Erfolg gehabt. 10 Tage nach der Verfütterung der Tetracotylen wurden im oberen Darmteile zahlreiche, im Durchschnitt 2 mm lange Holostomen gefunden, bei denen der Geschlechtsapparat schon ziemlich entwickelt war. Dagegen hatte nur bei 3 die Bildung eines Eies stattgefunden, während ein anderes deren 7 aufwies. Man kann diese Tetractotyle als *typica* bezeichnen und das Holostomum als *Strigea tarda* (Steenstr.), indessen haben diese Namen, wie die für die Cercarien gebrauchten, nur einen provisorischen Wert. So viel steht aber fest, daß diese Art aus Gabelcercarien hervorgeht, die der *Cercaria gracilis* La Val. nahe stehen. Daß diese Frist von 10 Tagen knapp hinreicht, um einzelne

kleinere Holostomiden im definitiven Wirt zu Reife zu bringen, geht aus einem Parallelversuche mit einer Hemistomum-Larve aus Girardinus hervor. Dieselbe entwickelte sich in einem Nachtreiher (*Nycticorax spec.*) zu einem kleinen, anscheinend noch unbeschriebenen Hemistomum. Auch hier hatten von zahlreichen Exemplaren nur einige mit der Eibildung begonnen.

Die Züchtung der übrigen Holostomum-Arten hängt von günstigen Bedingungen ab, dürfte aber mit der Zeit ebenfalls gelingen.

Was die zahlreichen Diplocercarien anbelangt, die weder ganz zu Schistosomum, noch ganz zu Holostomum passen, so glaube ich, daß sich der größere Teil als zu anderen Holostomiden gehörig herausstellen wird. Der Name Holostomum wurde von mir, wie früher allgemein üblich, für das Genus gebraucht, das neuerdings als *Strigea* bezeichnet wird, ein Name, der jedoch nur den Helminthologen bekannt ist.

Ich will hier diese vorläufige Mitteilung beschließen und die Belege für eine andere Gelegenheit aufsparen. Daß meine neue Orientierung auf Widerspruch stoßen wird, ist vorauszusehen. Wer sich indessen die Mühe geben will, meine Angaben experimentell zu prüfen, kann sich leicht von der Richtigkeit derselben überzeugen, und zwar mit weit geringerem Aufwande an Arbeit, als ich benötigte, um mein Beobachtungsmaterial zu sammeln und zu kontrollieren.

Rio de Janeiro, den 29. November 1920.

Nachdruck verboten.

Ein Fall von Soorvarietät.

[Aus dem Hygienischen Institut der Akademie für praktische Medizin in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Bürgers).]

Von Dr. W. Bachmann.

Am 7. Juli 1920 kam im hiesigen Pathologischen Institut ein 1-jähriges Kind mit der klinischen Diagnose: „Keuchhusten, Ernährungsstörung“ zur Sektion, die außer beiderseitiger Bronchopneumonie als vermutlicher Todesursache eine offenbar durch einen Soor-ähnlichen Pilz hervorgerufene Erkrankung der Zunge, des Pharynx, der Speiseröhre und des Magens ergab.

Makroskopischer Befund: Zunge und Rachen lebhaft gerötet, auf der Zungenspitze ein grauweißer, leicht abziehbarer Belag. Im ganzen Rachen, vom Zäpfchen und Zungengrund bis hinab zur Speiseröhre, ein körniger, weißer, nach unten zusammenfließender, grauweißer bis graugelblicher, sehr fest haftender Belag; nur im unteren Teil der Speiseröhre löst er sich leicht ab. Kehldeckel rinnenförmig zusammengekrümmt; Kehlkopf und Luftröhre enthalten nur etwas rötlichen Schleim. Im Magen befindet sich eine 3:2 cm große, buchtig begrenzte, mäßig gerötete, leicht erhabene Stelle, die von grauweißen, ziemlich festhaftenden Belägen bedeckt ist. Im allgemeinen ist die Schleimhaut von grauweißer Farbe. Entfernt man die oben beschriebenen Beläge, so erscheint darunter eine feine, grauweiße Körnelung auf gerötetem Grunde.

Die mikroskopische Untersuchung im direkten Ausstrich ergab mit Wahrscheinlichkeit die Diagnose „Soor“, die bei der Durchmuste-

zung der entsprechenden Schnittpräparate bestätigt wurde, soweit es überhaupt möglich ist, die Diagnose Soor ohne Kulturverfahren sicherzustellen. Die kulturelle Untersuchung des fraglichen Pilzes ergab nun mannigfache Abweichungen vom typischen Bilde des Soor, so daß die Frage zu entscheiden war, ob der vorliegende Pilz eine Varietät des Soor darstelle, oder aber überhaupt mit dem echten Soor nichts zu tun habe. Im folgenden ist der Gang der Untersuchung und deren Ergebnis geschildert:

Von den erkrankten Stellen der Zunge, des Sinus pyriformis bzw. Oesophagus wurde Material auf gewöhnlichen Agar, auf Maltoseagar 5 Proz., Drigalski-Agar, in Bouillon und sterilisierte Milch gegeben. Zur Kontrolle wurden unbeimpfte Bouillon- und Milchröhrchen, die am gleichen Tage wie die beimpften Röhrchen hergestellt waren, in die Untersuchung einbezogen. Von der erkrankten Stelle des Magens konnte aus äußeren Gründen nicht abgeimpft werden.

Die mikroskopische Untersuchung der direkten Abstriche von Zunge und Oesophagus ergab neben zahlreichen Bakterien hefeähnliche Zellen und Zellverbände verschiedener Gestalt: einmal kleinere, länglich ovale Zellen, andererseits größere zylindrische, an den Ecken abgerundete Zellen, auch einzelne Langsprosse, die für Teile eines Myzels gehalten wurden. Kulturell wurden auf den beimpften Platten verschiedene Bakterien (*Streptococcus acidilactici*, aërogenes, Pseudodiphtherie) festgestellt, außerdem auf Maltoseagar, der von den oben erwähnten Milchröhrchen aus beimpft war, 2 verschiedene Pilzformen in Reinkultur herausgezüchtet, deren 1 sich als gewöhnliche Hefe herausstellte, die für die vorliegenden pathologischen Veränderungen nicht verantwortlich gemacht werden konnte. Die 2. Pilzform zeigte folgende Eigentümlichkeiten:

Kulturell: Auf Maltoseagar werden grauweiße, sammetartige, sich ausbreitende Oberflächenkolonien gebildet, deren Zentrum etwas erhaben, nach 3 Tagen etwa einen weißen Flaum zeigt, während die Peripherie der Kolonien radiär angeordnete Strahlenbildung aufweist. Bei starker Vergrößerung entsprechen dem Zentrum hefezellenartige Wuchsformen, während im Randteil der Kolonien die Zellen myzelartig in Reihen angeordnet sind. Ein echtes Myzel ist jedoch nicht vorhanden, vielmehr erscheint es aus den gleichen Zellen wie das Zentrum bestehend, meist zylindrischen Zellen mit abgerundeten Ecken von 5–7 μ Länge und dazwischen einzelne große, runde Formen von 10 μ Durchm., die eine stark lichtbrechende Kapsel besitzen, die man für echte Konidien halten könnte; auch ovale Zellen von 5–7 μ Länge sind vorhanden, alle in einfachen Reihen, seltener verzweigt, angeordnet.

In ganz jungen Agarkulturen sind vorwiegend lange Fäden zu sehen, die von den eben beschriebenen runden Zellen ausgehen und die später oidienartig zerfallen, so daß das zuerst beschriebene Bild einer mehrtägigen Kultur entsteht.

Auf älteren Gelatineplatten (4–6 Tage alt) sind ebenfalls keine Fäden mehr zu beobachten, sondern nur die oben beschriebenen Oidien, in denen end- oder mittelständige, große, runde Zellen, wie oben, sich finden.

In der Kultur auf dem Objektträger (Gelatine und Agar) ist das Auswachsen der runden Zellen zu kurzen Fäden zu beobachten; auch lange Fäden finden sich, deren Entwicklung jedoch nicht sicher verfolgt werden konnte, die am Ende sowohl wie mittelständig die bekapselten,

runden Zellen tragen, welche den bei Soor beschriebenen Chlamydo-sporen (1) gleichen. Nur ganz vereinzelt wurde ein vom Sproßverband ausgehender, etwa 2μ dicker, septierter Myzelfaden beobachtet.

Die Agarstichkultur zeigt einen weißen Knopf an der Oberfläche, zartes Wachstum in die Tiefe mit Aufsplitterung in zahlreiche feine Strahlen. Dasselbe Verhalten im Gelatinestich. Bierwürze-Gelatine wird nicht verflüssigt oder erweicht (2), was gegen Soor spricht, da die seltene, nicht verflüssigende, kleinsporige Form nicht in Frage kommt (3). Auf Weinsäuremolke wird eine dichte Kahmhaut gebildet, in der jedoch Askosporen nicht zu finden sind. Die Gärungsfähigkeit unseres Pilzes ist gering, am deutlichsten gegen Maltose. Milchsäure wird nicht gebildet. Die für typischen Soor so charakteristischen Unterschiede zwischen Oberflächen- und Tiefenkolonien sind nicht sicher zu beobachten. Die in der Literatur (4) angegebene Kultur auf Runkelrübe und Noeggerathscher kolorierter Peptongelatine, die für Soor differentialdiagnostische Bedeutung haben soll, wurde nicht geprüft.

Nach den vorliegenden Beobachtungen handelt es sich bei dem fraglichen Pilz also nicht um typischen Soor, vielmehr scheint er nach seinem morphologischen Verhalten zu *Oospora* zu gehören. *Monilia candida* kommt deshalb nicht in Frage, da die stets gut unterscheidbaren Konidienträger fehlen (5), ebenso ein gut ausgebildetes Myzel nicht vorhanden ist. Sehr ähnlich scheint er *Oospora lactis* zu sein, die, wie folgt, beschrieben wird (6):

„Rasen gut ausgebreitet, sammetartig, weiß, oft zu einer dicken Decke werdend. Hyphen einfach oder verzweigt, kriechend oder aufsteigend, hyalin, von ganz verschiedener Länge und Breite, meist $6-12 \mu$ breit, in unregelmäßige Teilstücke zerfallend, die als Sporen (Oidien) zu betrachten sind. Sporen nach Zerfall sich meist an den Ecken abrundend, zylindrisch oder eiförmig, oft auch kugelig oder von etwas unregelmäßiger Gestalt, meist $6-20 \mu$ lang.“

Nach Guillermond (7) beträgt die durchschnittliche Länge sogar $15,7-31 \mu$, während die Länge der Oidien in unserm Fall 7μ nicht übersteigt, die der runden Zellen etwa 10μ beträgt. Auch fehlen die für *Oidium lactis* beschriebenen metachromatischen Körnchen in der Umgebung der Vakuolen (8), ebenso zeigen die Oidien nicht die bei *Oospora lactis* beschriebene mehrkernige Struktur (9).

Ich glaube deshalb, keinen Fehler zu machen, wenn ich den vorliegenden Pilz zu *Oospora* stelle. Bei dem für Soor so typischen pathologisch-anatomischen Befund halte ich es jedoch für richtig, auch hier eine der so häufig gesehenen Varietäten des Soor anzunehmen, dessen Stellung im botanischen System ja noch keineswegs festgelegt ist.

Zum Schluß möchte ich noch einem Einwand begegnen, der mit Recht gemacht werden könnte. Es ist auffallend, daß der beschriebene Pilz nur aus den beimpften Milchröhrchen herausgezüchtet wurde, so daß man sagen könnte, der vorliegende Pilz befand sich bereits in den unbeimpften Milchröhrchen. Demgegenüber möchte ich nur feststellen, daß die mikroskopische und kulturelle Untersuchung einer größeren Reihe von sterilen Milchröhrchen, die von der gleichen Milch wie die beimpften Röhrchen stammten und gleichzeitig mit ihnen sterilisiert worden waren, niemals den vorliegenden Pilz auffinden ließ. Außerdem stimmen die Größenverhältnisse des vorliegenden Pilzes mit den in den Organschnitten gefundenen so weitgehend überein, daß an der Identität des untersuchten Pilzes mit dem in den Organschnitten gesehenen nicht

gezweifelt werden darf. Durch Zufall gelang es mir übrigens, den gleichen Pilz noch 2mal aus dem Rachenabstrich diphtherieverdächtiger Kinder herauszuzüchten. Auch hier wurde im direkten Ausstrich die Diagnose Soor gestellt, während die kulturelle Untersuchung wiederum die oben beschriebenen Abweichungen zeigte.

Literatur.

- 1) Plaut; Kolle-Wassermann, Handb. der path. Mikroorg. 2. Aufl. S. 46. — 2) Desgl. S. 49. — 3) Desgl. S. 51. — 4) Desgl. S. 44. — 5) Rabenhorst, Kryptogamenfl. Pilze v. Winter. I. 8. — 6) Desgl. — 7) Guillermond, Recherches sur les levures et quelques moisissures formes levures. — 8) Desgl. — 9) Desgl.

Nachdruck verboten.

Cristispira helgolandica nov. spec. und ihre Fortpflanzung.

Von Dr. Collier, Staatl. Biol. Anstalt, Helgoland.

Im Inhalt der Leibeshöhle von *Asterias rubens* fand sich bei serologischen Untersuchungen in einigen Fällen (3mal) ein zur Gattung *Cristispira* gehöriger Parasit. Im völlig ausgewachsenen Zustand zeigt er eine Länge von etwa 68 μ , doch fanden sich auch Individuen von nur 12 μ Länge; der durchschnittliche Durchmesser betrug etwa 1,5 μ . Allerdings fanden sich auch in fixiertem Zustande längere Exemplare, doch erscheinen auf Ausstrichpräparaten die Parasiten häufig ausgezogen, so daß die Spirale länger als im Leben ist. In bezug auf die Größe gehört die gefundene Spironemacee ungefähr in die Nähe von *C. limae*, *pectinis* und *modiolae*, Formen, die nur um ein Geringes länger werden und ungefähr gleich schlank sind.

Nach der Großschen Methode (Rotierenlassen um die Längsachse) ließ sich feststellen, daß es sich bei der Körperform um eine wirkliche Spirale handelte. Ebenso wie bei der Gattung *Saprosira* ist bei der verschiedenen Länge der beobachteten Individuen diese als systematisches Merkmal nur bedingt brauchbar, vielmehr ist nur die Länge der einzelnen Windungen konstant, und beträgt etwa 11–12 μ , so daß bei den längsten, ausgewachsenen Parasiten 6 Windungen zu finden sind. Die Windungen bilden einen Winkel von etwa 75°, sind also ziemlich steil; der Querschnitt ist völlig kreisrund. Die Spitze ist schwach abgerundet; sonst aber sind die Körperkonturen völlig parallel zueinander.

Die auf der einen Seite des Körpers liegende Crista ist etwa $\frac{3}{4}$ –1 μ hoch und verläuft nur auf der einen Seite des Körpers, wobei sie keinerlei Struktur erkennen läßt. Auch irgendwelche Endanhänge sind nicht zu beobachten.

Es erübrigt sich, auf weitere Einzelheiten einzugehen, da ich im wesentlichen nur die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen bestätigen konnte. So waren beispielsweise feinste Körnchen aus Chromatin zu beobachten, die den Innenwänden angelagert waren. Eine völlige Homogenität, wie Bosanquet und Cecil behaupten, glaube ich mit Sicherheit verneinen zu können; auch scheint die Fanthamsche Ansicht, daß

die Kammerwandungen aus Chromatinstäbchen bestehen, nicht zutreffend zu sein, vielmehr scheint etwas Chromatin nur den Kammerwandungen anzuliegen.

Es handelt sich anscheinend, wie Dobell, Groß, Zuelzer u. a. annehmen, um einen mehrzelligen Zellkörper, der von einer derberen Membran umgeben ist. Dieser ist die *Crista* als feine Plasmamembran einseitig angelagert.

Ich möchte vorschlagen, den Parasiten nach seinem Fundort *Cristispira helgolandica* zu nennen.

Fortpflanzung. Eine Längsteilung, wie Perrin, Keysselitz, Gonder, Fantham und Porter früher bei ähnlichen Formen beschrieben haben, konnte nie beobachtet werden. Häufiger jedoch war eine Inkurvatur zu bemerken, die mit der Querteilung einherging. Neben dieser Querteilung war indessen noch ein anderer Modus der Vermehrung zu beobachten: An den Grenzen der einzelnen Kammern ließen sich, wenn die Parasiten einige Zeit unter dem Deckglase belassen wurden, schwache Einschnürungen erkennen, die sich immer weiter fortsetzten, bis die *Cristispira* in eine ganze Reihe von länglichen Teilstückchen zerfallen war. Ob die *Crista* an allen Teilstückchen residierte, ließ sich nicht mit Sicherheit entscheiden, doch möchte ich fast dieser Ansicht zuneigen. Diese Teilstückchen dürften vielleicht den einzelnen Individuen entsprechen, aus denen der Parasit zusammengesetzt ist; ich konnte nicht mit Sicherheit entscheiden, ob es sich um Sporen handelte. Diese Teilstückchen nun können sich zu einem neuen Parasiten umbilden.

Zum Beweis dieser Annahme schlug ich folgende Versuchsanordnung ein: Die parasitenhaltige Körperflüssigkeit wurde mit parasitenfreier Körperflüssigkeit eines anderen Seesterns derartig gemischt, daß in einer feuchten Kammer im hängenden Tropfen stets nur eine einzige *Cristispira* enthalten war. Meist trat dann eine Vermehrung durch Inkurvatur ein oder der Parasit starb ab, in 5 Proz. aller Fälle aber kam es zum Zerfall in die Einzelstücke. Es wurde nun eine größere Serie von feuchten Kammern hergestellt, jede einzelne darauf untersucht, ob nur ein einziger Parasit in ihr enthalten war, und die brauchbaren Präparate wurden systematisch beobachtet. Etwa jedes 20. Präparat zeigte endlich an Stelle der Inkurvatursteilung den Zerfall in die Einzelstücke. Leider war es unmöglich, in der feuchten Kammer selbst diese Einzelstücke zur vollständigen *Cristispira* wieder anwachsen zu sehen. Mit Hilfe des Tierversuches aber glückte es in 2 Fällen, die Teilstücke sich in vollkommene Parasiten entwickeln zu lassen.

Es wurden frische Seesterne genau untersucht, ob sie in ihrer Körperflüssigkeit keine *Cristispiren* beherbergten. Ein negativer Befund war um so sicherer, als ja nur in den seltensten Fällen eine Infektion zu finden ist. Trotzdem wurde stets eine größere Anzahl von Ausstrichen genau auf das Vorhandensein von Parasiten untersucht. War ein solches Tier nun als frei von *Cristispiren* befunden, so wurde es mit den Teilstücken geimpft. Dies geschah derart, daß das Deckglas, an dem sich der hängende Tropfen befand, umgedreht wurde und diesem noch einige Tropfen parasitenfreie Körperflüssigkeit zugesetzt wurden. Die Flüssigkeit wurde sodann abpipettiert und in einer Injektionsspritze gesammelt. Das Deckglas wurde sodann noch einige Male mit einigen Tropfen Körperflüssigkeit benetzt und wieder abpipettiert, bis sich keine Teilprodukte nachweisen ließen. Die gesammelte Menge wurde nun dem Seestern

eingespritzt, und es zeigte sich, daß in 2 Fällen nach 3 Tagen in seiner Körperflüssigkeit *Cristispira* zu finden waren, die allerdings nach 7—8 Tagen wieder verschwanden.

Aus diesem Versuch geht mit Deutlichkeit hervor, daß *Cristispira helgolandica* sich durch Zerfall in Einzelstücke vermehren kann, und daß es sich nicht nur um einfache Zerfallsprodukte handelt. Dieser Zerfall in die Einzelindividuen ist jedenfalls auf ungünstige Lebensbedingungen zurückzuführen. Interessant ist aber vor allen Dingen die Tatsache, daß es *Cristispira* gibt, die sich durch diesen Zerfall fortpflanzen können, was jedenfalls dann geschieht, wenn ungünstige Lebensbedingungen eintreten. Wie lange diese Einzelstücke unter natürlichen Bedingungen bestehen können, konnte nicht festgestellt werden, da schon nach 15 Minuten eine Entwicklung nicht mehr stattfand, sondern diese trat nur nach sofortiger Weiterverimpfung ein, und auch dann sogar nur in den wenigsten Fällen.

Im Anschluß daran die Diagnose der neuen Species:

Cristispira helgolandica nov. spec.

Mittlere Länge des erwachsenen Parasiten 68μ ; mittlere Dicke etwa $1,5 \mu$; Länge der Windungen 11—12 μ . Höchstzahl der Windungen 6. Spitze schwach abgerundet; Konturen der Körperwandungen völlig parallel. Ohne Endanhänge. Vermehrung durch Inkurvations- und durch Zerfall in Einzelstücke.

Habitat: Körperflüssigkeit von *Asterias rubens*, Nordsee.

Nachdruck verboten.

Einige Bemerkungen über die *Leptospira dentium* Hoffmann und andere Mundspirochäten.

[Aus der Universitäts-Hautklinik in Bonn (Direktor: Professor E. Hoffmann).]

Von Dr. Edmund Hoffmann.

Die Systematik der Spirochäten hat so lange mit besonderen Schwierigkeiten zu kämpfen, als es nicht gelungen ist, alle Formen kulturell zu isolieren und die morphologischen Veränderungen kennen zu lernen, die die einzelnen Arten unter veränderten Wachstumsbedingungen erleben. Aber auch ohne das ist mehrfach versucht worden, auf Grund morphologischer Eigentümlichkeiten sowohl, wie sonstiger Eigenschaften, Gattungs- und Artdiagnosen aufzustellen, die die mannigfachen Formen verwandtschaftlich gruppieren.

In einer Zusammenstellung der einzelnen Spirochätengruppen fügt Noguchi (1) den schon früher gebräuchlichen Gattungsnamen *Spirochaeta* (Ehrenberg), *Saprosira* (Gross), *Cristispira* (Gross), *Spironema* (Vuillemin), *Treponema* (Schaudinn) noch seine Gattung *Leptospira* bei, der er die Arten *L. icterohaemorrhagiae* (Inada und Ido) und *biflexa* (Wolbach und Binger) zurechnet. In späteren

Publikationen (2) tritt dann noch die *Leptospira hebdomadis* und der Erreger des Gelbfiebers, *L. icteroides* hinzu, abgesehen von den Rattenspirochäten, die durch Gestalt und immunisatorische Eigenschaften der *L. icterohaemorrhagiae* nahestehen. Ob eine wirkliche Berechtigung vorliegt, die Gruppe der Leptospiren als eigene Gattung von den übrigen Formen zu trennen, darüber können die Meinungen bei unserer heutigen Kenntnis der Spirochätenmorphologie noch auseinandergehend sein, als Tatsache aber müssen wir die nähere Verwandtschaft der Formen zueinander hinnehmen, die Noguchi mit seiner neuen Gattungsbezeichnung belegt. Es ist nun von Interesse, zu untersuchen, ob die Eigenschaften der jüngst von Hoffmann (3) unter dem Namen *Spirochaeta trimerodonta* beschriebenen Art der menschlichen Mundhöhle sich in den von Noguchi aufgestellten Formenkreis einordnen und damit den im Nachtrag (4) ihr beigelegten Namen *Leptospira dentium* rechtfertigen. Und zwar ist neben Gestalt und Bewegungsart festzustellen, ob das Aussehen im gefärbten Präparat dem der vorher bekannten Leptospiren entspricht, und vor allem, ob das Verhalten unserer Spirochäte gegen chemische Agentien das gleiche ist wie das von *Leptospira icterohaemorrhagiae* und *icteroides*.

Die Schwierigkeiten einer eingehenden Beobachtung sind für *L. dentium* besonders groß, weil meist nur wenige Exemplare vergesellschaftet mit einer Unzahl anderer Mundspirochäten vorkommen und die Leptospiren ihren Lieblingsaufenthalt unter den Detritusmassen finden, die ja massenhaft zwischen den Zähnen und in Zahnfleischtaschen auch eines gutgepflegten Mundes vorhanden sind. Die Neigung zum Verkriechen unter solche Massen und ihr Vorkommen in nur spärlicher Zahl macht natürlich auch das Suchen im gefärbten Präparat schwer. Schon Noguchi (5) macht auf die Gefahren aufmerksam, die sich in der Unterscheidung der Leptospiren (*icterohaemorrhagiae*) von *Treponema calligyrum* im gefärbten Ausstrich ergeben können, und zeigt das völlige Verstreichen der kleinen Spiralwindungen z. B. auch in einem Falle der Kongorotfärbung. Wie viel mehr aber muß die genaue Diagnose erschwert werden, wenn es sich darum handelt, Formen aus einem Wirrwarr aller möglichen Arten herauszuerkennen, statt sie in einem Präparat zu studieren, das aus einer Reinkultur stammt. Solange aber die Herstellung eines elektiven Nährbodens für die einzelnen Mundspirochätenarten noch nicht geglückt ist, wird eine Isolierung gerade dieser verhältnismäßig seltenen Formen auf besondere Hindernisse stoßen.

Wir müssen also von allen infolge des Absterbens irgendwie veränderten Formen absehen und nur nach solchen Leptospiren suchen, die die gleichmäßigen engen Windungen und die abgeknickten Enden mit ihrem punktförmigen Abschluß aufweisen. Solche Formen sind aber nur in den allerseltensten Fällen zu finden, und die Mundleptospiren, die wir mit ziemlicher Sicherheit im gefärbten Präparat als solche erkennen, geben meist die charakteristische Kleiderbügelform des Dunkelfeldpräparates (s. Abbild. in 3), nicht so deutlich wieder. Mit der Giemsa-Färbung lassen sich ganz zarte, feingewundene Formen erzielen, deren Identifikation mit der typischen Form des Dunkelfeldbildes nicht immer leicht fällt.

Dagegen führt Benians Kongorotmethode (5) manchmal zu besserem Erfolg: Ein Tropfen 2-proz. wässriger Kongorotlösung wird

mit einer geringen Menge spirochätenhaltigen Materials verrieben und ausgestrichen. Nach dem Lufttrocknen werden färbt Uebergießen mit 1-proz. salzsauren Alkohol das Präparat blau, und es ergeben sich Bilder, wie sie feiner (weiß auf blauem Grund) mit keiner anderen Negativmethode zu erhalten sind. Hier bieten sich dem Auge Formen dar, deren ganz feine Windungen kaum die Dicke des gesamten Fadens überschreiten, und die an beiden oder an einem Ende deutlich die punktförmige Verdickung erkennen lassen. Niemals ist es allerdings auch mit dieser Methode gelungen, so schöne Formen zu erzielen, wie sie das lebende Dunkelfeldpräparat bietet. Von Interesse ist, daß auch die Loefflersche Geißelfärbung zuweilen die *Leptospira dentium* deutlich wiedergibt, und einige recht gute Exemplare zeigte erneute Durchsicht eines alten Schaudinnischen Mundspirochätenpräparates.

Neben dem punktförmigen Abschluß der beiden Endportionen und der typischen Bewegung mittels der Körperenden ist das Verhalten der Leptospiren gegen Saponin besonders geeignet, diese Form von den übrigen Spirochätengattungen scharf zu trennen. Die Widerstandsfähigkeit gegen dies Medikament in 10-proz. Lösung wird von Noguchi als eines der wesentlichsten Unterscheidungsmerkmale hingestellt, und auf ihr Verhalten dem Saponin gegenüber gründet sich ganz besonders die Abtrennung der neuen Gattung. Und in der Tat ist diese Resistenz ein weiteres Moment, welches die Zugehörigkeit der *L. dentium* zur Gattung *Leptospira* begründen hilft. Ein Tropfen Saponin, mit etwas Sekret aus dem Munde verrieben, läßt nach kurzer Zeit schon eine deutliche Lähmung der meisten Spirochätenformen erkennen, während die zahlreichen Bazillen ebenso lebhaft wie vorher durchs Gesichtsfeld schießen. Einige Zeit noch läßt sich an einigen wenigen Exemplaren der *Sp. buccalis* und *dentium* (*Treponema*) geringe Lebenstätigkeit in Gestalt von krampfhaften Zuckungen verfolgen. Die meisten aber sind bald bewegungslos. Flüssigkeitsströmungen treiben die starren Körper mit sich fort, deren äußere Gestalt bald deutlich bleibt, bald verschwommen, gleichsam schattenhaft, wird. Die einzige Spirochäte, die in solchen Saponinpräparaten deutliche Bewegung zeigt, ist die *Leptospira dentium*. Sie ist jetzt, wo die störende Bewegung der vielen anderen Arten ausgeschaltet ist, oft leichter zu finden und deutlicher zu verfolgen. Es muß wohl erwähnt werden, daß selten auch mal ein einzelnes Exemplar einer groben Mundspirochätenart $\frac{1}{2}$ Std. und länger die Saponinwirkung aushält, doch ist dann mit der Fehlerquelle zu rechnen, die in der ungleichmäßigen Verteilung des Saponins unter dem Deckglas liegen kann. Durch diese Feststellung der Widerstandsfähigkeit gegen Saponin wird die nahe Beziehung der *L. dentium* zum Formenkreis der Gattung *Leptospira* (Noguchi) besonders deutlich gemacht.

An dieser Stelle mag Erwähnung finden, daß auch das Chinablau [angewandt nach Oelze (6)] die Leptospiren weniger schädigt als die übrigen Spirochätenformen der Mundhöhle. Während die groben Spirochäten einige Stunden nach Anfertigung des Präparates meist leblos und starr daliegen, zeigt die *L. dentium* noch deutliche Bewegung.

Während Noguchi mehrfach Abbildungen, z. B. der *L. icterohaemorrhagiae*, gibt, denen die Endkörperchen fehlen und deren feine Windungen bis in die äußerste Spitze fortgesetzt erscheinen, hat

man bei Dunkelfeldbeobachtung und zumal bei schneller Rotation unserer Mundspirochäte zuweilen den Eindruck, als säße das Endkörnchen einem ganz dünnen Fädchen auf, an dem von Windungen nichts mehr zu erkennen ist (vgl. Abbild. in 3). Auch sind die wellenartig sich krümmende Formen (Ring- und Schleifenbildungen), wie sie von Noguchi für *L. icterohaemorrhagiae* und *icteroides*, wie auch von Hübener und Reiter (7) und Uhlenhuth und Fromme (8) gleich in ihren ersten Veröffentlichungen beschrieben sind, verhältnismäßig selten zu beobachten. Vielmehr haben wir fast immer jenes eigenartige peitschenförmige Schlagen mit beiden Körperenden vor uns, welches für die Fortbewegung der übrigen Leptospiren in flüssigen Medien als charakteristisch beschrieben ist. Tatsächlich gelingt uns ja die Beobachtung unserer *L. dentium* nur im flüssigen Medium, denn ihre Bewegungsart im Innern der Detritusmassen, unter denen sie sich gern verkriecht, ist uns verborgen, und im halbstarren Kulturmedium sie zu verfolgen, fand sich infolge Mangels an Reinkulturen noch keine Gelegenheit.

Die *L. dentium* ist viel häufiger, als ihre späte Entdeckung vermuten lassen sollte. Der Nachweis gelang in fast 40 Proz. einer Serie von untersuchten Fällen, wobei ganz wahllos die Mundhöhlen von Patienten untersucht wurden, die gerade zur Verfügung standen und ohne Rücksicht auf eine etwa vorhandene Stomatitis oder sonstige Erkrankung. Zu anderen Zeiten dagegen fanden wir sie oft spärlich. Bei sehr starker Bakterien- und Spirochätenflora des Mundes, z. B. bei Stomatitis ulcerosa, sucht man oft vergeblich nach den feinen Mundleptospiren. Man hat den Eindruck, als ließe die kolossale Vermehrung der größeren Formen diese besonders feine Art nicht aufkommen; und auch nach Saponinanwendung ist mir hierbei ihr Nachweis oft nicht gelungen. Andererseits war es gerade ein Fall von Stomatitis, bei dem mehrfach ungewöhnlich lange Leptospiren gefunden wurden, ähnlich dem Teilungsstadium, das E. Hoffmann schon in seiner ersten Abbildung wiedergibt. Intravenöse Salvarsangaben pflegen, wie auf die Saprophyten der Mundhöhle im allgemeinen, so auch auf die Leptospiren keinen deutlichen Einfluß zu haben, und auch lokale Desinfizientien beeinflussen den Nachweis unserer Spirochäte nur wenig. Die Beweglichkeit der *L. dentium* pflegt im wachsumrandeten Dunkelfeldpräparat bei Zimmertemperatur die der groben Spirochäten meist zu überdauern. 78 Std. nach der Abnahme wurde noch deutliche Eigenbewegung nachgewiesen, während in dem Falle die groben Formen nur uncharakteristische Zuckungen ausführten. Brutschranktemperatur von 37° läßt nach 24 Std. nur abgestorbene Spirochäten erkennen, deren Gestalt nicht mehr einwandfrei zu identifizieren ist. Noch länger allerdings als die Leptospiren zeigen im gleichen Präparat jene Formen ihre Lebenstätigkeit an, die von Hoffmann (3) als *Spirochaeta skolidonta* bezeichnet sind. Hier habe ich bis zu 107 Std. nach Abnahme des Zahnbelags die Ortsbewegung der Organismen verfolgen und die Schlängelungen des feingewundenen Körpers beobachten können. Diese Form, die sich durch ihre eigenartige Bewegungsweise von allen anderen Mundspirochäten unterscheidet, ist ebenfalls bei genauer Durchsicht von Präparaten aus der Mundhöhle Gesunder oder Kranker nicht unschwer zu entdecken. Unter 30 Fällen konnten sie 16mal nachgewiesen werden. Verhältnismäßig häufig (bei 3 Pat.) zeigten sich

Formen, deren Leib mit hellen, stärker lichtbrechenden Knötchen besetzt war. Wir haben wohl die gleiche Erscheinung vor uns, die E. Hoffmann bei *Spirochaeta buccalis* als Degenerationsveränderung der absterbenden Organismen beschrieben hat.

Neben großen Mengen anderer Spirochätenformen ließ sich in beträchtlicher Anzahl gerade die *Spirochaeta skoliodontia* aus dem Peritonealexsudat eines Meerschweinchens erhalten, das mit Mundspirochäten mehrfach geimpft und 6 Tage nach der letzten Impfung an Sepsis eingegangen war.

Nach Fertigstellung dieser Arbeit wurde mir eine aus Leitungswasser gezüchtete Leptospirenreinkultur zugänglich, die Herr Geheimrat Uhlenhuth und Fräulein Dr. Zuelzer in liebenswürdigster Weise Herrn Prof. Hoffmann zur Verfügung gestellt hatten. An diesen Kulturen, die massenhaft schöne und besonders lange Exemplare von morphologisch durchaus gleicher Beschaffenheit wie die *L. dentium* enthielt, ließen sich natürlicherweise weit leichter als in unseren Mundpräparaten die färbärischen Eigenschaften dieser Organismen verfolgen.

Mit Giemsa-Lösung wurden feine, schwach rötliche Farbentöne erzielt, die aber wegen des gehäuften und alleinigen Vorkommens dieser Leptospirenart im Präparat deutlichere Bilder gaben als die Ausstriche vom Mundsekret mit ihrer großen Mannigfaltigkeit verschiedener Organismen. Ganz besonders nützlich erwies sich hierbei die jüngst von Hoffmann (9) als Leuchtbildmethode empfohlene Dunkelfeldbetrachtung gefärbter Ausstrichpräparate, in denen die gleichmäßigen und zierlichen Windungen der Leptospiren klar hervortraten und bis zum Ende hin zu verfolgen waren, während der Giemsa-Ausstrich im Hellfeld die einzelnen Windungen bei der gleichen Vergrößerung weniger deutlich erkennen ließ. Das Gleiche wurde übrigens auch bei der Kongorotfärbung festgestellt, die gleichfalls in Dunkelfeldbetrachtung die kleinen Spiralen klarer zeigte als im Hellfeld.

Von Interesse und Wichtigkeit ist die Beobachtung, daß auch die von Uhlenhuth als *Spiroch. pseudoicterogenes* benannten Kulturspirochäten sich durch große Saponinfestigkeit auszeichneten. 4 Std. nach Zuführung des 10-proz. Saponintropfens war noch deutliche und recht lebhafte Bewegung zu konstatieren. Wir haben also auch hier eine Form vor uns, die wohl der Noguchischen Gruppe *Leptospira* angehören dürfte.

Literatur.

- 1) Noguchi, Hideyo, Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirocheta*) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). (Journ. Exp. Med. Vol. 26. 1918. p. 575—592.) — 2) Ders., *Spirocheta icterohaemorrhagiae* in American wild rats and its relation to the Japanese and European strains. (Ibid. Vol. 25. 1917. p. 755—763.) — Ders., Cultivation morphology, virulence and biological properties of *Leptospira icteroides*. (Ibid. Vol. 30. 1919. p. 13—29). — Ders., Presence of a *Leptospira* in wild animals in Guayaquil and its relation to *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira icteroides*. (Ibid. Vol. 3). 1919. p. 98—117.) — 3) Hoffmann, Erich, Ueber eine der Weilschen Spirochäte ähnliche Zahnspirochäte des Menschen. (*Spirochaeta trimerodonta*) und andere Mundspirochäten. (Deutsch. med. Wochenschr. 1920. Nr. 10.) — 4) Ders., Nachtrag zu meiner Arbeit über eine neue Zahnspirochäte (*Spirochaeta trimerodonta* bzw. *Leptospira dentium*). (Ebenda. 1920. Nr. 23). — 5) Noguchi, Hideyo, The Spirochetal flora of the normal male genitalia.

(Journ. Exp. Med. Vol. 27. 1918. p. 667—678.) — 6) Oelze, F. W., Ueber Fluoreszenzfärbung von Spirochäten im vital gefärbten Dunkelfeldpräparat. (München. med. Wochenschr. 1920. Nr. 47.) — 7) Hübener und Reiter, Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. (München. med. Wochenschr. 1915. Nr. 43). — 8) Uhlenhuth und Fromme, Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). (Med. Klin. 1915. Nr. 44.) — 9) Hoffmann, Erich, Ueber die Verwendung des Dunkelfeldes zur Auffindung der Gelbfieber-, Syphilisspirochäten und anderer Mikroorganismen in gefärbten Ausstrich- und Schnittpräparaten. (Deutsch. med. Wochenschr. 1921.)

Nachdruck verboten.

Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der medizinischen Fakultät der Tohoku-Universität, Sendai, Japan (Direktor: Prof. K. Aoki).]

I. Mitteilung.

Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen während der Immunisierung des Kaninchens mit Typhusbazillen.

Von Prof. Dr. K. Aoki und Assistent Dr. T. Konno.

Die Beobachtung, daß die Paratyphus B-Bazillen im Typhusimmunsérum sich zusammenballen, ist eine so bekannte Tatsache, daß es überflüssig erscheint, die weitläufige Literatur darüber hier wieder anzugeben. Die Beobachtungen aber, wie stark, d. h. in welchem Verhältnisse die oben angegebenen Mikroben darin agglutinieren, gestalten sich außerordentlich verschieden.

So untersuchte z. B. Jürgens die Widalsche Reaktion bei vielen an Typhus erkrankten Soldaten mehrmals während des Krankheitsverlaufes und fand, daß Paratyphus B-Bazillen in den meisten Fällen deutlich stark, in einzelnen Fällen gleich stark wie Typhusbazillen agglutinierten. Dabei war besonders auffallend, daß die Mitagglutination sowohl im Anfang der Erkrankung, als auch im Rekonvaleszenzstadium die Hauptagglutination überwog. Gleichfalls beobachtete Zupnik die Widalsche Reaktion bei 300 Typhuskranken und kam zu dem Resultat, daß die Agglutination der Schottmüllerschen Bazillen in einigen wenigen Fällen so stark, wie die der Eberth'schen Bazillen, ja sogar noch höher eintrat. Ebenfalls fanden Grünberg und Rolly eine stärker als die Hauptagglutination eingetretene Mitagglutination von denselben Mikroorganismen bei einer beträchtlichen Anzahl von Typhuskranken. Manteufel beobachtete auch die gleich starke Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen bei ziemlich vielen Fällen von Typhuserkrankungen. Dagegen waren Korte und Steinberg der Ansicht, daß die Hauptagglutination der Eberth'schen Bazillen immer stärker sein müsse, als die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen, falls man dabei den Agglutinationsgrad nicht makroskopisch, sondern mikroskopisch genau beobachtet hätte. Bruns und Kayser prüften nicht Krankensérum, sondern viele künstlich bei Tieren hergestellte Typhusimmunséra und kamen zu dem Resultate, daß hochwertige Séra nicht nur Typhusbazillen, sondern auch ihnen verwandte Mikroben, nämlich Paratyphus B-Bazillen stärker beeinflussen als schwach wirkende Séra, daß also ein Parallelismus zwischen der Haupt- und Mitagglutination besteht. Porcile konnte dieses Verhältnisse nicht bestätigen kam dagegen zu dem Schluß, daß hochwertige Typhuséra immer schwache Mitagglutination gegen Paratyphus B-Bazillen zeigen, daß geringwertige Typhuséra stets schwächere Mitagglutination aufweisen. D'Amato kam zu dem gleichen Befunde

und belonte, daß man, um die Spezifität der Agglutination als zuverlässig verwerten zu können, möglichst stark wirkende Typhussera gebrauchen solle. Lipschütz bemerkte, daß die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination keine beständige sei, d. h. Sera, die gleichwertige Agglutination zeigten, agglutinieren ihnen verwandte Mikroben doch nicht immer gleich stark.

Diese Tatsachen machten es schwer, sowohl einfach durch die Widalsche Reaktion Typhus zu diagnostizieren als auch durch die Grubersche Reaktion Typhusbazillen zu bestimmen. Um eventuell eintretende Fehler zu vermeiden, wurde einerseits das Castellansche Verfahren empfohlen, andererseits wurden solche Sera angewandt, welche möglichst starke Hauptagglutination und gleichzeitig möglichst schwache Mitagglutination zeigen.

Ueber unsere experimentellen Erfahrungen zu dieser Frage sei hier kurz berichtet. In unserem Laboratorium waren 12 Typhusimmunsere vorrätig, die mit 6 Typhusbazillenstämmen bei Kaninchen hergestellt waren. Zufälligerweise beabsichtigten wir, zu prüfen, wie stark diese Typhussera eine größere Reihe Paratyphus B-Bazillenstämmen mitagglutinierten. Es ergab sich, daß diese Mikroben in einzelnen Seren fast gleich hoch, aber nicht in allen gleich stark agglutinierten. Dabei konnte man aber weder den Parallelismus zwischen der Haupt- und Mitagglutination, wie Bruns und Kayser behauptet hatten, nach Porciles Anschauung bestätigen. Es scheint vielmehr keine bestimmte Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination zu bestehen. Wir hatten nämlich 3 sehr verschieden wirkende Typhussera, deren Mitagglutination gegen Paratyphus B-Bazillen jedoch gleich hoch war. Das eine von den 3 Seren, Nr. 67, besitzt den Titer von 1:10 000, das andere, Nr. 74, von 1:5000 und das 3., Nr. 31, von 1:2000. Alle 3 Sera agglutinierten viele Stämme von Paratyphus B-Bazillen fast gleich stark, nämlich von 1:50—1:100.

Wir fanden noch andere entgegengesetzte Fälle, wo die Sera gleich starke Hauptagglutination zeigten, wo jedoch die Mitagglutination sehr verschieden hoch ausfiel. 4 Sera zeigten alle den Titer von 1:5000. Eins von diesen, Nr. 41, agglutinierte Paratyphus B-Bazillen von 1:1000 bis 1:2000, das andere, Nr. 44, 1:2000, das 3., Nr. 70, 1:200 und 4. Nr. 74, von 1:50—100 stark (Tab. Ia). Das Serum von Kaninchen Nr. 67 konnte aber nicht für die Bestätigung der Porcileschen Ansicht angeführt werden, sondern ist als eine Ausnahme zu betrachten. denn Porciles Anschauung, daß hoch wirkende Typhussera immer niederwertige Mitagglutination innehalten, konnte bei unseren Beobachtungen nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis stimmte vielmehr mit der Beobachtung von Lipschütz überein, welcher der Meinung war, daß diese Schwankung der Mitagglutination, unabhängig von dem Titer der Hauptagglutination, darauf beruhe, daß die Individualität der Organismen und der Stamm der Mikroben sehr verschieden sei. Je nach der Individualität der Tiere wäre der Bau und Gehalt der Rezeptoren gegen die Mitagglutination nicht gleich, und auch der Rezeptorenapparat der Mikroorganismen könne je nach dem Stamme verschieden gebaut sein. Dem Einflusse der Immunisierungsmethode wollte er aber keine große Bedeutung beimessen. Nach dem Ergebnis unserer Beobachtung aber scheint nicht nur die Individualität der Tiere, sondern auch das Immunisierungsverfahren dabei eine Rolle gespielt zu haben, denn Typhussera, die für sich allein verhältnismäßig schwache Mitagglutination zeigten, waren meist von Tieren hergestellt, die mit steigender Dose Bakterien 4mal mit 7-tägigen Intervallen vorbehandelt wurden, während viele andere Sera.

deren Mitagglutination für sich allein hoch war, fast ohne Ausnahme von Tieren gewonnen wurden, welche über 4mal vorbehandelt worden waren.

Infolgedessen haben wir versucht, ein klares Bild von dem Einflusse des Immunisierungsverfahrens auf die Bildung der Haupt- und Mitagglutination zu bekommen, um vielleicht auf diese Weise irgendeine praktische Anwendung finden zu können. Unsere Untersuchung erstreckte sich hauptsächlich auf das Immunisierungsverfahren, und zwar den Ort und die Stelle der Impfung, die Menge der eingespritzten Bakterien, Zahl und Art der Einspritzungen, wobei nicht versäumt wurde, die Individualität der Organismen zu berücksichtigen.

Die Resultate der Untersuchungen wurden hauptsächlich nach zwei Punkten hin betrachtet, 1) nach dem absoluten Wert der Haupt- und Mitagglutination, 2) nach den Beziehungen zwischen den beiden Reaktionen. Diese Beziehung kann man leicht durch einen Bruch ausdrücken, wobei der Titer der Hauptagglutination als Nenner und der Titer der Mitagglutination als Zähler genommen werden. Durch diesen Bruch kann man sehr bequem beurteilen, ob die betreffenden Sera einen großen Unterschied zwischen der Haupt- und Mitagglutination besitzen. Je kleiner dieser Bruch ausfiel, desto größer muß der Unterschied zwischen den beiden Reaktionen sein. Je größer dieser Unterschied, desto sicherer kann man das betreffende Serum zu diagnostischen Zwecken anwenden.

Technische Bemerkungen.

1) Im Handel bezogene Kaninchen wurden mindestens 1 Monat lang in unserem Stalle weitergezüchtet, bevor sie zum Versuche gebraucht wurden. Von jedem Kaninchen wurde eine größere Blutprobe von den Ohrvenen etwa 1 Monat vor dem Versuche genommen, damit jedesmal der Agglutinationstiter der normalen Sera der betreffenden Tiere austitriert werden konnte. An jedem 7. Tage nach der Einspritzung wurde stets eine kleine Blutprobe aus den Ohrvenen genommen, um den Agglutiningehalt der betreffenden Blutprobe auszutitrieren.

2) 6 Stämme von Typhusbazillen aus unserer Sammlung wurden auf Schrägagarnährböden gezüchtet, deren Flächenraum fast gleich groß war. Sie wurden ca. 20 Std. lang bei 37° C im Brutschrank wachsen gelassen, darauf in 0,85-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und bei 60° C genau 15 Min. lang erhitzt. Dieses Impfmateriale wurde niemals vorrätig gehalten, sondern jedesmal vor dem Gebrauche frisch dargestellt. Es wurde von den Kaninchen so gut vertragen, daß sie selbst durch die subkutane Einspritzung von 6 Agarkulturen gewöhnlich nicht tödlich geschädigt wurden.

3) Von der Blutprobe wurde das Serum gewonnen, wovon zuerst die Standardverdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 hergestellt wurden, von denen man weitere Verdünnungen machen konnte. Den 24-stünd. gut gewachsenen Agarkulturen wurden 5 ccm Kochsalzlösung hinzugefügt. Die so behandelte Kultur wurde ca. 5 oder 10 Min. lang ruhig stehen gelassen und dann leicht geschüttelt und so die Bakterien ganz leicht homogen aufgeschwemmt. Falls diese Aufschwemmung sich noch nicht genug homogenisieren ließ, wurde sie leicht zentrifugiert. So homogenisierte Aufschwemmung wurde zur Agglutination gebraucht.

Die weiteren Verdünnungen der Sera und Hinzufügung der Bakterien erfolgten nach dem von Fernet dargestellten Schema im Kolle und Wassermannschen Handbuche. Die Agglutinationsproben wurden bei 37° C im Brutschrank 3 Std. lang stehen gelassen. Das Ablesen erfolgte in der Weise, daß die Suspension und die Niederschläge der agglutinierten Bakterien genau mit der Lupe betrachtet wurden.

A. Subkutane Impfung.

1. Einmalige Immunisierung.

Versuch 1.

12 Kaninchen wurden mit $\frac{1}{1000}$ Schrägagarkultur von 6 Typhusbazillenstämmen vorbehandelt. Am 7. Tage nach der Einspritzung wurden die Blutproben entnommen und auf den Titer der Haupt- und Mitagglutination geprüft. Das Ergebnis zeigt Tab. II.

Versuch 2.

Es wurden 12 weitere Kaninchen mit $\frac{1}{100}$ Schrägagarkultur von Typhusbazillen vorbehandelt und am 7. Tage wurden die Blutproben entnommen und auf Hauptagglutination und Mitagglutination geprüft. Das Resultat glich bezüglich des Normalserums dem von Versuch 1. Mit Immunserum waren die Titer der Haupt- und Mitagglutination im ganzen höher. Ihr Verhältnis wechselte zwischen $\frac{1}{1}$ und $\frac{1}{30}$ als den Extremen und betrug im Durchschnitt $\frac{1}{6}$.

Versuch 3.

Ferner wurden je 15 Kaninchen mit einer noch größeren Dose Bakterien, nämlich von $\frac{1}{10}$ Schrägagarkultur, vorbehandelt mit dem Resultat, daß in den Immunseris sich der Agglutinationstiter abermals erhöht hatte (bis 1:5000 Haupt-, 1:500 Mitagglutination). Die Verhältniszahl betrug im Mittel $\frac{1}{10}$. Hierbei waren die Extreme $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{32}$.

Versuch 4.

Derselbe Versuch wurde bei 12 Kaninchen mit je $\frac{1}{1}$ Agarkultur von Bakterien ausgeführt. Das Ergebnis war eine weitere durchschnittliche Erhöhung der absoluten Titergrenzen der Hauptagglutination (1:2000 bis 1:5000) ohne Steigen der Mitagglutination gegenüber Versuch 3 (bis 1:200). Die Verhältniszahl betrug $\frac{1}{10}$.

Versuch 5.

Derselbe Versuch wurde bei 10 Kaninchen mit je 1 Agarkultur ausgeführt. Der Titer der Hauptagglutination stieg bei 2 Tieren auf 1:10000. Gleichzeitig erhob sich der der Mitagglutination bis auf 1:1000. Die Verhältniszahl betrug $\frac{1}{7}$.

Versuch 6.

Ferner wurde der gleiche Versuch bei 10 Kaninchen mit je 3 Agarkulturen angestellt. Die absolute Titerhöhe der Hauptagglutination blieb im ganzen gegenüber Versuch 5 gleich, wenn auch ein Serum bis 1:20000 agglutinierte, dagegen kam es bei einigen Tieren zur Mitagglutination bis 1:2000. Im ganzen ergab sich wieder eine Verhältniszahl von $\frac{1}{7}$.

Versuch 7.

Zum Schlusse wurde derselbe Versuch bei 10 Kaninchen mit je 6 Agarkulturen ausgeführt mit einem Versuch 5 und 6 analogen Resultat (Tab. VIII). Analog waren Haupt- und Mitagglutinine erhöht. Die Verhältniszahl betrug $\frac{1}{6}$.

Aus den Ergebnissen der obigen 7 Versuche konnten wir folgendes zusammenfassen:

Obwohl die Hauptagglutination unter einzelnen Tieren, die gleiche Dosen Bakterien erhalten hatten, entweder wegen der Individualität der Organismen oder der Bakterienstämme nicht konstant war, nahm sie doch im großen und ganzen je nach der Menge der Bakterien zu. Es zeigten diejenigen Tiere, welche nur eine geringe Dose Bakterien, z. B. $\frac{1}{1000}$ Agar, erhalten hatten, durchschnittlich sehr niedrigen Titer, nämlich bei den meisten Tieren 1:100, bei wenigen 1:200, ganz selten 1:500, dagegen gaben die anderen Tiere, die viel größere Dosen Bakterien, nämlich 6 Agarkulturen, bekommen hatten, sehr starken Titer an. Dieser Titer betrug bei den meisten Tieren 1:10000, bei wenigen 1:5000. Aber diese Zunahme des Titers je nach der Dose der

eingespritzten Bakterien schien nicht immer gleichen Schritt mit der Dose der eingespritzten Bakterien zu halten, vielmehr schien dieses Vermehrungsverhältnis bis zu einer gewissen Dosis der eingespritzten Bakterien, nämlich einer Agarkultur, bedeutend größer, mit der weiteren Vermehrung der eingespritzten Bakterien aber verhältnismäßig kleiner zu werden. Was die Mitagglutination anbelangt, so hängt ihr absoluter Titer im großen und ganzen von der eingespritzten Dosis der Bakterien ab, wie bei der Hauptagglutination. Aber ihr Vermehrungsverhältnis verhielt sich umgekehrt; es war nämlich bis zu einem gewissen Grade der Dosis, einer Agarkultur, nicht sehr groß, wurde aber mit der Vermehrung der eingespritzten Dose immer größer. Infolgedessen zeigte sich der Bruch zwischen der Haupt- und Mitagglutination sowohl bei der sehr kleinen Dose als auch bei recht großer Menge von Bakterien größer als bei mittelgroßen Bakterien Dosen, welche bei unseren Versuchen von $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{2}$ Agarkultur betrug. Da dieses ganze Verhalten entweder wegen der Individualität der Tiere oder der Bakterienstämme gewisse schwer erklärbare Schwankungen zeigte, so versuchten wir, diese zwei Momente auszugleichen.

Zu diesem Zwecke wurde aus den Ergebnissen der 7 Versuche ein durchschnittlicher Wert der Haupt- und Mitagglutination ausgerechnet, wie ihn Tab. III angibt, aus der das oben angegebene Verhalten deutlich zu ersehen ist. Die jeweilige Zunahme der Hauptagglutination nämlich war bis zu der Dosis von $\frac{1}{2}$ Agarkultur sehr groß, machte aber von dieser Dose an nicht mehr so starke Fortschritte, während es bei der Mitagglutination umgekehrt war. Hier vermehrte sie sich bis zu der Dose von $\frac{1}{2}$ Agar sehr unbedeutend, um erst von der 1-Agardose an enorm zuzunehmen. Deshalb wurde der Bruch zwischen den beiden Reaktionen, welche bei der Einspritzung geringer Bakterien dose, nämlich bei $\frac{1}{1000}$ $\frac{1}{4}$ groß war, bei der Einspritzung mittelgroßer Dose der Bakterien, nämlich $\frac{1}{2}$ Agar, viel kleiner, nämlich $\frac{1}{18}$, um dann mit der Einspritzung einer noch größeren Dose Bakterien, 3 Agar, wieder größer zu werden.

Dieses Verhalten kann man in einer Kurvenlinie darstellen, wenn die Dose der eingespritzten Bakterien als die Abszisse, der Nenner des Bruches, welcher das Verhältnis zwischen der Haupt- und Mitagglutination ausdrückt, als die Ordinate betrachtet wird. Der Gipfel dieser Kurvenlinie entspricht gerade dem minimalsten Wert des Bruches der Haupt- und Mitagglutination, wobei bemerkt werden muß, daß diese Kurvenlinie, die von der Dose von 1 Agar bis zu 3 Agar allmählich herunterkam, durch die weitere Einspritzung von 6 Agar wiederum einen kleinen Aufschwung zeigte.

Um andererseits zu wissen, ob der Bakterienstamm und die Individualität der Organismen irgendeinen Einfluß ausüben, wurden die obigen Ergebnisse nach dem Stamme der Bakterien angeordnet und durchschnittlich betrachtet. Daraus ergab sich, daß das Verhältnis zwischen der Haupt- und Mitagglutination, obwohl unter einzelnen Tieren, die mit dem gleichen Stamme und der gleichen Dose Bakterien vorbehandelt worden waren, ziemlich verschieden war, doch unter einzelnen Stämmen keinen bestimmten Unterschied zeigte. Danach schien der Stamm der Bakterien bei der 1maligen Immunisierung keinen besonderen Einfluß zu haben.

Aus allen diesen Betrachtungen kann man wohl schließen, daß der Wert der Haupt- und der Mitagglutination, wenn er auch von dem Stamme der Bakterien und der Individualität der Organismen abhängig ist, doch durch die Dose der eingespritzten Bakterien bedeutend beeinflusst werden muß.

2. 10-malige Einspritzung des Impfstoffs.

Da wir oben das Verhalten der Neubildung der Haupt- und Mitagglutination bei der 1maligen Immunisierung kennen gelernt hatten, wurden weitere Versuche angestellt, um zu sehen, ob man dasselbe Verhalten auch durch mehrmalige, nämlich 10malige Einspritzung, erhalten könne.

Versuch 8—9.

Je 6 Kaninchen wurden mit 6 verschiedenen Stämmen von Typhusbazillen vorbehandelt, und zwar wurde zuerst die Dose von $\frac{1}{1000}$, dann von $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5 Agarkulturen mit 7-tägigem Intervall eingespritzt. An jedem 7. Tage nach der Einspritzung wurden die Blutproben von jedem Tiere entnommen und auf Haupt- und Mitagglutination untersucht, wie oben. Der Titer der Hauptagglutination, der nach der 1. Einspritzung sehr schwach war, nämlich bei den meisten Tieren aus dem Versuche 1:200, nur bei 2 Tieren 1:500, bei 5 Tieren aus dem Versuche 9 1:100, bei 1 Tiere 1:500 nahm durch die 2. und die 3. Einspritzung gewaltig zu und erreichte schon durch die 4. und 5. Einspritzung bei den meisten Tieren fast den maximalen Titer. Dieser betrug bei den meisten Tieren 1:5000—1:10000, nur bei 1 Tiere 1:20000 und bei den übrigen 3 Tieren 1:2000. Von der 7. und 8. Einspritzung nahm er bis zum maximalen Titer von 1:20000 langsam zu, obwohl noch größere Dosen eingespritzt wurden. Ausnahmsweise nahm er bei solchen Tieren, bei denen der Ag-

glutinationstiter bis zu der 6. Impfung noch nicht stark vermehrt war, nämlich 1:2000, erst nach der 7. oder 8. Impfung mit großer Geschwindigkeit zu (Kaninchen Nr. 265, 293 und 294).

Die Mitagglutination verhielt sich ganz anders. Sie war bei der 1. Einspritzung ebenfalls sehr schwach, wie die Hauptagglutination; ihr Titer betrug bei den meisten Tieren 1:50, bei wenigen von 1:100—1:200 und hatte durch die 2. oder 3., ja sogar 5. Einspritzung fast nicht zugenommen. Als eine Ausnahme konnte man bei 1 Tiere nach der 5. Einspritzung eine starke Zunahme nachweisen. Diese, eine Zeitlang nicht in der Zunahme gebliebene Mitagglutination fing erst nach der 6. oder 7. Vorbehandlung an stark zuzunehmen, trat aber nicht bei allen Tieren in der gleichen Zeit und in dem gleichen Grade ein, nämlich bei 1 Tiere schon nach der 7. und bei noch anderen erst nach der 8. Impfung.

Auf diese Weise war der Titer der Mitagglutination immer mehr und schließlich so weit gestiegen, daß man ihn nach der 9. oder 10. Vorbehandlung bei den meisten Tieren von 1:5000—1:20000, ausnahmsweise noch höher, nämlich 1:50000 und bei wenigen 1:1000, finden konnte. Hier muß bemerkt werden, daß die Mitagglutination bei wenigen Kaninchen (nämlich Nr. 148 und Nr. 327) während der ganzen Immunisierungszeit fast nicht zugenommen hatte. Der Bruch der Haupt- und Mitagglutination, welcher nach der 1. Impfung recht groß war, nämlich bei den meisten Tieren von $\frac{1}{5}$, bis $\frac{1}{5}$, bei wenigen Tieren $\frac{1}{10}$, wurde weiter mit der 2. und 3. Vorbehandlung immer kleiner und kleiner, so daß er nach der 4. oder 5. Einspritzung bei den meisten Tieren einen minimalsten Wert bekam, welchen jedes Tier während des Immunisierungsverlaufs zeigen konnte. Letzteres trat bei 1 Tiere, Nr. 169, aber erst nach der 7. und bei einem anderen Tiere, Nr. 327, erst nach der 10. Einspritzung ein. Dieser minimalste Wert des Bruches betrug bei 7 Tieren $\frac{1}{100}$, bei 4 von $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{20}$ und bei 1 Tiere $\frac{1}{10}$. Von der 6. oder 7. Einspritzung fing er an, unter individuellen Schwankungen früher oder später immer stärker zuzunehmen. So wurde er nach der 7. Einspritzung bei 3 Tieren $\frac{1}{11}$, bei anderen 4 von $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{30}$, bei 2 $\frac{1}{50}$ und nur bei 2 Tieren $\frac{1}{100}$, und nach der 10. Einspritzung bei 2 Tieren $\frac{1}{1}$, bei 3 Tieren von $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{4}$, bei 2 $\frac{1}{10}$, bei 2 anderen Tieren $\frac{2}{1}$ und bei noch anderen 2 Tieren $\frac{1}{100}$.

Bei diesem Versuche zeigte sich die Zunahme der Haupt- und Mitagglutination bei einzelnen Tieren nicht gleich, so daß eine übersichtliche Betrachtung sehr schwer wurde. Diese Schwankung müßte darauf beruhen, daß die Individualität der Tiere einerseits, der Stamm der Bakterien andererseits verschieden wäre. Um diese Beeinflussungen auszugleichen, haben wir aus den Resultaten der obigen Versuche eine durchschnittliche Zahl ausgerechnet, wie in Tab. IV angegeben, woraus das oben beschriebene Verhalten der Haupt- und Mitagglutination noch deutlicher zutage trat.

Versuch 10 und 11.

Ferner wurden 2 Versuche unter denselben Bedingungen angestellt, aber mit einer größeren Menge der eingespritzten Bakterien. Die Dose der 1. Einspritzung betrug $\frac{1}{100}$, die mit der weiteren Einspritzung immer vermehrt wurde, wie bei den letzten 2 Versuchen. So wurden die Tiere im ganzen 10mal vorbehandelt. Da die Resultate aus den beiden Versuchen 10 und 11 ziemlich stark auseinandergehen, so möchten wir sie einzeln betrachten:

Bei dem Versuch 10 verhielt sich die Zunahme der Hauptagglutination ganz wie bei den letzten Versuchen. Ihr Titer, welcher nach der Einspritzung von $\frac{1}{100}$ Agar von 1:200—1:500, selten 1:1000 oder 1:2000 betrug, nahm durch die 2. und 3. Impfung gewaltig zu, so daß er nach der 4. oder 5. Vorbehandlung fast einen maximalen Wert erreicht hatte, nämlich bei 4 Tieren den Wert von 1:10000—1:20000, und nur bei den anderen 2 Tieren von 1:5000. Dieser Titer ging selbst nach der 9. und 10. Immunisierung nicht über 1:20000.

Die Mitagglutination war nach der 1. Einspritzung bei den meisten Tieren 1:100, nur bei 1 Tiere 1:50. Dieser Titer blieb bis zur 4. Impfung fast unverändert und nahm erst von der 5., noch deutlicher aber von der 6. Impfung an bedeutend zu. Er betrug bei 2 Tieren 1:1000 und bei einem Tiere 1:500. So nahm er unter individuellen Schwankungen früher oder später mit der weiteren Einspritzung immer mehr und mehr zu, so daß man bei der 8. Impfung bei 5 Tieren von 1:2000—1:5000; nach der 10. Impfung bei 3 1:10000, bei 1 Tiere 1:5000 und bei noch einem anderen 1:20000 nachweisen konnte. Ausnahmsweise blieb diese Mitagglutination in diesem Versuche bei einem Tiere während des ganzen Immunisierungsverlaufes unvermehrt. Der Bruch der Haupt- und Mitagglutination, welcher nach der 1. Impfung bei vielen Tieren von $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{20}$ betrug, wurde mit der 2. und 3. Einspritzung immer kleiner. Schon nach der 4. Vorbehandlung hatte er bei 5 Tieren, nach der 5. Impfung bei 6 einen minimalen Wert erreicht und betrug bei 5 Kaninchen $\frac{1}{100}$ und bei 1 Tiere $\frac{1}{50}$. Dieser minimalste Wert wurde ferner von der 6. oder 7. Vorbehandlung mit der Zu-

nahme der Mitagglutination immer größer und größer, bis er endlich nach der 10. Einspritzung bei 3 Tieren $\frac{1}{8}$, bei einem Tiere $\frac{1}{4}$ und bei noch einem anderen $\frac{1}{1}$ wurde. Bei einem Tiere hatte als Ausnahme dieser minimalste Wert in der ganzen Zeit nicht zugenommen.

Das Resultat aus dem Versuche 11 verhielt sich mit dem aus dem Versuch 10 insofern ganz gleich, als die Mitagglutination bei vielen Tieren verhältnismäßig früh stark zuzunehmen anfang. Diese Zunahme trat schon bei der 3. oder 4. Einspritzung deutlich auf, weshalb der minimalste Wert des Bruches bei vielen Tieren nicht so klein wurde wie bei dem letzten Versuche: Die Hauptagglutination war in dieser Zeit noch nicht hoch genug geworden. Dieser minimalste Wert betrug nämlich bei den meisten Tieren $\frac{1}{30}$ — $\frac{1}{50}$, nur bei einem Tiere $\frac{1}{100}$. Aus gleichem Grunde schien er früher einzutreten als bei dem letzten Versuche. Um die individuelle Schwankung, die bei den letzten 2 Versuchen deutlich aufgetreten war, auszugleichen, wurde eine durchschnittliche Zahl aus dem Ergebnisse der letzten 2 Versuche ausgerechnet, wie man in der Tabelle V findet. Aus dieser geht leicht hervor, daß man nicht nur das oben auseinander gesetzte Verhalten zwischen der Haupt- und Mitagglutination viel deutlicher sehen kann, sondern auch das Resultat aus den letzten 2 Versuchen mit dem aus den 2 vorletzten sich insofern ganz gleich verhielt, als der minimalste Wert des Bruches bei den 2 letzteren Versuchen etwas größer ausfiel als bei den 2 vorletzten.

Versuch 12 und 13.

Zum Schlusse wurden dieselben Versuche mit einer noch größeren Dose Bakterien ausgeführt, nämlich in der 1. Einspritzung $\frac{1}{10}$ Agarkultur, die mit jeder weiteren Einspritzung immer vermehrt wurde. So wurden die Tiere im ganzen 10mal in 7-tägigen Intervallen vorbehandelt. Die Zunahme der Hauptagglutination ging bei allen Tieren so vor sich, wie oben beschrieben. Die Mitagglutination fing erst an stark zuzunehmen, nachdem die Hauptagglutination fast einen maximalen Wert erreicht hatte. Der Titer der Hauptagglutination wurde nämlich nach der 4. oder 5. Einspritzung fast maximal groß, während die Zunahme der Mitagglutination erst nach der 6. Impfung deutlich bemerkbar wurde. Infolgedessen trat der minimalste Wert des Bruches bei der 4. oder 5. Impfung ein und betrug bei fast sämtlichen Tieren $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{200}$, ausnahmsweise bei einem Tiere $\frac{1}{40}$. Dieser Wert wurde nach der 8. oder 9. Einspritzung immer größer und größer und schließlich nach der 10. Impfung bei 4 Tieren von $\frac{1}{8}$ — $\frac{1}{2}$, bei 2 Tieren $\frac{1}{1}$ und bei 1 Tiere $\frac{2}{1}$. Hier machten wiederum 3 Tiere eine Ausnahme, bei welchen der minimalste Wert selbst nach der 10. Einspritzung nicht zugenommen hatte. Aber die durchschnittliche Zahl der Resultate aus diesen 2 Versuchen verhielt sich im großen und ganzen insofern ganz gleich wie bei den vorhergehenden, als der minimalste Wert des Bruches, welcher die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination darstellt, viel kleiner war als bei den letzten 4 Versuchen (Tab. VI).

Zusammenfassende Betrachtung der Versuche 8—13.

Da wir oben die Ergebnisse der letzten 6 Versuche einzeln kennen gelernt haben, seien sie hier nur noch kurz zusammenfassend betrachtet: Etwaige Beeinflussungen der Individualität der Tiere und des Stammes der Bakterien müssen ausgeglichen werden. Auf diese Weise wurden die durchschnittlichen Zahlen der 6 Ergebnisse in bezug auf die Haupt- und Mitagglutination ausgerechnet; daraus ergibt sich folgendes:

Selbst durch mehrmalige Einspritzungen von großen Dosen von Bakterien nahm die Hauptagglutination nicht immer zu, schien vielmehr auf eine bestimmte Höhe beschränkt zu sein. Der maximale Wert betrug bei Kaninchen durch die subkutane Vorbehandlung von 1:10000 bis 1:20000. Der Titer von 1:50000 wurde so selten nachgewiesen, daß man ihn als eine Ausnahme betrachten muß. Der Zeitpunkt, wo dieser maximale Titer der Hauptagglutination eintrat, scheint von der Dosis der eingespritzten Bakterien abhängig zu sein, denn er trat bei den Versuchen 10—13, wo die 1. Vorbehandlung mit der Dose von $\frac{1}{10}$ oder $\frac{1}{100}$ Agarkultur ausgeführt wurde, bei der 5. oder 7. Impfung deutlich ein, während man ihn bei den Versuchen 8—9, wo die Einspritzung mit $\frac{1}{1000}$ Agarkultur angefangen wurde, in derselben Zeit noch nicht nachweisen konnte. Erst nach der 10. Einspritzung trat er deutlich

auf. Danach kann man annehmen, daß der absolute hohe Titer der Hauptagglutination durch die mehrmalige Einspritzung von großen Mengen Bakterien schneller erhalten wird, als durch wiederholte Einspritzung geringerer Bakterienmengen. Ihre Vermehrungsgeschwindigkeit hielt mit der Wiederholung der Einspritzung nicht gleichen Schritt, sondern zeigte sich im vorderen Stadium der Immunisierung größer als im späteren. Der Zeitpunkt, wo die große Vermehrungsgeschwindigkeit aufhört und zu der kleineren übergeht, trat bei allen 6 Versuchen in der 4. oder 5. Impfung am häufigsten, selten in der 6. auf. Der Titer der Mitagglutination, welcher durch die 1. Impfung zustande gekommen war, hängt von der eingespritzten Dose der Bakterien ab, wie wir oben bei der einmaligen Immunisierung beobachtet hatten. Aber diese Schwankung scheint unter einer Dose von $\frac{1}{2}$ Agarkultur nicht stark zu sein und ferner bei weiteren Einspritzungen nicht mehr bemerkbar zu werden.

Solche Mitagglutination hatte bis zur 4. und 5., selten 6. Impfung nicht bedeutend zugenommen; erst von der 6. oder 7. Vorbehandlung an vermehrte sie sich mit jeder weiteren Einspritzung enorm. Schließlich fand man ihren Titer bei der 10. Vorbehandlung über 1 : 10 000.

Deshalb war das Verhalten der Vermehrung der Mitagglutination ganz entgegengesetzt von dem der Hauptagglutination. Dabei muß bemerkt werden, daß der Eintritt der großen Vermehrungsgeschwindigkeit der Mitagglutination während der mehrmaligen Vorbehandlung nicht von der absoluten Menge der eingespritzten Bakterien, vielmehr von der Zahl der Einspritzungen irgendwie abhängig zu sein schien, weil er bei allen 6 Versuchen, wo die Tiere mit den verschiedenen Dosen Bakterien vorbehandelt worden waren, in fast gleicher Zeit, nämlich bei der 5. oder 6. Einspritzung, am häufigsten nachgewiesen wurde. Aus der oben genau auseinandergesetzten Beziehung der beiden Reaktionen ergab sich, daß der Bruch der Haupt- und Mitagglutination bei der 1. Impfung, wo die Hauptagglutination sich noch nicht stark erwies, sehr groß war, bei der 2. und 3. Einspritzung immer kleiner und kleiner, bis er bei der 4. oder 5., durchschnittlich aber bei der 4. Impfung am minimalsten in dem ganzen Immunisierungsverlaufe wurde, weil die Hauptagglutination dabei rasch bis fast zum Maximum zugenommen, wogegen die Mitagglutination fast keine Zunahme zeigte. Dieser minimalste Wert des Bruches war bei den Versuchen 8—9 durchschnittlich $\frac{1}{43}$, bei 10 und 11 $\frac{1}{34}$ und bei den Versuchen 12 und 13 $\frac{1}{117}$. An dieser Stelle möchten wir darauf aufmerksam machen, daß so minimalste Werte wie $\frac{1}{100}$ oder $\frac{1}{200}$ bei solchen Versuchen, wo die Einspritzung mit $\frac{1}{10}$ Agarkultur angefangen wurde, am häufigsten gefunden wurden. Da ferner einerseits die Hauptagglutination von dieser Zeit an fast nicht mehr vermehrt, andererseits die Mitagglutination erst von dieser Zeit an bedeutend zugenommen hatte, wurde der Wert des Bruches mit der weiteren Einspritzung immer größer und größer, so daß er bei der 10. Vorbehandlung durchschnittlich $\frac{1}{1,9}$ wurde (Tab. VII).

Zum Schlusse dürfen wir nicht versäumen, zu berücksichtigen, ob dabei die Individualität der Tiere und der Stamm der Bakterien irgendeinen Einfluß auf die Agglutininbildung ausüben. Zur Klarstellung haben wir die Resultate aus den obigen 6 Versuchen nach dem Stamme der Bakterien und der Dose der Bakterien angeordnet. Daraus ergab sich, daß die Resultate bei allen Tieren, welche mit den 6 Bakterienstämmen immunisiert worden waren, im großen und ganzen sich gleich verhielten; nur bei wenigen Tieren war eine Abweichung zu bemerken,

nämlich bei 4 Tieren, welche mit dem Stamm von Nr. Ty. 37, bei 3, welche mit dem Stamme von Ty. 39 und bei noch 1 Tiere, welches mit dem Stamme von Ty. 42 vorbehandelt worden war. Diese Abweichung bestand darin, daß die Mitagglutination selbst in der Zeit, wo sie bei den meisten Tieren stark zuzunehmen pflegte, entweder gar nicht oder in geringerem Grade zunahm. Infolgedessen blieb der Bruch selbst in der Zeit minimal, wo er gewöhnlich maximal war. Diese Erscheinung war gerade die, welche oben bei der Einzelbetrachtung ab und zu als eine Ausnahme bemerkt worden war. Sehr interessant war es, daß diese Abweichung bei allen 4 Tieren, welche mit dem Stamme von Ty. 37 vorbehandelt worden waren, ohne Ausnahme nachgewiesen wurde, während man sie bei den anderen Tieren, die mit den anderen Stämmen vorbehandelt worden waren, nur ausnahmsweise feststellen konnte. Nach dem Ergebnisse dieser zusammenfassenden Betrachtungen ist nicht zu leugnen, daß, obwohl der Stamm der Bakterien und die Individualität der Tiere eine gewisse Rolle bei der Immunisierung gespielt haben, doch das Immunisierungsverfahren dabei auch einen großen Einfluß ausüben muß.

3. 4- oder 5malige Einspritzung von Impfstoff.

Da wir schon einerseits bei den Versuchen von 1—7 nachweisen konnten, daß man am besten bei der einmaligen Immunisierung der Tiere mit mittelgroßen Dosen von Bakterien vorbehandelt, um Sera herzustellen, welche eine möglichst große Differenz zwischen der Haupt- und Mitagglutination aufweisen, wir aber andererseits bei den Versuchen von 8—13 erfahren hatten, daß die Differenz zwischen der Haupt- und Mitagglutination bei solchen Tieren am stärksten eintritt, welche mit einer gewissen Dose der Bakterien und in gewisser Zeit, nämlich mit $\frac{1}{10}$ Agarkultur angefangen und mit steigender Dose 4- oder 5mal vorbehandelt worden sind, wurden hier ferner Versuche angestellt, bei welchen die Tiere mit noch größeren Dosen von Bakterien 4- oder 5mal immunisiert worden waren:

Versuch 14.

Zuerst wurden 6 Kaninchen mit Bakterien von $\frac{1}{10}$ Agarkultur vorbehandelt, wie bei den Versuchen 12 und 13. So wurde die Dose von $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 Agarkulturen in 7-tägigen Intervallen eingespritzt. An jedem 7. Tage nach der Einspritzung wurde die Blutprobe genommen und auf die Hauptagglutination und Mitagglutination austitriert, wobei sich ergab, daß die Hauptagglutination bei der 4maligen Immunisierung fast bis zum Maximum sich vermehrt, dagegen der Titer der Mitagglutination in dieser Zeit fast nicht zugenommen hatte. Infolgedessen wurde der Bruch der 2. und 3. Impfung allmählich kleiner, bis er in der 4. Impfung durchschnittlich $\frac{1}{150}$ wurde, wie bei dem 12. und 13. Versuche (Tab. IX).

Versuch 15.

Derselbe Versuch wurde bei 6 Kaninchen mit noch größerer Dose von Bakterien ausgeführt, und zwar betrug sie bei der 1. Einspritzung $\frac{1}{2}$ Agar, bei der 2. 1, bei der 3. 2 und bei der 4. 3 Agarkulturen, wobei sich die Zunahme der Haupt- und Mitagglutination im großen und ganzen genau gleich verhielt, wie bei obigem Versuche. Deshalb wurde der Bruch der beiden Reaktionen mit der 2. und 3. Einspritzung immer kleiner, so daß man ihn bei der 4. oder 5. Impfung fast ohne Ausnahme kleiner als $\frac{1}{100}$ fand.

Versuch 16

wurde mit gleicher Dose Bakterien ausgeführt, und zwar mit ganz gleichem Resultat wie bei dem letzten Versuche. Der minimalste Wert des Bruches trat bei der 5. Einspritzung ein; er war fast ausnahmslos kleiner als $\frac{1}{100}$.

Ferner wurde versucht, ob man mit noch größeren Dosen, nämlich von entweder 1 oder 3 Agar, ein ebenso gutes Resultat erhalten könne wie bei den letzten Versuchen. Eine so große Dose war für 1malige Einspritzung nicht geeignet.

Versch 17.

6 Kaninchen wurden mit einer Agarkultur, dann mit 2, 3 und 4 Agarkulturen in 7-tägigen Intervallen vorbehandelt. Auf gleiche Weise wurden die Blutproben entnommen und auf den Agglutinationstiter geprüft. Die Hauptagglutination, die schon bei der 1. Impfung sehr hoch, nämlich von 1:5000—1:10000 war, wurde durch die 2. oder 3. Impfung allmählich bis zum Maximum vermehrt, wogegen die Mitagglutination, welche bei der 1. Impfung ebenfalls ziemlich hoch, nämlich 1:200 war, während der weiteren Einspritzung bei vielen Tieren nicht zugenommen, sondern sich sogar etwas vermindert hatt. Deshalb zeigte sich der Bruch der Haupt- und Mitagglutination im großen und ganzen wie bei den letzten Versuchen.

Versuch 18.

Schließlich wurde derselbe Versuch mit noch größerer Dosis ausgeführt, und zwar bei der 1. Impfung mit 3 Agarkulturen und bei den weiteren 3 Einspritzungen bis zu 6. Die Hauptagglutination erreichte schon durch die 2. Impfung fast bei allen Tieren einen maximalen Titer, wogegen sich die Mitagglutination, welche bei der 1. Impfung recht hoch war, durch die weiteren 3 Impfungen nicht bei allen Tieren gleich verhielt, indem sie bei den mit dem Stamme Ty. 37 immunisierten Tieren sich selbst nach der 4. Impfung nicht vermehrte, während sie bei den mit dem Stamme von Ty. 39 vorbehandelten Tieren in der Zeit stark zugenommen hatte. Infolgedessen wurde der Bruch bei den ersten 2 Tieren während der ganzen Immunisierungszeit immer kleiner, bis er $\frac{1}{100}$ betrug. Dagen blieb der Wert des Bruches bei den 2 letzten Tieren in der ganzen Zeit weder vermindert noch vermehrt, weil die Mitagglutination mit der Hauptagglutination immer durch die weiteren Einspritzungen mit gleicher Geschwindigkeit sich vermehrt hatte.

Aus den Ergebnissen der letzten 5 Versuche ergab sich ein durchschnittlicher Wert, den Tab. X zeigt, aus der ersichtlich ist, daß die Zunahme der Haupt- und Mitagglutination bei den Versuchen 14, 15 und 16 ganz genau so vor sich gegangen war, wie bei den Versuchen 12 und 13. Dagegen stellte Versuch 18, wo eine sehr große Menge von Bakterien eingespritzt worden war, ein abweichendes Verhalten dar, das hauptsächlich darin besteht, daß die Mitagglutination, welche bei diesem Versuche nach der 1. Impfung sehr stark, nämlich 1:500 war, durch 2. oder 3. Impfung immer noch stark zugenommen hatte. Deswegen wurde der Bruch, welcher nach der 1. Impfung ziemlich klein erschien, durch die weiteren Impfungen, wo er gewöhnlich sich stark zu vermindern pflegte, nicht besonders kleiner oder blieb überhaupt unverändert. Aus diesem Ergebnisse könnte man annehmen, daß solche Sera, deren Hauptagglutination sehr schwach ist, dadurch erhalten werden, daß die Tiere zuerst mit der Dosis von $\frac{1}{10}$ oder $\frac{1}{2}$ Agar, dann mit steigenden Dosen in 7-tägigen Intervallen 4- oder 5mal vorbehandelt wurden. Mit entweder noch kleinerer oder noch größeren Dosen, nämlich von $\frac{1}{1000}$ Agar oder 3 Agarkulturen angefangen, mehr als 5mal die Tiere zu immunisieren, scheint insofern nicht zweckmäßig, als man auf diese Weise die Tiere zu stark reizt. Als Folge davon kommt es unseres Erachtens zu einer zu hohen Mitagglutination.

4. Schnellimmunisierung.

Da wir oben nachweisen konnten, daß die Tiere mit großen Bakterien-dosen, nämlich $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 und 4 Kulturen in 7-tägigen Intervallen am geeignetsten vorbehandelt wurden, um Sera zu erhalten, die den minimalsten Wert des Bruches der Haupt- und Mitagglutination zeigten, wurden weitere Versuche angestellt, um zu wissen, ob man mit denselben Bakterien-dosen und derselben Zahl der Einspritzungen, aber in recht

kurzen Intervallen, die Tiere ebenso gut immunisieren kann, wie bei den Versuchen 15 und 16.

Versuch 19.

5 Kaninchen wurden zuerst mit $\frac{1}{2}$, dann steigend mit 1, 2 und 3 Agar in 2-täg. Intervallen subkutan vorbehandelt. Am 7. Tage nach der letzten Einspritzung wurden die Blutproben auf die Haupt- und Mitagglutination untersucht. Die Hauptagglutination wurde aber nicht hoch genug, der Titer war bei den meisten Tieren 1:5000, während er bei den Versuchen 15 und 16, wo den Tieren dieselbe Bakterienmenge ebenso oft, aber in 7-tägigen Intervallen eingespritzt wurde, bei fast allen Tieren 1:10000 oder 1:20000 betrug. Die Mitagglutination war dazu verhältnismäßig hoch, bis 1:500. Infolgedessen wurde der Bruch bei 3 Tieren $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{50}$ und bei 2 Tieren $\frac{1}{100}$.

Versuch 20.

Derselbe Versuch wurde wieder bei 6 Kaninchen ausgeführt und es ergab sich, daß der Titer der Hauptagglutination auch in diesem Falle nicht hoch genug wurde, indem er bei 3 Kaninchen 1:5000 und bei noch 3 anderen Tieren 1:10000 war. Die Mitagglutination war bei 2 Tieren 1:500 und bei 4 anderen Tieren 1:200 stark. Deshalb wurde der Bruch viel größer als bei den Versuchen 15 und 16, und zwar betrug er bei 4 Tieren von $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{25}$, und bei 2 Tieren $\frac{1}{50}$, durchschnittlich $\frac{1}{25}$. Es war jedoch möglich, daß der Titer der Agglutination während der Immunisierung durch die häufigen Entnahmen der Blutproben überhaupt stärker erhöht würde, als in anderen Tieren, bei welchen die Blutprobe nicht häufig genommen war. Diesen Einwand kann man insofern ablehnen, als der Wert des Bruches, welcher die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination darstellt, bei 2 früheren Versuchen sich fast gleich verhielt, wenn bei dem einen keine Blutprobe während der Immunisierung und bei dem anderen Versuche dieselbe mehrmals an jedem 7. Tage regelmäßig genommen worden war.

Aus diesem Ergebnisse der letzten zwei Versuche mag es gerechtfertigt sein, folgendes zu schließen: Obwohl die einzelnen oder die gesamten Bakterien Dosen, oder die Zahl der Einspritzungen sich ganz gleich verhielt, konnte man doch je nach dem Intervall zwischen den Einspritzungen nicht immer gleiches Resultat erwarten. Dabei mußte natürlich der Einfluß der Individualität der Tiere und des Stammes der Bakterien ausgeschlossen werden. Deshalb scheint das Intervall bei der Immunisierung einen gewissen Einfluß zu haben. Das Tier mußte zuerst auf die vorangegangenen Einspritzungen gut ausreagiert haben, bevor die nachfolgende Einspritzung gemacht wurde. Sonst konnte es keine gute Reaktion entfalten, so daß der Titer der Hauptagglutination verhältnismäßig nicht hoch, dagegen die Mitagglutination relativ groß wurde.

B. Intravenöse Immunisierung.

Da wir bei der subkutanen Immunisierung die oben geschilderte interessante Erscheinung nachweisen konnten, wurde ferner geprüft, ob man auch durch die intravenöse Immunisierung dieselbe Erscheinung beobachten könne. Die letztere Methode ist ja gerade die, welche von Fachleuten überall gelobt und gebraucht worden ist.

Versuch 21.

5 Kaninchen wurden mit möglichst geringer Menge Bakterien ganz allmählich steigend vorbehandelt. Zuerst wurde die Dose von $\frac{1}{10000}$, dann von $\frac{1}{5000}$, $\frac{1}{2000}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{500}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{5}$ und $\frac{1}{2}$ Schrägagarkultur in 7-tägigen Intervallen eingespritzt. Die Blutproben wurden ebenso genau entnommen und ebenso gleich auf die Agglutination geprüft, wie bei den obigen Versuchen. Die Hauptagglutination, welche bei der 1. Impfung 10-fach stärker als bei der subkutanen Methode, nämlich 1:2000 war, vermehrte sich bis zur 4. und 5. Impfung immer bedeutend schnell und daraufhin ganz langsam, so daß sie endlich einen maximalen Wert von 1:20000 erreichte. Die Mitagglutination nahm bei der 1. Impfung nicht besonders zu. Erst von der 6. oder 7. Einspritzung an zeigte sie bei den meisten Tieren eine bedeutende Zunahme. Bei der 8. oder 9. Vor-

behandlung wurde ihr Titer bei allen Tieren so hoch, wie der maximale Wert der Hauptagglutination. Bei Kaninchen Nr. 375, welches schon von Anfang an eine starke Zunahme der Mitagglutination zeigte, trat dieser maximale Titer schon bei der 7. Impfung ein. Infolgedessen war die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination bei den meisten Tieren ganz genau so, wie es bei der subkutanen Impfung beobachtet wurde. Der Bruch nämlich, welcher bei der 1. Impfung bei allen Tieren von $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{10}$ groß war, wurde durch die 2. Einspritzung immer kleiner, um endlich bei der 4. und 5. Impfung einen minimalsten Wert zu erreichen, der bei 2 Tieren von $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{50}$ und bei 1 $\frac{1}{100}$ betrug. Bei Kaninchen Nr. 375, wo die Mitagglutination immer schneller zugenommen hatte, war der Bruch mit der Einspritzung nicht vermindert. Dieser minimalste Wert des Bruches wurde gewöhnlich von der 6. Impfung an immer größer und größer, so daß er bei der 8. Vorbehandlung bei 2 Tieren $\frac{1}{1}$ und bei 2 anderen Tieren von $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{4}$ wurde.

Versuch 22.

Derselbe Versuch wurde an 6 Kaninchen ausgeführt. Die Dose der 1. Impfung war genau so groß, wie bei dem letzten Versuche. Aber die Menge der weiter eingespritzten Bakterien wurde viel schneller mit den Einspritzungen vermehrt. So wurden $\frac{1}{100}$ bei der 2., $\frac{1}{10}$ bei der 3., $\frac{1}{5}$ bei der 4., $\frac{1}{2}$ bei der 5. 1 bei der 6. und endlich 2 Agarkulturen bei der 7. Vorbehandlung eingeführt. Die Hauptagglutination, die bei der 1. Impfung 1:2000 hoch war, wurde schon bei der 3. oder 4. Impfung fast ebenso stark, wie bei der 6. Einspritzung, wo bei fast allen Tieren der maximale Titer von 1:50 000 eingetreten war. Die Mitagglutination, welche bis zu der 2. Impfung nicht besonders stark war, nahm von der 3. oder 4. enorm zu, so daß sie bei der 6. Impfung fast den maximalen Titer der Hauptagglutination erreichte. Deshalb wurde der Bruch schon bei der 2. oder 3. Impfung minimal, nämlich von $\frac{1}{30}$ — $\frac{1}{50}$. Von diesem Zeitpunkt an wurde er mit den weiteren Vorbehandlungen immer größer, bis er endlich bei der 6. Impfung den Wert von $\frac{1}{1}$ erreichte. Hier muß bemerkt werden, daß der Wert des Bruches bei einem Tiere, welches mit dem Stamme von Ty. 37 vorbehandelt worden war, bei der 4. oder 5. Impfung etwas vermehrt und bei der 6. Einspritzung wieder ein wenig vermindert war. Diese Ausnahme war dadurch zustande gekommen, daß die Mitagglutination in dieser Zeit nicht zugenommen hatte.

Versuch 23.

Derselbe Versuch wurde mit einer noch größeren Bakteriendosis ausgeführt. Die Menge der 1. Einspritzung war $\frac{1}{100}$. Weiter wurden $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 3 Agarkulturen in 7-tägigen Intervallen eingeführt. Die Hauptagglutination zeigte schon bei der 1. Impfung einen starken Titer, 1:2000, welcher mit den weiteren Einspritzungen immer stärker sich vermehrte, so daß er bei der 4. oder 5. Impfung fast den maximalen Wert erreichte. Die Mitagglutination, welche bis zu der 2. oder 3. Einspritzung nicht bedeutend zunahm, fing erst von der 4. oder 5. Impfung an, sich enorm zu vermehren, bis sie bei der 6. Impfung fast ebenso hoch wurde, wie der maximale Wert der Hauptagglutination. Hier hatten wir wiederum eine Ausnahme bei 1 Tiere, welches mit dem Stamme von Ty. 47 vorbehandelt worden war, bei dem es schwer zu sein schien, mit wiederholten Einspritzungen einen stärkeren Titer der Mitagglutination zu bekommen. Deshalb blieb er bei diesem Tiere selbst bei der 6. oder 7. Impfung noch 1:1000. Der Bruch der Haupt- und Mitagglutination wurde im allgemeinen schon bei der 2. oder 3. Impfung minimal. Von der 4. an wurde er bei weiteren Einspritzungen bei fast allen Tieren $\frac{1}{1}$. Hier fanden wir wieder eine Ausnahme bei demselben Tiere, welches mit dem Stamme von Ty. 37 immunisiert worden war. Bei ihm war der Bruch mit den weiteren Einspritzungen nicht vermehrt, vielmehr vermindert.

Versuch 24.

Die Dosis wurde wiederum vermehrt. Die Impfung wurde zuerst mit $\frac{1}{10}$, weiter mit $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, und 3 Agarkulturen ausgeführt. Die Hauptagglutination wurde schon bei der 3. Impfung fast maximal groß, dagegen wurde die Mitagglutination von der 3. an enorm groß, so daß sie bei der 6. Impfung den maximalen Titer der Hauptagglutination erreichte. Der Bruch der beiden Reaktionen, welcher schon nach der 2. oder 3. Impfung minimal, nämlich $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{20}$ wurde, wurde von der 4. Impfung an wieder größer, so daß er endlich bei der 7. Impfung den Wert von $\frac{1}{1}$ bekam.

Versuch 25.

Zum Schlusse wurde derselbe Versuch an 6 Kaninchen mit 6 Bakterienstämmen ausgeführt, wobei sich herausstellte, daß die Hauptagglutination schon bei der 3. Einspritzung maximal wurde. Die Mitagglutination, welche bei der 1. Impfung schon recht hoch war, nahm von der 2. oder 3. Impfung an bedeutend zu, so daß sie bei der 6. Impfung den maximalen Titer der Hauptagglutination zeigte. Der Bruch, welcher bei der

1. Impfung durchschnittlich den Wert von $\frac{1}{5}$ zeigte, wurde entweder bei der 2. oder bei der 3. Impfung etwas kleiner. Von der 5. Einspritzung an wurde er wieder größer, so daß er endlich bei der 6. Impfung den Wert von $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{4}$ erreichte. 1 Tier machte eine Ausnahme, welches gleichfalls mit dem Stamme von Ty. 37 vorbehandelt worden war. Bei diesem hatte die Mitagglutination von der 2. Impfung an gar nicht zugenommen, deshalb der Bruch bei ihm mit der Einspritzung im großen und ganzen kleiner wurde. Eine weitere Ausnahme bildete Tier Nr. 322, bei welchem der Bruch von der 1. Impfung am kleinsten war und mit weiteren Einspritzungen immer größer wurde.

Zusammenfassende Betrachtung über die Versuche 21—25.

Wie wir schon oben betont haben, möchten wir hier auch aus den 5 Versuchen eine etwaige Beeinflussung der Individualität der Tiere und des Stammes der Bakterien ausgleichen, um ein Durchschnittsergebnis zu erlangen. Zu diesem Zwecke wurde eine durchschnittliche Zahl aus dem Resultate der obigen 5 Versuche ausgerechnet, wie Tab. XI zeigt.

Wie es bei der subkutanen Immunisierung der Fall war, hatte die Hauptagglutination auch bei der intravenösen Immunisierung eine maximale Grenze. Dieser maximale Titer betrug in vielen Fällen, wo die Tiere mit großer Bakterien-dose mehrmals vorbehandelt worden waren, ungefähr 1 : 50 000—1 : 100 000. Den Zeitpunkt, wo dieser Titer eintrat, kann man hier auch nicht allgemein bestimmen, weil er von der Menge der eingespritzten Bakterien abhängig war. Bei den Versuchen 24 und 25 nämlich, wo die Tiere mit großer Dose, d. h. $\frac{1}{10}$ Agarkultur, zuerst vorbehandelt worden waren, trat er schon bei der 4., ja sogar bei der 3. Impfung deutlich ein, während man ihn bei dem Versuche, wo die Tiere mit einer viel kleineren Menge Bakterien immunisiert worden waren, selbst bei der 8., ja sogar bei der 9. Impfung noch nicht nachweisen konnte. Seine Vermehrungsgeschwindigkeit während der ganzen Immunisierungsdauer hielt nicht gleichen Schritt mit der Wiederholung der Einspritzungen. Sie ging nämlich in dem vorderen Stadium der Immunisierungsdauer beträchtlich schneller vor sich als in dem späteren.

Der Zeitpunkt, wo diese große Vermehrungsgeschwindigkeit zu der kleineren übergeht, scheint bei den meisten Versuchen in der 3., eventuell in der 4., durchschnittlich in der 3. Impfung einzutreten. Dagegen zeigte sie sich bei der Mitagglutination in dem vorderen Stadium der Immunisierungszeit viel kleiner, als in dem letzteren. Deshalb hielt die kleinere Vermehrungsgeschwindigkeit bei den meisten Versuchen bis zu der 3. Impfung an; dann trat eine große Vermehrungsgeschwindigkeit ein.

Aber bei den Versuchen, wo die Immunisierung mit der großen Dose 12 B mit $\frac{1}{10}$ Agar angefangen wurde, war dieses Vermehrungsverhältnis nicht deutlich nachzuweisen. Hier zeigte die Mitagglutination in dem ersten Stadium immer fast gleiches Vermehrungsverhältnis. Eine ähnliche Erscheinung hatten wir bei der subkutanen Immunisierung nachgewiesen, wo eine sehr große Dose von Anfang an eingespritzt worden war.

Diese Zunahme der Mitagglutination in der letzten Hälfte der Immunisierungsdauer wurde, wenn auch eine Ausnahme ab und zu nachgewiesen war, doch bei vielen Tieren so groß, daß sie den maximalen Titer der Hauptagglutination fast erreichte. Wie es bei der subkutanen Immunisierung der Fall war, schien der Titer der Mitagglutination von der Menge der eingespritzten Bakterien abhängig zu sein, denn er war bei den Versuchen 24 und 25, wo die Tiere mit großer Dosis vor-

behandelt worden waren, viel größer, als bei den Versuchen 21 und 22, wo eine viel geringere Menge der Bakterien eingegeben wurde (Tab. XI).

Die Beziehung der Haupt- und Mitagglutination zeigte bei der intravenösen Immunisierung im großen und ganzen denselben Verlauf wie bei der subkutanen Vorbehandlung. Aber dieses Verhalten war insofern nicht gleich, als einerseits der minimalste Wert des Bruches schneller als bei der subkutanen Impfung, nämlich bei der 2. oder 3. Impfung eintrat. Andererseits stellte er bei der intravenösen Methode, sich viel größer dar als bei der subkutanen Immunisierung. Ferner hing die Größe dieses minimalsten Wertes des Bruches und der Zeitpunkt, wo er eintrat, von der Menge der eingespritzten Bakterien ab. Deshalb trat er bei dem Versuche, wo eine große Dosis Bakterien eingespritzt wurde, viel größer und früher ein, als bei dem, wo viel weniger Bakterien eingespritzt wurden. Dieser minimalste Wert des Bruches betrug nämlich bei dem Versuche 21 $\frac{1}{2}$, wo die Bakterien bei der 1. Impfung von $\frac{1}{1000}$ Agar eingespritzt wurden, während er bei dem Versuche, wo die Dose von $\frac{1}{10}$ Agar zuerst eingespritzt wurde, $\frac{1}{8}$, 3. war. Ferner trat er bei dem vorderen Versuche durchschnittlich in der 4. und bei dem letzteren Versuche in der 3. Vorbehandlung ein.

Um einen klaren Ueberblick über die Beeinflussung des Stammes der Bakterien auf die Agglutininbildung zu gewinnen, haben wir die Ergebnisse aus den Versuchen 21—25 nach dem Stamme der Bakterien angeordnet. Daraus ergibt sich, daß der Bruch zwischen der Haupt- und Mitagglutination, welcher durch die weitere Einspritzung von seinem minimalsten Wert an immer mehr zugenommen hatte, bei den Tieren, welche mit dem Stamme von Ty. 38, 39, 40 und 42 vorbehandelt worden waren, schon nach der 7. Impfung so groß war, daß er fast bei allen Tieren von $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{1}$ betrug. Dagegen zeigten alle anderen Tiere, welche mit dem Stamme Ty. 37 immunisiert worden waren, ein ganz anderes Verhalten, indem bei ihnen der minimalste Wert des Bruches während der weiteren Immunisierung entweder unverändert oder vermindert blieb. Wenn wir hier auch dieses Verhalten ganz genau auseinandersetzen konnten, so muß doch bemerkt werden, daß diese Ausnahme sowohl bei der subkutanen als auch bei der intravenösen Impfung hauptsächlich bei solchen Tieren nachgewiesen wurde, die gerade mit dem Stamme von Ty. 37 vorbehandelt worden waren.

C. Intraperitoneale Immunisierung.

Dieselbe Immunisierung wurde durch intraperitoneale Einführung der Bakterien ausgeführt:

Versuch 26.

5 Kaninchen wurden die Bakterien zuerst in der Menge von $\frac{1}{10}$, dann von $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 und 4 Agar in 7-tägigen Intervallen intraperitoneal eingebracht. Die Blutproben wurden ebenso genau entnommen und auf die Haupt- und Mitagglutination geprüft, wie oben angegeben. Die Hauptagglutination, die von der 1.—3. Impfung enorm zugenommen hatte, erreichte schon bei der 4. Einspritzung den maximalen Wert von 1:50000. Dagegen hatte die Mitagglutination bis zu der 3. Impfung nicht besonders stark zugenommen. Erst von der 4. Vorbehandlung an vermehrte sie sich mit den weiteren Einspritzungen immer mehr und mehr, so daß nach der 5. oder 6. Impfung bei vielen am Leben gebliebenen Tieren der Titer fast gleich stark wie der maximale Titer der Hauptagglutination war. Der Bruch zwischen der Haupt- und Mitagglutination zeigte deshalb bei einzelnen Tieren einen gleichen Verlauf wie oben beschrieben. Hier scheint auch das Tier, welches mit dem St. Ty. 87 immunisiert war, eine gleiche

Ausnahme zu bilden. Wie bei der intravenösen Methode, zeigte sich hier der minimale Wert durchschnittlich größer als bei der subkutanen Immunisierung, obwohl man bei einigen Tieren einen so kleinen Wert, wie von $\frac{1}{100}$, nachweisen konnte. Dazu scheint er schneller einzutreten als bei dem subkutanen Verfahren.

Schlußbetrachtung über alle Versuche.

Sowohl durch die subkutane als auch durch die intravenöse, event. intraperitoneale Immunisierung der Kaninchen mit Typhusbazillen konnten wir eine bestimmte Erscheinung in bezug auf die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen nachweisen. Es scheint dabei ganz gleich zu sein, ob die Tiere mit verschiedenen, und zwar steigenden, Dosen der Bakterien mehrmals oder 1mal vorbehandelt worden waren.

Der absolute Wert der Haupt- und Mitagglutination hängt von der Dosis der eingespritzten Bakterien ab. Je größer die Menge der Bakterien, desto mehr und schneller werden Agglutinine neugebildet. Aber die Vermehrungsgeschwindigkeit derselben schien mit der Wiederholung der Einspritzung nicht gleichen Schritt zu halten. Diese Vermehrungsgeschwindigkeit könnte man wohl dadurch ausdrücken, daß der Titer der Agglutination mit dem anderen Titer derselben dividiert wird, welcher nach der nächst vorhergegangenen Einspritzung erhalten wurde. Durch diesen Bruch kann man leicht verstehen, wie schnell die Agglutination durch die nachfolgende Einspritzung sich vermehrt hat. Je größer der Wert des Bruches, desto größer muß die Vermehrungsgeschwindigkeit der Agglutination sein. Auf diese Weise hatten wir die Vermehrungsgeschwindigkeit aus den durchschnittlichen Resultaten aller Versuche 1—7, 8—13 und 21—25 ausgerechnet. Dazu wurde die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination aus denselben Versuchen hinzugefügt (Tab. XII).

Aus dieser Tabelle ist folgendes ersichtlich: Bei der Hauptagglutination fiel er in dem vorderen Stadium der Immunisierungszeit viel größer aus als in dem späteren Stadium derselben, falls es sich dabei um mehrmalige Vorbehandlung handelte. Die Mitagglutination zeigte ein umgekehrtes Verhalten. Hier fand man ihn in dem ersten Stadium der Immunisierung viel kleiner als in dem letzten. Doch muß man bemerken, daß er am Ende des letzten Stadiums der Immunisierung wieder kleiner wurde, wo die Mittagglutination einen maximalen Titer, nämlich fast den der Hauptagglutination, zu erreichen pflegte. Ferner muß bemerkt werden, daß er sowohl bei der intravenösen Vorbehandlung als auch bei der 1maligen Immunisierung ausnahmsweise in ihrem ersten Stadium sich ebenso groß zeigte, wie beim letzten. Vielleicht ist das im großen und ganzen so zu verstehen, daß die Mitagglutination gerade in der Zeit sich enorm zu vermehren aufgefangen hat, wo die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hauptagglutination sich erst vermindert hatte (Tab. XII). In diesem Verhältnisse vermehrte sich der Titer der Haupt- und Mitagglutination mit wiederholten Einspritzungen immer mehr, so daß er schließlich bei der subkutanen Immunisierung nach der 9. oder 10. Impfung, bei der intravenösen Immunisierung nach der 6. oder 7. Vorbehandlung bei vielen Tieren gleich hoch wurde.

Der Wert des Bruches, welcher die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination darstellt, blieb deshalb in der ganzen Immunisierungszeit nicht gleich groß, sondern ändert sich immer unter einem bestimmten Verhalten. Er nahm nämlich in dem 1. Stadium von An-

fang an mit den wiederholten Einspritzungen immer mehr ab, so daß man ihn am Ende derselben in dem ganzen Immunisierungsverlaufe am kleinsten fand, weil in dieser Zeit der Titer der Hauptagglutination mit großer Geschwindigkeit sich vermehrt, wogegen der Titer der Mitagglutination sich entweder nur ganz wenig oder gar nicht vermehrt, ja sogar sich vermindert. Nun fing er an, in dem letzten Stadium mit der weiteren Wiederholung der Einspritzungen immer zuzunehmen, bis er schließlich so groß wie $\frac{1}{1}$ wurde, weil der Titer der Mitagglutination, welcher in dieser Zeit mit großer Geschwindigkeit sich vermehrte, fast den Titer der Hauptagglutination erreicht hat, welcher in dem letzten Stadium sich mit geringer Geschwindigkeit vermehrte (Tab. XII). Diese Beziehung kann man deutlich in einer Kurvenlinie darstellen, wenn man dabei den Nenner des Bruches als Ordinate, die Anzahl der Vorbehandlungen als Abszisse betrachtet (Fig. 5). Der Zeitpunkt, wo dieser minimalste Wert des Bruches eintritt, scheint von der Weise der Immunisierung abhängig zu sein. Er trat bei der intravenösen Vorbehandlung früher ein als bei der subkutanen. Wir fanden ihn bei der subkutanen Immunisierung durchschnittlich nach der 4., bei der intravenösen Vorbehandlung nach der 3. Einspritzung am häufigsten (Tab. XII). Der absolute Wert des kleinsten Bruches hängt auch von der Weise der Vorbehandlung ab, indem er bei der subkutanen Vorbehandlung kleiner als bei der intravenösen ist. Ferner trat er nach der Dose der Bakterien und der Zahl der Einspritzung verschieden auf. Um einen möglichst großen Unterschied zwischen der Haupt- und Mitagglutination zu erhalten, muß man zuerst die subkutane Methode brauchen.

Durch intravenöse oder intraperitoneale Applikation waren wir niemals imstande, ein gleichwertiges Serum zu erhalten. Ebenso konnte man auch bei der subkutanen Methode durch die Einspritzung von zu geringer oder zu großer Dose ungünstige Titer erzielen. Deshalb wurde der Gipfel der Kurvenlinie, welche den Verlauf des Bruches andeutet, bei der subkutanen Impfung viel höher als bei der intravenösen, event. intraperitonealen Vorbehandlung. Auch bei mittelgroßer Dose zeigte er sich viel höher, als bei der Einspritzung von einer zu großen Dose von Bakterien, wozu bemerkt werden muß, daß die 1malige Immunisierung mit verschiedenen Dosen im großen und ganzen dasselbe Verhalten zeigte.

Hieraus ist anzunehmen, daß weder ein zu starker noch ein zu schwacher Reiz für die Immunisierung des Kaninchens geeignet ist, sondern ein mittelmäßiger. Beim Gebrauch der subkutanen Methode würde man, wenn die Dosierung dabei nicht richtig wäre, oder die Tiere zu häufig vorbehandelt würden, dasselbe Resultat erhalten, wie bei der intravenösen Impfung. Durch zu starken Reiz kann man wohl einen höheren Titer der Hauptagglutination erhalten, wie bei der intravenösen Immunisierung, doch steigt die Mitagglutination dabei ebenfalls schneller und stärker, so daß man schließlich Sera erhält, welche einen geringen oder keinen Unterschied zwischen der Haupt- und Mitagglutination zeigen.

Wenn man dagegen das Kaninchen mehrmals mit einem zu schwachen Reiz vorbehandelt hätte, würde die Mitagglutination schon in der Zeit sich stark zu vermehren anfangen, wo die Hauptagglutination noch nicht hoch genug ist, weil der Zeitpunkt, wo die Mitagglutination erst eine große Vermehrungsgeschwindigkeit zeigt, nicht sehr von der absoluten Menge der Bakterien, sondern hauptsächlich von der Zahl der Ein-

spritzung abhängig ist. Infolgedessen wird der Titer der Hauptagglutination gleich stark, wie der Titer der Mitagglutination. Deshalb kann man auf diese Weise der Immunisierung ein praktisch brauchbares Serum nicht erwarten. Die Reizsphäre kann man jedoch nicht durch die Menge der eingespritzten Bakterien ausdrücken, sondern die Reizbarkeit der Tiere und die Reizkraft der Bakterien muß auch mitgerechnet werden.

Deshalb ist es leicht möglich, daß die Individualität der Tiere und der Stamm der Bakterien bei der Ausbildung der Agglutinine eine gewisse Rolle spielen. Aber unsere Versuche haben wenigstens den Beweis geliefert, daß die Art und Weise der Immunisierung ebenso wie die Menge der Bakterien, die Zahl der Einspritzungen und der Applikationsort auf die Ausbildung der Immunkörper, sowohl der Haupt- wie der Mitagglutination, einen großen Einfluß haben.

Ferner war ich imstande, aus den oben auseinandergesetzten Tatsachen einige schon von vielen Autoren beobachteten Erscheinungen verständlicher zu machen. Bruns und Kayser's Beobachtung nämlich, daß hochagglutinierende Sera immer stärkere Mitagglutination zeigen, könnte man wohl durch unsere Beobachtung so erklären, daß die betreffenden Autoren nur solche Sera geprüft haben, welche gerade in dem letzten Stadium der Immunisierungszeit von den Tieren genommen worden waren, wo die Mitagglutination sehr stark zuzunehmen pflegt. Porciles Anschauung, daß das Serum, je höher die Hauptagglutination ist, desto weniger verwandte Mikroben agglutiniert, muß daher rühren, daß er gerade solche Sera untersucht hat, welche im ersten und mittleren Stadium der Immunisierung von den Tieren geliefert worden waren. Die Sera aus dem ersten Stadium zeigen ja immer einen niedrigeren Titer der Mitagglutination, als die Sera aus dem Mittelstadium, dagegen sehr starke Hauptagglutination und schwache Mitagglutination. Die Erscheinung, daß die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen sowohl im Anfang der Erkrankung als auch in der Rekonvaleszenz manchmal die Hauptagglutination überwiegt, wie Jürgens schon bei Typhuskranken beobachtete, stimmt mit unserem Befunde insofern überein, als der Wert des Bruches zwischen Haupt- und Mitagglutination gewöhnlich im Anfang und im letzten Stadium der Immunisierung sich größer darstellt, als in ihrem mittleren Stadium. Die Lipschütz'sche Anschauung, daß der Titer der Hauptagglutination bei dem Typhusserum zu der Stärke der Mitagglutination keine bestimmte Beziehung habe, scheint insofern nicht richtig zu sein, als durch unser Verfahren im großen und ganzen eine bestimmte Beziehung zwischen beiden Reaktionen nachgewiesen werden konnte. Die Hauptagglutination pflegte im ersten Stadium der ganzen Immunisierung mit großer Schnelligkeit, im letzten Stadium dagegen mit geringerer Schnelligkeit zuzunehmen. Die Mitagglutination verhielt sich ganz umgekehrt. Infolgedessen zeigte die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination eine bestimmte Schwankung, welche in den Kurvenlinien dargestellt wurde; der Bruch der Beziehung zeigte sich sowohl im ersten als auch im letzten Stadium größer, dagegen in dem Zwischenstadium am allerkleinsten während des ganzen Verlaufes der Immunisierung.

Zusammenfassung.

- 1) Bei mit Typhusbazillen in steigenden Dosen mehrmals vorbehandelten Kaninchen, sei es subkutan, sei es intravenös, eventuell

intraperitoneal, stieg der Titer der Mitagglutination mit den weiteren Vorbehandlungen immer mehr, so daß er endlich einen maximalen Wert erreichte. Die meisten Sera zeigten dabei eine ebenso hohe Mitagglutination, wie die Hauptagglutination.

2) Die Vermehrungsgeschwindigkeit der beiden Reaktionen verhielt sich aber während der ganzen Immunisierungszeit nicht gleich. Die Hauptagglutination zeigte nämlich in dem ersten Stadium der ganzen Vorbehandlung eine große, in dem letzteren Stadium eine geringere Vermehrungsgeschwindigkeit. Dagegen zeigte die Mitagglutination eine kleinere Vermehrungsgeschwindigkeit in dem ersten Stadium der Immunisierung, eine große aber in ihrem letzten Stadium.

3) Die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination kann man durch einen Bruch ausdrücken, wobei der Titer der Hauptagglutination als Nenner und der der Mitagglutination als Zähler angenommen wird.

4) Der Wert dieses Bruches verhielt sich deshalb in der ganzen Immunisierungszeit so, daß er einen bestimmten Verlauf nimmt, der sich, wie folgt, zeigte: Der Wert des Bruches, welcher im Anfange der Immunisierung sehr groß war, z. B. $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{5}$, verminderte sich immer mehr mit den weiteren Einspritzungen, bis er endlich einen minimalsten Wert während der Immunisierungszeit erreichte. Von diesem Zeitpunkt ab fing er an, sich wieder zu vermehren, so daß er schließlich bei den meisten Tieren fast so groß wie $\frac{1}{1}$ wurde.

5) Der Zeitpunkt, wo dieser minimalste Wert des Bruches eintrat, stimmte anscheinend mit dem Zeitpunkt überein, wo die große Vermehrungsgeschwindigkeit der Hauptagglutination aufhörte und die kleine Vermehrungsgeschwindigkeit einzutreten anfang.

6) Dieser Zeitpunkt des Eintrittes des minimalsten Wertes des Bruches schien, je schonender die Tiere immunisiert wurden, desto später einzutreten. Deshalb trat er bei der subkutanen Vorbehandlung durchschnittlich später ein, als bei der intravenösen Immunisierung. Doch fand man ihn merkwürdigerweise bei der subkutanen Vorbehandlung in der 4. Impfung, und bei der intravenösen Vorbehandlung in der 3. Einspritzung am häufigsten.

7) Der absolute Wert des minimalsten Bruches verhielt sich nicht immer gleich, sondern hing hauptsächlich von der Dose der eingespritzten Bakterien, dem Mal und der Art der Vorbehandlung ab.

8) Um einen möglichst minimalsten Wert des Bruches zu erhalten, das heißt, um einen möglichst großen Unterschied zwischen der Haupt- und Mitagglutination zu gewinnen, mußten die Tiere mit einer mittelgroßen Dose angefangen, steigend 4 oder 5mal subkutan vorbehandelt werden. Durch die intravenöse Vorbehandlung waren wir niemals imstande, einen so kleinen Wert des Bruches zu erhalten, wie bei der subkutanen Immunisierung.

NB. Ein großer Teil der Tabellen mußte zwecks Raumersparnis fortgelassen werden. Aus den veröffentlichten wurden die absoluten Zahlen der ermittelten Titergrenzen für Haupt- und Mitagglutination aus gleichen Gründen gestrichen.

Literatur.

1) Jürgens, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 43. 1903. — 2) Zupnik, Deutsch. med. Wochenschr. 1905. — 2) Grünberg u. Rolly, München. med. Wochenschr. 1905. — 4) Korte u. Steinberg, Ebenda. 1905. — 5) Manteufel, Ebenda. 1905. — 6) Bruns u. Kayser, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 43. 1903. — 7) Porcile, Ebenda. Bd. 50. 1905. — 8) D'Amato, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 53. 1910. — 9) Lipschütz, Ebenda. Bd. 35. 1904.

Tabelle I.

Nr. der Kaninchen	27	31	35	36	41	44	46	63	66	67	70	74	
Serum	Imm.	Ser.	Imm.	Ser.	Imm.	Ser.	Imm.	Ser.	Imm.	Ser.	Imm.	Ser.	
	Stamm d. Typhusbaz.	Ty I	Ty II	Ty III	Ty III	Ty IV	Ty VII	Ty XVII	Ty XII	Ty IV	Ty XII	Ty IV	Ty VI
Titer der Aggl.	1000	2000	1000	2000	5000	5000	2000	2000	2000	1000	5000	5000	
Paratyph. B-Baz. 2	200	50±	—	200	1000	2000	—	2000	500	100	200	50	
dgl.	8a	500	50	50	200	2000	2000	—	2000	500	100	200	100
"	8b	500	50	—	200	2000	2000	—	2000	500	100	200	100
"	9	500	50	50	200	2000	2000	—	2000	1000	100	200	50
"	10	200	50	—	200	1000	2000	—	2000	500	100	200	50
"	14	200	50	50	100	1000	500	—	500	100	50	200	50
"	15	(500)	50	50	200	1000	2000	—	2000	500	100	200	50
"	15	500	50	50±	200	1000	2000	—	2000	200	100	200	50
"	17	200	50	50	200	1000	2000	—	2000	200	50	200	50

Tabelle II.

Stamm	Dose	Kaninchen	g	Normales Serum	Immun-Serum
		Nr.		Verhältnis	Verhältnis
Ty 37	1/1000 Agar	291	2046	1/4	1/6
38	dgl.	292	2230	1/3	1/3
39	"	293	2310	1/3 ¹⁵	1/3
40	"	294	2150	1/3	1/3
41	"	295	2490	1/3 ¹⁵	1/3 ()
42	"	296	2060	1/3	1/2 ()
37	"	148	1990	1/5	1/4
38	"	169	2050	1/3	1/10
39	"	225	2000	1/5	1/10
40	"	265	1890	1/3 ¹⁵	1/2
41	"	326	2050	1/3 ¹⁵	1/4
42	"	327	2050	1/1	1/3

Durchschnittliche Zahl 1/4

Tabelle III.

Die Dose der eingespritzten Bakterien	Die Beziehung zwischen Haupt- — Mitagglutination
1/1000 Agar	54/295 = 1/4
1/1000 "	112/591 = 1/5
1/100 "	153/1600 = 1/10
1/10 "	154/3000 = 1/15
1 "	640/4800 = 1/7
3 "	850/5900 = 1/7
6 "	950/9000 = 1/9

Tabelle XII.

	Mal der Einspritzung	Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglu- tination	Beziehung zwischen der nachfolgenden Agglutination (Vermehrungs- geschwindigkeit)		
				Hauptagglu- tination	Mitagglu- tination
Subkutane Immu- nisierung (Ver- such 8-13)	I	$\frac{1}{5^{73}}$	I-II	3,3	1,1
	II	$\frac{1}{16}$	II-III	2,6	1,1
	III	$\frac{1}{88}$	III-IV	1,3	0,9
	IV	$\frac{1}{57}$	IV-V	1,5	2,1
	V	$\frac{1}{40}$	V-VI	1,1	2,5
	VI	$\frac{1}{18}$	VI-VII	0,98	2,2
	VII	$\frac{1}{7^{73}}$	VII-VIII	1,2	2,0
	VIII	$\frac{1}{4^{72}}$	VIII-IX	0,98	2,0
	IX	$\frac{1}{2^{73}}$	IX-X	1,2	1,4
	X	$\frac{1}{1^{71}}$			
Intravenöse Immu- nisierung (Ver- such 20-24)	I	$\frac{1}{6}$	I-II	3,2	2,2
	II	$\frac{1}{8^{71}}$	II-III	2,5	1,7
	III	$\frac{1}{12}$	III-IV	1,6	2,8
	IV	$\frac{1}{6^{75}}$	IV-V	1,1	2,3
	V	$\frac{1}{3^{71}}$	V-VI	1,4	2,8
	VI	$\frac{1}{1^{76}}$	VI-VII	1,3	1,3
	VII	$\frac{1}{1^{72}}$			
Intraperitoneale Immunisierung (Versuch 25)	I	$\frac{1}{12}$	I-II	2,2	1,2
	II	$\frac{1}{22}$	II-III	2,5	1,5
	III	$\frac{1}{40}$	III-IV	1,9	3,3
	IV	$\frac{1}{70}$	IV-V	1,6	5,5
	V	$\frac{1}{6}$	V-VI	1,0	3,6
	VI	$\frac{1}{1^{75}}$	VI-VII	0,68	1,3
	VII	$\frac{1}{2^{71}}$			
Subkutane einma- lige Immunisie- rung (Versuch 1 bis 7)	$\frac{1}{1000}$ Agar	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{1000}$ - $\frac{1}{100}$	2,6	2,0
	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{100}$ - $\frac{1}{10}$	2,7	1,3
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$ - $\frac{1}{2}$	1,8	1,0
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{19}$	$\frac{1}{2}$ -1	1,6	4,2
	1	$\frac{1}{7}$	1-3	1,2	1,3
	3	$\frac{1}{7}$	3-6	1,5	1,1
	6	$\frac{1}{9}$			

Nachdruck verboten.

Studien über die Ueberempfindlichkeit.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Carl Prausnitz und Heinz Küstner.

Von den Idiosynkrasien gegen Nahrungsmittel ist die Ueberempfindlichkeit gegen Fischeiweiß bisher wenig studiert worden. Da der eine von uns (K.) mit dieser Anomalie behaftet ist, benutzten wir die Gelegenheit zur Ausführung von Untersuchungen über den Mechanismus der Reaktion und die dabei vorliegenden serologischen Verhältnisse. Dabei

wurde eine Reihe von Kontrolluntersuchungen an dem anderen von uns, der heufieberempfindlich ist, und mehreren unempfindlichen Kollegen ausgeführt, die sich freundlichst zur Verfügung stellten.

Bei dem jetzt 24 Jahre alten, sonst gesunden Patienten ist die Fischüberempfindlichkeit seit dem 6. Lebensjahre beobachtet worden. Nach dem Genuß kleinster Mengen von Fluß- oder Seefischspeisen treten folgende Erscheinungen auf:

Nach $\frac{1}{2}$ Std. Jucken auf dem Kopf, am Hals, an der Unterbauchgegend, ein Gefühl der Trockenheit im Halse; bald danach Schwellung und Rötung der Konjunktiven, starke Schwellung und Sekretion der Schleimhäute der Atemwege, mit heftigem Niesen, Hustenreiz, Heiserkeit bis zur Aphonie und ausgesprochener inspiratorischer Dyspnoë. Die Haut des ganzen Körpers, besonders des Gesichtes, wird stark hyperämisch, und an der ganzen Körperoberfläche schießen 1—2 cm große, heftig juckende Quaddeln auf, die eine ausgesprochene Neigung zum Konfluieren zeigen. Stärkere Schweißsekretion ist nicht beobachtet worden. Nach etwa 2 Std. tritt unter starkem Speichelfluß Erbrechen ein, und von da an lassen die Erscheinungen ganz allmählich nach. Temperatur, Herz- und Nierentätigkeit waren stets normal. Nach 10—12 Std. sind die Symptome vollkommen verschwunden; nur ein Gefühl der Abgeschlagenheit bleibt 1—2 Tage lang bestehen. An jeden Anfall schließt sich eine etwa 24 Std. anhaltende Oligurie und Verstopfung an, die vielleicht eine Folge des starken Wasserverlustes und Erbrechens, vielleicht auch ähnlich den Beobachtungen bei der Serumkrankheit durch Wasserretention zu erklären ist.

Vielleicht ist als eine abortive Form der Erkrankung die Beobachtung des Patienten zu deuten, daß er gelegentlich bei unvorsichtigem Arbeiten mit Fischleim lokalisierte Urtikaria der Lippen bekam. Die Erscheinungen der Fischempfindlichkeit stehen in keinem Zusammenhang mit der Psyche. Denn wiederholt traten sie auf, ohne daß der Patient ahnte, daß er Fisch genossen hatte, z. B. ein Mal nach dem Essen von Thunfisch, den er für Fleisch gehalten hatte, ein andermal nach dem Genuß von Petersilie, die auf einem vorher zum Zerkleinern von Anchovis benutzten Hackbrett zerschnitten worden war. Dagegen hat der Patient beobachtet, daß er Kaviar ohne Beschwerden essen kann. Die wirksame Substanz scheint nur im Muskelfleisch der Knochenfische vorzukommen. Sie nimmt eine Sonderstellung unter den Ueberempfindlichkeits-Antigenen ein, da das Fischfleisch für unseren Patienten in rohem Zustande vollkommen harmlos und erst beim Erhitzen (Kochen, Backen, Braten) giftig wird.

I.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde zunächst versucht, die Erscheinungen der Ueberempfindlichkeit durch parenterale Zufuhr des Fischantigens hervorzurufen. Die hierfür nötige Stammlösung wurde hergestellt durch Zerkleinern von frischem Seefisch (meist Schellfisch), Aufkochen in der 10-fachen Gewichtsmenge destillierten Wassers, Filtrieren durch Fließpapier und $\frac{1}{2}$ -stünd. Sterilisieren im Dampftopf. Die wasserklaren, nicht opaleszierenden Lösungen erwiesen sich merkwürdigerweise auf der Konjunktiva als unwirksam, bei intrakutaner Injektion dagegen als hochgiftig. Nach der Einspritzung von 0,1 ccm der Stammlösung in die Haut, wobei jede subkutane Einspritzung aufs strengste vermieden wurde, trat innerhalb von 10 Min. an der Injektionsstelle eine stark juckende Quaddel auf, die zusehends bis zu Fünfmarkstückgröße wuchs; die voll ausgebildete Quaddel war stark erhaben, weiß, zackig umrandet und von einem etwa 10 cm breiten, hochroten Hof umgeben. Nach 20 Min. entwickelte sich das oben beschriebene Bild

der schweren Allgemeinvergiftung (Urtikaria am ganzen Körper, heftigste Reizung der Konjunktiven und oberen Luftwege, Reizhusten, Atemnot). Die Allgemeinerscheinungen, die wir in gleicher Form wiederholt hervorrufen konnten, pflegen in einigen Stunden allmählich abzuklingen. Es gelingt durch subkutane Gaben von 1 mg Atropin. sulfuric. die Erscheinungen der Atmungswege, durch 0,5 mg Suprarenin die urtikariellen Beschwerden rasch und restlos zu beseitigen. Aber selbst nach 24, oft nach 48 Std. bleibt noch am Injektionsort eine ödematöse Infiltration bestehen. Dies Oedem ist für positive Ueberempfindlichkeitsreaktionen nach unseren Erfahrungen durchaus charakteristisch.

Eine deutliche lokale Reaktion konnte noch durch intrakutane Injektion von 0,1 ccm einer 1000-fachen Verdünnung der Fischstamm-lösung, dagegen nicht mehr durch 0,1 ccm einer 10000-fachen Verdünnung der Stammlösung hervorgerufen werden. Die wirksame Grenz-dosis entspricht demnach dem Kochextrakt aus etwa 0,01 mg Fischmuskel.

Eine durch Auslaugung zerkleinerten Fischfleisches in der Kälte hergestellte 50-proz. wässrige Lösung war dagegen für den Patienten völlig unwirksam. Wurde diese Lösung gekocht, so entstand ein Niederschlag, der unwirksam war, während das Filtrat schwach wirksam wurde (etwa 1000mal schwächer als die oben beschriebene Stammlösung). Bei Erhitzung auf Temperaturen bis zu 50° bleibt diese Fischlösung unwirksam; bei Erhitzung auf 55° — also die Grenze der Eiweißgerinnung — beginnt eine Giftwirkung aufzutreten; von 60° aufwärts ist kein Unterschied in der Giftigkeit gegenüber dem Kochextrakt festzustellen. Hiermit steht die für den Patienten selber höchst überraschende Tatsache in Einklang, daß er rohen Fisch (5 g!) essen kann, ohne die leisesten Beschwerden zu verspüren. Es scheint also, daß das wirksame Antigen erst in der Hitze im Fischmuskel entsteht. Offenbar sind im kalt hergestellten, filtrierten Fischextrakt noch kleine Mengen fein verteilten Fischeiweißes suspendiert, aus denen beim Kochen das Antigen entsteht.

Die Intrakutanversuche haben ergeben, daß auch bei technisch einwandfreier Injektion hinreichender Antigenmengen¹⁾ eine so starke Resorption des Giftes so rasch erfolgen kann, daß das Bild einer schweren Allgemeinvergiftung sich entwickelt. Diese Beobachtung steht nicht vereinzelt da. Beim Heufieber sind ähnliche Reaktionen bei subkutanen Injektionen des wirksamen Polleneiweißes von Dunbar, Prausnitz u. a. beschrieben worden. Nach unseren Untersuchungen aber kann sogar nach intrakutaner Injektion des Polleneiweißes das gleiche schwere Bild hervorgerufen werden. Dem anderen von uns, dem Heufieberpatienten, wurde 0,1 ccm einer 1-proz. Roggenpolleneiweißlösung²⁾ intrakutan eingespritzt: dies ist das 2000-fache der für die Erzeugung der konjunktivalen Reaktion beim Patienten nötigen kleinsten Menge.

Nach 10 Min. trat eine weiße, erhabene, zackig umgrenzte, stark juckende Quaddel von 22 × 17 mm und eine 60 × 45 mm große, hochrote Area auf. 10 Min. später starke Konjunktivalreaktion mit hochgradiger Sekretion, brennendem Jucken und Chemosse. Nach weiteren 10 Min. schwere inspiratorische Dyspnoë, keuchende Atmung, Stridor, quälender Hustenreiz. Quaddel jetzt 45 × 23, Area 200 × 90. Die Augenlider wurden hochgradig ödematös, die Lidspalte schlitzartig verengert, das Gesicht bis zur Un-

1) Das Tausendfache der zur Erzeugung der Lokalreaktion nötigen Menge.

2) Wir danken Herrn Prof. Dunbar für die freundliche Ueberlassung des wertvollen Präparates.

kenntlichkeit gedunsen. Die Verunstaltung ging erst im Verlaufe mehrerer Tage ganz allmählich zurück. Die Injektionsstelle blieb tagelang teigig geschwollen und schmerzhaft.

II.

Zur Charakterisierung der wirksamen Substanz wurde zunächst die Fischstammlösung mit dem 8-fachen Volumen absoluten Alkohols versetzt, 24 Std. stehen gelassen und durch Fließpapier filtriert. Die alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft und ergab auf 10 ccm Stammlösung 0,027 g einer grüngelblichen, fettigen, amorphen Substanz; sie wurde in 10 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgenommen und erwies sich bei intrakutaner Injektion als gänzlich unwirksam. Der alkoholische Niederschlag (0,035 g aus 10 ccm Stammlösung) wurde ebenfalls in 10 ccm Kochsalzlösung aufgenommen; diese Lösung war, ebenso wie die Fischstammlösung, noch in 1000-facher Verdünnung wirksam; also war das Antigen quantitativ in den Alkoholniederschlag übergegangen. Die kleinste wirksame Dosis des alkoholgefällten Antigens beträgt $35 \cdot 10^{-5}$ mgr.

Durch Alkohol und Aether in der Kälte und in der Wärme läßt sich aus Fischmuskel keine wirksame Substanz extrahieren.

Die Substanz wurde auf Dialysierbarkeit geprüft; 10 ccm der Stammlösung wurden in Schleicher und Schüllschen Hülzen 24 Std. gegen wiederholt gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert. Die Dialysierflüssigkeit (im ganzen 4 l) wurde auf dem Wasserbad bis auf 20 ccm eingedampft und erwies sich intrakutan als unwirksam. Die Flüssigkeit in der Hülse hatte die ursprüngliche Wirksamkeit beibehalten. Sie gab noch eine deutliche Millonsche und Biuretreaktion.

Das Antigen ist demnach weder ein Fett noch ein Lipoid. Es steht den Eiweißsubstanzen nahe, nimmt aber doch eine auffallende Sonderstellung ein: koktostabile Antigene sind schon lange bekannt (z. B. das Polleneiweiß); neu dürfte es aber sein, daß die wirksame Substanz sich erst bildet beim Erhitzen über die Denaturierungstemperatur des Eiweißes. Wir möchten annehmen, daß es ein noch ziemlich hochmolekulares Abbauprodukt des Fischeiweißes ist, da es durch Alkohol fällbar, nicht dialysierbar ist und noch die oben angegebenen Eiweißreaktionen gibt.

Behandelt man die Fischstammlösung mit 10-proz. Essigsäure oder 10-proz. Salpetersäure in der Kälte, so fällt ein Niederschlag aus. Der Niederschlag, ebenso wie das neutralisierte Filtrat, sind intrakutan unwirksam. Bei Zusatz von 0,1-proz. Essigsäure findet in der Kälte eine deutliche Abschwächung auf etwa das 10-fache statt, beim Kochen wird diese Lösung ganz unwirksam. Bei Behandlung der Stammlösung mit 3-proz. Kalilauge in der Kälte bleibt sie klar und wirksam.

Es gelang nicht durch Verdauung mit gut wirksamem Pepsin in schwach saurer Lösung oder mit Trypsin in alkalischer Lösung die Stammlösung zu entgiften.

Die Tatsache, daß der Patient Kaviar essen kann, ohne zu erkranken, legte es nahe, die einzelnen Fischorgane auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Es stellte sich heraus, daß nur die quergestreifte Muskulatur der Knochenfische das Antigen in größeren Mengen enthält. Ganz schwach wirksam (1000mal schwächer als die oben beschriebene Stammlösung) waren Abkochungen von Magen und Leber. Unwirksam waren Abkochungen von Milz und Rogen, sowie reines, unverdünntes Fischserum und Abkoch-

ungen von Fischserum. Von den Knorpelfischen erwiesen sich die Rochen etwa 100mal schwächer wirksam als die sonst untersuchten Knochenfische. Begreiflicher Weise war das Fleisch von Walfischen unwirksam.

III.

Serologische Untersuchungen.

Die streng spezifische Natur der beschriebenen Reaktion führte dazu, das Serum der überempfindlichen Person auf das Vorhandensein von Antikörpern zu prüfen. Bei den verschiedensten Versuchsanordnungen gelang es in vitro weder mit ihrem, noch mit normalem Menschenserum, Präzipitine oder komplementbindende Substanzen nachzuweisen.

Im Anschluß an die Beobachtung von Bauer (München. med. Wochenschr. 1911. S. 71), daß bei der Serumkrankheit das Patientenserum die entsprechenden Blutkörperchen agglutiniert, prüften wir die Wirkung des Serums von unserem Patienten gegenüber Fischerythrozyten, erzielten aber kein Ergebnis. Auch im Versuch an Menschen wurden neutralisierende Substanzen im Serum nicht beobachtet: Gemische von gleichen Teilen der FischstammLösung mit dem frisch entnommenen Serum des Patienten bzw. einer Normalperson wurden 2 Std. bei 37° und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Ihre Giftigkeit für den Patienten bei intrakutaner Injektion wurde hierdurch nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen weitgehende Uebereinstimmung mit dem auch sonst ähnlichen Verhalten des Polleneiweißes beim Heufieberpatienten. Auch dieses ist ein kochbeständiger, eiweißartiger Körper, der sich allerdings Säuren und Alkalien gegenüber anders verhält, aber ebenfalls eine bedeutende Resistenz gegen verdauende Fermente aufweist. Beide Körper sind streng spezifisch für die betreffenden überempfindlichen Personen, wenn auch in der wirksamen Dosis erhebliche quantitative Unterschiede beobachtet werden. Sie unterscheiden sich voneinander dadurch, daß das giftige Polleneiweiß vorgebildet ist, die giftige Substanz des Fisches erst bei der Eiweißdenaturierung entsteht. Das Polleneiweiß löst am Heufieberkranken bei subkutaner oder intrakutaner Injektion genau die gleichen Erscheinungen aus, wie das Fischextrakt beim Fischempfindlichen. Ein wohl nicht so wesentlicher Unterschied besteht darin, daß das Polleneiweiß bei enteraler, das Fischextrakt bei konjunkтивaler Einbringung unwirksam ist.

Die auftretenden Reaktionen weisen eine bemerkenswerte Aehnlichkeit mit denen der echten Anaphylaxie auf. Allerdings ist hier ein Unterschied vorhanden: Die Reaktion bei intrakutaner Injektion tritt bei der Fisch- und Pollenempfindlichkeit fast ohne Inkubation — binnen wenigen Minuten auf — und vergeht relativ rasch, während beim serumempfindlichen und ebenso beim tuberkulinempfindlichen Menschen die intrakutane Reaktion erst nach mehreren Stunden auftritt und tagelang deutlich auf der Höhe bleibt. Immerhin könnten diese Unterschiede nur gradueller Natur sein. Die Entscheidung, ob es sich bei den vorliegenden Formen der Ueberempfindlichkeit um echte Anaphylaxie handelt, wäre am ehesten möglich, wenn sie passiv auf nicht überempfindliche Wesen übertragen werden könnte. Bei Meerschweinchen gelang es nicht, das Bild der passiven Anaphylaxie zu erzeugen, wenn sie mit

dem Serum des fischempfindlichen Patienten (1 bzw. 2 ccm) intraperitoneal vorbehandelt und 24 Std. später mit 0,5 ccm der Fischstammlösung intravenös nachgespritzt wurden. Eine ähnliche Anordnung war auch mit dem Serum eines Heufieberkranken und Polleneiweißlösung ohne Ergebnis¹⁾. Daher wurde der Versuch unternommen, die Empfindlichkeit auf normal unempfindliche Menschen passiv zu übertragen. Die beim Meerschweinchen übliche Technik kam hier nicht in Frage, weil, entsprechend dem Körpergewicht des Versuchsobjektes, zu große Serummengen vom Spender hätten genommen werden müssen und vor allem wegen der Gefahr der Erzeugung eines bedrohlichen anaphylaktischen Shocks. Daher wurde versucht, die anaphylaktische Reaktion in der Haut zu lokalisieren, indem die beiden reagierenden Stoffe (Serum und Antigen) intrakutan in ein und dieselbe Hautstelle gespritzt wurden:

1) Verschieden abgestufte Gemische von Fischstammlösung mit dem Serum des fischempfindlichen Patienten waren bei intrakutaner Injektion von je 0,1 ccm am Normalmenschen unwirksam.

2) Auch durch längeres Stehenlassen (2 Std. 37°, 24 Std. Eisschrank) wurden die Gemische nicht wirksam.

3) Ein positives Resultat wurde erst erzielt, als, genau nach dem Prinzip des passiven Anaphylaxieversuchs am Meerschweinchen, das Serum intrakutan vorgespitzt und die Fischstammlösung 1 Tag danach in die gleiche Hautstelle nachgespritzt wurde.

Einem für Fisch unempfindlichen Manne wurden am 19. Juli 1920 am Bauch intrakutan eingespritzt je 0,1 ccm:

- 1) Serum des fischempfindlichen Patienten,
- 2) " " " " 1:10 verdünnt,
- 3) " " " " 1:10 "
- 4) " eines von jeder Idiosynkrasie freien gesunden Mannes,
- 5) " physiol. Kochsalzlösung.

Am 20. Juli 1920 wird in jede dieser Hautstellen und in eine 6) nicht vorbehandelte Hautstelle intrakutan 0,1 ccm der Fischstammlösung nachgespritzt. Die Anordnung der Quaddeln ergibt nachstehendes Schema:

	4	1	
Rechts	3 (Nabel)	5	Links
	6	2	

Nach 15 Min. war eine subjektiv und objektiv deutliche Reaktion nur bei den mit dem spezifischen Serum vorbehandelten Hautstellen 1, 2 und 3 vorhanden. Sie war am stärksten, wo das konzentrierte Serum angewendet wurde. Die Kontrollquaddeln 4, 5 und 6 zeigten nur eine leichte, traumatische Reaktion (vgl. Tabelle auf S. 166).

1) Anmerkg. währ. der Korrektur: Inzwischen ist es in aussichtreicheren Versuchen H. Curschmann gelungen, bei dem klinisch etwas ähnlichen Krankheitsbild der erworbenen Ueberempfindlichkeit der Fellfärber gegen „Ursol“ (Chinon-diimin-Polymere) mit dem Serum der Patienten Meerschweine passiv anaphylaktisch gegen diese Substanz zu machen. (München. med. Wochenschr. 1921. Nr. 5.)

Ergebnis des Versuchs.

Haut- stelle	Quaddel	Nach 15 Min.	Area	Nach 1 Std.
1	21 × 15 mm,	gespannt, blaß, plateauartig erhaben, mit zackigen Ausläufern, stark juckend	120 × 70 mm hochrot	Area noch hochrot
2	12 × 11 „	ebenso	80 × 50 mm hochrot	dgl.
3	12 × 8 „	ebenso	55 × 28 mm rot	Area rot
4	7 × 5 mm,	wenig erhaben, kreisrund, ganz unempfindlich	60 × 25 mm blaß	Area blaß
5	7 × 6 „	ebenso	40 × 25 mm blaßrosa	dgl.
6	8 × 7 „	ebenso	55 × 30 mm blaß	dgl.

Nach 1 Std. waren Quaddel und Area der mit spezifischem Serum vorbehandelter Hautstellen 1, 2 und 3 noch etwa gleich groß wie nach 15 Min., aber bereits unscharf gegeneinander abgegrenzt und im Beginn des Abklingens. An diesen Stellen war noch am Tage nach dem Versuch das deutliche Oedem vorhanden, das auch bei dem fischempfindlichen Patienten nach intrakutaner Injektion des Fischantigens nie vermißt wurde; dagegen blieben die Stellen 4, 5 und 6 ohne jede Spur von Oedem.

Der gleiche Versuch wurde nochmals an dieser Person, die übrigens pollenempfindlich ist, und außerdem an 2 anderen, von jeder Idiosynkrasie freien (1 Mann und 1 Frau) mit gleichem spezifischen Ergebnis ausgeführt. Bei einem weiteren, für Pepton empfindlichen Manne waren ebenfalls Unterschiede zugunsten der mit spezifischem Serum behandelten Hautstellen vorhanden; doch waren die Differenzen hier verhältnismäßig geringfügig.

Mit diesem Versuch ist daher bewiesen worden, daß nach dieser, von uns ausgearbeiteten Methodik die Fischüberempfindlichkeit mit dem Serum der empfindlichen Person passiv auf normale Menschen übertragen werden kann.

Es lag nunmehr nahe, die gleiche Anordnung bei anderen Formen der Ueberempfindlichkeit zu prüfen. Wir wählten hierzu das Heufieber, die Tuberkulin- und die Pferdeserumüberempfindlichkeit. Bei allen Dreien war das Ergebnis zahlreicher Versuchsreihen negativ. Es war noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß z. B. beim Heufieber nicht das Serum, sondern gewisse Zellen die Träger der Ueberempfindlichkeit sein könnten. Als solche kamen in erster Reihe in Betracht die Zellen der Subcutis und Cutis, da doch die Haut gerade eine hohe lokale Pollenempfindlichkeit aufweist. Um diese Frage zu entscheiden, wurde dem Heufieberpatienten ein 15 qcm großes Hautstück exstirpiert; die Subcutis und tieferen Schichten der Cutis wurden sorgfältig abgeschabt, mit Glaspulver im Achatmörser zu einem feinen Brei verrieben, mit 6 ccm physiol. Kochsalzlösung unter allmählichem Zusatz aufgenommen, 15 Min. geschüttelt und in der Handzentrifuge 1 Min. geschleudert, um die groben, suspendierten Bestandteile zu beseitigen. Mit der überstehenden, leicht opaleszierenden, schwach blutig gefärbten Flüssigkeit, die mikroskopisch zellfrei war, wurde an 3 Personen nach

der gleichen Versuchsanordnung wie oben die passive Uebertragung der Pollenempfindlichkeit geprüft — aber ohne jedes Ergebnis.

Vielleicht liegt hier ein prinzipieller Unterschied zwischen der Fischempfindlichkeit und den anderen Idiosynkrasien vor. Aber es ist uns wahrscheinlicher — schon mit Rücksicht auf die oben betonte, sehr große Aehnlichkeit zwischen Fisch- und Pollenempfindlichkeit — daß hier nur quantitative Unterschiede bestehen. Hierfür spricht auch der Umstand, daß der fischempfindliche Patient einen ganz ungewöhnlich hohen Grad der Ueberempfindlichkeit aufweist, während die zu den Heufieber- und Pferdeserumversuchen verwendeten menschlichen Serumspender die betreffende Ueberempfindlichkeit nur in mäßig starkem Grade zeigen. Vielleicht wäre es auch hier möglich gewesen, die Ueberempfindlichkeit gegen Pollen und Serum nach unserer Methode passiv zu übertragen, wenn uns hierfür höher empfindliche Personen zu Gebote gestanden hätten. Der im Tuberkulinversuch verwendete Patient reagiert allerdings so empfindlich auf Tuberkulin, daß dieser Einwand hier kaum zu Recht besteht.

Jedenfalls ist es nach den vorstehenden Erfahrungen sehr wahrscheinlich, daß die Fischempfindlichkeit als eine echte anaphylaktische Erscheinung zu deuten ist.

IV.

Die Möglichkeit einer aktiven Schutzimpfung ist beim Heufieber durch die Versuche von Noon, Freeman, Dunbar, Eskuchen u. a. bekannt. Auch der eine von uns (P.) hat sich im Sommer 1919 eingehend mit dieser Frage beschäftigt und konnte mit einigen von Herrn Prof. Dunbar freundlichst überlassenen, hochwirksamen Roggenpolleneiweißlösungen bei 2 von 4 Heufieberpatienten günstige Erfolge erzielen. Der Mechanismus dieses Schutzes ist noch nicht genügend geklärt. Es steht noch keineswegs fest, daß hier eine echte Immunität vorliegt. Dagegen scheint der Umstand zu sprechen, daß bisher in dem Serum derartig vorbehandelter Personen, im Gegensatz zum Serum pollenimmunisierter Kaninchen, Ziegen und Pferde das Heuflebergift neutralisierende Substanzen noch nicht nachgewiesen zu sein scheinen. Vielleicht handelt es sich hier, wie Bessau annimmt, um eine Antianaphylaxie oder Katanaphylaxie. Auch in der Frage der Technik dieser Schutzimpfung ist das letzte Wort noch nicht gesprochen. Man darf nicht zu kleine Dosen anwenden, sonst tritt meist kein Erfolg ein; und bei zu rascher Steigerung der Dosen kommt es leicht zu sehr akuten Erscheinungen von seiten der Haut und der Atmungswege, die unter Umständen recht bedrohlich verlaufen können und medikamentöse Behandlung (Atropin, Suprarenin) erfordern. (Noon, Freeman, Bessau; eigene Beobachtungen.)

Daß aber auf diesem Wege die Möglichkeit einer vorübergehenden, vielleicht auch einer dauernden Bekämpfung der Ueberempfindlichkeit besteht, ist auch aus den Erscheinungen zu schließen, die bei unserem fischempfindlichen Patienten beobachtet wurden. Nachdem bei ihm eine größere Zahl (etwa 40) von intrakutanen Injektionen verschiedener Fischextrakte im Laufe von etwa 6 Wochen stets an der Beugeseite des linken Vorderarms ausgeführt worden war, wurde hier eine sehr aus-

gesprochene lokale Herabsetzung der Empfindlichkeit festgestellt (vgl. nachstehende Tabelle).

Versuch (6. Juli 1920).

	Linker Unterarm, Beugeseite (oft vorbehandelt) 0,1 ccm Fischstammlösung intra- kutan	Rechter Unterarm, Beugeseite (bisher unbehandelt) 0,1 ccm Fischstammlösung 1:10 intra- kutan
Nach 15 Min.	Ganz schwache Lokalreaktion; Quaddel 20×13 mm, Area rot, verwaschen, nicht scharf umrandet	Sehr starke Lokalreaktion, an der Grenze der Allgemeinreaktion Quaddel 36×25 , Area 135×70 mm hochrot, an der Streckseite bildet sich eine kleine, stark juckende Tochterquaddel aus.

In späterer Zeit, nachdem auch am rechten Arm zahlreiche Fischinjektionen ausgeführt waren, trat auch hier eine entsprechende Verringerung der örtlichen Empfindlichkeit auf. Nach 8-wöchiger Unterbrechung der Versuche war die Empfindlichkeit annähernd in der ursprünglichen Stärke wieder zurückgekehrt. Es ergibt sich also, daß eine Art von lokaler Schutzimpfung möglich ist; allerdings ist sie, soweit unsere bisherigen Erfahrungen reichen, nur vorübergehend. Wir können noch nicht sagen, ob es gelingen wird, eine für den ganzen Körper gegen die enterale Zufuhr des Antigens wirksame Schutzimpfung durchzuführen. Versuche nach dieser Richtung werden noch unternommen.

Schlußfolgerungen,

1) Die Fischempfindlichkeit besteht nach den von uns an einem hochempfindlichen Patienten ausgeführten Untersuchungen sowohl gegen die enterale wie gegen die intrakutane Zufuhr des Antigens. Die wirksame Substanz ist im Muskelfleisch, aber nicht im Blutserum, den meisten Organen und dem Rogen der Knochenfische, und nur in geringer Menge im Muskelfleisch der Knorpelfische vorhanden. Sie ist im rohen Fischmuskel nicht nachweisbar; sie entsteht erst bei Erhitzung auf die Gerinnungstemperatur des Eiweißes.

2) Die wirksame Substanz ist in Alkohol und Aether in der Kälte und in der Wärme unlöslich, sie ist nicht dialysierbar, sie wird durch Säuren rasch unwirksam, durch Alkali, Pepsin, Trypsin nicht abgeschwächt.

3) Die Reaktion ist streng spezifisch. Präzipitine, komplementbindende Stoffe, neutralisierende Stoffe waren im Serum der empfindlichen Person nicht nachweisbar.

4) Mit dem Serum des Patienten konnten Meerschweinchen nicht passiv überempfindlich gemacht werden. Dagegen gelang mit seinem Serum die spezifische Uebertragung der Fischempfindlichkeit auf normale, nicht fischempfindliche Menschen: die Methodik bestand in der intrakutanen Injektion des Serums und der 24 Std. später erfolgenden

intrakutanen Injektion des Antigens in die gleiche Hautstelle.

5) Mit dieser Methodik gelang es nicht, die Empfindlichkeit gegen Polleneiweiß, gegen Tuberkulin, gegen Pferdeserum zu übertragen. Vielleicht wäre es mit dem Serum höher empfindlicher Personen als derer, die uns zu Gebote standen, möglich gewesen.

6) Bei häufiger Ausführung der intrakutanen Fischinjektion wurde eine mehrere Wochen anhaltende örtliche Abstumpfung der Empfindlichkeit erzielt.

Nachdruck verboten.

Original-Wassermann-Reaktion: Kältemethode: Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi.

[Aus dem Hygienischen Institut in Leipzig (Direktor: Geh.-Rat Kruse).]

Von Dr. med. **Karl Wilk.**

Wie schwerwiegend ist der Umstand, daß eine positive Wa.-R. oft das einzig greifbare Symptom der Syphilis sein kann! Muß daher die Serodiagnostik, um unter den möglichst besten Bedingungen zu arbeiten, nicht alle Methoden in sich schließen, welche hinsichtlich Spezifität der Resultate in Betracht kommen? Denn absolut erschöpfend ist kein einziges der bis jetzt angewendeten Verfahren, und nur durch ihre gegenseitige Ergänzung kann die Zahl der sonst unerkannt bleibenden Luesfälle nach Möglichkeit eingeschränkt werden.

Die Wa.-R. wird bekanntlich bei einer konstanten Temperatur von 37° C angestellt (Original-Wa.-R.) und der weitaus größere Teil aller luetischen Seren bindet bei diesem Wärmegrad ebenso wie in der Kälte (0—4° C). Die praktische Wichtigkeit der Tatsache, daß ein kleiner Teil von syphilitischen Seren ausschließlich in der Kälte gebunden wird, die als erster E. Jacobsthal hervorgehoben hatte, wurde aber erst richtig gewertet, nachdem Jacobsthals Ergebnisse von vielen Seiten in nach Tausenden zählenden Versuchsreihen geprüft und ihre Richtigkeit bestätigt worden war. Hatte schon Jacobsthal mit seiner Kältemethode ein Plus von 2 Proz. feststellen können, so mehrten sich in der Folge die positiven Reaktionen mit der zunehmenden Zahl der nach dieser Richtung untersuchten Seren bei negativer Original-Wa.-R. In klinischer Hinsicht fand man, daß die Syphilis oft früher, als durch die Orig.-Wa.-R. erkannt werden konnte, was für eine schnell einzuleitende spezifische Behandlung von außerordentlicher Bedeutung sein mußte. Andererseits waren es meist behandelte Fälle des II. und III. Luesstadiums (Spätlatenz bzw. Metalues), wo der Zeitpunkt der Infektion oft bis zu 20 Jahren und darüber zurücklag und die Orig.-Wa.-R. ein negatives Resultat ergeben hatte.

Die biologischen Eigenschaften der syphilitischen Seren bedingen ein Arbeiten mit mehreren, verschiedenen Extrakten, welchem Umstande

neuerdings sogar durch staatliche Verordnung Rechnung getragen wird. Es stehen aber die Extrakte bezüglich ihrer Reaktionsfähigkeit auch unter dem Einflusse der Temperatur, was besonders für die schärfer reagierenden, cholesterinisierten Extrakte gilt. Diese binden zuverlässiger bei 37° C, während die heute wohl ausschließlich verwendeten alkoholischen Luesleberextrakte im allgemeinen Temperaturschwankungen gegenüber ein konstanteres Verhalten zeigen sollen.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf über 2000 Seren. Wir gingen nach folgenden Prinzipien vor:

Nachdem durch Vorversuche die Gebrauchsdosis sowohl des hämolytischen Ambozeptors, als auch des frisch entnommenen Meerschweinchenmischkomplementes festgestellt worden war, untersuchten wir die Seren zuerst nach der Originalmethode (Wa.-R. bei 37° C im Wasserbade). Sowohl die stark positiv reagierenden (++++) also sicher luetischen, als auch die verdächtigen (++) und negativen Seren unterzogen wir, so weit es äußere Umstände zuließen, dem Kälteverfahren, auch hier — bis auf die Temperatur — stets in Anlehnung an die Vorschriften der Originalmethode arbeitend. — Die Patientenserum, Extrakt und Meerschweinchenkomplement enthaltenden Röhrchen wurden auf einige Minuten zwecks Vorkühlung in Eiswasser gestellt und dann auf 1/2 Std. in einem besonders hergerichteten Frigo untergebracht, dessen mit Wasser gefüllter Behälter konstant die Temperatur von 0—3° behielt (I. Phase). Dann erfolgte der Zusatz „sensibilisierter“ Hammelblutkörperchenaufschwemmung und die Röhrchen wurden nun auf 30 Min. ins Wasserbad bei 37° C gestellt (II. Phase). — Wir wollen gleich jetzt bemerken, daß die Hämolyse in den Kontrollen und Röhrchen mit negativen Seren meist schon nach den ersten 5. Min. stattfand und sehr selten eine Auflösung der Blutkörperchen erst nach diesem Zeitpunkt eintrat.

In einer 3., mit cholesterinisierten Extrakten ausgeführten Versuchsreihe, in Form der Ausflockungsmethode nach Sachs-Georgi (S.-G.-R.) prüften wir gleichzeitig noch einmal das Verhalten derselben Seren. Wir arbeiteten mit den Originalextrakten Nr. 27 und Nr. 31 und mit einfacher (Verd. 1:5) und doppelter (Verd. 2:5) Serummengemenge. Mit letzterer zur Verschärfung der Reaktion bei den sogenannten „schwachen“ Seren. Die Verdünnung der Extrakte geschah zweizeitig nach den Vorschriften von Sachs-Georgi. Die Röhrchen wurden (mit 1,5 ccm Gesamthalt) auf 30 Std. in den Brutschrank (37° C) gestellt, dieser während der Zeit nach Möglichkeit nicht geöffnet und nach Herausnahme das Resultat im Agglutinoskop abgelesen. Keines der positiven Seren flockte so langsam, daß ein Ergebnis nicht schon nach 24 Std. hätte festgestellt werden können (Kontrollversuche in einem 2. Thermostaten). Aber der oben genannten „schwachen“ Seren und sogenannten „Spätreaktionen“ wegen ließen wir die Röhrchen dennoch länger unbehelligt. Hierzu waren wir auch dadurch veranlaßt, weil wir besonders in den Röhrchen mit doppelter Serummengemenge nach einmaliger Abkühlung schon bei vielen negativen Seren unspezifische Flockungen auftreten sahen, was ein späteres Ablesen außerordentlich erschwert hätte, zumal auch in den Röhrchen mit einfacher Serummengemenge diese Flockungen nach Abkühlung oft auftraten.

Nach der „Brutschrankmethode“ (30 Std.) arbeitend, fanden wir die negativen Seren in der Tat fast stets frei von Eigenflockung, abgesehen von Fällen, bei denen die Ursache jedoch in der abnormen Beschaffen-

Tabelle I.

Gesamtsumme: 1510.					
Übereinstimmend positiv bzw. negativ		Nicht übereinstimmend: 105.			
Wa.-R. bei 37° C und 0-4° C	S.-G.-R.	+ Wa.-R. nur bei 0-4° C	+ Wa.-R. nur bei 37° C	S.-G.-R. negativ bei posit. Wa.-R.	S.-G.-R. positiv bei negat. Wa.-R.
1408 93 Proz.	1500 99,3 Proz.	85 5,6 Proz.	10 0,7 Proz.	3 0,21 Proz.	7 0,49 Proz.

Tabelle II.

Nr.	Wa.-R. bei 37° C		Wa.-R. bei 0-4° C		S.-G.-R.
	E. I	E. II	E. I	E. II	
95	++	+++	-	-	+++
172	+++	±	±	-	++++
283	+++	±	±	-	++++
385	++++	+++	++	±	++++
452	++++	+++	±	±	+++
569	±	±	-	-	+++
600	++	±	±	-	+++
612	++	+++	++	++	+++
729	++++	+++	-	-	++++
	Extrakt I	Extrakt II	Extrakt I	Extrakt II	

Tabelle III.

Nr.	Wa.-R. bei 0-4° C		Wa.-R. bei 37° C		S.-G.-R.
	E. I	E. II	E. I	E. II	
52	++++	+++	-	-	++++
74	+++	++	++	-	++++
189	++++	+++	-	-	++++
290	++++	+++	-	-	++++
317	+++	++	-	-	++++
339	++++	++++	++	-	++++
443	+++	±	-	-	++++
446	++++	++++	±	-	++++
563	+++	++	-	-	++++
565	++++	+++	-	-	++++
677	++++	++++	-	±	++++
692	++++	+++	-	-	+++
702	++	++	-	-	+++
704	++	++	-	-	+++
814	+++	±	-	-	++++
937	++++	++++	-	-	++++
1045	+++	±	-	-	++++
1178	+++	++	-	-	++++
1330	+++	++	-	-	++++
1351	++++	++++	-	-	++++
1374	++++	++++	-	-	++++
1445	++++	+++	++	++	++++
1452	++++	++	-	-	++++
1074	++++	++++	-	-	++++
	Extrakt I	Extrakt II	Extrakt I	Extrakt II	

heit der Seren gelegen war, was auch bei der Wa.-R. in Form von Eigenhemmung zutage trat. Reversible Bindung, im Sinne einer Lösung der unspezifischen Flockungen nach Wiedereinstellen der Röhrrchen in den Brutschrank, fanden wir bei vielen Seren nicht. Daß aber die positiven Seren auch in viel größerer Verdünnung noch scharf reagierten, davon haben wir uns stets überzeugen können. Ueber durch längeres Zentrifugieren beschleunigte und verstärkte Ausflockung (Schnelldiagnose) fehlen uns genauere Erfahrungen. Ob aber nicht etwa die Abkühlung der Röhrrchen hierbei von Einfluß ist, was unter Umständen auch für die negativen Seren nicht belanglos wäre? Bezüglich der positiven Resultate fanden auch wir keine graduelle Uebereinstimmung zwischen S.-G.-R. und Wa.-R.

Von den 1510 in 3 Parallelversuchen geprüften Seren reagierte der weitaus größere Teil übereinstimmend positiv bzw. negativ. Ein kleiner, aber nicht unbeträchtlicher Teil gab nur in der Kälte stark positiven Ausfall der Wa.-R. (Tab. I u. III). 10 Seren reagierten bei Anstellung der Orig.-Wa.-R. (37° C) stärker positiv als in der Kälte (Tab. II). Die Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi war 3mal negativ („Versager“) bei positivem Ergebnis der Wa.-R., 7mal positiv bei negativem Ausfall der Wa.-R. (s. Tab. I). Uebereinstimmend positive Resultate bei der Wa.-R. und S.-G.-R. hatten wir in über 99 Proz. der Fälle. Besonders hervorzuheben ist, daß die S.-G.-R. bei positivem Ergebnis der Wa.-R. in der Kälte sozusagen durchweg positiv ausfiel (s. Tab. III). Hinsichtlich der klinischen Diagnose konnten wir eine weitgehende Uebereinstimmung mit den Angaben früherer Untersucher feststellen. Es handelte sich teils um Fälle mit erst beginnender, oft unscheinbarer Initialsklerose, in der überwiegenden Mehrzahl aber um das II. und III. Luesstadium. Alle Patienten mit Lues II bzw. Lues III hatten mindestens eine spezifische Behandlung durchgemacht. 2mal wurde Lues congenita angegeben, 1mal Hysterie (?), 2mal war klinisch keine Lues nachweisbar (Wa.-R. und S.-G.-R. positiv!). — Zu den unspezifischen S.-G.-Reaktionen gab 2mal Ulcus molle, 1mal Tuberkulose Veranlassung. Ueber die anderen Fälle fehlen leider die klinischen Angaben.

Zusammenfassung.

I. Die Kältemethode und S.-G.-R. geben uns die Möglichkeit, zu einer Zeit schon die Diagnose auf Syphilis zu stellen, wo die Original-Wa.-R. noch nicht positiv ausfällt, was für eine schnell einzuleitende, spezifische Behandlung (Abortivkur) von einschneidender Bedeutung ist.

II. Beide Reaktionen bleiben noch positiv bei negativer Original-Wa.-R. in behandelten Fällen des II. und III. Luesstadiums, können also einerseits als Indikatoren für die Wirkung bzw. notwendige Fortdauer einer stattfindenden Therapie benützt werden, andererseits die Dringlichkeit einer spezifischen Behandlung anzeigen.

III. Die S.-G.-R. zeigte in unseren Ergebnissen sozusagen ausnahmslos Uebereinstimmung mit der Kältereaktion; da sie aber bedeutend billiger zu stehen kommt und technisch viel einfacher auszuführen ist

als die Wa.-R., muß sie als Ersatz der Kältemethode ernstlich in Frage gezogen werden.

IV. Die S.-G.-R. ist der unter I und II angeführten Eigenschaften wegen als Ergänzungsmethode neben der Original-Wa.-R. sehr zu empfehlen.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herrn Prof. Hintze für die Ueberlassung des Themas und die Ratschläge während der Ausführung der Untersuchungen meinen Dank auszusprechen.

Nachdruck verboten.

Die Fähigkeit, Glukose bei 46° C zu vergären, als erworbene Eigenschaft.

[Aus dem Laboratorium für die Gesundheitslehre zu Utrecht (Vorstand:
Prof. Dr. C. Eijkman).]

Von Dr. G. Grijns.

Wenn Oberflächenwasser oder Brunnenwasser mit Coli-Bazillen verunreinigt wird, tritt nach einiger Zeit eine allmähliche Verringerung ihrer Zahl ein, und wenn keine neue Infektion erfolgt, sehen wir sie schließlich wieder aus dem Wasser verschwinden. An Stauweihern, Talsperren und größeren Wasserbehältern kann man diese Erscheinung leicht beobachten, aber auch in kleineren Wassermengen läßt es sich im Laboratorium sehr gut verfolgen¹⁾.

Setzt man regelmäßig verschiedene Gärungsproben an, so findet man, daß zuerst die Gärungstiter bei 46°, dann die für Laktose und noch später die Glukosetiter bei 37° zu sinken anfangen, so daß man immer mehr Wasser verwenden muß, um noch Gärung zu erhalten. Schließlich wird die Eijkmansche Probe negativ, nachher auch die Laktoseprobe. Die Glukosegärung bei 37° bleibt bisweilen bestehen, manchmal verschwindet sie aber auch. In Gewässern, die Fische, Kaulquappen und dergleichen enthalten, verschwindet sie nimmer.

Es ist nun die Frage, ob die Bakterien, die noch bei 46° Glukose vergären, und die Laktosevergärenden besondere Arten sind, die in der ihnen nicht zusagenden Umgebung allmählich aussterben, oder ob sie zwar am Leben bleiben, jedoch die Fähigkeit, Glukose bei 46° C und Laktose zu vergären, einbüßen.

Für den ersteren Punkt wäre anzuführen, daß Coli-Stämme in Reinzucht beide Fähigkeiten jahrelang beibehalten können, und daß bei der Untersuchung vor längerer Zeit verschüttet gewesener Abortgruben wiederholt eine positive Eijkmansche Reaktion gefunden wurde²⁾.

1) Clemesha, W. W., The bacteriology of surface waters in the tropics. Bombay 1912. — Flu, P. C. De gistingproef van Eijkman ter opsporing van faecale verontreiniging van water. (Geneesk. Tijdschr. v. Nederl. Indië. Bd. 55. 1915. S. 817.)

2) Eijken, P. A. A. F., u. Grijns, G., Over biologische processen in den Indischen bodem. (Geneesk. Tijdschr. v. Ned. Indië. Bd. 55. 1915. S. 690.)

Eijken¹⁾ zeigte aber, daß man Bakterien, die zwar Glukose, nicht aber Laktose vergären und auf Endo-Platten rot wachsen, zu Laktosevergärrern umzüchten kann, wenn man sie eine Zeitlang bei 37° in Laktose enthaltenden Flüssigkeiten züchtet.

Flu²⁾ isolierte aus einer auf der Endo-Platte als Coli wachsenden Glukose bei 37°, nicht aber bei 46° vergärenden Kolonie nach Burris Methode eine einzelne Bakterie, von der eine Reinzucht auf Endo-Agar ausgesät wurde. Von den erhaltenen Kolonien wurden 75 in Glukosebouillonröhrchen übergeimpft, von welchen je eines bei 37° und eines bei 46° bebrütet wurde. Alle vergoren den Zucker bei 37°, aber 60 auch bei 46°. Diese hatten die Fähigkeit, Glukose bei 46° zu vergären, wiedererlangt.

Es erschien mir daher angebracht, diese Beobachtung zu erweitern und zu erforschen, inwiefern Bakterien, die eine Summe von Merkmalen mit den Coli-Bakterien gemeinsam haben, durch Züchtung in Glukose enthaltenden Medien bei 37° die Fähigkeit, auch bei 46° Glukose zu vergären, erlangen würden.

Zu diesem Zwecke wurden Grabenwasserproben aus dem Catharynsingel auf Endo-Platten verteilt und die rot wachsenden Kolonien in je zwei Glukosepeptonkochsalzröhrchen nach der Eijkman'schen Formel geimpft. Die eine Reihe wurde bei 37°, die zweite bei 46° aufgehoben und 24—47 Std. beobachtet. Von 107 auf diese Weise untersuchten Kolonien zeigten 28 in keinem von beiden Röhrchen Gas. Bei 36 trat bei 37° und bei 48° Gasbildung ein, während 43 Stämme nur bei 37° vergoren. Letztere wurden auf halbprozentigem Glukoseagar bei 37° weiter gezüchtet und alle 5 oder 6 Tage übergeimpft.

Ungefähr nach 1 Monat wurde dann wieder in Glukosepeptonwasser bei 37° und bei 46° untersucht.

Es stellte sich heraus, daß 11 Stämme die Fähigkeit erworben hatten, Glukose bei 46° zu vergären. In der Tabelle sind die untersuchten Stämme und einige ihrer Hauptmerkmale zusammengestellt. Da es bei der Eijkman'schen Probe sich nicht darum handelt, *Bacterium coli* Escherich zu isolieren, sondern ein Urteil zu gewinnen über die Wahrscheinlichkeit einer fäkalen Wasserverunreinigung, habe ich die Eigenbewegung nicht gefördert. Es steht ja mit der Eigenbewegung bei Coli-Stämmen, die längere Zeit in Kultur sind, mitunter auch sehr schlecht.

Auffallend ist, daß so viele nichtbewegliche Kleinwesen gefunden wurden, und gerade die beweglichen sich nicht zu einer positiven Eijkman'schen Probe emporrangen.

Die Tatsache, daß durch Züchtung bei 37° in Traubenzucker enthaltendem Nährboden eine gewisse Menge Coli-ähnlicher Bakterien zu Traubenzuckervergärung bei 46° geführt werden konnten, läßt mich vermuten, daß auch das „echte“ Coli im Darmtraktus der Warmblüter diese Fähigkeit erwirbt. Es ist doch hier wohl immer Glukose vorrätig und die Temperatur gewöhnlich über 37,5°.

Diejenigen Stämme, die sich am leichtesten an diese Bedingungen anpassen, werden wahrscheinlich die anderen überwuchern, und so darf

1) Eijken, P. A. A. F., De lactosegisting als hulpmiddel bij het onderzoek van watermonsters. (Geneesk. Tijdschr. v. Ned. Indië. Bd. 56. 1916. S. 951.)

2) Flu, P. C., l. c. S. 241.

Uebersicht der untersuchten Stämme.

Nr.	Isoliert	Gelatine	Indol	Milch	Laktose	Neutralrot	Gram	Eigenbewegung	Form
1	6. 1.	+	+	+ 2 T	—	—	—	+	kleine Stäbchen
2	"	langsam	+	+	—	—	—	—	große "
3	13. 1.	—	+	+ 1 T	+	+	—	—	kleine "
4	"	—	+	+	+	+	—	—	dgl. "
5	"	—	—	+ 2 T	+	+	—	—	"
6	"	—	+	+ 1 T	+	+	—	—	"
7	"	—	+	+	+	+	—	—	"
8	"	—	+	+	+	+	—	—	"
9	"	—	+	+	+	+	—	—	"
10	"	—	+	+	+	+	—	—	"
11	"	—	+	+	+	+	—	—	"
12	"	—	+	—	+	+	—	—	sehr kurze, ovoide Stäbch.
13	19. 1.	—	+	+ 5 T	+	+	—	+	sehr kleine Stäbchen
14	"	—	+	+ 1 T	+	+	—	+	kleine Stäbchen
15	21. 1.	—	+	+	+	+	—	+	" "
16	12. 2.	—	+	+	+	—	—	—	" "
17	"	—	+	+	+	—	—	—	" "
18	"	—	+	+	+	—	—	—	" "
19	"	—	+	+	+	—	—	—	" "
20	"	—	+	+	+	—	—	—	" "
21	"	—	+	+	+	—	—	—	" "
22	18. 2.	—	—	+ 2 T	+	+	—	—	lange Stäbchen
23	"	—	—	—	+	+	—	—	kurze "
24	"	—	—	—	+	±	—	—	lange "
25	"	—	—	+ 5 T	—	—	—	—	"
26	"	—	+	—	+	+	—	—	ovoide "
27	13. 3.	—	+	+ 1 T	+	—	—	—	kurze "
28	"	—	+	± "	?	·	—	+	" "
29	"	—	+	+	+	—	—	+	ziemlich große Stäbchen
30	31. 3.	—	+	+ 1 "	+	+	—	—	dgl.
31	"	—	+	+	+	—	—	—	"
32	12. 5.	—	+ 4 T	+	+	+	—	—	große Stäbchen
33	"	—	—	+ 2 T	+	—	—	—	kurze "
34	"	—	+ 4 T	+ 1 T	+	+	—	—	" "
35	"	—	+	+ 2 T	+	+	—	—	" "
36	"	—	+	+	+	+	—	—	lange "
37	"	—	—	+	+	—	—	—	kurze "
38	"	—	—	+	+	+	—	—	" "
39	"	—	Spur	+ 1 T	+	+	—	—	" "
40	"	—	+ 4 T	+ 2 T	+	+	—	—	" "
41	"	—	+	+ 4 T	+	+	—	—	" "
42	"	—	+	+ 5 T	+	+	—	+	" "
43	"	—	+ 9 T	+ 1 T	+	+	—	—	" "

+ bedeutet: bei Gelatine Verflüssigung; bei Milch Gerinnung; bei Laktose Gasbildung; bei Neutralrot Fluoreszenz; wo bei Indol die Zahl der Tage nicht angegeben, ist diese 2. Die Stämme, die später Glukose bei 46° vergoren haben, sind mit fetten Nummern bezeichnet.

man erwarten, wie auch von Flu in der zitierten Arbeit dargetan ist, daß im Darmkanal die Coli-Stämme, die bei 46° vergären, die Oberhand gewinnen.

Wenn sie ins Wasser oder in den Boden gelangen, müssen sie die höhere Temperatur und die Glukose entbehren, wobei jene Fähigkeit allmählich wieder verloren geht.

An die Herren Mitarbeiter

Die jetzigen abnormen Verhältnisse zwingen uns leider, mit dem verfügbaren Raum so sparsam wie möglich umzugehen. Wir sehen uns daher genötigt, in Zukunft Arbeiten, welche den Umfang von 3½ bis 4 Druckbogen (einschließlich Tabellen, Kurven etc.) überschreiten, von der Annahme auszuschließen und bitten die Herren Mitarbeiter, in den einzuliefernden Manuskripten sich möglichst kurz fassen zu wollen, Tabellen, geschichtliche Einleitungen usw. aber zu vermeiden, soweit dies nur irgendwie zulässig ist. In der Hoffnung, daß bald wieder normalere Verhältnisse die jetzigen Einschränkungen unnötig machen, zeichnen

Redaktion und Verlag
des Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten.

Inhalt.

- | | |
|---|--|
| <p>Aoki, K., u. Konno, T., Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination. I. Mitteilung. Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen während der Immunisierung des Kaninchens mit Typhusbazillen, S. 139.</p> <p>Bachmann, W., Ein Fall von Soorvarietät, S. 129.</p> <p>Busson, B., Die Erreger der „hämorrhagischen Septikämie“, S. 101.</p> <p>Collier, Cristispira helgolandica nov. spec. und ihre Fortpflanzung, S. 132.</p> <p>Grijns, G., Die Fähigkeit, Glukose bei 46° C zu vergären, als erworbene Eigenschaft, S. 173.</p> <p>Hofmann, Edmund, Einige Bemerkungen über die <i>Leptospira dentium</i> Hoffmann und andere Mundspirochäten, S. 134.</p> | <p>Lutz, Adolpho, Zur Kenntnis des Entwicklungszyklus der Holostomiden. Vorläufige Mitteilung, S. 124.</p> <p>Pesch, Karl, Die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen durch die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe. Ein neuer, das Wachstum von <i>Bacterium coli</i> hemmender Nährboden für Paratyphus B, S. 97.</p> <p>Prausnitz, Carl, u. Küstner, Heisz, Studien über die Ueberempfindlichkeit, S. 160.</p> <p>Schmitt, Hans, Das Verhalten der Ruhrbazillen und der Typhus-Coli-Bazillen in eiweißfreien Lackmusnährböden, S. 119.</p> <p>Weil, S., Zur Gasbrandfrage, S. 118.</p> <p>Wilk, Karl, Original-Wassermann-Reaktion: Kältemethode: Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi, S. 169.</p> |
|---|--|

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 3.

Ausgegeben am 11. Mai 1921.

Nachdruck verboten.

Die Kapseln der Bakterien und eine neue Methode, diese einfach darzustellen¹⁾.

[Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Amsterdam (Direktor: Prof. Dr. R. H. Saltet).]

Von **M. van Riemsdijk**, Assistentin am Institut.

Mit 1 Tafel.

Der Methoden zur Herstellung von Kapseln bei den Bakterien gibt es unendlich viele, und immer kommen wieder neue dazu, was wohl der beste Beweis dafür ist, daß keine einzige Methode in allen Fällen befriedigt. Schlägt man die Hand- und Lehrbücher bei diesem Kapitel nach, so kommt man fast in einen „Irrgarten“.

Im 1. Bande des Handbuches der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann werden schon allein nicht weniger als 13 verschiedene Kapselfärbungen angegeben, und man kann ruhig sagen, daß es in den übrigen Handbüchern ebenso ist.

Diese große Menge von verschiedenen Methoden deutet darauf hin, daß die verschiedenen Methoden beim selben Organismus keine einheitlichen Resultate geben.

Dadurch entsteht eine sehr große Unsicherheit, wenn man ein unbekanntes Bakterium auf seine Kapsel prüfen will, weil man im voraus kaum wissen kann, welche Methode in dem betreffenden Fall, bei der Lage der Kultur, die besten und sichersten Resultate geben wird.

Das Endoplasma des Bakterienleibes wird vom Ektoplasma (Zellmembran) umgeben.

Die Membran ist der Schutzmantel des eigentlichen Zellkörpers und schützt gegen schädliche Einflüsse, spielt eine große Rolle bei der Osmose, wodurch die Zelle die Nährstoffe an sich zieht, und bestimmt endlich die Form des Bakterienleibes.

Daß der Bakterienkörper nach Trocknung und Fixierung seine scharf umschriebene, konstante Form behält, ist zum großen Teil diesem festumschließenden Membranschutzmantel zuzuschreiben.

Bei den gewöhnlichen Färbemethoden mit basischen Anilinfarbstoffen, womit der Bazillenkörper (Endoplasma) sich sehr leicht färbt, wird das „Ektoplasma“ nie gefärbt.

Infolge der größeren Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse, also auch gegen Farbstoffe, sowie der vom Endoplasma verschiedenen chemischen Zusammensetzung, müssen hier ganz besondere und eingreifende Methoden angewendet werden, um die Membran und die Geißeln erkennbar zu machen.

Arthur Meyer ist es gelungen, dieses äußerst zarte Zellhäutchen durch sehr verdünntes Methylenblau oder Rutheniumrot zu färben, wobei sehr kurz zu spülen, schnell zu trocknen und danach das Präparat in Wasser zu untersuchen ist. Die Membran zeigt sich dann als äußerst dünnes, rosa gefärbtes Häutchen, wie eine konturierte Linie rings um den Protoplastkörper.

Die äußere Bekleidung des Bakterienkörpers ist chemisch sehr verschieden zusammengesetzt, man bekommt den Eindruck, daß bei ein und demselben Organismus verschieden zusammengesetzte Kulturböden chemische Umwandlungen der Membran hervorrufen können,

1) Nach einem Vortrag, gehalten in dem Niederländischen Verein für Mikrobiologie am 17. Dez. 1919.

eine einheitliche Färbung also schon aus diesen chemischen Gründen einfach nicht möglich ist.

Diese Membran oder „Zellhaut“ des Bakterienkörpers ist jetzt nur ein Teil des gesamten Ektoplasmas, und die Bakterien sind meistens nicht allein von dieser zarten Hülle umgeben, die aufgefaßt werden muß als die innere Schicht einer 2. äußeren Schicht, welche von sehr gelatinöser, schleimiger Beschaffenheit ist.

Die „Gesamtmembran“ besteht demnach aus 2 ganz verschiedenen, aber innig aneinander angeschmiegteten Teilen, einer dünnen, derben, nicht wasserreichen, inneren Schicht, und einer gelatinösen, schwach lichtbrechenden, wasserreichen, aufquellenden „äußeren Schicht“, der „Schleimschicht“.

Diese „Schleimschicht“ wächst in die Dicke, quillt, wird aus der inneren Membranschicht geboren.

Schon Robert Koch hat beobachtet, daß die Bakterien im ungefärbten Präparat nie scharf konturiert sind und wenn die Zellkörper dicht beisammen liegen, sie nie genau aneinanderstoßen, sondern immer eine kleine Zone von verschiedener Breite dazwischen liegen bleibt. Diese Zone besteht aus Schleim, welcher jeden Bakterienkörper bekleidet und die Zellgebilde aneinander klebt und die mehr oder weniger schleimige Konsistenz unserer Bakterienkulturen verursacht.

Also der Teil des Bakterienkörpers, welcher immer dem quellenden, auflösenden Einfluß des Wassers ausgesetzt ist, ist jetzt bekleidet mit einer 2. sehr wasserreichen, schleimigen Schicht, welche eine Art Uebergang bildet zwischen der derben Zellmembran und der wasserreichen Umgebung und als ein Schutzmantel des Bakterienkörpers vor Einflüssen, welche von außen her das Endoplasma schädigen können, dient.

Diese Art Schleimkapsel, welche fast jeden Mikrobekörper bekleidet, weicht in der chemischen Konstitution von der eigentlichen inneren Zellmembran, woraus sie entstanden ist, ab.

Zuerst tritt dieses deutlich hervor, weil die Schleimschicht sich nicht auf dieselbe Weise färbt wie die Zellmembran; Farbstoffe, welche die Membran gut färben, lassen die „Kapsel“ gänzlich ungefärbt. Zweitens zeigt sich die Schleimschicht im ungefärbten Präparat (hängenden Tropfen) als eine unbestimmte, lichtbrechende Zone, welche jeden Bazillenkörper wie eine Art unbestimmter „Halo“ umgibt.

Da die Schleimschicht der Zellmembran gegenüber sehr wasserreich ist, wird, wenn der Zellkörper antrocknet, die Kapsel infolge des Wasserverlustes schrumpfen.

Vergleicht man einen „hängenden Tropfen“ mit einem gefärbten Trockenpräparat desselben Mikroorganismus, so ist der Unterschied zwischen der Größe des Zellkörpers ganz bedeutend, mit anderen Worten die gefärbte Bakterienzelle ist sehr viel kleiner als im feuchten Milieu. Die Zelle ist also bei gefärbten Präparaten bedeutend geschrumpft durch das Trocknen, Fixieren und die Wasserverdunstung.

Dem optisch viel kleiner erscheinenden Zellkörper ist das Schrumpfen nicht allein zuzuschreiben, sondern auch der Umstand, daß die Schleimschicht sich gar nicht mit den gewöhnlichen Anilinfarben färbt, macht, daß die Zelle kleiner erscheinen muß, weil die gelatinöse Schicht als eine ungefärbte, unsichtbare Hülle erscheint.

Mit den intensiven Methoden, womit die Geißeln allein färberisch sichtbar gemacht werden können, nämlich einer Beizung mit aufquellen-

der Tanninlösung und nachheriger Färbung, färbt diese äußere Schleimschicht sich auch, wodurch der Bazillenleib viel breiter erscheint, als bei den gewöhnlichen Färbemethoden (Babes, Zettnow, Bunge, bei verschiedenen Bakterienarten.)

Vielleicht mit einer einzigen Ausnahme kann man ruhig sagen, daß alle Bakterien eine „Schleimschicht“ besitzen, welche durch Verquellung der äußeren Membranschichten entsteht, und das Resultat ist ein biochemischer Prozeß, wodurch Proteine und Kohlenwasserstoffe aus dem Milieu herangezogen werden und durch den Bazillus zur Kapsel ausgebildet werden, während durch die Tätigkeit des Protoplasten die innersten Schichten der Membran immer erneuert werden. Bei vielen muß der Schleim aufgefaßt werden als Stoffwechselprodukt (*Leuconostoc mesenteroides* mit und ohne Zucker, *Streptococcus* usw.)

Die chemische Zusammensetzung dieser Schleimschicht ist ganz verschieden von der der Membran selbst; hauptsächlich sind Kohlehydrate die Baustoffe, nämlich Dextran, Lävulan, Glykoside, Galaktose, Arabinose, Gummiarten, auch Muzin (*Bac. gliscrogenium*) und Zellulose (*Essigsäurebazillus*, wo der Schleim sich mit Jodlösung schön blau färbt).

Die Dicke der Schleimschicht kann sehr verschieden sein und auch bei demselben Organismus sehr schwanken; sie ist absolut abhängig von dem Alter der Kultur und der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens.

Nur wenn die Zelle von einer scharf umschriebenen Gallerthülle umgeben ist, spricht man von „Kapsel“. Der *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc*, *Lactococcus dextranicus* Smit) gibt ein schönes Beispiel von diesen 2 Extremen, d. h. eine bedeutend breite, große Kapsel — oder gar keine Kapsel.

Wächst der *Leuconostoc* in Gegenwart von Zucker, so bildet er eine Schleimkapsel, welche ca. 10 bis 20mal die Breite des Bazillenkörpers erreichen kann; es wird so sehr viel Schleim gebildet, daß er in der Umgebung des Bazillenleibes austritt, und ze quillt und auf diese Weise die sogenannte Schleiminseln, Zoogloën, bildet (große Schleimbrocken), worin verschiedene Bazillenkörper eingebettet liegen und nicht mehr jede Bakterienzelle ihre eigene Kapsel hat.

Nimmt man den Zucker aus den Nährböden fort und züchtet den *Leuconostoc* auf gewöhnlichem Agar, so zeigt sich bei dieser Kultur keine Spur von Kapsel oder Schleim; man sieht die nackten Streptobazillen wie eine Kette hintereinander liegen, ohne eine Spur irgendeiner Schleimhülle. Nimmt man statt Rohrzucker Laktose oder Maltose, so tritt unter keiner Bedingung eine Schleimbildung ein.

Ward sah beim *Bac. vermiformis* nur eine Kapsel auftreten auf sauren, zuckerhaltigen Nährböden, nicht aber auf neutralen zuckerfreien.

Streptokokkenarten bilden, wie Zettnow beschrieb, schöne Kapseln auf Saccharosegelatine, nicht aber auf Dextrosegelatine.

Hlava gelang es bei einem gewöhnlichen „nackten“ *Streptococcus* eine deutliche Kapsel hervorzubringen, wenn den Nährböden ca. 18 Proz. Zucker hinzugefügt wurde.

Im Gärungsbetriebe gibt es auch eine ungeheuere Menge Mikroorganismen, echte „Schleimbildner“, welche zuckerreiche Flüssigkeiten, wie Wein-, Bier (*Micrococcus viscosus*), Milch, Pflanzeninfuse,

Brot ganz verschleimen und den Betrieb sehr schädigen können und die in üblem Rufe stehenden „Schleimgärungen“ hervorbringen.

Eine derartige Verschleimung kommt auch im Harn vor. *Malherba* und *Sanna Salaris* zeigten, daß *Bac. gliscrogenium* imstande ist, Harn ganz zu verschleimen. Ich selbst habe eine Verschleimung auch einmal im Harn beobachtet; die ursprünglich dünne Flüssigkeit war in eine ganz steife, derbe Masse verwandelt worden.

Dieser Gruppe gegenüber, wo unter bestimmten Verhältnissen eine schöne „Kapsel“ um den Zellkörper herum sich zeigen kann, steht eine Gruppe von Mikroorganismen (Diphtheriebazillen, Vibrionen, einige Kokkenarten), welche unter keiner Bedingung imstande sind, deutliche Kapseln zu produzieren, wo die meist differenten Nährböden nicht imstande sind, eine Schleimhülle auszulösen, nicht so viel Schleim gebildet wird, daß man von einer „Kapsel“ reden darf, die Bakterien also völlig „kapsellos“ sind.

Zwischen diesen beiden Extremen, nämlich denjenigen Organismen, welche imstande sind, schöne, deutliche „Kapseln“ zu bilden, und denjenigen, welche „kapsellos“ sind, steht eine große Gruppe von Mikroorganismen, welche dann und wann imstande sind, „Kapseln“ zu bilden, die aber sehr verschieden in Größe und Breite sind, und stark unter dem Einfluß von chemisch-physikalischen Reizen des Nährbodens, Alter der Kultur und Temperatur stehen.

Weiter gibt es noch eine Gruppe von (pathogenen) Bakterien, welche von den medizinischen Bakteriologen den Namen „Kapselbakterien“ bekommen haben, wegen ihrer breiten Schleimkapsel, welche sich im tierischen Körper am schönsten bildet (*Bac. anthracis*, *Pneumococcus*, *Bac. pneumoniae* Friedländer, *Micrococcus tetragenus septicus*, *Bac. lactis aërogenes*, *Bac. Morax Axenfeld*, *Streptococcus capsulatus*, Bazillus des Rhinoskleroms und Ozaena-Gruppe). Diese Gruppe hebe ich deswegen hervor, weil die Mediziner über das Entstehen der Bakterienkapsel wichtige Theorien aufgestellt haben.

Es gibt eben bei dieser „pathogenen Gruppe“ solche, welche ganz besonders im Tierkörper, wo sie umgeben sind von den tierischen eiweißreichen Flüssigkeiten, eine Schleimkapsel bilden. Ein schönes Beispiel dieser letzten Möglichkeit ist der *Bac. anthracis*.

Babes-Heim usw. glauben jetzt, daß diese Kapselbildung im infizierten Körper aufgefaßt werden muß als eine Reaktion des Zellkörpers gegen die Antikörper, welche einen bakterienfeindlichen Reiz auf die Zelle, vielmehr noch auf die Zellhüllen, ausüben, und versuchen, die Zelle zu vernichten. Auf diese Reizwirkung reagiert die Bakterienzelle nicht allein mit Verdickung ihres Ektoplasmas durch die Schleimhülle, sondern auch mit der Steigerung der Virulenz und erhöhter Resistenz gegen bakterizides Serum, wodurch die sogenannte „Serumfestigkeit“ entsteht.

Sauerbeck hat diesen physiologischen Prozeß „Bakterienimmunität durch strukturelle Anpassung“ genannt.

Man hat solche Bazillen auch wohl „animalisierte“ oder „tierische Bazillen“ genannt, und gezeigt, daß dieser Prozeß nicht allein an die lebenden, tierischen Flüssigkeiten (im infizierten Körper) gebunden ist, sondern auch in „vitro“ zu erreichen ist.

Daß die Sache nicht so einfach ist, wie diese Forscher glauben, haben Bail und Eisenberg beweisen können; denn wurde das spezi-

fische Milzbrandserum durch Erhitzung seiner spezifischen bakteriziden Eigenschaften beraubt, so folgte ebensogut Kapselbildung des betreffenden Bakteriums.

Ueber die biologischen und physiologischen Leistungen der Kapsel sind viele Theorien aufgestellt worden, von denen die Theorie von Babes und Heim mir aber die bedenklichste zu sein scheint. Ich meinerseits glaube, daß man hinter diese Hypothese unbedingt ein Fragezeichen stellen muß.

Bei verschiedenen Organismen, worunter auch pathogene (*Bac. pneumoniae*, *Bac. lactis aërogenes*, *Bac. subtilis*) habe ich wunderschöne Kapselbildung auf gewöhnlichem Nähragar beobachtet.

Hier kann man doch kaum einen ungünstigen Reiz des Nährbodens annehmen, wenn man demselben Gedanken folgt, wie beim kranken Tierkörper, welcher die Zellmembran zur Aufquellung und Verschleimung ansetzt.

Werden dieselben Organismen auf einen Eiweißzuckernährboden, z. B. Ascitesagar, geimpft, so ist die Kapsel noch viel schöner ausgeprägt, was sehr begreiflich ist, denn die Konsistenz der Kultur ist auch unendlich voluminöser und schleimiger.

Kruse behauptet, daß da, wo Kapselbildung auftritt auf erwärmtem, also nicht spezifischem Serum, es vielleicht noch möglich wäre, daß doch noch Stoffe vorhanden sind, welche als Abkömmlinge der Schutzstoffe aufzufassen sind, welche noch diesen Kapselbildung anregenden Reiz auf das Zellektoplasma ausüben.

Ich glaube aber vielmehr, daß die Kapselbildung eine Aeüßerung der höchsten physiologischen Leistungen der Zelle ist, daß in unserem Falle des Ascitesnährbodens die Ernährungs- und anderen physiologischen Ansprüche so günstige sind, daß die Zelle darauf mit „völligem Wohlbefinden“ reagiert, nämlich sehr üppigem Wachstum, und woselbst der umhüllende Schleim sich auch viel besser entwickelt. Statt einen ungünstigen, glaube ich hier vielmehr einen günstigen Reiz annehmen zu müssen. Wenn Bail vom Milzbrandbazillus behauptet, daß normale Milzbrandstäbchen auf gewöhnlichem Serum schon Kapseln bilden können, abgeschwächte Anthraxbazillen den Tierkörper brauchen, um eine derartige Hülle zu bilden, glaube ich, dies auch allein einem erhöhten physiologischen Reiz zuschreiben zu müssen, den das Serum resp. der Tierkörper ausgeübt, nicht aber einer Art Abwehr, denn bei einer ungünstigen Temperatur gezüchtete Anthraxbazillen haben die Fähigkeit verloren, auch im physiologischen Milieu Kapseln zu bilden. Hand in Hand mit diesem Unvermögen geht auch die Abschwächung der Virulenz, also eine zweite physiologische Funktion, welche durch die erhöhte Temperatur gelitten hat. Bail hat weiter gezeigt, daß die kapsellosen Arten konstant kapsellose und avirulente Nachkommen erzeugten, welche auf keine Weise wieder zur Kapselbildung gereizt werden konnten.

So hat Buerger schöne, ausgeprägte Kapseln darstellen können an Pneumokokken, wenn er sie auf Glykoseserumagar züchtete, wo selbstverständlich das Wachstum viel üppiger, auch viel schleimiger war. Ich selbst habe keine Kapseln an Pneumoniekokken nachweisen können in einer gewöhnlichen Agarkultur. Wurde diese aber auf Ascitesagar (bei 80° C erstarrt) übergeimpft, so waren schon nach 24 Std. schöne, deutliche Kapseln da und die Kolonien waren auch schleimiger und üppiger. Dieser eiweißreiche Nährboden hat also in jeder Beziehung die Zelle im günstigen Sinne gereizt (Tab. V).

Bekannt genug ist es, daß eine Pneumokokkenkultur auf Nähragar schnell abstirbt, auf eiweißreichem Nährboden (Ascitesserum) aber die Kultur viel länger am Leben bleiben kann; die größeren physiologischen Leistungen haben also auch eine Resistenzhöhung zur Folge, wenn die Mikroorganismen im „besten Wohlbefinden“ sind. Gordon hat so die große Merkwürdigkeit beobachtet, daß Pneumokokken, auf Gelatine geimpft und bei 37° C bebrütet, starke Kulturen mit ausgeprägter Kapselbildung geben.

Die Kapselbildung ist also meiner Meinung nach nicht das Resultat einer ungünstigen Reizwirkung, sondern vielmehr eines günstigen funktionsanregenden Reizes und wird gebildet durch zarte, noch gänzlich unbekannt Diffusionsvorgänge zwischen Ektoplasma der Zelle und der Nährböden, die chemisch-physikalische Reize auslösen, worauf die Zelle mit Bildung einer Schleimhülle reagiert.

Ueber diese Vorgänge weiß man eigentlich noch nichts Bestimmtes, nur ist es Tatsache, daß der Nährboden einen besonders mächtigen Einfluß ausübt auf die Entstehung dieser äußeren Hülle. Ich will damit nicht sagen, daß die Schleimhülle, wenn sie der Bakterienleib einmal umhüllt, nicht aufgefaßt werden soll als eine „Schutzhülle“, als ein Schutz für die Zelle selbst, worüber sehr viel zu sagen ist.

Viele Resistenzprüfungen sind in dieser Hinsicht unternommen worden und haben gezeigt, daß die kapseltragenden Bazillen resistenter sind als die „nackten“ Zellen derselben Bakterienart.

So haben Liesenberg und Zopf gezeigt, daß *Leuconostoc mesenteroides* mit Kapsel eine höhere Temperatur (87—88° C) länger erträgt als kapsellose Zellen. Burri hat dasselbe für Milchsäurebakterien feststellen können. Auch können kapseltragende Zellen besser Austrocknung ertragen (Liesenberg und Zopf) als kapsellose, und für pathogene Arten hat Danysz die größere Widerstandsfähigkeit bei gekapselten Milzbrandbazillen gezeigt gegen Alexine und Arsenik.

Preis hat weiter feststellen können, daß der bekapselte Milzbrandbazillus nach 15 Min. in 0,2-proz. Karbolsäure noch lebt, während der kapsellose in 10 Sek. schon zugrunde ging, ebenso mit 1-proz. Essigsäure bekapselte Keime in 8 Min., kapsellose Keime in 4 Min. tot waren.

Auch die Verhältnisse im Vogelblut, das durch die erhöhte Temperatur vernichtend auf die Anthraxbazillen wirkt, erlitten eine Aenderung. Bekapselte Anthraxbazillen blieben im Huhn mehr als 4 Tage, in der Taube mehr als 2 Tage länger am Leben als die kapsellosen Formen.

Preis hat überhaupt in seiner klassischen Abhandlung über die Kapselbildung der Milzbrandbazillen viel Wichtiges zutage gefördert.

Einiges davon möchte ich hier erwähnen: Bei jeder Milzbrandinfektion entbrennt ein Kampf zwischen den Körpersäften einerseits und den Anthraxbazillen andererseits. Die pathogenen Eigenschaften des Bazillus gehen Hand in Hand mit der Bildung einer Kapsel; ist die Kapsel sehr derb, so ist die Virulenz sehr groß, ist sie weich und zart, so ist die Virulenz nur mäßig; natürlich gibt es unzählige Uebergänge.

Die Bildung der Kapsel wird unmittelbar beeinflusst durch den Gehalt an Milzbrand-Antistoff (anthrakoziden Stoffen) des infizierten Blutes. Sind die anthrakoziden Stoffe in großer Menge vorhanden, so werden sie die Milzbrandbazillen abtöten, bevor sie imstande sind, Kapseln zu bilden, was der Fall sein wird im unempfindlichen (refraktären) und immunen Tiere (Ratten, Vögel, Frösche). Im empfind-

lichen Tiere (Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse, Igel) sind die Antistoffe so wenig energisch, daß keine oder nur ein Teil der Bazillen abgetötet werden; der resistenter Teil hat Zeit genug gehabt, sich mit einer Kapsel zu bekleiden und ist jetzt von außerordentlicher Resistenz und Virulenz geworden.

Diese kapseltragenden Bazillen haben auch wieder kapseltragende Nachkommen. Wenn diese Bazillen ihren Entwicklungshöhepunkt erreicht haben, so tritt der Rückgang ein; die Zellen degenerieren, die Kapsel löst sich vom Körper ab, das Protoplasma wird körnig usw. Die Kapselsubstanz gelangt jetzt in die Körpersäfte und wirkt lähmend auf die anthrakoziden Stoffe im Blute; die Bilanz schlägt immer mehr zur Bazillengiftigkeit über, weil die feindlichen Stoffe immer mehr vernichtet werden. Dies gibt das foudroyante Bild am Ende der Infektion, wo die Bazillen Blut und Organe vollständig überschwemmen und auf diese Weise das Tier schnell zugrunde gerichtet wird, weil die anthrakoziden Stoffe durch das Anthrakomuzin (Kapselschleim) völlig vernichtet sind.

Es bedarf keiner weiteren Erläuterung, daß bei dem Zustandekommen einer Milzbrandinfektion unzählige Faktoren von seiten der Körpersäfte (milzbrandfeindliche Kräfte) und des Bazillenleibes (Kapselbildungsenergie) stetig aufeinander einwirken. Besteht ein vollständiges Gleichgewicht, so tritt keine Infektion ein, eine kleine Abschwächung eines dieser Faktoren aber ändert sofort die ganze Situation.

Der große Unterschied zwischen virulenten und avirulenten Bazillen im Tierkörper besteht also darin, daß beide zugrunde gehen, und zwar die avirulenten sehr schnell, wenn sie in die Tiersäfte gelangen (das Tier bleibt am Leben), während die virulenten erst eine Kapsel bilden und sich dadurch vor den feindlichen Stoffen schützen, daher immer resistenter werden und giftigere, kapseltragende Nachkommen bekommen, bis sie endlich auch zugrunde gehen (das Tier ist inzwischen an der Infektion gestorben).

Merkwürdig ist es, daß das Anthrakomuzin gar nicht spezifisch ist und Kapselschleim von anderen kapseltragenden Bazillen ebenso lähmend auf die anthrakoziden Stoffe wirkt.

Diese schönen Versuche beweisen also, daß die anthrakoziden Stoffe die Kapsel nicht auslösen, sondern X-Stoffe, welche ich „X-Kapselstoffe“ nennen möchte. Sind die Antistoffe so kräftig, daß die Bakterienzellen gehemmt oder getötet werden, so haben diese X-Kapselstoffe keinen Einfluß, da der Kapselreiz ausbleibt.

Die Kapselerzeugung hängt ab von der Zeit, welche vergeht zwischen Infektion und Beeinflussung von seiten der Antistoffe. Ist die Zeit so lang, daß die Bazillen auf den X-Reiz reagieren können und Kapseln bilden, so folgt die tödliche Infektion. Auch ist es möglich, daß die anthrakoziden Stoffe so kräftig sind, daß sie auch bekapselte Individuen bekämpfen können.

Sehr wichtig ist auch, was Preisz gezeigt hat, daß nur das Blut (Blutserum) den kapselerzeugenden Reiz besitzt, nicht aber die sämtlichen entbluteten Organe (Stiennon).

Diese X-Kapselstoffe sind in jedem Blutserum anwesend, ebenso gut von empfänglichen als refraktären Tieren, wie die Kulturen auf erstarrten Blutseris von verschiedensten Tieren bewiesen haben, worauf der Anthraxbazillus zu wachsen vermag. Auch auf anthrakoziden Seris, wo noch Wachstum stattfindet, werden noch Kapseln gebildet. Die Breite

derselben kann aber unter diesen Umständen sehr schwanken. Im Serum von Mensch, Kalb und Hund wurden 1—3 breite Kapseln gebildet (unter 1—3 breiten Kapseln ist zu verstehen, daß die Kapsel 1—3mal die Breite des Bazillenleibes ausmacht).

Im Serum von Vögeln (Henne, Ente, Gans) werden $\frac{1}{2}$ —1-breite Kapseln gebildet; auf keinem Serum fehlt aber die Kapsel ganz.

Gruber und Futaki schreiben denn auch von diesen X-Kapselstoffen: „Die Kapselbildung erfolgt in den tierischen Säften unter Verbrauch eines bestimmten, in ihnen enthaltenen Stoffes“. Rotky hat gezeigt, daß dieser reizende Stoff kein Eiweißkörper und auch kein Kohlehydrat ist, denn wurde Serum gegen Aqua destillata dialysiert, so bildeten Anthraxbazillen in dieser vollkommenen eiweißfreien Lösung Kapseln. Wurde jetzt das ausgefallene Eiweiß mit Kochsalz gelöst, darauf Milzbrandbazillen geimpft, so wurden keine Kapseln gebildet. Zusatz von Glykose reizte nicht zur Kapselbildung. Der X-Kapselstoff ist hitzebeständig und kann 25 Min. lang 100° C ertragen. Auf erschöpftem Serum (worauf die Anthraxbazillen schon einmal tüchtig gewachsen waren) regte Glykose zur Kapselbildung an (Ciani, Ottolenghi).

Die Untersuchungen von Preisz haben deutlich gezeigt, daß die Theorien von Pane, Bail, Fiscoeder usw., welche die Kapselbildung als einen degenerativen, krankhaften Prozeß der Anthraxbazillen auffassen, als eine Begleiterscheinung, aber nicht als die Ursache der Resistenz der „Kapselbazillen“ gegen die Phagozyten und anthrakozide Stoffe, falsch ist.

Freilich dürfen wir annehmen, daß die Kapsel des Bazillenkörpers einen Schutz verleiht, der aber individuell sehr verschieden sein kann. Benecke behauptete kürzlich auch, daß der Schleim noch einen mechanischen Wert haben kann, weil er die Zellindividuen mechanisch zusammenhält (Verklebung, zu Kahmhäuten verbundene Bakterien).

Preiz ist auch bei den Anthraxbazillen der Ansicht, wo die bekapselten Bazillen nicht von den Leukozyten aufgenommen werden, also aphagozytabel sind, daß die Ursache hier eine mechanische ist.

Paltauf, Porges, Streit, Beham, Toenniessen, Fitzgerald haben gezeigt, welchen großen Widerstand die Kapsel der Bakterien gegen Agglutinine leistet; nur die kapselfreien Kulturen, welche durch chemische Auflösung der Kapsel oder durch bestimmte Kulturverfahren ihre Kapsel verloren haben, waren sofort gut agglutinabel.

Gewannen diese Stämme ihre Kapsel wieder zurück, so hörte die einmal so deutliche Agglutination völlig auf.

Toenniessen hat bei einer Friedländerschen Pneumoniebazillenkultur 3 konstante Varianten züchten können:

der Typus	{ Zellen mit deutlicher Schleimhülle
die Fluktuante	{ Zellen ohne Schleimhülle, nur mit dickem Ektoplasma
die Mutante	{ Zellen ohne Schleimhülle und mit sehr dünnem Ektoplasma.

Der „Typus“ ließ sich nie agglutinieren wegen der Schleimhülle, die „Fluktuante“ war im geringen Maße agglutinierbar, während die „Mutante“ sich unter allen Umständen und von allen spezifischen Sera sehr leicht agglutinieren ließ.

Diesen Schleim, diese Kapsel färberisch darzustellen, ist die Aufgabe vieler Bakteriologen gewesen. Die chemische Konstitution der Gallerthüllen kann individuell sehr verschieden sein, und mit diesen chemischen Differenzen geht natürlich auch die verschiedene Affinität zu Farbstoffen Hand in Hand. Ich glaube deswegen, annehmen zu müssen, daß es darum gerade wegen der vielen chemischen Differenzen so viele Kapselfärbungen geben muß.

Der Schleim hat auch gegenüber Anilinfarbstoffen große Resistenz, der Farbstoff muß also auch in besonderer Weise in die Gallerthülle hineingepreßt werden, und um das zu erzielen, werden folgende Haupteingriffe bei diesen Färbungen vorgenommen:

1) Energisches Fixieren des Bakterienausstrichs mittels Säuren, meistens Osmiumsäure.

2) Färbung mit basischen Anilinfarben, unter tüchtiger Erwärmung (Aufkochen) oder der Farbstoff wird kochend heiß auf das Präparat gegossen. Durch Kalilauge wird die Kapsel auch wohl erst noch zur Aufquellung gebracht (Noetzel).

Muir's schickt erst noch eine „Beizung“ im Sinne der Geißelfärbung voraus, also mit Tanninlösung und Kaliumalaun, wonach erst die Färbung unter Erwärmung folgt.

Die Differenzierung, damit Kapsel und Endoplasma eine andere Farbe bekommen, wird mittels Säuren erreicht.

Eine Kontrastfärbung bringt danach das Endoplasma in einer anderen Farbe zutage, umgeben von einer different gefärbten Gallerthülle.

Es muß zugegeben werden, wenn man alle diese Kapseldarstellungsmethoden einer kritischen Beurteilung unterwirft, daß sie wohl sehr roh sind und die dünne Kapsel sehr wenig schonen.

Die Kapsel ist, wie schon erwähnt, ein äußerst zartes Gebilde, sehr wasserreich, also sehr schrumpfungsfähig, weshalb es klar ist, daß die energischen Eingriffe bei diesen Färbungen sehr wohl Veranlassung geben können zu starker Schrumpfung und Aenderungen.

Bei der Zartheit der Kapsel, die sehr kontraktile ist, ist es fraglich, können wohl die auseinandergelassenen Resultate der verschiedenen Forscher dem rohen Kochen und Fixieren zugeschrieben werden, weil dadurch ganz besondere Verhältnisse geschaffen werden, die so sehr von den natürlichen Verhältnissen abweichen.

Immer ist man in Furcht, sogenannte Pseudo- oder Schleimkapseln zutage zu bringen, weil gerade durch die Erhitzung die Möglichkeit gegeben ist, daß Eiweißkörper, welche immer in jeder Kultur anwesend sind, sich niederschlagen und sich so täuschend dem Zellkörper anschmiegen können, weil sie eher trocknen wie der Bazillenleib, so daß auf diese Weise die leere Lücke erscheint, welche durch die Retraktion des Zellkörpers entsteht. Man kann dann leicht an eine „wirkliche“ Kapsel denken.

Alfred Fischer geht sogar so weit, anzunehmen, jede Kapsel, auch die des Milzbrandbazillus im Tierkörper, sei als eine derartige Eiweißbildung aufzufassen, und Boni hat mit seiner Methode, wobei er als Ausstrichflüssigkeit eine Mischung von Hühnereiweiß, Glycerin und Formalin benutzt, in der Flamme tüchtig fixiert (weiße Dämpfe) und danach färbt, bei fast allen Mikroorganismen im künstlichen Nährboden Kapseln darstellen können.

Hamm hat später gezeigt, daß die Kapsel nach Boni als echtes, typisches Eiweißartefakt aufzufassen ist. Ich hebe dies hervor, um den

Eindruck zu verstärken, wie außerordentlich täuschend diese Eiweißbildungen sich anschmiegen können, und mehr und mehr habe ich den Eindruck bekommen, daß man bei der Darstellung eines so äußerst zarten Gebildes, wie es die Kapsel ist, absehen muß von den energischen, rohen Fixierungs- und Färbemethoden bei so starker Erhitzung.

Weil es unmöglich ist, die Kapsel auf andere Weise gefärbt darzustellen, dank der Resistenz Farbstoffen gegenüber, wäre es besser, die Zellkörper und ganze Umgebung vorsichtig zu tingieren, die Kapsel also auszusparen.

Die Methode von Gins steht diesem „Ausparungsprinzip“ am nächsten; da hierbei fast alle Bakterienarten im künstlichen Nährboden Kapseln bildeten, hatte ich den Eindruck, daß die Kapsel vielleicht durch Schrumpfungen der Bazillenleiber, vielleicht auch der Tusche, entstanden ist.

Die neue, völlig unspezifische Methode, welche ich Ihnen hier schildern will, ist deswegen eine schonende zu nennen, da sie den Zelleib am wenigsten zerstört, weil die eigentliche Färbung in einer Flüssigkeit vorgenommen wird und von keiner energischen Fixierung oder Trocknung die Rede ist.

Zur Ausführung dieser einfachen Methode braucht man folgende Reagentien:

Protargollösung in Aqua dest. (Argentum proteinicum. Im Dunkeln aufzuwahren)	1:200
wässrige Eosinlösung (Eosin gelb, Grübler)	1:50
Carbon. Natic.	20 Proz.

Bei der Herstellung der Protargollösung schüttelt man das Pulver auf die benötigte Quantität kalten, destillierten Wassers, danach wird ein wenig geschüttelt und, wenn das Protargol sich völlig gelöst hat, die Lösung filtriert.

Auf diese Weise löst sich das Pulver viel besser, als wenn das Wasser auf das Pulver gegossen wird. Die Lösung muß immer neu hergestellt werden, denn Protargol dissoziiert sehr leicht und ist danach unbrauchbar. Aufbewahrung in dunkler Flasche nützt dabei nicht.

Als eigentlichen Farbstoff nehme man Eosin gelb (Grübler), nicht Rot (weil letzteres für diesen Zweck nicht dieselbe färbende Kraft hat wie Eosin gelb). Bei 1 ccm von der Eosinlösung 1:50 wird 1 Tropfen (aus 1 ccm-Pipette) 20 Proz. Na_2CO_3 hinzugefügt.

Färbung:

Die eigentliche Färbung geschieht nun in folgender Weise:

- 1) In ein kleines Reagenzrohr (Agglutinationsröhre) bringt man 5 Propfen der Protargollösung 1:200 (mittels Pipette).
- 2) In dieser Flüssigkeit zerreibt man ein wenig von der frischen, zu untersuchenden Bakterienkultur.
- 3) Hinzu kommt ebensoviel, also auch 5 Tropfen, von der alkalischen Eosinlösung.
- 4) Gut mischen und 10 bis 20 Min. ruhig stehen lassen.
- 5) Mit einer Oese wird jetzt vorsichtig von der Flüssigkeit auf ein reines Objektglas gleichmäßig dünn ausgestrichen.

- 6) An der Luft trocknen lassen (ohne jede Erwärmung).
- 7) Mit Zedernöl sofort mikroskopisch beobachten.

Resultate:

Wenn die untersuchte Bakterienzelle eine Kapsel hat, so zeigt sich in einem derartig hergestellten Präparat folgendes:

Die Zelle ist schwach rötlich gefärbt, umgeben von einer weißen Zone, welche rings um dem Bazillenleib verläuft; welche Zone durch einen scharfen, roten Rand abkonturiert wird von dem homogenen rötlich gefärbten Untergrunde (Fig. 1, 3, 5).

Ist keine Kapsel vorhanden, so gibt es keine weiße Zone; der rote Rand schmiegt sich sofort direkt dem Zellenrande an (Fig. 2, 4, 6).

Das neu angefertigte Präparat muß sofort mikroskopisch untersucht werden, denn durch das Liegen geht es zurück, und das Bild wird verwischt, und es können plasmolytische Vorgänge nach einiger Zeit entstehen, welche sehr täuschend wirken können.

Es ist auch abzuraten, mehr als 1 Präparat zugleich anzufertigen, da man immer wieder aus derselben Flüssigkeit nach einigen Minuten wieder schnell ein Präparat herstellen kann. Bei Anthraxtieren wird einfach etwas Blut oder etwas von den Organen gut in Protargol verrieben. Mit Pneumoniesputum kann man ebenso verfahren; ist der Sputum zu schleimig und zäh, um es zu verreiben, so kann man es vorher in einer Flasche mit etwas Wasser sehr tüchtig schütteln, bis alles zerkleinert und fein ist. Dann kann man noch zentrifugieren und das Zentrifugat in Protargol verreiben.

Es wird im Anfang merkwürdig erscheinen, daß Bakterien sich überhaupt mit Eosin, einem sauren Farbstoff, färben lassen.

Die Färbung war im Anfang auch wenig intensiv; mir fiel besonders auf, daß die Färbung so wenig gleichmäßig erschien, indem einige Zellen sich außerordentlich gut, andere dagegen sehr wenig intensiv färbten, weswegen ich die färbende Kraft auf irgendeine Weise zu verstärken suchte. Zu meinem Erstaunen leistete ein Tropfen 20-proz. Natriumkarbonat Wunder. Die meisten Bakterien färben sich mit alkalisiertem Eosin gut, wie die Photogramme deutlich zeigen.

Die sich weniger gut färbenden Zellen sehen weißlich-rosa aus; eine längere Färbung gibt in diesen Fällen öfters ein besseres Bild. Man kann nie voraussagen, wie lange man zu färben hat; jede Kultur wird individuell zu behandeln sein. Meiner Erfahrung nach liegt die Grenze zwischen 10—20 Min.

Bei den nicht Kapseln tragenden Bakterien wirkt der rote Rand so stark konturierend, daß, wenn die Färbung der Zelle auch nicht intensiv ist, die Form doch sehr deutlich zu unterscheiden ist (Fig. 4, 6).

Dieser rote Rand entspricht bei den nicht Kapseln tragenden Zellen vielleicht der Zellhülle (Zellmembran), weil sie so genau die Kontur der Zelle zeigt. Bei den nicht Kapseln tragenden Staphylokokken ist diese Konturlinie besonders stark ausgesprochen (Fig. 6). Dies würde übereinstimmen mit dem Befunde von Nakanishi, welcher bei Staphylokokken eine sehr kräftig entwickelte Zellmembran beschreibt.

Merkwürdig ist es, wenn eine Kapsel da ist, daß dieser rote Rand zurückgedrängt wird und den Eindruck einer „Kapselmembran“ macht (Fig. 1, 3, 5).

Buenger hat mit seiner Kapseldarstellungsmethode auch diesen

scharfen, dicken Rand beobachtet und nennt ihn „Grenzmembran“ oder „Kapselmembran“.

Dieser äußerste, scharf gefärbte Rand der Kapsel deutet jedenfalls auf eine andere chemische Zusammensetzung der äußersten Kapselschichten der eigentlichen Kapsel gegenüber, die sich gar nicht in der vorgeschriebenen Zeit mit Eosin färben läßt.

Man könnte denken, daß sich um diese äußersten Schichten der Kapsel, resp. des Zelleibes, das Protargol in einer dickeren Schicht legt, weil diese Flüssigkeit nicht in die Kapsel, resp. Zelleib eindringen kann, also einen Widerstand findet. Wird aber das Protargol aus der Probe entfernt, so zeigt sich dieser scharfe Rand ebensogut; das Protargol ist also nicht daran schuld. Ramsdon und Robertson haben gezeigt, daß die Oberfläche jeder Proteinlösung aus derberen und klebrigeren Schichten besteht, eine Art Kondensation stattfindet. Vielleicht ist der scharf gefärbte Rand bei dieser Kapselfärbung auch einer Kondensation des Kapselstoffes nach der Peripherie hin zuzuschreiben.

Die äußersten Zellschichten der nicht kapselnden Organismen färben sich also mit Eosin sehr stark, ebenso die äußersten Schichten der Kapsel.

Daß die Zellschicht (Zellmembran!) bei den kapselbildenden Bakterien sich nicht besonders tief färbt, also den scharfen Randkontur nicht zeigt (was sie ohne Kapsel wohl tun), ist wohl der Schleimhülle zuzuschreiben, welche wahrscheinlich die äußerste Zellschicht mikrochemisch geändert hat, weshalb eine starke Eosinaufnahme nicht stattfinden kann.

Das Protargol, das den ganzen Grund des Präparates ausmacht, färbt sich sehr schön mit Eosin, nämlich homogen, weich rosa.

Man könnte vielleicht denken, daß die gute Eosinfärbung der Bakterienzelle zugeschrieben werden muß, weil das Protargol den Zelleib imprägniert. Die Rosafärbung würde sich durch die große Affinität des Eosin zum Protargol erklären, woraus folgen würde, daß die Zelle der Protoplasten nicht imstande wäre, Eosin aufzunehmen, das jedoch das Protargol, welches überall in den Zelleib eingedrungen ist, die Eosinfärbung veranlaßt. Dadurch würde das Rätsel gelöst sein, daß Bakterien sich mit einem sauren Anilinfarbstoff färben lassen.

Folgende Probe wurde unternommen:

Die Bakteriensuspension wurde, statt in Protargol-Eosin, nur in Eosin (alkalisch) angestellt, das Eosin also mit ebensoviel Aqua dest. verdünnt, als der Menge Protargol entsprach, um die richtige Konzentration des Eosins zu haben.

Mikroskopisch ergab sich genau dasselbe Bild, also intensiv rötlich gefärbte Bakterien (Milzbrand); nur war der Hintergrund nicht homogen gefärbt und hier und da sah man rosa Fetzen.

Das bewies, daß nicht das Protargol, sondern ganz bestimmt die Zelle selbst sich mit Eosin färbte.

Also ist das Gesetz, die überall in den Lehrbüchern sich findende Angabe, daß Bakterien sich nur mit basischen Anilinfarbstoffen färben, nie aber die Zellkerne, nicht zu wörtlich aufzufassen, da es Ausnahmen gibt.

Das Ideal wäre wohl eine Kontrastfärbung gewesen, wobei der Bazillenkörper anders gefärbt würde als die Umgebung.

Alle meine diesbezüglichen Versuche waren aber vergeblich. Protargol läßt sich nur mit Eosin färben, aber keinem anderen Farbstoff.

Basisch oder sauer gaben dasselbe Resultat; das Protargol wurde einfach gar nicht gefärbt.

Ich versuchte eine Mischung von Eosin und Methylenblau, Eosin mit Gentianaviolett, Eosin mit Giemsa-Lösung, Eosin mit Vesuvin und Eosin mit Methylviolett, in der Hoffnung, daß der Zellkörper sich mit den basischen Komponenten färben und das Protargol den sauren Farbstoff an sich ziehen würde, aber umsonst. Die Zelle färbte sich zwar richtig mit dem basischen Farbstoff, das Protargol aber blieb völlig ungefärbt und die Kapsel zeigte sich gar nicht.

Mit Rücksicht auf das gute Resultat mit alkalischem Eosin machte ich keine weiteren Versuche mehr, eine Doppelfärbung zu erzielen.

Verschiedene Konzentrationen von Protargol 1:100, 1:50 etc. wurden versucht, auch verschiedene stärkere Eosinlösungen 1:10 etc., mehr Alkali; die Resultate waren gar nicht besser, im Gegenteil waren die ersten Mischungen immer die besten, weil die stärkeren Lösungen Zellkörper und Protargol zu stark angriffen und zerstörten. Ich betrachte also die oben angegebenen Lösungen absolut als die besten.

Auch wurde noch versucht, unter Erhitzung zu färben, im Brutschrank bei 37° C 15 Min., bei 80° C im Wasserbade. Die Bazillen färbten sich zwar besser und intensiver, die Kapsel aber sah geschrumpft und zerstört aus. Wurde unter Hitze energisch gefärbt, so fing die Kapsel an, schnell rosa zu werden, was also der beste Beweis ist, daß es nicht eine Lücke ist, welche durch gegenseitige Schrumpfung von Zelle einerseits und Protargol andererseits entstanden ist, die sogenannten „Pseudokapseln“.

Immer kam ich nach allen diesen Versuchen wieder auf die erste Methode als die beste zurück.

Nach dieser einfachen Methode wurde jetzt eine große Anzahl von Reinkulturen auf Kapseln geprüft. Ich wählte absichtlich meine Proben aus den verschiedenen Bakteriengruppen, sowohl gramnegativen als grampositiven Bazillen, um die Kritik so groß wie möglich zu machen und experimentierte mit folgenden Gruppen:

Coli-Typhusgruppe, Dysenteriegruppe, Vibrionengruppe, Diphtheriegruppe, sporentragende Gruppe, Kokkengruppe, kapseltragende Gruppe (Kapselbazillen).

Als Kontrolle für diese Kapselfärbung wurde die Methode von John e benutzt, welche beinahe die gleichen Resultate gab, aber viel schwieriger zu beurteilen ist. Es gab Präparate, wo man kaum mit Sicherheit sagen konnte, was man vor sich hatte.

Tabelle I.
Typhus-Coli-Gruppe.

24 Std. alte Agarkultur 37° C.				
	Kapsel			Kapsel
Typhus 1	((+))	Typhus 8		((+))
„ 2	((+))	„ 9		—
„ 3	—	„ 10		—
„ 4	((+))	„ 11		((+))
„ 5	((+))	„ 12		((+))
„ 6	((+))	Coli 1		—
„ 7	—	„ 2		—
		„ 3		((+))

Tabelle II.
Dysenteriegruppe.

24 Std. alte Agarkultur 37° C			
		Kapsel	
Dysenterie Shiga	3	++	dicke Baz.
"	"	—	lange, schlanke Baz.
"	"	++	dicke Baz.
"	"	++	" "
"	"	++	" "
"	"	—	lange, schlanke Baz.
"	"	++	dicke Baz.
Pseudoeynteriae	F	++	dicke Baz.
"	A	—	lange, schlanke Baz.
"	B	—	" " "
"	C	—	" " "
"	D	—	" " "
"	E	—	" " "

Tabelle III.
Vibrionengruppe.

24 Std. alte Agarkultur 37° C		Kapsel
Cholera	1	—
"	14	—
"	16	—
Vibrio Dunbar		—
Spirillum Metschnikovi		((+))
Vibrio El Tor	1	—
"	"	2
"	"	3
"	"	5

Tabelle IV.
Diphtheriegruppe.

24 Std. alte Agarkultur 37° C			
		Kapsel	Kapsel
B. diphtheriae	1	—	B. diphtheriae von Serumplatte
"	"	2	" " " Blutplatte
"	"	3	
"	"	4	
"	"	5	
"	"	6	
"	"	7	
"	"	8	
"	"	9	
B. Pseudodiphtheriae	1	—	B. Pseudodiphtheriae
"	"	2	Aus Peritonealflüssigkeit einer infizierten Cavia

Tabelle V.
Coccaceae-Gruppe.

24 Std. alte Agarkultur, 37° C				
	Kapsel		Kapsel	
Staphylococcus	1	—	Staphylococcus 11	—
"	2	—	" 12	—
"	3	—	Streptococcus 1	—
"	4	—	" von Blutplatte	—
"	5	—	Pneumococcus-Agarkultur	—
"	6	—	" Asciteskultur	++
"	7	—	" Eiter	+++
"	8	—	Micrococcus tetragenus aureus I	—
"	9	—	" " " II	—
"	10	—	" " " III	—

Tabelle VI.
Sporentragende Gruppe.

24 Std. alte Agarkultur, 37° C	
	Kapsel
Bac. anthracis	—
" " aus Blut einer infiz. Maus	+++
" mesentericus vulgatus	+
" subtilis	—
" tetanus (Leberbouillon)	—

Tabelle VII.
Kapselbazillengruppe.

24 Std. alte Agarkultur, 37° C	
	Kapsel
Bac. lactis aërogenes 1	+++
" " 2	+++
" Morax-Axenfeld 1	+++
" pneumoniae Friedländer 1	+++
" " 2	+++

Aus den Tabellen ergibt sich zunächst, daß es viel mehr Bakterien gibt, welche eine Kapsel zeigen können (sei es auch vorübergehend, also nicht konstant und von vielen Faktoren abhängig), als man glaubt, und daß dieses Phänomen sich nicht allein auf Bazillen und Kokken beschränkt, die sogenannten „Kapselbazillen“ und „Kapselkokken“, diese streng umschriebenen Gruppen der Lehrbücher. Wobei man immer den Eindruck bekommt, daß es außer diesen Bazillen keine anderen gäbe, welche auch Kapseln bilden können.

Sind diese jetzt „wirkliche“ Kapseln, oder sind es die so sehr gefürchteten „Pseudo- oder Schleimkapseln“ durch das Schrumpfen des Protargols entstanden, welches sich vom Zellrand zurückgezogen hat und so eine Kapsel vortäuscht?

Dagegen wäre zuerst anzuführen, daß die „weiße Hülle“, wenn energisch unter Hitze gefärbt, allmählich rosarot wurde, wohl der beste Beweis, daß es sich nicht um eine leere Lücke handelt.

Zweitens ist dagegen anzuführen, daß es so viele Bazillenarten gibt, welche gar keine Kapsel bilden, wie Tab. III, IV, V zeigen.

Diese negativen Resultate sind für die Beurteilung dieser Methode viel wichtiger als die positiven; jedes negative Resultat spricht kräftig gegen die so gefürchtete „Pseudokapsel“.

Drittens ist noch zu bedenken, daß es Kulturen gibt, wo neben überwiegend kapsellosen hier und da eine Zelle sich zeigte, welche eine Kapsel hatte (Tab. I—III). Zuletzt ist noch anzuführen, daß nicht Kapseln bildende Bazillenarten, wie die Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillen, in keiner Weise in sehr eiweißreichem Milieu, Blutplatte, Serumplatte, Peritonealflüssigkeit von einer Cavia, welche an Diphtherie eingegangen war, und worin die Bazillen deutlich nachzuweisen waren, mit dieser Methode eine Kapsel zeigten.

Von einigen Forschern wird behauptet, daß die Kapselbildung bei 24° C eine bessere ist als bei 37° C. Nach meiner Erfahrung gibt es gar keinen Unterschied zwischen diesen Temperaturen der Schleimhülle gegenüber, wenn auch in den meisten Fällen die Kultur bei 37° eine üppigere ist.

Unbedingt aber übt der eiweißreiche Kulturboden (Ascitessserum, Blut) auf die Kapselbildung einen wesentlichen Einfluß. Die Kapsel sieht breiter und größer aus als auf gewöhnlichem Agar. Immer ging ich von jungen, frisch übergeimpften Kulturen aus, welche man nach 24 Std. 2 × 24 usw. auf die Kapselbildung prüfen muß. Beim *Bac. lactis aërogenes* zeigten frisch übergeimpfte, 24 Std. alte Kulturen auf Ascitesagar wenige Kapseln, aber nach 2 × 24 Std. waren die Kapseln auf einmal wunderschön zu sehen. Ein bestimmtes Alter der Kultur ist also nie vorauszusagen, am besten ist es, erst nach 24 Std. und dann noch später zu sehen; etwas Konstantes kann man nicht angeben.

Das Eosin selbst hat auch einen anderen Einfluß auf die Bakterienzelle als die basischen Farbstoffe, wie meine Kontrollversuche erwiesen. Der *Coli*-Bazillus wurde vital in Methylenblau gefärbt und von der Suspension auf einen Objektträger ausgestrichen. Er bildete die kleinen, bekannten, kurzen Stäbchen. In der Eosinsuspension sah die Zelle wohl 2mal so groß und breit aus, vielleicht weil das Ektoplasma sich mit Eosin zeigt, das mit den basischen Anilinfarbstoffen ungefärbt bleibt.

Auf eine weitere große Eigentümlichkeit der Typhus-*Coli*-Gruppe möchte ich noch hinweisen: Färbt man Repräsentanten dieser Gruppe, so sieht man mitten in der rosa gefärbten Bakterienzelle einen viel rötlicheren, undefinierbaren Punkt, aber nur in den älteren, ausgewachsenen Zellen, während die ganz jungen, kleinen Zellen ihn nicht zeigen. Zuerst dachte ich an eine Art Kapselbildung, aber der Punkt war mir doch zu wenig konturiert für eine Bakterienzelle und glich zu sehr einem Fleck. Im Tuschepräparat sah ich genau dasselbe Bild, die weiß ausgesparte Zelle, welche ebenso groß aussah wie die Eosinzelle und auch mitten darin denselben undefinierbaren Punkt, der jetzt aber schwärzlich gefärbt war. Wurde jetzt mit Fuchsin nachgefärbt, wie Eisenberg angibt, so zeigten sich die rot gefärbte *Coli*-Stäbchen sehr gut definiert, die ebenso groß waren wie die ursprünglich in Tusche weiß ausgesparten Körper; der schwarze Fleck aber war verschwunden.

Dieses Präparat bewies also, daß dieser Punkt die Bakterienzelle war, der helle Hof die Kapsel; der schwarze Fleck war aber noch immer ein Rätsel.

Die daraufhin studierte Literatur ergab zwei Abhandlungen von Sangiorgi und Eisenberg, welche dasselbe Phänomen wahrgenommen haben; Eisenberg hat es nur bei Gram-Zellen gesehen und meinte, daß es mit der Gramnegativität sehr eng zusammenhängt. Ich glaube das nicht, denn bei *Bac. subtilis* habe ich ihn genau so nachweisen können.

Ich glaube aber vielmehr, daß es die sogenannten Nukleinschollen Zettnows sind, denn wenn man die *Coli*-Kultur im hängenden Tropfen sieht, so zeigen viele Zellen denselben Fleck im Zentrum als dunklen Schatten, und zwar sind es die alten, ausgewachsenen Zellindividuen, welche sie am schönsten zeigen, wie Zettnow hervorgehoben hat. Ein derartiges Bild darf also nicht als eine richtige Kapsel angesehen werden, weil es damit nichts zu tun hat.

Fig. 4, *Spirillum volutans*, zeigt auch deutliche Flecken und Punkte, welche sich durch Eosin färben. Diese Gebilde stimmen sehr gut mit dem Volutin überein, woran diese Zellen so reich sind.

Einmal sah ich an *Bac. anthracis* von einer jungen Agarkultur eine Kapsel, welche der von Preisz (Fig. 9, Taf. III)¹⁾ sehr ähnlich war. Bei einer folgenden Ueberimpfung auf Agar war die Kapsel aber verschwunden. Die erste Kultur stammte von einer monatealten Milzbrandkultur, vielleicht waren Stoffwechselprodukte dieser alten Kultur mitübertragen worden und haben die Kapselbildung bei der jungen Kultur angeregt. Kodama hat auf alkalischem Agar bei Milzbrand öfters eine Kapsel darstellen können, wenn der Alkaligehalt 200mal die Stärke von normaler Sodalösung betrug.

Diese Untersuchungen haben wieder ergeben, daß man mit dem Begriff „kapseltragende“ und „kapsellose“ Bakterien sehr vorsichtig sein muß und vor allen Dingen nicht daran festhalten muß, daß es nur einige Gruppen gibt, welche immer Kapseln zeigen, während die anderen nie Kapseln bilden, sondern daß die Kapsel viel mehr ein quantitativer als ein qualitativer Begriff ist.

Nicht von „Kapsel“ oder „keine Kapsel“ darf man reden, vielmehr nur von „mehr“ oder „weniger“ Kapseln. Diese Prozesse stehen unter dem direkten Einfluß des Alters der Kultur und der physisch-chemischen Zusammensetzung des Nährbodens.

Will man von „Kapselbakterien“ reden, so bleiben *Bac. anthracis*, *Bac. pneumoniae* Friedländer, *Bac. Morax-Axenfeld*, *Bac. lactis aërogenes*, *Bac. capsulatus mucosus* (Ozaena und Rhinosklerom), pneumococcus, *Bac. microc. tetragenus septicus*, *Bac. streptococcus mucosus*, doch darf man das Kapselbildungsvermögen den anderen Bazillen nicht absprechen. Bezüglich der Schleimbildung sagt Arthur Meyer: „Schleimbildung ist für viele Bazillenspezies mit mehr oder weniger Sicherheit angegeben worden; sie wird, wie gesagt, den meisten Spezies zukommen, aber je nach der Spezies und dem Nährsubstrat, auf welchen die Vegetation sich entwickelte, und der Schleim mehr oder weniger reichlich gebildet wird.“

Ich glaube, meine neue Methode zur Kapseldarstellung empfehlen zu dürfen, denn die Hüllen, welche sich damit zeigen, sind keine sogenannten „Scheinkapseln“ oder „Pseudokapseln“. Erwähnt sei noch, daß der *Bac. lactis aërogenes* von Carol, der im hiesigen Labo-

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. S. 341.

ratorium aus einer Hautentzündung isoliert worden ist, keine Kapsel zeigte nach der Methode von Johnne, Huntoon und Heim, obgleich der „hängende Tropfen“ von dieser Kultur eine deutliche „Zone“ um den Bazillenleib zeigte, welche den Gedanken auf eine Kapsel lenkte. Das Protargol-Eosinpräparat gab aber eine wunderschöne Kapsel, was auch ganz übereinstimmte mit den meisten kulturellen Ergebnissen.

Für diejenigen, welche diese Methode versuchen wollen, gebe ich den Rat; sie zuerst an einem tüchtigen Kapselbazillus zu versuchen, damit man einen richtigen Eindruck bekommt, wie ein „positives“ Bild ausschauen muß.

Hoffentlich wird diese einfache Methode der Praxis gute und zuverlässige Resultate leisten.

Dem Fräulein S. Benjamins, Subassistentin an unserem Institute, sage ich hier noch meinen aufrichtigen Dank für die große Hilfe, welche sie mir durch die Herstellung der vielen Präparate geleistet hat.

Literatur.

Ambrož, Adolf, Entwicklungszyklus des *B. nitri* n. sp., als Beitrag zur Cyto-
logie der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. 1909. S. 193.) — Aoki,
Ueber Kapselbildung der Pneumokokken im Immunserum. (Arch. f. Hyg. Bd. 75.
1912. S. 393.) — Bail, Oscar, Untersuchungen über kapsellosen Milzbrand. (Centralbl.
f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. 1915. S. 38. — Buerger, L., Eine neue Methode zur
Kapselfärbung der Bakterien, zugleich ein Beitrag zur Morphologie und Differenzierung
einiger ungekapselter Organismen. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 39. 1905. S. 335; Journ.
of infect. dis. Vol. 4. 1907. p. 426.) — Baer, George, u. Kantor, John. A com-
parative study of Methods for staining the Capsules of Bacteria. (Centralbl. f. Bakt.
Abt. I. Orig. Bd. 63. 1912. S. 120.) — Beham, L. M., Die agglutinatorischen Eigen-
schaften der Kapselbazillen und die Anwendung der Serumagglutination bei den Trägern
von Kapselbazillen. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 66. 1912. S. 110.) — Bütschli, O.,
Bemerkungen über Cyanophyceen und Bacteriaceen. (Arch. f. Protistenk. Bd. 1. 1902.
S. 41.) — Babes, v., Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporen-
bildung, Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien. (Zeitschr. f.
Hyg. Bd. 20. 1895. S. 412.) — Bunge, R., Zur Kenntnis der geißeltragenden Bakterien.
(Baumgart. Jahrb. Bd. 10. 1894. S. 445.) — Bail, Oscar, Die Kapselbildung von
Milzbrandbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 46. 1908. S. 488.) — Ders.,
Ueber Korrelation zwischen Kapselbildung, Sporenbildung und Infektiosität des Milz-
brandbazillus. (Ebenda. Bd. 75. 1915. S. 159.) — Ders. u. Kleinhans, F., Versuche
über die Infektiosität von Streptokokken an Meerschweinchen. (Zeitschr. f. Immunitätsf.
Orig. Bd. 12. 1912. S. 199.) — Boni, J., Methode zur Darstellung der Bakterienkapsel
auch in festen Nährböden. (München. med. Wochenschr. 1900. Nr. 37.) — Benecke, W.,
Bau und Leben der Bakterien. Leipzig u. Berlin (B. G. Teubner) 1912. — Carpano, M.,
Ueber die Kapselhülle einiger Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913.
S. 42.) — Ciani, G., Sulla capsula del „*Bacillus anthracis*“. (Ebenda. Abt. I. Ref.
Bd. 61. S. 399.) — Carol, W. L. L., Een geval van cocco-bacillaire huidbesmetting
met Gangraen. (Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1919. 1. H. No. 11.) — Douglas et Di-
staso, Etudes sur le noyau des Bacteries. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 63.
1912. S. 1.) — Dies., Ueber den Kern der Bakterien. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 66.
S. 321.) — Danysz, J., Immunisation de la Bactéricidie charbonneuse contre l'action
du sérum du rat. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1900. p. 41.) — Eisenberg, Philipp,
Ueber die Tuschedifferenzierung gramnegativer Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I.
Orig. Bd. 56. 1910. S. 183.) — Feinberg, Ueber den Bau der Bakterien. (Ebenda.
Abt. I. Orig. Bd. 27. 1900. S. 417.) — Fischer, Alfred, Vorlesungen über Bakterien.
2. Aufl. Jena (Gust. Fischer) 1903. — Fitzgerald, J. G., Agglutination of encapsu-
lated Bacteria. (Proc. Soc. f. exper. Biol. a. Med. 1912. Vol. 10. p. 52; Ref.: Bull. de
l'Inst. Pasteur. 1913. p. 623.) — Fischeoeder, F., Beiträge zur Kenntnis des Milz-
brandes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. 1909. S. 321.) — Gotschlich, E.,
Allgemeine Morphologie und Biologie. (Handb. d. pathog. Mikroorg. von W. Kolle und
A. v. Wassermann.) — Gins, H. A., Zur Technik und Verwendbarkeit des Burri-
schen Tuscheverfahrens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 52. 1909. S. 620.) —
Ders., Ueber die Darstellung von Geißelzöpfen bei *Bact. typhi*, *Bact. proteus*
und den Bakterien der Salmonella-Gruppe mit der Methode des Tuscheausstrichpräpa-

rates. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911. S. 472.) — Gruber u. Futaki, Münch. med. Wochenschr. 1907. Nr. 6. — Gordon, H., Capsule formation by *Diplococcus pneumoniae* in culture. (Bull. l'Inst. Pasteur. T. 2. 1904. p. 426.) — Hlava, *Leuconostoc hominis* und seine Rolle bei den akuten exanthematischen Krankheiten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 32. 1902. S. 263.) — Heim, L., Lehrbuch der Bakteriologie. Stuttgart (Ferd. Enke) 1918; München. med. Wochenschr. 1904. S. 426.) — Hamm, A., Beobachtungen über Bakterienkapseln auf Grund der Weidenreichen Fixationsmethode. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 43. 1907. S. 287.) — Huntoon, A simple method for staining the capsules of Bacteria. (Journ. of Bact. Vol. 2. 1917.) — Huyer, zitiert von Arthur Meyer. — Johne, zit. v. Kolle u. Wassermann. — Klein, Alex., Die physiol. Bakteriologie des Darmkanals. (Arch. f. Hyg. Bd. 45. 1902.) — Kruse, W., Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig (F. C. W. Vogel) 1910. — Kodama, H., Ueber Kapselbildung der Milzbrandbazillen bei der Züchtung auf Schrägagar. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 62. 1912. S. 177.) — Ders., Die Ursache der natürlichen Immunität gegen Milzbrandbazillen. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 68. 1913. S. 373.) — Kuhnemann, G., Ueber Kapselbildung beim Typhusbazillus. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911. S. 497.) — Liesenberg und Zopf, zitiert von Arthur Meyer. — Meyer, Arthur, Die Zelle der Bakterien. Jena (Gust. Fischer) 1912. — Marrassini, A., Ueber das Vorhandensein einer den Körper einiger Bakterien umgebenden Hülle und deren besondere Bedeutung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71. 1913. S. 113.) — Malerba u. Sanna Salaris, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15. S. 39; zit. von Kruse. — Muirs, zitiert von Kolle u. Wassermann. — v. Nestlinger, N., Zur Frage der Kapselbildung des *Diplobazillus Morax-Axenfeld*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919. S. 529.) — Noetzel, Baumgartens Jahresber. Bd. 12. 1896. S. 797.) — Nakanishi, München. med. Wochenschr. 1900. S. 187; zitiert von Kolle u. Wassermann, Bd. 1. S. 60. — Ottolenghi, D., Ueber die Kapsel der Milzbrandbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 52. 1912. S. 577. — Preisz, Hugo, Experimentelle Studien über Virulenzempfänglichkeit und Immunität beim Milzbrand. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909. S. 341.) — Variieren und Wesen der Abschwächung des Milzbrandbazillus. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. S. 510.) — Pane, N. Ueber die Genesis der Kapseln des *Pneumococcus*. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 24. 1898. S. 289.) — Paltauf, die Agglutination. (Kolle u. Wassermanns Handb.) — Porges, O., Ueber die Agglutinabilität der Kapselbakterien. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. 18. 1905; Bull. l'Inst. Pasteur. 1905. p. 669.) — Quaddekker, E., Het Kleuren van Miltsuurbacillen. (Tijdschr. v. vergelijc. Geneesk. D. I. Afl. 1.) — Růžicka, Vladislav, Weitere Untersuchungen über den Bau und die allgemeine biologische Natur der Bakterien. (Arch. f. Hyg. Bd. 5. 1904. S. 281.) — Ramsdon, W., Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 47. 1904. S. 336; zit. v. Baehr u. Kontor.) — Robertson, T. B., Journ. Biol. Chem. Vol. 4. 1908. p. 1; zit. v. Baehr u. Kontor.) — Rotky, R., Versuche über die Kapselbildung des Milzbrandbazillus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 74. 1914. S. 285. — Riemsdyk, M. van, Der *Micrococcus tetragenus albus* als Erreger einer Meningitis cerebrospinalis. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 89.) — Sangiorgi, Guiseppe, Ueber einen eigenartigen, bei einigen Mikroben durch die Tusche dargestellten Baubefund. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 55. 1910. S. 94. — Sauerbeck, E., Kapselbildung und Infektiosität der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 63. S. 313.) — Streit, Zur Frage der Agglutinierbarkeit von Kapselbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. S. 709.) — Schmidt, A., Ueber die Benutzung verschiedener Sputa als Nährböden und das Wachstum der Pneumokokken auf denselben. (Baumgartens Jahresber. Bd. 9. 1893. S. 41.) — Schaudinn, Fritz, Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen. (Arch. f. Protistenk. Bd. 1. 1902. S. 306; Bd. 2. 1903. S. 421.) — Swellengrebel, N. H., Sur la cytologie comparée des Spirochètes et des Spirilles. (Ann. l'Inst. Pasteur. T. 21. 1907.) — Ders., Zur Kenntnis der Cytologie von *Bacillus maximus buccalis*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. S. 617—673.) — Stiennon, T., Absence de Phagocytose après l'injection de bacilles encapsulés du charbon bactérien. État des leucocytes en présence des bacilles encapsulés du charbon. — Ders., Sur les conditions de formation de la gaine des *Bacillus anthracis*. (Bull. de l'Inst. Pasteur. T. 5. 1907. p. 585.) — Smit, Jan., Kapselbildung bei den Dextran-Laktococccen. (Fol. Microbiol. D. 5. Afl. 1. 1917.) — Toenniessen, E., Untersuchungen über die Kapsel der pathogenen Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 65. 1912. S. 23.) — Ders., Ueber die Agglutination der Kapselbazillen. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 75. 1915. S. 329.) — Woloschin, A. D., Zur Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus im tierischen Organismus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 72. 1914. S. 312.) — Ward, zitiert v. Arthur Meyer. — Zett-

now, E., Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 10. 1891. S. 689.) — Ders., Ueber den Bau der großen Spirillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24. 1897. S. 72.) — Ders., Kleine Beiträge zur Morphologie der Bakterien. (Ebenda. Bd. 85. 1918. S. 17.) — Ders., Romanowskis Färbung bei Bakterien. (Ebenda. Bd. 30. 1899. S. 1.)

Tafelerklärung.

Fig. 1. *Bac. anthracis* aus infiziertem Blute einer Maus. Protargol-Eosinfärbung (Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Fig. 2. *Bac. anthracis* von gewöhnlichem Agar. Protargol-Eosinfärbung (keine Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Fig. 3. *Diplococcus pneumoniae* aus Eiter. Protargol-Eosinfärbung (Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Fig. 4. *Staphylococcus pyogenes aureus* von Agarkultur. Protargol-Eosinfärbung (keine Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Fig. 5. *Bac. pneumoniae* Friedländer — Ascites-Agarkultur, Protargol-Eosinfärbung (Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Fig. 6. *Spirillum volutans* von Agarkultur, Protargol-Eosinfärbung (keine Kapsel). Homog. Oel-Immers. $\frac{1}{12}$, Komp.-Okul. 8.

Nachdruck verboten.

Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Universitäts-Instituts in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. M. Neisser).]

II. Mitteilung.

Die synthetischen Fähigkeiten verschiedener Bakterienarten.

Von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner.

In der 1. Mitteilung¹⁾ wurden die Ernährungsbedürfnisse und die synthetischen Fähigkeiten des Paratyphus B-Bazillus besprochen. Es stellte sich heraus, daß er Stickstoff an Kohlenstoff zu binden und so seine Leibessubstanz aufzubauen vermochte, wenn ihm der Stickstoff in Form von Ammoniak, der Kohlenstoff in Form einer organischen Verbindung geboten wurde; die einfachste dazu ausreichende Kohlenstoffquelle war die Oxalsäure.

In dieser 2. Mitteilung sollen die Ernährungsbedürfnisse der Verwandten des Paratyphus B-Bazillus, besonders von Typhus- und Paratyphus A-Bakterien untersucht werden. Vorher aber mögen einige orientierende Versuche mit anderen, teils pathogenen, teils saprophy-

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. Heft 1.

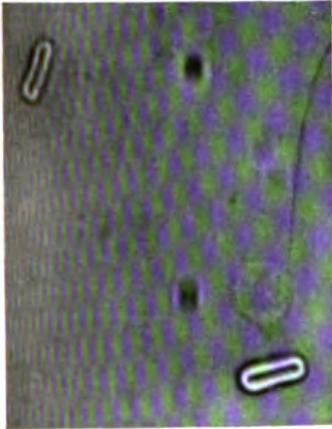


Fig.1



Fig.2

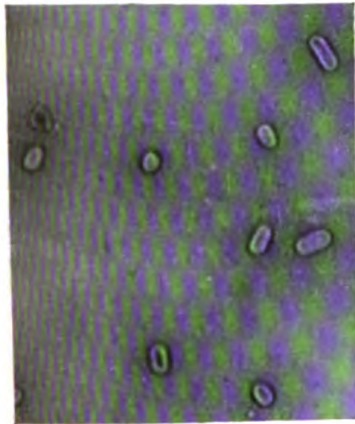


Fig.3

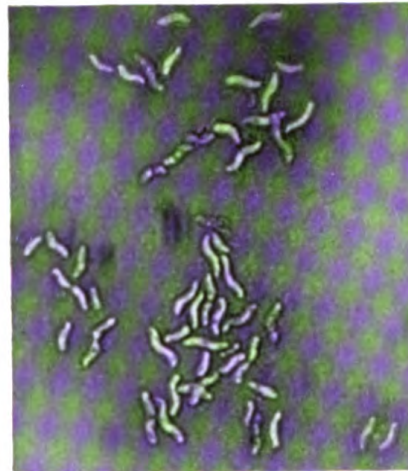


Fig.4

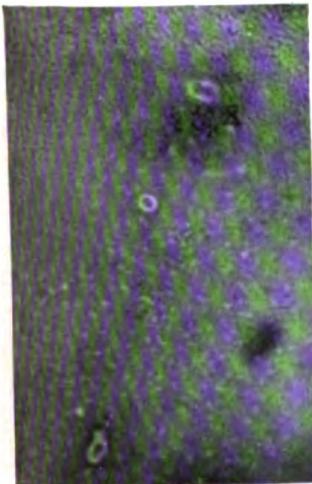


Fig.5

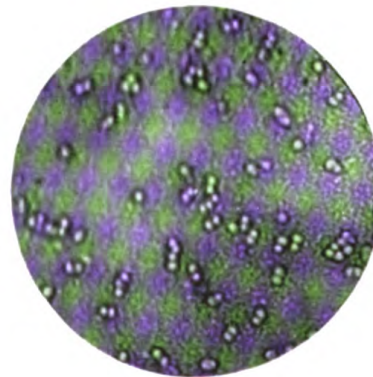


Fig.6

tischen Bakterienarten mitgeteilt werden. Wir haben diese nur in der Absicht eines Vergleiches mit der Paratyphusgruppe ausgeführt und wollen sie auch nur unter diesem Gesichtspunkt besprechen. Deshalb sollen, um Wiederholungen möglichst zu vermeiden, nur die Differenzen hervorgehoben werden. Ein solcher Vergleich wird über die assimilatorischen Fähigkeiten der verschiedenen Arten Aufschluß geben, und es ist von Interesse, sich darüber zu orientieren, wie sich Bakterien, die auf Grund ihrer sonstigen Eigenschaften als näher oder ferner verwandt gelten, in dieser Beziehung verhalten. Außerdem wird sich herausstellen, wie sich die Lebensäußerungen der verschiedenen Keimarten (Beweglichkeit, Farbstoffbildung, Sauerstoffbedürfnis) je nach den Ernährungsbedingungen ändern. Diese vergleichenden Versuche sind mit je einem Stamm von Coli- und Pyocyaneus-Bazillen in gleich systematischer Weise durchgeführt worden, wie dies in der 1. Mitteilung für den Paratyphus B-Bazillus beschrieben worden ist. Mit anderen Stämmen der Coli- und Pyocyaneus-Bazillen und mit Proteus-, Alkaligenes-, Friedländer-Bazillen und Cholera- und Metschnikoff-Vibrionen wurden nur die grundsätzlich wichtigen Versuche ausgeführt.

Wir beginnen mit den Arten, die keine prinzipiellen Unterschiede von dem Paratyphus B-Bazillus aufweisen. Die meisten von ihnen sind schon früher in einfachen künstlichen Nährböden gezüchtet worden. Wenn sich gelegentlich Abweichungen in den Angaben der einzelnen Autoren untereinander oder von den hier zu besprechenden Resultaten ergeben, so ist zu bedenken, daß nur solche Versuche im strengen Sinne vergleichbar sind, die in quantitativ und qualitativ genau übereinstimmenden Nährböden angestellt wurden. So ist es z. B. für die Frage, ob eine stickstoffhaltige Substanz zum Aufbau verwendet werden kann, nicht gleichgültig, welche und wieviele Kohlenstoffquellen gleichzeitig vorhanden sind. Deshalb wäre eine Besprechung solcher in Einzelheiten liegenden Widersprüche wenig lohnend, da diese eben meistens nur scheinbare sind. Dazu kommt, daß gelegentlich unsere Resultate von den älteren Angaben deshalb abweichen, weil von uns dem bei besonderer synthetischer Leistung erhöhten Sauerstoffbedürfnis der Bakterien Rechnung getragen und außerdem ein Nährboden nur dann als für eine Bakterienart tauglich bezeichnet wird, wenn darin ein Wachstum in zahlreichen hintereinandergelegten Passagen beobachtet wurde.

Die Ernährungsbedürfnisse des Colibazillus sind von verschiedenen Autoren, z. B. besonders gründlich schon von Capaldi und Proskauer¹⁾, untersucht worden.

Schon diese haben festgestellt, daß er mit Ammoniak als einziger Stickstoffquelle zu leben vermag. Prinzipiell gleicht er damit also in seinen synthetischen Fähigkeiten dem Paratyphus B-Bazillus.

Es stellte sich aber heraus, daß er dabei anspruchsvoller ist als dieser. Wir haben zu unseren Versuchen 4 typische Coli-Stämme benützt, in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden²⁾, der aus 0,5 Proz. Kochsalz,

1) Capaldi u. Proskauer, Zeitschrift f. Hyg. Bd. 23. 1896

2) Der Kürze halber bezeichnen wir die einfachen künstlichen Nährböden unter Weglassung des in jedem enthaltenen Kochsalzes und Biphosphats nach der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat und so viel Natriumbikarbonat zusammengesetzt ist, daß er lackmusneutral wird und darüber hinaus 0,7 Proz. einer Normalsodalösung enthält, wächst der Coli-Bazillus in flacher Schicht dauernd in Passagen, doch nicht so schnell und üppig, wie der Paratyphus B-Bazillus. Das Phänomen der Anpassung an diese eigenartigen, ihn zu besonders schwerer synthetischer Arbeit zwingenden Ernährungsverhältnisse ist hier meist sehr deutlich. Während er, einem Nähragarröhrchen entnommen, in der 1. und 2. Passage des Milchsäure-Ammoniaknährbodens zögernd wächst, geht später darin seine Vermehrung fortschreitend schneller vonstatten. Reichliche Sauerstoffzufuhr durch Züchtung in flacher Flüssigkeitsschicht am Boden kleiner Erlenmeyer-Kölbchen ist hier noch notwendiger als beim Paratyphus B-Bazillus; in einem mit dem flüssigen Nährboden hoch gefüllten Reagenzröhrchen wächst er kaum, und Passagen sind meist nicht zu erzielen. Ohne Sauerstoff kann der Coli-Bazillus in diesem Nährboden überhaupt nicht leben. Wie der Paratyphus B-Bazillus, ist auch dieser fakultative Anaërobier bei dem Zwang zu schwerer synthetischer Arbeit ein strenger Aërobier.

Bezüglich der zum Wachstum notwendigen Konzentrationen der Nährstoffe zeigten sich Verschiedenheiten bei den einzelnen Bakterienarten. Verminderte man in dem oben angegebenen Nährboden das Kaliumbiphosphat auf $\frac{1}{4}$ und das Ammoniumlaktat auf $\frac{1}{8}$ des Wertes, der reichliches Wachstum gestattet, so konnte sich der zu diesem Versuche benutzte Coli-Bazillus nicht mehr vermehren, während der Paratyphus B-Bazillus noch von Passage zu Passage wuchs.

Läßt man das Kochsalz fort, und alkalisiert den Nährboden anstatt mit Natriumbikarbonat mit Kalilauge, so daß er nur aus Kaliumbiphosphat, milchsäurem Ammonium und Kalilauge besteht, so wächst der Coli-Bazillus zwar zögernd, aber doch in beliebig zahlreichen, hintereinandergelegten Passagen und zeigt durch allmählich schneller werdendes Wachstum eine Anpassung auch an diesen Zustand. Die Verarmung des Nährbodens an Chlor und an Natrium hindert ihn also, ebenso wie den Paratyphus B-Bazillus, im Gegensatz zu später zu besprechenden Bakterienarten, in seinem Wachstum nicht. Setzt man diesen Nährsalzen Bromkali zu, so wird dadurch sein Wachstum deutlich verbessert, und es scheint Brom das Chlor, soweit dies überhaupt für den Coli-Bazillus in Betracht kommt, ersetzen zu können.

Ein Zusatz von Verbindungen der für das Leben in Betracht kommenden chemischen Elemente, welche im oben angegebenen Milchsäure-Ammoniaknährboden fehlen oder nur in den bei Benutzung von Glasgefäßen unvermeidlichen Spuren vorhanden sind, verbessert das Wachstum des Coli-Bazillus deutlich; beim Paratyphus B-Bazillus dagegen war dadurch keine Beeinflussung zu beobachten. So wirken 0,5 Proz. schwefelsaures Natrium oder 0,1 Proz. Magnesiumsulfat förderlich; mit 0,25 Proz. Kalziumchlorid gedeiht der Coli-Bazillus schon in den ersten Passagen so üppig wie in einer Bouillon. Aber auch mit allen diesen gleichzeitig beigefügten mineralischen Zusätzen vermager nicht anaërob zu wachsen.

Das Vermögen, unter diesen einfachen Ernährungsverhältnissen die Kohlehydrate zu spalten, wenn sie die einzige Kohlen-

stoffquelle sind, ist beiden Bakterienarten gemeinsam, nur daß natürlich der Coli-Bazillus aus Milch- oder Rohrzucker allein seinen Kohlenstoffbedarf zu decken vermag, während der Paratyphus B-Bazillus verhungert, wenn er keine andere Kohlenstoffquelle als eine dieser beiden für ihn unangreifbaren Zuckerarten hat. Anaërobes Wachstum ist aber dem Coli-Bazillus auch mit Traubenzucker oder Milchzucker unmöglich, trotzdem er, wie der Paratyphus B-Bazillus, die Kohlehydrate bei Sauerstoffgegenwart auch in diesem Nährboden bis zur Kohlensäure spalten kann. Einerlei, ob das Mono- oder das Disaccharid die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle ist, oder ob es dem Milchsäure-Ammoniaknährboden neben der Milchsäure als zweite Energiequelle zugesetzt wird, der Coli-Bazillus kann dabei den Sauerstoff nicht entbehren.

Bezüglich der brauchbaren Stickstoffquellen verhalten sich Coli- und Paratyphus B-Bazillen ebenfalls gleich. In einem Milchsäure-Nitratnährboden waren auch unsere Coli-Stämme nicht in zahlreichen Passagen zur Vermehrung zu bringen. Aus d-Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure konnte auch der Coli-Bacillus, wie Versuche mit einem Stamm lehrten, seinen Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiebedarf decken, dagegen nicht aus Glykokoll oder l-Tyrosin. Bemerkenswert ist, daß dieser indolbildende Coli-Bazillus in einem Tryptophannährboden, der 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,4 Proz. l-Tryptophan und die zur schwach alkalischen Reaktion nötige Menge von Natriumbikarbonat enthielt, ebenso schlecht und langsam wuchs, wie der Paratyphus B-Bazillus. Bei letzterem ist dies verständlich, denn er vermag ja kein Indol abzuspalten, sondern bildet in Peptonnährböden als Stoffwechselprodukt gerade Tryptophan. Der Coli-Bazillus hingegen spaltet auch in obigem Nährboden Indol ab und deckt seinen Stickstoff- und Kohlenstoffbedarf wohl vor allem aus dem dadurch verfügbar gewordenen Alanin. Denn erspart man ihm die Spaltung des Indol-Alanins, indem man ihm das Alanin direkt gibt, so wächst er damit weit besser, als mit Tryptophan. Andererseits kann man ihm die Abspaltung der Seitenkette aus dem Indol-Alanin durch Zugabe einer organischen Kohlenstoffverbindung als Energiequelle sehr wesentlich erleichtern. Er wächst nämlich in einem Nährboden mit Tryptophan und Milchsäure weit besser als mit Tryptophan allein, ebensogut als mit Alanin allein.

Aus diesem Vergleich zwischen Coli- und Paratyphus B-Bazillen ersieht man aber noch etwas: Da der Paratyphus B-Bazillus in dem oben genau bezeichneten Tryptophannährboden sich zwar langsam, aber dauernd vermehrt, darin aber keine andere oxydierbare Substanz als das Tryptophan vorhanden ist, müssen wir annehmen, daß das Bakterium das Tryptophan wenigstens zum Teil spaltet, um die zum Leben nötige Energie zu gewinnen. Da aber dabei kein Indol gebildet wird, wird es demnach eine andere Art der Tryptophanspaltung sein, als sie der Coli-Bazillus vollbringt.

Wir beobachten also eine weitgehende Uebereinstimmung in den synthetischen Fähigkeiten von Coli- und Paratyphus B-Bazillen. Die unentbehrlichen Nährstoffe sind für beide Arten dieselben. Trotzdem aber läßt sich nicht leugnen — und das ist bemerkenswert — daß von diesen beiden Bakterienarten der Coli-Bazillus der anspruchsvollere ist.

Aus der Gruppe der **Proteusbazillen** haben wir 2 gewöhnliche, aus Stuhl und Eiter stammende, keine Indolbildung aufweisende **Proteus**-Stämme und den indolbildenden Fleckfieber-**Proteus X 19** (Weil-Felix) geprüft. Ihr Wachstum ist im Milchsäure-Ammoniaknährboden, der außerdem nur Kochsalz und Kaliumbiphosphat enthält, auch bei reichlichster Sauerstoffzufuhr nur sehr schwach und sehr langsam. Im hängenden Tropfen aus der 1. oder 2. Passage sieht man nur einzelne der Stäbchen sich langsam und taumelnd bewegen. Schließlich hört nach 3—4 Passagen im flüssigen Nährboden die Vermehrung auf. Erst nach Zusatz von schwefelsaurem Salz wächst der **Proteus**-Bazillus kräftiger und in zahlreichen Passagen. Setzt man anstatt Schwefel Kalzium in der Form von Kalziumchlorid hinzu, so wird dadurch das Wachstum nicht verbessert. Für dieses Bakterium ist also offensichtlich, im Gegensatz zum **Paratyphus B-Bazillus**, eine gewisse Menge von schwefelhaltiger Verbindung nötig, ohne die es dauernd nicht leben kann. Trotzdem aber ist, entsprechend dem oben gesagten, das Wesentliche seiner Ernährungsbedürfnisse das Gleiche wie beim **Paratyphus B-Bazillus**. Dieser Prototyp eines mit fermentativen Spaltungen arbeitenden Fäulnisregers vermag seinen Stoffwechsel so umzustellen, daß er sein Körpereiß durch weitgehende Synthesen aus wenigen einfachen Bausteinen aufbauen kann. Er vermag im Milchsäure-Ammoniaknährboden ohne Sauerstoff nicht zu gedeihen, auch nicht nach Zusatz von Magnesiumsulfat oder von Traubenzucker als zweiter Energiequelle, verhält sich also wie der **Paratyphus B- und Coli-Bazillus**.

Auch der **Bacillus faecalis alcaligenes**, von dem wir einen frisch aus Stuhl gezüchteten und einen alten Sammlungsstamm prüften, wächst zwar in Milchsäure-Ammoniaknährboden von Passage zu Passage, doch ist auch er anspruchsvoller als der **Paratyphus B-Bazillus**. Bei ihm spielt, was bei einem so strengen Aërobier verständlich ist, die künstlich erhöhte Sauerstoffzufuhr eine für das Wachstum in diesen einfachen Nährböden ausschlaggebende Rolle. Schwefelzusatz schafft sehr merklich günstigere Wachstumsbedingungen. Bei Entziehung des Kochsalzes sowie des Kaliums stellt er seine Vermehrung ein. Auch der Ersatz von Chlornatrium durch Bromkali gestattet kein Wachstum des **Bacillus alcaligenes**, während der **Paratyphus B-Bazillus** mit Bromkali besser wuchs als mit Kochsalz.

Von **Friedländer-Bazillen** wurden ein frisch aus einem Pleuraexsudat gezüchteter und ein alter, sehr stark schleimbildender Sammlungsstamm untersucht. Diese Bakterien sind schon von C. Fränkel¹⁾ in Nährböden bekannter Zusammensetzung, die aber neben Ammoniumsalzen noch eine Aminosäure enthielten, gezüchtet worden. Sie wachsen auch in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden mit Kochsalz und Kaliumbiphosphat sehr gut. Die Entziehung des Kochsalzes setzt ihr Wachstum so gut wie gar nicht herab. Ersatz des Kochsalzes durch Bromkali hindert ihre Vermehrung, im Gegensatz zu dem eben besprochenen **Bacillus alcaligenes**, nicht. Im kaliarmen Milchsäure-Ammoniaknährboden, der nur Natriumsalze enthält, zeigen sie langsameres und weniger üppiges Wachstum als in natriumarmen Nährböden, die nur Kalisalze enthalten. Auf festem agarhaltigen Milchsäure-Am-

1) Fränkel, C., Hyg. Rundsch. Jahrg. 4. 1894.

moniaknährboden war die Schleimbildung unserer Friedländer-Stämme eine gute.

Von pathogenen Keimen haben wir auch die **Choleravibrionen** untersucht. Diese sind zuerst von Voges¹⁾ in einem künstlichen Nährboden bekannter chemischer Zusammensetzung gezüchtet worden, doch enthielt dieser eine organische Stickstoffverbindung, nämlich Asparagin. Kisch²⁾ dagegen züchtete sie mit Ammoniak als einziger Stickstoffquelle. Der einzige von uns untersuchte Sammlungsstamm von Choleravibrionen ist im Milchsäure-Ammoniaknährboden, der nur 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat enthielt, gut gewachsen. Doch war auch er, ähnlich wie die Coli-Bazillen, etwas anspruchsvoller als der Paratyphus B-Bazillus. Ließ man das Kochsalz weg, so wurde seine Entwicklung deutlich verlangsamt. Bromkali war nicht, wie beim Paratyphus B-Bazillus, ein vollwertiger Ersatz dafür. Im Milchsäure-Ammoniaknährboden war der *Vibrio Metschnikoff* nicht zum Wachstum zu bringen. In der Meinung, daß die fehlenden chemischen Elemente dafür verantwortlich seien, haben wir Kalzium-, Magnesium-, Eisensalze und Sulfate nacheinander und auf das Verschiedenste miteinander kombiniert zugesetzt. Auch in dem kompliziertesten dieser Nährböden, der 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, 0,05 Proz. Kalziumchlorid und Spuren von Eisensulfat enthielt, ist der *Vibrio Metschnikoff* nicht gewachsen, während Choleravibrionen sich üppig vermehrten. Wenn man die Milchsäure durch Zitronen- oder Bernsteinsäure ersetzte, so ist ebenfalls nur der Cholerabazillus, aber nicht der *Vibrio Metschnikoff* gewachsen. Leider stand uns nur 1 Cholerastamm zur Verfügung, so daß wir nicht untersuchen konnten, ob diese Differenz zwischen Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen konstant ist. — Unser Cholerastamm konnte sich wie Paratyphus B- und Coli-Bazillen von Nitrat als einziger Stickstoffquelle bei Gegenwart von Milchsäure nicht vermehren.

Alle bis jetzt besprochenen Bakterienarten haben also, soweit sie untersucht wurden, prinzipiell gleiche synthetische Fähigkeiten gezeigt, nur waren sie dabei einmal etwas anspruchsvoller, einmal etwas genügsamer. Diese Differenzen bezogen sich hauptsächlich auf die für Vermehrung notwendige Konzentration der Nährstoffe. Wir halten es für nötig, nochmals zu betonen, daß auch die Nährböden, welchen wir kein Kochsalz oder kein Kalium- oder kein Natriumsalz zugesetzt haben, nur quantitativ von den anderen verschieden sind, insofern sie nur als arm, aber nicht als frei von Chlor, Natrium oder Kalium anzusprechen sind. Dasselbe gilt für Schwefel, Magnesium, Kalzium und Eisen. In dieser Beziehung also sind Coli-, Proteus-Bazillen, Choleravibrionen und *Bacillus faecalis alcaligenes* anspruchsvoller als Paratyphus B- und Friedländer-Bazillen. Ob diese nur theoretische Bedeutung besitzenden Verschiedenheiten tatsächlich allen Stämmen dieser Arten zukommen, kann aus den besprochenen Versuchen, wo jeweils nur wenige Stämme geprüft wurden, nicht entnommen werden. Gewisse Unterschiede zwischen verschiedenen Stäm-

1) Voges, O., Centralbl. f. Bakt. Bd. 15. 1894.

2) Kisch, Br., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919.

men gleicher Art sind zweifellos gerade darin zu beobachten, daß ein Stamm schneller und leichter wächst als ein anderer.

Wir fanden also bei allen diesen Bakterienarten eine sehr weitgehende synthetische Leistungsfähigkeit und gleichzeitig eine bemerkenswerte Vielseitigkeit ihres Stoffwechsels.

Weit übertroffen werden sie darin von dem *Bacillus pyocyaneus*. Mit diesem haben wir uns eingehender beschäftigt, weil seine besonders vielseitige Befähigung bekannt ist, und er uns so als Beispiel eines besonders anspruchslosen Bakteriums dienen konnte. Ein Vergleich zwischen seinen Leistungen und denen des Paratyphus B-Bazillus versprach, Einblicke in die Mannigfaltigkeit des Bakterienstoffwechsels zu geben. Zu den Versuchen wurde ein 3 Jahre alter Laboratoriumstamm benutzt.

Im Milchsäure-Ammoniaknährboden mit 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat wächst der *Pyocyaneus* sehr üppig unter lebhafter Farbstoffbildung, auch bei Zimmertemperatur. Setzt man das Biphosphat auf $\frac{1}{10}$ und das Ammoniumlaktat auf $\frac{1}{6}$ der obigen Menge herab, so kann sich unser *Pyocyaneus* noch vermehren, während der Paratyphus B-Bazillus nicht mehr wächst. Dieser kann, wie wir sahen, nur bei $\frac{1}{4}$ des Biphosphat- und $\frac{1}{3}$ des Ammoniumlaktatgehaltes gerade noch gedeihen, während diese Konzentration für den geprüften Coli-Bazillus keine Wachstumsmöglichkeit mehr bietet. Entziehung des Kochsalzes verlangsamt das Wachstum des *Pyocyaneus* kaum. Doch bildete unser Stamm in den ersten Passagen eines solchen natrium- und zugleich chlorarmen Nährbodens keinen Farbstoff, auch nicht in 10 Tage alten Kulturen. Erst von der 7. Passage ab trat in 2—3 Tage alten Kulturen wieder Farbstoffbildung auf.

Erstaunlich geradezu ist die Fähigkeit des *Pyocyaneus*, seinen Stoffwechsel je nach den gebotenen Ernährungsbedingungen umzustellen. Wir kennen ihn als echten Saprophyten mit ausgesprochen dissimilatorischen Eigenschaften, als Bildner von pepto- und kollolytischen Fermenten. Dieses gleiche einzellige Lebewesen kann seinen Stoffwechsel auf die allerweitgehendsten Synthesen einstellen, wobei die Spaltungen auf ein Minimum herabgesetzt sind.

In einem Karbonat-Ammoniaknährboden mit 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,34 Proz. Natriumbikarbonat, der in dieser Zusammensetzung die gewünschte Alkaleszenz hat, vermochte sich unser Stamm zu vermehren. Dabei wuchs er langsam, aber stetig von Passage zu Passage heran, meist dauerte es 4—7 Tage, bis er sich darin so weit vermehrt hatte, daß sich deutliche Trübung des Nährbodens und im hängenden Tropfen reichlichere, zum Teil bewegliche Stäbchen zeigten. Setzte man einen solchen Nährboden anders zusammen, indem man die gleichen Ionen in Form anderer Salze in die Lösung einbrachte, aber das Wesentliche, die Form der Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, beibehielt, so beobachtete man ebenfalls Wachstum des *Pyocyaneus* und sicherte dadurch seine Resultate. So vermehrte er sich auch in einem Nährboden aus 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumkarbonat. Hierin fehlte sogar noch das Sulfat. Gegen die in dieser Nährlösung stärkere alkalische Reaktion war gerade der *Pyocyaneus* weniger empfindlich.

Wir wollen nochmals daran erinnern, daß es uns bei diesen mit dem *Pyocyaneus* angestellten Versuchen auf einen Vergleich mit dem Paratyphus B-Bazillus ankam. In dem Karbonat-Ammoniaknährboden wächst der Paratyphus B-Bazillus nicht, wohl aber unser *Pyocyaneus*.

Wir sind uns dabei dessen bewußt, daß unsere Versuchsanordnung zur Entscheidung der Frage, ob der *Pyocyaneus* wirklich allein von diesen anorganischen Substanzen dauernd leben kann, insofern nicht einwandfrei ist, als sie z. B. die in der Luft enthaltenen Spuren flüchtiger organischer Stoffe nicht ausschließt; diese könnten dem anspruchslosen *Bacillus pyocyaneus* vielleicht zur Vermehrung verhelfen, wie dies nach Beijerinck und van Delden¹⁾ für den *Bacillus oligo-carbophilus* der Fall ist. Wäre durch eine exakte Versuchsanordnung jede derartige Fehlerquelle ausgeschaltet, so müßte man folgern, daß in diesem Karbonat-Ammoniaknährboden das Ammonium als einzige oxydierbare Substanz die Energiequelle sein muß. Der *Pyocyaneus* wäre dann im gleichen Sinne kohlenstoff-autotroph wie die Nitrosobakterien Winogradskys²⁾.

Auch aus ameisensauren Salzen vermag der *Pyocyaneus*, im Gegensatz zu *Paratyphus B-* und *Coli-*Bazillen, seinen Kohlenstoff- und Energiebedarf zu decken. Gibt man ihm 0,5 Proz. Kochsalz, 0,6 Proz. Ammoniumphosphat, 0,4 Proz. Natriumformiat, so zeigt er ein allmählich mit steigender Passagenzahl kräftiger werdendes Wachstum, bildet Farbstoff und ist beweglich. Auch wenn das Ammonium an Schwefelsäure gebunden und die Phosphorsäure als Kalisalz vorhanden ist, wächst er ebenso gut, und es bedeutet die Zugabe von Schwefelsäure keine Verbesserung des Nährbodens.

Gerade in diesen allereinfachsten Nährgemischen mit dem ausgiebigsten Zwang zu schwerer synthetischer Arbeit, wie in den zuletzt besprochenen Karbonat- und Formiat-Ammoniaknährböden ist das Phänomen der Anpassung an diese Verhältnisse besonders deutlich. Mit steigender Zahl von Passagen bessert sich das Wachstum. Dies spricht gerade im entgegengesetzten Sinn wie der sich immer wieder vordrängende Gedanke an Reservestoffe, die im Leibe der Bakterien aus der Zeit ihres Lebens in Bouillon zurückgeblieben sein könnten, oder wie der Verdacht, daß die Spuren von Nährmaterial, die bei der ersten Beimpfung des künstlichen Nährbodens vom Nähragarröhrchen übertragen werden, das Wachstum unterhalten.

Auch mit Oxalsäure, als einziger Kohlenstoffquelle, kann unser *Pyocyaneus* wachsen, und zwar weit besser als *Paratyphus B-* oder *Coli-*Bazillen. Milchsäure, Zitronensäure und Bernsteinsäure liefern gute Wachstumsbedingungen. Aber auch von Traubenzucker als einziger Kohlenstoffquelle vermag der *Pyocyaneus* zu leben. Von älteren Autoren, z. B. von A. Fischer³⁾ wird angegeben, daß der *Pyocyaneus* Kohlehydrate spalten kann. In den neueren Büchern fehlt diese Angabe, oder es wird betont, daß der *Pyocyaneus* Kohlehydrate nicht angreift. Es läßt sich aber zeigen, daß er in einem Nährboden, der nur 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,5 Proz. Ammoniumsulfat, 0,5 Proz. Traubenzucker als einzige Kohlenstoffquelle und Natronlauge als Alkalisierungsmittel enthält, gut wächst; dabei wird die Reaktion erst etwas stärker alkalisch, dann ganz allmählich sauer. In einem Milchsäure-Ammoniaknährboden mit Traubenzuckerzusatz ist, wie sich durch Titration leicht feststellen läßt, die Reaktion etwa vom

1) Beijerinck u. van Delden, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. 1903.

2) Winogradsky, zit. nach Löhnis, Handb. d. landwirtschaftl. Bakteriologie. Berlin 1910.

3) Fischer, A., Vorlesung. üb. Bakterien. Jena 1903.

10. Tage ab weit weniger alkalisch, als wenn der Traubenzucker fehlt. Diese Säurebildung beweist die Spaltung des Kohlehydrates.

Aber auch in bezug auf die Stickstoffgewinnung reichen die Fähigkeiten des *Pyocyaneus* weiter als die des *Paratyphus B-Bazillus* und der übergroßen Zahl der übrigen Bakterienarten. Es ist ja bekannt, daß er Nitrate reduzieren kann. Und er ist imstande, aus Nitraten und Nitriten allein seinen Stickstoffverbrauch zu bestreiten. Wir setzten Nährböden aus 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Natriumlaktat als einziger Kohlenstoffquelle und Natriumnitrat oder Natriumnitrit als einziger Stickstoffquelle (mit Natronlauge alkalisiert) zusammen. In beiden Nährböden wächst der *Pyocyaneus* üppig unter lebhafter Farbstoffbildung in jeder Passage innerhalb 1 Tages von wenigen Keimen bis zu milchiger Trübung heran. Durch Reduktion des Nitrates bringt er den Stickstoff in eine zum Ausgangspunkt seiner Eiweißsynthese geeignete Form. Diese Reduktion ist mit einer Arbeitsleistung verknüpft, und er gewinnt die hierfür nötige Energie durch Oxydation der Milchsäure. Was macht er, wenn man ihm diese Energiequelle entzieht und statt Milchsäure Karbonat gibt? Wie gesagt, ist unser Stamm imstande, in einem Karbonat-Ammoniaknährboden zu wachsen, und darin ist das Ammoniak als Energiequelle zu betrachten. In einem Karbonat-Nitratnährboden aber, der 0,4 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,4 Proz. Natriumnitrat und 0,5 Proz. Natriumbikarbonat enthält, kann er sich nicht vermehren. Hierin fehlt ihm die Energiequelle, um durch Reduktion des Nitrates den Stickstoff in eine assimilierbare Form zu bringen. Hier also liegt die natürliche Grenze der synthetischen Leistungsfähigkeit des *Bacillus pyocyaneus*.

Wir haben so dem *Paratyphus B-Bazillus* und den ihn prinzipiell gleichenden Bakterien in dem *Pyocyaneus* ein Bakterium gegenübergestellt, das zu noch viel weitergehenden Synthesen befähigt und mit einer ganz erstaunlichen Vielseitigkeit in der Einstellung seiner Stoffwechselprozesse begabt ist.

Wir wenden uns jetzt den Verwandten des *Paratyphus B-Bazillus* zu und wollen untersuchen, wieweit sich ihre Verwandtschaft in ihren Ernährungsbedürfnissen dokumentiert. Die **Gärtner-, Vol-dagsen-, Mäusetyphusbazillen** verhalten sich ernährungsphysiologisch, wie entsprechende Versuche lehrten, dem *Paratyphus B-Bazillus* gleich. Sie sind in diesen einfachen künstlichen Nährgemischen so wenig zu unterscheiden, wie bei der üblichen kulturellen Prüfung in den gebräuchlichen Nährböden; die genannten Bakterien gedeihen aërob gut im Milchsäure-Ammoniaknährboden, Citronensäure-Ammoniaknährboden, Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden und Traubenzucker-Ammoniaknährboden, jeweils ohne und mit Zusatz von Magnesiumsulfat, Kalziumchlorid und Eisen. Anaërobes Wachstum war in diesen Nährböden auch mit Traubenzucker als zweiter Energiequelle nicht zu erzielen. So wenig wie der *Paratyphus B-Bazillus* konnten sie sich im Milchsäure-Nitrat- oder Milchsäure-Nitritnährboden dauernd in Passagen vermehren. *Paratyphus B-* und *Gärtner-Bazillen* sind nur durch ihre antigenen Eigenschaften verschieden. Diese werden, wie in der 1. Mitteilung besprochen, von jeder Rasse auch bei Entwicklung unter den gleichen primitivsten Ernährungsbedingungen zur Ausbildung gebracht.

Das Hauptinteresse beanspruchen in diesem Zusammenhange die **Paratyphus A- und Typhusbazillen**. Diese sind nach manchen Literaturangaben in ihren synthetischen Fähigkeiten prinzipiell vom Paratyphus B-Bazillus und Coli-Bazillus verschieden. Für den Typhusbazillus ist dies gegenüber dem Coli-Bazillus z. B. von Capaldi und Proskauer¹⁾, für den Paratyphus A-Bazillus von Kisch²⁾ auch gegenüber dem Paratyphus B-Bazillus beschrieben worden. Doch haben beide Arbeiten nur auf diese Verschiedenheit und die sich daraus ergebende Möglichkeit der praktischen Differenzierung Wert gelegt, und haben die Ernährungsbedürfnisse dieser beiden von Paratyphus B- und Colibazillen verschiedenen Bakterienarten nicht eingehender in Nährböden bekannter chemischer Zusammensetzung untersucht.

van Loghem³⁾ hat in einer kurzen, aber sehr wichtigen Arbeit berichtet, daß die Angabe Fischers⁴⁾, der Typhusbazillus vermöge Ammoniak nicht zu assimilieren, dahin ergänzt werden muß, daß es Typhusstämmen gibt, die diese Fähigkeit besitzen. Seine Angaben wurden von Kisch⁵⁾ bestätigt. Auch wir können auf Grund eingehender Untersuchungen sagen, daß derartige Typhusstämmen vorkommen. Wir fanden unter 15 geprüften Stämmen zwei solche. Wegen der grundsätzlichen Wichtigkeit dieser Tatsache in bezug auf die Stellung von Typhus- zu Paratyphus B-Bazillen wollen wir über diese Ammoniak assimilierenden Typhusstämmen später gesondert berichten. In dieser Mitteilung sollen nur die Ernährungsbedürfnisse der Ammoniak nicht assimilierenden Typhusstämmen besprochen werden, weil sie die Mehrzahl bildeten. Gleichzeitig sollen die Paratyphus A-Bakterien abgehandelt werden, weil sie sich genau so wie die hier zu besprechenden Typhusstämmen verhielten.

Wir haben 3 Typhus- und 2 Paratyphus A-Stämme in folgender Hinsicht geprüft. Diese waren im Milchsäure-Ammoniaknährboden nicht zum Wachstum zu bringen. Wir versuchten zuerst, durch Zusatz der dem obigen Nährboden fehlenden chemischen Elemente eine für diese beiden Bakterienarten geeignete einfache Nährlösung zu finden. Wir stellten deshalb 8 weitere Nährgemische her, die alle Kochsalz und Biphosphat und Ammoniumlaktat enthielten und dazu entweder 0,5 Proz. Natriumsulfat oder 0,05 Proz. Kalziumchlorid oder 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, oder Spuren von Eisenchlorid oder Eisensulfat. Diese Zusätze haben wir weiter so kombiniert, daß entweder das Kalzium- oder das Magnesiumsalz mit Eisen oder das Magnesium- mit dem Kalziumsalz oder alle genannten Verbindungen zusammentrafen. In keinem dieser Nährböden waren Paratyphus A- oder diese Typhusbazillen zum Wachstum zu bringen. In der Meinung, daß vielleicht eine höhere Kohlenstoff- und Energiequelle hierin das Wachstum doch noch erwirken könnte, haben wir die Milchsäure durch Zitronensäure oder Bernsteinsäure ersetzt. Weiter haben wir jedem der obigen 8 Nährböden entweder 1 Proz. Mannit oder 1 Proz. Traubenzucker oder 1 Proz. Maltose zugefügt. Auch aus keiner dieser Kombinationen vermochten sich die beiden in Frage stehenden Bakterien dauernd aufzubauen. Zwar ließ sich gelegentlich in der 1. oder 2. Passage

1) Capaldi und Proskauer, l. c.

2) Kisch, l. c.

3) van Loghem, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57. 1911.

4) Fischer, A., l. c.

5) Kisch, B., l. c.

der mannit- oder maltosehaltigen Nährböden geringe Vermehrung beobachten, dann aber rissen die Passagen regelmäßig ab.

Wurde das Ammoniak durch Nitrat ersetzt oder dem Ammoniak Nitrat hinzugefügt, so blieben die Wachstumsverhältnisse dieselben. Es mußten also prinzipielle ernährungsphysiologische Unterschiede zwischen Paratyphus B- und diesen Typhus- resp. Paratyphus A-Bazillen bestehen.

Wir sind deshalb dazu übergegangen, den Stickstoff an Kohlenstoff gebunden zu verabreichen; wir haben Aminosäuren dargeboten, und zwar wurden sie dem Milchsäure-Ammoniaknährboden zugefügt. Weder 0,5 Proz. Glykokoll oder 0,5 Proz. d-Alanin noch 0,5 Proz. l-Leuzin, 0,25 Proz. Asparaginsäure, 0,4 Proz. Asparagin, 0,5 Proz. Glutaminsäure oder 0,5 Proz. l-Zystin genügten, um unter diesen Verhältnissen, selbst bei reichlichster Sauerstoffzufuhr, diese Typhus- oder Paratyphus A-Bazillen zum Wachstum zu bringen. Auch 0,25 Proz. l-Tyrosin reichte dazu nicht aus. Setzten wir gleichzeitig mit diesen Aminosäuren die oben aufgezählten anorganischen Salze hinzu, so wurde ebenfalls keine Vermehrung beobachtet. Ebenso wenig führte eine Zugabe von 1 Proz. Traubenzucker zu allen diesen Nährböden zum Ziel. Erst der Zusatz von l-Tryptophan zum Milchsäure-Ammoniaknährboden rief regelmäßiges, von Passage zu Passage verfolgbares Wachstum dieser beiden Bakterienarten hervor. Vergegenwärtigt man sich die Konstitution dieser Aminosäuren und bezeichnet sie nach ihrer chemischen Zusammensetzung, so ergibt sich aus diesen Versuchen: Der Paratyphus B-Bazillus kam, wie wir sahen, mit Ammoniak und einer Oxypropionsäure dauernd aus. Die hier behandelten Typhus- und Paratyphus A-Bazillen hingegen konnten sich auch dann nicht vermehren, wenn ihnen die Aminopropionsäure, die zweibasische Aminobernsteinsäure oder Aminoglutarinsäure oder das Oxyphenylalanin mit seinem fertig vorgebildeten Kohlenstoffring zur Verfügung standen. Erst das Indolalanin mit seiner heterozyklischen Komponente konnte als Ausgangspunkt der Synthese dienen.

Dabei soll betont werden, daß diese Resultate nur für die von uns gewählte quantitative und qualitative Nährstoffzusammenstellung bewiesen sind. Wir halten es nicht für ausgeschlossen, daß andere Kombinationen und besonders andere gleichzeitig vorhandene Kohlenstoffverbindungen zu anderen Ergebnissen bezüglich der Verwertung dieser Aminosäuren führen und daß auch in dieser Beziehung gerade so wie bei der Ammoniakassimilation nicht alle Stämme übereinstimmen. So gibt A. Fischer¹⁾ und Kisch²⁾ an, daß einige ihrer Typhusstämme mit Asparagin als einziger Stickstoffquelle auskommen können. Doch teilt letzterer nicht mit, ob er Wachstum in mehreren Passagen beobachtet hat. Man muß seiner Arbeit vielmehr entnehmen, daß diese Versuche nur in einer Passage angestellt worden sind. Außerdem benutzte er feste Nährböden, auf denen nach seinen eigenen Angaben bereits anspruchslosere pathogene Bakterien ohne Zusatz einer Stickstoffquelle wuchsen!

Betrachten wir nun das Verhalten eines Typhus- und eines Paratyphus A-Stammes in diesem Milchsäure-Ammoniak-Tryptophannährboden, der 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat und 0,4 Proz. Tryptophan enthält und mit Natriumbikar-

1) Fischer, A., l. c.

2) Kisch, Br., l. c.

bonat alkalisiert ist: Sie wachsen darin bei reichlicher Sauerstoffzufuhr innerhalb 2—3 Tagen bis zu dichter Trübung des Nährbodens heran. Ersetzt man das Ammoniumlaktat durch das Tryptophan, fügt dies also nicht dem Ammoniumlaktat, wie bisher besprochen, hinzu, so vermag weder Typhus- noch Paratyphus A-Bazillus zu wachsen, und zwar ist das Unentbehrliche dabei nicht das Ammoniak, sondern die Milchsäure; denn 0,5 Proz. Tryptophan, 0,6 Proz. milchsaures Natrium mit 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,5 Proz. Kochsalz, wie oben alkalisiert, genügen zum Wachstum. Die Milchsäure ist darin durch andere Kohlenstoffverbindungen, z. B. durch Traubenzucker, ersetzbar. Damit haben wir den einfachsten Nährboden, der nach unseren Untersuchungen ein dauerndes Wachstum der hier besprochenen Typhus- und Paratyphus A-Bazillen bei reichlicher Sauerstoffzufuhr gewährleistet.

Sehr deutlich beschleunigt wird ihre Vermehrung durch Zugabe von 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, 0,05 Kalziumchlorid und Spuren von Eisensulfat. Ein solcher Nährboden ist schon 24 Std. nach der Beimpfung mindestens so stark gewachsen wie eine Bouillon.

Sowohl Typhus- wie Paratyphus A-Bazillen bleiben in diesen tryptophanhaltigen Nährböden wochenlang lebensfähig. Was das morphologische Verhalten betrifft, ist eine so typische Formveränderung, wie wir sie bei den Paratyphus B-Bazillen beschreiben konnten, beim Typhusbazillus nicht zu beobachten. Weder in frischen noch älteren Kulturen dieses Nährbodens war eine Eigenbewegung der Stäbchen zu sehen. Orientierende morphologische Untersuchungen, unter Benützung der Zettnowschen Geißelfärbungsmethode, ergaben wiederholt nur geißellose Typhusbazillen, während eine gleichalte Bouillonkultur desselben Stammes reichliche Begeißelung aufwies. Trotzdem also durch diesen Nährboden dauernde und rasche Vermehrung ermöglicht wird, ist doch die Beanspruchung des Bakteriums durch die weitgehenden Synthesen und die geringen verfügbaren Energievorräte so groß, daß, wie beim Hunger, die Ausbildung nicht lebensnotwendiger Teile des Körpers unterbleibt. Wie wir sahen, ist dies beim Paratyphus B-Bazillus auch in weit einfacheren Nährböden nicht oder nicht in demselben Maße der Fall. Auch hieraus geht hervor, wieviel anspruchsvoller die hier behandelten Typhus- und Paratyphus A-Bazillen sind.

Die in den einfachen Nährböden gezüchteten Typhus- und Paratyphus A-Bazillen haben ihre Agglutinabilität gegenüber Immunsera, die mit in bouillonhaltigen Nährböden gezüchteten Bakterien gewonnen worden sind, behalten. Wir haben Grund zur Annahme, daß solche Bakterien in bezug auf ihren Agglutinogengehalt mit den auf gewöhnlichen Nährböden gezüchteten nicht identisch sind, sondern sich ähnlich wie die auf karbolhaltigem oder nährstoffarmem Nähragar gewachsenen [Braun und Schaeffer¹), Braun²), Feiler³)] und analog wie die im Milchsäure-Ammoniaknährboden kultivierten Paratyphus B-Bakterien verhalten [Cahn-Bronner⁴)].

Dieser einseitig assimilatorische, mit ganz geringen Spaltungen ablaufende Stoffwechsel macht sich auch bei diesen beiden Bakterienarten in ihrem Sauerstoffbedürfnis geltend. Man beobachtet hier, auf die Verhältnisse des Typhusbazillus übertragen, ganz das Gleiche, wie bei Paratyphus B- und Coli-Bazillen. In diesen einfachen trypto-

1), 2), 3), 4) l. c. in der 1. Mitteilung.

phanhaltigen Nährböden können diese Typhus- und Paratyphus A-Bazillen nicht anaërob wachsen. Auch ein Zusatz von Sulfat, Kalzium-, Magnesium- oder Eisensalzen macht ihnen den Sauerstoff im Milchsäure-Tryptophannährboden nicht entbehrlich.

Was den **Dysenteriebazillus Shiga-Kruse** betrifft, so zeigte Kisch¹⁾, daß es Stämme gibt, die Ammoniak assimilieren können, während andere dies nicht vermögen. Wir können diese Tatsache mit unseren Erfahrungen bestätigen. Von 8 untersuchten Stämmen wuchsen 6 im Milchsäure-Ammoniaknährboden, 2 dagegen nicht. Ueber die ersteren soll später in anderem Zusammenhange berichtet werden; von den letzteren haben wir einen Stamm zusammen mit den eben besprochenen Ammoniak nicht assimilierenden Typhus- und Paratyphus A-Stämmen in den oben angeführten Nährböden geprüft.

Dieser Dysenteriebazillus Shiga-Kruse verhält sich durchaus ähnlich wie die beschriebenen Typhus- und Paratyphus A-Bazillen und ebenso wie diese grundverschieden gegenüber Paratyphus B-Bazillen. Auch er wächst auf keinem Milchsäure-Ammoniaknährboden, weder nach Zusatz anorganischer Verbindungen noch anderer Kohlenstoff- und Energiequellen. Von den Aminosäuren war es ebenfalls nur das Tryptophan, das ihm zum Aufbau seiner Leibessubstanz genügte. Dieser Stamm wuchs aber im Gegensatz zu den gleichzeitig untersuchten Typhus- und Paratyphus A-Bazillen im Tryptophan-Milchsäure-Ammoniaknährboden nur dann, wenn Magnesiumsulfat, Kalziumchlorid und Eisen zugegen waren. Ob alle diese mineralischen Zusätze gleichzeitig vorhanden sein müssen, konnten wir wegen der Knappheit des reinen Tryptophans nicht untersuchen. Bei Sauerstoffabschluß vermag er aber auch in diesem Nährboden nicht zu gedeihen. Auch er ist also unter diesen Ernährungsbedingungen ein strenger Aërobier.

Somit haben wir in diesen Stämmen von Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bazillen eine Gruppe von Bakterien in ihren Ernährungsbedürfnissen untersucht, die sich prinzipiell von Paratyphus B- und Coli-Bazillen unterscheidet. Das Charakteristikum dieser anspruchsvolleren Bakterien ist einerseits ihre Unfähigkeit, Stickstoff selbsttätig an Kohlenstoff zu binden, andererseits ihr Vermögen, mit einem der niedersten Eiweißspaltprodukte, einer Aminosäure, auszukommen. Das Charakteristikum, Ammoniak nicht assimilieren zu können, kommt aber, wie nochmals hervorgehoben sei, nicht allen Stämmen von Typhus- und Shiga-Kruse-Bazillen zu.

Eine andere ernährungsphysiologische Gruppe von Bakterien kann vorläufig nur angedeutet werden.

Von den untersuchten Stämmen grampositiver Bakterien konnte sich keines aus Ammoniak als einziger Stickstoffquelle und einer organischen Kohlenstoffverbindung aufbauen. Weder Diphtherie-, noch Xerose-, noch Milzbrandbazillen, weder weiße oder gelbe Staphylokokken, noch lange Streptokokken, nicht einmal Heubazillen, waren in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden oder Bernsteinsäure-Ammoniaknährboden zum Wachstum zu bringen. Sie wuchsen auch nicht, wenn man dem Milchsäure-Ammoniaknährboden ein Sulfat, ein Kalzium-, Magnesium- oder Eisensalz und außerdem noch Traubenzucker zusetzte.

1) l. c.

Unsere Diphtherie- und Milzbrandbazillen konnten sich auch nach Tryptophanzusatz nicht vermehren; sie wuchsen also auch nicht auf dem für Typhusbazillen ausreichenden Nährböden, nicht einmal, wenn diesem noch Traubenzucker zugefügt wurde.

Diese beiden Keime gehören demnach ernährungsphysiologisch wieder einer anderen Gruppe von Bakterien an, die, im Gegensatz zu Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bazillen, unter den gewählten Bedingungen sich nicht mehr von den niedersten Eiweißspaltprodukten aufbauen können. Sie sind also in ihrer synthetischen Fähigkeit noch weiter beschränkt. Es gilt aber nicht allgemein, wie man das aus dem Gesagten vielleicht entnehmen könnte, daß kein grampositives Bakterium die Aminosäuren als Stickstoffquelle benützen kann. Das ist vom Heubazillus bekannt (C. Fränkel)¹⁾. Auch unser Stamm vermehrte sich im Milchsäure-Ammoniaknährboden nach Zusatz von Asparaginsäure, Tyrosin oder Tryptophan.

Wir haben so die synthetischen Fähigkeiten des Paratyphus B-Bazillus und seiner Verwandten vergleichend untersucht und uns über die Ernährungsbedürfnisse einiger anderer Bakterienarten orientiert.

Dabei hat sich ein so weitgehendes Assimilationsvermögen, eine solche Vielseitigkeit des Stoffwechsels einer und derselben Art und eine solche Anpassungsfähigkeit an die gebotenen Ernährungsbedingungen ergeben, wie sie anderswo in der Natur, bei Pflanze und Tier, nicht angetroffen wird. Es ist, wie mit Recht schon Kisch hervorgehoben hat, von besonderem Interesse, daß Arten, die als nahe verwandt angesehen werden, wie z. B. Paratyphus A- und B-Bazillen, in ihren synthetischen Fähigkeiten so prinzipiell verschieden sind. Dabei drängt sich unwillkürlich die Frage auf, ob in diesen Fällen die Annahme einer engen Verwandtschaft überhaupt berechtigt ist. Vom ernährungsphysiologischen Standpunkt müssen wir annehmen, daß der Paratyphus A- mit dem Typhusbazillus weit näher verwandt ist als mit dem den gleichen Namen tragenden Paratyphus B-Bazillus, und es wird diese Ansicht durch die pathogenen Eigenschaften dieser Bakterienart gestützt (E. Lehmann)²⁾. Aber wie sich bisher bei den Spaltpilzen jede Einteilung, die sich auf eine einzige Eigenschaft gründete, als unbefriedigend erwies, so darf selbstverständlich die synthetische Fähigkeit nicht allein als Einteilungsprinzip gelten. Nur verdient sie sicherlich auch bei den pathogenen Keimen für die Aufstellung von Gruppen und Arten im System der Bakterien eine größere Berücksichtigung als bisher.

Es müssen systematische Untersuchungen über die Ernährungsbedürfnisse auch anderer Bakteriengruppen in Angriff genommen werden. Dadurch wird Aufschluß auch über deren synthetische Leistungen gewonnen, und es ergeben sich daraus Unterscheidungsmerkmale, die bei den bisherigen Differenzierungsverfahren nicht zum Ausdruck kommen können. Die Ergebnisse derartiger bisher in der Literatur niedergelegter und der hier besprochenen Versuche haben nur deshalb für die praktische Differenzierung der Bakterien eine beschränkte Bedeutung, weil sie sämtlich gerade mit Keimen der Coli-, Paratyphus-, Typhus-

1) Fränkel, C., l. c.

2) Lehmann, E., Zeitschr. f. Hyg. Bd. 81. 1916.

Gruppe angestellt worden sind, und wir gerade dabei über wohlbewährte diagnostische Methoden verfügen, so daß nach neuen kein Bedürfnis vorliegt. In anderen, weniger durchgearbeiteten Bakteriengruppen aber sind die Differenzierungsverfahren in weit höherem Maße ergänzungsbedürftig.

Nach unserer Ansicht liegt aber die Bedeutung solcher systematischer Versuche hauptsächlich auf anderem Gebiet; Unterscheidungsmerkmale von theoretischem oder praktischem Wert mögen sich dabei gelegentlich von selbst ergeben. Die Züchtung der Bakterien in Nährböden, die nur das Unentbehrliche und dieses in bekannter chemischer Form enthalten, soll vielmehr eine **Arbeitsmethode** für die Erforschung ihrer physiologischen Eigenschaften sein.

Der Ablauf des Bakterienstoffwechsels und die Untersuchung der Stoffwechselprodukte werden unter solchen übersichtlichen chemischen Verhältnissen der Bearbeitung in ganz anderem Maße zugänglich, als in den üblichen Nährböden unbekannter, schwankender Zusammensetzung.

Unter solchen Stoffwechselprodukten haben die Gifte und Fermente ein besonderes biologisches Interesse. Die Frage, ob die Bakterien in diesen einfachen Nährgemischen Toxine bilden, war der Ausgangspunkt der ältesten Arbeiten mit „eiweißfreien Nährböden“. Eine Antwort ist diesen Autoren¹⁾ nicht gelungen, denn es fehlte für die pathogenen Keime die systematische Durcharbeitung der Methode. Es wäre wichtig, zu untersuchen, unter welchen Ernährungsbedingungen Toxine gebildet werden, weil man so über die Entstehungsweise der Gifte etwas erfahren kann. Jacoby²⁾ hat für die Fermente mit dieser Methode die Grundlagen ihrer Bildung und Wirkung studiert. In engster Beziehung zu solchen Fermentversuchen steht die Bearbeitung zahlreicher chemisch-physiologischer Fragen des Bakterienstoffwechsels. Die Spaltprodukte, welche bei der Dissimilation komplizierter Verbindungen entstehen, werden qualitativ und quantitativ faßbarer, während dies oft in den Nährböden unbekannter Zusammensetzung unmöglich ist. Eine solche Bearbeitung der Spaltungen und Synthesen von Kohlehydraten und Eiweißkörpern greift über auf das Gebiet der Biochemie.

Diese ernährungsphysiologische Betrachtung führt aber auch zu rein biologischen Fragen, die nicht mit chemischen Methoden zu lösen sind. Die Beziehungen zwischen den Ernährungsverhältnissen und der Entwicklung der äußeren Gestalt, der Lebensfähigkeit, der Virulenz, der Widerstandsfähigkeit gegen Schädlichkeiten verschiedener Art sind zu untersuchen. Das antigene Verhalten der Mikroorganismen bei verschiedenem Ablauf der Stoffwechselprozesse ist zu prüfen.

Von diesen angedeuteten Untersuchungen sind einige abgeschlossen, andere im Gange. In der nächstfolgenden Mitteilung soll eine spezielle Lebensäußerung der Bakterien, nämlich die Fähigkeit, sich ohne Sauerstoff zu vermehren, in einen experimentellen Zusammenhang mit solchen ernährungsphysiologischen Versuchen gebracht werden.

1) Uschinsky, Centralbl. f. Bakt. Bd. 14; Fränkel, C., l. c.

2) Jacoby, M., Biochem. Zeitschr. Bd. 74. 1916. S. 77; Bd. 79—81, 83 u. 84. 1917; Bd. 85—88. 1918.

In den bis jetzt besprochenen Versuchen der 1. und 2. Mitteilung sollte versucht werden, am Beispiel des Paratyphus B-Bazillus und seiner Verwandten für alle diese angedeuteten Fragestellungen eine systematische Grundlage zu geben. Der leitende Gesichtspunkt ist, das Unentbehrliche für das Leben einer Bakterienart zu bestimmen, um dann unter diesen bekannten und vereinfachten chemischen Verhältnissen biologische und physiologische Fragen bearbeiten zu können.

Nachdruck verboten.

Eine neue, einfache Serodiagnostik der Syphiliskranken mittels Ausflockungsreaktion.

Von Prof. Dr. H. Kodama,

Direktor des Instituts für Hygiene und Bakteriologie der Medizinischen Hochschule
in Kanazawa, Japan.

Es ist mir bekannt, daß Porges und Meier, Porges, Neubauer, Elias und Salomon, Hermann und Perutz, Jacobsthal, Bruck und Hidaka, Klausner u. a. über Serodiagnostik der Syphilis mittels Ausflockungsreaktion berichtet haben, und als im Oktober 1920 die „Experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten“ von Kolle und Hetsch, 5. Aufl. in meine Hände gelangte, lernte ich nun auch die neue Methode der Serodiagnostik der Syphilis von Meinicke und die von Sachs und Georgi kennen. Da ich nun der Meinung bin, daß diese neuen Methoden der letztgenannten Autoren im Prinzip der von mir gefundenen Methode, über die ich bereits 1918 berichtet habe, sehr ähnlich sind, so möchte ich hier im folgenden meine Methode kurz darstellen:

Seit 1913 habe ich mich mit der Ausflockungsreaktion des Syphilitikerserums durch Schichtproben (Ringproben) mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem verdünnten alkoholischen Herz- oder Leberextrakte des normalen Meerschweinchens beschäftigt, um eine einfache serodiagnostische Methode zu finden.

Meine Bemühungen sind auch von recht guten Erfolgen begleitet gewesen, aber anfangs war mir bei der Verdünnung des Antigens ein Fehler unterlaufen, so daß es mir nicht gelang, die gewünschte, immer konstant klare Flüssigkeit zu gewinnen. Meine Versuche ergaben zuweilen eine opaleszierende, zuweilen klare Flüssigkeit, ohne daß es mir damals möglich gewesen wäre, die Ursache hiervon zu erkennen. Wenn ein solches opaleszierendes Antigen zur Schichtprobe verwendet wurde, so bildete sich des öfteren durch einen mechanischen Niederschlag ein Pseudoring, der der echten Ringbildung sehr ähnlich war¹⁾.

1) Die Resultate meiner damaligen Forschungen habe ich seinerzeit in der Japanischen Medizinischen Zeitschrift Kenbikio unter der Bezeichnung: „Ausflockungswirkung des Syphilitikerserums“ veröffentlicht. Seitdem habe ich weitere Versuche angestellt, um konstante, klare Verdünnung des Antigens zu gewinnen, was mir auch schließlich durch die unten beschriebene Verdünnungsmethode gelungen ist. Zu

Mein Verfahren ist folgendes:

1) Herstellung des Antigens.

Zuerst wird das Herz (oder die Leber) eines normalen Meerschweinchens ganz fein zerschnitten und mit Aether (1 : 20) bei Zimmer-temperatur 2 Tage lang extrahiert; alsdann wird der Aether abgegossen und nochmals frischer Aether zugesetzt und das Ganze kräftig geschüttelt; dann wird der Aether sogleich wieder abgegossen, weil die extrahierte Substanz durch Aether für das Syphilitikerserum nicht spezifisch ist. Dem derart behandelten Organ wird nun absoluter Alkohol (1 : 5) zugesetzt, worauf es dann 1—2 Wochen lang extrahiert wird. Daso gewonnene Antigen kann jahrelang aufbewahrt werden, ohne daß die wirksame Substanz irgendwelche Veränderung erleidet. Die alkoholischen Extrakte aus den Herzen von Rindern und Kaninchen und aus dem Eigelb sind nicht besonders geeignet, da sie die reagierenden Substanzen in geringeren Mengen enthalten als die aus den Herzen von Meerschweinchen.

2) Verdünnungsmethode des Antigens.

Wenn ein alkoholisches Organextrakt mit destilliertem Wasser oder einer 0,1-proz. Sodalösung verdünnt wird, so kann man zwar eine ganz klare Flüssigkeit gewinnen, aber es zeigt sich dabei, daß bei der Ueberschichtung mit einem syphilitischen oder einem nichtsyphilitischen Serum beide ohne Unterschied ausgeflockt werden. Eine Trübung bzw. Opaleszierung wird nach meiner Erfahrung auch bei der durch physiol. Kochsalzlösung aus dem alkoholischen Organextrakte gewonnenen, verdünnten Flüssigkeit hervorgerufen, und zwar einerseits durch den Sauerstoff in der Luft und andererseits wahrscheinlich durch den Einfluß der in der physiol. Kochsalzlösung enthaltenen Cl-Ionen. Durch folgendes Verfahren erhält man eine geeignete klare Flüssigkeit:

Man tut zuerst 4,5 ccm einer physiol. Kochsalzlösung in ein Reagenzglaschen; dann werden mit einer 1 ccm haltenden Pipette, deren Spitze einen möglichst weiten Mund hat, 0,5 ccm Antigen abgesaugt. Taucht man nun die Spitze dieser antigenhaltigen Pipette bis auf den Boden der physiol. Kochsalzlösung ein und bläst dann den Inhalt der Pipette plötzlich und rasch in die Lösung hinein, so kann eine ganz klare Flüssigkeit gewonnen werden. In dem Falle, wo auch bei diesem Verfahren keine klare Flüssigkeit erhalten wird, muß das alkoholische Organextrakt vor der Verdünnung durch die Kochsalzlösung durch absol. Alkohol (2 : 1 oder 1 : 1) verdünnt werden. Eine derart hergestellte klare Flüssigkeit bleibt mehrere Std. lang klar; man muß daher die Verdünnung der Alkoholextrakte immer frisch herstellen.

3) Als Untersuchungsmaterial dient das Serum des zu prüfenden Pat., das vollkommen klar sein muß und durch Erhitzung auf 56° C in 30 Min. inaktiviert wird. Inaktiviertes Serum, das eine sehr deutliche Rotfärbung zeigt, bei dem also eine starke Hämolyse eingetreten ist, muß vermieden werden. Selbst wenn man ein klares, inaktiviertes Serum über Nacht im Eisschrank stehen läßt, zeigt sich bei ihm doch häufig eine kaum sichtbare, feine, flockige Trübung. Ein solches Serum wird vor seiner Verwendung einen Augenblick in ein Wasserbad

gleicher Zeit habe ich meine Untersuchungen über das syphilitische und das nicht-syphilitische Serum mit der Wassermannschen Reaktion verglichen und die diesbezüglichen Resultate unter dem Namen: Eine neue einfache Serodiagnostik der Syphiliskranken mittels Ausflockungsreaktion im Juli 1918 in der Japanischen Medizinischen Wochenschrift Ijishinschi publiziert.

von ca. 50° C, eingetaucht, wodurch das Serum sich verändert und dann mehrere Stunden lang in diesem veränderten Zustande erhält.

4) Reaktion. Im Verlauf der weiteren Untersuchung wird ein Röhrchen in das Uhlenhuthsche Reagenzglasgestell eingehängt und dann 0,1 ccm des zu prüfenden, klaren Serums mit einer graduierten Pipette (1 ccm) in dasselbe hineingetan. Hierauf wird das Serum mit 0,5—1,0 ccm des oben beschriebenen Antigens überschichtet. Man bedient sich hierbei einer Kapillarpipette und gibt acht, daß das Antigen möglichst an der Wand des Reagenzröhrchens herunterfließt. Die Reaktion läßt man bei Zimmertemperatur, nicht im Brutschrank, vor sich gehen.

5) Bei der Kontrolle muß auf zweierlei geachtet werden, nämlich: a) daß sowohl das als sicher bekannte syphilitische Serum als auch das als sicher bekannte nichtsyphilitische Serum mit dem obigen Antigen, b) daß das zu prüfende Serum mit einer 1:10-fachen verdünnten alkoholischen Kochsalzlösung überschichtet wird.

6) Wenn an den Berührungsfächen der Schichtungen ein deutlich sichtbarer, weißer Ring auftritt, so handelt es sich um Syphilis, zeigt sich aber kein solcher Ring, so leidet der Kranke nicht an Syphilis. Den Grad der Reaktion bezeichnet man a) mit ++, wenn die Reaktion schon nach Verlauf von mehreren Min., spätestens aber 1 Std. nach stattgefundener Ueberschichtung auftritt; b) mit +, wenn die Reaktion nach Ablauf von 1—2 Std. auftritt. Im übrigen soll die Reaktion nicht später als nach Ablauf von 2 Std. eintreten.

7) Die Resultate meiner unter den angeführten Bedingungen angestellten Untersuchungen über das verdächtige Syphilitiker Serum, verglichen mit den nach der Wassermannschen Methode erzielten, sind folgende:

a) das Serum von 71 verdächtigen Personen ergab nach der Wassermannschen Reaktion +++ bzw. ++, also komplette bzw. fast komplette Hemmung; nach meiner Methode fiel die Reaktion immer positiv aus (und zwar meistens mit ++, oft aber auch mit +);

b) das Serum von 14 anderen Kranken, das nach der Wassermannschen Reaktion ± zeigte, also fast komplette Hämolyse, reagierte nach meiner Methode nur negativ;

c) das Serum von 140 weiteren Kranken, das nach der Wassermannschen Reaktion nur — zeigte, reagierte nach meiner Methode in 130 Fällen negativ, in 10 Fällen aber positiv. Bemerkte sei noch, daß in diesen letzten 10 Fällen das Serum von Personen stammte, die vom klinischen Standpunkte aus der Syphilis sehr verdächtig waren (nämlich chronische Osteomyelitis, chronische Endometritis, latente Syphilis und Paralyse u. a.).

Aus obigen Tatsachen geht hervor, daß die von mir entdeckte Methode als selbständige serodiagnostische Methode für Syphilis verwendbar ist oder auch als Hilfsmethode bei der Wassermannschen Reaktion verwertet werden kann.

Literatur.

Bruck u. Hidaka, Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. Bd. 8. 1911. — Elias, Neubauer, Porges u. Salomon, Wien. klin. Wochenschr. 1908. Nr. 21. u. 23. — Hermann u. Perutz, Med. Klin. 1911. — Jacobsthal, Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. Bd. 8. 1911. — Klausner, München. med. Wochenschr. 1911. S. 73. — Kolle u. Hetsch, Die experiment. Bakteriologie u. die Infektionskrankh. 5. Aufl. — Porges u. Meier, Berlin. klin. Wochenschr. 1908.

Nachdruck verboten.

Systematische Untersuchungen an Kulturen der Hogcholeragruppe unter Berücksichtigung des Voldagsen- und Paratyphus β -Typus.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes Berlin.]

Von **P. Manteufel, H. Zschucke und H. Beger.**

Nach dem Vorschlage von Weil und Saxl (1) ist in dieser Abhandlung unter der Bezeichnung Paratyphus β eine Gruppe von menschenpathogenen Hogcholerabazillen zusammengefaßt, die sich von den bisher bekannten, bei Erkrankungen des Menschen gefundenen Paratyphus B-Bazillen im wesentlichen dadurch unterscheidet, daß sie bei der Agglutinationsprüfung zu Paratyphus B-Immunsereen nur geringe verwandtschaftliche Beziehungen erkennen läßt, während Immunsere des als Erreger einer Schweineseuche (Typhus suis, Ferkeltyphus) beschriebenen Typus Voldagsen bis zur Höhe des homologen Titers einwirken.

Bernhard (2), der als erster bei einer Reihe von Fleischvergiftungen in Brandenburg a./H. und in Elbing solche Stämme gefunden hat, bezeichnete sie deshalb als *Suipestifer*-Bazillen vom Typus Voldagsen, und dieser Auffassung haben sich spätere Untersucher wie Geissler (3), Neukirch (4), Weil und Saxl (1), Levy und Schiff (5), Dienes und Wagner (6) angeschlossen¹⁾. Geissler erhob seine Befunde bei einer Massenerkrankung an Brechdurchfall in Pommern, während die übrigen Beobachtungen auf verschiedenen außerdeutschen Kriegsschauplätzen (Kleinasien, Syrien, Wolhynien, Galizien, Balkan) gemacht wurden.

Bernhard führt seine Fälle nach den seuchenpolizeilichen Ermittlungen auf den Genuß von Rindfleisch zurück, was allerdings von Ilgner (7) bestritten wird, der das Fleisch von pestkranken Schweinen als Ursache ansieht. Geissler nimmt an, daß die betreffenden Erkrankungen nicht durch Fleischgenuß, sondern durch Vermittlung von Trinkwasser entstanden seien, das aus einem Teiche stammte, der durch Abgänge von Vieh verunreinigt war. Levy und Schiff lassen die Möglichkeit einer Infektion durch Fleisch oder Milch von Rind oder Schaf offen, während Neukirch sowie Weil und Saxl eine Nahrungsmittelvergiftung als Ursache im allgemeinen und den Genuß von Schweinefleisch im besonderen nach dem Tatbestand für ausgeschlossen ansehen.

Die Entstehungsart dieser Paratyphus β -Erkrankungen gibt mithin keine übereinstimmenden Hinweise auf die Ansteckungsquelle, und der Befund von Voldagsen-Bazillen ist besonders deshalb so auffällig, weil manche Autoren (Glässer (8), Dammann und Stedefeder (9), Pfeiler, Kohlstock und Standfuss (10)), die Voldagsenbazillen als Erreger einer von der Viruspest der Schweine abzutrennenden, selbständigen Erkrankung ansehen und die Meinung vertreten, daß der Typus Voldagsen — der Name stammt von der Domäne Voldagsen bei Braunschweig — von dem Typus *Suipestifer*, der allgemein als ein häufiger und harmloser Bewohner des Schweinedarmes angesehen wird, als eine für Ferkel hochpathogene Art abzutrennen sei. Pfeiler und Engelhardt (11) geben an, daß sie menschenpathogene Pestifer-Bazillen (Typus Kuzendorf) auch bei Menschen und Rindern gefunden hätten, und stellen die hier als Paratyphus β zusammengefaßten, menschenpathogenen Stämme ebenfalls zur Pestifer-Gruppe, weil sie kulturell durchaus verschieden von ihren Voldagsen-Ferkeltyphusbazillen seien. Uhlenhuth und Hübener (12), Händel und Gildemeister (13), sowie Joest (14) vertreten die gegenteilige Auffassung, daß die Bazillen vom Typus Voldagsen Abarten des Pestifer-Bazillus und als Erreger einer seuchenhaften Erkrankung ebensowenig

1) Auch die von Hirschfeld in Serbien gefundenen Paratyphus C-Bazillen scheinen hierher zu gehören. Lancet. Febr. 1919. S. 296; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 70. Diese Annahme ist inzwischen durch Tenbrock als zutreffend erwiesen worden. (Journ. exp. Med. Bd. 32. 1920.)

wie diese anzusehen seien. Pfeiler und Engelhardt halten zwar diese Auffassung auf Grund eigener und der Versuche von Tormann (15), der bei normalen Schweinen zwar Pestifer-Bazillen, aber niemals Voldagsenbazillen fand, für widerlegt, aber von unparteiischer Seite liegen zu dieser Frage noch keine Untersuchungen vor, so daß man den Befund von Voldagsenbazillen beim Menschen als neuen Gesichtspunkt in der vielumstrittenen Frage nach der Herkunft der Paratyphusinfektionen bezeichnen muß.

R. Müller und Bitter (16) sind auf Grund ihrer Erfahrungen der Meinung, daß man bei den Paratyphusinfektionen des Menschen die typhusähnlich verlaufenden Fälle, die gewöhnlich durch Kontakt von Mensch zu Mensch übertragen werden, von den Fleischvergiftungen, die auf den Genuß von Fleisch kranker Tiere zurückzuführen sind, scharf trennen müsse. Dieser Meinung hat sich neuerdings von klinischen Gesichtspunkten aus auch Schittenhelm (17) angeschlossen. Während als Erreger des menschlichen Paratyphus der Bazillus Schottmüller und der Paratyphus A zu gelten haben, sind nach Bitter als Fleischvergifter bisher der *Bacillus enteritidis* Gärtner und Flügge-Känsche (Breslau) bekannt. Von den beiden letztgenannten unterscheidet sich der Gärtner-Typus auch serologisch vom Paratyphus Schottmüller. Bei den Enteritis-Breslau-Stämmen ist das nicht ganz einwandfrei möglich, dagegen lassen sich diese nach Bitter vom Typus Schottmüller dadurch abgrenzen, daß sie in älteren Kulturen keine Schleimwälle und auf Raffinoseagar keine Knöpfe bilden, sowie ebenfalls im Gegensatz zum Bazillus Schottmüller bei weißen Mäusen vom Magendarmkanal aus eine septische Erkrankung verursachen. Da die Paratyphus β -Bazillen im ganzen weder auf Paratyphus B- noch auf Gärtner-Sera stark reagieren, wären sie also nach dieser Auffassung in keine der beiden Fleischvergiftergruppen einzureihen. Damit ist aber auch die Frage der serologischen Einheitlichkeit in der Paratyphus B-Gruppe engeren Sinnes (ausschließlich der Gärtner-Bazillen), andererseits auch die serologische Identität der Paratyphus B- und Pestifer-Gruppe in Frage gestellt, und ungeachtet der gewaltig angeschwollenen Paratyphusliteratur — die letzte Zusammenstellung von Loele (18) aus dem Jahre 1915 umfaßt 919 Nummern — ist die Aetiologie der Paratyphusinfektionen des Menschen unklarer als je.

In Fortsetzung der früheren Arbeiten aus der bakteriologischen Abteilung des Gesundheitsamtes haben wir deshalb die Angelegenheit unter Berücksichtigung der neu aufgetretenen Gesichtspunkte nach folgenden zwei Richtungen einer erneuten Prüfung unterzogen:

1) Gehören die als Erreger von menschlichen Epidemien angesehenen Paratyphus β -Bazillen zum Typus Voldagsen?

2) Ist mit den gegenwärtigen Untersuchungsmethoden eine praktisch brauchbare Differenzierung innerhalb der Hogcholera-Gruppe engeren Sinnes (Paratyphus B, Paratyphus β , Suipestifer, Voldagsen) möglich?

Zu den Untersuchungen wurden außer einer größeren Reihe von Paratyphus B- und Pestifer-Kulturen der Abteilungssammlung folgende Stämme herangezogen ¹⁾:

1) Voldagsen-Damman	I	} Originalstämme von Damman (Abteilungssammlung)
" "	II	
" "	IV	
2) Glässer-Gesundheitsamt		} Originalstamm (Abteilungssammlung) (Pfeilersches Institut in Bromberg) (Institut Robert Koch)
Glässer-Bromberg		
Glässer-Koch		
3) Bernhard Krause-Blut		(Institut Robert Koch)
4) Erzindjan-Neukirch:	Achmed Omar	} Originalstämme von Neukirch (Abteilungssammlung)
" "	Sali Mustafa	
" "	Emin Mustafa	
" "	Sali Abdurachman	
" "	Erison	
" "	Zeise	
" "	Luise	
" "	Freundlich	

1) Für die gütige Ueberlassung der Kulturen sei den beteiligten Herren an dieser Stelle bestens gedankt. Ebenso haben wir Herrn Professor Gildemeister und Dr. Schmitt, die uns bei der Herstellung der Immunsera hilfreich unterstützt haben, unseren herzlichsten Dank auszusprechen.

5) Paratyphus β 2 Weil (Wolhynien)	}	Originalstämme von Weil-Prag
6) Paratyphus β 5 Weil (Albanien)		
6) Paratyphus Schiff E 2	}	Originalstämme von Schiff-Greifswald
" " " E 9		
" " " E 18		
7) Fleischvergiftung Ueberruhr 20 Stämme	}	Originalstämme von H. Bruns-Gelsenkirchen
8) Fleischvergiftung Makrele-Kiel		
9) Ferkeltyphus-Bromberg	}	Originalstämme von Pfeiler-Bromberg
" -Institut		
" -L 16		
10) Suipestifer Kunzendorf		(Abteilungssammlung)
11) Mäusetyphus Loeffler		(Pfeilersches Institut in Bromberg)
		(Abteilungssammlung)

Als charakteristische Eigentümlichkeiten der Voldagsengruppe bezeichnen Händel und Gildemeister (13) die wechselnde Fähigkeit, aus Traubenzucker Gas zu bilden, damit zusammenhängend das wechselnde Verhalten in Neutralrotagar, in dem bald gar keine Veränderung, bald nur Zerreißung, aber keine Entfärbung eintritt, ferner das Ausbleiben des Umschlages in Blau beim Wachstum in Kahlbaum-scher Lackmusmolke und die fehlende Gasbildung aus Mannitzucker in der Lösung nach Hetsch. Stämme, bei denen Gasbildung auftritt, verhalten sich mithin ähnlich wie Paratyphus A-Stämme, solche, bei denen sie unterbleibt, wie Typhusstämmen.

Tab. I gibt eine Zusammenstellung dieser biochemischen Reaktionen bei der gegenwärtigen Prüfung. Die Reaktionen sind im Laufe eines Jahres wiederholt vorgenommen worden und haben jetzt ziemlich konstante Ergebnisse geliefert. Man sieht, daß die Stämme Voldagsen-Dammann I, II und III sowie Stamm Glässer aus der Sammlung des Gesundheitsamtes sich untereinander und mit dem Stamm Glässer-Bromberg übereinstimmend verhalten: Sie röten die Lackmusmolke ohne starke Trübung und Umschlag in Blau, verursachen in Neutralrotagar regelmäßig Gasbildung und Entfärbung und vergären die Mannitlösung nicht. Der Glässer-Stamm aus dem Institut Robert Koch unterscheidet sich von den 5 erstgenannten dadurch, daß er in der Mannitlösung Gas bildet und die Lackmuslösung bläut. Demnach entspricht er der oben gegebenen Definition für die Voldagsen-Gruppe nicht mehr, sondern verhält sich kulturell wie ein typischer Hogcholerastamm. Wir müssen dahingestellt bleiben lassen, ob der Stamm von vornherein irrtümlich als Glässer bezeichnet worden ist, oder ob er sich im Laufe der Jahre verändert hat. Für die Wahrscheinlichkeit der letzteren Annahme spricht das serologische Verhalten, worauf noch zurückzukommen ist. Die 3 Voldagsen- und der Glässer-Stamm unserer Sammlung haben sich jedenfalls im Laufe der Jahre insofern verändert, als sie jetzt regelmäßig in Neutralrotagar Gasbildung und Entfärbung hervorrufen, und das ist hier auch beim Stamm Glässer-Bromberg regelmäßig der Fall gewesen. Im Gegensatz zu den eben besprochenen Stämmen haben die 3 Ferkeltyphusstämmen hier bei wiederholten Prüfungen auch in Fleischbrühe niemals Traubenzucker vergoren. Durch dieses Verhalten und durch das Wachstum in Neutralrotagar ohne Gasbildung unterscheiden sie sich auffällig von den Voldagsenstämmen, mit denen sie von Pfeiler identifiziert werden. Bei den Ferkeltyphuskulturen ist also im Laufe der Zeit anscheinend das Gegenteil wie bei unseren Voldagsenstämmen eingetreten, da sie nach Pfeiler früher nur gelegentlich kein Gas bildeten. Jetzt haben sie dieses Ver-

mögen ganz verloren, während die Voldagsen- und Glässer-Stämme sich darin vervollkommen haben.

Tabelle I.

Stamm	Kahlbaum- sche Lack- musmolke	Mannit- lösung nach Hetsch	Neutralrot- agar	Trauben- zucker- bouillon	Trauben- zuckerlösung nach Bar- siekow	Milch- zucker- lösung nach Bar- siekow
dagsen-Dammann I	Unverändert		Zerreißung	Gasbil- dung	Rötung und Gerinnung	Unver- ändert
" " II	oder geringe	Unverändert	und Entfär- bung			
" " III	Rötung					
sser, Reichsgesund- heitsamt	Rötung oder unverändert.	Unverändert	Zerreißung	Gasbil- dung	Rötung und Gerinnung	Unverän- dert
" Koch	Rötung oder Umschlag in Blau	Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	und Entfär- bung			
" Bromberg	Rötung	Unverändert				
keltyphus Bromberg Institut	Rötung	Unverändert	Unverändert	Unverän- dert	Rötung und Gerinnung	Unverän- dert
" L 16						
ndjan Achmed-Omar	} Dauernde Rötung od. Umschlag in Blau am 3.—7. Tage	} Rötung, Fäl- lung u. Gas- bildung	} Zerreißung und Entfär- bung	} Gasbil- dung	} Rötung und Gerinnung	} Unverän- dert
" Sali Mustafa						
" Emin Mustafa						
" Sali Abdurach- man						
" Zeise						
" Erison						
" Luise	} Umschlag in Blau am 3. bis 7. Tage					
" Freundlich						
hard ‚Krause-Blut‘	Dauernde Rö- tung oder Umschlag in Blau am 3. bis 7. Tage	Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	Zerreißung und Entfär- bung	Gasbil- dung	Rötung und Gerinnung	Unverän- dert
il Paratyphus β_2 Wol- ynien	} Umschlag in Blau am 4. Tage	} Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	} Zerreißung und Entfär- bung	} Gasbil- dung	} Rötung und Gerinnung	} Unverän- dert
il Paratyphus β_6 Alba- dien						
iff E 2	} Umschlag in Blau am 5. bis 6. Tage	} Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	} Zerreißung und Entfär- bung	} Gasbil- dung	} Rötung und Gerinnung	} Unverän- dert
" E 9						
" E 18						
ipestifer Kunzendorf	Umschlag in Blau am 2. bis 5. Tage	Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	Zerreißung und Entfär- bung	Gasbil- dung	Rötung und Gerinnung	Unverän- dert
aschvergifter Makrele	} Umschlag in Blau am 2. bis 5. Tage	} Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	} Zerreißung und Entfär- bung	} Gasbil- dung	} Rötung und Gerinnung	} Unverän- dert
" Ueberruhr						
aratyphus B Nr. 1	Umschlag in Blau am 2. bis 4. Tage	Rötung, Fäl- lung, Gas- bildung	Zerreißung und Entfär- bung	Gasbil- dung	Rötung und Gerinnung	Unverän- dert

Wie Tab. I weiter zeigt, unterscheiden sich die Paratyphus β -Stämme übereinstimmend und durchgängig dadurch von den typischen Vol-dagsen-Glässer-Kulturen, daß sie die Lackmusmolke bläuen und Mannitzucker vergären. Kulturell wären sie mithin nicht als Vol-dagsenstämmen anzusprechen, sondern entsprechen, ebenso wie Stamm Gläser aus dem Kochschen Institut, in allen Eigenschaften dem Hogcholeratypus. Dabei ist zu betonen, daß auch diese Stämme sich früher nach den Beschreibungen der Autoren weniger konstant in ihrem Verhalten gezeigt haben. Man erinnert sich dabei unwillkürlich an das

Ta

Stamm	Immunserum Paratyphus B Hellig (Kaninchen)	Immunserum Paratyphus B Kaensche (Kaninchen)	Immunserum Paratyphus B Runge (Kaninchen)	Immunserum Ueberuhr 1648 (Kaninchen)	Immunserum Makrele (Kaninchen)	Immunserum Erzindjan (Kaninchen)
	Titer 10 000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 10 000
1 Paratyphus B Runge	0	5 000	5000	1 000	1000	0
2 " " 1	500	5 000	5 000	1 000	200	0
3 " " Breslau	200	10 000	10 000	10 000	5000	200
4 " " Schott- müller	500	10 000	10 000	10 000	2000	5 000
5 " " Hellig	5 000	5 000	5 000	5 000	1000	0
6 " " Kantjes	10 000	10 000	10 000	500	500	0
7 " " 217	500	10 000	5 000	2 000	2000	200
8 " " Meirel- beek	0	10 000	10 000	10 000	1000	0
9 " " Busse	2 000	1 000	500	1 000	2000	5 000
10 " " Nagel	1 000	5 000	1 000	1 000	1000	200
11 " " Walk- hoff	500	5 000	5 000	500	0	200
12 " " Lange	0	10 000	10 000	1 000	1000	0
13 " " Lassan	0	500	0	0	0	0
14 " " Makrele	500	10 000	10 000	2 000	5000	500
15 " " Ueber- ruhr 1648	0	10 000	10 000	10 000	1000	0
16 " " Ueber- ruhr 1664	0	10 000	5 000	10 000	2000	0
17 Mäusetyphus Loeffler	5 000	10 000	10 000	2 000	2000	0
18 Pestifer 805	500	1 000	200	0	0	10 000
19 " 338	500	1 000	200	0	0	10 000
20 " 339	0	200	500	200	0	10 000
21 " 815	200	200	0	0	200	10 000
22 " 327	0	200	0	500	0	10 000
23 " 808	500	200	0	200	0	10 000
24 " 819	1 000	200	0	500	0	1 000
25 " Drüe	500	200	200	0	100	10 000
26 " 811	500	0	0	200	0	1 000
27 " Kunzen- dorf Brom- berg	500	200	0	200	0	10 000
28 " Kunzen- dorf R.G.A.	500	200	0	0	100	5 000
29 " Amerika 664	0	0	0	0	0	2 000
30 " " 719	0	0	0	0	0	10 000
31 " ges. Schwein	500	5 000	10 000	0	200	2 000

wechselnde Wachstum mancher Ruhrstämmen auf den Zuckernährböden in der ersten Zeit nach der Isolierung; ein Verhalten, das im Gefolge fortgesetzter Ueberimpfungen ebenfalls konstanter wird.

Ueberblickt man diese Ergebnisse, so haben wir also unter 9 authentischen Kulturen der Voldagsen-Gruppe 3 kulturell unterschiedliche Typen, nämlich die 3 Ferkeltyphusstämmen mit dem kulturellen Verhalten des Typhusbazillus, 3 Voldagsen- und 2 Glässer-Stämme, die der Definition von Händel und Gildemeister entsprechen, und

belle II.

Immuneserum Paratyphus B. Weil Albanien (Kaninchen)	Immuneserum Schiff E2 (Kaninchen)	Immuneserum Bernhard Krause-Blut (Kaninchen)	Immuneserum Voldagsen-Dammann I (Kaninchen)	Immuneserum Glässer R.G.A. (Kaninchen)	Immuneserum Glässer Bromberg (Kaninchen)	Immuneserum Ferkeltyphus Bromberg (Kaninchen)	Immuneserum Schweinepest Drüse (Kaninchen)	Immuneserum Amerika 706 (Kaninchen)
Titer 5000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 5000	Titer 5000	Titer 10 000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 2000
0	0	500	0	0	0	0	0	0
0	0	200	0	0	0	0	0	0
0	0	1000	0	200	0	0	500	0
0	0	200	0	0	0	0	200	0
0	0	1000	0	200	0	0	0	500
0	0	0	200	0	2000	0	0	5000
0	0	1000	0	0	0	0	0	0
0	0	1000	0	200	0	0	0	0
0	0	500	500	0	500	0	1000	1000
0	0	500	200	0	0	0	0	200
0	0	500	0	0	200	0	200	200
0	0	500	200	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	200	200	100	200	0	1000	0
0	0	100	0	0	0	0	200	0
0	0	100	0	0	0	0	500	0
200	0	500	200	0	1000±?	0	200	0
5000	5000	500	5000	2000	5000	2000	2000	2000
5000	5000	500	10000	5000	5000	2000	10000	2000
200	5000	200	0	200	2000	0	2000	2000
5000	5000	1000	5000	5000	5000	2000	2000	1000
5000	2000	1000	5000	2000	5000	2000	5000	1000
5000	5000	1000	5000	2000	5000	2000	2000	2000
5000	5000	500	5000	1000	10000	1000	5000	1000
5000	5000	500	2000	2000	2000	2000	5000	2000
5000	5000	0	1000	1000	10000	1000	5000	2000
5000	5000	1000	2000	5000	5000	2000	1000	2000
5000	5000	500	2000	100	10000	0	1000	2000
5000	5000	200	5000	500	5000	2000	5000	2000
10000	2000	200	2000	5000	10000	500	1000	2000
0	0	200	5000	100	2000±?	0	1000	2000

Generated on 2019-09-15 20:44 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uc1.b3789188 Public Domain in the United States; Google-digitized / http://www.hathitrust.org/access_use#pd-us-google

einen Glässer-Stamm von typischem Hogcholeracharakter. Die untersuchten Paratyphus β -Stämme zeigen auf der bunten Reihe alle typischen Eigenschaften der Hogcholeragruppe.

Das serologische Verhalten der eben besprochenen Kulturen ergibt sich aus Tab. II und III. Die verwendeten Sera sind monovalente, mit bei 60° abgetöteten Kulturen hergestellte Kaninchenimmunsera. Aus Gründen, auf die wir später zu sprechen kommen, wurden bei der Agglutinationsprüfung nur grobe Unterschiede als differentialdiagnostisch verwertbar angesehen.

Bezüglich der 9 authentischen Stämme aus der Voldagsen-Ferkeltyphusgruppe zeigte sich zunächst, daß sie von einem Typhus-, einem Gärtner- und einem Paratyphus A-Serum wenig oder gar nicht agglutiniert werden. Die Ergebnisse mit diesen 3 Seren sind deshalb in die Tabelle nicht aufgenommen worden. Diese Immunsera greifen auch die mitgeprüften Paratyphus B- und Pestifer-Stämme wenig oder gar nicht an.

Die Voldagsen - Ferkeltyphusstämme verhalten sich gegenüber Paratyphus B-Sera und Pestifer-Sera nicht übereinstimmend. Von 5 Paratyphus B-Seris wirken 3 auf keine der Kulturen, eine auf die 3 Stämme Voldagsen-Dammann und eine außerdem noch auf unseren Sammlungsstamm Glässer. Dagegen wirken die beiden Pestifer-Sera auf alle 9 Stämme gleichmäßig stark. Die engen serologischen Beziehungen der 9 Stämme untereinander werden durch die wechselseitigen Agglutinationsresultate mit den Immunseren Voldagsen-Dammann I, Glässer-Gesundtsamt, Glässer-Bromberg und Ferkeltyphus-Bromberg bewiesen. Bei Berücksichtigung ihrer kulturellen Differenzen zeigen die 9 Stämme dieser Gruppe im ganzen auffallend enge serologische Beziehungen, die uns berechtigen, die Glässer-Stämme Gesundtsamt und Bromberg mit den 3 Dammann-Stämmen zu identifizieren und die Ferkeltyphusstämme mindestens als sehr nahe Verwandte zu bezeichnen. Unklar bleibt nach den Befunden nur die Stellung, die dem Stamm Glässer aus der Sammlung des Kochschen Institutes zukommt. Kulturell ist er, wie erwähnt, ein Hogcholerabazillus, wird aber von unseren 5 Paratyphus B-Immunseren fast gar nicht agglutiniert. Dagegen zeigt er, wie die anderen Voldagsenstämme, nahe verwandtschaftliche Beziehungen zu den beiden Pestifer-Immunseren. In dieser Beziehung entspricht er den Paratyphus β -Stämmen verschiedenster Herkunft. Auch deren auffallende Besonderheit besteht ja darin, daß sie sich kulturell wie Paratyphus B-Stämme verhalten, aber von Immunseren, die mit bekannten Paratyphus B-Kulturen menschlichen Ursprunges hergestellt sind, im allgemeinen wenig oder gar nicht beeinflußt werden¹⁾. Lediglich der Weilsche Stamm aus Wolhynien bildet darin eine Ausnahme, indem er auf 4 von unseren 5 Paratyphus B-Sera reagiert. Auf dieses Verhalten hat Weil bereits hingewiesen.

Bemerkenswert ist nun, daß alle von uns untersuchten Paratyphus β -Kulturen von den Pestifer-Immunseren Drüse und Amerika 704 gut beeinflußt werden. Allerdings kommen auch Stämme vor, die auf einzelne Sera wenig ansprechen. Außerdem können wir die Angaben der Autoren

1) Wir legen besonderen Nachdruck auf die Feststellung, daß diese Befunde nur im allgemeinen zutreffen. Beim genaueren Studium der Tabelle wird man hier und überall Ausnahmefälle finden, die nicht in das Schema passen.

dahin ergänzen, daß die Paratyphus β -Stämme nicht allein durch Voldagsen-Immunsera, sondern auch durch unser Glässer- und Ferkeltyphusserum bis zur Höhe des Titers agglutinierbar sind. Sie verhalten sich demnach serologisch und kulturell ähnlich wie der atypische Glässer-Stamm aus dem Kochschen Institut. Da auch die typischen Stämme der Voldagsen-Gruppe sowie die kein Gas bildenden Pfeilerschen Ferkeltyphusbazillen ebenfalls sehr enge serologische Beziehungen zu den beiden nämlichen Pestifer-Immunseren zeigen und umgekehrt, so liegt der Gedanke nahe, daß man die β -Stämme ebenso zu beurteilen hat, wie den Stamm aus dem Kochschen Institut. Sie haben mit den typischen Voldagsenkulturen gemeinsam die engen, wechselseitigen serologischen Beziehungen untereinander und zu den Pestifer-Stämmen, sowie die geringe serologische Verwandtschaft zu Paratyphus B-Stämmen menschlichen Ursprunges. Sie unterscheiden sich von den typischen Voldagsenstämmen durch ihr absolut paratyphusgleiches Wachstum, insonderheit die Vergärung des Mannitzuckers und die Bläuung der Lackmusmolke. Nun sehen Händel und Gildemeister (13) in dem Typus Voldagsen bekanntlich nichts anderes als eine labile Varietät des Pestifer-Bazillus, während Pfeiler und seine Mitarbeiter die Voldagsen- bzw. die mit ihnen identifizierten Ferkeltyphusbazillen als besondere Art von der Pestifer-Gruppe abtrennen. Demgegenüber hat Joest (18) in zutreffender Weise auf das unterschiedliche Verhalten mancher echten Pestifer-Stämme in der bunten Reihe hingewiesen und derartige Differenzen als Grundlage für eine Artdifferenzierung abgelehnt. Pfeiler und Engelhardt bestätigen andererseits bezüglich des Ferkeltyphus-Immunserums die Beobachtungen von Händel-Gildemeister und Teodorasku (19), daß Voldagsen-Immunsera typische Pestifer-Stämme, darunter auch ihren Typus Kunzendorf, bis zum Titer agglutinieren. Sie sehen diese Agglutination aber nicht als Haupt-, sondern als starke Mitagglutination an. Demgegenüber ergibt sich aus unseren Untersuchungen, daß hier ein wechselseitiges Verhalten vorliegt: Der starken serologischen Beeinflussung der Pestifer-Stämme durch Ferkeltyphus-Voldagsen- und Glässer-Immunsera entspricht eine ebenso starke Agglutination der Ferkeltyphus-Voldagsen-Glässer-Stämme durch Pestifer-Immunsera. Da die Titerunterschiede dabei nichts Gegenteiliges schließen lassen, liegt mithin kein rechter Grund vor, hier nur an eine Mitagglutination zu denken. Handelt es sich aber um eine Hauptagglutination, so wird man zu dem Schluß kommen, daß die Angehörigen der hier in Frage stehenden Typen trotz gewisser Wachstumsunterschiede eine gemeinsame Gruppe bilden, deren typischer Vertreter der Bazillus Pestifer wäre. Man hätte nach dieser Auffassung in dem Stamm Glässer aus dem Kochschen Institut eine Kultur, die sich biologisch und serologisch jetzt als typischer Pestifer zeigt, während die anderen beiden Glässer- und die drei Dammann-Stämme bei serologischer Uebereinstimmung nur im Wachstum in Lackmusmolke und Mannitlösung differieren. Die drei Ferkeltyphusstämmen wären dann als „gaslose“ Varietät des Pestifer-Bazillus anzusprechen. Damit kommen wir zu der gleichen Auffassung, die Joest 1915 aus anderen Gründen bereits entwickelt hat. Bezüglich der Paratyphus β -Kulturen wäre konsequenterweise dann zu schließen, daß sie infolge

ihrer vollkommenen kulturellen und serologischen Uebereinstimmung als typische Pestifer-Stämme anzusehen sind. Wenn man sie bisher zum Typus Voldagsen gezählt hat, so liegt das wohl daran, daß sie bei Bernhard und Neukirch anfangs im Wachstum auf Lackmusmolke und Neutralrotagar Abweichungen und Unbeständigkeiten gezeigt haben, wie sie damals beim Typus Pestifer noch nicht bekannt waren, Abweichungen, die bei der jetzigen, mehrjährigen Fortzucht nicht mehr in die Erscheinung getreten sind. Ein zweiter Grund mag der sein, daß die serologische Prüfung nur mit Voldagsen- und Paratyphus B-, dagegen nicht mit Pestifer-Immunsereen durchgeführt worden ist.

Pfeiler und Engelhardt stellen die Paratyphus β -Bazillen ebenfalls zum Typus Pestifer, und behaupten, daß sie pathogene Kulturen dieser Art nicht nur beim Schwein, sondern auch bei anderen Haustieren und bei Menschen bereits festgestellt hätten, dagegen hätten sie Ferkeltyphusbazillen weder beim Menschen noch bei anderem Vieh als bei jungen Schweinen gefunden. Da sie die Ferkeltyphus- und Voldagsenbazillen miteinander identifizieren, lehnen sie die Bezeichnung der Paratyphus β -Kulturen als Voldagsenbazillen aus diesem Grunde ab.

Demgegenüber müssen wir aus den vorliegenden Untersuchungen den Schluß ziehen, daß die kulturellen Unterschiede der Voldagsen-Gruppe nicht durchgreifend und beständig genug sind, um eine Artdifferenzierung von der Pestifer-Gruppe genügend zu begründen. Wir halten den Typus Glässer-Voldagsen einschließlich der Pfeilerschen Ferkeltyphusbazillen für eine zwar kulturell unterschiedliche, aber serologisch identische Spielart der Pestifer-Bazillen, und mit diesen letzteren sind auch die von uns untersuchten Paratyphus β -Stämme sowohl in kultureller als in serologischer Hinsicht zu identifizieren.

Man könnte einwenden, daß in dieser Auffassung eine unzulässige Unterschätzung kultureller Differenzen zugunsten serologischer Reaktionen liegt. Diesem Einwand gegenüber ist daran zu erinnern, daß seit den Untersuchungen von Löwenthal und Seligman (20), Oette (21), Wagner (22), Dorset (23) u. a. Hogcholerastämme bekannt sind, die nach ihrem serologischen Verhalten als Paratyphus B- und Pestifer-Bazillen bezeichnet werden mußten, obwohl ihnen das wichtigste kulturelle Merkmal, nämlich die Gasbildung aus Traubenzucker, fehlte. Bei der serologischen Uebereinstimmung kann wohl auch bei den Ferkeltyphusbazillen das mangelhaft ausgebildete oder fehlende Vermögen, den Traubenzucker zu vergären, keinen ausreichenden Gegengrund gegen die Identifizierung mit Hogcholerabazillen bilden. Auch ist bekannt, daß unzweifelhafte Paratyphus B- oder Pestifer-Bazillen bei wiederholten Prüfungen und in der Hand verschiedener Untersucher in Lackmusmolke ein unterschiedliches Wachstum und den Umschlag in Blau bisweilen spät oder gar nicht gezeigt haben. Seitz (24) hat auf die auffallenden Widersprüche der diesbezüglichen Untersuchungen in der Literatur hingewiesen und durch eigene Versuche die verschiedenen chemischen Prozesse aufgedeckt, die bei der Säuerung und Alkalisierung der Lackmusmolke nebeneinander vor sich gehen. Nach seinen Feststellungen kann man unter den verschiedenen Bedingungen mit verschiedenen Lieferungen der gleichen Kahlbaumschen Molke bei der-

selben Kultur alle Uebergänge von Unverändertbleiben und geringer Rötung bis zur starken Trübung und Umschlag in Blau erhalten. Er hat sogar ausnahmsweise auch Typhuskulturen in der Lackmusmolke in Blau umschlagen sehen. Mithin dürfte als differentialdiagnostisches Reagens die Lackmusmolke mit großer Vorsicht zu verwerthen sein. Nach den Erfahrungen bei der Typendifferenzierung in der Ruhrgruppe ist die gleiche Vorsicht auch bei der Verwendung der Mannitlösung angebracht. Beispielsweise kann ein Ruhrstamm, auch wenn er den Mannitzucker nicht zerlegt, auf Grund seines agglutinatorischen Verhaltens dem Typus Flexner Y angehören. Eine Berechtigung, mittels Zuckervergärung die verschiedenen Typen einer Gruppe zu differenzieren, ist nach unserer Meinung höchstens beim positiven Ausfall der Reaktion gegeben und dann, wenn auch gewichtiger Gründe, wie z. B. serologische Differenzen, vorliegen. Das ist aber bei den Unterschieden zwischen der Voldagsen- und Pestifer-Gruppe nicht der Fall.

Größeres Gewicht dürfte unseres Erachtens dem Einwande zukommen, daß die Agglutination der Voldagsen- und Ferkelytyphusbazillen durch Pestifer-Serum und umgekehrt lediglich als Mitagglutination aufzufassen ist, daß also bei den serologischen Beziehungen zwischen den Traubenzucker vergärenden und die Lackmusmolke bläuenden Pestifer-Bazillen und den Ferkelytyphusstämmen, die beides nicht tun, das gleiche Verhältnis vorliegt, wie zwischen der Typhus- und der Gärtner-Gruppe. Trotz ihrer serologischen Uebereinstimmung werden diese beiden Gruppen bekanntlich als artverschieden angesehen. Die Unterscheidung zwischen Haupt- und Mitagglutination läßt sich mit ausreichender Sicherheit nur dann treffen, wenn sich beim Austitrieren der Sera starke quantitative Unterschiede ergeben. In den anderen Fällen hat man eine solche Unterscheidung mit Hilfe des Castellianischen Absättigungsversuches angestrebt. Die praktischen Ergebnisse mit dieser Methode haben indes bei den verschiedenen Autoren gerade in der Paratyphusgruppe eine auffällig unstimmige Beurteilung erfahren. Uhlenhuth und Hübener (12) z. B. sprechen ihr auf Grund eigener Erfahrungen jede praktische Bedeutung auf diesem Gebiete ab. Die Untersuchungen von Weil und Felix (25) über den Doppeltypus der Rezeptoren lassen diese veränderlichen Ausfälle solcher Absättigungsversuche jetzt zwar verständlich erscheinen, andererseits aber ergeben sie auch, daß die Unterscheidung zwischen Haupt- und Mitagglutination in der Paratyphusgruppe auf viel verwickelteren Grundlagen beruht als es bei der Proteus-Gruppe der Fall zu sein scheint. Unsere eigenen Versuche, mit Hilfe der Absättigungsmethode zu einer praktisch brauchbaren Differenzierung zu gelangen, sind noch nicht abgeschlossen und werden später mitgeteilt werden.

Im Zusammenhang damit haben wir auf Grund der Untersuchungen von Sachs und Schlossberger (26) bei der Proteus-Agglutination versucht, durch Erhitzung der agglutinablen Substanz auf 100° die „koktolabilen“ Rezeptoren zu zerstören und so Bakterienaufschwemmungen mit reinem „koktostabilen“ Rezeptorenapparat zur Reaktion zu bringen. Wir hatten gehofft, auf diese einfache Weise durch Ausschaltung der störenden Mitagglutination streng spezifische Reaktionen zu bekommen, wie es bei der Proteus-Gruppe gelingt. Diese Hoffnungen haben sich leider nicht erfüllt. Ein gewisser Teil der auf 100° erhitzten Aufschwemmungen flockte beim Kochen spontan aus, und ein anderer Teil wurde in seiner Agglutinierbarkeit auch gegenüber dem homologen

Serum so erheblich beeinträchtigt, daß eine serologische Differenzierung unter Benutzung von gekochten Bakterienaufschwemmungen sich in unserem Falle praktisch nicht durchführen ließ. Nach den inzwischen veröffentlichten Untersuchungen von Weil und Felix (25), Feiler (27) und Gruschka (28) stößt die experimentelle Beseitigung der Mitagglutinine in der Paratyphusgruppe deswegen auf weit größere Schwierigkeiten als in der Proteus-Gruppe, weil bei der Paratyphusgruppe sowohl die „koktostabilen“ als auch die „koktolabilen“ Rezeptoren dem Endoplasma des Bakterienleibes angehören, während bei der Proteus-Gruppe die koktolabilen Rezeptoren an den Geißelapparat gebunden sind. Die dem Typhus und Paratyphus B gemeinsamen Agglutinogene lassen sich nach Feiler auch durch Züchtung auf 1-prom. Karbolsäureagar nicht beseitigen, während das bei den die Mitagglutination bedingenden H-Rezeptoren der Proteus-Gruppe gelingt. Wir sind deshalb nach Erörterung dieser Schwierigkeiten in der Lage, bekennen zu müssen, daß uns bisher eine praktisch brauchbare Unterscheidung zwischen den Voldagsen-Glässer-Ferkeltyphusbazillen untereinander und eine Abtrennung von den Pestifer-Bazillen weder serologisch noch kulturell gelungen ist. Es bleibt abzuwarten, ob auf anderem Wege die Herstellung von Immunseren gelingt, die nur Hauptagglutinine enthalten und infolgedessen strengere Spezifität zeigen als die mit den bisherigen Methoden hergestellten Sera. Weil und Felix (25) haben z. B. vorgeschlagen, die störenden Mitagglutinine aus einem Immunserum dadurch zu entfernen, daß man das betreffende Serum mit einer Aufschwemmung des homologen Stammes, die 2 Std. auf 100° erhitzt ist, absättigt. Die nach dem Zentrifugieren abgegossenen Sera sollen dann nur die homologen Agglutinine enthalten. Nach Versuchen, die ich zusammen mit Beger angestellt habe, ist auch mit diesem Verfahren leider kein praktischer Fortschritt in der Differentialdiagnose der Hogcholera zu erzielen gewesen.

Was unsere Auffassung anlangt, daß die menschenpathogenen Paratyphus β -Stämme zur Pestifer-Gruppe gehören, so spricht zunächst gegen diese Annahme die Feststellung, daß bei den Neukirchschen Fällen der Zusammenhang mit Schweinefleischgenuß gänzlich ausgeschlossen ist. Indes hat bereits Geissler bei Massenerkrankungen an Brechdurchfall durch Voldagsenbazillen die Möglichkeit der Uebertragung durch Vieh auch ohne Fleischgenuß wahrscheinlich gemacht, nämlich durch Vermittlung des Trinkwassers aus einem Teich, der gleichzeitig dem Vieh als Tränke zugänglich war. Ferner ist bekannt [Zwick und Weichel (29)], daß Bazillen der Hogcholera-Gruppe als Erreger von Milchdrüsenentzündungen beim Vieh beobachtet sind. Dadurch wird die Uebertragung durch Milch in den Bereich der Möglichkeit gerückt. Daß Bazillen der Hochcholera-Gruppe außer beim Schwein auch beim Rind, Pferd und Schaf vorkommen, ist bekannt, ebenso auch, daß Rindfleisch als Ursache der Fleischvergiftung mit an erster Stelle steht. So ist auch in Gegenden, wo keine Schweinezucht betrieben wird, sicher mannigfache Gelegenheit vorhanden, daß sich Menschen mit Bazillen der Hogcholera-Gruppe tierischer Herkunft infizieren. Schwer verständlich ist bei dieser Auffassung nur der Gedanke, daß in ländlichen Gegenden, wo durch das Vieh so viele Infektionsquellen in Haus und Hof geschaffen werden, die Paratyphusinfektionen des Menschen nicht an der Tagesordnung sind.

Wir kommen damit zum zweiten Punkt unserer Untersuchungen, der die praktisch wichtige Frage betrifft, ob innerhalb der eigentlichen Hogcholera-Gruppe eine serologische Differenzierung zwischen den menschlichen Paratyphus B-Bazillen und den Suipestifer-Bazillen möglich ist.

Weber und Händel (30) teilen bekanntlich die Hogcholera-Gruppe nach serologischen Gesichtspunkten in drei Unterabteilungen, nämlich:

1) Die Gesamtheit der durch Paratyphus B-Immunsera agglutinierbaren Stämme menschlicher und tierischer Herkunft, zu der also neben den bei menschlichen Erkrankungen gefundenen Kulturen die Mäusetypus-, Psittakose- und Pestifer-Bazillen gerechnet werden.

2) Die Gesamtheit der durch Gärtner-Immunsera agglutinierbaren Stämme menschlicher und tierischer Herkunft, zu der also auch die „Rattenschädlinge“ und ein Teil der „Paracoli-Bazillen“ der Kälberruhr zu rechnen sind.

3) Die Gesamtheit der weder durch Paratyphus B- noch durch Gärtner-Immunsera agglutinierbaren Stämme, die morphologisch und kulturell mit den beiden erstgenannten Untergruppen übereinstimmen und deshalb von Uhlenhuth und Hübener auch als Paratyphus C-Gruppe zusammengefaßt worden sind.

Was zunächst diese 3. Untergruppe anbetrifft, so hat sich inzwischen herausgestellt [Rimpau (30), Keck (31)], daß ein gewisser Teil ihrer Vertreter, wenn man die Prüfungen nicht mit 1, sondern mit einer größeren Anzahl von Immunsera vornimmt, auch serologische Beziehungen zu den erstgenannten Untergruppen erkennen läßt. Auch in unserer Zusammenstellung finden sich Stämme, deren Zugehörigkeit zur Paratyphus B-Gruppe unerkant geblieben wäre, wenn bei der Agglutinationsprüfung nicht mehrere Immunsera Verwendung gefunden hätten. Auch die Paratyphus β -Kulturen wären beispielsweise als inagglutinabel zu bezeichnen gewesen, wenn man sich nur auf Paratyphus B-Sera von Stämmen menschlicher Herkunft beschränkt hätte. Offenbar wird sich das Gebiet der Paratyphus C-Gruppe um so mehr einengen lassen, je mehr diagnostische Sera zur Agglutinationsprüfung verwendet werden.

Durch den Befund von Hogcholera-Bazillen, die nur auf das eine oder andere aus einer größeren Anzahl von Immunsereen reagieren, wird die serologische Einheitlichkeit der Paratyphus B-Gruppe von vornherein sehr in Frage gestellt. Das Gleiche gilt bekanntlich auch für die Gärtner-Gruppe, seitdem Sobernheim und Seligmann (33) festgestellt haben, daß unter einer größeren Anzahl von Immunsereen sich nicht ein einziges befand, das alle Stämme dieser Untergruppe zu beeinflussen vermochte.

Unsere Untersuchungen erstrecken sich nur auf die Paratyphus B-Gruppe und bestätigen zunächst die schon von Uhlenhuth-Hübener und Händel gemachte Feststellung, daß hier eine Fülle von quantitativ verschiedenen serologischen Beziehungen vorliegt. Während die obigen Autoren aber daraus den Schluß ziehen, daß serologisch eine Differenzierung innerhalb der eigentlichen Paratyphus B-Gruppe, insonderheit eine Unterscheidung der Paratyphus B-Stämme von den biologisch gleichen Pestifer-Stämmen nicht möglich ist, glaubten Pfeiler und seine Mitarbeiter anfänglich, daß diese Unterscheidung mit Hilfe eines Ferkeltyphusimmunsereums durchführbar wäre. Diese Feststellung geht zurück auf eine Angabe von Händel und Gildmeister (13), die später von Teodorasku (19) an einer größeren Anzahl von Stämmen nachgeprüft wurde, daß nämlich Voldagsen-Immunsere nicht nur Voldagsenstämme, sondern auch die von diesen kulturell differenten Pestifer-Stämme hoch agglutinierten, während sie Paratyphusstämme

vom Menschen im allgemeinen wenig oder gar nicht angegriffen. Aber schon Teodorasku weist auf eine Ausnahme von dieser Regel unter seinen Fällen hin, und neuerdings gibt auch Tormann (15), ein Mitarbeiter Pfeilers, an, daß die Hoffnung auf eine durchgreifende Differenzierung der Paratyphus B-Stämme menschlicher und tierischer Herkunft auf dem angegebenen Wege sich nicht ganz erfüllt hätte. In der Veterinärabteilung des Gesundheitsamtes hat vor kurzem Giessel (34) in einer Dissertationsarbeit die Frage einer ausgedehnten Prüfung unterzogen und kommt zu dem Ergebnis, daß weder durch die Verwendung von Glässer- und Voldagsen-Immuserum noch durch Ferkeltyphusimmunsera von Kaninchen eine Unterscheidung von Paratyphus B-Stämmen nach menschlicher oder tierischer Herkunft durchführbar ist.

Noch weiter in der Zerlegung der Paratyphus B-Gruppe geht Selter (35) in einer Arbeit aus dem Jahre 1916, indem er aus Agglutinationsprüfungen mit monovalenten Kaninchenseren erstens den Schluß zieht, daß die „Erreger“ der Tierkrankheiten Schweinepest, Kälberruhr, Mäusetyphus, Psittakosis mit den Paratyphusbazillen des Menschen im allgemeinen nicht identisch sind, und das zweitens die Paratyphus B-Bazillen menschlicher Herkunft ihrerseits wieder mindestens in 2 selbstständige Gruppen zerfallen, deren eine durch den Bazillus Hamburgensis (Schottmüller), die andere durch den Bazillus Breslaviensis (Trautmann) vertreten wird, der mit dem Bazillus Flügge-Kaensche identisch ist. Selter glaubt aus diesen Feststellungen den für die Praxis wichtigen Schluß ziehen zu können, daß in Fällen von Nahrungsmittelvergiftung, bei denen Paratyphus B-Bazillen vom Typus Schottmüller oder Kaensche nachgewiesen werden, die Annahme berechtigt ist, es handle sich nicht um Bazillen, die vom kranken Tier auf den Menschen übertragen worden sind, sondern um Bazillen menschlicher Herkunft, mit denen die Nahrungsmittel erst bei der Zubereitung durch Menschenhand infiziert wurden. Bitter (16) wiederum trennt die Fleischvergifter vom Typus Flügge-Kaensche als Enteritis Breslau von den serologisch schwer zu unterscheidenden eigentlichen Paratyphus B-Bazillen des Typus Schottmüller deswegen ab, weil die ersteren in Oberflächenkulturen, die bei 37° bebrütet und dann bei Zimmertemperatur weiter beobachtet werden, keine Schleimwälle, auf Raffinoseagar keine Knöpfe bilden und für weiße Mäuse bei der Fütterung pathogen sind, während die Schottmüller-Bazillen bei frisch aus dem Körper isolierten Kulturen die von Bernhard Fischer zuerst beschriebene Schleimwallbildung und auf Raffinoseagar nach R. Müller Knopfbildung zeigen, dagegen bei der Verfütterung an Mäuse keine tödliche Sepsis erzeugen.

Solchen und ähnlichen Meinungsverschiedenheiten begegnet man bei der Durchsicht der umfangreichen Paratyphusliteratur auf Schritt und Tritt. Da man unmöglich annehmen kann, daß diesen Widersprüchen lediglich unrichtige Beobachtungen zugrunde liegen, bleibt nur der Schluß übrig, daß die beobachteten kulturellen und serologischen Unterschiede in ihrer Bedeutung für die Differentialdiagnose innerhalb einer Verwandtschaftsgruppe überschätzt worden sind. Inzwischen haben ausgedehnte Untersuchungen über das Variationsvermögen der Bakterien das Vorkommen von erheblichen Schwankungen im kulturellen und serologischen Verhalten sowohl in frisch isolierten als auch in älteren Laboratoriumskulturen erwiesen. Auch die vielfach beobachteten Unter-

schiede im Vermögen der Agglutininbindung und -bildung lassen jetzt manche früher als Artdifferenzen gedeutete Eigentümlichkeiten in anderem Lichte erscheinen. Ueber manche dieser Fragen dürften vielleicht die von Weil und Felix erkannten und von Sachs und Schloßberger (26), Braun, Salomon und Schäffer (36), Jötten (37) und Feiler (27) genauer erforschten Unterschiede im Rezeptorentypus der Bakterien weitere Aufklärung bringen. Schließlich muß man annehmen, daß man bisher bei der Artdifferenzierung durch Immunitätsreaktionen Unterschiede, die auf die verschiedenen Arten der Immuntiere zurückzuführen sind, nicht richtig beurteilt hat. Gerade bei der Differentialdiagnose in der Ruhr- und Paratyphusgruppe zeigt sich die unterschiedliche Eigenart der Immunsera bei Verwendung verschiedener Tierarten als Serumpspender recht deutlich, und man weiß z. B., daß Immunsera von Eseln gewöhnlich eine viel größere Wirkungsbreite haben, als Kaninchensera und infolgedessen bei der Verwendung für differentialdiagnostische Verwandtschaftsreaktionen ganz andere Resultate liefern als jene. Man kann mit solchen Eselseren weder die verschiedenen Ruhrtypen noch die Gärtner- und Paratyphus B-Stämme differenzieren, während das mittels Kaninchenseren in der Regel möglich ist.

Dieser letzteren Tatsache haben wir bei unseren Untersuchungen Rechnung getragen und nur monovalente Immunsera von Kaninchen verwendet. Ferner haben wir im Sinne der obigen Ausführungen geringen quantitativen Unterschieden im Agglutinationstiter keine differentialdiagnostische Bedeutung beigelegt und nur grobe Unterschiede verwertet. Da wir durchgängig mit älteren Laboratoriumsstämmen gearbeitet haben, sind wir durch kulturelle und serologische Schwankungen, die frisch aus dem Körper isolierte Stämme zeigen, weniger gestört worden. Allerdings haben die Untersuchungen von Sobernheim und Seligmann gezeigt, daß man auch bei alten Laboratoriumsstämmen mit einer gewissen Neigung zur Variation rechnen muß.

Aus den letzterwähnten Untersuchungen ergab sich unter anderem, daß innerhalb der Gärtner-Gruppe keine serologische Einheitlichkeit besteht. Die beiden Autoren fanden nämlich unter den von ihnen geprüften Immunseren kein einziges, das sämtliche Gärtner-Stämme bei der Agglutination zu beeinflussen vermochte; die Wirkungsbreite der einzelnen Sera war eine ganz verschiedene und deutete auf eine engere serologische Zusammengehörigkeit der sogenannten „Rattenschädlinge“ innerhalb dieser Gruppe hin.

In Analogie zu diesen Befunden haben wir in der Paratyphusgruppe unter den verwendeten 15 Kaninchenseren ebenfalls nicht ein einziges gehabt, das alle Paratyphusstämme von Menschen und Tieren beeinflußt hätte. Bei allen Seren fiel eine mehr oder weniger große Zahl heraus und reagierte nur mit einem oder wenigen der geprüften Seren, und man kann annehmen, daß derartige Kulturen als inagglutinabel angesehen worden wären, wenn die Agglutination nur mit einer geringeren Anzahl von Immunseren gemacht worden wäre.

Unter den Voraussetzungen, mit denen wir diese Arbeit begannen, hatten wir erwartet, daß die Agglutinationsprüfung mit Paratyphus- und Pestifer-Seren je nach der größeren oder geringeren Wirkungsbreite der einzelnen Sera ein ganz ungesetzmäßiges Durcheinander der wechselseitigen Beziehungen ergeben würde. Dagegen stellte sich heraus, daß insofern eine gewisse Gesetzmäßigkeit in die Erscheinung tritt, als im

allgemeinen ein Teil der Stämme mehr auf Immunsera anspricht, die mit bekannten menschlichen Paratyphusstämmen hergestellt sind (Nr. 1—17 der Tab. II), während der andere Teil besser von Pestifer-Seren und den mit Voldagsen-Glässer-Ferkeltyphus und Paratyphus β -Stämmen hergestellten Immunseren agglutiniert wird (Nr. 18—31 der Tab. II und die Stämme der Tab. III). Im letzten Falle bleibt der Regel nach die Agglutination mit Paratyphus B-Seren menschlicher Herkunft mehr oder weniger ganz aus, in ersteren die Agglutination mit Immunseren von Pestifer-Stämmen und deren Varietäten. Der Kürze halber sei die 1. Unterabteilung der Paratyphus B-Gruppe, die 2. als Pestifer-Gruppe bezeichnet, ohne daß damit etwas über die wirkliche Herkunft dieser Kulturen ausgesagt werden soll.

Zu der Paratyphus B-Gruppe gehören nun z. B. außer den meisten Paratyphus B-Stämmen unserer Sammlung vom Menschen der Mäuse-typhus Loeffler, der Stamm aus der Makrelenvergiftung in Kiel, und die Kulturen aus der Hammelfleischvergiftung in Ueberruhr. Von der letztgenannten umfangreichen Fleischvergiftung die Hayo Bruns und Gasters (38) sowie Frickinger, beschrieben haben, sind hier 20

Ta-

Stamm	Immunserum Paratyphus B Hellig (Kaninchen)	Immunserum Paratyphus B Kaenschke (Kaninchen)	Immunserum Paratyphus B Runge (Kaninchen)	Immunserum Ueberruhr 1648 (Kaninchen)	Immunserum Makrele (Kaninchen)	Immunserum Erzindjan (Kaninchen)
	Titer 10 000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 10 000
32 Bernhard „Krause- Blut“	200	0	200	100	0	5 000
33 Erzindjan Achmed Omar	200	200±?	200±?	0	200	10 000
34 „ Sali Mustafa	1000	0	0	0	500	10 000
35 „ Emin Mustafa	200	0	0	0	200	10 000
36 „ Sali Abdur- achman	200	0	0	0	100	10 000
37 „ Zeise	0	0	0	0	100	10 000
38 „ Erison	200	0	0	0	100	10 000
39 „ Luise	1000	2000±	200±	100	500	10 000
40 „ Freundlich	0	0	0	0	100	5 000
41 Schiff E 2	200	0	0	0	0	10 000
42 „ E 9	500	0	0	1000±	0	10 000
43 „ E 18	200	0	0	1000?	0	10 000
44 Paratyphus β , Weil Wol- hynien	1000	2000	500	2000	5000	10 000
45 „ β , Weil Al- banien	200	0	0	0	0	5 000
46 Voldagsen-Dammann I	2000	2000	200	100	200	10 000
47 „ „ II	1000	2000	500	500	200	10 000
48 „ „ III	5000	2000	0	100	500	10 000
49 Glässer Reichsgesund- heitsamt	5000	200	0	0	0	10 000
50 „ Bromberg	200	0	0	100	0	10 000
51 „ Koch	0	0	0	0	0	10 000
52 Ferkeltyphus Bromberg	200	0	0	0	0	5 000
53 „ L 16	0	0	0	0	0	10 000
54 „ Institut	200	0	0	0	0	10 000

Reinkulturen, sowohl solche von notgeschlachteten Schafen als auch von erkrankten Menschen, genauer untersucht worden mit dem Ergebnis, daß sie serologische Unterschiede nach der menschlichen oder tierischen Herkunft nicht erkennen lassen. Wir haben darum nur 2 Hammelstämme in die Tabelle aufgenommen. Die Makrelenvergiftung in Kiel ist, wie die Arbeit von Bitter (16) ergibt, auf den Genuß geräucherter Makrelen zurückzuführen. Während man in diesem Falle noch im Zweifel sein kann, ob die Paratyphusbazillen aus den Makrelen selbst stammen, oder erst bei der Zubereitung hinzugekommen sind, ist im Falle der Ueberruhrepidemie durch den Tatbestand die Schafseuche als das Primäre über jeden Zweifel sichergestellt. Wir müssen deswegen den Schluß ziehen, daß sich aus der serologischen Uebereinstimmung bei der Agglutinationsprüfung eine Schlußfolgerung auf die humane oder animale Herkunft der Stämme nicht ziehen läßt.

Die zweite Untergruppe umfaßt außer den Pestifer-Stämmen und deren Varietäten (Voldagsen, Glässer, Ferkeltyphus) die Paratyphus β -Kulturen, die aus menschlichen Erkrankungen gezüchtet sind (s. Tab. III).

belle III.

Immuneserum Paratyphus β , Weil Albanien (Kaninchen)	Immuneserum Schiff E2 (Kaninchen)	Immuneserum Bernhard Krause Blut (Kaninchen)	Immuneserum Voldagsen Damman I (Kaninchen)	Immuneserum Glässer R.G.A. (Kaninchen)	Immuneserum Glässer Bromberg (Kaninchen)	Immuneserum Ferkeltyphus Bromberg (Kaninchen)	Immuneserum Schweinepest Drüe (Kaninchen)	Immuneserum Amerika 706 (Kaninchen)
Titer 5000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 5000	Titer 5000	Titer 10 000	Titer 10 000	Titer 5000	Titer 2000
500	500	5000	0	0	200	1 000	1000	2000
5 000	1 000	500	200	2 000	2 000	2 000	2000	1000
5 000	1 000	500	1000	2 000	10 000	5 000	2000	2000
2 000	1 000	2000	500	2 000	2 000	2 000	2000	1000
2 000	1 000	500	500	1 000	2 000	5 000	2000	1000
2 000	2 000	1000	500	2 000	2 000	2 000	1000	1000
0	2 000	5000	1000	2 000	2 000	2 000	2000	1000
2 000	2 000	5000	1000	200	5 000	2 000	2000	2000
1 000	500	500	1000	2 000	5 000	2 000	5000	1000
10 000	10 000	1000	2000	10 000	2 000	10 000	2000	1000
5 000	5 000	2000	2000	2 000	5 000	10 000	2000	1000
5 000	5 000	2000	2000	5 000	5 000	10 000	2000	2000
5 000	5 000	5000	2000	2 000	10 000	2 000	5000	5000
5 000	10 000	2000	2000	1 000	5 000	2 000	2000	2000
5 000	5 000	500	5000	5 000	10 000	5 000	5000	2000
5 000	5 000	500	5000	5 000	10 000	5 000	5000	2000
10 000	10 000	1000	5000	2 000	5 000	5 000	5000	2000
2 000	2 000	200	2000	5 000	10 000	1 000	2000	2000
2 000	10 000	2000	5000	10 000	10 000	10 000	2000	5000
2 000	1 000	500	500	5 000	2 000	2 000	2000	2000
10 000	10 000	2000	5000	5 000	10 000	10 000	2000	2000
2 000	5 000	500	2000	5 000	5 000	10 000	2000	2000
2 000	5 000	1000	2000	1 000	5 000	10 000	2000	2000

Auch hier läßt die serologische Uebereinstimmung mithin keinen Schluß auf die Herkunft der Kulturen zu; denn die Pestifer-Stämme und ihre Varietäten stammen vom Schwein, während die Paratyphus β -Stämme vom Menschen herrühren. Bei diesen β -Epidemien kommen Schweine als Ansteckungsquelle zum Teil gar nicht in Betracht, weil in den betreffenden Gegenden keine Schweinezucht bestand. Auch mittels der Voldagsen- und Ferkeltyphussera läßt sich nach den Ergebnissen der Tabelle die Unterscheidung zwischen Kulturen menschlicher und tierischer Herkunft nicht durchführen, sonderlich mit Rücksicht auf die Paratyphusstämme, die, obwohl menschlicher Herkunft, doch von dem Ferkeltyphusserum sehr stark agglutiniert werden. Andererseits aber stimmen unsere Ergebnisse insofern mit denen von Selter überein, daß die Untergruppe Paratyphus B des Hogcholerabazillus nach der Einteilung von Weber und Händel serologisch keine Einheit darstellt.

Die Tabelle gibt auch die Agglutinationsergebnisse mehrerer Stämme wieder, die sowohl zu Paratyphus B-Seren menschlicher Herkunft als zu Pestifer-Seren Beziehung haben. Dazu gehören z. B. die Stämme Kantjes und Busse, die bereits erwähnte Weilsche Paratyphuskultur aus Wolhynien, und eine Sammlungskultur des Gesundheitamtes mit der Bezeichnung Suipestifer Gesundes Schwein. Tatsächlich aber sind diese doppelt reagierenden Stämme doch entschieden Ausnahmen von der Regel. Auch in der Arbeit von Selter finden sich derartige „Doppelstämme“ angeführt, aber auch hier handelt es sich um Ausnahmen, die zwar die praktische Verwertbarkeit dieser serologischen Differenzierung für den einzelnen Fall beeinträchtigen, aber doch an der Tatsache nichts zu ändern vermögen, daß die serologische Identität der Paratyphus- und Pestifer-Stämme ebensowenig aufrecht zu erhalten ist, wie die der Paratyphus B- und Gärtner-Stämme. Weitere Untersuchungen nach dieser Richtung müssen erst erweisen, ob sich aus der serologischen Verschiedenheit praktische Schlüsse ableiten lassen. Vorläufig ist jedenfalls daran festzuhalten, daß eine zuverlässige Unterscheidung in einen Typus humanus und animalis auf dieser Grundlage nicht möglich ist. Der Paratyphus B-Typus kommt nicht nur beim Menschen, sondern auch beim Tier vor, der Pestifer-Typus nicht nur beim Schwein, sondern auch beim Menschen. Man kann mithin einen Hogcholerastamm vom Menschen ohne weitere serologische Untersuchungen nicht als Paratyphus B und jeden Stamm vom Schwein nicht ohne weiteres als Pestifer bezeichnen, sondern muß in Zukunft beim Menschen neben den durch die früheren Untersuchungen festgestellten Paratyphus B- und Gärtner-Kulturen auch auf das Vorkommen von Pestifer-Bazillen der mehrfach erwähnten Paratyphus β -Gruppe achten, die wahrscheinlich einen Teil der bisher als inagglutinabel angesehenen und mit Paratyphus C bezeichneten Stämme in sich birgt. Ebenso kann man bei Schweinen außer Pestifer- und Gärtner-Bazillen auch Paratyphus B-Kulturen finden.

Es wird nunmehr die weitere Aufgabe dieser Untersuchungen sein, Hogcholerastämme von anderen Tieren auf ihre serologische Zugehörigkeit zu untersuchen.

Die weitergehende serologische Differenzierung der Paratyphus B-Bazillen menschlichen Ursprunges in einen Hamburger und Breslauer

Typus wird durch unsere Ergebnisse nicht gestützt. Ob sich diese beiden Typen nach den Angaben von Bitter mittels kultureller Unterscheidungsmerkmale trennen lassen, bedarf ebenfalls der Bestätigung von anderer Seite. Wir wollen bezüglich dieser Frage hier nur feststellen, daß die weitaus größte Zahl unserer Pestifer-Kulturen serologisch zum Typus Breslau keine Verwandtschaft zeigt und deshalb nicht erkennen läßt, ob die Pestifer-Bazillen als menschliche Fleischvergifter in Betracht kommen.

Wir sind uns bewußt, daß unsere Befunde bezüglich der serologischen Differenzen zwischen Paratyphus B- und Pestifer-Bazillen mit den Ergebnissen namhafter Autoren im Widerspruch stehen. Worauf diese verschiedenartigen Ergebnisse beruhen, wird die Zukunft lehren. Es wäre denkbar, daß die einzelnen Stämme auch diese serologischen Eigenheiten nicht konstant festhalten, sondern insofern Änderungen unterworfen sind, als die Passagenkulturen bald mehr auf das eine, bald mehr auf das andere Immunserum reagieren. Darauf deutet vielleicht das Vorkommen von „Doppelstämmen“ hin. Wir sind deshalb auch weit entfernt davon, dieser Differenzierung für den einzelnen Fall eine praktische Bedeutung beizumessen. Unaufgeklärte Ungesetzmäßigkeiten, wie wir sie selbst beobachtet haben, und die Rücksicht auf die mannigfachen von uns erörterten, schwer kontrollierbaren Zufälligkeiten, die das Ergebnis der Agglutinationsreaktion beeinflussen können, mahnen zur Vorsicht bei der Beurteilung. Sicher gestellt und praktisch wichtig erscheint uns vorderhand nur die Tatsache, daß man bei der Herstellung von Paratyphus-Immunseren für die Untersuchungspraxis der Mannigfaltigkeit des Rezeptorenapparates in dieser Gruppe viel mehr Rechnung tragen muß, als es bisher geschehen ist.

Zusammenfassung.

1) Die kulturellen Merkmale des Typus Voldagsen (Glässer, Ferkeltyphus) sind nicht konstant genug, um eine Artdifferenzierung gegenüber dem Typus Pestifer zu ermöglichen, zumal sich durch Agglutinationsreaktionen keine Trennung durchführen läßt.

2) Nach unseren Befunden sind die Bazillen vom Typus Voldagsen einschließlich der Ferkeltyphusstämmen von Pfeiler als Varietäten des Typus Pestifer anzusehen. Die Ferkeltyphusbazillen sind nach dieser Auffassung Pestifer-Kulturen, die wenig oder kein Gas bilden.

3) Die Paratyphus β -Kulturen menschlicher Herkunft sind kulturell und serologisch mit dem Typus Pestifer identisch.

4) Die Paratyphus B-Gruppe ist ebensowenig wie die Gärtner-Gruppe (nach den Untersuchungen von Sobernheim und Seligmann) als Einheit anzusehen. Abgesehen von Ausnahmen („Doppelstämme“) sind durch Agglutinationsreaktionen mit monovalenten Kaninchen-Immunseren zwei Unterabteilungen zu erkennen: die eine reagiert auf Paratyphus B-Sera menschlichen Ursprunges und wird von Immunseren, die

mit Pestifer-Bazillen und deren Varietäten hergestellt sind, wenig oder gar nicht beeinflußt. Die zweite Unterabteilung reagiert auf Immunsera von Pestifer-Bazillen und deren Varietäten, und wird von Paratyphus B-Seren wenig oder gar nicht beeinflußt. Zu der ersten Untergruppe gehören außer den meisten Paratyphus B-Stämmen unserer Sammlung auch die Stämme aus der Hammelepizootie in Ueberruhr, zu der zweiten Untergruppe außer den Pestifer-Stämmen unserer Sammlung auch die verschiedenen Paratyphus β -Kulturen menschlicher Herkunft.

5) Aus der serologischen Zugehörigkeit läßt sich demnach ein Schluß auf die menschliche oder tierische Herkunft eines Hogcholerabazillus nicht ziehen.

6) Die serologische Verschiedenheit der Hogcholeragruppe läßt es notwendig erscheinen, für die Untersuchungspraxis möglichst polyvalente Immunsera zu verwenden, die gleichzeitig mit Kulturen aus der Paratyphus B-, Gärtner- und Pestifer-Gruppe hergestellt sind. Eselsera eignen sich für diesen Zweck besser als Kaninchensera, da sie im allgemeinen eine größere Wirkungsbreite haben. Für die differentialdiagnostischen Untersuchungen innerhalb der Paratyphus B-Gruppe sind solche Sera natürlich nicht brauchbar.

7) Bei Verwendung derartiger polyvalenter Eselsera lassen sich wahrscheinlich auch Stämme, die man anders in die Gruppe der inagglutinablen Paratyphus C-Bazillen einreihen müßte, z. B. die Paratyphus β -Kulturen, serologisch bestimmen.

7) Weitere Untersuchungen sind nötig, um festzustellen, ob die serologische Unterschiedlichkeit ein so durchgreifendes und beständiges Verhalten zeigt, daß sich daraus praktische Schlüsse über den Zusammenhang von menschlichen und tierischen Paratyphus-Infektionen ziehen lassen.

Berlin-Dahlem, im Januar 1921.

Quellenangabe.

- 1) Weil u. Saxl, Wien. klin. Wochenschr. 1917. Nr. 17. — 2) Bernhardt, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 73. 1912. — 3) Geissler, Zeitschr. f. Medizinalbeamte. Bd. 26. 1913. — 4) Neukirch, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 85. 1915. — 5) Levy u. Schiff, Berlin. klin. Wochenschr. 1919. Nr. 45; Arch. f. Schiffs- u. Tropenkrankh. Bd. 23. Beih. 4. — 6) Dienes u. Wagner, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 87. 1918. — 7) Ilgner, Zeitschr. f. Milchhyg. Bd. 23. 1913. — 8) Glässer, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1907. — 9) Dammann u. Stedefeder, Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilk. Bd. 36. 1910. — 10) Pfeiler u. Kohlstock, Berlin. tierärztl. Wochenschr. Bd. 12. 1913; Pfeiler u. Stanfuß, Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. Bd. 14. 1913; Pfeiler, Weichards Ergebn. d. Hyg., Bakteriolog. usw. Bd. 3. 1919. — 11) Pfeiler u. Engelhardt, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 28. 1920. — 12) Uhlenhuth u. Hübener, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl. Bd. 3; Uhlenhuth u. Händel, Ebenda. 2. Aufl. Bd. 6. — 13) Händel u. Gildemeister, Berlin. tierärztl. Wochenschr. 1912. Nr. 34, u. Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 11. 1941. — 14) Joest, Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. Bd. 16. 1914/15. — 15) Tormann, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919. — 16) Müller, R., Deutsch. med. Wochenschr. Bd. 36. 1910; Bitter, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 90. 1920; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. 1920. — 17) Schitten-

helm, München. med. Wochenschr. 1920. Nr. 46. — 18) Loele, Lubarsch-Ostertag, Allgem. Pathol. d. Mensch. u. d. Tiere. Bd. 18. 1915. — 19) Teodorasku, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 14. 1912. — 20) Löwenthal u. Seligmann, Berlin. klin. Wochenschr. Bd. 50. 1913. — 21) Oette, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 68. 1913. — 22) Wagner, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 71. 1913. — 23) Dorset, Ann. Rep. Bur. of anim. Indust. 1902. — 24) Seitz, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 71. 1912. — 25) Weil u. Felix, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 29. 1920. — 26) Sachs u. Schloßberger, Arb. a. d. Inst. f. exper. Ther. in Frankfurt. 1919. H. 6. — 27) Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 29. 1920. — 28) Gruschka, Ebenda. Bd. 30. 1920. — 29) Zwick u. Weichel, Arb. a. d. Gesundheitsamt. Bd. 34. 1910. — 30) Weber u. Händel, Berlin. klin. Wochenschr. 1912. Nr. 47. — 31) Rimpau, Arch. f. Hyg. Bd. 76. 1912. — 32) Keck, Ebenda, Bd. 79. 1913. — 33) Sobernheim u. Seligmann, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 6. 1910. — 34) Giessel, Dissert. d. Berlin. tierärztl. Hochsch. 1920. — 35) Selter, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 81. 1916. — 36) Braun u. Salomon, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 81 u. 82. 1918. — Braun u. Schäffer, Berlin. klin. Wochenschr. 1919. Nr. 18, u. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 89. 1919. — 37) Jötten, Berlin. klin. Wochenschr. 1919. Nr. 12. — 38) Hayo u. Gasters, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 90. 1920. — 39) Frickinger, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 29. 1919.

Nachdruck verboten.

Geißeln und „Myzele“ unter der Einwirkung von Wärme.

[Aus der Prosektur des Kaiser Franz Josefs-Spitals in Wien.]

Von Dr. A. Hinterberger.

Daß Geißeln relativ hinfällige Gebilde sind, ist jedermann bekannt, der sich mit der Darstellung dieser Organe eines großen Teiles der Kleinlebewesen befaßt hat. Von den Veränderungen, welche durch manche chemische Agentien bei der Hervorrufung der Agglutination an den Geißeln selbst (spezifisch agglutinierendes Serum verändert diese nicht) erzeugt werden, habe ich vor Jahren Mitteilung gemacht¹⁾.

Es war naheliegend, nachzusehen, welche Einwirkung die Wärme auf die Geißeln ausübt:

Lehmann und Fried²⁾ haben die Beweglichkeit verschiedener Stämme in bezug auf deren Schnelligkeit untersucht und dabei auch die Einwirkung der Wärme auf die Geschwindigkeit der Eigenbewegung festgestellt. Sie konnten bei *Bacillus subtilis* ein Aufhören der Bewegung bei 49°–55° und durch den Nachweis vollkommen unveränderter Fortimpfbarkeit feststellen, daß bei diesen Temperaturen nur die Geißeln des *B. subtilis*, und zwar funktionell, geschädigt wurden.

Ich wollte mir die Frage beantworten, ob auch die Form der Geißeln unter der Einwirkung der Wärme sich verändert, ob die Geißeln nicht etwa bei höheren Temperaturen verschwinden, oder, vorsichtiger gesprochen, ob nicht die Möglichkeit, Geißeln auf dem Deckglase sichtbar zu machen, durch vorherige Erwärmung einer Bakterienaufschwemmung aufgehoben wird. Ob die Geißeln wirklich gelöst werden, kann man ja wohl heute noch nicht sicher feststellen.

Ferner schien es mir von Interesse, ob die Wärme auch in bezug auf die in älteren, nicht vollkommen vor dem Austrocknen geschützten Kulturen oder in auf wasserarmen Nährböden gewachsenen Bakterien-

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 36. 1904. Nr. 3.

2) Arch. f. Hyg. Bd. 46. 1903. S. 310, u. Fried, Inaug.-Diss. Würzburg. 1902. Ref.

rasen auftretenden eigentümlichen Fadennetze, welche ich seinerzeit beim Milzbrandbazillus und anderen Mikroorganismen¹⁾ beschrieben und „Myzele“ benannt hatte (ob mit Recht oder mit Unrecht, das wird sich vielleicht in späterer Zeit erweisen) eine Wirkung äußere und ob und inwieweit die betreffenden Veränderungen voneinander abweichen.

Der Gang der Untersuchung war sehr einfach:

Die Geißeltragenden Kulturen wurden auf gewöhnlichem oder auch verdünntem Agar gezüchtet. Um die „Myzele“ bildenden Kulturen zu erzielen, stellte ich mir trockenere Nährböden durch Neukochen konzentrierteren oder Abdampfen gewöhnlichen Nähragars oder durch Einstellen von in Petri-Schalen in dünner Schicht ausgegossenem Agar in den Brutofen auf 2—3mal 24 Std. her. Im letzteren Falle gebrauchte ich den kleinen Kniff, das Austrocknen dadurch zu beschleunigen, daß ich durch 3 auf dem Rand der unteren Petri-Schalenhälfte aufgesteckte, kleine, u-förmige Blechstreifen das Berühren der beiden Petri-Schalenhälften verhinderte und der Luftzirkulation über der Nährbodenoberfläche freien Lauf ließ.

Von dem die Geißelbildenden Kulturen liefernden gewöhnlichen oder wasserreicheren Agar sowie von dem trockeneren Agar, auf welchem die „Myzele“ bildenden Rasen wuchsen, wurde Kulturmaterial entnommen und in einem kleinen Becherglas in ein etwa 1½ cm hohes Wasserquantum eingetragen. Dann kam ein kleines Thermometer in die Aufschwemmung und das Ganze in ein Wasserbad, das langsam erhitzt wurde. Bei verschiedenen Wärmegraden wurde mit steriler, kühler Oese von der Emulsion zur Anfertigung von Ausstrichpräparaten solcher Art entnommen, daß je ein Strich auf einem gemeinsamen Deckglas gezogen wurde.

Dann hob ich das Becherglas aus dem Wasserbad heraus, brachte die Emulsion über freier Flamme zum Kochen, ließ etwas abkühlen, strich noch einmal auf das nämliche Deckglas auf und hatte nun auf einem Deckglase die Emulsion z. B. bei 37,5°, 60°, 75°, 89° und gekocht nebeneinander in getrennten Strichen aufgetragen.

Die in der mir gewohnten Weise vorgenommene Färbung mit Silbernitrat²⁾ zeigte, daß die Geißeln bei Temperaturen von ca. 75° verschwunden waren, die „Myzele“ aber noch bei 89° (bei der Temp. der Emulsion im kochenden Wasserbad) vorhanden waren, nach kurzem Kochen der Aufschwemmung über freier Flamme aber dann ebenfalls nicht mehr zu sehen waren. Ich wiederhole, daß nur die (allerdings sehr große) Wahrscheinlichkeit besteht, daß die Geißeln bei 75° gelöst werden, die „Myzele“ zuerst bei Siedetemperatur; denn es kann ja auch sein, daß beide durch Hitze nur insofern verändert werden, daß sie die Färbungen nicht mehr annehmen. Die Geißelfärbungen, speziell die Silbernitratfärbung, sind ja bekanntlich sehr kitzlige Reaktionen, bei denen man sehr unangenehme Ueberraschungen erleben kann.

Dadurch, daß ich große Deckgläser verwendete und auf diese die Aufstriche aus den verschieden hoch erhitzten Aufschwemmungen nebeneinander auftrug, war ich sicher, daß keine Irreführung durch verschieden gut ausgefallene Fixierung, Färbung etc. möglich war.

Wie Reitmann und ich³⁾ seinerzeit angegeben haben, wachsen Geißeln auf feuchtem, „Myzele“ dagegen auf relativ trockenem Nährboden.

Geißeln und „Myzele“ sehen ganz verschieden aus, und als dritter Unterschied tritt deren verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Wärme hinzu.

Sogar wenn die von Migula seinerzeit gesehenen und von ihm „Pseudogeißeln“ genannten Fäden dasselbe wie diese „Myzele“ sind, dürfte sich im Hinblick auf die erwähnten wesentlichen Unterschiede

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 30. 1901. No. 11.

2) Centralbl. f. Bak. Abt. I. Orig. Bd. 30. 1901. S. 420 u. 421.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 37. 1904. H. 2.

zwischen beiden Formen das Wort „Pseudogeißeln“ für diese Nebenorgane mancher Bakterien kaum mehr empfehlen.

Es kommt häufig vor, daß in einer Aufschwemmung bei höherer Temperatur mehr „Myzele“ zu sehen sind als vorher. Das würde event. eine Stütze für die Ansicht abgeben, daß diese „Myzele“ nur Gerinnungen irgendwelcher, in den Emulsionen der Kulturrasen gelöster Stoffe seien. Dagegen spricht aber zweierlei: 1) trifft man in den erwähnten Fällen meist auch mehr Bakterienkörper in den Aufstrichen, und folgerichtig, ebenso wie der Aufstrich mehr Körper zeigt, auch mehr auseinander gebreitete „Myzele“, 2) zeigen sich in Emulsionen, welche nur geißeltragende Organismen enthalten, nach Erhitzen nicht „Myzele“, sondern nur Geißeln, bzw. nach erreichten 75° dann nur die Körper.

Es wäre nur zu verwundern, wenn nicht mehr „Myzele“ in der erwärmten Aufschwemmung zu sehen wären, als in der noch kühleren. Ein Rasen, welcher aus geißeltragenden Bakterien besteht, bildet, wenn er in Wasser kommt, sehr rasch eine sehr gleichmäßige Aufschwemmung von einzeln oder in kleinen Häufchen beisammen liegenden Kleinlebewesen. Ein Rasen hingegen, welcher aus durch Myzelfäden aneinander und an die Nährbodenoberfläche gehefteten Organismen besteht, ist eine ziemlich feste Bildung, die nicht nur von dem Nährboden nicht so leicht abzunehmen ist, sondern auch an der Platinnadel so fest haftet, daß man sie von dieser unter Wasser mit einer 2. Nadel förmlich herunterkratzen muß. Sie schwimmt dann als ein förmlicher Brocken, welcher durch Schütteln schlecht oder beinahe gar nicht zerteilbar ist, umher, bis die steigende Wärme und die Bewegung der Flüssigkeit dabei die Zerteilung und Aufschwemmung einigermaßen befördert. Diese Brocken sind manchmal so fest, daß sie nicht einmal durch heftiges Kochen vollkommen zerteilt werden. *Bacillus pyocyaneus*, *Megatherium foetidus* z. B. geben unter Umständen außerordentlich feste und sehr stark am Nährboden haftende Rasen, besonders wenn sie auf sehr wasserarmen Agar aus Nährbouillonkulturen geimpft werden.

Am besten kann man diese festen Rasen zerteilen, wenn man sie mit einer flach geschlagenen Platinnadel von der Agaroberfläche zart abschabt und dann die mit dem Rasen bedeckte Fläche der Platinnadel an der Innenfläche des Becherglases mit späterem fortwährenden Eintauchen in das Wasser verreibt.

Die Versuche wurden an: *Bacillus typhi*, *Proteus fluorescens*, *Bacillus typhi murium*, *B. mycoides*, *Mesentericus vulgatus*, *B. prodigiosus*, *pyocyaneus*, *subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cyanogenus* und anderen vorgenommen.

Agglutinationsähnliche Erscheinungen wurden bei Erwärmung der Emulsionen nie beobachtet.

Nachdruck verboten.

Ueber eine neue Hühnerenzootie, bedingt durch *Prosthogonimus intercalandus* n. spec.

[Aus dem Veterinärinstitut (Leiter: Prof. Dr. E. Hieronymi) und dem Zoologischen Museum (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. M. Braun) der Universität zu Königsberg i. Pr.)]

Von Prof. Dr. E. Hieronymi und Dr. L. Szidat.

Mit 4 Abbildungen im Text.

I. Teil: Pathologie. Von E. Hieronymi.

Im Juni 1920 wurden dem Veterinärinstitut der Universität zu Königsberg i. Pr. verendete Hühner eingesandt, die aus dem Geflügelbestande eines Hegemeisters stammten, der am Damnteich bei Königsberg i. Pr. wohnte. Nach dem Vorbericht war in nicht allzulanger Zeit der gesamte Bestand von 14 Legehühnern bis auf 2 ausgestorben. Nachforschungen ergaben, daß fast alle Hühnerbestände der am Damnteich wohnenden Besitzer an den gleichen Krankheitssymptomen eingegangen oder stark dezimiert waren, nachdem die Legetätigkeit der Hühner vollständig aufgehört hatte. Seit Jahren war von den am Teich ansässigen Besitzern ein ähnliches Massensterben der Hühner nicht beobachtet worden. Die Anwohner gaben an, daß das Sterben von dem Zeitpunkt an eingesetzt habe, als die Hühner in der Nähe des Teiches ihren Auslauf hatten und dabei Gelegenheit fanden, von dem Wasser des Teiches zu trinken oder, am Ufer watend, Kleintiere aufzupicken, die begierig verzehrt wurden. Bemerkenswert ist ferner, daß zu der gleichen Zeit große Schwärme der *Libellula quadrimaculata* besonders stark auftraten.

In derselben Jahreszeit fiel auch anderen Beobachtern ein Hühnersterben auf, ja in manchen Gegenden Ostpreußens werden mit Beginn jedes Sommers Klagen laut, die nicht nur das Sterben der Hühner betonen, sondern ganz wie in dem von mir beobachteten Falle hervorheben, daß Störungen in der Legetätigkeit vorausgehen.

Meyer¹⁾ schreibt, daß mit Beginn des Sommers von den Legehühnern in der Umgebung Königsbergs weichschalige Eier gelegt werden. Gewöhnlich nahm man bisher einen Kalkmangel der Nahrung oder eine sehr mastige Fütterung als Bedingung für diese Störungen in der Eiablage an. Auch Meyer fiel auf, daß das Legen weichschaliger Eier und daß Todesfälle dann eintraten, wenn die Hühner, am Ufer eines Gewässers, Sees oder Teiches herumwatend, große Mengen Kleingetieres verzehrt hatten. Meyer glaubt, daß diese übermäßige Aufnahme tierischer Nahrung schädlich gewirkt habe, ist sich aber über die Pathogenese nicht klar geworden. Nach ihm sollen ähnliche Krankheitserscheinungen bei Legehühnern auch nach dem Verzehr von Maikäfern oder Libellen beobachtet worden sein.

Eine interessante Bestätigung dieser Beobachtung gibt Thienemann²⁾, der direkt im Anschluß an Libellenflüge auf der Kurischen Nehrung das Legen weichschaliger Eier und Krankheitserscheinungen bei Hühnern feststellen konnte. Es handelte sich auch hier um die vierfleckige Libelle, *Libellula quadrimaculata*, die reichlich von Hühnern gefangen und verzehrt wurde. Die letzten Libellenschwärme fanden am

1) Meyer, Weichschalige Eier. (Georgine. 1920. S. 271.)

2) Thienemann, J., Libellenflüge und weichschalige Eier. (Georgine. 1920. S. 315.)

19. Mai 1920 statt und im Juni begann das Hühnersterben. Thienemann führt die Krankheitssymptome nach dem Verzehren von Libellen auf hypothetische Giftstoffe zurück, die im Libellenkörper enthalten sein sollen.

Viele Hühnerobduktionen in den Sommermonaten lassen neben einer Entzündung des Eileiters auch Bauchfellentzündungen erkennen, die nicht stets befriedigend bezüglich ihrer Entstehung gedeutet werden konnten.

Kitt¹⁾ schreibt in seiner Arbeit über Krankheitsfolgen des Eibefühlens bei Legehühnern, daß die Aetiologie der Eileiterentzündungen eine verschiedene und meist eine polybakterielle sei. Derartige Eihalterleiden kommen nach Kitt manchmal seuchenartig in einem Gehöft vor, sogar stationär, mehrere Jahre hintereinander sich wieder-

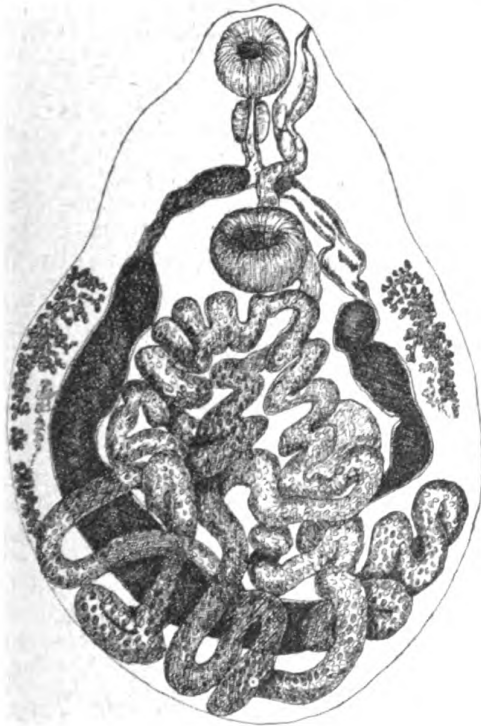


Fig. 1.

Fig. 1. *Pr. intercalandus*, reifes Exemplar mit stark gefülltem Uterus.

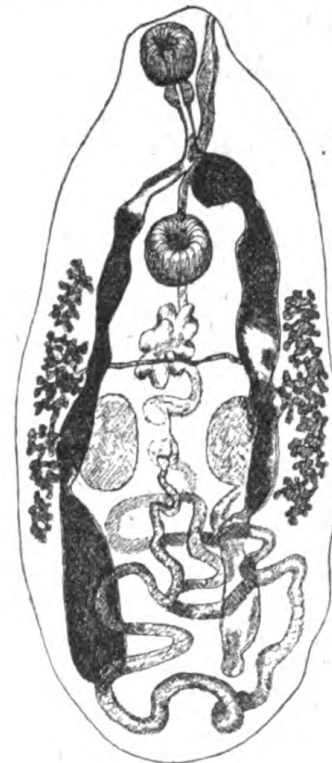


Fig. 2.

Fig. 2. *Pr. intercalandus*, jüngeres Exemplar.

holend, so daß an eine Uebertragung durch den Hahn zu denken sei. Die von ihm geschilderten pathologisch-anatomischen Veränderungen im Eileiter und am Bauchfell sind meinen Befunden bei der in Rede stehenden Enzootie sehr ähnlich.

Klinische Erscheinungen. Die während des Lebens bei den Hühnern beobachteten Krankheitserscheinungen waren anfänglich nicht besonders charakteristisch. Die Tiere wurden unruhig, saßen dann mit gesträubtem Gefieder kränkelnd umher, verloren ihre Lebhaftigkeit, und die Freßlust hörte auf. Auffällig war in jedem Falle, daß bei den Legehühnern in diesem Krankheitsstadium schwere Störungen in der Legetätigkeit eintraten. Die Tiere legten zwar zunächst noch Eier, doch waren sie auffallend dünnchalig, schließlich fehlte die Kalkkomponente

2) Kitt, Th., Die Krankheitsfolgen des Eibefühlens bei Legehühnern. (Monatsh. f. prakt. Tierheilk. Bd. 28. S. 256.)

ganz und die Eier wurden weichschalig abgelegt. Nach kurzer Zeit hörten die Tiere vollständig auf zu legen und starben in wenigen Tagen.

Pathologisch-anatomische Veränderungen. Es standen mir zur Obduktion 6 verendete Hühner zur Verfügung; bei allen war, mit ganz geringen Variationen, der Obduktionsbefund derselbe.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen spielten sich lediglich im Eileiter und am Bauchfell ab. Die übrigen Organe wiesen keine erheblichen Zustandsänderungen auf; bakteriologisch konnten niemals spezifische Keime ermittelt werden.

Bei der Eröffnung der Bauchhöhle sah man stets eine heftige Adhäsivperitonitis. Die stark injizierten Darmschlingen waren graurot verfärbt, ihre Serosa war rau, mattiert und mit m. o. w. feinen, gelben Fibrinbeschlägen bedeckt. Aehnliche Veränderungen fanden sich auch an der Serosa des stets prall mit Exsudat gefüllten Eileiters. Seine Wandungen waren mit den Darmschlingen oder mit dem parietalen Bauchfell verklebt. Häufig entstand so ein schwer entwirrbares Konvolut von Darmschlingen, Eileiter und Exsudatmassen.

Das Exsudat hatte meist fibrinös-eitrigen, in einigen chronischen Fällen jauchigen Charakter und zeigte dann eine trübe, schmutzig-grüne, schieferige Verfärbung, dieneben fettig-schmierigen Belägen und dem widerlichen Geruche besonders auffiel. Bei manchen Hühnern war ein so reichliches flüssiges Exsudat in der Bauchhöhle enthalten, gemischt mit dünnflüssigen Eiweißmassen aus dem Eileiter, daß es in größeren Mengen aus der eröffneten Bauchhöhle abfloß. In der trüben graugelben Flüssigkeit, die sich auch in den Luftsäcken fand, schwammen weiche, leicht zerdrückbare Flocken von grauweißer Farbe.

In anderen Fällen konnten jedoch nicht nur pathologische Exsudate in der Bauchhöhle gefunden werden, sondern auch Sekrete, Eiweiß- und Dottermassen aus dem Eileiter waren in den Bauchfellsack durch rückläufige, vielleicht antiperistaltische, Bewegung des Eileiters hineingelangt und mit Fibrin und Eiter zu Klumpen zusammengesintert. Besonders die Dotterbestandteile zeigten sich als zähe, durch Druck der Eingeweide zwischen die Darmschlingen einmodellerte Massen. In den wenigen Fällen, bei denen eine Verjauchung des Bauchhöhleninhaltes stattgefunden hatte, sah das Dottermassen-Exsudatgemisch schmutzig-olivgrün verfärbt aus, die Flüssigkeit roch übel, das Peritoneum war grauschwarz, schiefrig verfärbt, wie Kitt anbigt, durch Schwefeleisenbildung an den hyperämischen und von kleinen Hämorrhagien betroffenen Stellen. Ein auffälliges Symptom einer hochgradigen Bauchfellentzündung am uneröffneten Kadaver bestand darin, daß die Bauchdecken bei solchen Tieren eigentümlich livide und trübe, bläulichrot verfärbt waren.

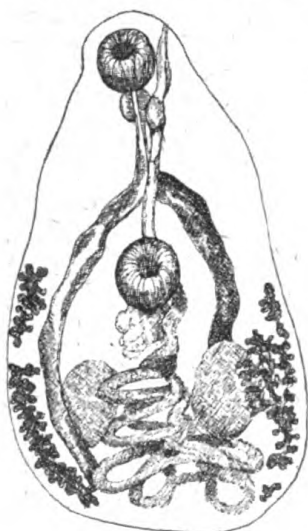


Fig. 3.

Fig. 3. *Pr. intercalandus*, Exemplar mit abnorm verkürzter hinterer Körperhälfte.



Fig. 4.

Fig. 4. *Pr. intercalandus*, junges unentwickeltes Exemplar.

Schwere Veränderungen lagen stets am Eileiter vor. Der kaudale und kraniale Abschnitt des Eileiters zeigte an der Serosa eine sehr starke Injektion der Gefäße. Die trübe Serosa war häufig ziegelrot gefärbt und mit dunkelroten Blutpunkten bedeckt. Fibrinös-eitrige Exsudate führten zu einer Verklebung mit Nachbarorganen, und mißfarbige, jauchige Ergüsse überzogen manchmal die einzelnen Windungen. Meist lag eine erhebliche Dilatation einzelner Eileiterabschnitte bis zu einem Durchmesser von 5–6 cm vor. Die Erweiterung war durch flüssige oder feste Inhaltsmassen bedingt, und je nach dem Füllungszustande wechselte meist die Wandstärke. Gewöhnlich war die Schleimhaut stark geschwollen, gerötet und mit Blutungen bedeckt. Bei leichteren katarrhalischen Affektionen lagen auch dünnflüssige trübe Eiweißmassen auf ihr. In den meisten Fällen stagnierte jedoch das Sekret und mischte sich mit Fibrin und Eiter. Der Eileiter war dann wurstförmig ausgedehnt, seine Wand papierdünn. In seiner Lichtung lagen bröckelige, blätterteigähnliche, zwiebelschalenartig geschichtete Massen von gelblicher oder schmutziggrauer Farbe, die entweder durchfeuchtet waren

oder die Konsistenz gekochten, trockenen Eigelbes besaßen. Kastanien- bis mandarinengroße, unregelmäßig ovale, eihähnliche oder rundlich geformte Klumpen füllten in mehreren Exemplaren den Eileiter aus. Bisweilen mischte sich der im kaudalen Eileiterabschnitt produzierte Kalk den Konkrementen bei; entweder in zusammenhängenden dünnen Lagen oder einzelnen Schollen, so daß Massen entstanden, die mit einer knitterigen Kalkhülle umschlossen oder mit Kalkpartikeln durchsetzt waren.

Zwischen diesen festen Exsudatsekretmassen, mehr noch in dem flüssigen Inhalt des Eileiters, fanden sich in jedem untersuchten Falle in Unmassen eigentümliche Trematoden, Parasiten von Distomenform, bei einem Huhne auch in mehreren Exemplaren in der Bauchhöhle. Bei den Kadavern, die eine vorgeschrittene Fäulnis zeigten, war die Zahl der Parasiten geringer.

Der von mir gefundene Parasit ist ein *Prosthogonimus* und muß als Erreger der beschriebenen Eileiterentzündung und der sekundären Peritonitis angesehen werden. Das Auftreten von *Prosthogonimus*-Arten im Eileiter und im Ei von Hühnern ist seit langem bekannt.

Schon 1749 teilte Hanow¹⁾ den ersten Fund von *Distomum ovatum* im Hühneri mit. Fiebiger²⁾ und Braun³⁾ führen *Prosthogonimus ovatus*, *pellucidus*, *cuneatus* und *japonicus* an, die in der Bursa Fabricii und nach der Rückbildung dieses Organes im Eileiter angetroffen werden.

Eine Anzahl der Parasiten übergab ich Herrn Geheimrat Braun, der sie in liebenswürdiger Weise, für die ich auch an dieser Stelle verbindlichst danke, untersuchte und eine neue Spezies feststellte, die er *Prosthogonimus intercalandus* n. spec. nannte. Im 2. Teil der Arbeit wird von Herrn Dr. Szidat Genaueres über den Parasiten mitgeteilt.

An keiner Literaturstelle, auch nicht bei Joest⁴⁾, ist jedoch darauf hingewiesen, daß durch ähnliche Parasiten pathologische Veränderungen am Eileiter oder gar Todesfälle aufgetreten seien. Die Parasiten wurden auch nur in wenigen Exemplaren und als harmlose Schmarotzer angetroffen.

Die Pathogenese dürfte so zu erklären sein, daß die Parasiten, deren Entwicklungszyklus noch unbekannt ist, und die sich im Eileiter angesiedelt haben, durch ihr Haften an der Schleimhaut und Blutsaugen — die Parasiten besitzen in frischem Zustande einen fleischwasserähnlichen Farbenton — einen Katarrh der Eileiterschleimhaut erzeugen, und zwar zunächst im kaudalen Abschnitt des Oviduktes. Infolgedessen tritt eine Störung der Kalksekretion ein, die Eier werden dünnchalig oder schalenlos gelegt. Eine Sistierung der Legetätigkeit wird dann eintreten, wenn die gesamte Eileiterschleimhaut erkrankt ist und eine geordnete Absonderung der Schleimhaut mit dem Ziele der Eibildung unmöglich gemacht ist. Das regellos abgeschiedene Sekret aus den eiweiß-, dotter- und kalkliefernden Drüsen mischt sich mit Entzündungsprodukten, mit Schleim, Fibrin und Eiter, es stagniert und eine Dilatation des Eileiters durch die Konkrementbildung ist die Folge. Eine Infektion dieser Inhaltsmassen ist unausbleiblich, da der Eileiter nicht steril ist. Das durch rückläufige Bewegung in die Bauchhöhle gelangte

1) Hanow, Seltenheiten der Natur und Oekonomie 1749. (Zit. nach F. A. Zörn, Die Krankheiten des Hausgeflügels. Weimar 1882.)

2) Fiebiger, J., Die tierischen Parasiten der Haus- und Nutztiere. Wien (Braunmüller) 1912.

3) Braun, M., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. 1901.

4) Joest, E., Spezielle pathologische Anatomie der Haustiere. Bd. 2. 1. Hälfte. 1920.

Sekretexsudatgemisch infiziert das Bauchfell, die sekundäre Peritonitis führt in längerer oder kürzerer Zeit zum Tode.

Eine Therapie dieser parasitären Krankheit erscheint aussichtslos. Es wurde von mir empfohlen, die Hühner eingesperrt zu halten und nur Körnerfutter zu verabreichen: in der Folge blieben weitere Erkrankungen aus. Prophylaktisch kommt also nur das Fernhalten der Tiere von verdächtigen Gewässern und die Vermeidung von Libellenfutter in Frage.

Es wäre interessant, wenn in den Sommermonaten meine Befunde bei Legehühnern bestätigt würden, da die neue Krankheit nicht nur eine wissenschaftliche, sondern auch eine wirtschaftliche Bedeutung besitzt, die in dem Ausfall an Eiern in der Legezeit und dem Massensterben wertvoller Legehühner beruht.

Zusammenfassung: In Geflügelbeständen wurden Störungen in der Eiablage beobachtet, die bei allen erkrankten Hühnern zum Tode führten. Die Todesursache war eine Eileiterentzündung und sekundäre Peritonitis, bedingt durch einen von mir gefundenen, noch nicht beschriebenen Parasiten, der zoologisch als *Prosthogonimus intercalandus* n. spec. bestimmt wurde.

II. Teil. *Prosthogonimus intercalandus* n. spec.

Von Dr. L. Szidat.

Im Juni 1920 wurden dem Zoologischen Museum in Königsberg von dem Leiter des hiesigen Veterinär-Institutes, Herrn Prof. Dr. Hieronymi, eine Anzahl Trematoden aus dem Eileiter von *Gallus domesticus* zur Untersuchung überwiesen, die unzweifelhaft der Gattung *Prosthogonimus* Lühe angehören. Sie unterscheiden sich jedoch von den 6 bereits bekannten Arten der Gattung¹⁾ so stark, daß die Aufstellung einer neuen Spezies berechtigt erscheint. Ich schlage die Bezeichnung **Pr. intercalandus** vor. Von einigen Hundert in Formalin befindlichen Exemplaren war die Mehrzahl noch nicht völlig ausgewachsen. Sämtliche Maße sind von ungequetschten Exemplaren genommen.

Bei völlig ausgewachsenen Exemplaren der neuen Art ist der Körper flach und besitzt birnenförmigen Umriß. Nicht völlig ausgebildete Exemplare haben mehr zungenförmige Gestalt. Die durchschnittliche Länge des Körpers beträgt 4,8 mm, die größte Breite 3,2 mm. Eine Bewehrung des Körpers mit Stacheln war nicht erkennbar.

Die Saugnäpfe sind fast gleich groß; der etwas kleinere Mundsaugnapf ist durchschnittlich 0,46 mm, der Bauchsaugnapf 0,5 mm breit. Der dem Mundsaugnapf unmittelbar folgende, kuglige Pharynx hat einen Durchmesser von 0,24—0,25 mm. Ihm folgt der 0,21—0,26 mm lange Oesophagus.

Die Darmschenkel reichen fast bis zum hinteren Körperende. Bei vielen Exemplaren enthielten sie noch Reste der Nahrung als dunkle, nahezu schwarze Masse (Blut).

Symmetrisch zu beiden Seiten des Körpers, etwa am Anfang der hinteren Körperhälfte, liegen die rundlich-ovalen, völlig glattrandigen

1) Siehe Skrjabin, K., Vogeltrematoden aus Russisch-Turkestan. (Zool. Jahrb. Abt. f. Syst. Bd. 35. 1913. S. 360.)

Hoden. Ihre äußeren Seitenränder werden meist etwas von den Darm-schenkeln verdeckt.

Der schmale, wenig gewundene Cirrusbeutel reicht bis zur Darm-gabelung. Auf der linken Seite neben dem Mundsaugnapf, etwa in Höhe seiner Oeffnung befindet sich der Genitalporus.

Die traubig angeordneten Dotterstocksfollikel der rechten Körper-hälfte sind oft stärker entwickelt und reichen weiter nach hinten als die der linken. Die vordere Grenze liegt etwa in der Höhe der Bauch-saugnapföffnung.

Der aus 10—13 Lappen bestehende Keimstock liegt median, etwa Saugnapfbreite hinter dem Bauchsaugnapf.

Bei völlig reifen Exemplaren füllt der Uterus die hintere Körper-hälfte ziemlich aus, so daß er die dort liegenden Organe fast völlig verdeckt. Bei jüngeren Tieren sind die Uterusschlingen weniger dicht und lassen alle Einzelheiten der hinteren Körperhälfte deutlich er-kennen. Die Schlingen des Uterus gehen nach vorn nie über den Bauchsaugnapf hinaus. Seine Mündung liegt dicht neben der männlichen Genitalöffnung.

Die bräunlich gelben Eier sind 0,029 mm lang und 0,015 mm breit.

Die neue Art steht zwischen *Prosthogonimus pellucidus* v. Linstow und *Pr. japonicus* M. Braun. Von *Pr. pellucidus* unterscheidet sie sich durch erheblich geringere Größe. *Pr. japonicus* besitzt bei ungefähr gleicher Körperlänge stark abweichende Verhält-nisse besonders in der Größe der Saugnäpfe, Form und Größe des Cirrusbeutels und Lage der Dotterstöcke.

Die Unterschiede gibt am deutlichsten die tabellarische Arten-übersicht der Gattung *Prosthogonimus* Lühe von K. J. Skrjabin¹⁾ wieder.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Koktostabilität gebundener Immunkörper. [Aus dem Werksspital der Prager Eisenindustrie-Gesellschaft in Kladno.]

Von Privatdozent Dr. Wilhelm Spät.

Die Frage der Koktostabilität gebundener Immunkörper wurde von Friedberger und Pinzower aufgerollt. Aus den zur Klärung der-selben vorgenommenen Untersuchungen konnten diese Autoren den Schluß ziehen, daß die an das Antigen gebundenen Immunkörper hitze-beständig seien, denn Typhusbazillen, mit Agglutinin maximal, bis zur Sättigung beladen, waren nicht imstande, nach Erhitzung auf 100° weitere Agglutininmengen aus einer Immunserumverdünnung zu entziehen.

Die auffallenden Ergebnisse dieser Versuche veranlaßten Bessau zur Nachprüfung derselben. Mit Recht ging hierbei Bessau von dem Standpunkte aus, daß die Im-munkörper nach der allgemeingültigen Vorstellung als Stoffe fermentativer Natur auf-zufassen sind, also als Stoffe, die sich den verschiedensten physikalischen und chemi-schen Einflüssen gegenüber meist sehr labil verhalten. In den sehr zahlreichen Ver-suchen mit Absorption, Bakteriolyse, Immunisierung usw. kam nun Bessau zu einem gegenteiligen Resultat. So konnte er nachweisen, daß durch Aufkochen oder bloß schon durch starkes Erhitzen die Funktionstüchtigkeit der an Choleravibrien gebundenen Bakteriolyse vollständig vernichtet wird; auch gelang es ihm, in diesbezüglichen Ver-

1) Siehe Anmerkung auf S. 240.

suchen zu zeigen, daß sensibilisierte Bakterien nach Erhitzung ihre antigene Eigenschaft wiedergewinnen. Aus diesen und anderen Befunden glaubte Bessau, die Angaben von Friedberger und Pinczower nicht bestätigen zu können. Gegen diese Schlußfolgerung hat nun Kumagai, ein Schüler Friedbergers, Stellung genommen und sowohl einzelne Versuche als auch dem ihnen zugrunde liegenden Gedankengang einer Kritik unterzogen, auf die wir zum Teil weiter unten noch zurückkommen werden. Durch die Arbeit Kumagais veranlaßt, führte Bessau eine neue Reihe von Versuchen aus, auf Grund deren er seine frühere Stellungnahme neuerlich aufrecht erhält.

Schien uns schon die aprioristische Ablehnung der Angaben von Friedberger und Pinczower durch Bessau mit Rücksicht auf die Fermentnatur der Immunkörper, wie bereits angedeutet, theoretisch gerechtfertigt, so hatten wir überdies gegen diese Annahme noch andere Bedenken. In einer großen Reihe von Arbeiten konnten Weil, Spät u. a. nachweisen, daß beim Zustandekommen von Immunitätsreaktionen eine Verankerung des Immunkörpers an das Antigen — wenigstens so lange sich dieses in gelöstem Zustande befindet — also eine Bindung im Sinne Ehrlichs nicht eintritt. Aber auch, wenn das Antigen in korpuskulärer Form vorliegt, wird man kaum an eine Bindung denken dürfen, wenn man sich vergegenwärtigt, wie leicht beispielsweise an Bakterien gebundene Agglutinine wieder von den Bakterien in indifferente Flüssigkeiten, wie physiologische Kochsalzlösungen oder verschiedene normale Blutsera übertragen werden können. Diese Feststellungen und Erwägungen stehen im vollkommenen Einklange mit der Auffassung der Immunkörper als Fermente, die ja gleichfalls bei den Reaktionen bloß durch ihre Anwesenheit wirken, ohne mit den einzelnen Substanzen irgendeine Verbindung einzugehen. So hat uns nicht allein die Diskrepanz der Angaben von Friedberger und Pinczower und Kumagai einerseits und Bessau andererseits, sondern vor allem das Problem der Bindung von Immunkörper in dieser Beleuchtung zur Nachprüfung der bisherigen Befunde gedrängt. Nach unseren Vorstellungen findet bei den Immunitätsreaktionen, d. h. bei der Einwirkung von Immunkörper auf die homologen Antigene, eine Bindung von Immunkörper nicht statt, wir können daher a priori nicht gut annehmen, daß eine Differenz in der Thermoresistenz zwischen freien und gebundenen Immunkörpern besteht.

Was die Technik der Untersuchungen betrifft, so prüften Friedberger und Pinczower die Agglutination, ebenso in der letzten Arbeit Bessau. Letzterer überdies in den früheren Versuchen die Bakteriolyse und Immunisierung mit den sensibilisierten und dann gekochten Bakterien. Wir wählten die Methode der Komplementbindung und der Agglutination. Von den vielen ausgeführten Versuchen führen wir nur einige Beispiele an.

Beispiel 1.

3 Typhusagarkulturen werden mit physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Emulsion in 3 Teile geteilt und 2 Std. bei 60° erhitzt. Teil I und II wurden sodann mit großen Mengen (bis 0,65 ccm) eines hochwertigen Typhusimmunserums sensibilisiert. T. III bleibt unverändert. Nach der Sensibilisierung wurde T. I $\frac{1}{4}$ Std. auf 100° erhitzt. Dann wurden nach Zusatz von Komplement die Aufschwemmungen auf Komplementbindung geprüft.

a) Teil I. (Typhusbazillen sensibilisiert, auf 100° erhitzt)

0,4	ccm	komplette	Lösung
0,3	"	"	"
0,2	"	"	"
0,1	"	"	"
0,05	"	"	"
0,01	"	"	"

b) Teil II. (Typhusbazillen sensibilisiert, nicht erhitzt)

0,4 ccm	vollständige Hemmung
0,3 "	" "
0,2 "	" "
0,1 "	" "
0,05 "	Spur Lösung
0,01 "	starke Lösung

c) Teil III. (Typhusbazillen nicht sensibilisiert)

0,4 ccm	komplette Lösung
0,3 "	" "
0,2 "	" "
0,1 "	" "
0,05 "	" "
0,01 "	" "

d) Teil III. + 0,05 ccm Typhusimmunserum

0,4 ccm	vollständige Hemmung
0,3 "	" "
0,2 "	" "
0,1 "	" "
0,05 "	Spur Lösung
0,01 "	starke Lösung

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sensibilisierte Bakterien nach Erhitzung auf 100° — infolge Zerstörung des Immunkörpers — nicht mehr Komplementbindung geben. Die letzte Reihe (d) demonstriert, daß die gekochten Bakterien nach Zusatz des homologen Immunserums zur Komplementbindung wieder geeignet sind.

Beispiel 2.

3 Typhusagarkulturen werden in je 2 ccm physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmt und $\frac{1}{4}$ Std. auf 100° (in kochendem Wasser) erhitzt. In einem Vorversuch wird die größte Menge Bazillenemulsion ermittelt, welche noch nicht hemmt: 2 Tropfen. Hierauf wird folgende Aufstellung gemacht:

1) 0,1 ccm Ty.-Immunserum	+ 2 Tropfen Bazillenemulsion
2) 0,05 "	" + 2 "
3) 0,025 "	" + 2 "
4) 0,01 "	" + 2 "
5) 0,005 "	" + 2 "
6) 0,0025 "	" + 2 "
7) 0,001 "	" + 2 "

und zwar 3mal dieselben Röhrchen, also zusammen 21 Röhrchen; außerdem die entsprechenden Kontrollen für Immunserum und Bazillenemulsion, die wir hier ebenso wie in den anderen Beispielen nicht besonders anführen.

Die 3 Reihen zu je 7 Röhrchen werden $\frac{3}{4}$ Std. bei 37° sensibilisiert, dann wird

die Reihe I zentrifugiert, $\frac{1}{4}$ Std. bei 100° erhitzt,

" " II (nicht zentrifugiert) $\frac{1}{4}$ Std. bei 100° erhitzt,

" " III bleibt unverändert.

Schließlich Zusatz von Komplement zu allen Röhrchen.

Es ergab nun:

Reihe I	Reihe II	Reihe III
1) komplette Lösung	komplette Lösung	vollständige Hemmung
2) " "	" "	" "
3) " "	" "	" "
4) " "	" "	" "
5) " "	" "	" "
6) " "	" "	Spur Lösung
7) " "	" "	starke Lösung

Wir sehen auch hier, daß die sensibilisierten und gekochten Bakterien zur Komplementbindung nicht mehr befähigt sind, und daß demnach der Immunkörper durch das Kochen offenbar zerstört wurde.

Bei diesen Versuchen könnte der Einwand gemacht werden, daß bei der Erhitzung bloß die komplementbindende Gruppe des Immun-

körpers zerstört, die haptophore (zytophile) dagegen möglicherweise erhalten bleibt. In der Tat hat Kumagai diesen Einwand gegen die diesbezüglichen bakteriolytischen Versuche von Bessau erhoben. Um auch diese Bedenken zu zerstreuen, wurden nachstehende Versuche ausgeführt:

Beispiel 3.

a) Eine Typhusagarkultur wurde mit 10 ccm physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmt und in 2 Teile geteilt. Der 1. Teil wird mit 0,1 ccm Typhusimmenserum (Agglut.-Titer 1:50 000) $\frac{1}{2}$ Std. bei 37° sensibilisiert, zentrifugiert, der Satz ein zweites Mal mit der gleichen Menge Immenserum behandelt, wieder zentrifugiert, 4mal gewaschen: Sediment I (sensibilisiert).

Der 2. Teil der Bazillenemulsion wird bloß zentrifugiert (ohne weitere Behandlung): Sediment II (nicht sensibilisiert).

b) Das Sediment I wird mit 0,1 ccm Typhusimmenserum $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Std. bei 37° behandelt, sodann zentrifugiert. Wir erhalten somit: Sediment I und Abguß I. Das Sediment II wird in gleicher Weise sensibilisiert und zentrifugiert. Wir erhalten somit: Sediment II und Abguß II.

c) Das Sediment I wird 15 Min. bei 100° erhitzt, in 5 ccm aufgeschwemmt, in nachstehender Weise verteilt und auf Komplementbindung geprüft:

Sediment I					
1) 1 ccm	+	Komplement			kompl. Lösung
2) 1 "	+	0,01 ccm Immenserum	+	Komplement	Hemmung
3) 1 "	+	0,005 "	"	"	"
4) 1 "	+	0,0025 "	"	"	"
5) 1 "	+	0,001 "	"	"	Spur Lösung

d) Gleichzeitig wird Abguß I und II durch Komplementbindung austitriert, um zu sehen, ob die Sensibilisierung des Sedimentes I eine vollständige (maximale) war, oder ob diese noch in stände war, einer Immenserumverdünnung weitere Mengen von Immunkörpern zu entziehen. (Zusatz von Bazillenemulsion in einer im Vorversuch ermittelten Menge und Komplement.)

Abguß I		Abguß II
0,001 ccm	0	0
0,005 "	0	0
0,0025 "	0	0
0,001 "	0	starke Lösung
0,0005 "	0	kompl. Lösung
0,00025 "	0	" "
0,0001 "	geringe Lösung	" "

Daneben eine Aufstellung mit nativem Immenserum mit entsprechendem Zusatz von Bazillenemulsion und Komplement, sowie von nativem Immenserum mit auf 100° erhitzten Bazillen.

Komplementbindung mit nativem Serum.		
a) Mit auf 60° erhitzten Bakterien	b) Mit auf 100° erhitzten Bakterien	
0,001 ccm	0	0
0,005 "	0	0
0,0025 "	0	0
0,001 "	0	0
0,0005 "	0	0
0,00025 "	0	0
0,0001 "	geringe Lösung	Spur Lösung
		geringe Lösung

Wir ersehen aus diesem Versuche (Röhrchen Nr. 1 der Gruppe c), daß die an die Typhusbazillen des Sedimentes I gebundenen Antikörper zerstört, daher zur Komplementbindung nicht mehr befähigt sind. Daß das Ausbleiben der Komplementbindung auf den Mangel an Immunkörpern zurückzuführen ist, ersehen wir aus den übrigen Röhrchen dieser Gruppe, denen noch nachträglich Immenserum zugesetzt wurde; daß die Sensibilisierung des Sedimentes I eine komplette, maximale war, ersehen wir aus der Tatsache, daß Abguß I sich wie natives Serum verhält, d. h. es wurden der Immenserumverdünnung keine weiteren Mengen von Immunkörpern entzogen (Versuchsphase b). Daß schließlich auch

die zytophile Gruppe des Immunkörpers beim Erhitzen zerstört wird, sehen wir aus den Röhrchen 2—5 der Gruppe c), denn die früher maximal beladen gewesenen Bakterien geben nach Zusatz von frischem Immuneserum wieder die Komplementbindungsreaktion.

Zum Schluß möchten wir noch einige Versuche erwähnen, welche auf einem anderen Wege — Agglutination — zu ähnlichen Resultaten geführt haben:

Beispiel 4.

2 Typhusagarkulturen wurden mit je 12 ccm aktiven Rinderserums abgeschwemmt, die Emulsion derart mit normalen Immunkörpern sensibilisiert. Dann wurde zentrifugiert, die Sedimente gewaschen. Das Sediment von je 1 Kultur wird in 2 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Aufschwemmung I wird 15 Min. bei 100° erhitzt.

Emulsion II bleibt unerhitzt.

Hierauf werden beide Emulsionen 1 Std. lang bei 42° im Wasserbade unter häufigem Schütteln digeriert. Die an die Bakterien gebundenen Normalantikörper werden von diesen abgespalten und in die physiol. Kochsalzlösungen übertragen, so daß diese dadurch befähigt wird, wie ein Serum zu agglutinieren. Nach 1 Std. wird zentrifugiert, die Abgüsse werden zur Agglutination mit Typhusbazillen verwendet. Es ergab:

	Abguß I	Abguß II
0,5 ccm	keine Agglutination	+++
0,3 "	" "	+++
0,2 "	" "	++
0,1 "	" "	++
0,05 "	" "	+

Durch Erhitzen auf 100° wurden die an Bakterien gebundenen Normalantikörper zerstört, so daß beim Absprengen keine Antikörper (Typhusagglutinine) in physiol. Kochsalzlösung übertragen werden konnten.

Wir sind uns sehr wohl bewußt, daß die bei Normalantikörpern nachgewiesenen Verhältnisse nicht ohne weiteres auch auf die Immunkörper übertragen werden dürfen. Immerhin ist es interessant, daß auch in dieser Hinsicht eine Uebereinstimmung mit den früheren Versuchen besteht.

Aus allen diesen unseren Versuchen geht hervor, daß, entgegen der Behauptung von Friedberger und Pinczower sowie Kumagai, und in Uebereinstimmung mit den Angaben von Bessau, die an das Antigen gebundenen Immunkörper keine Koktostabilität besitzen, also in dieser Hinsicht keine Besonderheit gegenüber den freien Immunkörpern aufweisen.

Zusammenfassung.

Versuche mit Komplementbindung und Agglutination haben ergeben, daß die gebundenen Immunkörper, im Gegensatz zu Friedberger und seinen Schülern und in Uebereinstimmung mit Bessau, keine Koktostabilität besitzen, da ihre Wirkung durch ein 1/4-stünd. Kochen aufgehoben werden kann.

Literatur.

Friedberger u. Pinczower, Ueber die Thermoresistenz der an die Antigene gebundenen Antikörper. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 45.) — Bessau, Zur Frage der Hitzebeständigkeit der gebundenen Antikörper. (Ebenda. Bd. 60. — Kumagai, Zur Frage der Hitzebeständigkeit der gebundenen Antikörper. (Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 14.) — Bessau, Die gebundenen Antikörper sind nicht hitzebeständig. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 83.)

Nachdruck verboten.

Hat Einspritzung von Adrenalin einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Antikörperbildung?

[Aus dem Central-Laboratorium für die Volksgesundheit Utrecht (Holland).]

Von Dr. U. G. Bijlsma, Utrecht.

Borchardt¹⁾ glaubt, gezeigt zu haben, daß beim Menschen subkutane Injektion von Adrenalin oder Hypophysin das Vermögen zur Typhusagglutininbildung erhöht, wenn mit Typhusvakzin vorbehandelt ist. Obgleich in seiner Publikation nicht mitgeteilt wird, wie hoch der Titer der Widalschen Reaktion bei nicht mit diesen Organpräparaten Behandelten stieg und daher seine Resultate nicht beweisend sind, schien mir doch die Frage von genügender theoretischer und praktischer Bedeutung zu sein, um einige Versuche darüber anzustellen, welchen Einfluß Adrenalin auf die Antikörperbildung hat.

Die Möglichkeit, daß eine fördernde Wirkung des Adrenalins besteht, war um so weniger von vornherein auszuschließen, weil in der Literatur einzelne Mitteilungen über den Einfluß (positiv oder negativ) der Schilddrüse auf das Vermögen zur Antikörperbildung vorliegen.

So fand Frouin²⁾, daß Hunde, bei denen die Schilddrüse exstirpiert war, etwas besser imstande waren, Antitoxin zu bilden als die Kontrolltiere, wenn beiden Tetanustoxin eingespritzt wurde. Launoy und Levy-Bruhl³⁾ fanden die aktive Immunität gegen *Spirochaeta gallinarum* bei schilddrüsenlosen Hühnern mindestens ebenso stark wie bei den Kontrolltieren. Garibaldi⁴⁾ injizierte Kaninchen intraperitoneal Schafserythrozyten und sah bei den thyreoidektomierten Tieren eine stärkere Hämolysebildung als bei den Kontrolltieren. Barbaro⁵⁾ dagegen beobachtete einen ungünstigen Einfluß der Schilddrüsenexstirpation auf die Antikörperbildung. Koopman⁶⁾ sah bei 2 Kaninchen, welche nur mangelhaft Hämolyse bildeten, Besserung auftreten durch Verfütterung von Schilddrüsentabletten. (Er erklärt das — meiner Meinung nach mit Recht — durch die Annahme, daß diese Tiere zuvor an Schilddrüseninsuffizienz gelitten haben.)

In einer weiteren Mitteilung glaubt Borchardt⁷⁾ gezeigt zu haben, daß auch Asthmolysin und Spermin, subkutan eingespritzt, und ebenso Schilddrüsentabletten per os denselben günstigen Einfluß auf das Agglutininbildungsvermögen haben wie Adrenalin und Hypophysin subkutan (s. ob.).

Ich habe 3 Versuchsreihen angestellt, deren Resultate kurz mitgeteilt seien:

I. Von 3 jungen Kaninchen wurde das 1 nicht vorbehandelt, bei 1 weiteren wurde die linke Nebenniere exstirpiert, das 3. erhielt jeden Tag eine subkutane Einspritzung von 0,1 mg salzsaurem Adrenalin (Furnee). 8 Tage nach der Operation wurde in der im hiesigen Laboratorium üblichen Weise mit der Immunisation begonnen, und zwar erhielten die Kaninchen jeden 7. Tag eine steigende Dosis von anfangs abgetöteten, später lebendigen Typhusbazillen intravenös.

Das Serum aller 3 Versuchstiere erreichte einen Titerwert von 1:20000. Die Agglutinationskurve zeigte keine nennenswerten Unterschiede.

II. Von 3 Kaninchen wurde 1 als Kontrolle nicht vorbehandelt, einem 2. wurde die linke Nebenniere exstirpiert, das 3. bekam täglich

1) Borchardt, München. med. Wochenschr. Bd. 66. 1919. S. 870.

2) Frouin, Compt. rend. Soc. Biol. Paris. T. 69. 1910. p. 237.

3) Launoy et Levy-Bruhl, Ebenda. T. 75. 1913. p. 352.

4) Garibaldi, Ebenda. T. 83. 1920. p. 15.

5) Barbaro. Fisiopatologia della tiroide e del timo con le infezioni. Milano 1919; Ref. in Endocrinology. Vol. 4. 1920. Nr. 1.

6) Koopman, Ebenda. Vol. 3. 1919. p. 318.

7) Borchardt, Therap. Halbmonatsh. Bd. 34. 1920. S. 536.

eine intravenöse Einspritzung von 0,05 mg Adrenalinum hydrochloricum. Alle 3 wurden immunisiert gegen *Vibrio cholerae*.

Ungefähr wie in Versuch I, wurde von der Adrenalinbehandlung eine fragliche, von der Nebennierenexstirpation eine schwache Wirkung gesehen (schließlicher Titerwert des Serums 1:20 000, 1:10 000, 1:2000).

III. Einem Kaninchen wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jedesmal 1 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von gewaschenen Schafserythrozyten intravenös injiziert. Außerdem wurde jeden 2. Tag 0,1 mg Adrenalinum hydrochloricum subkutan eingespritzt.

10 Tage nach der letzten Blutkörpercheninjektion war der hämolytische Titer des Serums 1:500, also sicher nicht höher als der gewöhnlich nach einer derartigen Behandlung erhaltene Wert.

In keinem dieser 3 Versuche hat sich also ein sicherer Einfluß der Adrenalineinspritzung auf die Fähigkeit zur Antikörperbildung ergeben. Auch einseitige Nebennierenausschaltung zeigte sich wirkungslos.

Der Widerspruch zwischen meinen und Borchardts Ergebnissen kann auf zweierlei Weise erklärt werden:

- 1) Menschen verhalten sich in dieser Hinsicht anders als Kaninchen.
- 2) Wenn Borchardt auch Kontrollpersonen einer Vakzination unterworfen hätte, würde er bei diesen Versuchspersonen denselben Verlauf der Agglutinationskurven gesehen haben wie bei seinen mit Organpräparaten behandelten Menschen.

So lange nicht Borchardt mitgeteilt hat, ob er und Rosenthal¹⁾, welcher seine Ergebnisse bestätigt haben soll, gleichzeitig und mit demselben Vakzin Kontrollversuche angestellt haben, halte ich die 2. Erklärung für die wahrscheinlichere.

Schlußfolgerungen.

Bei Kaninchen hat weder die subkutane oder intravenöse Adrenalineinspritzung noch die einseitige Nebennierenausschaltung einen deutlich nachweisbaren Einfluß auf die Fähigkeit zur Bildung von Agglutininen oder Hämolysinen.

Utrecht, Dez. 1920.

Nachdruck verboten.

Chromnickeldraht als Platindrahtersatz bei bakteriologischen Arbeiten.

[Aus dem städtischen Hygienischen Universitäts-Institut zu Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Neisser).]

Von Dr. **Walther Frieber**.

Als vor 1 Jahre der bis dahin als „Platin“ bekannte Platindrahtersatz bei einer Lieferung für so schlecht befunden wurde, daß er wie reiner Eisendraht in der Hitze weich wurde, sich blähte und bei nur kurzem Glühen verbrannte, mußten wir uns nach einem besseren Ersatz umsehen. Dabei lag der Gedanke nahe, daß sich unter den für elektrische Widerstände verwendeten Drahtsorten ein brauchbarer Draht finden ließe, zumal an diese Drähte durch die sehr hohen und oft wechselnden, bis zur Weißglut gesteigerten Temperaturen in der Technik

¹⁾ Rosenthal, 32. Kongr. f. inn. Med. 1920; zit. nach Borchardt, Therap. Halbmonatsh. Bd. 34. 1920. S. 541.

große Anforderungen gestellt werden, ähnlich denen, wie sie in noch höherem Maße bei bakteriologischen Arbeiten verlangt werden müssen, da hier noch eine besondere Widerstandsfähigkeit gegen das häufige Veraschen und Weißbrennen verkohlenden Nährmaterials hinzukommt.

Bei der Prüfung derartiger Drahtsorten mehrerer Firmen fanden wir einen brauchbaren Ersatz in dem uns in freundlicher Weise von Herrn Ingenieur W. Schulz, Prometheus G. m. b. H. Frankfurt a. M., West 13, Falkstr. 2 zur Verfügung gestellten Chromnickeldraht.

Wiederholtes kurzes oder anhaltendes starkes Ausglühen greifen diesen Draht nicht an, auch gegen das Veraschen organischer Substanzen ist er unempfindlich. Er wird nicht brüchig, sondern behält seine Festigkeit und Glätte. Die Oberfläche überzieht sich mit einer schwarzen Oxydschicht, die gegen weitere Oxydation schützt und dem Draht einen leichten grünen Farbton gibt, der ihn von reinem Nickel zu unterscheiden gestattet. Reinnickeldraht, den wir auch prüften, hat diese guten Eigenschaften nicht aufzuweisen; diese werden ihm erst durch die Legierung mit Chrom verliehen.

Bakterizide oder wachstumshemmende Wirkungen der Metalloxyde kommen nicht in Frage. Staphylokokkenauxanogramme ergaben keinerlei Wachstumsbeeinflussung.

Als Impfnadel oder -Oese kann der Draht in gleicher Weise verwendet werden wie Platindraht, und zwar in Stärke von 0,3 mm als Oese für hängende Tropfen, von 0,5 mm für gewöhnliche Arbeiten als Oese oder Nadel, und 0,8 mm stark zum Ausstreichen zähen Materials, zum Anfertigen von Kollargolpräparaten etc.

Die Prometheus, G. m. b. H. hat sich in liebenswürdiger Weise bereit erklärt, kleine Mengen dieses Chromnickeldrahtes obiger Stärken auch an andere bakteriologische Laboratorien abzugeben. Der Preis von **M. 1.—** für 1 g Draht, entsprechend einer Länge von etwa 25 cm des 0,8 mm starken Drahtes, oder etwa 60 cm bei 0,5 mm Durchmesser, ist in Anerkennung der finanziellen Schwierigkeiten der wissenschaftlichen Institute in vorbildlicher Weise niedrig gehalten, so daß sich eine Nadel von 7 cm Länge des 0,5 mm dicken Drahtes auf nur 12 Pfg. stellt. Wenn auch der Chromnickeldraht die Lebensdauer des echten Platindrahtes natürlich nicht erreicht, so darf es doch als eine wesentliche Ersparnis gelten, daß auch die dünnere und mittlere Drahtsorte selbst bei starker Inanspruchnahme wenigstens mehrere Wochen aushalten.

Für die liebenswürdige Ueberlassung des Chromnickeldrahtes möchten wir auch an dieser Stelle Herrn Ingenieur Schulz sowie der Prometheus G. m. b. H. unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Nachdruck verboten.

Bemerkungen zu Fritz Eckstein „Die einheimischen Stehmücken“.

Eine Schilderung ihrer Lebensweise und Anleitung zu ihrer Bestimmung. 17 Abbild. 58 SS. München (Joseph Völler) 1917). M. 5,20.

Von **Dr. E. Martini,**

Assistent am Institut für Schiffs- und Tropenhygiene, Hamburg.

Mit 6 Abbild. im Text.

Bei der großen Verbreitung, die man dieser hübschen Volksschrift wünscht, scheint es ratsam, einige Versehen und Uebersehen in der-

selben alsbald zu berichtigen, und zwar in einem Blatt, das durch seine Verbreitung ermöglicht, die Verbesserungen in die hoffentlich weiten Leserkreise der Ecksteinschen Schrift zu tragen. Die richtigzustellenden Punkte sind wohl nicht als Fehler aufzufassen, vielmehr sind die Mißverständlichkeiten offenbar durch eine gewisse Eile zu erklären, die wahrscheinlich durch andere Arbeit, so die zeitraubenden Untersuchungen im Gelände, veranlaßt, den Autor verhindert haben, Druckfehler, Abschriftsfehler und ähnliche Versehen zu verbessern.

Am wichtigsten für die Allgemeinheit sind vielleicht die Angaben über Malaria. Hier ist zunächst zu ergänzen (S. 33, 38), daß *Anopheles nigripes* auch Malaria übertragen kann. — Die Auffassung Schaudinns über die Entstehung der Rückfälle (S. 35 oben) wird heutzutage sehr in Zweifel gezogen, so daß die Ursache der Rückfälle noch nicht als durch Schaudinn erklärt angesehen werden kann. — Das Erbrechen (S. 35 Abs. 4) kommt zwar oft bei Malariaanfällen vor, doch verlaufen entschieden mehr Anfälle ohne solches, so daß die Kennzeichnung des Fieberanfalls, der mit heftigsten Kopfschmerzen und Erbrechen einherzugehen pflegt, mißverständlich ist. Auch hören nicht mit der Ausbildung der Gameten die Fieberanfälle auf (S. 35 unten), vielmehr können schon bei den ersten Anfällen Gameten vorhanden sein und sind es häufig, während der Anfälle eines Rückfalls oft dauernd. — Der Tropicaparasit braucht nicht nur 24 Std. zu seinem Entwicklungskreis (S. 37), sondern¹⁾ wie der Tertianaparasit 2×24 Std. Erkrankungen mit täglichen mäßig langen Fieberanfällen sind in der Regel doppelte Tertianaansteckungen, nicht Tröpica; Schwarzwasser (S. 37) kommt auch bei Tertiana vor.

Das Allgemeine über den Bau der Stechmücken und Funktion ihrer Organe, das Verf. in sehr zweckmäßiger und anregender Weise miteinander zu verbinden weiß, besprechen wir zuerst. Wenn man liest (S. 15), daß die 2 Paar Stechborsten und der Hypopharynx in der Ruhe von Ober- und Unterlippe scheidenartig umschlossen sind, wird man kaum die Vorstellung gewinnen, die uns Fig. 1 nach Vogel von der wirklichen Anordnung gibt, bei der also die Oberlippe nichts umschließt; auch wird man sich unter messerartigen Vorsprüngen (S. 15) der Stechborsten wohl kaum gleich sägezahnförmige Bildungen denken. Uebrigens ist die Angabe (S. 15), daß bei dem Stechakt nur die „Stechborsten“, worunter der Autor die Ober- und Unterkiefer versteht, in die Wunde eindringen, die übrigen Organe, das wäre also Hypopharynx, Ober- und Unterlippe, beim Einstich abgeknickt werden, ungenau. Hypopharynx und Oberlippe dringen, wie allbekannt, mit in die Wunde ein, auch steigt das Blut nicht zwischen den Stechborsten auf, sondern in der Oberlippe, und der Stechrüssel ist also gerade hohl, er enthält einen großen Kanal, der durch die zusammengekrümmte Oberlippe gebildet wird für das einströmende Blut, und einen kleinen, der im Hypopharynx liegt, für den austretenden Speichel (S. 19). — Die Haare der männlichen Fühler stehen um die Basis jedes Fühlergliedes annähernd in einem fast geschlossenen Ring, also eher quirlförmig, nicht als Büschel. Das Hirn liegt nicht oberhalb, sondern zwischen der Saugmuskulatur (S. 15). Ob die Schwinger, die umgebildeten Hinterflügel, hauptsächlich Gleichgewichtsorgane sind (S. 18), ist gerade neuerdings fraglich. Bei der Aufzählung der Beinabschnitte (S. 18) wäre besser der

1) Von wenigen Forschern wird allerdings der Existenz eines zweiten Tropicarregers mit nur 24-stünd. Entwicklung das Wort geredet.

auf die Hüften folgende Schenkelring oder Trochanter mit erwähnt, auch läßt der Ausdruck „zwischen Brustkorb und Hinterleib findet sich an der Oberseite ein kleines, schildchenartiges, chitines Gebilde, das sogenannte Schildchen“ (S. 18), nicht vermuten, daß auf das Schildchen noch das Postnotum, und die Rückenschiene der Hinterbrust vor dem

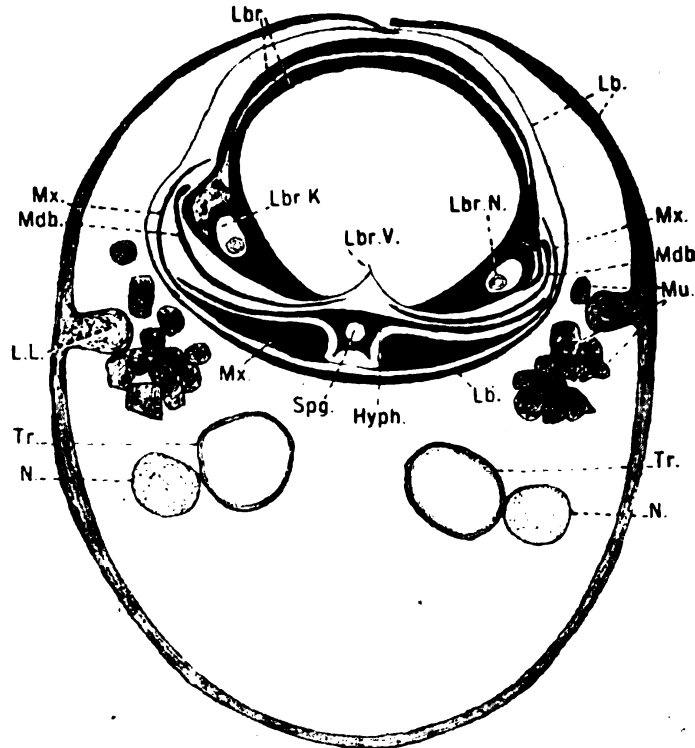


Fig. 1. Durchschnitt des Stechrüssels nach Vogel (aus Zool. Jahrb. Bd. 42. Abt. f. Anat. 1921). *L.L.* Seitliche Verstärkungen der Cuticula. *Hyph.* = Hypopharynx, *Lb.* = Unterlippe, *Lbr.* = Oberlippe, *Lbr.K.* = Nervenröhre in derselben, *Lbr.N.* = der Nerv darin, *Lbr.V.* Verschluss des Oberlippenrohres, *Mdb.* Oberkiefer, *Mx.* = Unterkiefer. (Die beiden Oberkiefer und die beiden Unterkiefer sind die Stechborsten im engeren Sinne.) *Mu.* = Muskeln, *N.* = Nerv, *Spg.* = Speichelgang. *Tr.* Tracheen.

am Hinterende den Larven „das Schwimmen an der Wasseroberfläche erleichtern“ sollen (S. 10), ist unerfindlich. Vom Gefäßsystem erwähnt E. nur ein „am Hinterende gelegenes schlauchartiges, pulsierendes Herz“ (S. 19). Das schlauchförmige Gefäß erstreckt sich bis in den Kopf.

1) An Druckfehlern ist besonders auch das Schriftenverzeichnis reich.

In seiner ersten Veröffentlichung gab Eckstein den *Culicines*, *Aëdines*, *Anophelines* den meiner Meinung richtigen Wert von Subtribus. Daß er dieselben neuerdings als Unterfamilien anspricht (wie Wilhelmi in seiner Besprechung angibt), habe ich aus der Arbeit nicht ersehen, und daher vermeidet Eckstein auch mit Recht die Formen *Anophelinae* usw. Unterfamilien der *Culicidae* sind ja *Corethrinae*, *Culicinae*, nach einigen auch *Dixinae*. Ebenso weiß ich an Ecksteins Ausdruck „Stechmücken“ nichts auszusetzen; es ist der schriftdeutsche Ausdruck für *Culicidae* und schließt nicht aus, daß auch noch andere Mücken oder Schnaken stechen, resp. einzelne Stechmücken nicht stechen. Auf die Nomenklatur gehe ich im übrigen nicht ein und bemerke nur, daß heutzutage für *Culicada* ganz allgemein *Ochlerotatus* gesagt wird, und *Culiseta* und *Culicella* als *Theobaldia* vereinigt werden, wodurch auch verwirrende Anklänge an *Culex* wegfallen; für *Mansonia* scheint sich die Bezeichnung *Taeniorhynchus* durchzusetzen.

Hinterleib folgen. Der Darm ist nur cum grano salis „grade“ zu nennen (S. 18), da hinter dem Magen der Darm alsbald eine Schlinge bildet. Auch der Ausdruck Spermaphoren (S. 19) für die Samenhälter des Weibchens wäre besser durch „Spermatheken“, die in der Mückenkunde an Stelle des allgemeineren „Receptaculum seminis“ gebräuchliche Vokabel ersetzt, da die Zoologie unter Spermaphoren Bildungen des männlichen Körpers versteht, die eine Menge Samenfäden zu einem Paket zusammenfassen. Ebenso heißt es für „Klasse“ Dipteren besser Ordnung (S. 5). In der Einleitung lies für *Anopheliden* *Anophelinen*¹⁾. Wie die 4 kleinen Kiemen

wenn es auch in der vorderen Hälfte etwa nicht mehr sich selbsttätig zusammenzieht.

Unter den Larven gibt es eine deutsche Aëdeslarve, deren Fühler lang und vom Borstenbusch ab deutlich verjüngt sind; diese Art, *A. serus*, die E. noch nicht bekannt war, würde die Bestimmung nach dem Larvenschlüssel (S. 21) unter die *Culicines* bringen. — Der kleine Dorn unter der Spitze des Atemrohres, der früher von Eckstein¹⁾ als kennzeichnend für *nemorosus*, jetzt für *nemorosus* und *vexans* angegeben wird (S. 22), kommt [fast?] allen Stechmückenlarven zu, auch *cantans*. Doch steht er nicht ventral, auch bei *nemorosus* nicht, wie E. früher angab und jetzt zeichnet, sondern beiderseits dorsal. Da dem Autor ferner 3 in Deutschland heimische Arten der *Cantans*- und 4 der *Nemorosus*-Gruppe nicht bekannt waren, mag der Untersucher gelegentlich nicht mit den Tabellen zurecht kommen²⁾. Bei *A. ornatus* ist die Angabe von 25 Striegel-schuppen (S. 53) offenbar zu hoch; die Hälfte würde genügen. Früher gab der Autor ausdrücklich an, die Schuppen ständen in 2 Reihen; bei meinen Stücken ist das nicht der Fall; sie stehen nur in einer Reihe, wie ich schon 1915 schrieb und abbildete. Bei *C. nigrina* soll es wohl heißen, 12–14 mehrfach „gezähnte“ (nicht gezeichnete) Dornen (S. 48). Die Zahl der ventralen Haarbüschel am Atemrohr (S. 41) von *C. hortensis* und *territans* ist bei meinen Präparaten nicht verschieden. Eckstein hat anscheinend das eine Mal die beider, das andere Mal nur die einer Seite gezeichnet, doch sind die Haarbüschel bei *hortensis* viel stärker. Außerdem hat die letztere Art noch eine Reihe viel kleinerer, dorsaler Haarbüschel jederseits.

Bei den Imagines kann man doch den Brustkorb von *An. nigripes* nicht als kurz und gedrungen bezeichnen (S. 25), er ist etwas weniger schlank als der der anderen *Anopheles*, aber im Vergleich mit den übrigen Stechmücken noch sehr lang. An den Tastern der *Anopheles*-Männchen ist nicht nur das letzte Glied verdickt (S. 28), sondern die beiden letzten verbreiterten Glieder bilden zusammen unter ungefähr gleicher Beteiligung die „Keule“. Das Hinterende von *A. ornatus* ist so wenig deutlich zugespitzt, daß der Anfänger beim Bestimmen, wenn er etwa an *C. pipiens* und *A. nemorosus* denkt, *A. ornatus* stets zu den Formen mit stumpfem Hinterleibsende, also unter *Culex*, suchen wird (S. 24 oben). Ist Hinterleib von *annulipes* „gelb“ mit zerstreuten Schuppen Druckfehler für gelb mit zerstreuten dunklen Schuppen (S. 5)?

Die männlichen Geschlechtsorgane gehören vielleicht kaum in eine Volksschrift, weil sie der Untersuchung doch einige Schwierigkeit machen. Sehr hübsch ist die Herausstellung der Unterscheidung zwischen Aëdinen und Nichtaëdinen durch den Dorn der „Klammerhaken“ (S. 25)³⁾. Andererseits verstehe ich nicht, wie die Fig. 7a die 3 „Chitinslamellen“ des „Spreitzapparates“ von *A. bifurcatus* zeigen soll (S. 31/32), die sich in der vorliegenden Dorsoventralansicht ja decken. Vgl. Fig. 2a bis d, 3 und meine Fig. 16, Taf. 1, l. c. Man sieht, daß die Abbildung S. 229 dieses Centralbl. Bd. 84 besser war, als die neuere. Doch sind

1) Rücksichtlich vollständigerer Bestimmungstabellen verweise ich auf: Martini, Ueber Stechmücken. Leipzig (Barth) 1920.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 83. 1919.

3) Der Unterschied ist jedoch nur bei Beschränkung auf die europäische Fauna richtig.

dort auch die Figuren von *maculipennis* und *nigripes* nicht richtig (vgl. die Abbildungen meiner Mückenarbeit und die Nebenfiguren der Fig. 2). Die Unterschiede unserer Anophelen sind, daß bei *nigripes* (Fig. 2d) der Penis (4) unbedornt, bei den anderen beiden bedornt ist, und daß *nigripes* und *maculipennis* nur 2 basale, unverzweigte, Großborsten haben (bei b u. c), während *bifurcatus* 2 verzweigte (c) und eine unverzweigte (b) führt¹⁾. Die subapikale Großborste (a) ist Merkmal der gesamten Gruppe von *Anopheles*, zu der alle drei einheimischen Arten und der südeuropäische *sinensis* gehören. Das nach innen vorspringende „Sinnesorgan“ findet sich nicht nur bei *terrigans*, sondern auch bei *pipiens* und *hortensis*. Die Abbildung war noch ähnlicher als die neue Fig. 7 auf S. 231 Bd. 84 dies. Centralbl. Es liegen schon (z. B. bei Howard, Dyer und Knab) viel bessere Darstellungen

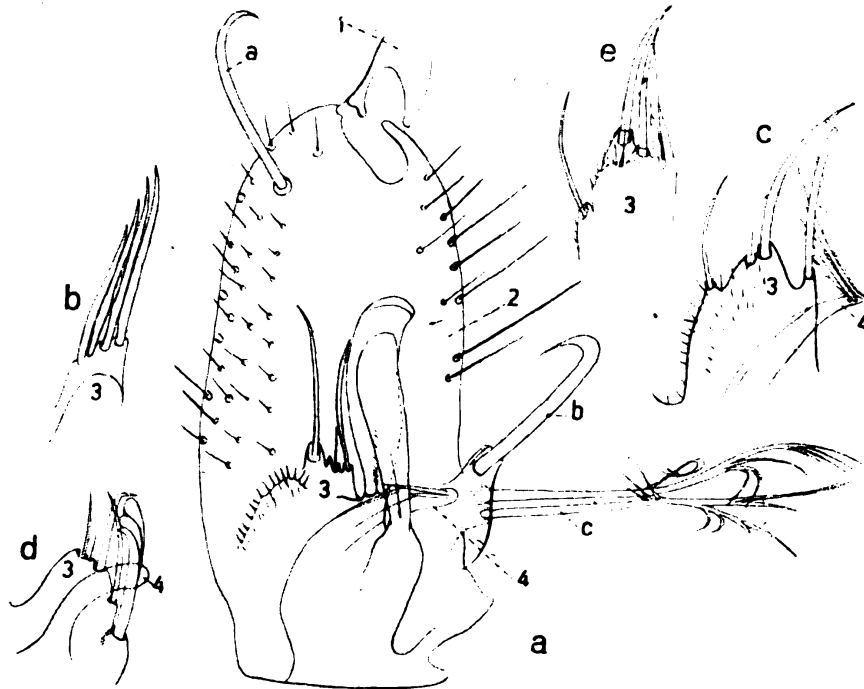


Fig. 2. Männlicher Geschlechtsapparat von *A. bifurcatus* von innen. Der dünnhäutige Analkegel ist der Uebersicht halber weggelassen. *b* Vordere Reihe der Basalanhänge von vorn. Meist sind dort nur 3 Anhänge vorhanden. *c* Basalanhänge von *A. maculipennis* von innen. *d* Do. von *A. nigripes*. *e* abnorme Anhänge von *A. maculipennis*. Ueber die kleineren Buchstaben siehe im Text, über die Zahlen bei Fig. 3.

vor. Sehr chitinige Spreithaken (*cantans*, S. 50) ist unverständlich. Daß bei *A. diversus* der Endstift des Klammerorganes stets gekrümmt ist, ist wichtig und neu und in der Umzeichnung meiner Fig. 1 c verloren gegangen, die daher in dieser Hinsicht verbesserungsbedürftig ist. Von den reichen Einzelheiten läßt aber die Figur der Aedes-Geschlechtsorgane (Fig. 7) ebensowenig erkennen wie die Abbildung in Bd. 84 dieses Centralbl. Sie genügen modernen Anforderungen nicht (vgl. die Abbildungen bei Smith, Howard, Dyar und Knab u. a.), indem ich bezüglich unserer einheimischen Arten auf meine Veröffentlichungen

1) Fig. 2d zeigt von der gewöhnlichen Bildung des Basalanhanges von *maculipennis* eine Abweichung, von der ich noch nicht sagen kann, ob Variabilität oder Verschiedenheit zugrunde liegt.

(l. c. u. Arch. f. Schiffs- u. Tropenkr. Bd. 19. 1915. S. 585 verweise, bringe ich hier (Fig. 3) nur das Bild von *A. sylvae*, da bei dieser Abbildung der Basaldorn der Klammerapparate in meiner Mückenarbeit versehentlich weggeblieben ist.

Die *Anopheles* halten nach Eckstein den Leib in der Ruhe „schief nach außen“ (S. 29), *Anopheles* steht aber unter der Decke manchmal durchaus senkrecht von der Unterlage. Für die anderen Stechmücken, die den Hinterleib „horizontal oder gegen die Unterlage geneigt halten“, würde wohl besser „parallel zur Unterlage“ gesagt, da *Culex* an Wänden stets annähernd senkrecht, Kopf

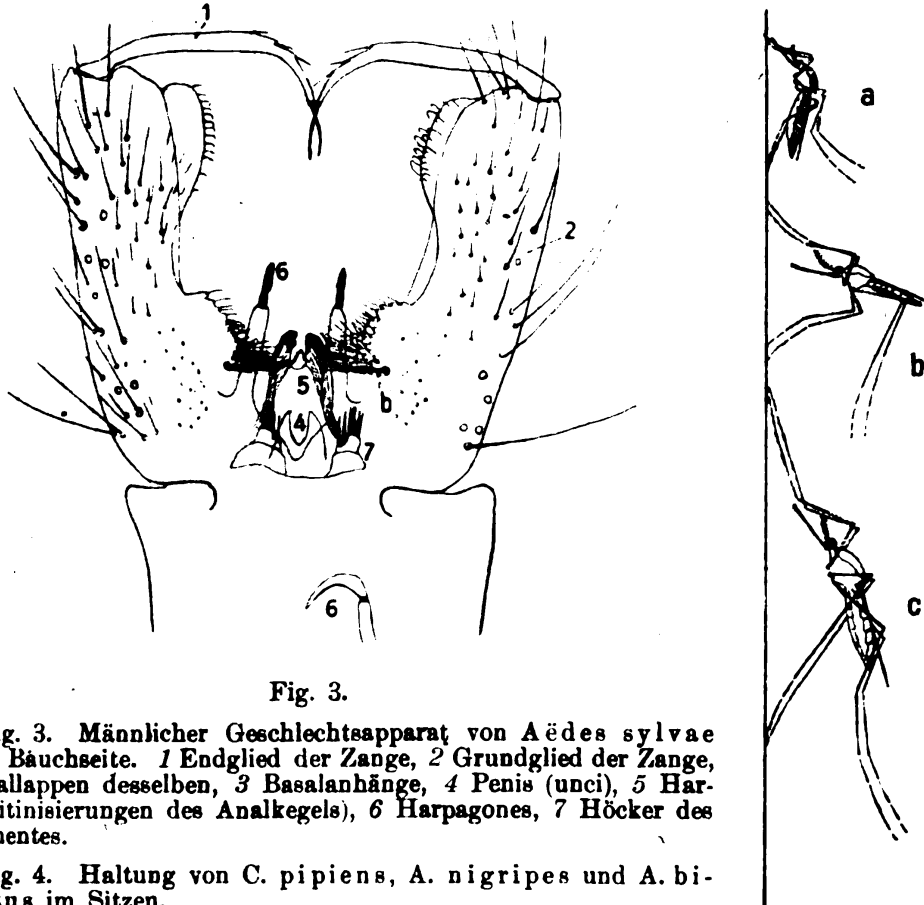


Fig. 3.

Fig. 3. Männlicher Geschlechtsapparat von *Aedes sylvae* von der Bäuchseite. 1 Endglied der Zange, 2 Grundglied der Zange, 2b Basallappen desselben, 3 Basalanhänge, 4 Penis (unci), 5 Harpes (Chitinisierungen des Analkegels), 6 Harpagones, 7 Höcker des 9. Segmentes.

Fig. 4. Haltung von *C. pipiens*, *A. nigripes* und *A. bifurcatus* im Sitzen.

Fig. 4.

nach oben, sitzt. Unter der Decke wird meist ein schräges Absperren der *Culex*-Leiber von der Unterlage beobachtet; das Charakteristische ist eben die buckelige, im Brustkorb, der stärker gewölbt ist, abgewinkelte Haltung der Culicinen. Fig. 4 zeigt diese Haltung an der Wand. Man erkennt auch die auffallende Verschiedenheit (S. 44) in der Haltung von *nigripes* und *maculipennis* resp. *bifurcatus*. Den Ausdruck „Tümpel“ kann man nicht wohl für die *Mansonia*-Gewässer verwenden, da man mit Tümpel in der Oekologie gerade die nicht ausdauernden Gewässer, also das Gegenteil von *Mansonia*-Gewässern, die andauernde Weiher, Teiche oder Seen, Gräben sind, bezeichnet.

Blutnahrung kann wohl nur bei echten *Culex* gut entbehrt werden; bei den anderen Arten ist ihre Entbehrlichkeit entweder überhaupt nicht

nachgewiesen oder es kommt nur zur Ablage weniger schlecht schlüpfender Eier, sofern man nicht stickstoffreiche Ersatzfutter wählt, die in der Natur schwerlich eine erhebliche Rolle spielen. Die Lästigkeit von *C. pipiens* habe ich im Verhältnis zu seiner Häufigkeit immer sehr gering gefunden. Warum ist Amerika die eigentliche Heimat von *territans*? Die Art kommt übrigens auch in kleinen Gräben und Wasserlöchern vor. Das Vorkommen von *Theob. morsitans* in Amerika ist mir neu¹⁾, bei *A. dorsalis* glaube ich, Anhaltspunkte zu haben, daß auch diese mehrere Generationen macht. Der Aufenthalt von *A. annulipes*, auf den Eckstein offenbar nur selten gestoßen ist, sind nicht Auwälder in erster Linie, sondern Wiesen und Felder, besonders Wiesengräben- und Teichränder; die Brutplätze liegen offen; zum Teil sind es Pfützen im Stoppelfeld.

Im ganzen liegt in den Beobachtungen zur Lebensweise die Stärke der Ecksteinschen Studien und fast jeder seiner bisherigen, mit den vorliegenden 8 Arbeiten, bringt die eine oder andere dankenswerte neue Mitteilung. Die Beobachtung des Autors, daß *morsitans* Vogelblut

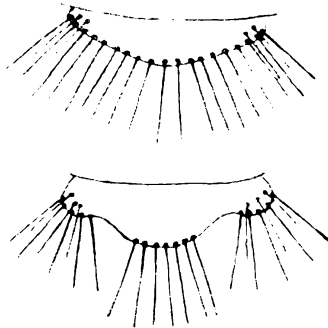


Fig. 5. Rückenschildchen von *Aedes cinereus* und *Anopheles bifurcatus*.

nimmt, ist sehr wertvoll, da über deren Ernährung noch nichts Sicheres bekannt gewesen sein dürfte, auch das Vorkommen von *horrens* in Deutschland war mir neu und fehlt in meiner eigenen Mückenarbeit. Vielleicht interessiert, daß *territans*, eine Mücke, über deren Ernährungsweise auch noch fast nichts bekannt ist, in Amerika an einem Frosch in größerer Zahl saugend gefunden wurde (Shannon).

Die Wirksamkeit der Fische als Mückenfeinde richtet sich ganz nach den örtlichen Verhältnissen; man darf wohl nach übereinstimmender Anschauung in der neueren Literatur auf sie in natürlicher Umgebung keine großen Hoffnungen setzen.

Zu den Figuren auch nur das Wesentlichste. Fig. 3: Die Haltung der Puppen ist unnatürlich, wie in so vielen, auch modernsten Darstellungen, der Hinterleib berührt in Wirklichkeit fast den Wasserspiegel. Das 9. Glied ist nur ein ganz kleiner Teil unter den Ruderfinten, die anscheinend dem 8. angefügt sind, während sie auf der Fig. 3 in der Mitte des großen 9. Segments hängen. Die *Anopheles*-Larve hat anscheinend nur 8, statt 9 Segmente. Fig. 5a: Die Oberlippe entspringt unter, nicht auf dem Schildchen; die Fühlergeißel hat 13 Glieder, nicht 14, wie in der Zeichnung, wo das 1. Geißelglied als 2 Glieder gezeichnet ist. In Wirklichkeit ist der Torus (das große Glied, von dem die Fühlergeißel entspringt) beim Männchen sehr viel größer als beim Weibchen, nicht umgekehrt. Fig. 7, siehe oben S. 252, 253, Fig. 8, läßt die 3-lappige Form des Aëdinen-Schildchens nicht erkennen; die Form zeigt anliegende Fig. 5 (besser war Fig. 1 der 1. Mitteilung von Eckstein). In Fig. 9 sind unter Nr. 3, 6, 7 einreihige Striegel gezeichnet, während ich sie bei diesen Arten nie einreihig fand; in Nr. 12 und 13 sind die Striegel ganz weggelassen, in Nr. 4 das Härchen vor dem Ende

1) Sie hat auch ihren Namen von Theobald auf Grund englischer Funde erhalten, obwohl auch von dort nicht bekannt ist, daß sie stäche.

des Atemrohres auf die ventrale, statt auf die dorsale Seite gezeichnet. Schneider gibt von einer Anzahl Aedes-Larven bereits weit bessere Darstellungen. Beim Objekt der Fig. 12a ist anscheinend durch den Druck des Deckglases der Enddarm teilweise herausgepreßt gewesen, wofür auch die gespreizte Lage der Kiemen spricht. Die Bildungen des Hinterendes sind daher nicht erkennbar. Fig. 12b u. c geben wohl die mittleren Stirnhaare wieder? während der Hauptunterschied der maculipennis und bifurcatus-Larven in den seitlichen Stirnhaaren steckt; eine sichere Unterscheidung an den Mittelhaaren ist kaum möglich, da sie bei beiden Arten oft etwas verzweigt sind“. Der Unterschied der Stirnhaargruppe von bifurcatus und maculipennis, die für den Anopheles-Topographen in Mitteleuropa das Wichtigste an den Anopheles-Larven ist, gebe ich deshalb in Fig. 6. Diese Haargruppe ist bei sinensis der von maculipennis zum Verwechseln ähnlich. Fig. 17: Der Mückenflügel ist nach einem gefalteten Flügel, also schlechtem

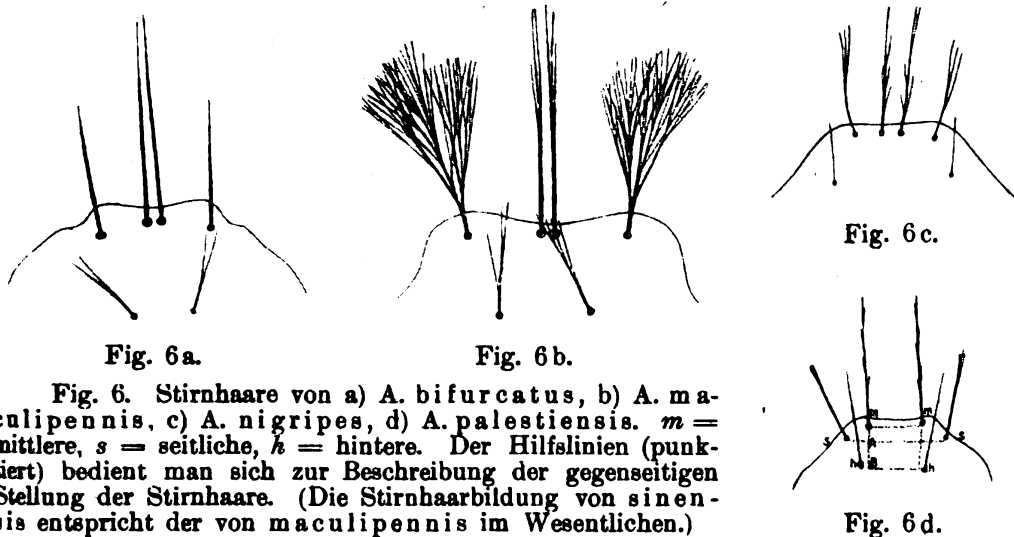


Fig. 6. Stirnhaare von a) *A. bifurcatus*, b) *A. maculipennis*, c) *A. nigripes*, d) *A. palestiensis*. *m* = mittlere, *s* = seitliche, *h* = hintere. Der Hilfslinien (punktiert) bedient man sich zur Beschreibung der gegenseitigen Stellung der Stirnhaare. (Die Stirnhaarbildung von *sinensis* entspricht der von *maculipennis* im Wesentlichen.)

Präparat, gezeichnet und gibt daher ein unnatürliches Bild, die 7. Ader (Analis) scheint bereits den Hinterrand zu bilden.

Ich würde mir die große Arbeit eines genauen Durchgehens von Ecksteins Veröffentlichung nicht gemacht haben, wenn sie nicht doch viele Vorzüge besäße. Sie faßt das Wichtigste kurz zusammen, trägt es in sehr allgemein verständlicher Sprache vor und versucht, mit Figuren in einfachsten Mitteln das Notwendige zu erreichen. Die Zeiten ermöglichen ja leider für den deutschen Forscher so schöne Abbildungen, wie sie Smith z. B. bringt, nicht mehr.

Es steckt jedenfalls eine große Menge eigener Arbeit in dem, was uns Eckstein mitteilt, um so mehr als ihm offenbar ein großer Teil einschlägiger Literatur unbekannt geblieben ist.

Im Verzeichnis der wichtigsten Literatur sind unter 15 Schriften 7 vom Autor selbst. Die übrigen sind bis auf den grundlegenden Theobald seit 1917 erschienen, also ungefähr in der Zeit, seit E. sich mit Stechmücken beschäftigt. Die Mehrzahl wirklich wichtiger Arbeiten, die sich auf die bei uns einheimischen Stechmückenarten und Malaria beziehen, teils originalen teils zusammenfassenden Charakters, fehlt; so von ersteren aus neuerer Zeit alle Arbeiten von Grassi,

Ficalbi, Galli-Valerio, Eysell, die Arbeiten von Edwards und Schneider, Osterwald und Tänzer u. a., ferner alle die grundlegenden Arbeiten der älteren Zeit und der neuen Welt; von letzteren Speiser, Sack, Grünberg, Ziemann, Eysell und andere. Aus manchen der aufgeführten Schriften erfährt dagegen der Leser nicht viel, was nicht schon in der Volksschrift steht, und diese Uebersicht ermöglicht daher kein tieferes Eindringen in die Materie.

Wenn der Autor schreibt (S. 4): „Vor allem zu nennen sind hier die Untersuchungen von Prof. Bresslau und seiner Mitarbeiter, deren Ergebnisse erst zu einer rationell durchführbaren Stechmückenbekämpfung geführt haben“, so wird der Leser kaum vermuten, daß eine Stechmückenbekämpfung rationell bereits seit ungefähr 20 Jahren in Ländern fast aller Sprachen in großzügigster Weise angestrebt und auf das Erfolgreichste durchgeführt wurde. Sind auch einzelne unrationelle Versuche in Deutschland vorgekommen, neben sehr rationellen hie und da in unseren Kolonien, so ist doch schon 1912 und 1914 von Mühlens¹⁾ über rationelle Stechmückenbekämpfung in Wohldorf und deren Erfolg berichtet. Zu dem, was in älteren Anleitungen und in den genannten Arbeiten über Wohldorf, außerdem in Lehrbüchern, Sanitäts- und anderen Berichten aller Sprachen sich findet, ist durch die neueren deutschen Arbeiten sehr wenig hinzugekommen. Damit soll Bresslau und dessen Mitarbeitern das Verdienst nicht geschmälert werden, daß sie das im Auslande über die Lebensweise der verschiedenen Stechmückengruppen bekannt Gewordene für die entsprechenden deutschen Formen als erste bestätigt, praktisch Vortreffliches geleistet und durch Werben mit Wort und Tat auf dem wichtigen Gebiet der Stechmückenbekämpfung mehr erreicht haben, als vorher in Deutschland erreicht war. Das gilt vor allen Dingen von Glasers unermüdlicher Tätigkeit. Immerhin ist die große Bedeutung des Ungeziefers für die Volkswohlfahrt noch lange nicht genügend bekannt. Hier wird jedenfalls Ecksteins Arbeit eine wertvolle Hilfe werden.

1) Arch. f. Schiffs- u. Tropenkr. u. Beih. Bd. 16. 1912, u. Bd. 18. 1914.

Inhalt.

- | | |
|--|---|
| <p>Bijlsma, U. G., Hat Einspritzung von Adrenalin einen Einfluß auf die Fähigkeit zur Antikörperbildung?, S. 246.</p> <p>Braun, H., u. Cahn-Bronner, C. E., Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. II. Mitteilung. Die synthetischen Fähigkeiten verschiedener Bakterienarten, S. 196.</p> <p>Frieber, Walther, Chromnickeldraht als Platindrahtersatz bei bakteriologischen Arbeiten, S. 247.</p> <p>Hieronymi, E., u. Szidat, L., Ueber eine neue Hühnerenzootie, bedingt durch <i>Prosthogonimus intercalandus</i> n. spec. Mit 4 Abbildungen im Text, S. 236.</p> <p>Hinterberger, A., Geißeln und „Myzele“ unter der Einwirkung von Wärme, S. 233.</p> | <p>Kodama, H., Eine neue, einfache Serodiagnostik der Syphiliskranken mittel-Ausflockungsreaktion, S. 211.</p> <p>Mantoufel, P., Zschucke, H., u. Beger, H., Systematische Untersuchungen an Kulturen der Hogcholera-Gruppe unter Berücksichtigung des <i>Voldagsen-</i> und <i>Paratyphus β</i>-Typus, S. 214.</p> <p>Martini, E., Bemerkungen zu Fritz Eckstein „Die einheimischen Stechmücken“. Eine Schilderung ihrer Lebensweise und Anleitung zu ihrer Bestimmung. Mit 6 Abbildungen im Text, S. 249.</p> <p>van Riemsdijk, M., Die Kapseln der Bakterien und eine neue Methode, diese einfach darzustellen. Mit 1 Tafel, S. 177.</p> <p>Spät, Wilhelm, Zur Frage der Kokostabilität gebundener Immunkörper. S. 241.</p> |
|--|---|

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 4.

Ausgegeben am 11. Juni 1921.

Nachdruck verboten.

Methoden zur Differenzierung der Streptokokken und Pneumokokken.

[Aus der bakteriologischen Abteilung der Farbwerke vorm. Meister
Lucius & Brüning, Höchst a. M.)

Von Dr. R. Bieling.

Bei den zahlreichen Grippeerkrankungen der letzten Zeit kam neben den Influenzabazillen vor allem den Streptokokken und Pneumokokken eine besondere Bedeutung zu, weil sie als Mischinfizienten häufig zu schweren und tödlichen Komplikationen führten.

Vor die Aufgabe gestellt, durch Immunisierung von Großtieren tatsächlich wirksame Antisera gegen diese Krankheitserreger herzustellen — eine Teilaufgabe bei der Herstellung des Höchster Grippeserums —, mußte vor allem eine exakte Einteilung und scharfe Artbestimmung der zahlreichen, aus dem an Grippe erkrankten Menschen herausgezüchteten Kokkenstämme versucht werden.

Im folgenden wird nun über Beobachtungen bei der Differenzierung grampositiver pathogener Kokken aus menschlichen Erkrankungsfällen berichtet und es sollen Methoden beschrieben werden, welche sich für die Artbestimmung und Einteilung der untersuchten Stämme als geeignet erwiesen.

Der Umstand, der eine sichere Charakterisierung der genannten Kokkenarten von vornherein erschwert, ist die Variabilität ihrer biologischen Eigenschaften bei Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden. v. Lingelsheim¹⁾ hält die Eigenschaften eines *Streptococcus* „bedingt durch die Umstände, denen er zeitig ausgesetzt ist, sowie durch sein vorausgegangenes Schicksal“.

Es wird also notwendig, nur solche Keime, die, unter gleichen Bedingungen stehend, aus dem gleichen Nährboden stammen, untereinander zu vergleichen. Aus praktischen Gründen glauben wir daher fordern zu müssen, daß eine Artbestimmung innerhalb der pathogenen Streptokokken- und Pneumokokkengruppen sich auf die Eigenschaften bezieht, welche frisch aus dem Blut oder blutreichen Organgeweben erkrankter Menschen herausgezüchtete Stämme zeigen. So erlangen wir ein Bild des Zustandes, welchen der Kokkus als Krankheitserreger im Menschen darbietet, und welcher dementsprechend für die Herstellung der Heilsera verlangt wird.

Die folgenden Untersuchungsergebnisse sind dementsprechend nur insoweit zur einteilenden Charakterisierung der untersuchten Stämme verwendet worden, als sie an derartigen frischen Kulturen festgestellt wurden. Bei der Untersuchung in der Praxis kann diese Forderung leicht erfüllt werden, da eine erschöpfende Untersuchung eines Stammes mit den sämtlichen zu beschreibenden Methoden in wenigen Tagen be-

1) Kollé u. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 2. Aufl.

endet sein kann. Im Laufe der Untersuchungen soll dann weiterhin gezeigt werden, daß bei Auswahl geeigneter Differentialnährböden, wie sie im folgenden beschrieben werden, die durch die Variabilität der Stämme bedingten Fehlresultate vermieden werden können.

Von einem praktisch brauchbaren Unterscheidungsmerkmal muß verlangt werden, daß es möglichst scharfe und deutliche Ausschläge gibt ohne Uebergänge und zweifelhafte Reaktionen, und zwar auch dann nicht, wenn die Unterscheidungsmethode oder der Nährboden in seiner Zusammensetzung innerhalb der Variationsbreite schwankt, welche im Laboratoriumsbetrieb unvermeidlich ist.

Morphologische Unterschiede.

Die Einteilungsprinzipien der Streptokokken nach ihren morphologischen Eigenschaften erfüllen diese Forderungen nicht.

Das Kettenwachstum auf flüssigen Nährböden ist nicht nur künstlicher Beeinflussung weitgehend zugänglich (Veränderungen der Alkalität, Zusatz von hemmenden Substanzen), sondern wechselt auch auf denselben Nährböden, wie z. B. Serumbrühe. Kettenbildende Pneumokokken sind keine Seltenheit.

Die Form des einzelnen Kokkus ist bei den Streptokokken im allgemeinen rundlich bis queroval, bei den Pneumokokken längsoval. Doch sind die Unterschiede im Einzelfall, besonders in den Kulturen, häufig wenig ausgeprägt. Zudem gibt es Streptokokken, welche ebenfalls die Lanzettform der einzelnen Kokken besitzen, ohne sich in irgendeiner anderen Weise von den Streptokokken zu unterscheiden.

Auch die Kapselbildung im Herzblut der intizierten Mäuse kann nicht als sicheres Charakteristikum für den *Pneumococcus* angesehen werden, denn er teilt dieses Verhalten mit dem *Streptococcus mucosus*. Auch der *Streptococcus mitior* kann, falls er einmal mäusepathogen ist, im Herzblut des Versuchstieres echte Schleimhüllen bilden, wie ich es an einem Stamm feststellen konnte, der in den sämtlichen später zu besprechenden Differenzierungsmethoden sich als ein typischer *Streptococcus mitior* erwies.

Eine sichere Charakterisierung eines fraglichen Stammes, welche in jedem Einzelfall zum Ziel führt, kann also auf Grund der morphologischen Unterschiede allein nicht durchgeführt werden; viel schärfere und deutlichere Unterschiede gibt hier die Untersuchung des Verhaltens der Stämme auf verschiedene Nährböden.

Blutagar.

Derjenige Nährboden, dessen Einführung für die Einteilung und Namengebung der Streptokokken sowie der Pneumokokken von ausschlaggebender Bedeutung war, ist der Schottmüllersche Blutagar¹⁾. Auf diesem wächst der *Streptococcus longus* als feiner Rasen kleinster Kolonien.

Der Kolonieuntergrund, wie ein mehr oder minder breiter Hof um die Kolonie ist infolge der blutlösenden Wirkung des lebendigen *Streptococcus* frei von Rotfärbung, durchsichtig und hell. Der *Streptococcus mitior* bringt diese Hämolyse im allgemeinen nicht zustande. Er verfärbt den Kolonieuntergrund schwarzgrün, ganz ähnlich wie der *Pneumococcus*. Freilich findet man besonders beim *Pneumococcus* häufig ebenfalls eine Aufhellung des Kolonieuntergrundes, welche meist einen mehr grünlichen Farbton hat und von einem schwarzgrünen Rande umgeben ist. Eine sichere Unterscheidung ist jedoch nicht immer möglich.

Dieses Verhalten der Streptokokken auf der Blutplatte ist außerdem recht labil. Hämolytische Streptokokken verlieren oft schon nach wenigen Ueberimpfungen jede Einwirkung auf die Färbung der Blutplatte. Freilich kann man häufig durch wenige Züchtungen in bluthaltiger Brühe oder durch Tierpassagen und Abimpfung aus dem Herzblut die hämolytische Wirkung wiederherstellen. Andererseits genügen geringe Zusätze von

1) Deutsche med. Wochenschr. 1903. Nr. 20.

inneren Desinfizientien, welche das Wachstum der Kokken nicht mehr hindern können, um die Hämolyse zu unterdrücken.

Tabelle I.

Ein Tropfen einer 24-stünd. Kultur eines hämolytischen Streptococcus wird auf Schottmüllerschen Blutagar mit verschiedenen Zusätzen von Eukupin. bihydrochl. gebracht. Das Wachstum und die Hämolyse auf der Blutplatte werden nach 1mal und 2mal 24 Std. bei 37° abgelesen.

Eukupin- gehalt der Blutplatte	1:10000		1:15 000		1:20 000		1:25 000		1:30 000		—	
	W	H	W	H	W	H	W	H	W	H	W	H
24 ^b	—	—	+++ (+)	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
48 ^b	—	—	+++ +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

W = Wachstum. H = Hämolyse.

Auf der Blutplatte mit der Eukupinkonzentration 1:10000 ist das Wachstum der aufgeimpften Streptokokken völlig gehemmt. Auf der Konzentration 1:15 000 ist bereits ungehemmtes Wachstum in 24 Std. eingetreten, die Hämolyse ist jedoch nicht zustande gekommen. Bei weiterer Bebrütung entwickelt sich eine leichte, im Vergleich zur Kontrolle jedoch deutlich verminderte Auflösung des Blutes. Auch nach den Eukupinkonzentrationen 1:20000 und 1:25000 ist am 1. Tag eine deutliche Hemmung der Hämolyse ohne Wachstumshemmung zu sehen.

Der zeitliche Ablauf der Hämolysehemmung der Streptokokken durch Eukupinzusatz wird deutlich in den folgenden Versuchen nach dem obigen Schema:

Tabelle II.

Eukupin- gehalt der Blutplatte	1:9000		1:10 000		1:11 000		1:12 500		1:15 000		—	
	W	H	W	H	W	H	W	H	W	H	W	H
24 ^a	±	—	+++	—	+++	+	+++	+	+++	++	+++	++
48 ^b	+	—	+++ ±	±	+++	+	+++	++	+++	+++	+++	+++

Es besteht also die Möglichkeit, durch chemische Mittel das hämolytische Vermögen von Streptokokken zu unterdrücken, ohne gleichzeitig das Wachstum des Stammes auf dem Blutagar erheblich zu schädigen.

Zu erheblichen diagnostischen Irrtümern aber kann die Tatsache führen, daß hämolytische Streptokokken auch im erkrankten Organismus selbst, wohl durch die Einwirkung von Abwehrkörpern, ihre hämolytische Wirkung verlieren können. Die Verwendung von frisch aus dem Krankheitsherd herausgezüchteten Stämmen, ja selbst die Beurteilung der ersten, mit dem streptokokkenhaltigen Krankheitsmaterial selbst beimpften Blutplatte, vermeidet dies nicht, wie folgende Beobachtungen zeigen:

Das Blut eines an einer Sepsis durch hämolytische Streptokokken eingegangenen Meerschweinchens wurde auf Serumbrühe verimpft. Es wuchs eine Reinkultur von Streptokokken 89 H. Uebertragung auf Blutplatte ergab starke Hämolyse sämtlicher Kolonien. Das Tier hatte nun im Dünndarm verstreut mehrere schorfbedeckte Ulcera, welche von einer breiten, geröteten Zone umgeben waren, offenbar anschließend an septische Embolien. Nach Entfernung des Schorfes wurde der Grund des Ulcus abgeimpft. Es wuchs eine Reinkultur von Streptokokken 89 D, welche sich in keiner Weise morphologisch noch nach einer der später zu schildernden Methoden von den Blutstämmen unterschieden. Sie waren jedoch völlig anhämolysch und zeigten auch keine Grünfärbung des Blutnährbodens.

Bei Weiterzüchtung auf bluthaltiger Serumbrühe und Blutagar änderte sich dieses Verhalten nicht. Jedoch gelang es durch 3 Mäusepassagen, den Dünndarmstamm 89 D stark hämolytisch zu machen. Zu diesem Zwecke wurde eine Maus mit der Brühekultur intraperitoneal infiziert und aus dem Herzblut der toten Maus 1 Serumbrüheröhrchen angelegt, mit dem eine 2. Maus intraperitoneal infiziert wurde usw.

Die aus dem Herzblut der 3. Mäusepassage gezüchteten Streptokokken waren als erste sofort hämolytisch auf der Blutplatte und behielten diese Eigenschaft auch bei Fortzüchtung auf Blutagar bei (2 Generationen beobachtet).

Umgekehrt konnte auf folgende Weise das hämolytische Vermögen des Herzblutstammes 89 H vorübergehend aufgehoben werden. Eine Maus wurde mit einer Serumbrühekultur des hämolytischen Stammes intraperitoneal infiziert, am folgenden Tag wird die Niere des Tieres herausgenommen, in steriler Kochsalzlösung abgespült und von dem Querschnitt eine Serumbrühekultur zur weiteren Infektion angelegt.

Aus der Niere der 3. Maus wuchs schon beim Ausstreichen der Niere selbst auf der Blutplatte eine Reinkultur nicht hämolytischer Streptokokken. Die folgenden Abimpfungen auf der Blutplatte ergeben jedoch schon wieder hämolytische Kolonien.

Aus der Niere eines mit hämolytischen Streptokokken infizierten Tieres wurden also dieselben in anhämolysierender Form herausgezüchtet.

Diese Methode der Abimpfung aus der Niere septischer Tiere wurde darum gewählt, weil mehrfach bei Patienten mit Streptokokkensepsis später aus dem steril entnommenen Urin hämolytische Streptokokken in ihrer anhämolysierenden Form gezüchtet werden konnten, so daß angenommen wurde, daß in den Ausscheidungsherden der Infizierten selbst die hämolytische Wirkung der Streptokokken unterdrückt wird.

Auch in den Abszessen Septischer wurden in zwei Fällen Streptokokken in Reinkultur gefunden, welche die Blutplatte nicht hämolysierten, sondern grünschwarz färbten, genau wie der *Streptococcus mitior*. Die gleichzeitig verwandten, später zu schildernden Methoden (Blutwasseragar, Kochblutagar) hatten jedoch diese Fehldiagnose verhindert. Der eine der beiden Stämme wurde allein durch zwei Züchtungen auf Blutagar stark hämolytisch, während bei den anderen 3 Mäusepassagen mit Abimpfungen aus dem Herzblut notwendig waren, um die Hämolyse hervorzurufen.

In den Ausscheidungsherden septisch erkrankter Menschen und Tiere finden sich also bisweilen Streptokokken, welche die Blutplatte überhaupt nicht verändern oder nur die Grünfärbung des *Streptococcus mitior* hervorrufen, ohne jedoch seine übrigen Eigenschaften zu besitzen. Durch gleichzeitige Untersuchung des Herzblutes der Erkrankten, in welchem sich hämolytische Streptokokken fanden, sowie durch die leichte Umwandlung der anhämolysierenden Stämme in hämolytische wurdeargetan, daß es sich hier nicht um selbständige Arten, sondern nur um Wuchsformen des hämolytischen *Streptococcus* handelt. Die Entstehung anhämolysierender Generationen aus hämolytischen Stämmen auf künstlichen Nährböden zeigt die folgende Beobachtung:

Bei einem *Streptococcus*, der bereits seit längerer Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet war, wurde häufig bemerkt, daß neben hämolytischen Kolonien nicht hämolytische auftraten, die sich in allen sonstigen Eigenschaften völlig identisch verhielten. Impfte man von einer isolierten, stark hämolytischen Einzelkolonie auf ein Serumbrüheröhrchen, so erhielt man wiederum eine Reinkultur, welche auf Blutagar nicht hämolytische ergab neben hämolytischen. Dagegen ergab die Fortimpfung einer anhämolysierenden Kolonie niemals wieder eine hämolytische.

Alle diese teils im infizierten Organismus, teils auf dem künstlichen Nährboden entstandenen, nicht hämolytischen Streptokokkengenerationen sind dadurch charakterisiert, daß ihnen die später zu besprechenden Eigenschaften des *Streptococcus mitior* fehlen. Sie färben Kochblutagar nicht gelb, sie wachsen auf Blutwasseragar als feuchte, abstreichbare Kolonien (siehe unten). Sie gleichen vielmehr in

jeder Beziehung dem *Streptococcus haemolyticus*, ausgenommen allein in dem Verhalten auf dem Schottmüllerschen Blutagar.

Umgekehrt konnte beobachtet werden, daß auch gelegentlich Pneumokokken auf der Blutplatte mit typischem, hämolytischem Hof wuchsen.

Ein Pneumokokkenstamm, der sich morphologisch und nach sämtlichen biologischen Methoden als typischer *Pneumococcus* verhielt, wuchs auf Blutplatte im allgemeinen typisch, in einzelnen Generationen jedoch bildete er die gleichen breiten, hämolytischen Höfe, wie ein echter hämolytischer *Streptococcus*. Der Kulturrasen selbst löste sich dabei nach Pneumokokkenart in 10-proz. taurocholsauren Natrium restlos und prompt auf. Abimpfungen ergaben wieder nicht hämolytische, grünfärbende Kolonien, sowie pneumokokkenartiges Verhalten auf den übrigen Nährböden, genau so, wie die nachträglich untersuchten Ausgangskulturen. Ein solch plötzliches Auftauchen hämolytischer Generationen wurde zweimal gesehen. Bemerkenswert war hier, daß stets sämtliche Kolonien einer Kultur entweder hämolytisch oder nicht hämolytisch waren.

Die Blutplatte trennt also wohl im allgemeinen Pneumokokken und *Streptococcus mitior* einerseits, von dem sogenannten hämolytischen *Streptococcus* andererseits. Die charakteristische hämolytische Wirkung wird jedoch relativ leicht unterdrückt sowohl durch Einwirkung chemischer Körper, sowie durch biologische Vorgänge im erkrankten Organismus selbst. Sie zeigt sich überdies auf künstlichen Nährböden nicht konstant, so daß die vielfach geübte Charakterisierung von Streptokokkenstämmen lediglich nach ihrem Verhalten auf der Blutplatte zu einer Reihe von falschen Ergebnissen führen muß.

Kochblutagar.

Viel exakter gelingt die hier versuchte Trennung zwischen *Streptococcus longus* einerseits und *Str. mitior* und Pneumokokken andererseits auf der Kochblutagarplatte.

Sternberg und Boxer¹⁾ benutzten den von Voges zur Züchtung des Influenzabazillus angegebenen Nährboden, welcher in der Weise hergestellt wurde, daß zu kochendem Agar einige Tropfen frischen, defibrinierten Pferdeblutes zugesetzt wurden. Auf diesem braunen Nährboden wuchsen die Diplokokken unter starker grüngelber Färbung der Kolonie und ihrer Umgebung, während die Streptokokken als graue Kolonien wuchsen und den Nährboden unverändert ließen.

Wir verwandten stets einen Agar mit größerem Blutzusatz. 3-proz. Agar mit 1 Proz. Pepton werden zum Kochen erhitzt, mit 15-proz. defibriniertem Pferdeblut gemischt und sofort von der Flamme abgesetzt. Nach Abkühlen auf etwa 50–60° wird der schokoladenbraune Niederschlag gut aufgeschüttelt und die fein verteilte Mischung zu Platten und Röhren gegossen.

Auf diesem Kochblutagar wuchsen die Pneumokokken als grüngelbe Kolonien, umgeben von einer breiten, ebenso verfärbten Zone auf der braunen Fläche. Der *Streptococcus mitior* wächst genau so, wie der *Pneumococcus*, während der *Streptococcus longus* (hämolyticus) graue Kolonien bildet und den Blutfarbstoff unverändert läßt. Bisweilen beobachtet man bei einigen Stämmen von *Streptococcus haemolyticus* an Stellen sehr dichter Beimischung ebenfalls eine schwache Grünfärbung der Kolonien, ohne daß daraus diagnostische Schwierigkeiten entständen. Im übrigen konnten Variationen auf dem Kochblutagar bisher nicht beobachtet werden, auch da nicht, wo auf der Schottmüllerschen Blutplatte die oben geschilderten Aenderungen der Hämolyse auftraten. Anhämolytische Generationen des *Streptococcus longus* und hämolytische Generationen von *Pneumococcus*

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. 1906. S. 591.

wuchsen auf dem Blutagar typisch, so daß hier Fehldiagnosen ausgeschlossen waren.

Wir besitzen also in dem Kochblutagar ein scharfes und recht konstantes Mittel zur Unterscheidung von Pneumokokken und *Streptococcus mitior* einerseits und von *Streptococcus longus* (*haemolyticus*) andererseits.

Ganz ähnliche Unterschiede sieht man auf dem von Gilbert und Fournier¹⁾ verwandten, nach Art des Loeffler-Serums erstarrten Vollblut. Die auch auf dem Blutagar zuweilen zu beobachtende matte Oberfläche der Mitiorulturen tritt hier häufig recht deutlich zutage.

Blutwasseragar.

Der nunmehr zu schildernde Nährboden unterscheidet sich von den vorhergehenden dadurch, daß auf ihm jede der 3 Kokkentypen ein charakteristisches Wachstum und Verhalten zeigt, so daß auf derselben Platte Pneumokokken, *Streptococcus mitior* und *Streptococcus haemolyticus* zu unterscheiden sind.

Herstellung: Ein Teil Pferdeblut wird mit zwei Teilen Wasser gemischt und die klare Flüssigkeit mit gleichen Teilen verflüssigten, auf 60° abgekühlten Agars gemischt. Der Agar enthält zweckmäßig 2 Proz. Traubenzucker. Je nach der Temperatur, bei der die Mischung hergestellt wird, nimmt der fertige Nährboden eine verschiedene Färbung an. Mischungen, welche bis zu 50° hergestellt werden, ergeben einen klaren, rubinroten, durchsichtigen Agar. Bei Erwärmen auf mehr als 50° ist der Agar dunkler rot bis bräunlich, bei 60° wird er so dunkel, daß er in starker Schicht undurchsichtig wird. Temperaturen von 70° und höher rufen braune Ausfällungen hervor; dadurch wird das Differenzierungsvermögen des Gemisches zerstört. Arbeitet man mit frischem, steril gewonnenem Blut, so kann man auf jede nachträgliche Erwärmung verzichten; sonst empfiehlt es sich, die Mischung bei 55–60° zu erwärmen, um sie dann erst schräg zu stellen, bzw. zu Platten zu gießen.

Auf diesem Blutwasseragar wachsen hämolytische Streptokokken ohne Verfärbung des Nährbodens. Einzeln stehende Kolonien sind bis zu 2 mm groß, flach, mit einer zentralen Spitze und einem Ringwall. Die Kolonien lassen sich nach 24–48-stünd. Wachstum mit der Platinöse leicht von dem Nährboden abstreichen, der darunter glatt und spiegelnd bleibt.

Die Kolonien des *Streptococcus mitior* haben etwa dieselbe Größe; sie sind jedoch tiefbraun oder braunviolett, sehen trocken aus und lassen sich von der Unterfläche durch Kratzen nicht entfernen. Nur bei ganz frischen, unter 24 Std. alten Kulturen lassen sich bisweilen mit der Platinöse noch etwas krümlige Massen abnehmen, ohne den Nährboden zu verletzen. Es bleibt aber auch dann noch ein Rest auf der Unterfläche haften. Ähnlich verhalten sich alte Laboratoriumsstämme.

Die Kolonien des *Pneumococcus* zeichnen sich durch eine auffallende Größe aus; man sieht Kolonien bis zu 5 mm Durchmesser. Die einzelne Kolonie ist schwarzbraun oder braunviolett, bildet eine glatte, zusammenhängende, schleimige Haut, die sich als Ganzes zunächst noch leicht von der Unterfläche abnehmen und verschieben läßt. Impfstiche bilden schon nach 24 Std. eine zusammenhängende, faltige, schleimige Haut. Nach weiterem Aufenthalt im Brutschrank haftet diese Haut häufig an der Unterfläche an, so daß sie ohne Verletzung des Nährbodens nicht entfernt werden können. Bei Verwendung von Blutwasseragar, der auf 60° erhitzt wurde, sieht man nach reichlicher Beimischung

1) Compt. rend. de la soc. biol. T. 48. 1896. p. 2.

mit Pneumokokken an den Stellen intensivsten Wachstums häufig bereits eine leicht gelbe Färbung, ähnlich der auf dem Kochblutagar entstehenden. Alte Laboratoriumsstämme zeigen weniger charakteristisches Wachstum.

Erwärmt man den Agar auf 70°, so fallen alle diese Unterschiede der Koloniegröße, der Färbung und des festhaftenden bzw. schleimigen Wachstums fort.

Das feste Wachstum tritt nicht ein, wenn dem Nährboden nur Serum zugesetzt wird. Auch dann, wenn nur hämolysiertes Blut ohne Serum beigemischt wird, erhält man keine guten Resultate. Häufig fehlt das Wachstum völlig. Ebenso empfiehlt es sich, dem Nährboden insgesamt 1 Proz. Traubenzucker beizugeben. Ein krümliges und leicht anhaftendes Wachstum zeigen einzelne Mitior-Stämme auch schon auf dem Schottmüllerschen Agar. Klar treten diese Unterschiede in Kombination mit den übrigen, der Färbung und der Koloniegröße aber erst dann hervor, wenn man hämolysiertes Blut als Agarzusatz verwendet.

Taurocholsaures Natrium.

Eine bequeme und sichere Unterscheidung der frischen Pneumokokken von sämtlichen Streptokokken gibt die Probe mit taurocholsaurem Natrium nach Händel und Neufeld. In 1 ccm einer 10-proz. Lösung von Natrium taurocholicum wird 1 Oese des Kulturrasens verrieben oder 1 Tropfen einer gut bewachsenen Brühkultur (möglichst viel Sediment) aufgeschüttelt. Die Pneumokokken werden sofort aufgelöst, die Aufschwemmung wird klar und im hängenden Tropfen sieht man keine Bakterien mehr. Streptokokken dagegen lösen sich nicht, die Aufschwemmung bleibt auch noch nach Stunden trübe und die Kokken bleiben gut sichtbar. Die Methode eignet sich jedoch nur für frische Stämme.

Chinaalkaloide.

Ebenso benutzten wir zur Charakterisierung unserer Stämme ihre Prüfung gegenüber dem Optochin, dessen bakterizide Wirkung besonders gegen die Pneumokokken gerichtet ist.

Die Wirkung der Chinaalkaloide wurde vor allem von Rochs¹⁾ und Koch²⁾ zur Artbestimmung der Streptokokken verwendet. Wir führten die Prüfung praktisch folgendermaßen aus:

Ausgehend von einer frischen, höchstens 3 Tage alten Stammlösung von Optochinum hydrochloricum in Aqua destillata 1:100, werden in gewöhnlicher Fleischbrühe fallende Verdünnungen von 1:5000—1:80000 hergestellt. Aus einer 24-stünd. Serumbrühkultur des zu prüfenden Stammes wird eine Verdünnung 1:10 in physiol. Kochsalzlösung bereitet und in 1 Tropfen dieser Aufschwemmung zu 1 ccm der vorher aufgekochten und wieder erkalteten Optochinlösung in Brühe zugegeben. Nach 18—24 Std. Bebrütung bei 37° wird, soweit nicht Trübung und Wachstum ohne weiteres zu sehen ist, 1 Tropfen der beimpften Optochinbrüheröhrchen nach vorherigem Aufschütteln auf eine Blutplatte gebracht zur Prüfung auf den Keimgehalt der Verdünnungen. (Die Beimpfung mit Oesen ist ungenau, da die Kokken infolge der Hemmung zu Wachstum in Knäueln neigen, die bei der Oesenimpfung entgehen können.)

Am geringsten ist die Wirkung des Optochins auf den Streptococcus mitior. Er wächst gewöhnlich schon in Optochinverdünnungen 1:5000. Der Streptococcus haemolyticus wird häufig noch von Verdünnungen 1:10000, ja selbst von 1:20000 gehemmt, während bei Pneumokokken noch Optochinverdünnungen 1:80000 glatte Wachstumshemmung hervorrufen. Die absolute Hemmungsgrenze liegt noch viel höher. Die Ablesung des Wachstums auf der Blutplatte nach der Beimpfung mit 1 Tropfen 24-stünd. bebrüteter Optochinbrüheröhrchen ergibt folgendes Bild, wobei aus der Fülle der untersuchten Stämme für jede der beiden Streptokokkentypen jedesmal die 2 Stämme ausgesucht wurden, welche die stärkste und die schwächste Beeinflussung durch die Alkaloide zeigten.

1) Virchows Arch. Bd. 220. 1915. S. 328.

2) Virchows Arch. Bd. 227. 1919. S. 39.

Tabelle III.

Optochinverdünnung			1:5000	1:10 000	1:20 000	1:40 000	1:80 000	—
Stamm	Lew. II	Str. haemol.	1 Kol.	++	+++	+++	+++	+++
"	Ltt.	"	—	—	—	++	++	+++
"	Le.	Str. mitior	+++	+++	+++	+++	+++	+++
"	Sch.	"	—	—	+	+	+++	+++
"	Ka.	Pneumococ.	—	—	—	—	—	+++
"	Ma.	"	—	—	—	—	—	+++

Weniger ausgeprägt sind die Unterschiede, wenn man statt des Optochin die entsprechende Amylverbindung, das Eukupin, benützt.

Blutwasser — Optochinagar.

Hiermit war auch die Möglichkeit gegeben, die Wirkung der Chininpräparate mit der differentialdiagnostischen Wirkung der Blutwasserplatte zu verbinden. Zu unseren diagnostischen Zwecken bewährte sich besonders folgender Agar unter Verwendung des schärfer differenzierenden und billigeren Optochins:

1) Optochin. hydrochl. 0,1 in Aqua dest. 10,0 aufgekocht. Soll nicht länger als 3 Tage aufgehoben werden.

2) 1,0 ccm Optochinlösung 1 (1:100) + 150,0 ccm flüssiger 3-proz. Agar.

3) 60,0 ccm Pferdeblut + 90,0 ccm Wasser 1 Std. bei 60°, 2) und 3) werden bei einer Temp. von 60° zu gleichen Teilen gemischt. Man erhält 300 ccm fertigen Optochinblutwasseragar.

Auf diesem Nährboden gelingt es, unter Verzicht auf die subtileren Unterschiede, welche Pneumokokken und Streptococcus mitior schon auf dem Blutwasseragar allein zeigen, mit ganz groben Mitteln die 3 Arten auf einer Platte exakt und klar zu bestimmen. Man beimpft die Platte mit großen Oesen bzw. Tropfen der zu untersuchenden Kulturen. Auf dem Blutwasseroptochinagar wächst der Pneumococcus überhaupt nicht (bei Verwendung großer Impfmengen schlagen sich diese als zarter Schleier nieder). Der Streptococcus haemolyticus wächst in der gewöhnlichen Form ohne Veränderung des Nährbodens. Der Streptococcus mitior aber bildet mehr oder minder dicke, meist braun gefärbte, trockene Beläge, welche auf dem Nährboden fest anhaften und sich nicht abstreichen lassen.

Prinzipiell wäre auch eine Verwendung der Optochinwirkung mit der Kochblutplatte möglich gewesen. Es ergab sich jedoch bei mehreren Versuchen, daß bei der Hitzefällung des Blutes die Optochinwirkung ganz erheblich beeinträchtigt wird, so daß Pneumokokken selbst auf Platten mit 1:10 000 Optochingehalt wachsen können. Offenbar wird das Chininpräparat von dem koagulierenden Blut mitgerissen. Jedenfalls wird seine Wirkung so stark vermindert, daß seine differentialdiagnostische Verwertung dadurch unmöglich wird.

Physikalisch-chemische Schädigungen.

Der Blutwasseragar enthält außerdem einen schwachen Zusatz von Dextrose, welcher besonders auf die Streptokokken einen wachstumsfördernden Einfluß ausübt. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß Pneumokokken für höhere Dextrosemengen recht empfindlich sind. Konzentrationen in Blutwasseragar von mehr als 3—4 Proz. üben eine deutliche Hemmungswirkung auf sie aus, während Streptococcus haemolyticus und mitior bedeutend mehr Traubenzuckerzusatz vertragen können.

Tabelle IV.

Blutwasser wird mit dextrosehaltigem Agar zu gleichen Teilen vermischt, so daß der Gehalt des fertigen Agars an Traubenzucker zwischen 5 und 20 Proz. liegt. Die Platten werden mit 1 Tropfen einer frischen Kultur der verschiedenen Kokken beimpft und 48 Std. bei 37° bebrütet. Die Ablesung des Wachstums ergibt dann folgendes Bild:

Dextrose	Pneumokokken				Str. mitior		Str. haemol.	
	P 80	Ka	Ma	St	Le	H	89 H	Lth
0 Proz.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
5 "	—	2 Kol.	4 Kol.	+	+++	+++	+++	+++
7,5 "	—	—	—	±	+++	+++	+++	++
10 "	—	—	—	—	++	+	+	+
12,5 "	—	—	—	—	++	+	+	+
15 "	—	—	—	—	+	+	+	±
20 "	—	—	—	—	±	±	±	±

Diese Empfindlichkeit der Pneumokokken gegen stärkeren Zuckerzusatz ist wohl nur eine Teilerscheinung der stärkeren Empfindlichkeit dieser Bakterien gegen die verschiedenartigen Schädigungen physikalischer und chemischer Natur. So sind z. B. zur Abtötung von Streptokokken in vergleichenden Versuchen stets höhere Wärmegrade notwendig, wie zur Abtötung der Pneumokokken, und vor allem waren die Mitior-Stämme besonders wärmeresistent.

Zusammenfassung.

1) Durch eine Reihe von Einzelreaktionen werden 3 Arten pathogener, grampositiver Kettenkokken bestimmt: der Pneumococcus, der Streptococcus viridans und der Streptococcus longus (haemolyticus).

2) Einzelne der beschriebenen Reaktionen können stark variieren, ohne daß die anderen Reaktionen sich gleichzeitig im gleichen Sinne verändern.

3) Das hämolytische Vermögen auf der Schottmüllerschen Blutplatte ist besonders starken Schwankungen ausgesetzt. Hämolytische Streptokokken können diese Eigenschaft verlieren

a) durch Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden,

b) im infizierten Organismus, besonders in den Ausscheidungsherden (Niere, septische Infarkte, Furunkel).

4) Es entstehen hierdurch anhämolitische Generationen hämolytischer Streptokokken, welche entweder die Blutplatte überhaupt nicht verändern, oder nur die Grünschwärzfärbung der Pneumokokken und des Streptococcus mitior hervorbringen, im übrigen jedoch die Eigenschaften der langen Streptokokken besitzen.

5) Derartige anhämolitische Streptokokken können durch verschiedene Methoden wieder hämolytisch gemacht werden. Andererseits ist es auch möglich, einen hämolytischen Stamm anhämolitisch zu machen

a) durch Schädigung mit Chemikalien,

b) durch Abimpfung aus den Ausscheidungsherden infizierter Tiere.

6) Auch Pneumokokken bilden bisweilen starke hämolytische Gene-

rationen, ohne daß sich im übrigen ihre biologischen Eigenschaften ändern.

7) Aus 5) und 6) ergibt sich, daß die hämolytische Wirkung auf der Blutplatte kein sicheres Einteilungsprinzip für die pathogenen Kokken darstellt.

8) Für die Charakterisierung und Bestimmung von frischen, aus Krankheitsherden gezüchteten, menschenpathogenen, grampositiven Kokken erwies sich der Blutwasseragar und der Blutwasseroptochinagar als brauchbar. Mit ihnen ist die Artbestimmung auf einem einzigen Nährboden möglich.

Zur Charakterisierung werden weiterhin mit Vorteil die übrigen näher besprochenen biologischen Hilfsmittel herangezogen, und zwar bewährten sich der Kochblutagar, sowie die Probe mit taurocholsaurem Natrium und mit Optochin als scharfe und brauchbare Unterscheidungsmittel. Allerdings werden von jeder dieser drei Methoden zwei Kokkenarten zusammengefaßt.

	Blutwasseragar	Blutwasser-optochinagar	Kochblutagar	Taurocholsaur. Natr.
Streptococc. longus	abstreichbar	abstreichbar	keine Färbung	keine Lösung
Streptococc. mitior	trocken, nicht abstreichbar	trocken, nicht abstreichbar	grüngelbe Färbung	keine Lösung
Pneumococc.	schleimig	kein Wachstum	grüngelbe Färb.	Lösung

Nachdruck verboten.

Ueber die Immunitätsreaktionen beim Wochenbettfieber, mit Berücksichtigung der üblichen Therapie.

[Aus der Abteilung für Vakzinetherapie der S. Tierärztl. Hochschule (Leiter: Prof. Dr. med. Alexander Strubell) und der geburtshilfsgynäkol. Abt. des Stadtkrankenhauses Dresden-Friedrichstadt (Leiter: Prof. Dr. Walter Albert).]

Von Prof. Dr. **Giovanni Bertoloni** in Alessandria (Italien)¹⁾.

Mit 23 Kurven im Text.

Vorwort

von Prof. Dr. med. Alexander Strubell, Dresden.

Der Arbeit meines Schülers Prof. Dr. Giovanni Bertoloni schicke ich gerne einige einleitende Worte voraus. Herr Dr. Bertoloni kam im Herbst 1913 nach Berlin in der Absicht, dort seine Habilitations-

1) Eingereicht als Habilitationsschrift bei der Kgl. Italienischen Universität in Pavia. Nebst einem Vorworte von Prof. Dr. med. Alexander Strubell.

schrift über Immunitätstheorien und -methoden beim Puerperalfieber auszuarbeiten. Er wurde behufs der Erlernung der opsonischen Technik nach Dresden an mich verwiesen. Durch das besonders gütige Entgegenkommen des Herrn Kollegen Prof. Albert, leitendem Arzte der Gynäkologischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Dresden-Friedrichstadt, wurde es Herrn Bertoloni ermöglicht, das Material dieser Abteilung zu benützen, während ich ihm gern mein Laboratorium, die von mir geleitete Abteilung für Vakzinetherapie, für die Ausführung des immunitätswissenschaftlichen Hauptteiles seiner Arbeit zur Verfügung stellte, und das um so lieber, als ich gerade zur selben Zeit in Italien an der Klinik und dem Institute Edoardo Maraglianos eine weitgehende liberale Gastfreundschaft genoß. Während wir Deutschen, mein Assistent und ich, in Genua arbeiteten, saß der Italiener Bertoloni in Dresden in der Abteilung für Vakzinetherapie und hat dort, dank seinem zähen Fleiße, wenigstens ein Resultat erzielt, welches einen Merkstei in der Geschichte meines Laboratoriums und der opsonischen Forschung überhaupt darstellt. Während ich selber nämlich, gemeinsam mit meinem leider verstorbenen Schüler Dr. Wilhelm Felber die Fehlerquellen bei der Bestimmung des opsonischen Index einer genauen Nachprüfung unterzogen hatte (siehe unsere gemeinsame Arbeit, dieses Centralbl. Bd. 51), und gleichfalls gemeinsam mit Wilhelm Felber die diagnostische Bedeutung besonders des tuberkulo-opsonischen Index erneut als zu Recht bestehend erweisen und somit die Resultate Wrights und seiner Schüler, besonders Alexander Flemings, bestätigen konnte (dieses Centralbl. Bd. 54. Heft 1), und mich im übrigen gerade in bezug auf die Würdigung der diagnostischen Bedeutung des opsonischen Index in erfreulicher Uebereinstimmung mit Hans Much befand, auch gemeinsam mit meinem Schüler Michligk ausführliche Studien über die pharmako-dynamische Beeinflussung des opsonischen Index (dieses Centralbl. Bd. 68. 1913. H. 5/6) ausgeführt habe, fehlte es mir bis dahin noch an Beweisen auf Grund eigener, aus meinem Laboratorium hervorgegangener Versuche dafür, daß, wie Wright behauptet, und wie Mac Donald an der Hand der Bestimmung des opsonischen Index bei der Pneumonie nachgewiesen hatte, der opsonische Index in der Tat gestattet, prognostische Schlüsse auf den Ablauf einer infektiösen Erkrankung zu ziehen. Mac Donald hatte bei seinen Pneumonikern den opsonischen Index gegen Pneumokokken bestimmt und hatte gefunden, daß der heilenden Krisis mit dem kritischen Fieberabfall bei der Pneumonie etwa 24 Stunden vorher ein Steigen des opsonischen Index gegen Pneumokokken vorhergeht, während vor dem Tode mit der prämortalen Fiebersteigerung ein katastrophales Sinken des Index Hand in Hand geht.

Dieser an einer akuten, in so eklatanter Weise typisch eine plötzliche Wendung zum Guten oder Bösen nehmenden Infektionskrankheit erhobene Befund war, soweit ich mich orientieren konnte, in der Literatur vereinzelt geblieben. Von um so größerer Bedeutung mußte es daher für mich als Schüler Wrights, als Vorkämpfer seiner Lehre sein, daß nunmehr in meinem Laboratorium wieder an einer kritisch oder lytisch zur Heilung oder zum Tode führenden Infektionskrankheit, der puerperalen Staphylokokkensepsis, durch Bertoloni der Nachweis geführt werden konnte, daß der Wiederherstellung der Wöchnerin und dem Temperaturabfall ein äußerst charakteristisches

Steigen des opsonischen Index gegen Staphylokokken, dem Tode und der prämortalen Temperatursteigerung ein katastrophales Fallen des opsonischen Index gegen Staphylokokken etwa 24 Std. vorhergeht.

Diese Tatsache erschien mir damals und erscheint mir auch heute von solcher prinzipiellen klinischen und immunitätswissenschaftlichen Bedeutung, daß ich als Chef des Laboratoriums, in dem diese Feststellungen gemacht wurden, und als derjenige, unter dessen Aegide sie ausgeführt worden sind, mich nicht damit begnügen konnte und wollte, das dieselbe erhärtende wissenschaftliche Material in der in italienischer Sprache erschienenen Habilitationsschrift Bertolonis „Le reazioni immunitarie nell' infezione puerperale in rapporto alla terapia usata“ Perugia (Tipogr. Guerriero Guerra) 1914, niedergelegt zu sehen, sondern daß ich den begreiflichen Wunsch hegte, die für mich als Forscher auf diesem Gebiete wichtigsten Teile von Bertolonis Habilitationsschrift an hervorragender Stelle in deutscher Sprache zur Veröffentlichung zu bringen. Diesem gerechten Wunsche ist die Redaktion dieses Centralblattes, trotz der Not der Zeit, in sehr liebenswürdiger Weise entgegengekommen, und ich möchte nicht verfehlen, Herrn Geheimrat Uhlworm ebenso wie dem Verlag von Gustav Fischer in Jena hierfür meinen allerergebendsten Dank auszusprechen. Es kann natürlich für mich als Laboratoriumsleiter nicht gleichgültig sein, ob solche wichtige Destillate der wissenschaftlichen Arbeitsstätte, der ich vorstehe, an einer für die Mehrzahl der Immunitätsforscher und Kliniker wenig zugänglichen Stelle oder an hervorragendem Platze, nämlich in diesem Centralblatte, erscheint.

In diesem Wunsche bin ich auch durch neue Publikationen von guten Forschern bestärkt worden, welche mein durch den Krieg, persönliche Erkrankung und sonstige Schwierigkeiten bedingtes vorübergehendes Schweigen mir dahin ausgelegt haben, ich hätte mich wegen der großen Fehlerquellen in der Bestimmung des opsonischen Index von dieser Technik und der Wrightschen Lehre abgewendet, wie dies neuerdings Frankenstein aus dem Laboratorium von Langer behauptet hat (Zeitschr. f. Kinderheilk. Sonderabdr. a. Bd. 25. H. 1/3). Es ist mir unverständlich, wie jemand, der meine Arbeiten kennt oder kennen sollte, mir etwas derartiges unterschieben kann, indem gerade ich eben in unermüdlicher Forschertätigkeit es gewesen bin, der gemeinsam mit meinen Schülern die Fehlerquellen des opsonischen Index als bei richtiger Technik geringe nachgewiesen hat. Wenn Langer (Therap. Halbmonatsh. 1920. H. 9) ebenfalls schreibt (S. 254), es hätten begeisterte Anhänger der Opsoninbestimmung sich allmählich von ihr abgekehrt; man habe eingesehen, daß die mühsamen Untersuchungen mit Fehlerquellen arbeiteten, welche den Wert und die Zuverlässigkeit der Methodik erheblich einschränkten, und es sei nach jahrelanger, mit größtem Eifer betriebener Anwendung der Opsoninbestimmung heute recht still davon geworden, so sei dieser geschätzte Autor durch die vorliegende Arbeit jedenfalls davon belehrt, daß es nur äußere Umstände, nämlich die räumliche und geistige Trennung von meinem Schüler Bertoloni gewesen ist, welche die Publikation dieser Arbeit in deutscher Sprache verhindert hat, welche ich als den Schlußstein meines auf

die Erforschung der Lehre Wrights gerichteten Lebenswerkes betrachte. Ich habe es nach solchen wissenschaftlichen Taten nicht nötig, die Richtigkeit und Wichtigkeit und den Wert der opsonischen Bestimmung für die Immunitätsforschung noch einmal und immer wieder zu beweisen, vielmehr darf ich auf das von mir Erarbeitete hinweisen, und indem ich mit der Publikation der Bertolonischen Arbeit die lange Kette opsonischer Forschungsreihen aus meinem Laboratorium beende, die opsonische Lehre, wenn auch in anderem Sinne als Langer, nämlich im positiven, als ein in sich abgeschlossenes Kapitel in der Serologie betrachten.

Dresden im April 1921.

Prof. Dr. med. Strubell.

Theorien der Immunität und Immunitätsreaktionen.

Von Prof. Dr. Giovanni Bertoloni in Alessandria (Italien).

In diesem Kapitel will ich auf den augenblicklichen Stand der serologischen Forschung eingehen, und zwar zuerst auf die Theorien, auf denen sie sich aufbaut, und dann auf die Reaktionen, die bisher in der Serodiagnostik Verwendung gefunden haben.

Vorausschicken muß ich, daß auf dem Gebiete der Serologie, trotz der Jugend dieses Zweiges am Baume der Wissenschaft, bereits so viel geleistet ist und andererseits noch so viele ungelöste Fragen vorliegen, daß ich gezwungen bin, mich in meiner Zusammenfassung auf die allerwichtigsten Punkte des bisher Erreichten und der noch zu erforschenden Probleme zu beschränken.

Mit dem bekannten Gegensatz der angeborenen und der erworbenen Immunität oder Giftfestigkeit des Organismus möchte ich beginnen. Der angeborenen Immunität liegt die Tatsache zugrunde, daß nicht jeder Organismus für jede Infektion empfänglich ist, während die erworbene Immunität durch Ueberstehen einer Infektionskrankheit oder durch künstliche Behandlung mit dem Krankheitserreger erlangt wird.

Ein beträchtlicher Teil der Bakterien, welche sich im Verlauf einer Infektionskrankheit im Tierkörper entwickeln, unterliegt daselbst einem Zerstörungsvorgang, der auch dann eintritt, wenn die Mikroorganismen den Sieg davon tragen und den Organismus zugrunde richten. Zunächst treten aber Abwehrvorrichtungen des Körpers in Tätigkeit gegen die zum Teil sehr giftigen Leibesbestandteile der Bakterien und gegen ihre Sekretionsprodukte, die Toxine, die im Organismus zur Resorption gelangen. Diese Abwehrvorrichtungen können solche Veränderungen im Körperhaushalt hervorbringen, daß in vielen Fällen auf eine erneute Infektion mit dem gleichen Infektionserreger gar keine oder nur eine leichte Erkrankung erfolgt. Es hat also durch die 1. Erkrankung eine Immunisierung stattgefunden, der Körper ist in den Besitz einer natürlich erworbenen Immunität gegenüber dem betreffenden Infektionserreger gelangt.

Es gibt nun eine Reihe von Erkrankungen, deren einmaliges Ueberstehen eine erworbene Immunität zur Folge hat, dazu gehören Scharlach, Masern, Keuchhusten, Typhus, Lues (?) usw., während andere Krankheiten wie Gonorrhöe, Influenza, Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion,

Recurrans, Malaria usw. im Gegensatze event. dazu sogar eine gesteigerte Empfänglichkeit zurücklassen.

Diejenige Immunität, die der Körper durch Ueberstehen einer Krankheit unter Betätigung seiner eigenen reaktiven Kräfte erwirbt, bezeichnen wir als aktive Immunität gegenüber jener anderen passiven Immunität, bei welcher der Organismus seine Widerstandsfähigkeit denjenigen Substanzen verdankt, die in einem anderen Individuum durch aktive Immunisierung entstanden sind.

Die Tatsache, daß die Schwere der überstandenen Erkrankung von geringer Bedeutung für den Vorgang der Immunisierung ist, daß also eine leichte ambulatorische Erkrankung eine ebenso hochgradige Immunität wie eine schwere Affektion mit bedrohlichen klinischen Erscheinungen hervorzurufen imstande ist, bildet die Grundlage aller Immunitätsbestrebungen, deren Absicht ja dahin geht, dem Organismus mit einem Minimum von Kräfteaufwendung künstlich jene Widerstandsfähigkeit zu verleihen, welche auf natürlichem Wege nur durch hochgradige Gesundheitsstörungen erreicht werden kann.

Die praktische Ausführung dieser Immunitätsbestrebungen muß stets darauf bedacht sein, die Schädigungen der Giftwirkungen einzuschränken, ohne indessen zu gleicher Zeit den immunisatorischen Effekt zu verlieren. Bei künstlich aktiver Immunisierung gelingt dies durch Verwendung abgeschwächter Bakterien, die dem betreffenden Organismus weniger gut angepaßt sind und bei denen auch eine nachträgliche Giftvermehrung im Körper ausgeschlossen ist; oder es wird eine Inokulation virulenter Erreger an Körperstellen vorgenommen, die ihnen ungünstige Wachstumsbedingungen bieten.

Eine Herabsetzung der Giftwirkungen der zur Einführung in den Körper bestimmten Mikroorganismen kann auf die verschiedenste Art herbeigeführt werden, einerseits durch Abschwächung oder durch vollkommene Abtötung der Bakterien, wobei die Art und Weise, wie dies geschieht, durchaus nicht ohne Bedeutung ist, andererseits durch Einverleibung von Bakterienextrakten. Jodtrichlorid und Lugolsche Lösung haben sich zur Giftabschwächung vortrefflich bewährt; sie stellen das souveräne Mittel dar, um Toxine in ihrer Giftigkeit herabzusetzen bei gleichzeitiger Erhaltung ihrer immunisierenden Kraft.

Als prägnante Beispiele aktiver Immunisierung möge folgende Zusammenstellung dienen:

Aktive Immunisierung (nach Dieudonné).

- I. Mit lebenden, vollvirulenten Krankheitserregern:
 - a) unter Wahl passender Dosen (Tollwutimpfung von Högyes);
 - b) unter Wahl passender Lokalität der Infektion (gegen Lungenseuche des Rindes und Schafpocken an der Schwanzspitze).
- II. Mit lebenden, abgeschwächten Krankheitserregern:
 - a) Abschwächung durch hohe Temperaturen (Züchtung bei 42°: Milzbrand, Rauschbrand);
 - b) Abschwächung mittels Passage durch wenig empfindlichen Tierkörper (Schutzpockenimpfung);
 - c) Abschwächung durch Eintrocknung (Tollwutimpfung nach Pasteur);
 - d) Abschwächung durch Zusatz von Antiseptics (Karbolsäure, Kaliumbichromat bei Milzbrand);
 - e) Abschwächung durch physikalische Einwirkungen: Belichtung, hoher Luftdruck, Elektrizität usw. (Kaum praktisch verwendet.)
- III. Mit abgetöteten Kulturen:

(Typhus, Cholera, Pest.)
- IV. Mit Bakterienextrakten:
 - a) mit Bakterienproteinen (Tuberkulin, Mallein);

b) mit aus den Bakterien durch besondere mechanische Eingriffe gewonnenen Produkten:

- α) Tuberkulin TR (Koch);
 - β) Bakterienplasmine (Buchner);
 - γ) Agressine (Bail, Wassermann und Citron).
- V. Mit Stoffwechselprodukten der Bakterien.
(Tetanus und Diphtherietoxin.)

Auf die verschiedenen Möglichkeiten diese Impfstoffe und Vakzine in den zu immunisierenden Organismus einzuführen, auf ihre Applikationsweise, gehe ich zunächst nicht näher ein.

Uns interessieren hier vielmehr vorerst die Veränderungen, die der Organismus unter dem Einfluß dieser ihm zugeführten Giftstoffe erleidet; ihre Erklärung oder vielmehr der Versuch sie zu erklären, bedeutet zu gleicher Zeit ein Eingehen auf die heute über die Immunitätsphänomene herrschenden Theorien.

Die Untersuchung der Gewebssäfte in ihren Beziehungen zur Immunität hat früher und erfolgreicher eingesetzt als die Untersuchung der geformten, der zelligen Elemente. So beziehen sich auch die meisten der bekannt gewordenen Tatsachen auf das Blutserum, auf die durch Immunisierung gewonnenen Immunséra, und zwar haben weniger die physikalischen und die rein chemischen Untersuchungen die Kenntnis zu fördern vermocht als die experimentell biologischen Methoden.

Behring und Kitasato machten als erste die Beobachtung, daß Immunsera eine bedeutende Schutzwirkung ausüben, wenn sie Versuchstieren gleichzeitig oder kurze Zeit nach der Infektion mit den betreffenden Giften beigebracht werden. Durch Beimischung von Immunserum kann Mäusen z. B. mehr als das 300-fache der letalen Tetanustoxindosis einverleibt werden, ohne daß sie in der Folge die geringsten tetanischen Erscheinungen zeigen. Daß es sich dabei um eine spezifische Eigenschaft des Immunserums handelt, geht daraus hervor, daß Versuche mit Blut und Serum nicht immunisierter Tiere vollkommen negativ ausfallen. Das Tetanusserum und ihm verwandte, ähnliche Wirkungen ausübende Immunsera wie auch das Diphtherieserum bezeichnen wir als antitoxische Sera, die supponierten Substanzen, denen sie ihre Schutzkraft verdanken, als Antitoxine. Im Anschluß an Behring und Kitasato haben uns andere Forscher eine ganze Reihe von Antitoxinen kennen gelehrt: Calmette, Phisalix und Bertrand ein Antitoxin gegen Schlangengift, Klemperer gegen das heftig wirkende Gift des bei Fleischvergiftungen gefundenen *Bacillus botulinus*, Sachs gegen das Gift der Kreuzspinne, Ehrlich gegen die giftigen Pflanzeneiweißstoffe Rizin, Abrin, Crotin, und Wassermann gegen das Toxin des *Bacillus pyocyaneus*. Außerdem gelang es in den letzten Jahren noch andere Antitoxine gegen bakterielle, tierische und pflanzliche Gifte herzustellen.

Von den antitoxischen sind die bakteriziden Sera zu unterscheiden, zu denen das Typhus-, das Cholera-, das Rotlauf- und das Schweineseucheserum gehören. Menschen, welche die Cholera asiatica überstanden haben, besitzen ein Blutserum, das noch in sehr hohen Verdünnungen imstande ist, Meerschweinchen vor der tödlichen Wirkung einer intraperitonealen Infektion mit dem Cholerabazillus zu schützen (Pfeiffersche Reaktion).

Pfeiffer und Wassermann haben dargetan, daß diese Wirkung keine antitoxische ist, sondern darauf beruht, daß ein Zerfall der

Bakterienleiber, eine Bakteriolyse, herbeigeführt wird. Als Beweis dafür ist anzuführen, daß bei gleichzeitiger Injektion von großen Mengen Vibrionen und von Serum der Tod, gegenüber den nicht mit Cholera-immunserum behandelten Tieren, sogar beschleunigt wird. In diesem Falle werden durch den vom Immunserum herbeigeführten beschleunigten Bakterienzerfall rasch sehr große Mengen von Toxinen frei, gegen die das Immunserum nicht wirksam ist. Diesen Toxinen unterliegt das Tier rascher als das nicht mit Serum behandelte Kontrolltier, bei dem der Bakterienzerfall nicht künstlich beschleunigt wird, deshalb langsamer vor sich geht, bei dem auch die Intoxikationserscheinungen erst später hervortreten und später zum Tode führen.

Um zu beweisen, daß die bakteriziden Schutzkräfte, die Bakteriolyse, auch wirklich im fließenden Blut vorhanden sind und sich nicht erst nach den Veränderungen durch Blutgerinnung und Fibrinabscheidung im Serum entwickeln, haben Hewlett, Delezenne, Falloise und Lambotte sehr ingeniöse Versuche mit zellfreiem, flüssig gewonnenem Plasma angestellt. Sie haben den Beweis dadurch einwandfrei erbracht, daß sie mit diesem Plasma Cholera-vibriionen gegenüber das typische Pfeiffersche Phänomen des granulären Bakterienzerfalls mit denselben Verdünnungen hervorzurufen vermochten, wie mit dem von demselben Tiere stammenden Serum.

Indessen sind nicht alle Bakterienarten der Einwirkung der Gewebsflüssigkeiten zugänglich; besonders die Streptokokken, Pneumokokken und manche andere Mikroorganismen zeigen weder im normalen Blutserum noch auch im Immunserum irgendeine Andeutung einer Schädigung, geschweige denn Abtötung, und auch bei sonst empfindlichen Arten finden sich nicht selten sogenannte „serumfeste“ Stämme.

Nach den oben charakterisierten, im Immunserum enthaltenen Antikörpern, den Antitoxinen und den Bakteriolyse, hebe ich nunmehr die Agglutinine hervor. Auch im Normalserum sind Agglutinine vorhanden, aber nur in sehr geringer Menge, während die Immunagglutinine noch in starken Verdünnungen wirksam sind. Wird eine Aufschwemmung von Bakterien im hängenden Tropfen oder im Reagenzglas mit einer geringen Quantität des spezifischen Immunserums vermischt, so ist bald ein Aufhören der Bakterienbewegung und ein Zusammenballen und Ausfallen der Mikroorganismen zu erkennen. Zu den eigentlichen Schutzkörpern der Sera dürfen wir die Agglutinine aus dem Grunde nicht zählen, weil sich die agglutinierten Keime als vollkommen lebensfähig erweisen, sich sogar nicht selten im agglutinierten Zustand vermehren.

Metschnikoffs Vermutung, daß in den Körpersäften Substanzen vorhanden sein müßten, unter deren Einfluß die Phagozyten eine gesteigerte Tätigkeit entfalten, hat sich in dieser Form zwar nicht als zutreffend erwiesen, indessen ergab sie die Anregung zu einer Reihe wichtiger Entdeckungen, die an die Namen Wright, Douglas, Bulloch und Atkin anknüpfen. Ueber die von ihnen befolgte Methodik wird weiter unten ausführlich berichtet.

Durch die von ihnen angewendeten Verfahren konnten sie den Anteil der verschiedenen bei der Phagozytose beteiligten Faktoren, nämlich der Leukozyten, des Plasmas und der Bakterien gesondert betrachten und beurteilen. Daß tatsächlich in Serum und Plasma Stoffe vorhanden sind, welche die Phagozytose befördern, konnte dadurch bewiesen werden, daß die Bakterienaufnahme der Leukozyten immer ge-

ringer wurde, je stärker das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde. Indessen stellte sich die Beantwortung der Frage nach der Art der Wirksamkeit der phagozytosebefördernden Substanzen doch wesentlich komplizierter, als Metschnikoff vermutet hatte.

Zuerst stellte sich heraus, daß das Blutserum durch 15 Minuten lang dauernde Erwärmung auf 60—65° C seine Wirksamkeit fast vollkommen einbüßt, daß also die phagozytosebefördernden Stoffe des normalen Blutserums — im Gegensatz zu denen der Immunsere — thermolabil sind. Weiter gelang es durch verschiedene Versuche zu beweisen, daß die betreffenden Substanzen in völliger Analogie mit den Bakteriolysinen und den Hämolysinen von Bakterien absorbiert werden. Aktives Blutserum, das längere Zeit auf Bakterien eingewirkt hatte, wurde von diesen durch Zentrifugieren wieder getrennt und erwies sich nunmehr seiner phagozytosebefördernden Kraft vollständig beraubt. Da es nun andererseits möglich war, mit solchen aus dem Serum abzentrifugierten und „sensibilisierten“ Bakterien hochgradige Phagozytose zu erzielen, so war damit klargelegt, daß die fraglichen Substanzen nicht etwa direkt auf die Leukozyten einwirken, sondern daß sie die Bakterien, von denen sie absorbiert werden, nach der Richtung beeinflussen, daß diese leichter von den Phagozyten aufgenommen werden können.

Da also die Leukozyten gewissermaßen nur einen Indikator darstellen, so ist es nicht weiter erstaunlich, daß die durch das Serum einer Tierart sensibilisierten Bakterien auch von den Leukozyten einer anderen Tierspezies begierig aufgenommen werden. Dieser Befund bezieht sich indessen nur auf den qualitativen Ausgang des Versuchs; für den quantitativen Verlauf des Phagozytoseversuchs ergeben sich dann allerdings bei den verschiedenen Tierarten sehr verschiedene Zahlen.

Tschistowitsch hat unter anderen darauf hingewiesen, daß bei Verwendung ein und desselben Serums und ein und derselben Bakterienaufschwemmung Leukozyten vom Hunde ganz andere Zahlen ergeben, als die vom Kaninchen.

Wright hat die betreffenden Substanzen, da sie gewissermaßen die Bakterien zum Verzehren für die Phagozyten vorbereiten „Opsonine“ genannt (von „opsonare“ zur Nahrung zubereiten).

Da das Verhalten der Mikroorganismen den opsonischen Serumwirkungen gegenüber sehr verschieden ist und auch nicht mit ihrem Verhalten in bezug auf die bakteriziden, bzw. bakteriolytischen Kräfte des Serums parallel geht, so können unter diesen Gesichtspunkten 4 Klassen von Bakterien unterschieden werden:

1) Bakterien, welche sowohl der bakteriziden wie der opsonischen Einwirkung des Serums in hohem Grade unterworfen sind; hierher gehören der Cholera vibrio und der Typhusbazillus.

2) Bakterien mit hochgradiger Empfindlichkeit für die Opsoninwirkung, hingegen mäßiger Empfindlichkeit für die bakteriolytischen Serumwirkungen: *Bacterium coli* und *dysenteriae*.

3) Bakterien mit hochgradiger Empfindlichkeit für die Opsoninwirkung, die jedoch der Bakteriolyse nicht unterliegen; als Beispiel sind der *Staphylococcus pyogenes*, der *Micrococcus melitensis* (der Erreger des Maltafiebers), *Streptococcus lanceolatus* und *Bacterium pestis* zu nennen.

4) Bakterien, welche weder für die bakteriolytische noch für die Opsoninwirkung empfänglich sind: der Diphtherie- und der Xerosebazillus.

Wie aus dieser Einteilung hervorgeht und wie auch Neufeld hervorhebt, ist die opsonische Wirkung des Normalserums auf eine viel größere Reihe von Bakterienarten ausgedehnt, wie seine bakterizide Fähigkeit.

Die sich an diese Befunde anschließende Frage nach der Spezifität und nach der Mehrheit der Normalopsonine gläubten Bulloch und Western experimentell dahin entscheiden zu können, daß in dem Blutserum mindestens 2 verschiedene Opsonine von spezifischer Wirkung und Affinität, einerseits zum Tuberkelbazillus, andererseits zum Staphylococcus vorhanden sind. Da andere Forscher, z. B. Klien, die Spezifität der Normalopsonine neuerdings bestreiten, so muß diese Frage vorläufig noch als unentschieden gelten.

Bisher scheinen virulente Bakterien widerstandsfähiger gegen die Opsonine zu sein als abgeschwächte, ein Punkt, der allerdings auch noch eingehender Bestätigung bedarf, und des weiteren scheinen Bakterien, die selbst nach längerer Digestion mit Serum keine Phagozytose erleiden, nicht imstande zu sein, Opsonin aus dem Serum zu absorbieren, so daß allerdings ein Kausalnexus zwischen Bindungsfähigkeit der Bakterien und ihrer Resistenz gegenüber der Phagozytose bestehen dürfte.

Meyer, Hata und andere suchten die wichtige Frage nach der Konstitution der Opsonine zu lösen. Es gelang ihnen, das Normalopsonin in zwei Bestandteile zu zerlegen, deren einer bei 0° von den Bakterien gebunden wurde, während der andere fast vollkommen in dem Serum zurückblieb. Demnach müssen auch die Opsonine ähnlich wie die Hämolytine und wie die Bakteriolytine als komplexe Substanzen angesehen werden.

Ebenso gelang es auch, inaktiviertes, d. h. auf 60° erwärmtes Serum durch Zusatz kleiner, an sich unwirksamer Mengen von Serum in bezug auf die opsonische Wirkung zu reaktivieren.

Nach allen diesen Befunden hat man vermutet, daß die Opsonine nicht neue Substanzen darstellen, sondern daß es sich nur um eine neue Wirkungsweise bekannter Serumkomponenten, z. B. der Bakteriolytine, handele. Es wurde dafür ins Feld geführt, daß Maßnahmen, die das Komplement des normalen Serums zerstören, dasselbe gleichzeitig mit dem Opsonin tun, daß Komplement und Opsoninwirkung fast stets gleichzeitig auftreten oder fehlen. Im normalen Kammerwasser sind z. B. weder Komplemente noch Opsonine vorhanden, während sie sich nach erfolgter Punktion in dem neugebildeten Kammerwasser beide finden. Kleine Differenzen zwischen Komplementen und Opsoninen sind wohl nachweisbar, lassen sich aber damit erklären, daß die Opsoninreaktion viel empfindlicher ist als die lytische, so daß sich minimale Komplementmengen, die im lytischen Versuch versagen, noch durch den Opsonisierungsversuch nachweisen lassen. Neufeld schlägt nach alledem vor, die Frage nach der Identität der Opsonine und der Lysine vorläufig als ungelöst zu betrachten und den komplexen Bau der Opsonine dadurch zu bezeichnen, daß man von opsonischen Ambozeptoren und von opsonischem Komplement spricht. Die letztere Annahme erscheint besser fundiert als die erste.

Die phagozytosebefördernden Stoffe der Immunsera scheinen gegenüber denen der normalen Sera, von denen wir eben gesprochen haben, mit den bakteriolytischen Stoffen nichts gemein zu haben. Sie lassen sich von den bakteriolytischen Ambozeptoren durch besondere Absorptionsmethoden trennen und unterscheiden sich auch von den Komple-

menten durch ihre weitaus größere Thermoresistenz, bedürfen überdies keiner Mitwirkung von Komplementen. Rimpau schlägt vor, diese Substanzen, über deren Wirkungsweise vorläufig nur Hypothesen existieren, Bakteriotropine zu nennen.

Außerst kompliziert wird die Angelegenheit durch die Beobachtung, daß in manchen Normalseris neben dem eigentlichen thermolabilen Opsonin noch thermostabile Substanzen von Tropincharakter und wiederum in Immunseris solche Stoffe gefunden sind, die geringen Zusatzes normalen Serums bedürfen, um die Phagozytose zu befördern. Werden die komplexen Substanzen der Immunsera als Analoga der komplexen Substanzen der Normalsera angenommen und gleichfalls als Opsonine bezeichnet, so könnte folgendes Schema aufgestellt werden:

- | | | |
|--|-------------------|-----------------|
| a) einfache phagozytosebefördernde Substanzen: | des Normalserums: | Normaltropine, |
| | Immunserums: | Immuntropine, |
| b) komplexe | Normalserums: | Normalopsonine, |
| | Immunserums: | Immunopsonine. |

Ebensowenig wie über Natur und Wirkungsweise herrscht bisher über den Ursprungsort der Opsonine Einheit; Löhlein ist geneigt, ihn in die Leukozyten selber zu verlegen. Eine Beziehung zwischen Leukozytenmenge und Opsoningehalt des Blutes scheint indes nicht zu bestehen.

Ueber die Bedeutung der Opsonine hat Wright besondere Beobachtungen angestellt, er konnte nämlich dartun, daß bei einigen Infektionskrankheiten, besonders bei Staphylokokkeninfektionen und bei der Tuberkulose, der Opsoningehalt des Serums stark herabgesetzt zu sein pflegt. Er verglich die opsonische Kraft von Gesunden mit derjenigen des Patienten und bekam dadurch einen Quotienten, den er als phagozytären Index bezeichnete.

Spätere Untersucher haben die Wrightschen Beobachtungen teils bestätigt, teils dahin abgeändert, daß bei fortschreitenden Tuberkulosen und bei Puerperalinfektionen weniger eine dauernde Erniedrigung des opsonischen Index als ein auffallend wechselndes Verhalten desselben zu beobachten sei, wie es bei Gesunden nicht vorkommt.

In pathologischen Exsudatflüssigkeiten, die in unmittelbarer Berührung mit den Bakterien stehen, pflegt die phagozytische Zahl viel niedriger zu sein als im Blutserum des betreffenden Patienten. Für diese Erscheinung ebensowohl wie für die Tatsache, daß der opsonische Index bei chronischen Krankheiten häufig herabgesetzt sei, glaubte Wright die Deutung in der Absorptionfähigkeit zu sehen, welche die Bakterien und ihre Bestandteile auf die Opsonine auszuüben vermögen. Auch diese Erklärung ist bisher nicht allgemein anerkannt worden; es ist nach den Untersuchungen von Böhme sogar wahrscheinlicher, daß die Opsoninverbindung von den Leukozyten geschieht oder aber, daß die Opsonine von den proteolytischen Fermenten der weißen Blutzellen zerstört werden.

Hier wie auch sonst so häufig in der Medizin, wenn zwei Phänomene parallel miteinander laufen, ist die Unterscheidung überaus schwer, in welchem Kausalnexus sie zueinander stehen, wo die Ursache, wo die Wirkung zu suchen ist. Wright war stets der Ansicht, daß die Veränderung des Serums, die abnorme Verminderung der opsonischen Kraft das Primäre sei und erst dadurch das Haften und die Vermehrung der pathogenen Mikroorganismen möglich werde. Er spricht dem Phänomen also nicht nur eine diagnostische, für die Prophylaxe wertvolle Bedeu-

tung zu, sondern glaubt die herabgesetzte Widerstandsfähigkeit des Organismus gegenüber den Infektionen damit erklären zu können.

Wright hat für seine therapeutischen Maßnahmen die logische Konsequenz aus seinen theoretischen Anschauungen gezogen und versucht die unzureichende Opsoninproduktion des erkrankten Körpers zu steigern. Er spritzte dem betreffenden Patienten eine abgetötete Bakterienkultur derselben Art ein, die die Erkrankung hervorgerufen hatte, wobei sich die aus den Eigensekreten gezüchteten Bakterien als besonders wirksam erwiesen. Zunächst erfährt der opsonische Index dadurch, wie erklärlich, eine weitere Verringerung, die aber nach wenigen Stunden oder Tagen ausgeglichen ist. — Wright bezeichnet diese Zeit als die „negative Phase“ und warnt vor einer Wiederholung der Bakterieninjektion während dieses Zustandes der Resistenzverminderung.

Pfeiffer und Friedberger äußern sich auf Grund umfassender experimenteller Versuche im Gegensatz zu Wright dahin, daß im Tierversuche wenigstens die Empfänglichkeit für die Infektion nach der Impfung nicht erhöht, sondern sogar eine Resistenzsteigerung zu verzeichnen sei.

Jedenfalls hat Wright mit seinen therapeutischen Maßnahmen überraschend günstige Erfolge besonders bei Staphylokokkenerkrankungen, bei Karbunkeln und bei Furunkulose gehabt. Die Bedeutung der seit langem geübten lokalen Behandlungsmethoden, die auch er zur Unterstützung seiner Bakterieninjektionen heranzieht, in Gestalt heißer Umschläge, Sandbäder und der Bierschen Stauungshyperämie, erblickt er darin, daß dadurch die wirksamen Stoffe in größerer Menge an die Bakterien herantreten können.

Auf eine weitere interessante Eigenschaft vieler antibakterieller Immusera hat zuerst Kraus hingewiesen, es handelt sich dabei um Vorgänge, die dem eben beschriebenen Agglutinationsphänomen sehr nahe stehen. Mischt man z. B. das bakterienfreie Filtrat einer älteren Typhusbouillonkultur mit dem homologen Serum, so tritt in dem ursprünglich vollkommen klaren Gemisch nach längerem Stehen eine Trübung auf, die sich schließlich als lockerer Niederschlag zu Boden setzt. Kulturen anderer Bakterienarten geben diese „spezifischen Niederschläge“ mit Typhusserum nicht. Es ist anzunehmen, daß es sich um freigeordnete Bestandteile der Bakterienleiber handelt, die infolge ihres Zellzerfalls in Lösung gehen und vom Immuserum gefällt oder präzipitiert werden. Die spezifisch wirksamen Substanzen selbst werden Präzipitine oder Koaguline genannt.

Ebenso wie die Agglutinine sind auch die Opsonine und die Bacteriotropine in normalen Seris in kleinen Mengen vorhanden, in den Immuseris tritt ihre Wirkung dagegen selbst noch in 1000-facher Verdünnung hervor. Es sind dies Stoffe, welche die Bakterien zwar an und für sich nicht zu schädigen scheinen, wohl aber ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber den Phagozyten herabsetzen und sie für die Aufnahme durch die Körperzellen, besonders aber durch die Leukozyten, geeignet machen.

Ueber die Wichtigkeit der Phagozytose gegenüber der Wichtigkeit der Schutzwirkung von Körpersäften gingen noch bis vor kurzem die Meinungen sehr weit auseinander. Während Metschnikoff annahm, daß die Phagozytose das Primäre, der glückliche Ausgang der Krankheit dagegen das Sekundäre sei, behaupten deutsche Immunitätsforscher, Kruse und Pfeiffer unter ihnen, bisher, daß die Phagozytose erst

dann einträte, wenn das Schicksal der eingedrungenen Mikroorganismen bereits durch die bakteriziden Kräfte bestimmt sei: Nach Metschnikoff spielten die Phagozyten die Rolle von Kampfzellen, nach der Meinung Anderer die von Resorptionszellen. In letzter Zeit beginnt man, diese sicher nicht zweckmäßige Gegenüberstellung aufzugeben; einerseits ist nicht zu vergessen, daß auch mit dem Vorgange der Resorption dem Organismus ein großer Dienst geleistet wird, andererseits hat Petersson gezeigt, daß Meerschweinchen eine vielfache Dosis letalis von abgetöteten Choleravibrionen vertragen können, wenn gleichzeitig große Mengen von lebenden Meerschweinchenleukozyten in die Bauchhöhle eingespritzt werden. Dadurch ist der Beweis erbracht, daß die weißen Blutkörperchen in der Tat die Fähigkeit besitzen, die Gifte der betreffenden Bakterienleiber unschädlich zu machen. Jedenfalls wird es richtig sein, Bakterizidie und Phagozytose einander nicht gegenüber zu stellen, sondern beide Abwehrvorrichtungen in gleicher Weise bei den Immunitätstheorien zu berücksichtigen.

Nach Deutsch werden die zur Immunisierung dienenden Stoffe, durch deren Einverleibung die Bildung der Antikörper ausgelöst wird, zweckmäßigerweise als Antigene bezeichnet. Da die Studien der letzten Jahre zu einer ganz ungeahnten Erweiterung des Begriffes der Immunisierung geführt haben, insofern als es sich herausgestellt hat, daß auch die parenterale, d. h. nicht auf dem Wege des Magendarmkanals erfolgende Einverleibung ungiftiger Substanzen ähnliche Veränderungen im Blutserum hervorbringen kann wie Bakterien und ihre Toxine, sowie Giftstoffe pflanzlicher oder tierischer Art, die ähnliche Eigenschaften besitzen — so ist durch Pirquet für diesen neuen Zustand des Organismus der Name „Allergie“, d. h. veränderte Reaktionsfähigkeit geprägt worden. Dementsprechend werden diejenigen Stoffe, die diesen Zustand des Organismus hervorrufen, als Allergene bezeichnet. Die Bezeichnungen sind besonders für die Fälle richtiger anzuwenden, in denen die Widerstandsfähigkeit des Organismus nicht zugenommen hat oder sogar wesentlich vermindert ist.

Antigene resp. Allergene finden sich in allen Geweben, Zellen und Körperflüssigkeiten organischer Lebewesen. Belfanti und Carbone haben gefunden, daß Pferdeserum, das normalerweise für Kaninchen unschädlich ist, bei der Vorbehandlung mit Kaninchenblut toxische Eigenschaften für diese Tierspezies empfängt und bei intravenöser Applikation Kaninchen schon in ganz minimalen Dosen zu töten vermag. Anderen Tierspezies gegenüber indessen zeigt sich dieses Serum vollkommen indifferent, das heißt nicht anders wie normales Pferdeserum. Auch in vitro erzeugen solche Sera ganz besondere Wirkungen, indem sie die homologen Blutkörperchen derart schädigen, daß es zu einem Austritt des Hämoglobins, wie man sagt, zur Hämolyse kommt.

Parallel den spezifisch bakteriziden Seris, zeigen auch die hämolytischen Sera meist noch eine Reihe weiterer Eigenschaften, nämlich, wie jene, Stoffe enthalten, die Bakterien agglutinieren, und die Phagozytose befördern; so besitzen die hämolytischen Immunsera ähnliche Wirkungen auf das Blut und auf die roten Blutkörperchen, enthalten demnach neben den Hämolysinen Hämagglutinine, Hämopräzipitine und Hämotropine. Außer den genannten, auf die Erythrozyten einwirkenden Stoffen werden auf immunisatorischem Wege noch andere Zellgifte erzeugt, die alle unter dem Namen „Zytotoxine“ zusammengefaßt werden. Zu diesen gehören die Leukotoxine, die durch Einspritzen weißer

Blutkörperchen oder der sie enthaltenden Organe wie Milz, Lymphdrüsen und Knochenmark im Serum des betreffenden Organismus als Antikörper gebildet werden. Unter der Einwirkung leukotoxischer Sera verlieren die weißen Blutzellen ihre Beweglichkeit, ziehen die Pseudopodien ein und degenerieren zu schemenhaften, blasigen Gebilden. Epitheltoxine wurden durch v. Dungern im Serum des Meerschweinchens durch Injektion von Trachealepithel des Rindes in die Bauchhöhle erzeugt. Als Analoga zu den genannten Häm- und Leukotoxinen, das heißt als Antikörper, die durch Injektion von Bestandteilen der betreffenden Organe im Serum gewonnen wurden, sind außerdem noch **Hepato-, Spermato-, Nephro- und Neurotoxine** zu nennen.

Zwischen den giftigen Substanzen dieser Immunsera und den echten bakteriellen Toxinen bestehen, wie aus den vorstehenden Ausführungen ersichtlich ist, so große Aehnlichkeiten in bezug auf Entstehung und Wirkung, daß es naheliegend war, auch ihnen entgegenwirkende Antitoxine herzustellen. In der Tat ist es auch gelungen Antihämolyse, Antileukotoxine, Antispermatotoxine und so fort zu erzeugen. Ihnen reihen sich die verschiedenen, gleichfalls durch Immunsera erzeugten Antifermente an, unter denen diejenigen gegen das Labferment, das Pepsin, Trypsin und gegen das Fibrinferment genannt seien.

Nach dem bisher gelieferten Hinweis auf die verschiedenen Toxine und Antitoxine wenden wir uns einer bisher nicht erwähnten Wirkung der Sera zu, deren Kenntnis die Forschung der letzten Jahre erschlossen hat. Durch die Berührung mit frischem Blutserum können aus relativ ungiftigen Bakterieninhaltsstoffen, ebenso aus Erythrozyten, ja auch aus gelösten Eiweißkörpern heftige Gifte frei werden, Gifte, welche wahrscheinlich für den gesamten Infektionsprozeß von großer Wichtigkeit sind. Werden die Experimente mit dem Serum, von dem sich das des Meerschweinchens am besten eignet, und Bakterien, Erythrozyten oder Eiweißstoffen *in vitro* angestellt, so ergibt sich die große Wichtigkeit: 1) der relativen Menge der Komponenten, 2) der Zeitdauer der Einwirkung und 3) der Temperatur, bei der der Versuch vorgenommen wird. Die derartig extrahierten Krankheitsstoffe führen noch in vielfacher Verdünnung der ursprünglich letalen Giftdosis zu den schwersten Erscheinungen, wobei besonders zu betonen ist, daß die aus gelösten Eiweißkörpern gewonnenen Gifte dieselben Krankheitserscheinungen hervorrufen wie die aus Bakterien und aus Erythrozyten dargestellten. Aus diesem Grunde ist die Frage natürlich, woher denn die Giftstoffe eigentlich stammen, ob wirklich aus den Antigenen, den Bakterien, Eiweißstoffen usw., oder aber vielleicht aus dem aktiven Serum, eine Frage, die als noch nicht endgültig gelöst zu betrachten ist. Die kurz charakterisierte Gruppe dieser Gifte, die durch Einwirkung des Serums sowohl im Reagenzglas wie im Tierkörper entstehen, bezeichnen wir als **Anaphylatoxine**, die durch sie hervorgerufenen Phänomene, im Gegensatz zu denen der Immunität oder Prophylaxe, als **Anaphylaxiephänomene**. Produziert wurde ein solches Gift zuerst durch Richet aus den Tentakeln gewisser Aktinien; das von ihm als **Aktinokongestin** bezeichnete Gift tötete Hunde noch in der minimalen Dosis von 0,0042 g pro Kilogramm Körpergewicht nach Ablauf eines längeren Latenzstadiums unter Erbrechen, Diarrhöen und unter den Erscheinungen einer fortschreitenden Respirationslähmung. Ein ähnlich wirkendes Gift, das „**Mytilokongestin**“, isolierte Richet bald darauf aus den Miesmuscheln.

Läßt man die Tiere nach Injektion einer subletalen Dosis sich wieder erholen und spritzt man nochmals ein, so findet man nunmehr die vergiftende Dosis um ein Erhebliches herabgesetzt und überdies eine große Veränderung der Krankheitssymptome. Während nach der ersten Injektion eine längere Latenzzeit eintritt, so machen sich die Folgen der Reinjektion fast momentan bemerkbar und die Tiere gehen nach kurzer Zeit, in ca. 12–24 Std., zugrunde. Wir haben es also mit einer gesteigerten Giftempfindlichkeit und mit einem foudroyanten Krankheitsverlauf zu tun, die das charakteristische Merkmal auch von anderen anaphylaktischen Phänomenen sind. Von der Tatsache ausgehend, daß es möglich ist, die Ueberempfindlichkeit auf passivem Wege zu erzeugen, wird die Anaphylaxie dahin erklärt, daß im Serum der anaphylaktischen Tiere ein besonderer Reaktionskörper vorhanden ist, der gleichfalls einen als Folge der sensibilisierenden Antigeneinspritzung gebildeten Immunkörper darstellt. Wie die meisten Antikörper, so ist auch der anaphylaktische Reaktionskörper thermostabil; er läßt sich 1 Std. lang auf 56° C erhitzen, ohne an Wirksamkeit einzubüßen.

Eine weitere mit den Eiweißantikörpern übereinstimmende Eigenschaft der anaphylaktischen Antikörper besteht darin, daß wie dort bei der *in vitro* vor sich gehenden Eiweiß-Antieiwweißreaktion, so auch im sensibilisierten tierischen Organismus bei der gegenseitigen Einwirkung von Anaphylaktogen und Reaktionskörper die thermolabile Komponente des Serum, „das Komplement“, zur Bindung gelangt. Daß die stark giftige Substanz von Komplement + Antigen + Antikörper gebildet wird und dadurch die schädigenden Wirkungen auf den Organismus, nicht aber durch Verarmung desselben an Komplement bedingt sind, geht daraus hervor, daß, wie Friedberger zuerst gezeigt hat, die Zufuhr selbst reichlicher Komplementmengen nach der Reinjektion nicht imstande ist, den Ausbruch des anaphylaktischen Shocks zu verhindern.

Ebenso ist es Friedberger gelungen, aus spezifischen Präzipitaten durch Digestion mit Meerschweinchenkomplement Anaphylatoxin zu extrahieren, welches Meerschweinchen unter akuten anaphylaktischen Symptomen tötet. Mit inaktivem Serum, d. h. mit Serum, bei dem durch Erhitzung die thermolabile Komponente ausgeschaltet ist, findet dagegen nur eine ganz geringe Giftabspaltung statt — wiederum ein Beweis für die aktive Rolle des Komplements.

Die Sensibilisierung des Organismus gelingt nur bei Anwendung von Immuserum, das von verwandten Arten stammt. Es wurde vergeblich versucht, Meerschweinchen mit Immuserum vom Huhn und umgekehrt Vögel mit Säugerimmuserum zu anaphylaktisieren.

Wenngleich die Anaphylatoxine bei den verschiedenen Tierspezies differente Krankheitserscheinungen verursachen, so lassen sich dieselben doch auf ein einheitliches Prinzip zurückführen, das Biedl und Kraus in dem Satze zusammengefaßt haben: „Die anaphylaktische Intoxikation wird durch ein Gift hervorgerufen, das physiologisch identisch mit dem Witte-Pepton zu betrachten ist“. — Als beweisend für diese Identität sei darauf hingewiesen, daß bei beiden Vergiftungszuständen Leukopenie und Ungerinnbarkeit des Blutes eintritt. Außerdem ist sowohl bei Peptonvergiftung wie beim anaphylaktischen Shock eine stark vermehrte, vom Blutdruck unabhängige Lymphbildung zu beobachten. Ebenso ist die eminente Wichtigkeit der Leber für das Zustandekommen der Ver-

giftungerscheinungen erwiesen; diese traten nicht auf, wenn die Leber aus dem Kreislauf eliminiert wurde.

Galten die bisherigen Betrachtungen in der Hauptsache der Entstehung der Antikörper, ihrer chemischen Natur und Besonderheit, so soll im Folgenden derjenigen Theorie gedacht werden, die ein in den Tatsachen verborgen liegendes allgemeines Grundgesetz zuerst erkannte und deutete. Weit hinausgehoben über alle anderen Hypothesen auf demselben Gebiete wird Ehrlichs Seitenkettentheorie durch die Fruchtbarkeit ihrer Anwendungsmöglichkeit und durch das große Tatsachenmaterial, auf dem sie sich aufbaut. Ehrlich griff das Problem der Spezifität der Antikörper heraus und förderte durch seine theoretischen Erörterungen die Klärung der komplizierten Verhältnisse, wies aber auch gleichzeitig der Forschung neue Gesichtspunkte, weitere Bahnen.

Die Versuche mit Giften von bekannter chemischer Konstitution, besonders mit Alkaloiden und Glykosiden, Antikörper zu produzieren, hatten keinen Erfolg gehabt. Die bekannten Antigene waren entweder den Eiweißkörpern zuzurechnen oder sie gehörten zu den noch unerforschten Substanzen der tierischen und pflanzlichen Gewebe, denen auch die Fermente zugezählt werden müssen. Während die Gifte der ersten Gruppe, speziell der Alkohole, Alkaloide und Glykoside auf physikalischem Wege lokalisiert werden, wird die Bindung der zur zweiten Gruppe gehörenden Toxine und toxinähnlichen Gifte in den empfindlichen Organen als eine chemische betrachtet. Da derartige chemische Einwirkungen nicht ohne zueinander passende Atomgruppen denkbar sind, so müssen für die Toxine wie für die Antitoxine und für die empfänglichen Zellelemente haptophore Gruppen vorausgesetzt werden.

Ehrlich nimmt nun an, daß die beiden haptophoren Gruppen der Antitoxine und der Zellen nicht nur ihrer Struktur nach, sondern auch genetisch miteinander zusammenhängen, und zwar in der Weise, daß die Antitoxine freie, von ihrer Mutterzelle abgelöste Rezeptoren darstellen. v. Behring drückt sich folgendermaßen über die Verwandtschaft der beiden Atomgruppen aus:

Dieselbe Substanz im lebenden Körper, welche, in der Zelle gelegen, Voraussetzung und Bedingung einer Vergiftung ist, da sie das Toxin an dieselbe fesselt, wird Ursache der Heilung, wenn sie sich in der Blutflüssigkeit befindet und das daselbst vorhandene Toxin durch seine Bindung und Neutralisation verhindert, an die empfänglichen Zellen heranzutreten. Weigert vergleicht das Antitoxin sehr passend mit einem Blitzableiter, der den Blitz ablenkt; während dieselbe Eisenmasse, unrichtig verteilt, gerade das Gegenteil bewirkt. — Sind die Antitoxine freigewordene Rezeptoren der Zelle, so ist ihre Spezifität nur eine direkte Folge der spezifischen Giftempfindlichkeit, bzw. Affinität der betreffenden Körperzellen. Sind dagegen die Zellrezeptoren nicht streng spezifisch nur auf ein einziges Antigen eingestellt, sondern besitzen sie eine Affinität zu verschiedenen Substanzen, so werden auch, wenigstens zunächst, die abgestoßenen Rezeptoren die gleiche Vielseitigkeit zeigen.

Ehrlich hat die Bindung der Toxine an das giftempfindliche Protoplasma auf das gleiche Schema gebracht wie die Assimilation der Nahrungsstoffe. Bei dieser treten nach seiner Auffassung die Nutrirezeptoren der Zellen mit den betreffenden haptophoren Gruppen des Nahrungsmoleküls in Verbindung: die Toxine sollen gleiche haptophore Gruppen besitzen, die auch in gleicher Weise an die Zelle verankert werden. Während aber die für die Ernährung bestimmten Stoffe

bald der Spaltung und Verbrennung zugeführt und die Rezeptoren wieder frei werden, dauert die Bindung der Giftgruppen anscheinend länger, so daß die Rezeptoren oder Seitenketten zeitweise ausgeschaltet werden. Diesem Defekt begegnet die Zelle durch eine Regeneration und zeitweilige Ueberproduktion der genannten Gruppen. Das typische Immunisierungsverfahren mit der wiederholten Belastung der Zelle mit Antigenen veranlaßt nun eine derartige Ueberkompensation, daß die Zelle den Ueberschuß an Seitenketten nach Art eines Exkretes an das Blut abgeben wird. Für die Assimilation der Nahrungsstoffe nehmen wir nach Ehrlich an, daß der Rezeptor oder „Fangarm“ des Protoplasmas gleichzeitig Träger einer fermentativen, einer ergophoren Gruppe ist, nach Analogie der Fangarme niederer Tiere, die diese Vorgänge in grober Weise widerspiegeln. Für die Immunitätsvorgänge müssen wir uns noch eine zweite Art der Rezeptoren vorstellen, die zwar selbst keine fermentative Gruppe enthalten, aber imstande sind, im Blute kreisende Stoffe von fermentähnlichen Wirkungen durch eine besonders haptophore Gruppe an sich zu fesseln. Ehrlich bezeichnet diese Stoffe ihrer ergänzenden Wirkung wegen als Komplemente und die haptophore Rezeptorengruppe als komplementophile Gruppe. Die Rezeptoren und die Antikörper, die sie bilden, lassen sich demnach folgendermaßen zusammenstellen:

Rezeptoren	Antikörper
I. Ordnung besitzen nur eine haptophore Gruppe für das Nahrungsmolekül und liefern:	{ Antitoxine, Antikomplemente, Antifermente, Tropine
II. Ordnung besitzen eine haptophore Gruppe und daneben ergophore Gruppen und liefern:	{ Agglutinine, Koaguline, Präzipitine
III. Ordnung besitzen eine haptophore Gruppe, daneben noch eine zweite haptophore oder komplementophile Gruppe für die Verankerung der fermentähnlich gedachten Komplemente und liefern:	{ die hämolytischen, bakteriolytischen, zusammen die zytolytischen Ambozeptoren, die Bordetschen Antikörper usw., außerdem die Immunopsonine.

Da auch im normalen Blutserum, wie bereits oben erwähnt wurde, eine Anzahl von Antikörpern, Ambozeptoren, Agglutininen usw. anzutreffen sind, so ist die im Verlaufe der Immunisierung erfolgende Neubildung von Antikörpern nicht als etwas Neues, sondern als eine Steigerung normaler Weise sich abspielender Stoffwechselfvorgänge aufzufassen.

Ehrlich gibt, wie aus dem Vorhergehenden zu ersehen ist, eine rein chemische Erklärung der Antikörperbildung, die sowohl früheren wie heutigen anders lautenden Anschauungen und Einschränkungen gegenüber, durch die große Zahl der sie bestätigenden Tatsachen, an der Spitze aller auf dasselbe Gebiet bezüglichen Hypothesen steht. Immerhin soll die Möglichkeit einer Mitwirkung physikalischer Kräfte keineswegs bestritten werden.

Daß es sich bei der Einwirkung von Antitoxinen und Antikörpern auf die betreffenden Toxine und Antigene nicht um Zerstörung der betreffenden Stoffe, sondern um unter gewissen Bedingungen „reversible“ Verbindungen handelt, haben die Versuche von Roux und Calmette, von Morgenroth, von Hahn und Trommsdorf und von P. Th. Müller ergeben. Roux und Calmette haben gefunden, daß nach dem Aufkochen einer Mischung von Schlangengift und Gegengift die typische Giftwirkung wieder zutage tritt; Morgenroth zeigte, daß ein neutrales, tagelang aufbewahrtes Gemisch von Kobragift und Gegengift

durch Zusatz von Salzsäuremengen in seine beiden Komponenten gespalten wird. Hahn und Trommsdorf machten aus agglutinierten Bazillen das gebundene Agglutinin wieder frei, und zwar durch Digestion mit verdünnten Säuren und Alkalien; die Extrakte, die sie gewannen, waren wiederum agglutinationsfähig. Den gleichen Vorgang konnte P. Th. Müller bei dem Kaseinniederschlag hervorrufen, den das Laktoserum in der Milch verursacht.

Wir wenden uns nunmehr zu einer Gruppe von Theorien und Untersuchungen, die auf dem Gebiete der Serologie ganz besonders befruchtend gewirkt haben. Diese Arbeiten knüpfen an den Namen von Abderhalden an, dessen Schrift über die „Abwehrfermente des tierischen Organismus“ jetzt, knapp 1½ Jahr nach ihrem ersten Erscheinen, bereits in der dritten Auflage erschienen ist.

Im folgenden halte ich mich an die von ihm in dem genannten Werke gegebenen Ausführungen:

Diejenigen Zellen, die die Ernährung des tierischen Organismus zu vermitteln haben, bauen unter normalen Verhältnissen die Nahrungsmoleküle vor ihrer Weitergabe an den Kreislauf des Blutes so weit ab, daß sie dem Körper angepaßt sind; in das Blut werden physiologisch nur weit reduzierte, sich stets gleichbleibende Stoffe abgegeben. Wahrscheinlich zum Schutz des Blutes vor ungeeigneten Stoffen dient die zwischen ihm und den Ernährungszellen eingeschaltete Lymphe mit ihren weißen Blutzellen mit ihren spaltenden und unschädlich machenden Fähigkeiten. Werden dem Körper blut- oder plasmafremde Stoffe parenteral, d. h. unter Umgehung des Darmtraktus einverleibt, so wird der Organismus die ihm außerhalb der Ernährungszellen zu Verfügung stehenden Vorrichtungen in Anwendung bringen, um die körperfremden Stoffe zu assimilieren oder auszuschleiden. Der Organismus entledigt sich solcher Substanzen, die in die Blutbahn gelangen, dadurch, daß er im Serum Fermente auftreten läßt, welche die Verarbeitung der betreffenden Stoffe ermöglichen.

Weinland konnte zeigen, daß nach einer längere Zeit fortgesetzten subkutanen Einverleibung von Rohrzucker im Blute der Versuchstiere Invertin, also ein Rohrzucker spaltendes Ferment auftritt. Abderhalden fand, daß nach der Einspritzung verschiedener Eiweißkörper, wie Kasein, Eiereiweiß und Edistin, sowohl wie bei Einverleibung verschiedenartiger Peptone und Polypeptide im Blutserum Fermente auftreten, welche Eiweiß und Pepton abzubauen vermögen. Diese Fermente, über deren Natur noch gar nichts bekannt ist und die im allgemeinen nach ihren Wirkungen beurteilt werden, sind den eigentlichen Antikörpern wohl verwandt, aber sie sind nicht wie diese spezifisch. Das nach Rohrzuckerinjektionen nachweisbare Invertin spaltet auch Milchrucker und das nach parenteraler Einverleibung von Edistin oder Kasein entstehende Ferment vermag die verschiedensten Peptone abzuspalten, gleichviel ob dieselben aus Gelatine, aus Edistin, Kasein oder aus Seide herkommen.

Die Versuchsanordnung, nach welcher der Nachweis geführt wird, daß das Blutplasma neue Eigenschaften zeigt, wenn dem Organismus plasmafremde Substanzen zugeführt werden, ist nach Abderhalden folgende:

Serum und Plasma des Versuchstieres werden vor dem Versuch auf die Abwesenheit von Blutfarbstoff geprüft. Nur absolut hämoglobinfreies Serum und Plasma darf zu den Versuchen benutzt

werden. Ist Blutfarbstoff vorhanden, so sind rote Blutkörperchen zerfallen und die diesen zugehörigen Fermente sind in der Blutflüssigkeit vorhanden. Serum und Eiweißpepton oder Polypeptidlösung werden in bestimmtem Verhältnis zueinander gemischt, in ein Polarisationsrohr eingefüllt und rasch das Drehungsvermögen bestimmt. Das Gemisch wird in einen Brutschrank gebracht und von Zeit zu Zeit das Drehungsvermögen wieder festgestellt. Sofern das Blut von gesunden, normal ernährten Tieren stammt, trat niemals eine Änderung ein, konnte niemals eine Spaltung von Proteinen oder Peptonen festgestellt werden.

Nunmehr wurden dem gleichen Tier bestimmte Stoffe direkt in den Organismus eingeführt und nach einiger Zeit mit dem Serum resp. Plasma genau so verfahren, wie dies oben geschildert wurde. Schon bei den ersten Versuchen, die an Hunden und Kaninchen mit Eiweiß oder Pferdeblutserum ausgeführt wurden, zeigte sich, daß der Gehalt des Blutes an peptolytischen Fermenten vermehrt war, daß die Anfangsdrehung im Polarisationsrohr im Laufe der Zeit sich änderte.

Dieses Auftreten von Fermenten im Blutplasma nach der Einspritzung von blutfremden Proteinen und Peptonen steht nach Abderhalden unzweifelhaft in irgendeinem Zusammenhange mit der Anaphylaxie. Es ist seiner Ansicht nach denkbar, daß die Fermente im Laufe der Zeit besondere Eigenschaften annehmen und dann vielleicht nach der zweiten Einspritzung Abbaustufen liefern, die eine spezielle Wirkung hervorrufen. Es wäre nach Abderhalden indessen verkehrt, die Anaphylaxie allein auf das Verhalten des Blutes zurückzuführen, da wahrscheinlich die Körperzellen beim Zustandekommen der Anaphylaxie einen wichtigen Anteil haben; vielleicht spielen sich im Blut nur die Verhaltensmaßregeln der Körperzellen wieder. Schließlich ist Abderhalden auch geneigt, das Anaphylaxieproblem nicht als einzig und allein von rein chemischen Gesichtspunkten aus für lösbar zu erachten, sondern die Mitwirkung physikalischer Verschiebungen und Störungen, vielleicht durch Änderung des osmotischen Gleichgewichts oder durch Wirkung besonderer Ionen anzunehmen.

Die sehr naheliegende Frage: wie reagiert der Organismus, wenn ihm Blut der eigenen Art und solches von anderen Tierarten in die Blutbahn eingeführt wird? wurde durch Experimente dahin gelöst, daß bei der Einverleibung von arteigenem Blute jede Reaktion ausbleibt, während ein Abbau in der Blutbahn eintritt, wenn das Blut einem Tier anderer Rasse zugehört.

Durch die erwähnten und durch viele weitere Versuche und ihre Ergebnisse hält es Abderhalden für erwiesen, daß nach parenteraler Zufuhr körpers- und plasmafremder Substanzen im Serum bestimmte Fermente auftreten, die die genannten Stoffe in Abbaustufen überführen. Bei weiterem Verfolgen dieser Gedankenreihe mußte es gelingen, körpereigenen, jedoch blut- und plasmafremden Substanzen nachzuspüren. Während der Gravidität schien, die Richtigkeit der Voraussetzungen angenommen, die Möglichkeit vorhanden zu sein, arteigenes, jedoch plasmafremdes Material im Blute anzutreffen. Die Erfahrung zeigte denn auch bald, daß das Serum von Schwangeren immer Abwehrfermente enthält, die auf Plazentareißweiß eingestellt sind, und zwar ergaben zahlreiche Untersuchungen, daß die betreffenden Substanzen während der ganzen Zeit der Schwangerschaft im Blute kreisen, bereits 8 Tage nach der Befruchtung nachweisbar sind, und wenn die Plazenta aus dem mütterlichen Organismus gelöst ist, binnen 14—21 Tagen verschwinden. Nicht-

schwängere Frauen ergeben ebensowenig einen Abbau von Plazentagewebe wie männliche Individuen.

Eine weitere Fragestellung, die sich aus dem Vorhergehenden und besonders daraus ergibt, daß die Fermente gegen plasmafremde Stoffe nicht streng spezifisch gefunden wurden, war folgende: Baut Serum von Individuen, die an Infektionskrankheiten leiden, die ein Karzinom besitzen oder Erkrankungen anderer Natur aufweisen, Plazentagewebe ab?

A priori mußte das nach dem Ergebnis der bisherigen Versuche angenommen werden. Um so größer war die Ueberraschung, daß in keinem Falle Abbau eintrat und es sich damit erwies, daß der tierische Organismus dann streng spezifisch eingestellte Fermente bildet, wenn körpereigene Zellen plasmafremde Stoffe abgeben. Abderhalden erklärt diesen scheinbaren Widerspruch der Ergebnisse damit, daß die Zelle das plasmafremde Material nur in Spuren abgibt, während der Experimentator mit seinen vergleichsweise stets brutalen Eingriffen diese Verhältnisse nicht nachahmen kann. Weiterhin ist es möglich, daß die künstlich zugeführten Stoffe nicht mehr jene Feinheit in der Organisation besitzen, um spezifisch auf sie eingestellte Fermente hervorzurufen. Auch einem anderen Einwand, der gegen die angewandte Versuchsmethodik erhoben werden könnte, glaubt Abderhalden begegnen zu können. Bei dem Dialysierverfahren (von dem noch weiter unten die Rede sein wird) beginnt das Abwehrferment den Abbau beim Eiweißstadium, es wird dabei das Auftreten von diffundierbaren Abbaustufen festgestellt; wird dagegen die optische Methode benutzt, so wird den Fermenten durch Herstellung von Peptonen vorgearbeitet, die durch die Abwehrfermente zerlegt werden. Abderhalden hält Fälle, bei denen die optische Methode einen Abbau anzeigt, während das Dialysierverfahren ein negatives Resultat ergibt, nicht für unmöglich, trotzdem bis jetzt kein einziger solcher Fall einwandfrei nachgewiesen sei. Andererseits ist es mit der vorausgesetzten Aufgabe und Fähigkeit der Fermente, plasmafremde Stoffe zu zerlegen, wohl vereinbar, daß Protein und auch Peptone abgebaut werden, vorausgesetzt, daß solche Peptone benutzt werden, die den normalen fermentativen Abbaustufen des Ausgangsmateriales entsprechen.

Abderhalden faßt das Neue seiner Forschungsergebnisse folgendermaßen zusammen:

(Wörtlich.) „Vollständig neu ist der eindeutige Nachweis, daß der tierische Organismus sich innerhalb gewisser Grenzen ganz allgemein mittels Fermenten gegen abbaufähige, aus mehreren Bausteinen bestehende Verbindungen wehrt. Neu ist ferner der Gedanke, daß sich mittels dieser Fermente die Funktion bestimmter Organe beurteilen läßt. Endlich ist neu, daß der tierische Organismus so spezifisch eingestellte Fermente mobil macht und damit gleichzeitig dokumentiert, daß die Bestandteile seiner verschiedenartigen Zellen einen der betreffenden Zellart allein zukommenden Aufbau besitzen.“

Durch die bisher festgestellten Tatsachen eröffnet sich ein weites Feld für die serodiagnostische Erforschung der Organfunktionen, ein neuer Weg zur Erweiterung der Kenntnisse über den Zellaufbau und den Zellstoffwechsel unter normalen und unter pathologischen Verhältnissen. Bereits sind Untersuchungen im Gange, um festzustellen, ob die einzelnen Zellarten eines Organismus über spezifische Fermente verfügen, ob z. B. die Darm- oder Leberzellen und

die Leukozyten stets mit bestimmten Abwehrfermenten ausgerüstet sind. Daß die Fermente der Niere Peptone aus den verschiedensten Organen angriffen, während Preß- und Mazerationsaft aus anderen Organen nur Pepton resp. Eiweiß aus den entsprechenden Geweben abbaute, konnte bereits erwiesen werden. Es ergibt sich ferner die Perspektive, durch die neuen Methoden die Abhängigkeit der einzelnen Organe voneinander und ihre Dysfunktionen studieren zu können, den primären Grund der Ausfallserscheinungen näher kennen zu lernen.

Auf dem Gebiete der Pathologie, zur Diagnostik derjenigen Organe, die blut- resp. plasmafremde Stoffe abgeben, werden sich die gewiesenen Methoden fruchtbar erweisen; die Therapie wird durch Verschwinden der Abwehrfermente den Erfolg ihrer Maßnahmen prüfen können.

Ein besonders umfassendes Gebiet zukünftiger Arbeit bieten die Infektionskrankheiten. Die beim Dialysierverfahren entstandenen Abbaustufen können toxikologisch geprüft werden dadurch, daß das Dialysat zu Tierversuchen verwendet wird.

Abderhalden hofft außerdem, daß es gelingen wird, die Thrombose durch entsprechend eingestellte Fermente auszugreifen und zum Einschmelzen zu bringen und daß die Zukunft auch den Nachweis von Abwehrfermenten im Serum bringen wird, die Fette, Kohlehydrate, Nukleoproteide usw. abzubauen vermögen.

Es gibt wohl kaum eine reizvollere Aufgabe, als zu erforschen, wie sich der Organismus verteidigt, wenn in den harmonischen, bis in die kleinsten Einzelheiten in feinsten Weise geregelten Stoffwechsel fremde Elemente störend eingreifen. Durch Eindringen in die Eigenschaften der einzelnen Abbaustufen werden sich allmählich die Geheimnisse der Infektionskrankheiten und der Immunitätsreaktionen erschließen!

Für die Karzinomdiagnose besitzen wir bereits die Mitteilung günstiger Ergebnisse von Epstein, Lüdke und Gambaroff. Sehr interessant für die Annahme von spezifisch eingestellten Fermenten ist die Beobachtung von Paltauf, wonach das Serum eines Karzinomträgers Tumorgewebe von einer 61-jähr. Patientin nicht abbaute, während diese bei Anwendung von Schwangerenserum erfolgte. Die pathologisch-anatomische Diagnose ergab ein Chorionepitheliom.

Wie aus den obigen Hinweisen ersichtlich ist, knüpfen sich eine große Anzahl neuer Fragen und Probleme an die experimentellen Ergebnisse und an die erklärenden Theorien, durch welche Abderhalden die serologische Wissenschaft in so glücklicher Weise erweitert hat. Möchten sich die geeigneten Forscher finden, die auf der verheißungsvollen Grundlage erfolgreich und Neubefruchtend weiterbauen.

Als Abschluß meiner Ausführungen stellte ich nunmehr im folgenden die auf den im Vorhergehenden referierten Forschungen und Theorien aufgebauten Reaktionen kurz zusammen, die zu diagnostischen Zwecken angewendet werden.

Unter den zur Diagnose benutzten allergischen Reaktionen, bei denen die veränderte Reaktionsweise des erkrankten Organismus als Kriterium benutzt wird, sind die verschiedenen Tuberkulinreaktionen, die Malleinreaktion und die anaphylaktischen Reaktionen zu nennen.

Beim Menschen kommt für die Tuberkulinreaktion fast ausschließlich das Tuberkulin Koch (auch Altuberkulin genannt) in Betracht, und zwar wird es mit einer $\frac{1}{2}$ -proz. Karbolsäurelösung derartig verdünnt, daß eine 1-proz. und eine 1-prom. Tuberkulinlösung resultiert. Die sub-

kutane Injektion, die am besten in den Morgenstunden zwischen 8 und 10 Uhr, und zwar in der Rückengegend des Patienten ausgeführt wird, beginnt mit einer Anfangsdosis von 0,2–0,5 mg, die bis zu einer Grenzdosis von 10 mg gesteigert werden kann. Die Reaktion des tuberkulösen Organismus auf die Einspritzung besteht in einer lokalen Rötung und Schwellung der Haut an der Einstichstelle (Stichreaktion) in einer entzündlichen Infiltration des subkutanen Gewebes (Depotreaktion) und in einer Temperatursteigerung (Thermoreaktion).

Die Pirquetsche Reaktion bedeutet eine Modifikation der subkutanen Reaktion. Dabei wird das Tuberkulin nicht unter die Haut sondern nur in die obersten Schichten der Kutis eingespritzt; die Fieberreaktion und die Allgemeinerscheinungen fallen bei dieser Applikationsweise fort, es stellt sich nur Rötung und Schwellung der Impfstelle mit nachfolgender Papelbildung ein. Die Pirquetsche Kutanreaktion ist überaus empfindlich und zeigt auch ausgeheilte tuberkulöse Prozesse an; da diese nun nach Sektionsbefunden in 91–97 Proz. aller Fälle vorhanden sind, so kann es nicht wundernehmen, daß die Reaktion bei fast allen Erwachsenen positiv ausfällt. Durch Anwendung schwächerer Tuberkulinkonzentrationen hat Erlandsen in neuerer Zeit versucht, die allzu große Empfindlichkeit der Pirquetschen Reaktion herabzusetzen.

Als dritte Tuberkulinreaktion ist die von Calmette und von Wolff-Eisner ausgearbeitete Ophthalmoreaktion zu nennen. Calmette benutzte eine 1- oder $\frac{1}{2}$ -proz. Lösung, Citron 1, 2–4-proz. Lösungen des Tuberkulins. Tritt nach dem Einträufeln von einem Tropfen dieser Lösungen in den Bindehautsack Rötung des Auges, Schwellung der Konjunktiva und seröse oder gar eitriges Sekretion auf, so kann Tuberkulose als sichergestellt gelten.

Da manchmal stürmische Reizerscheinungen bei der Ophthalmoreaktion vorkommen, die als direkt gefährlich bezeichnet werden, so herrscht über ihre praktische Verwertbarkeit noch keine Einigkeit bei den Aerzten.

In der Tiermedizin hat sich die Ophthalmoreaktion rasch eingebürgert, wobei das aus Rindertuberkelbazillen gewonnene Bovotuberkulol und Phymatin angewendet werden.

Im Anschluß an die verschiedenen Tuberkulinreaktionen muß der Malleinreaktion gedacht werden, die sich gleichfalls in der Tiermedizin außerordentlich bewährt hat. Die Höhe der zur Anwendung gelangenden Konzentration richtet sich nach der Art des benutzten Präparates (Rohmallein, konzentriertes und Trockenmallein). Bisher wurde meist die subkutane Injektion ausgeführt, nach welcher die rotzkranken Pferde sowohl eine lokale wie eine Thermoreaktion zeigen. In letzter Zeit scheint übrigens auch die Ophthalmomalleinreaktion an Bedeutung zu gewinnen.

Anaphylaktische Reaktionen, bei denen es sich um Vorgänge der Eiweißüberempfindlichkeit handelt, die zur Differenzierung von Eiweißantigenen verschiedener Herkunft dienen, werden gelegentlich zu diagnostischen Zwecken verwendet. Sie decken sich mit den noch später zu besprechenden Präzipitinreaktionen und Komplementablenkungen und werden nach H. Pfeiffer besonders dann empfohlen, wenn infolge hochgradiger Zersetzung einer Blutspur die Präzipitinreaktion im Stich läßt oder wenn es sich um Blutarten handelt, für welche Immunsera nicht zur Verfügung stehen.

Das Verfahren ist folgendes:

4 Meerschweinchen werden mit verdünnten Extrakten der betreffenden Blutpur intraperitoneal injiziert; die Verdünnungen werden mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit einer $\frac{1}{2}$ -proz. Sodalösung hergestellt. Nach 14–28 Tagen wird die Reinjektion mit dem Serum jener Tierespezies vorgenommen, von der vermutlich die zu untersuchende Blutprobe herstammte. Das inaktivierte, auf Körpertemperatur vorgewärmte Serum wird in Dosen von 0,5, 1,0, 1,5 und von 2,0 ccm den Versuchstieren in die Bauchhöhle eingespritzt. Zwei nicht vorherbehandelte Meerschweinchen, die als Kontrollen dienen, erhalten 1,5 bzw. 2,0 ccm von demselben Serum. Nun werden viertelstündlich rektale Temperaturmessungen vorgenommen, welche bis zur völligen Erholung von dem anaphylaktischen Shock oder bis zum Exitus fortgesetzt werden. Die Größe des Shocks wird von Pfeiffer zahlenmäßig nach folgender Formel ausgedrückt:

$$\text{Shockgröße} = \frac{\text{Temperaturabnahme} \times \text{Shockdauer}}{2} =$$

Bei tödlichem Versuchsverlaufe tritt eine andere Berechnung ein, für die Pfeiffer die empirische Formel aufstellte:

$$\text{Shockgröße} = 30\,000 + \left(20\,000 - \frac{\text{Temperaturabnahme} \times \text{Lebensdauer}}{2} \right) =$$

Die Zeit wird in beiden Fällen in Minuten, die Temperatur in Zehntelgraden gerechnet.

Als bakterizide Reaktion ist der Pfeiffersche Versuch zu erwähnen, dessen theoretische Bedeutung bereits im vorhergehenden hervorgehoben wurde. Seine Anwendung in der Diagnostik empfiehlt sich besonders dann, wenn die später zu besprechende Agglutinationsprobe einen zweifelhaften Ausfall ergibt. In Betracht kommt die Pfeiffersche Reaktion für Typhus und für Choleradiagnosen, und zwar sowohl zur Identifizierung eines zweifelhaften Mikroorganismus wie zur Erkennung eines zweifelhaften Krankheitsfalles.

1) Versuchsanordnung zur Identifizierung eines fraglichen Mikroorganismus:

Immunsrum von hohem und feststehendem Wirkungswert wird in dem 5-fachen des Titerwertes dem 1. Meerschweinchen, einem 2. das 10-fache des Titerwertes, gemischt mit je einer Oese der zu untersuchenden, 18 Std. bei 37° auf Agar gezüchteten Kultur, in 1 ccm Fleischbrühe, in die Bauchhöhle eingespritzt. Das 3. Meerschweinchen erhält mit demselben Zusatz das 50-fache der Titerdosis vom normalen Serum derselben Tierart, von welcher das beim 1. und beim 2. Tier benutzte Immunsrum stammt. Das 4. Tier endlich erhält $\frac{1}{4}$ Oese der Kultur, um zu ermitteln, ob die Bakterien für Meerschweinchen virulent sind.

Die Reaktion ist als positiv anzusehen, die Diagnose auf Cholera oder Typhus gesichert, wenn nach spätestens 1 Std. in der Peritonealflüssigkeit vom Tier 3 und 4 große Mengen lebhaft beweglicher, morphologisch gut erhaltener Bazillen zu sehen sind, während bei den Tieren 1 und 2 körniger Zerfall und Auflösung der Vibrionen eingetreten ist.

2) Versuchsanordnung zur Diagnose des Krankheitsfalles:

Verdünnungen vom Blutserum des betreffenden Patienten mit 20, 100 und 500 Teilen Bouillon werden zu je 1 ccm mit einer 2 mg-Oese 18-stünd. Agarkultur virulenter Choleravibrionen vermischt, je einem Meerschweinchen intraperitoneal appliziert. Das 4. Tier erhält als Kontrolle $\frac{1}{4}$ Oese der gleichen Kultur ohne Serum in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt. Der positive Ausfall (wie unter 1 bei den Tieren 1 und 2) bei den 3 ersten Tieren im Laufe von 20–60 Min. berechtigt zu der Annahme, daß das Serum von einem Pat. stammt, der die Cholera überstanden hat.

Korte und Sternberg haben, im Anschluß an die Methodik von Neisser und Wechsberg den Schauplatz des bakteriziden Versuches in das Reagenzglas verlegt und auf den Ausfall die Serodiagnostik des Abdominaltyphus begründet. Das Prinzip ist dabei, zu einer an sich unwirksamen Kombination von normalem, aktivem Serum + Typhusbazillen immer geringere Mengen des zu prüfenden, inaktivierten Serums

hinzuzufügen und zu untersuchen, bis zu welcher Verdünnung eine bakterizide Wirkung nachweisbar ist.

3) Versuchsanordnung für die bakterizide Reaktion in vitro:

Zu starken Verdünnungen des zu prüfenden menschlichen Serums (50-, 100-, 200-, 400-, 800-fach in 0,85-proz. Kochsalzlösung, jede Verdünnung auf 1 ccm aufgefüllt werden zunächst die Typhusbazillen 0,5 ccm einer 5000-fachen Verdünnung von 24-stünd. Typhusbouillonkultur) und dann das Komplement, frisches Kaninchenserum (ebenfalls 0,5 ccm in 10—15-facher Verdünnung) hinzugefügt, so daß die Gesamtflüssigkeitsmenge jeden Röhrchens 2 ccm beträgt.

Als Kontrolle dienen 1) die Aussaat von 0,5 ccm Typhusbouillonverdünnung, mit Kochsalzlösung auf 2 ccm aufgefüllt für sich allein,

a) sofort ausgegossen zu Platten,

b) nach Beendigung des Versuchs zu Platten ausgegossen.

1a zeigt die Zahl der eingesäten Bazillen,

1b ihre Vermehrung im Laufe des Versuchs an.

2) Die gleiche Aussaat wie Kontrolle 1 mit der früher genannten Menge Kaninchenserum versetzt, aber ohne menschliches Serum.

Kontrolle 2 gibt die bakterizide Wirkung an, welche dem Kaninchenserum für sich allein zukommt.

Sämtliche Röhrchen werden nun für 3—4 Std. in den Brutschrank gestellt, worauf ihr Inhalt zu Platten ausgegossen wird. Die Platten können bereits nach 12 Std. besichtigt werden. Eine Auszählung der Kolonien ist überflüssig, nur große, ohne weiteres erkennbare Unterschiede sind zu berücksichtigen. Die stark verminderte Kolonienzahl gegenüber den Kontrollen bestimmt die Wertigkeit des zu prüfenden Serums.

Diese Methode ergibt nicht nur die Diagnose für Typhus, sondern zugleich eine quantitative Vorstellung von dem Wirkungswert des betreffenden Serums, stellt aber nicht unerhebliche Anforderungen an die Technik und an die Zeit des Untersuchers.

Unter den biologischen Präzipitinreaktionen ist das von Uhlenhuth ausgearbeitete Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut sowie anderer für die forensische Praxis in Betracht kommenden Eiweißsubstanzen hervorzuheben.

Die Ausführung der Methode ist folgende:

Zur Erlangung eines hochwertigen Serums wird Kaninchen in Intervallen von 6—8 Tagen je 10 ccm defibriniertes menschliches Blut in die Bauchhöhle oder je 10 ccm zellfreies Blutserum subkutan injiziert. Von 10 immunisierten Tieren liefern häufig nur 1—2 verwendbare Sera. Das zu untersuchende Blut oder der Fleischauszug (Pferdefleischnachweis) wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:1000 verdünnt (wachsenach Kochen und Zusatz eines Tropfens Salpetersäure an der Entstehung einer ganz leichten Eiweißtrübung erkennbar ist) und dann etwa 5 Tropfen der verschiedenen spezifischen Sera hinzugefügt. Als Kontrollen sind 4 verschiedene Versuche nötig:

1) Spezifisches Antiserum + physiologische NaCl-Lösung,

2) die zu untersuchende Blutlösung ohne jeden Zusatz,

3) spezifisches Antiserum + Menschenblut in entsprechender Verdünnung,

4) spezifisches Antiserum + Blut anderer Tierspezies (Rind, Pferd, Schaf usw. in entsprechender Verdünnung. Fällt Kontrollprobe 1, 2 und 4 negativ, 3 dagegen positiv aus, so kann, bei positiver Hauptreaktion als sicher angenommen werden, daß die betreffende Blutspur vom Menschen, resp. das Fleisch vom Pferde her stammt.

Die biologische Präzipitinreaktion gestattet es auch, die Zusammensetzung von Bienenhonig und von seinen Verfälschungen und die Beimischung von minderwertigen Mehlsorten zum Weizenmehl oder das Fehlen von Eigelb in angeblich damit gefärbten Teigwaren zu ermitteln.

Zur Diagnostik der Infektionskrankheiten sind die Präzipitinreaktionen bisher nur wenig benutzt worden, hervorzuheben ist indes die Ascolische Thermopräzipitinmethode, die, eine Modifikation des gewöhnlichen Verfahrens, sich zum Nachweise milzbrandigen (auch bereits fauligen oder an Häuten und Fellen vorhandenen) Materials bewährt hat.

Die Methode gestaltet sich folgendermaßen:

Die verdächtigen Objekte werden mit dem 5–10-fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung einige Minuten lang gekocht und dann auf ein Asbestfilter aufgegossen. Nach dem Erkalten werden die klaren Filtrate mittels präzipitierenden Milzbrandserums — bzw. zur Kontrolle mittels Normalserums — unterschichtet. Im positiven Falle stellt sich binnen weniger als einer Viertelstunde an der Grenze beider Flüssigkeiten eine ringförmige Trübung ein.

Von den nur zu erwähnenden, von Fornet und Schereschewsky und von Porges zur Luesdiagnose angegebenen Präzipitationreaktionen stellt die erste möglicherweise, die zweite dagegen sicher keine spezifische Eiweißfällung, sondern eine Kolloidausflockung anderer Art dar.

Unter den Agglutinationsreaktionen, die zur Identifizierung fraglicher Bakterienarten und zur Serodiagnostik der Infektionskrankheiten Anwendung finden, erfreut sich die Widalsche Reaktion beim Typhus abdominalis allgemeiner Verwendung. Die Beobachtung der agglutinierten Bakterien kann dabei im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop oder aber im Reagenzglas erfolgen.

Methodik der Widalschen Reaktion nach Pröschner:

Blutentnahme am äußeren Rande des Ohrläppchens mittels U-förmig gebogener Glaskapillare, zentrifugieren, abbrechen der Röhrrchen unterhalb des von dem Blutkuchen getrennten Serums. Messung des erhaltenen Serums mit einer in 100 Teile eingeteilten 1 ccm Meßpipette, Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:10, 1:20, 1:40 usw., im ganzen 5–6 Verdünnungen; außerdem fertigt man eine Kontrolle ohne Serum, nur mit 0,5 ccm Kochsalzlösung an; Zusatz der Bakteriensuspension (0,5 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur von Typhus oder denjenigen Bakterien, um die es sich in dem speziellen Falle handelt; die Bakterienkultur ist vorher durch Zusatz von 1 Proz. Formalin (40 Proz.) oder von 0,5-proz. Karbolsäure abgetötet und von dem hierbei entstehenden Bodensatz abgegossen worden). Es empfiehlt sich, falls Typhus in Frage kommt, die Reaktion nicht nur mit dem Typhusbazillus, sondern gleichzeitig auch mit den Kulturen des Bac. paratyphi A und B anzusetzen. Die Proben werden direkt in den Reagenzröhrchen oder in kleinen gläsernen, aufeinandergestellten Blockschälchen 1–2 Stunden bei 37° im Brutschrank gehalten und dann, wie oben angegeben, mit freiem Auge oder unter dem Mikroskop kontrolliert. Eine Agglutination in den auf 1:40 oder stärker verdünnten Serumproben gilt als positiver Ausfall. In zweifelhaften Fällen ist es zweckmäßig, die Reaktion nach 2 bis 3 Tagen zu wiederholen, da dann häufig der Agglutinationsgehalt des Serums zugenommen hat.

Für die praktischen Aerzte, die meist nicht in der Lage sind, sich die erforderlichen Kulturen selbst zu bereiten, hat Ficker ein sogenanntes Typhusdiagnostikum herstellen lassen, eine Flüssigkeit, welche die wirksamen Antigene des Typhusbazillus enthält und genau so wie die Bakteriensuspension dem zu prüfenden Serum zugesetzt wird. Ebenso ist auch ein Paratyphusdiagnostikum A und B hergestellt.

In der Veterinärmedizin wird die Agglutinationsreaktion vorwiegend zur Rotzdiagnose angewendet. Bei dem von Schütz und Miessner ausgearbeiteten Verfahren ließ sich in etwa $\frac{4}{5}$ der untersuchten Fälle die richtige Diagnose stellen.

Als hämolytische Reaktion ist die „klinische Alexinprobe“ nach Moro zu bezeichnen:

Einem Gemisch von gewaschenen Hammelblutkörperchen (0,1 ccm einer 10-proz. Aufschwemmung) mit einer zur Lösung hinreichenden Menge inaktivierten hämolytischen Ambozeptorserums wird das zu untersuchende aktive menschliche Serum in der Menge von 0,025 ccm (0,1 ccm 4-fach verdünnt) hinzugesetzt. Vollkommene Hämolyse bedeutet Steigerung des Komplementgehaltes. Bleibt ein ungelöster Erythrozytenrest zurück, so wird dieser abzentrifugiert, nach Abgießen der obenstehenden Flüssigkeit in 0,1 ccm n/10 Salzsäure gelöst, wobei eine gelbbraune Verfärbung eintritt (Überführung des Hämoglobins in salzsaures Hämatin). Vergleichen der er-

haltenen Flüssigkeit mit dem Farbenton der Sahlischen Standardlösung. Die Intensität der Färbung gibt den Maßstab für den Komplementgehalt des Serums an.

Sichere diagnostische oder prognostische Schlüsse lassen sich beim Erwachsenen bisher nicht aus den Resultaten der Alexinprobe ziehen.

Much und Holzmann haben eine antihämolytische Reaktion ausgearbeitet, bei der die Kobragifthämolyse durch Serum von Geisteskranken gehemmt werden sollte. In der Tat scheint diese sogenannte Psychoreaktion bei Nerven- und Geisteskranken häufiger als bei anderen Personen einzutreten, aber als Differentialdiagnose für manisch depressives Irresein und Dementia praecox gegenüber von Neurasthenie, Hysterie, Paralyse usw., wie sie zunächst von Much und Holzmann bezeichnet wurde, hat sie sich den Nachuntersuchern doch nicht ergeben. Die Vorschriften für die Psychoreaktion sind:

Durch 50-fache Verdünnung einer 1-proz. Stammlösung von Kobragift wird die Versuchslösung hergestellt. Eine Reihe von Reagenzgläsern wird mit 0,35 ccm Patientenserum und 0,1, 0,5 usw. ccm des verdünnten Kobragiftes beschickt; in jedes Gläschen noch 0,5 ccm einer mehrfach mit physiol. Kochsalzlösung gewaschenen 10-proz. Aufschwemmung von defibriniertem Menschenblut (am besten aus der Placenta), worauf das Gesamtvolumen mit Kochsalzlösung auf 1,85 ccm aufgefüllt wird. Als Kontrollen dienen Röhrchen mit Giftlösung ohne Serum. Alle Proben werden gründlich durchmischt, 2 Std. bei 37° C gehalten und dann 22 Std. auf Eis gestellt. Bei positiver Reaktion muß dasjenige Röhrchen, welches die kleinste noch lösende Kobragiftdosis enthält, vollkommene Hemmung der Hämolyse zeigen.

Ein Verfahren der biologischen Eiweißdifferenzierung, das in neuerer Zeit viel verwendet wird, ist von M. Neisser und Sachs ausgearbeitet worden. Dasselbe beruht auf der Komplementbindung, welche stets dann zu beobachten ist, wenn eiweißartige Antigene bei Gegenwart aktiven Normalserums mit ihren spezifischen Antikörpern in Berührung treten.

Zur Ausführung der Reaktion ist erforderlich:

- 1) Ein hochwirksames Antiserum gegen jene Eiweißart, deren Anwesenheit in dem zu untersuchenden Material nachgewiesen werden soll.
- 2) Frisches, komplementhaltiges Normalserum vom Meerschweinchen.
- 3) Gewaschenes Rinderblut in 5-proz. Aufschwemmung.
- 4) Inaktives, vom Kaninchen gewonnenes Immunsorum gegen Rinderblut (Ambozeptorserum).

Blutkörperchen, Normalserum und Ambozeptorserum bilden zusammen ein hämolytisches System, in welchem Auflösung der Erythrozyten stattfindet, vorausgesetzt, daß das Komplement nicht von anderer Seite her mit Beschlag belegt wird. Dies tritt aber ein, wenn gleichzeitig mit dem Komplement ein Eiweißkörper und dessen Antikörper in dem Gemisch zugegen ist. In solchem Falle bleibt dann infolge einer Ablenkung des Komplementes, die Hämolyse aus, und da die Natur des verwendeten Eiweißimmunsorum bekannt ist, so kann dann aus dem Ausbleiben der Hämolyse ein Schluß auf die Provenienz des eiweißhaltigen Materials gezogen werden.

Die Vorteile des Verfahrens der Komplementablenkung gegenüber der Uhlenhuthschen Präzipitationsmethode bestehen erstens in seiner größeren Spezifität, zweitens darin, daß das Antieißserum in sehr großer Verdünnung angewendet werden kann. Andererseits ist das Verfahren der Komplementablenkung aber im höchsten Grade umständlich und deshalb nur für Laboratorien zu empfehlen, die ähnlichen Zwecken ständig dienen. Solche Laboratorien brauchen die zeitraubende „Einstellung des Systems“, die zu der sehr wichtigen Wertbestimmung der verwendeten Reagentien notwendig ist, nicht jedesmal vorzunehmen.

da das Antieißserum wie das Ambozeptorserum im eingefrorenen Zustand lange konserviert werden kann und dann bei dem einmal festgelegten Titer dieser beiden Sera vor jedem Versuch nur die Wertigkeit des komplementhaltigen Meerschweinchenserums festgestellt zu werden braucht.

Die Methode erscheint dazu berufen, noch eine große Rolle in der Serodiagnostik zu spielen, sie ist bereits mit großem Erfolge bei Typhusfällen, den verschiedensten gonorrhöischen Affektionen, bei Lepra, Tuberkulose, Variola usw. angewendet worden. In der Tiermedizin ist sie unentbehrlich bei der Rotzdiagnose geworden. Auch bei nichtbakteriellen Erkrankungen, wie bei Echinococcus-Infektion, wobei als Antigen der Inhalt von Echinococcus-Blasen dient, hat sie sich als wichtiges Hilfsmittel bewährt.

Von allergrößter praktischer Wichtigkeit hat sich indessen die Komplementbindungsmethode bei der Syphilisdiagnose erwiesen, wie sie Wassermann, Neisser und Bruck ausgearbeitet haben. Diese Forscher konnten zeigen, daß das Serum syphilitischer Menschen und Affen bei der Vermischung mit Extrakten ausluetischen Organen Komplement bindet, woraus sie auf die Anwesenheit spezifisch syphilitischer Stoffe in den Gewebsextrakten auf der einen Seite, auf der anderen von spezifisch antisiphilitischen Immunkörpern in dem Serum den Schluß zogen.

Als „hämolytisches System“ dient Hammelblut, ein Ambozeptorserum, das durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Hammelerythrozyten gewonnen wird, und Meerschweinchenkomplement. Das Ambozeptorserum soll noch in den kleinen Dosen von 0,001—0,0005 ccm bei Zusatz von 0,1 ccm frischen Meerschweinchenserums instande sein, 1 ccm 5-proz. Hammelblutaufschwemmung nach 2-stünd. Aufenthalt bei 37° vollkommen zu lösen. Das Ambozeptorserum muß klar zentri-fugiert und sofort inaktiviert werden. Das Komplementserum muß am Versuchstage frisch gewonnen sein. Die syphilitischen Organe werden fein zerkleinert, mit der 4-fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung, der 0,5 Proz. Karbolsäure zugesetzt wurde, verrieben und dann 24 Std. im Schüttelapparat extrahiert. Die gröberen Gewebsteile werden entfernt, der Extrakt im Eisschrank aufbewahrt, wo er sich ziemlich lange unverändert erhält. In neuester Zeit werden vielfach alkoholische Gewebsextrakte mit gutem Erfolge verwendet.

Nunmehr erfolgen die nötigen Vorversuche zur „Einstellung des Systems“, für die Rickmann, Wassermann, Neisser und Bruck ausführliche Angaben erteilt haben. Zu dem Hauptversuche wird dann etwa die 2—3mal lösende Dosis des Ambozeptorserums und jene Extrakt-dosis verwendet, welche instande ist, mit einem hochwirksamen, sicherluetischen Serum vollkommene Hemmung der Hämolyse hervorzurufen, ohne jedoch mit normalem Serum eine Reaktion zu geben und ohne selbst bei Verdoppelung der Dosis „Eigenhemmung“ zu zeigen.

Die Brauchbarkeit dieser serodiagnostischen Methode der Syphilis darf wohl als sichergestellt gelten; nach Citron gelang der Nachweis der Antikörper in fast allen Fällen von Syphilis jeglichen Stadiums. Merkwürdigerweise haben sich trotz der anerkannten praktischen Zuverlässigkeit der Reaktion in letzter Zeit Bedenken gegen die Richtigkeit ihrer theoretischen Begründung erhoben und zwar auf Grund der Beobachtung, daß die Reaktion auch bei Anwendung nichtsyphilitischer Organe, wengleich mit graduellen Unterschieden, gelingt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Reaktion nur das Vorhandensein eines Stoffes, vielleicht lipoider Natur, anzeigt, der an sich mit dem Syphiliserreger nichts zu tun hat, der aber leichter aus syphilitischen als aus anderen Organen zu extrahieren ist.

Die Firma Merck bringt ein von Dungen angegebene „Syphilisdiagnostikum für die Sprechstunde“ in den Handel, welches aus einem

alkoholischen Organextrakt, abgewogenem Ambozeptorserum von bekanntem Titer und auf Papier eingetrocknetem Meerschweinchenkomplement besteht. Die Zuverlässigkeit dieses Diagnostikums wird indessen bestritten.

Zur Bestimmung der antitryptischen Kraft des Blutes haben Müller und Jochmann, Marcus, v. Bergmann und Meyer Methoden ausgearbeitet, die als antifermentative Reaktionen zusammenzufassen sind.

Eine Trypsinlösung (0,1 g Trypsin in 5 ccm Glyzerin und 5 ccm destilliertem Wasser) wird mit Blut resp. Serum in folgenden verschiedenen Mengenverhältnissen gemischt: 1 Oese Blut zu $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4 usw. bis zu 10 Oesen Trypsinlösung; von jeder dieser Mischungen 6—8 Oesen getrennt auf eine Löfflersche Serumplatte; auf eine Testplatte einige Oesen Trypsinlösung ohne Blutzusatz. Einstellen der Platten für 5 Std. in den Brutschrank, Beobachtung, ob sich infolge der verdauenden Wirkung des Trypsins auf der Oberfläche Dellen bilden oder ob die Dellenbildung durch den Blutzusatz gehemmt wird.

Bei dem etwas genaueren Verfahren v. Bergmann und Meyer wird die vollkommene Verdauung einer verdünnten Kaseinlösung als Indikator benutzt, die dann beim Ansäuern mit Essigsäure keine Fällung oder Trübung mehr geben darf.

Es hat sich herausgestellt, daß sich bei Karzinomkranken, bei schwer Tuberkulösen, bei Tumorträgern oft eine recht beträchtliche Steigerung der antitryptischen Kraft des Blutes vorfindet. Es scheint dies mit dem gesteigerten Gewebszerfall und möglicherweise mit dem Auftreten von antifermentativ wirkenden Aminosäuren zusammenzuhängen.

Wir wenden uns nunmehr zu dem Verfahren Wrights, das von Strubell auf das Ausführlichste geschildert und zur Bestimmung der opsonischen Kraft des Blutserums empfohlen wird. Hierzu sind erforderlich:

1) Das zu untersuchende Blutserum des Kranken; 2) Serum normaler Individuen zur Kontrolle; 3) gewaschene Blutkörperchen; 4) eine Bakterienemulsion.

Nach Wrights Angaben dient ein gebogenes Glasröhrchen zur Blutentnahme vom Patienten an der Nagelwurzel des Fingers; einige Blutstropfen eines gesunden Individuums läßt man in eine mit 1,5-proz. Lösung von zitronensaurem Natron gefüllte Glas-tube hineinlaufen; die Blutkörperchen werden mit physiologischer, mehrfach erneuter Kochsalzlösung zentrifugiert. Eine Oese von einer 24-stünd. Agarkultur der betreffenden Bakterienemulsion wird mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben und verdünnt. — Handelt es sich um Untersuchungen bei Tuberkulose, so benutze man getrocknete, abgetötete Bazillen von den Höchster Farbwerken. — Vor dem Gebrauch wird die Emulsion geprüft, ob sie eine genügende Zahl von Bazillen enthält.

Gleiche Teile von Serum, Blut und von Bakterienemulsion werden in eine mit einer Gummikappe armierte Kapillare aufgezogen, dazwischen jedesmal etwas Luft nachgesaugt; dann der Inhalt der Kapillare gegen einen Objektträger ausgeblasen, die Flüssigkeit möglichst rasch, aber gut vermischt, wieder angesaugt, das untere Teil des Röhrchens abgeschmolzen, die Kapillare auf 20—30 Min. in den Brutschrank bei 37° eingestellt. Darauf wird das zugeschmolzene Ende des Röhrchens abgeschnitten, ein Tropfen des Inhalts auf einen mit Schmirgelpapier rauh gemachten Objektträger gebracht und ausgestrichen. Der Ausstrich geschieht mittels eines besonders zubereiteten Objektträgers. Am Ende des Ausstrichs liegen der Erfahrung gemäß die meisten Leukozyten. Fixierung des Ausstrichs in gesättigter Sublimatlösung, färben nach Ziehl-Neelsen, mit Karbolthionin, Giemsa-Lösung usw.

Nun wird die phagozytische Zahl durch Auszählung der Bakterien in mindestens 100 Leukozyten festgestellt; es sollen dabei 2—8 Bakterien auf einen Phagozyten kommen. Bei einer kleineren oder bei einer höheren Zahl gestaltet sich die Zählung schwierig oder ungenau. Nun wird die durchschnittlich von einem Leukozyten aufgenommene Bakterienzahl berechnet, wodurch die phagozytische Zahl gewonnen wird; als normale phagozytische Zahl dagegen gilt dasjenige Mittel, das sich bei der Untersuchung von mindestens 3 gesunden Personen ergibt.

Die phagozytische Zahl des betreffenden Pat., geteilt durch die normale phagozytische Zahl, liefert dann den opsonischen Index des Pat., den Wright als bestimmend für sein therapeutisches Handeln ansieht.

Ich muß es mir leider versagen, hier die opsonische Technik ausführlich zu schildern und verweise in erster Linie auf die zahlreichen Arbeiten Strubells, besonders auf die Schilderung in Strubells Monographie: Die Klinik der Opsonine. Jena (Gustav Fischer) 1913, welche ja auch den Ausgangspunkt meiner opsonischen Studien darstellen.

Die Opsoninbestimmung dient ebensowohl zur klinischen Beurteilung des Krankheitszustandes bei Infektionen und zur Kontrolle der therapeutischen Maßnahmen wie zu rein diagnostischen Zwecken. Auf den Wrightschen Theorien lassen sich folgende Regeln aufbauen:

Erhält sich der opsonische Index einer Bakterienspezies gegenüber dauernd normal, so kann eine Infektion mit derselben als ausgeschlossen betrachtet werden; ist der Index dauernd herabgesetzt, so handelt es sich um einen lokalen Prozeß, ist er dauernd erhöht, so ist die Infektion überwunden oder eine künstliche Impfung vorangegangen. Die Immunopsonine sind thermoresistenter als die normalen, deshalb beweist eine große Differenz zwischen den Indices des erhitzten und des nicht erhitzten Serums, daß es sich um normale Opsoninverhältnisse handelt, daß keine Bakterienresorption stattgefunden hat, im gegenteiligen Falle, wenn die Wirksamkeit des Serums durch die Erhitzung nicht wesentlich vermindert wird, Infektion oder Immunisierung anzunehmen ist.

Da die beschriebene Methode äußerst genau befolgt werden muß, so wird ihre Anwendung wahrscheinlich Speziallaboratorien vorbehalten bleiben.

Eine wesentliche Vereinfachung würde es bedeuten, wenn der von einigen Seiten gemachte Vorschlag angenommen würde, nur festzustellen, wie viel Prozent der polymorphkernigen Leukozyten bei der Aufnahme der Bakterien beteiligt sind. Im allgemeinen soll diese Prozentzahl mit dem opsonischen Index parallel gehen und ihre Bestimmung überdies weniger Fehlerquellen unterworfen sein.

Es sei an dieser Stelle auf eine Reihe von Verfahren hingewiesen, die in den theoretischen Erörterungen nicht erwähnt wurden und die bestimmte physikalisch-chemische Begleiterscheinungen der Reaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern betreffen. Weichardt hatte zuerst behauptet, daß mit der Einwirkung dieser beiden Komponenten aufeinander gewöhnlich eine, wenn auch nur minimale, Diffusionsbeschleunigung verbunden sei. Die von dem genannten Forscher empfohlenen Verfahren werden unter dem Namen der Epiphanin-(Oberflächen-)Reaktionen zusammengefaßt.

In neuester Zeit hat Ascoli eine physikalisch-chemische Immunitätsreaktion empfohlen, die auf der Anschauung beruht, daß bei den Reaktionen zwischen Antigen und Antikörpern Produkte entstehen, die zu einer Veränderung der Oberflächenspannung führen. Da sich hierbei eine Zunahme der Tropfenzahl, also eine Abnahme der Tropfengröße beobachten ließ, so benannte Ascoli die Reaktion Meiostragminreaktion (Reaktion der verkleinerten Flüssigkeitstropfen). Ascoli suchte nachzuweisen, daß sich das Phänomen zur Serodiagnose der Syphilis und Tuberkulose, der Echinokokken und Ankylostoma-Krankheit eigne; ein abschließendes Urteil über die Methode kann vorläufig nicht ausgesprochen werden, da noch nicht genügend Nachprüfungen vorliegen und da überdies das Verfahren nur bei einem speziell darauf eingetübten Arbeiter zuverlässige Ergebnisse liefert. — Ascoli und Izar konnten bei 93 von 100 Fällen von malignen Tumoren positive Ausschläge erzielen, während von 103 anderweitigen Erkrankungen nur einer eine Erhöhung der Tropfenzahl ergab.

Zum Schlusse meiner Wiedergabe der in der Serodiagnostik angewandten Verfahren referiere ich die von **Abderhalden** ausgearbeiteten Methoden zur Feststellung von proteolytischen, d. h. Eiweiß bestimmter Organe abbauenden Fermenten. Zur Anstellung von Versuchen genügt die Befolgung der hier kurz zusammengefaßten Vorschriften selbstverständlich nicht, dafür muß auf die von **Abderhalden** in seinem bereits oben erwähnten Buche ausführlich gegebene Methodik verwiesen werden: Abwehrfermente des tierischen Organismus gegen körper-, blutplasma- und zellfremde Stoffe, ihr Nachweis und ihre diagnostische Bedeutung zur Prüfung der Funktion der einzelnen Organe. Berlin (Jul. Springer) 1913.

Vorschriften für die Ausführung eines Dialyserversuches:

Vor jedem Versuche wird, unmittelbar vor der Anstellung des Versuches, das Organ auf völlige Freiheit von auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Stoffen geprüft. Mit dem Vermerk „Organ geprüft“ sollte jedes Versuchsprotokoll beginnen. Man kocht das Organ in der Zerkleinerung, in der man es anzuwenden beabsichtigt, und zwar am besten im Reagenzglas 5 Min. lang. Man filtriert durch ein kleines, gehärtetes Filter und gibt zu 5 ccm Filtrat mindestens 1 ccm der 1-proz. Ninhydrinlösung. Ergibt sich die leiseste Spur einer Violettfärbung, so wird das Substrat nochmals mit einer 5-fachen Menge destillierten Wassers ausgekocht, bis die Probe negativ ausfällt. So viele geeichte Dialysierhülsen, wie gebraucht werden, bringt man in leere, trockene Erlenmeyer-Kölbchen und beschickt die Hülsen mit ca. $\frac{1}{2}$ g des Organs, und zwar nachdem die Stückchen vorher auf Fließpapier scharf abgepreßt sind. In die mit Gewebe beschickte Hülse gibt man 1–1,5 ccm Serum; dann gibt man in eine leere Dialysierhülse ebenfalls 1–1,5 ccm Serum (Kontrollversuch). Die Hülsen werden gründlich mit destilliertem Wasser (nach genauer Vorschrift) abgespült und in mit 20 ccm destilliertem, sterilisiertem Wasser beschickte Erlenmeyer-Kölbchen gesetzt; in die Hülse und auf die Außenflüssigkeit wird eine Menge Toluol gegossen. Die Hülse muß über die innere und die äußere Toluolschicht mindestens 0,5 cm hinausragen. Man verwende Erlenmeyer-Kölbchen mit weitem Hals. — Die Kölbchen werden ca. 16 Std. in den Brutschrank bei 37° eingestellt. Die Hülsen werden aus den nummerierten Erlenmeyer-Kölbchen aus dem Brutschrank bis zur Beendigung des Versuches in leere Erlenmeyer-Kölbchen gestellt. Mit einer verschlossen durch die Toluolschicht durchgeführten Pipette entnimmt man 10 ccm des Dialysates und gibt diese in ein trockenes, weites, absolut reines Reagenzglas. Für jedes Dialysat bedient man sich einer absolut reinen Pipette. Zu jeder Probe fügt man 0,2 ccm der 1-proz. wässrigen Ninhydrinlösung und ferner einen trockenen Siedestab. Eine Probe nach der anderen wird vollständig gleichmäßig 1 Min. gehocht. Nach einer halben Stunde werden die Färbungen geprüft.

Es sind folgende Fälle möglich: Dialysat von Serum und von Serum + Organ negativ. Dann ist kein Abbau erfolgt. Hat man mit Plazenta gearbeitet, so kann man daraufhin verneinen, daß eine Plazenta in lebensfrischem Zustande mit dem betreffenden Organismus in Verbindung steht. Oder es ist Serum allein negativ und Organ + Serum positiv. Die Diagnose lautet auf eine Plazenta, die in lebensfrischem Zustande mit dem mütterlichen Organismus in Verbindung steht.

Die früher angewendete Biuretprobe ist ausschließlich deshalb gegenüber der Ninhydrinprobe zurückgestellt worden, weil die meisten Untersucher schwache Biuretreaktionen nicht mit Sicherheit erkennen können. Wer das indessen vermag, sollte nach **Abderhalden** unter allen Umständen auch diese Probe beibehalten.

Das Prinzip der ebenfalls von **Abderhalden** ausgearbeiteten optischen Methode ist: Veränderungen optisch aktiver Substrate durch Feststellung von Drehungsänderungen mittels eines Polarisationsapparates nachzuweisen. Während bei dem Dialysierverfahren der hydrolytische Abbau eines Kolloids in ein diffundierbares Kristalloid festgestellt wird, wird bei der optischen Methode aus rein technischen Gründen nicht vom Eiweiß, sondern von aus diesem dargestellten Pepton aus-

gegangen. Eiweiß würde Fällungen erzeugen, so daß feine Drehungsänderungen nur schwer zu verfolgen wären.

Ausführung der optischen Methode:

Man gibt in ein Reagenzglas 1 ccm absolut hämoglobinfreies Serum; dasselbe muß steril sein und darf keine Formelemente enthalten; dazu wird 1 ccm einer 5- bis 10-proz. Peptonlösung aus dem betreffenden Organe hinzugefügt. (Ueber die Darstellung von Peptonen zur Anwendung bei der optischen Methode siehe Abderhaldens Spezialvorschriften, wie oben angegeben.) Man kann auch aus Bazillen oder auch aus bestimmten Proteinen Peptone bereiten. Man mischt Serum und Peptonlösung und gießt das Gemisch in ein 2 ccm fassendes Polarisationsrohr und bestimmt das Drehungsvermögen des Gemisches, nachdem es 37° angenommen hat. Man verfolgt dann das Drehungsvermögen in bestimmten Zeitabschnitten. Bleibt eine Änderung des Drehungsvermögens aus, dann nehmen wir an, daß ein Abbau nicht stattgefunden hat. Finden wir nach einiger Zeit eine andere Drehung als am Anfang des Versuches, dann dürfen wir auf einen fermentativen Abbau schließen.

Was Resultate und Methode anbelangt, siehe das Kapitel, das die betreffende Technik angeht bei den von mir gebrauchten Methoden.

Die Immunitätsreaktionen, die bei Puerperalsepsis Anwendung gefunden haben.

Nachdem ich mich in dem 1. Kapitel meiner Habilitationsschrift mit der Theorie der Immunität und mit den Methoden beschäftigt habe, welche bei dem Studium der Immunitätslehre Anwendung gefunden haben, wende ich mich nunmehr zu den spezielleren Ausführungen, und zwar zunächst zu den in der Literatur über das von mir bearbeitete Thema niedergelegten Beobachtungen. Vorauszuschicken ist, daß bis jetzt bei Puerperalfieber noch relativ wenig mit Immunitätsreaktionen gearbeitet worden ist, und wir werden sehen, daß dies zum großen Teil auf die besonders großen Schwierigkeiten, die in den biologischen Eigenschaften der hierbei in Betracht kommenden Keime und besonders des *Streptococcus* liegen, zurückzuführen ist. Es ist wohl möglich, daß ich die eine oder die andere Arbeit zu diesem Thema übersehen habe, immerhin konnte ich nach möglichst sorgfältiger Durchsicht der Literatur nur eine beschränkte Anzahl von Veröffentlichungen zusammenstellen.

Die betreffenden Arbeiten, die die Immunitätsreaktionen bei Puerperalsepsis berücksichtigen, beschäftigen sich mit dem phagozytären, opsonischen und antitryptischen Index des Blutes, stellen die Frage nach den darin enthaltenen Bakteriolytinen und untersuchen die Ergebnisse der Vakzino- und der Chemotherapie. Manche Autoren haben auch eine Kombination der verschiedenen Untersuchungsmethoden benutzt, indem sie den antitryptischen und den leukozytären oder den leukozytären und den opsonischen Index festsetzten. Nicht aufführen will ich die zahlreichen Publikationen, die nur klinisch und bakteriologisch ohne Ausführung von Immunitätsreaktionen die Puerperalerkrankungen behandeln.

Ueber die antitryptische Kraft des Serums bei Puerperalfieber fand Sava^ré an der Hand von 19 Fällen, daß der Index unabhängig von der Schwere der Infektion in konstanter Weise ansteigt, und daß außerdem das Ansteigen auch nicht proportional der Heftigkeit der Infektion ist.

Thaler dagegen kommt nach seinen Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß der antitryptische Index prognostisch verwertbar sei. Er hält eine erhebliche und konstante Erhöhung des antitryptischen Index für prognostisch ungünstig, und umgekehrt. Jochmann wiederum erklärt die Antitrypsinbestimmung für diagnostische und prognostische Zwecke bedeutungslos. Landois zieht aus seinen Untersuchungen keinen

derartigen Schluß. Er begnügt sich mit der Feststellung, daß die Erhöhung des antitryptischen Index eine Folge starken Leukozytenzerfalles sei, wobei leukozytäres Ferment frei wird. Zlatogorow und Scherewen stellt sowohl den antitryptischen wie den leukozytären Index bei Puerperalerkrankungen fest. Er findet die theoretische Seite der Frage über die Bildungsstätte des Antitrypsins und die klinische Bedeutung der antitryptischen Reaktion in bezug auf die Prognose noch wenig aufgeklärt. Es herrschen in der diesbezüglichen Literatur, was die prognostische Bedeutung dieser Reaktion anbelangt, bis zum heutigen Tage noch große Meinungsverschiedenheiten. Die Autoren haben sich die Aufgabe gestellt, mittels systematischer Blutuntersuchungen während des Krankheitsverlaufes die Schwankungen des antitryptischen Koeffizienten bei verschiedenen Infektionen und in verschiedenen Perioden, gleichzeitig damit auch die morphologische Formel des Blutes zu bestimmen. Um die Abhängigkeit der antitryptischen Kraft des Blutes von der Leukozytose und dem Allgemeinbefinden des Organismus verfolgen zu können, wurden Versuche an Tieren angestellt, bei denen verschiedene Krankheiten hervorgerufen und die Leukozytose künstlich gesteigert wurde. Als Versuchstier wurde das Kaninchen benutzt. Unter 153 untersuchten Fällen waren 25 von Pyämie und Septikämie. Das Resultat war folgendes: Der antitryptische Koeffizient erwies sich bei den ersten Untersuchungen in sämtlichen Fällen gesteigert; darauf aber fanden die Autoren verschiedene Schwankungen desselben in Abhängigkeit von der Krankheitsperiode. Siegte der Organismus im Kampf mit dem Krankheitsprozeß, so sank der Koeffizient allmählich und ständig ab und erreichte die Norm in der Rekonvaleszenzperiode. In anderen Fällen stieg er jedoch ziemlich schnell an und erreichte hohe Ziffern beim letalen Ausgang. Was die leukozytäre Formel anlangt, so fanden die Autoren das vollkommene Fehlen eines Parallelismus zwischen den Schwankungen der Leukozytenzahl und dem antitryptischen Koeffizienten. Das Sinken derselben und die Steigerung der Leukozytenformel hielten die Autoren für ein gutes prognostisches Zeichen (alle Kranken genasen). Die Anhäufung des antitryptischen Fermentes geht vor sich, unabhängig von der Stärke und dem Zeitpunkt der Leukozytose; daraus schließen die Autoren, daß die Anhäufung des antitryptischen Fermentes in Abhängigkeit ausschließlich von dem Grade des Zerfalles der Zellen steht, welche das Antigen befreien. Die Autoren heben besonders die große Bedeutung des antitryptischen Koeffizienten in bezug auf die Prognose hervor. Vom biologischen Standpunkt kann aber die antitryptische Reaktion für eine bestimmte Krankheit nicht alopathonomisch angesehen werden, weshalb man aus der Verstärkung dieser Reaktion keine bestimmten diagnostischen Schlüsse ziehen kann. Bei gesunden Individuen fand Waelli nur ganz ausnahmsweise Zunahme des Antitrypsins; bei Infektionskrankheiten stellte Autor Vermehrung fest.

M. A. Scheremezinskaja hat bei septischen Erkrankungen Erhöhung des antitryptischen Index festgestellt. Autor legt dem antitryptischen Index in prognostischer Hinsicht große Bedeutung bei, betont aber, daß diese Reaktion nicht pathognomonisch für eine bestimmte Krankheit gilt; sie erlaubt daher keine diagnostischen Schlüsse.

Die einzige Arbeit, die sich mit der Anwendung der Intrakutanreaktion bei Puerperalsepsis beschäftigt, ist die von Köhler. Autor zieht das Fazit seiner Untersuchungen dahin, daß durch intrakutane Einverleibung von Streptokokkenantigenen sich bei Sepsis puerperalis, durch Streptokokkeninfektion verursacht, eine Hautreaktion erzielen läßt, die in diagnostischer und prognostischer Beziehung verwertet werden kann. Die Reaktion war auf solche Fälle beschränkt, bei denen der Streptococcus im Blute nachgewiesen werden konnte. Indessen fehlte die Reaktion bei prognostisch ungünstigen, zum Tode führenden Fällen. In einigen Fällen traten Intensitätsunterschiede auf, die von prognostischer Bedeutung sind. Der Verfasser sah nämlich, daß im Einklang mit den bei Tuberkulose erworbenen Erfahrungen die Reaktion bei schweren Fällen schwächer ausfiel als bei leichten, und daß sie in den ungünstigsten, zum Tode führenden Fällen, trotz positiven Streptokokkenbefundes im Blute, überhaupt nicht auftrat. Die Erklärung ist ebenso wie für den negativen Ausfall der Tuberkulinreaktion bei desolaten Fällen im Abfall des Antikörpertiters zu suchen.

Ich wende mich nun zu den Arbeiten über die Vakzinotherapie bei Puerperalinfektionen. Besonders auf diesem Gebiete sind im Vergleich zu den zahlreichen klinischen Arbeiten nur wenige erschienen, die sich mit den in vitro sichtbaren Immunitätsreaktionen beschäftigen. Auch Munk in seinem Sammelreferat über Opsonine und Vakzinotherapie geht auf diesen Punkt nicht näher ein. Ueber Anwendung der opsonischen Immunitätsreaktion bei der Vakzinotherapie habe ich nur eine Arbeit gefunden, und zwar die von A. di Sant-Agnese. Die Vakzinotherapie wurde in Italien nur von A. di Sant-Agnese probiert. Autor hat diese Methode bei 5 Fällen von schwerer Puerperalsepsis angewendet; von 3 mit Autovakzin behandelten Fällen genasen 2, einer, in welchem die Therapie erst einige Tage vor dem Tode begann, war nicht mehr zu retten. Der opsonische Index war hier 0,58; in den anderen 2 Fällen

ergab die bakteriologische Untersuchung des Blutes ein negatives Resultat. In dem einen, wo der Index für Streptococcus niedrig war, spritzte er exogenes Vakzin ein, mit gutem Erfolg; in dem anderen, wo der Index für den Streptococcus und für den Staphylococcus aureus und albus über oder ungefähr der Norm entsprechend war, wurde kein Resultat erzielt und die Betreffende starb an Pyämie. Autor will nicht uneingeschränkt behaupten, daß die guten Erfolge allein auf die Vakzine-therapie zurückzuführen seien; er glaubt aber, daß nach dieser Richtung hin weitere Versuche am Platze sind.

Ich komme jetzt zu denjenigen Autoren, welche das Puerperalfieber durch pharmakodynamische Mittel zu beeinflussen suchten und die Wirkung der verschiedenen chemischen Präparate durch Anstellung von Immunitätsreaktionen prüften. Ich füge hier ein, daß trotz der häufigen und so verschiedenartigen Anwendung von Kollargol, trotz der zahlreichen Berichte über die klinischen Erfolge und Mißerfolge, Veröffentlichungen über das Verhalten der Abwehrkräfte des Organismus bei solcher Behandlung meines Wissens nur spärlich vorhanden sind, abgesehen von kurzen Notizen bei wenigen Autoren.

Bonnaire und Jeannin haben während der Kollargolbehandlung Untersuchungen über die Veränderungen der Leukozytenzahl angestellt, die zu dem Ergebnis geführt haben, daß im Anschluß an die Injektion eine starke Polynukleose auftritt, die in den günstig verlaufenden Fällen sehr ausgesprochen, schwächer in den anderen ist. Die mononukleären Zellen vermindern sich parallel zum Anstieg der polynukleären. Nach Cohn ist die Hyperleukozytose, die dabei entsteht, ein wichtiger Faktor im Kampfe des Organismus gegen die Mikroben, obwohl von manchen Autoren auch eine direkte antitryptische Wirkung des Mittels angenommen wird. Ilkewitsch wandte bei 23 Kranken intravenöse Infusionen von Argentum nitric. in Lösungen von 1:8000, 1:10000, 1:20000, in Mengen von 500 ccm an, und intravenöse Injektionen von Aqua dest. bei 60 Kranken. Der Allgemeinzustand der Kranken besserte sich zusehends nach der Injektion. Der günstige therapeutische Effekt der Lösungen wird vom Autor nicht den minimalen Dosen des Argent. nitric., sondern dem destillierten Wasser zugeschrieben. Was das Blutbild anbelangt, meint der Autor, daß die Zunahme der roten Blutkörperchen ein gutes prognostisches Zeichen darstellt, wohingegen ihre Abnahme und die gleichzeitige Zunahme der weißen prognostisch eine ungünstige Bedeutung hat. Daß das Serum der Patientinnen nach der Infusion kein Hämoglobin enthielt, spricht gegen die hämolytische Wirkung des wässerigen Argentum nitric. und des destillierten Wassers.

In Uebereinstimmung mit französischen Autoren (Pastia, Bossan und Marcelet) finden Werner und v. Zubrzycki, daß Kolloidmetalle, und zwar in ihren Versuchen das Elektrargol (Clin.), die opsonische Kraft des Serums gegen Bakterien zu beeinflussen vermögen. Sowohl Tierversuche (5 Kaninchen) als auch Beobachtungen an intravenös behandelten Kranken (2) und Gesunden (2 Schwangere und 2 Wöchnerinnen), wie auch Versuche im Reagenzglas bei Zusatz von Elektrargol zeigen, daß dieses die opsonische Kraft des Serums gegen Staphylokokken in hohem Grade vermehrt, und so imstande ist, den Organismus im Kampfe gegen invasive Mikroorganismen zu unterstützen. Die Autoren fügten hinzu, daß nach den Untersuchungen von Henri, Charrin, Monier-Vinard, Cernovade die Kolloidmetalle bakterizide Eigenschaften besitzen.

C. H. Hoffmann, der experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Kollargols auf Leukozyten und Opsonine angestellt hat, kommt zu dem Schluß, daß Kollargol, intravenös appliziert, beim Kaninchen eine deutliche Leukozytose hervorruft, daß es aber auf den opsonischen Index nicht wirkt.

Intravenöse Sublimatgaben wurden mehrfach in der Therapie bei Infektionskrankheiten angewendet und auch einige Male Immunitätsreaktionen angeschlossen. Die einzigen Arbeiten indessen, die sich auf Puerperalerkrankungen beziehen, sind diejenigen von D'Erchia, Polizzotti, Santi und Schmidlechner. D'Erchia hat in seiner umfangreichen Monographie über die Therapie des Puerperalfiebers 2 Fälle erwähnt (Nr. 19 und 20 seiner Kasuistik), die er unter gleichzeitiger Berücksichtigung des opsonischen Index (Wright'sche Methode) mit Sublimatinjektionen behandelt. In beiden Fällen wurde, wenn auch im geringen Grade, ein Anstieg der opsonischen Kraft wahrgenommen. Daraus schließt Autor, daß das Sublimat als „Opsonogen“ ganz vorzüglich wirkt. Diese Eigenschaft besitzen die Sera nicht, daher die Mißerfolge mit der Serotherapie. Was die Zusammensetzung des Blutes anbelangt, hat Autor durch die in Rede stehende Behandlung in 3 Fällen das Fehlen irgendwelcher quantitativen Veränderungen der roten und weißen Blutkörperchen und des Hämoglobingehalts, abgesehen von einem Falle, in welchem eine geringe Vermehrung der weißen Blutkörperchen stattfand, konstatiert.

Polizzotti wandte bei 4 Fällen von Puerperalfieber, bei denen der *Streptococcus longus haemolyticus* aus dem Sekret des Uterus gezüchtet wurde, so daß sie deswegen und wegen schweren klinischen Erscheinungen zu den prognostisch ungünstigen gerechnet werden müssen, nachdem er sich vorher von dem normalen Nieren- und Darmbefund und von der nahezu normalen Blutbeschaffenheit der Patientinnen überzeugt hatte, endovenöse Sublimatinjektionen an. Die Wirkung der Injektionen (4—6 von $\frac{1}{5}$ —1 cg) prüfte er durch Leukozytenzählung und durch Feststellung des opsonischen Index nach Wright und nach Semon. In allen 4 Fällen konnte er einen Leukozytenanstieg und eine Erhöhung des opsonischen Index konstatieren, im 2. Falle Leukozytenvermehrung von 9000 auf 13000 und eine Erhöhung des opsonischen Index von 0,88 auf 1,21. Im 4. Falle, der durch Lungen- und Kehlkopf-tuberkulose kompliziert war, stieg die Zahl der Leukozyten von 10000 auf 12200; der opsonische Index von 0,85 auf 1,12. Erythrozytenzahl und Hämoglobingehalt blieben in allen Fällen nahezu unbeeinflusst. Nieren- oder Darmstörungen, Stomatitis usw. traten nicht auf.

Nach diesen Ergebnissen erscheint dem Verf. das Sublimat in endovenöser Applikation als ein gutes Opsonogen. Seine Wirkung wird keine direkte bakterizide sein; diese erscheint im Gegenteil bei der starken Verdünnung ausgeschlossen; sondern sie wird in einer Hemmung der Bakterienentwicklung, Verminderung der Virulenz und einer Verzögerung ihres Stoffwechsels, eventuell in einer Neutralisierung der Stoffwechselprodukte bestehen.

C. Schmidlechner prüfte bei der Sublimatbehandlung bei Puerperalsepsis systematisch und täglich das gegenseitige Verhältnis der geformten Bestandteile des Blutes, das neutrophile Blutbild, die Arneht-Wolf-Faktoren, die Änderungen der absoluten und relativen Werte, und hat aus den von ihm beobachteten Tatsachen die Folgerung abgeleitet, daß die Sublimattherapie bei schwerer Erkrankung die Mortalitätsziffer nicht bessert, auf den Krankheitsverlauf nicht günstig wirkt und weder die Heilungsdauer abkürzt noch das Fieber mildert.

Die häufig gemachten Beobachtungen, daß die Lokalisierung der Infektion durch Abszeßbildung einen günstigen Einfluß auf den Verlauf der Krankheit ausübt, veranlaßte Santi, der über 18 Fälle von Puerperalsepsis berichtet, der Ursache und Wirkung dieser Erscheinung durch Tierexperimente näher zu treten. Er versuchte festzustellen, ob durch lokalisierte Infektion die bakteriziden Kräfte des Blutes erhöht werden. Er infizierte 2 Hunde mit *Staphylococcus aureus* durch Injektion in die V. jugularis. Die Anwesenheit des *Staphylococcus* im Blute wurde 2—3 Tage später festgestellt; dem einen Hunde wurde 24 Std. nach der Injektion 1 ccm Terpentinöl auf der inneren Schenkelseite eingespritzt, in Abständen von 24 Std. wurde der phagozytäre Index festgestellt. 4 Hunden wurden *Staphylokokkensuspensionen* in die V. jugularis injiziert, deren Virulenz durch Tierpassage erhöht worden war; davon erhielten 2 Tiere unmittelbar nach der Infektion eine subkutane Terpentininjektion. 2 Tieren wurde *Staphylokokkenemulsion* in die V. tibialis, dem einen unmittelbar darauf Terpentin wie in Gruppe 2 injiziert. In allen diesen Fällen entstand an der Körperstelle, der das Terpentin einverleibt war, ein lokaler Abszeß, und jedesmal zeigte das Tier gegenüber dem Kontrolltier einen höheren phagozytären Index; die Differenz betrug im Höchsthalle 1,5, steigerte sich aber bei Behandlung mit Hühnerseptikämiebazillen (2 Gruppen) bei dem einen Tier bis auf 2 (Terpentin behandeltes Tier 4, 6, Kontrolltier 2, 6). Aus diesen Ergebnissen zieht der Verf. den Schluß, daß der phagozytäre Index der Hundeleukozyten bei Infektion und gleichzeitigem lokalem Abszeß höher ist als bei allgemeinen Infektionen ohne Lokalisierung. Um dem Einwand zu begegnen, daß die günstige Wirkung ein Oxydationseffekt des Terpentins und nicht durch die Abszeßbildung hervorgerufen sei, rief Verf. bei anderen mit *Staphylokokken* vorbehandelten Hunden durch Injektion von Nukleoprotein vom Kalbshoden lokale Infektion hervor. Der phagozytäre Index war auch bei diesem Tier gegenüber dem Kontrolltier erhöht.

Durch dieses und andere sehr interessante Experimente und Kontrolluntersuchungen kommt Santi zu dem Schluß, daß sich die Wirkung der lokalisierten Abszesse bei Infektionen 1) als eine Erhöhung der phagozytären Kraft der Leukozyten, 2) eine Entwicklungser schwerung für die im Blute kreisenden Bakterien erklären läßt. Beides ist auf zirkulierendes Abszeßmaterial zurückzuführen. 3) werden wahrscheinlich Toxine sowohl wie Keime im Abszeßherd selbst fixiert und transformiert.

Ueber die Resultate mit der Rivaltaschen Serumreaktion bei puerperalen Erkrankungen schreiben Bruni und Pestalozza. Wie erinnerlich, hat Rivalta 2 präzipitierende Substanzen im Blutserum und Blutplasma beobachtet. Bruni beschränkt sich in seiner Veröffentlichung auf die Zahlenbefunde der zuerst präzipitierenden Substanzen, da er seine Beobachtungen über die zweite vorläufig als unsicher und unzureichend bezeichnen müsse. Den Untersuchungen an Kranken gehen solche

an gesunden Frauen vorauf; bei ihnen fand er in Uebereinstimmung mit der 2. Publikation von Rivalta einen Reaktionsindex von 4—600.

An 20 Fällen stellte Bruni 50 Proben an, aus deren Vergleich der semiologische und vor allem aber der prognostische Wert der Rivaltaschen Reaktion für die puerperalen Infektionen zu erkennen ist. Die Reaktion ergab in allen Fällen, in denen die Kranken der Infektion unterlagen, niedrige Werte, und umgekehrt höhere Zahlen, wenn die Krankheit überwunden wurde. Die von Bruni gefundenen Differenzen bewegen sich zwischen 200 und 700, während Rivalta und andere Untersucher bei anderen Infektionskrankheiten 1:100 bis 1:1500 fanden, woraus Bruni folgert, daß bei Puerperalinfektionen der Index weniger großen Schwankungen unterworfen sei. Bei einer Reaktion von 1:400 muß eine äußerst vorsichtige Prognose gestellt werden, denn bei diesem Werte sah der Autor sowohl guten wie auch infausten Ausgang. Bei höheren Werten kann nach den Erfahrungen von Bruni die Prognose als günstig gelten. Rivalta selbst stellte die nach ihm benannte Reaktion nur in einem sehr schweren Falle von Puerperalfieber an. Bei der 1. Untersuchung während eines Schüttelfrostes fand er einen Index von 1:700; 5 Tage später von 1:500 und einen Wiederanstieg, 1:700, des Index bei gleichzeitigen Symptomen einer parametranen Eiterung. Bei ausgedehnten Eiterungen ergab ihm die Essigsäureserumreaktion immer sehr hohe Werte, oft über 1000; außerdem machte er die merkwürdige Beobachtung, daß in den wenigen Geburtsfällen, die er verfolgen konnte, der Index nach der Geburt höher wurde.

Einige Autoren, wie Montanelli, G. H. Weaver und Tuncliff, haben bei Puerperalkranken nach Gaben von Antistreptokokkenserum den opsonischen Index untersucht und Raspini die Veränderungen in den korpuskulären Bestandteilen des Blutes beobachtet.

Montanelli meint, daß das Antistreptokokkenserum, zur richtigen Zeit angewendet, dem Organismus neue Abwehrkräfte verleiht oder latent vorhandene anregen kann. Welche eigentlich diese Abwehrkräfte seien, bleibt uns vorläufig unbekannt. Nach dieser Richtung hin erlauben die von ihm ausgeführten Untersuchungen über den opsonischen Index noch kein Urteil über die bakterizide Kraft des Antistreptokokkenserums. Seine Resultate waren: Unbedeutender Anstieg des opsonischen Index in 2 gut verlaufenden Fällen (Nr. 3 und 5); deutlicher Anstieg in einem einzigen ad exitus gekommenen Fall (Nr. 4); Abstieg in den zwei anderen. Verf. bedauert, diesen Untersuchungen keinen absoluten Wert beilegen zu dürfen, indem die Unmöglichkeit (?) niemals auszuschließen ist, daß der beim Versuche angewendete Streptokokkenstamm, der von den Kranken gezüchtet ist, biologisch von allen denjenigen differiert, die zur Immunisierung der Pferde und zur Serumbereitung dienen.

Tavel hat bereits festgestellt, daß die opsonische Wirkung nur bei spezifischem Serum gegenüber homologen Bakterien zunimmt, daß übrigens der Streptococcus von verschiedenen in derselben Klinik untergebrachten Kranken biologisch different ist, hat auch Montanelli selbst durch die Reaktion von Bordet und Gengou beweisen können. Weiter konnte ich der Arbeit von Montanelli entnehmen, daß Raspini, der in der Florentiner Frauenklinik Gelegenheit gehabt hat, bei der Serotherapiebehandlung Untersuchungen über die leukozytäre Formel anzustellen, eine deutliche und konstante Leukozytose demonstrieren konnte. Diese Leukozytose beginnt im Durchschnitt 1 Std. nach der Injektion. Vermehrt sind besonders die polynukleären Neutrophilen, nur selten findet man eine Abnahme derselben und an ihrer Stelle pflügen die Mononukleären eine Vermehrung zu erfahren. Die basophilen, die eosinophilen und die Uebergangsformen bleiben unverändert.

Aus den einschlägigen Beobachtungen von G. H. Weaver und Tuncliff geht hervor, in Uebereinstimmung mit den am Tier gewonnenen Erfahrungen, daß auch Menschen im Anschluß an die Injektion von Antistreptokokkenserum eine beträchtliche Steigerung des opsonischen Index und der Leukozytenaktivität auftritt. Sämtliche mit Serum behandelten Fälle von Erysipel gingen in Heilung über. Experimentelle Untersuchungen am Kaninchen zeigten, daß die Steigerung des opsonischen Index im Blute am schnellsten bei intravenöser Seruminjektion erfolgt, weniger rasch und auch weniger intensiv bei subkutaner oder bei intramuskulärer Einspritzung.

Eventuell wäre es möglich, bessere therapeutische Effekte zu erzielen, wenn es gelänge, die Antikörper zu konzentrieren, d. h. größere Mengen mit einem geringeren Volumen einzuspritzen.

Frankl und Thaler kritisieren die Methoden, die bisher zur Erkenntnis der durch Streptokokkeninfektion hervorgerufenen Reaktionsvorgänge des Organismus angewendet wurden. Die Resultate erscheinen ihnen gegenüber den Erkrankungen, die durch andere Bakterienformen verursacht werden, äußerst mangelhaft. Da Zange-meister festgestellt hatte, daß Schutzwirkungen, die an Tieren zu erzielen sind, nicht gleichbedeutend seien mit dem Vorhandensein von Immunkörpern, die dem Menschen

Schutz verleihen können, so verzichteten sie auf Tierexperimente und studierten die verschiedenen Reaktionen in vitro.

Die Präzipitinreaktion schalteten Frankl und Thaler von vornherein aus und wendeten zunächst die Bordet-Gengousche Komplementbindungsmethode an. Von anderen Autoren hatte Besredka nur in dem aus dem Pasteurschen Institut stammenden Serum einen spezifischen komplementbindenden Körper gefunden, Ciuca mit Antistreptokokkenserum, das ihm aus Budapest geliefert wurde, dagegen nicht mit den Pariser Stämmen. Castex fand in 21 Fällen die Anwesenheit spezifischer Streptokokkenantikörper. Schleichner und Foix und Mallein hatten bei Verwendung des Scharlach-Streptococcus als Antigen mit Scharlachserum beinahe in allen Fällen komplette Bindung, nicht aber mit dem Streptococcus des Erysipel und des Puerperalfiebers.

Frankl und Thaler stellten die Bindungsreaktion mit den Streptokokken eines schweren Puerperalfieberfalles sowohl mit dem Serum desselben Falles sowie mit einer Reihe von Normalseris an. Die Ergebnisse dieser einen Versuchsreihe waren für die Autoren bestimmend, die Methode fallen zu lassen, da Rekonvaleszentenserum und Normalserum in gleichem Maße Bindung zeigten. Die Autoren bekennen sich zu der Anschauung, daß die Bordetsche Reaktion auch bei positivem Ausfall nicht den spezifischen Antikörper für Streptokokken nachweist, sondern nur ein aspezifisches Reagin anzeigt. Die Angaben anderer Autoren, van de Velde, Aronson, Meyer, Moser und Pirquet, Neufeld, Fischer usw., über die Agglutination der Streptokokken lauten einander vollkommen widersprechend. van de Velde fand zuerst, daß das Serum eines gegen Streptokokken immunisierten Tieres nur den zur Immunisierung gebrauchten Stamm agglutiniert. Zu den eigenen Agglutinationsprüfungen bedienten sich Frankl und Thaler der von Sagić empfohlenen Burrischen Tuschemethode: sie hatten ausnahmslos negative Resultate.

Zur Heranziehung der Wrightschen Methode konnten sich Frankl und Thaler nicht entschließen, trotzdem sie die klinische Bedeutung der Immunopsonine nicht verkennen, da ihnen die Methode gerade von dem Streptococcus einwandfreie Resultate nicht zu gewährleisten schien. Die Kettenform erschwert ihrer Meinung nach die Beurteilung der Phagozytose und macht eine fehlerlose Zählung der phagozytierten Streptokokken gänzlich unmöglich. Die optische Methode von Abderhalden bewährte sich den Autoren für ihre Zwecke nicht, ebenso negativ waren die Resultate, die sie mit der von Ascoli empfohlenen Meistagminreaktion erhielten.

Trotz der bisherigen wenig ermunternden Versuche, bakteriolytische Substanzen im Serum der Patientinnen mit Puerperalfieber aufzufinden, schienen den Autoren gerade diese Bemühungen von besonderem Interesse, und auch unter Anwendung von frischem Patientenserum anstatt wie bisher mit mehr oder minder alten Immunseris, nicht völlig aussichtslos.

Denys und Leclef sprachen sich bezüglich der Immunkörperwirkung bei Streptomykosen für die Annahme einer Bakteriolyse, Neufeld und Rimpau, Heynemann und Barth, v. Lingelsheim, Aronson und Schottmüller indessen dagegen aus.

Frankl und Thaler untersuchten nun das Serum von 9 puerperalen Streptomykosefällen auf Bakteriolyse, indem sie 1 Oese einer 24-stünd. Bouillonkultur der Streptokokken auf 1 resp. 2 ccm Patientenserum einwirken ließen und dann auf die Blutagarplatte gossen. Außerdem wurde stets eine Reihe von Kontrollplatten angelegt. Im übrigen wurde die Hemmungskraft einer großen Zahl von Normalseris auf verschiedene Streptokokkenstämme geprüft, wobei in der weitaus überwiegenden Mehrheit der Fälle keine Wachstumshemmung zu konstatieren war. Die Autoren folgern aus ihren bisherigen Untersuchungen, daß im Serum mit Streptokokken infizierter puerperae Stoffe nachweisbar sind, welche die Mikroorganismen in vitro abtöten, und daß es sich dabei um echte Bakteriolyse handelt. Daß dieselben nicht stets in den käuflichen Immunseris vorhanden sind, spricht nach Frankl und Thaler um so weniger gegen deren Existenz im Serum der Kranken, als die Immunsera wohl niemals aus ganz frischem Serum hergestellt werden, was nach ihrer Meinung für die Wirksamkeit notwendig ist. Aus den Ergebnisdifferenzen bei schwereren und bei leichteren Fällen prognostische Schlüsse zu ziehen, halten die Autoren für unstatthaft 1) wegen der geringen Zahl ihrer Untersuchungen, und 2) wegen der negativen Phase der Bakteriolyse, in der in einzelnen Fällen die Blutentnahme vorgenommen sein kann.

Wir wenden uns zuletzt zu denjenigen Autoren, die sich über die Anwendung und über die diagnostische Verwertung des opsonischen Index bei Puerperalerkrankungen äußern. Allgemeine Bemerkungen über die Wertung des opsonischen Index finden wir in dem Sammelreferat von Munk. Während Wolf und Reiter, Fournet und Schreuker und Gaethgens dem opsonischen Index einen relativen diagnostischen Wert zusprechen, so besitzt für Capelli weder die opsonische noch die phagozytäre Methode diagnostischen oder prognostischen Wert, und auch Coenen hält die op-

sonische Methode zum mindesten vorläufig noch nicht für die klinische Diagnostik verwendbar.

Von dem Gedanken ausgehend, daß sich die klinische Verwertbarkeit des opsonischen Index nur dann verteidigen läßt, wenn die Untersuchung einer größeren Reihe normaler Sera ein gleiches Verhalten des Index anzeigt, untersuchten Heynemann und Barth zunächst eine größere Anzahl (35) normaler Wöchnerinnen und auch einzelne Schwangere. 29 Sera hielten sich bei den Untersuchungen mit hämolytischen Streptokokken innerhalb der normalen Indexschwankungen (0,8—1,2); 6 Sera zeigten Abweichungen von der Norm. Bei den Untersuchungen mit Staphylokokken fanden Heynemann und Barth noch mehr Abweichungen. Von 20 Untersuchten bewegten sich nur 13 Resultate in den von Wright als normal angegebenen Grenzen; bei den anderen 7 schwankte der Index zwischen 0,78—2,9. Immerhin finden die Verff. die Abweichungen von der Norm bei ihren Resultaten nicht sehr beträchtlich, und es erscheint ihnen naheliegend, die als normal zu bezeichnenden Schwankungen des opsonischen Index von 0,8—1,2 auf 0,7—1,3 auszudehnen. Diese Erweiterung vorausgesetzt, hätten die Autoren für Staphylokokken bis auf 3 nur Resultate innerhalb der bezeichneten Grenze zu verzeichnen. Gerade für die Staphylokokken erscheint eine Erweiterung der Grenzen um so angebrachter, als bei den meisten Menschen mit vorausgegangenen überwundenen Staphylokokkeninfektionen gerechnet werden muß.

Außerdem nahmen Heynemann und Barth bei 40 fiebernden, infizierten Patientinnen Opsoninbestimmungen vor, und zwar bestimmten sie in fast allen Fällen den Index nicht nur für Streptokokken, sondern auch für den *Staph. aureus*. Bei schweren klinischen Fällen mit Endometritis streptococcica (3) zeigten sich deutliche Ausschläge des opsonischen Index; bei der gleichen Erkrankung und weniger schweren klinischen Erscheinungen (14 Fälle) erhielten die Autoren keine Ausschläge. In der 3. Gruppe der leicht verlaufenden Fälle (3) befinden sich ein Versager mit Indices von 0,9 und 0,64.

Unter 16 Infektionen mit Streptokokkennachweis im Blut, Peritoneal- oder Abszeß-eiter, lag bei 7 Fällen der Index innerhalb der Grenzen von 0,8—1,2, bei 5 zwischen 0,7—1,3. Ein normaler Index gegenüber Streptokokken gestattet daher nie, das Bestehen einer solchen Infektion auszuschließen. Ein von der Norm abweichender Streptokokkenopsoningehalt bei einer fiebernden Wöchnerin spricht für das Vorliegen einer Streptokokkeninfektion, ist aber nicht beweisend. Wiederholte Bestimmungen erhöhen die Sicherheit des Resultates, vermögen aber auch nicht Fehldiagnosen auszuschließen.

Für die Prognose vermag die opsonische Bestimmung nach Anschauung von Heynemann und Barth keinen Anhalt zu geben, und für die Therapie erscheint ihnen ein Vorteil aus Wrights Lehren nur bei länger dauernden lokalen Puerperalinfektionen (Parametritis) zu erwarten. Alle Befunde, die die Autoren bei Streptokokkeninfektionen erhoben haben, fanden sich in erhöhtem Maße bei den Infektionen mit Staphylokokken.

Rolly fand bei Nachprüfung der Wrightschen Methode bei Infektionskrankheiten große Schwankungen, Fehlerquellen und Störungen durch Spontanphagozytose.

Auf Grund von Untersuchungen an 16 verschiedenartigen Fällen, darunter 3 Puerperalinfektionen, deren Opsoningehalt stets gegen zahlreiche Keimarten (meist 8) festgestellt wurde, spricht Rolly der Opsoninbestimmung jeden Wert für die Diagnose und Prognose bei Infektionen ab.

Die Frage der Bedeutung der Opsonine bei Puerperalprozessen stand beim XIII. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie 1909 in Straßburg zur Diskussion.

Schiffmann, Ed. Martin und Robbers äußerten sich zu der Frage folgendermaßen: Schiffmann beobachtete bedeutend größere Schwankungen im opsonischen Index bei Puerperalfieber gegenüber Streptokokken als bei Gesunden. Doch war kein kausaler Zusammenhang mit der Fieberkurve und dem Allgemeinbefinden zu konstatieren, auch waren keinerlei prognostische Schlüsse zu ziehen. Dieser Autor betont, wie Ed. Martin, die Umständlichkeit der Methode, der große Fehlerquellen anhaften. Der letztere konnte kein eindeutiges Resultat erzielen. Er hält die Bestimmung des opsonischen Index auch für die Diagnose der puerperalen Streptomykose für wertlos. Robbers hält Versuche mit der direkten Bakteriotherapie des Puerperalfiebers für aussichtslos. Mehr erwartet er von den Versuchen auf dem Umwege, über einen gesunden Menschen den Kranken Schutzstoffe zuzuführen. Vorversuche aber haben ergeben, daß auch bei gesunden Individuen der opsonische Index sich für eine bestimmte Bakterienart durch vorbehandeltes menschliches Serum passiv beeinflussen ließ. Auch in 2 leichten Puerperalfällen schien der Erfolg mit vorbehandeltem menschlichen Serum günstig zu sein. Bei einer sehr akut verlaufenden Sepsis bleibt der Erfolg aus. Bei mehr lokalen Erkrankungen gelingt es, durch Injektionen von abgetöteten Kulturen die opsonische Kraft des Blutes zu erhöhen. Die Beobachtungen von Guggisberg

erstrecken sich nur auf 6 Fälle. Bei allen diesen Fällen, bei denen es sich um eine Infektion mit Eitererregern handelte, war der opsonische Index herabgesetzt gegenüber den Kontrollversuchen mit normalem Serum. Eine Beziehung zwischen schwerer Infektion und Indexerniedrigung konnte Autor nicht nachweisen. Der 4. Fall (schwere Streptomykose, die in wenigen Tagen zum Exitus führte) hatte einen Index, der von 1,0 wenig verschieden und höher war als in anderen Fällen von Streptokokkenmastitis, die in Heilung übergingen. Ueber das schwankende Verhalten der opsonischen Wirkung, was ja für die Diagnose und Prognose einer Allgemeininfektion nach Wright von ausschlaggebender Bedeutung ist, weiß der Autor nicht zu berichten. Um einen Rückschluß auf die diagnostische Verwertung des opsonischen Index bei Allgemeininfektion ziehen zu können, ist es von Bedeutung zu wissen, wie bei Allgemeininfektion der opsonische Grad des Serums anderen Mikroorganismen gegenüber sich verhält. Autor denkt, daß bei solchen schweren Schädigungen der Infektion die opsonische Kraft des Serums auch anderen pathogenen Eitererregern gegenüber herabgesetzt ist. Darauf bezügliche Untersuchungen ergaben indessen, daß das durchaus nicht immer der Fall zu sein braucht.

Nach Jürgens verspricht die Bestimmung des opsonischen Index neue Aufschlüsse über manche Punkte der Infektion und der Infektionskrankheiten zu bringen. Vorläufig haftet der Methode noch viel Subjektives an. Denn wenn auch die Phagozytose an sich ein objektiv nachweisbarer Vorgang ist, so läßt sich doch der Grund der Phagozytose nicht sicher objektiv feststellen, und dieses Fehlen eines rein objektiven Maßes fällt um so mehr ins Gewicht, als es sich im allgemeinen doch nur um geringe Schwankungen der betreffenden Zahlen handelt. Wer dem opsonischen Index zuviel vertraut, wird herbe Enttäuschungen erleben. Wer es aber versteht, im klinischen pathologischen Syndrom auch den opsonischen Index vorsichtig und kritisch zu verwenden, der wird über manche diagnostische Schwierigkeiten leichter als bisher hinwegkommen und die neue Methode als ein brauchbares Hilfsmittel schätzen lernen.

Schiffmann und Kohn haben gefunden, daß 7 Patientinnen von 8 Puerperalen bedeutend größere Schwankungen im opsonischen Index Streptokokken gegenüber aufwiesen als Gesunde. Auch der Index von Staphylokokken war von 3 untersuchten Fällen bei 2 Patienten stärker variabel als bei Gesunden. Der Autor fand keinen Zusammenhang zwischen Fieberkurve und sonstigem Verlauf, und meint infolgedessen, daß die Methode in prognostischer Hinsicht keine Schlüsse erlaubt. Autor fügt hinzu, daß in Anbetracht der zeitraubenden schwierigen Methodik und des Umstandes, daß sie auf das exakteste durchgeführt werden muß, es undurchführbar ist, die Methode als klinischen Behelf, etwa wie die bakteriologische Untersuchung, anzuwenden, sondern die Methodik muß eigens hierzu geschulten Personen bzw. privaten Instituteu vorbehalten bleiben.

Schließlich sei noch Cririck erwähnt, der seine Untersuchungsergebnisse folgendermaßen zusammenfaßt: Bei Puerperalfieber, wenn es sich um eine Streptokokkensepsis handelt, ist der Index der akuten Krankheitsphase für Strept. pyog. subnormal und wird normal oder supranormal mit dem Herabsinken der Temperatur oder Krankheitserscheinungen. In tödlich verlaufenen toxämischen Fällen ist der Index bedeutend herabgesetzt. Bei Mischinfektionen läuft der Streptococcus-Index nicht parallel mit den Krankheitserscheinungen. In den nicht von Streptokokken verursachten Fällen hält sich der Streptokokkenindex innerhalb der normalen Grenzen.

Nachdem ich mich mit der Literatur und den in derselben erwähnten Methoden zunächst theoretisch beschäftigt hatte und ein besonderes Interesse für die opsonische Methode Wrights gefaßt hatte, begab ich mich von Italien nach Berlin, um dort in erster Linie die opsonische Methodik zu erlernen. Es wurde mir dort aber von sehr sachverständiger Seite der Rat erteilt, mich an Herrn Professor Strubell in Dresden zu wenden, der, als Vorkämpfer auf diesem Gebiete bekannt, mir und meinen Plänen am besten die nötige Förderung zu gewähren imstande sei. Herr Professor Strubell erklärte sich sofort bereit, mir einen Arbeitsplatz in seinem Institute und die nötige Einführung in die so schwierige opsonische Methodik zu geben und schickte mich behufs Erlangung des nötigen klinischen Materials an Herrn Prof. Dr. Albert, Leiter der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung der Frauenklinik in Dresden, der in sehr lebenswürdiger Weise mir sein äußerst reichhaltiges Material zur Verfügung stellte. Ich entschloß mich, in erster

Linie die in der Abteilung für Vakzinetherapie, dem Institut des Prof. Strubell, mit besonders verfeinerter Technik betriebene Bestimmung des opsonischen Index in den Vordergrund meiner Betrachtungen zu stellen, habe aber außerdem an denselben Fällen die Rivaltasche Probe und das Abderhaldensche Dialysierverfahren ausgeführt, und habe an der Hand dieser Immunitätsreaktionen auch den Versuch gemacht, die Wirkung therapeutischer Maßnahmen bei der puerperalen Sepsis (besonders der durch Staphylokokken verursachten) zu kontrollieren.

Nachdem also durch die grundlegenden Arbeiten Wrights und seiner Schüler die Lehre von den Opsoninen und die Lehre von der vakzinotherapeutischen Beeinflussung der Infektionskrankheiten begründet und durch eine Reihe ausgezeichneter Autoren bestätigt worden ist, speziell in Deutschland aber durch Strubell und seine Schule nachgeprüft worden ist, war es wohl durchaus berechtigt, einer Studie über das Puerperalfieber in erster Linie auch die opsonische Betrachtungsweise zugrunde zu legen. Im Gegensatz zu anderen wissenschaftlichen Methoden, z. B. der Methode der Komplementbindung, welche vom serologischen Standpunkte aus gewiß ganz ausgezeichnete, und zwar spezifisch diagnostische Resultate (natürlich mit Ausschluß der Syphilisreaktion nach Wassermann und unter der Voraussetzung, daß man wirklich Antigen und Antikörper aufeinander wirken läßt), liefert, ist die opsonische Methode die einzige, welche wir an ein und demselben Tage beliebig häufig wiederholen können. Es ist natürlich vollkommen ausgeschlossen, zum Zwecke der Komplementbindung oder auch der Agglutination und der Präzipitation oder auch einer Toxin- oder Antitoxinbestimmung täglich mehrmals die genügenden Mengen Blut dem betreffenden Patienten abzunehmen. Die geringen Quantitäten Blut aber, welche wir für eine opsonische Blutbestimmung brauchen, könnten wir, wenn es nötig erschiene, auch 10mal an einem Tage erhalten. Und uns kommt es ja gerade bei fieberhaften Infektionskrankheiten, wie es z. B. das Puerperalfieber ist, darauf an, bei den ungeheuer brüsken Temperaturschwankungen auch die mit denselben korrespondierenden Schwankungen der Immunität festzustellen. Und bei aller Mühseligkeit der Methode, welche auch ich vollkommen zugebe, ebenso wie Prof. Strubell das stets auch getan hat, sei es gesagt, daß wir für diese im Blute zweifellos auftretenden, und zwar ständig auftretenden und für das Befinden des Pat. hochwichtigen Schwankungen der Immunität tatsächlich keine andere Methode zur Verfügung haben. Es ist also vollkommen müßig, an der Methode der Opsoninbestimmung fortwährend herumzumäkeln. Wir sind nicht so reich an exakten Methoden auf dem Gebiete der Immunitätsforschung, daß wir der Opsoninbestimmung tatsächlich entraten und dieselbe achtlos über Bord werfen können. Und zwar ist daran festzuhalten, daß die Bestimmung des opsonischen Index nicht nur diagnostischen, sondern auch prognostischen Wert hat, was ich entgegen der Auffassung Muchs noch betonen möchte, unter besonderem Hinweis auf die Untersuchungen von Mac Donald, dessen Resultate bezüglich des Verhaltens des opsonischen Index bei der kritischen Lösung oder dem tödlichen Ausgang der krupösen Pneumonie von Strubell in seiner Monographie ausführlich zitiert worden sind.

Aber die Schwankungen des opsonischen Index gestatten nicht nur außerhalb der Norm von 0,90 und 1,10 einen Schluß auf die bakteriologische Diagnose einer Infektionskrankheit und auf deren Prognose

sondern es ist auch möglich, an der Hand der opsonischen Blutbestimmung wertvolle Anhaltspunkte zu erhalten für die Therapie der betreffenden Erkrankung. Und so habe ich denn nicht verfehlt, meiner klinischen Betrachtungsweise des Puerperalfiebers, neben der sonstigen Beobachtung des gesamten Verhaltens und der genauen Kontrolle der Temperatur, die Bestimmung des opsonischen Index zugrunde zu legen. Auch habe ich eine Reihe therapeutischer Maßnahmen (Injektionen mit Kollargol, mit Staphylokokkenvakzine etc.) klinisch, wie auch andere Methoden (Injektionen von Sublimat, Fixationsabszesse usw.) im Experiment in ihrer Wirkung durch die opsonische Blutbestimmung kontrolliert. Damit nicht zufrieden, und in der Hoffnung, auch der pharmakologischen Beeinflussung des Puerperalfiebers durch meine Untersuchungen einen Dienst zu erweisen, habe ich bei meinen Untersuchungen auch auf die pharmako-dynamisch-opsonischen Versuche Strubells zurückgreifen müssen, über die ich bisher noch nicht gesprochen, die ich aber weiter unten in einem besonderen Kapitel auf das genaueste schildern werde. So lange die Hoffnung besteht, ungünstige Veränderungen der Immunität auf immunochemischem Wege zu bekämpfen, wird es nötig sein, die mit solchen immuno-chemischen Behandlungsmethoden erzielten Resultate nach besten Kräften mit wissenschaftlich einwandfreien Methoden zu kontrollieren. Dies war mir in diesem Falle möglich, wo ich die besondere Ehre hatte, 3 neue, von der pharmazeutischen Weltfirma Gehe & Co. in Dresden uns zur Prüfung übergebene Salze der Acetylsalizylsäure, das acetylsalizylsaure Bromural, Kalzium und Magnesium, zunächst allgemein bezüglich ihres pharmakodynamischen Einflusses auf die opsonische Immunität, wie auch im speziellen nach Erledigung dieser ersten Aufgabe das Bromural und das Kalziumsalz bezüglich ihrer Einwirkung bei künstlich erzeugten Staphylokokkeninfektionen zu untersuchen. Dieses letztere Kapitel der Arbeit wird gesondert publiziert werden. Das Kapitel über die genauere von mir angewandte Technik, insbesondere eine genaueste Beschreibung der opsonischen Technik und deren Erfolge, wie sie in der Abteilung für Vakzinetherapie des Herrn Prof. Strubell geübt wird, das hier folgen sollte, hat bisher aus Gründen der Raumersparnis weggelassen werden müssen.

Fall 1. Frau A. Z., 30 Jahre alt (Journ.-Nr. 4745), 20. Nov. 1913. Gesund. Erste Menses mit 13 Jahren; immer regelmäßig, ohne Beschwerden. 4 Entbindungen, alle normal, die letzte vor 2 Jahren. Letzte Menses am 9. Okt. 1913, bis zum 25. Okt. 1913 gedauert. Am 18. Nov. bekam Pat. heftige Schmerzen im Leibe, Erbrechen. Status: Mittelgroße, kräftig genährte Pat. von blasser Gesichtsfarbe. Thorax und innere Organe ohne Besonderheit. Abdomen weich, nicht aufgetrieben. P. vag. Uterus ante-flektiert, weich, Fundus 3 Querfinger oberhalb der Symphyse. Cervikalkanal für 1 Finger nicht durchgängig. Aus demselben entleert sich reichlich Blut. 20. Nov. 13: Mit Fieber eingeliefert.

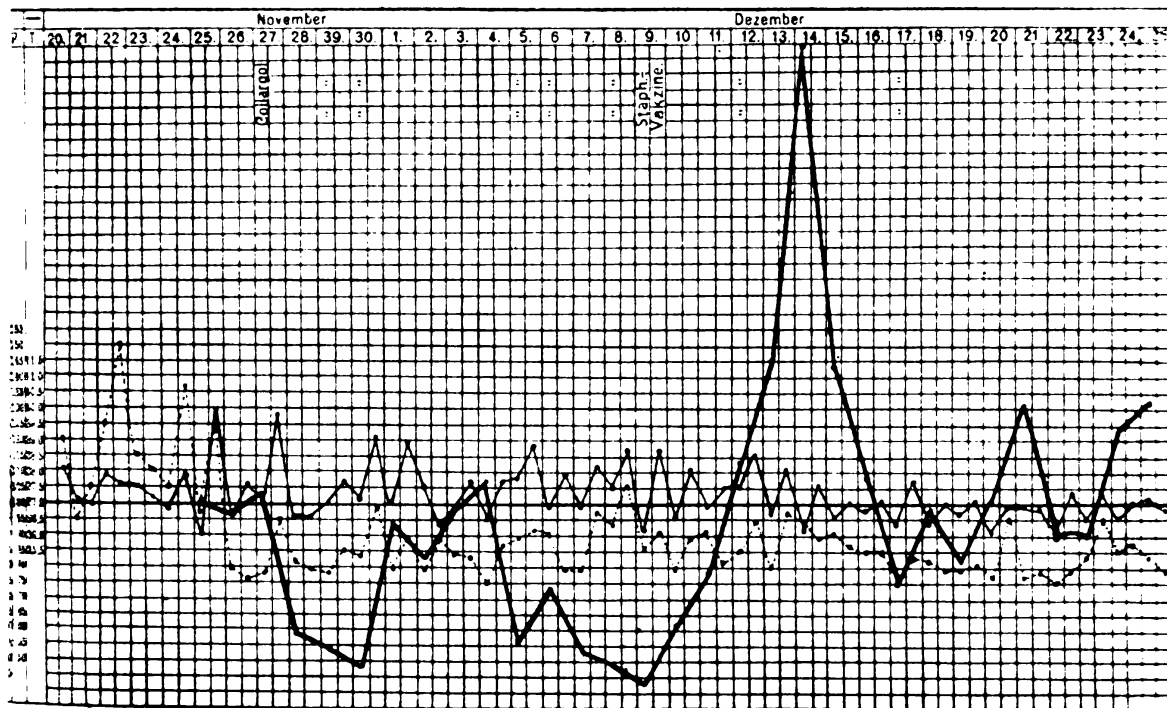
Diagnose: Abortus incipiens. mens. IV febril.

Therapie: Dilatation, Ausräumung einer Frucht im 4. Monat samt Placenta. Alkoholausspülung. 22. Nov.: Im Blute Staphylokokken nachweisbar. 24. Nov.: P. vag. Uterus groß, kontrahiert. Cervikalkanal offen, für 1 Finger nicht durchgängig. Ad-nexe frei. Blutig-schleimiger Fluor. 25. und 27. Nov.: Schüttelfröste. 1. intravenöse Injektion von Kollargol 2-proz., 5 ccm. 29. Nov.: desgl. 30. Nov.: desgl. 1. Dez.: Einlauf mit 200 ccm 1-proz. Kollargollösung. 5., 6. und 8. Dez.: desgl. 9. Dez.: subkutane Injektion von $\frac{1}{2}$ ccm Staphylokokkenvakzine (20 Mill. Staph. pyogenes albus). 12. Dez.: $\frac{3}{4}$ ccm Staphylokokkenvakzine (30 Mill. Staph.). 16. Dez.: 1 ccm desgl. (40 Mill. Staph.). 19. Dez.: 1,25 ccm Staphylokokkenvakzine (50 Mill.). 20. Dez.: 1,5 ccm Staphylokokkenvakzine (60 Mill. Staph.). P. vag. Status idem. 9. Dez.: Bisher Behandlung mit Kollargol intravenös und rektal. Von heute ab: Staphylokokkenvakzine. 18. Dez.:

p. vag. Uterus kontrahiert, links neben dem Uterus ein hühnereigroßes Exsudat von mäßig großer Druckschmerzempfindlichkeit. Adnexe frei. 24. Dez.: Uterus anteflektiert, beweglich. Das linksseitige Exsudat ist kleiner als vorher und nicht druckempfindlich. Adnexe frei. Schleimiges Scheidensekret. Steht auf. 31. Dez.: p. vag. Uterus anteflektiert, beweglich. Links neben dem Uterus noch ein walnußgroßes eingedicktes Exsudat. Adnexe frei. Die Periode ist seither nicht eingetreten. 3. Jan. 14: Auf Wunsch in Heilung entlassen.

Im Verlauf der Krankheit wurde die Rivoltasche Probe 3mal vorgenommen, mit folgendem Resultat: 30. Nov. 13: Reaktion 1:800, 15. Dez.: 1:1100, 25. Dez.: 1:1000.

Temperatur, Puls, opsonischer Index: siehe Kurve.



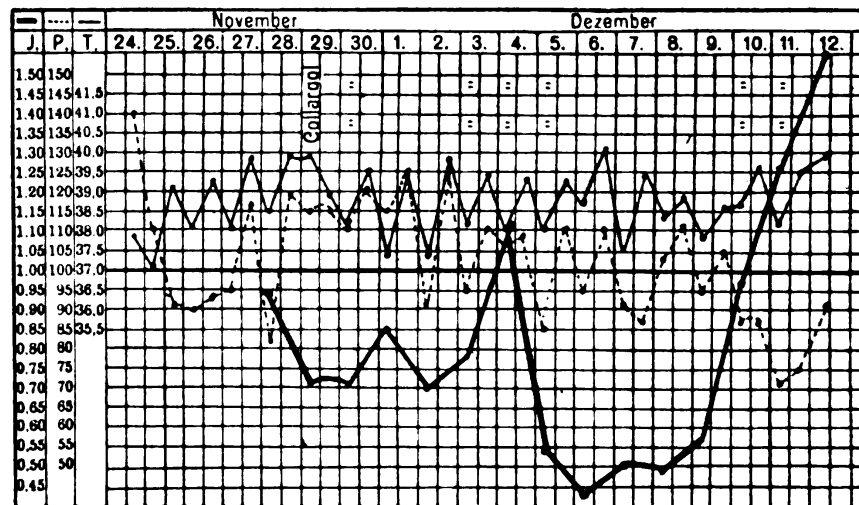
Kurve 1.

Diagnose: Abortus incip. mens. 4 febrilis. Staphylokokkensepsis, linksseitiges parametr. Exsudat.

Resumé: Der fieberhaft verlaufene Fall, bei dem am 25. und 27. Nov. Schüttelfröste auftraten, welche von Temperaturen bis zu 40 resp. 39,8° gefolgt waren, wurde zunächst mit Kollargol behandelt, das offenbar keinen besonders günstigen klinischen Erfolg gezeitigt hat. Die Temperatur blieb nach wie vor febril, bis zu 39°, ein Zustand, an dem erst die Injektion von Staphylokokkenvakzine (verdünnt, $\frac{1}{2}$, ccm = 20 Mill. Staph. pyog. alb.) etwas geändert hat. Nach der 2. Injektion geht die Temperatur zur Norm zurück, um mit Ausnahme einer kleinen etwas erhöhten Zacke am 17. Dez. darin zu verharren. Vergleichen wir nun auf der Kurve das Verhalten von Puls, Temperatur und opsonischem Index, so fällt auf, wie nach der Injektion von Kollargol die Temperatur deutlich ansteigt, unter gleichzeitigem sehr beträchtlichen Sinken des Index von 1,05 auf 0,53 herab. Der Index erhöht sich wieder, bei hochbleibender Temperatur, kehrt zur Norm zurück und sinkt zwischen dem 4. und 9. Dez. wieder sehr beträchtlich herab, auf 0,48. Nun folgt am 9. Dez. die Staphylokokkeninjektion, die ein Steigen des Index zur Norm im Gefolge hat; am 12. Dez. erneute Injektion von Staphylokokken verdünnt (30 Mill. Staph.), welche eine ungeheuer dezidierte Steigerung des Index gegen Staphylokokken im Laufe von 2 Tagen auf eine Höhe von 2,45 im Gefolge hat. Der Index sinkt bis zum 16. Dez. wieder etwas unter die Norm, um auf eine weitere Injektion von 40 Mill. Staph. wieder zur Norm emporzusteigen und dieselbe teils innezuhalten, teils nach oben zu überschreiten. Das Verhalten des Pulses, der im Anfang ziemlich hohe Werte, bis 155, erreicht hat, hat während der ganzen

Zeit zwischen 80 und 110 geschwankt (ist leider aus der vorliegenden Kurve, was seine Stellung zur Norm anlangt, durch ein Versehen des Zeichners nicht ersichtlich). Der Zeichner hat bei dieser und anderen Kurven in der Höhe der Norm, wo der Index von 1,0 und die Temperatur von 37,0 in der Höhe des dicken Balkenstriches figurieren, statt eines Pulses von 70 einen solchen von 105 gesetzt, in anderen Kurven von 100; dadurch erscheinen sämtliche Pulswerte niedriger, als sie de facto sind, besonders im Verhältnis zum Index und zur Temperatur. Trotz dieses technischen Fehlers, den ich leider nicht mehr korrigieren lassen konnte, erhellt aus diesen Kurven zur Evidenz die Gegensätzlichkeit von Puls und Temperatur einerseits und opsonischem Index andererseits. Sobald Puls und Temperatur hoch ansteigen, sinkt der Index ganz beträchtlich, während mit dem mehr oder minder beträchtlichen Ansteigen des Index Puls und Temperatur deutlich herabgehen. Es dürfte wohl kaum ein schlagenderes Beispiel für den opsonischen wie für den klinischen Effekt der Staphylokokkenvakzine geben, wie die Injektion am 9., 12. und 17. Dez. bei dieser Pat., während andererseits infolge der Kollargolinjektion beträchtliche Senkungen des Index eingetreten sind.

Fall 2. Frau K. Sch. (Journ.-Nr. 4794), 37 Jahre alt. Aufnahme 24. Nov. 1913. Gesund. Erste Menses mit 17 Jahren, regelmäßig; 7 Entbindungen, normal verlaufen; eine Fehlgeburt im 3. Monat, im Februar 1913. Kommt wegen Blutungen, welche seit 18. Nov. 1913 bestehen. Letzte Menses Aug. 1913. Status: Mittelgröße, gut genährte Frau. Ungleicher Knochenbau des Thorax. (Links Skoliose.) Thorax, innere Organe frei. Links und rechts bronchitische Geräusche. Abdomen weich, nicht aufgetrieben. p. vag.: Uterus vergrößert, anteflektiert; Cervikalkanal frei, 1 Finger durchgängig. Aus demselben entleert sich reichlich Blut. Adnexe frei. Digitale Ausräumung in Narkose. Alkoholspülung. Tropfeneinlauf von Kochsalzlösung. 27. Dez.: Abdomen weich, leicht aufgetrieben. p. vag.: Uterus groß, kontrahiert, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen. Schleimig-blutiger Fluor. Im Bereich des linken Parametrium schmerzhafte, strangförmige Schwellung (Thrombophlebitis). Im Blut keine Bakterien nachweisbar. 29. Dez.: Schwellung an der Innenseite des l. Oberschenkels



Kurve 2.

(Phlegmasie), Unterschenkel frei. Pat. klagt über heftige, zeitweise rasende Kopfschmerzen in der rechten Kopfseite. Mehrmals Erbrechen und Flimmern vor den Augen. Bronchitische Erscheinungen. Nervensystem ohne Besond. Augenhintergrund keine pathol. Veränderung. p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich. Cervikalkanal geschlossen. Linksseitige Thrombophlebitis der Beckenvenen; keine fluktuierenden Resistenzen. Die Schwellung am l. Oberschenkel bleibt lokal und wird durch Alkoholumschläge gebessert. Urin frei von Eiweiß und Zucker. 6. Dez.: p. vag.: status idem. Kopfschmerzen rechts dauernd; nachts stärker als am Tag. 9. Dez.: Durchfälle, ziemlich dünnflüssig, getürbt. Widal negativ. Blutuntersuchung negativ. 11. Dez.: Leib aufgetrieben, Darmschlingen gebläht. Kein Erbrechen; Durchfälle. Starke Irregularion

der Herzaktion und Atemnot. 12. Dez.: Besonders rechts Bronchitis catarrh.; Pneumonie? Cor.: Grenzen etwas verbreitert; an der Herzbasis lautes blasendes Geräusch, das auch an der Herzspitze hörbar ist. Puls: tardus, inaequalis, irregularis. Abdomen: weich, aufgetrieben. Leber und Milz groß.

p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Leichte ödematöse Schwellung um den Uterus. Keine abnormen Resistenzen. — Das linke Bein ist im Oberschenkel abgeschwollen. Tod 2 Tage später zu Hause.

Diagnose: Plazentarreste post abortum febrilem mens. 3. Thrombophlebitis ven. uterinae sin. Myocarditis, Bronchitis.

Im Laufe der Krankheit wurde die Rivoltasche Probe 2mal vorgenommen; am 25. Nov. ergab sie 1:400; am 6. Dez. 1:300; 12. Dez. 1:600.

28., 30. Dez. 1913 und 3., 4., 5., 10. und 11. Jan. 1914: Kollargoleinlauf 5 ccm einer 5-proz. Lösung in 150 ccm Kochsalzlösung.

Temperatur, Puls und opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Der hoch febril verlaufene Fall wurde mit Kollargol behandelt, man kann nicht sagen mit besonders gutem Erfolg. Exazerbationen der Temperatur korrespondieren mit tiefen Senkungen des Index; nur einmal im Verlaufe der Beobachtung stieg — unbekannt, aus welcher Ursache — der Index ziemlich hoch, bis 1,55, während die Temperatur hoch blieb (40°), bei verhältnismäßig nicht sehr gesteigertem Puls (95).

Fall 3. Fräulein A. W. (Journ.-Nr. 4793), 31 Jahre alt. Aufnahme am 24. Nov. 1913. Immer gesund. Menstruiert mit 16 Jahren, regelmäßig. 4 Entbindungen, normaler Verlauf; eine Fehlgeburt im 4. Monat im Jahre 1909. Letzte Menses Ende Sept. 1913. Pat. kommt wegen Blutungen, welche seit 8 Tagen bestehen. Frucht am 13. Nov. abgegangen. Status: Mittelgroße, gut genährte Pat.; Thorax, innere Organe ohne Bes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben. p. vag.: Uterus anteflektiert, vergrößert, Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig, Anhänge frei, aus demselben entleert sich etwas Blut. Digitale Ausräumung von Plazentarstücken, Alkoholspülung.

26. Nov.: Im Blute sind Streptokokken nachweisbar.

1. Dez. p. vag.: Uterus anteflekt., kontrahiert, beweglich, groß. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Schleimiges Scheidensekret. — Diagnose: Plazentarreste post abort. febr. mens. II.

3. Dez.: Geheilt entlassen.

Die Rivoltasche Probe wurde am 25. Nov. vorgenommen; sie ergab 1:600.

Temperatur, Puls, opsonischer Index: siehe Kurve. Die Temperatur der Pat. sank sehr bald nach der Ausräumung des Uterus und verhielt sich danach immer innerhalb der Norm, während der anfänglich hohe Puls (110) zwischen 80 und 95 schwankte. Mit der Ausräumung stieg sofort der opsonische Index gegen Staphylokokken ziemlich hoch, auf 1,35, kehrte dann zur Norm zurück und stieg dann wieder auf 1,30. Mit der Heilung korrespondierendes Ansteigen des opsonischen Index!

Fall 4. Frau E. N. (Journ.-Nr. 4866), 41 Jahre alt. Aufnahme am 28. Nov. 1913. Mutter an Kindbettfieber gestorben. Gesund. Erste Menses mit 19 Jahren; regelmäßig. 2 Fehlgeburten im 4. und 5. Monat. 4 Entbindungen mit normalem Verlauf, die letzte am 14. Nov. 1913 durch Wendung und künstliche Lösung der Nachgeburt ermöglicht. 19. Nov.: Fieber, Schüttelfrost. Das Fieber dauert bis heute an.

Status: Mittelgroße, mäßig genährte Pat. von blaßgelber Gesichtsfarbe und Hautfarbe. Thorax, Pulmon. ohne Besond.

Cor.: systolisches Geräusch über der Herzbasis und Herzspitze. Puls kräftig, beschleunigt. Abdomen weich, leicht aufgetrieben. p. vag.: Uterusfundus 2 Querfinger unterhalb des Nabels, weich. Cervikalkanal für 1 Finger gut durchgängig.

Urin ohne Besond.

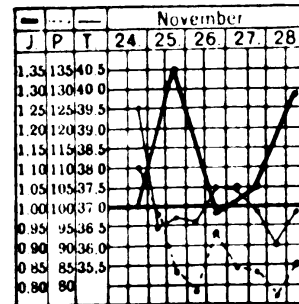
Ausräumung von zwei apfelgroßen Plazentarstücken in leichter Narkose. Alkoholspülung. Kochsalztropfeneinläufe.

29. Nov. Leichte Auftreibung des Leibes. Unter zunehmender Herzschwäche Exitus letalis.

Diagnose: Sepsis puerperalis. Retentio placentae.

Temperatur, Puls, opsonischer Index: siehe Kurve.

Der sehr rasch letal verlaufene Fall zeigt ein Ansteigen des Pulses auf 130 und der Temperatur auf 40°, bei gleichzeitig dezi- diertem Herabstürzen des opsonischen Index auf 0,35.



Kurve 3.

Fall 5. Fräulein A. J. (Journ.-Nr. 4878), 23 Jahre alt. Aufnahme 29. Nov. 1913. Gesund. Menstruiert mit 19 Jahren, regelmäßig. Letzte Menses Mitte Februar 1913. Schwangerschaft gut verlaufen.

Innere Untersuchung: Muttermund 5-markstückgroß. Blase gesprungen, Kopf fest im Beckeneingang; große Kopfgeschwulst. I. Schädellage. Keine Herztöne festzustellen.

30. Nov.: Kopf in D. A. Deutliches Klaffen der Kopfknochen. Perforation.

Normale Nachgeburt: spontan und vollständig.

2. Dez.: Stark übelriechender Fluor.

5. Dez.: Plötzlicher Verfall. Leib weich, kein Erguß nachweisbar.

Einstellung zeigt stark brandige Nekrosen in der Scheide und Portio. Spülung des Uterus mit Alkohol.

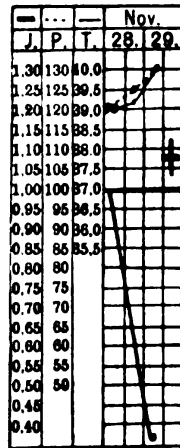
6. Dez.: Ikterus, Erguß im Abdomen, keine Spannung der Bauchdecken. Exitus.

Diagnose: Schwangerschaft am 10. Monat. Erste Schädellage, Tod des Kindes. Fieber während der Geburt; fauliges Fruchtwasser. Peritonitis.

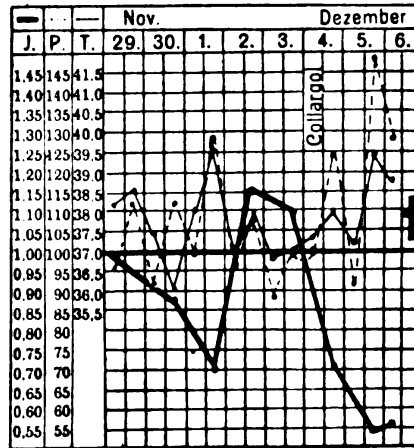
5. Dez.: Kollargoleinlauf 5-proz., 200 g.

Die Rivoltasche Probe wurde am 5. Dez. vorgenommen; sie ergab 1:100.

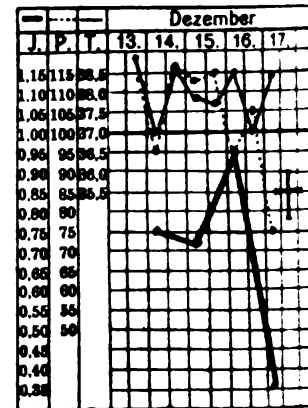
Temperatur, Puls und opsonischer Index: siehe Kurve.



Kurve 4.



Kurve 5.



Kurve 6.

Der unglücklich verlaufende Fall zeigt beträchtliche Temperatursteigerungen bis nahe an 40°, während der Puls am Tage vor dem Exitus bis auf beinahe 150 stieg. Im entgegengesetzten Parallelismus zu dem Verhalten von Puls und Temperatur steht das Verhalten des opsonischen Index gegen Staphylokokken: der Index sinkt mit dem Steigen von Temperatur und Puls und steigt mit dem Sinken derselben. An den letzten Tagen vor dem Tode gleichzeitig mit dem überaus beträchtlichen Pulsanstieg Sinken des Index bis auf 0,55 herab. Danach Exitus!!!

Fall 6. Frau J. G. (Journ.-Nr. 5071), 34 Jahre alt. Aufnahme 13. Dez. 1913. Gesund. Erste Menses mit 15 Jahren. 3 Entbindungen mit normalem Wochenbett: 2 Fehlgeburten im 2. Monat. Letzte Menses 16. Okt. 1913. Jetzt Blutungen seit 12. Dez. 1913. Urin ohne Besond.

Status: Mittelgroße, gut genährte Pat. mit fieberhaft geröteter Gesichtsfarbe.

Thorax: Innere Organe ohne Besond.

Abdomen weich, nicht aufgetrieben. Starke Druckschmerzhaftigkeit der Unterleibsgegend.

p. vag.: Uterus überfaustgroß, anteflektiert. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig; aus demselben entleert sich Blut.

Ausräumung von übelriechender Plazenta in Narkose. Alkoholspülung.

14. Dez.: Leichte Bauchdeckenspannung und starke Schmerzen. Erbrechen. Fluor foetidus.

15. Dez.: Zunahme der Bauchdeckenspannung und Schmerzen. Erbrechen grünlicher Massen. Im Blute sind Streptokokken nachweisbar.

Laparotomie in Chloroformnarkose (Dr. Prange): Nach Eröffnung der Bauchhöhle werden die mäßig belegten Adnexe entfernt. Es ist viel freier Eiter im

Abdomen, die Tuben sind mit Eiter gefüllt. Hierauf wird der Uterus total extirpiert, die Scheide wird offen gelassen, die Parametrien übernäht. Drainage durch die Scheide. Bauchnaht. Pat. erholt sich leidlich nach der Operation.

16. Dez.: Früh 1 Uhr Kurvenkreuzung! Von da ab Verfall, zunehmende Herzschwäche. Kein Erbrechen mehr.

17. Dez.: Exitus letalis.

Diagnose: Abortus febrilis mens. III. Peritonitis purulenta.

Die Rivoltasche Probe ergab am 15. Dez.: 1:300.

Temperatur, Puls und opsonischer Index: siehe Kurve.

Die febrile Temperatur und der hohe Puls der Pat. korrespondieren mit der schweren Erkrankung nicht ganz, insofern als man eigentlich eine noch viel höhere Temperatur erwarten sollte. Der opsonische Index macht gleich am Tage nach der Operation eine Steigerung zur Norm durch, welche von einer rapiden Senkung bis herab auf 0,40 gefolgt ist. Es scheint, daß dieser rapide Abfall des Index bei hochbleibender Temperatur charakteristisch für den Exitus letalis bei diesem Puerperalfieber ist.

Fall 7. Frau T. J. (Journ.-Nr. 5114), 30 Jahre alt. Aufnahme 17. Dez. 1913. Als Kind öfters Mandelentzündung. Menstruiert mit 16 Jahren, immer regelmäßig. 2 Entbindungen, normal verlaufen; 3. Entbindung am 9. Dez. 1913. Vom 4. Wochenbettstag an Fieber, das heute noch andauert.

Status: Mittelgroße, gut genährte Frau mit blaßgelber Hautfarbe; am Hals Narbe von Kocherschem Kragenschnitt.

Thorax: Pulmon. ohne Besond.

Cor.: Grenzen nicht verbreitert. Herztöne leise, systolisches Geräusch über der Herzbasis. Puls weich, klein, gering gespannt und gefüllt. — Abdomen weich, etwas aufgetrieben.

p. vag.: Uterus überfaustgroß, weich, anteflektiert. Cervikalkanal offen, für 1 Finger durchgängig. Rechts neben dem Uterus teigige Schwellung, die in mäßigem Grade auch links besteht. Mißfarbener, überriechender Fluor.

Extremitäten: kein Oedem. Urin frei von Eiweiß und Zucker.

18. Dez. 1913: Digitale Austastung des Uterus in Narkose, fördert mehrere Plazentarreste zutage, die stark verfault sind. Die Innenfläche des Uterus fühlt sich uneben an, die Wand erscheint brüchig und weich. Alkoholspülung.

Im Blut Staphylokokken nachweisbar (Prof. Schmorl).

21. Dez.: Das Fieber fällt etwas ab und nimmt den Typus der steilen Kurve an. Kollargolinjektion 2-proz., 5 ccm.

24. Dez.: p. vag.: Uterus noch groß, anteflektiert; Cervikalkanal geschlossen; noch stark aufgelockert. Im linken Parametrium bleistiftdicke, druckempfindliche derbe Stränge (Thrombophlebitis). Im Urin Spuren Eiweiß, keine Zylinder, Epithelien, Leukozyten.

30. Dez.: Pat. klagt zeitweise über Herzklopfen, Herzangst und Atemnot. Ueber dem Herzen systolisch blasende Geräusche. Puls kräftig. Fieber ist abgefallen.

6. Jan. 1914: p. vag.: Uterus kontrahiert, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen, leichte Schwellung des linken Parametrium, die mäßig schmerzhaft ist. Adnexe frei. Schleimiger Fluor. Urin frei von Eiweiß und Zucker.

13. Jan.: Gutes Allgemeinbefinden. Appetit gut. Steht auf.

19. Jan.: p. vag.: Uterus klein, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Rechte Tube leicht verdickt. Linkes Parametrium frei. Fluor albus. Pat. hat gestern einen Anfall von Leibscherzen gehabt. Objektiv nihil.

20. Jan.: Cor. Herztöne rein bis auf ein leichtes systolisches Geräusch über der Herzspitze.

Pulmon. bronchit. Geräusch, besonders links. Pat. fühlt sich noch etwas schwach, ist sonst ohne Beschwerden. Sichtbare Schleimbäute blaß. An der Halsnarbe, im rechten Winkel derselben, eine eiternde Fistel, die etwa 2 cm in die Tiefe führt. Urin frei von Eiweiß und Zucker. Viel Harnsäuresediment.

20. Jan.: In Heilung entlassen.

20. Febr.: Kommt zur Nachuntersuchung. Objektiv keine Beschwerden. p. vag.: normaler Befund.

Diagnose: Sepsis puerperalis (Staphylokokken). Plazentarreste.

Kollargol wurde 12mal gegeben, und zwar am 18. Dez. 1913, rektal (2mal 5 ccm einer 2-proz. Lösung in 100 ccm Kochsalzlösung).

Am 19. Dez. (1mal 10 ccm dgl.), rektal.

„ 20. „ 5 ccm 2-proz. Lösung, intravenös.

Am 22. Dez. desgleichen.

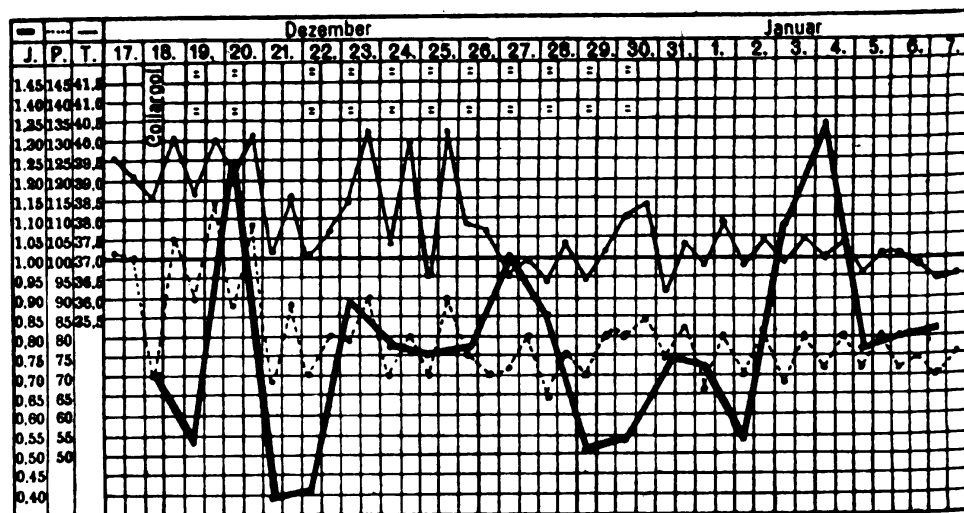
" 23. " " " "
 " 24. " 20 ccm 2-proz. Lösung, rektal.
 " 25. " 5 " desgleichen.
 " 26. " 5 " " intravenös.
 " 27. " 5 " 5-proz. Lösung in 100 ccm Kochsalzlösung, rektal.
 " 28. " 5 " desgleichen.
 " 29. " 5 " "
 " 30. " 10 " "

Im Laufe der Krankheit wurde die Rivaltasche Probe 3mal vorgenommen; sie ergab am 20. Dez. 1:400, am 25. Dez. 1:500, am 7. Jan. 1914 1:400. Die Abderhaldensche Reaktion hat folgende Resultate gegeben:

Stärke der Ninhydrinreaktion

- 1) Serum allein: —.
- 2) " mit eigenen Staphylokokken ++++.
- 3) " mit Streptokokken: —.

Temperatur, Puls und opsonischer Index: siehe Kurve.



Kurve 7.

Resumé: Die hohen Temperaturen der Patientin dauern etwa 10 Tage lang an, während der Puls zwischen 80 und 125 schwankt, allmählich aber herabgeht. Die Schwankungen des opsonischen Index sind denen der Temperatur ungefähr entgegengesetzt, mit Ausnahme der einen Steigerung des Index auf 1,35 am 19. Dez., der aber sofort eine tiefe Senkung auf 0,50 entspricht. Mit der gesteigerten Temperatur am 18., 23., 24., 25. und 30. Dez. korrespondiert jedesmal eine tiefe Senkung des Index. Der Index steigt am 2., 3. und 4. Jan. in steiler Kurve sehr hoch an, von 0,65 auf 1,40, um dann am 5. Jan. wieder auf etwa 0,90 herabzusinken, was ja einem normalen Verhalten entspricht. Der Puls ist zurzeit zwischen 80 und 90. Temperatur normal. Ein irgendwie deklarerter Einfluß des Kollargol erscheint aus dem Verhalten nicht ersichtlich.

Fall 8. Fräulein G. N. (Journ.-Nr. 4538), 19 Jahre alt. Aufnahme 16. Dez. 1913. Immer gesund. Erste Menses mit 14 Jahren, regelmäßig. Kein Abortus; letzte Menses 29. Aug., klagt über grüngelblichen Ausfluß. Kommt von Station 49, wo sie wegen Lues in Behandlung war, mit Wehen, welche seit 3 Tagen bestehen.

Status: Mittelgroßes, gut genährtes Mädchen. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben. p. vag.: Uterus zwischen Nabel und Symphyse. Cervikalkanal offen. Adnexe frei. Unter guten Wehen wird eine 5 Monatsfrucht samt Plazenta ausgestoßen.

17. Dez.: Leichte Fiebersteigerung. Austastung des Uterus fördert noch einige Plazentarreste zutage. Alkoholspülung.

In Blutaussaat keine pathogenen Keime (Schmorl).

26. Dez.: p. vag.: Uterus weich, retroflektiert; Cervikalkanal geschlossen. Schwellung beider Adnexe.

2. Jan. 1914: p. vag.: Uterus besser kontrahiert, retroflektiert. Die Adnexe sind walnußgroß verdickt und im Douglas adhärent. Linke Adnexe druckschmerzempfindlich.

6. Jan.: p. vag.: die linken Adnexe sind zu einem hühnereigroßen Tumor verdickt, druckschmerzhaft.

10. Jan.: Pat. klagt über Halsschmerzen und Schmerzen beim Schlucken; die rechte Tonsille zeigt eitrig-pfröpfte.

p. vag.: Uterus retroflektiert, fixiert. Rechte Adnexe verdickt und in den Douglas geschlagen. Der linksseitige Adnextumor besteht wie oben.

15. Jan.: Angina ist in 2 Tagen abgelaufen.

p. vag.: status idem.

16. Jan.: Periode ohne bes. Störung.

24. Jan.: Im Vaginalausstrich Gonokokken nicht mit Sicherheit nachweisbar. Reiche Bakterienflora in dem schleimig-eitrigem Fluor.

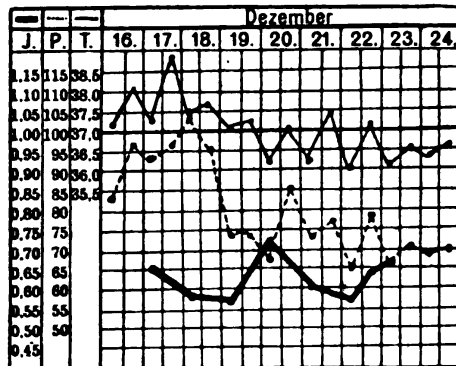
25. Jan.: p. vag: Uterus retroflektiert, fixiert. Das Anheben desselben ist sehr schmerzhaft. Cervikalkanal geschlossen. Rechte Adnexe noch verdickt. Linke Adnexe zu einem hühnereigroßen Tumor zusammengeballt; mäßig druckschmerzempfindlich. Fluor mäßigen Grades.

26. Jan.: In Heilung entlassen.

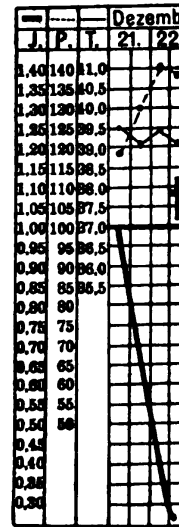
Diagnose: Abortus febrilis mens. V. Retroflexio uteri fixata. Salpingitis duplex, Angina catarrhalis. Lues.

Puls, Temperatur und opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Der nach Ausräumung des Uterus bald zur Norm zurückkehrende Fall bietet opsonisch nicht viel Interessantes. Der Index gegen Staphylokokken war und blieb niedrig, schwankte zwischen 0,62 und 0,77, der Puls kehrte allmählich zur Norm zurück.



Kurve 8.



Kurve 9.

Fall 9. Frau B. G. (Journ.-Nr. 5158), 39 Jahre alt. Aufnahme 21. Dez. 1913. Vor 6 Jahren Rippenfellentzündung. Erste Menses mit 18 Jahren, regelmäßig. 8 Entbindungen. normal verlaufen; ein Abortus mit Fieber vor 5 Jahren. Letzte Entbindung vor 2 Tagen. Pat. wird mit Fieber und großen Leibscherzen geschickt. Die Geburt war normal. Plazenta mit Crédé ausgedrückt.

Status: Mittelgroße, gut genährte Frau. Thorax: Innere Organe ohne Besonderheiten. Abdomen aufgetrieben, gespannt, besonders in den unteren Abschnitten.

p. vag.: Uterusfundus unterhalb des Nabels, Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig. Adnexe nicht sicher abtastbar. Bei der Austastung des gut kontrahierten Uterus finden sich nur einige Blutgerinnsel. Alkoholspülung.

22. Dez.: Leib stark aufgetrieben; kein Erbrechen. Im Magen grünlicher, nicht übelriechender Inhalt. Stuhlverhaltung. Laparotomie in Chloroformäthernarkose (Dr. Prange). Nach Eröffnung der Bauchhöhle fließen große Mengen Eiter ab. Der Uterus ist eitrig belegt und brüchig, zeigt an verschiedenen Stellen Defekte. Beide Adnexe werden entfernt und unter ziemlich starker Blutung das Corpus uteri hoch amputiert. Uebernähung des Cervixstumpfes. Drainage nach den Bauchdecken. Schließung der Bauchdecken.

Exitus 3 Std. post operationem.

Diagnose: Peritonitis puerperalis.

Temperatur, Puls und ops. Index: siehe Kurve.

Resumé: Der Fall, welcher unglücklich verlief, zeigt bei gar nicht sehr beträchtlicher Temperatursteigerung bis 38,5 und Pulssteigerung bis auf 140 ein kolossales Herabsinken des opsonischen Index von 1,0 auf 0,25 am Tage des Todes, welches nach den in dieser Untersuchungsreihe gemachten Erfahrungen offenbar typisch ist.

Fall 10. Frau F. F. (Journ.-Nr. 5175), 28 Jahre. Aufnahme 22. Dez. 1913. Anämie, vor 2 Jahren behandelt. Erste Menses mit 18 Jahren, regelmäßig. Kein Abortus. Eine Entbindung vor 11 Tagen, ohne besonderen Blutverlust; dabei Dammriß. Kommt mit hohem Fieber, das seit 6. Wochenbettstag besteht.

Status: Mittelgroße, gering genährte Pat. von äußerst blasser Hautfarbe. Thorax: Pulmon. ohne Besonderheiten.

Cor.: Systol. Geräusche über der Herzspitze und Herzbasis.

Puls: Klein, weich. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus schlecht kontrahiert, über faustgroß. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig. Adnexe frei. Bei der Austastung lassen sich reichlich bröckelige Plazentarmassen, besonders von der Plazentaransatzstelle, ablösen. Alkoholspülung. Im Blute Streptokokken nachweisbar (Schmorl).

23. Dez.: Leichte Euphorie. Gegen Mittag beginnende Benommenheit. Nachmittag 2 Uhr: Exitus.

Die Rivaltasche Probe ergab am 23. Dez.: 1:100.

Die Abderhaldensche Reaktion ergab:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

1) Serum allein: —

2) Serum mit Streptokokken:

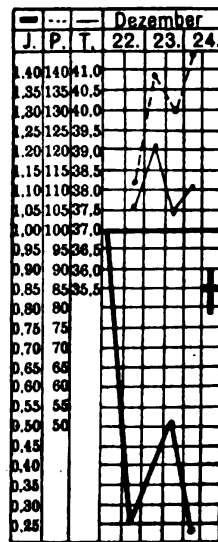
3) Serum mit Staphylococcus aur.: ++

4) Serum mit eigenen Streptokokken und Stäbchen: +++

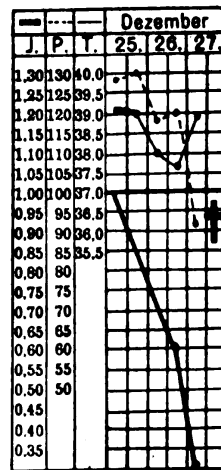
5) Serum mit Bact. coli: +++

6) Serum mit Staph. alb.: +

Diagnose: Sepsis puerperalis. Anaemia gravis.



Kurve 10.



Kurve 11.

Puls, Temperatur und ops. Index: siehe Kurve.

Resumé: Dieser Fall verläuft ähnlich wie Fall 9: Exitus letalis bei mittelhoher Temperatursteigerung, sehr hohem Puls (bis 145) und tiefem Herabsinken des Index herunter bis auf 0,23.

Fall 11: Frau M. L. (Journ.-Nr. 5201), 25 Jahre alt. Aufnahme 25. Dez. 1913. Immer gesund, soweit aus den etwas unklaren Angaben hervorgeht. Menses mit 16 Jahren, regelmäßig. Am 22. Dez. früh Spontangeburt eines 5 Monat-Foetus; dabei Temperatur 40°. In den letzten Tagen vor dem Abortus angeblich Fieber, das in den letzten Tagen stärker wurde. Heute früh 39,1°. Mehrfach Erbrechen. Stuhlgang angehalten.

Status: Mittelgroße, mäßig genährte Pat. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen aufgetrieben, gespannt und sehr druckschmerzempfindlich.

p. vag.: Uterus groß, weich, anteflektiert. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig. Aus demselben entleert sich bräunlich-roter Ausfluß. Adnexe frei.

Beim Austasten werden noch einige Plazentarreste gelöst. Punktion des hinteren Scheidengewölbes Eiter. Inzision ergibt eine blutig-schleimige Flüssigkeit. Tamponade der Inzisionsöffnung.

26. Dez.: Im Blute vereinzelte Ketten von Streptokokken (Schmorl).

Abdomen dauernd gespannt und sehr druckschmerzempfindlich.

27. Dez. Zunahme der Benommenheit. Exitus früh 9,20.

Diagnose: Sept. Peritonitis post abortum.

Puls, Temperatur, opson. Index: siehe Kurve.

Resumé: Dieser Fall verläuft ganz analog Fall 9 und 10. Temperatur bis 39, Puls bis 130, der dann aber zurückgeht. Herabstürzen des opsonischen Index am Tage des Todes bis auf 0,30.

Fall 12. Fräulein A. Sch. (Journ.-Nr. 5220), 25 Jahre alt. Aufnahme: 16. Jan. 1914. Immer gesund. 2 Geschwister an Lungentuberkulose gestorben. Kinderkrankheiten. Erste Menses mit 16 Jahren, immer regelmäßig. Kein Partus, kein Abortus. Letzte Periode Mitte August. Pat. bekam am 5. Jan. Schmerzen im Leibe; mittag ging die Frucht ab. Geringe Blutung. Leichtes Fieber.

Status: Mittelgroße, gut genährte Pat. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

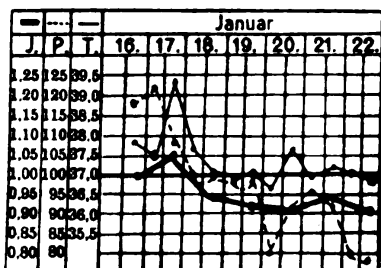
p. vag.: Uterus überfaustgroß, anteflektiert. Cervikalkanal für 1 Finger bequem durchgängig; aus demselben Blut. Ausräumung von Plazentarresten in Narkose. Alkoholspülung.

17. Jan.: Im Blute keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl). 23. Jan. p. vag.: Uterus noch groß, kontrahiert, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Schleimiger Ausfluß. 28. Jan.: Geheilt entlassen.

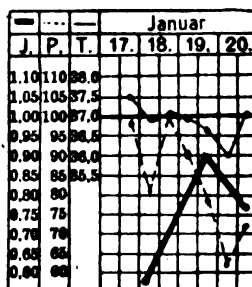
Diagnose: Plazentarreste post abortum, mens. V.

Temperatur, Puls und opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Der Fall, welcher geheilt entlassen wurde, zeigt opsonisch keine besonders charakteristischen Schwankungen, vielmehr hielt sich der Index gegen Staph. vollständig innerhalb der Norm, die Temperatur ging nach Ausräumung der Plazentarreste sehr bald zur Norm zurück, desgleichen der Puls.



Kurve 12.



Kurve 13.

Fall 13. Fräulein J. K. (Journ.-Nr. 236), 27 Jahre alt. Aufnahme: 17. Jan. 1914. Immer gesund. Kinderkrankheiten (Masern, Scharlach). Erste Menses mit 15 Jahren; regelmäßig. Eine Entbindung mit normalem Verlauf vor 5 Jahren; Zange, Dammriß; Wochenbett normal. Keine Fehlgeburt. Letzte Menses November. Am 6. Jan. trat starke Blutung ein.

Status: Mittelgroße, mäßig genährte Pat. von blassem Aussehen; leichtes Lidödem. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus vergrößert, anteflektiert. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig; aus demselben entleert sich Blut. Ausräumung einer 2 Monatsfrucht samt Plazenta in Narkose. Alkoholspülung.

18. Jan. Blutaussaat ergibt keine pathogenen Keime (Schmorl). Urin enthält Spuren von Eiweiß, keine korpuskul. Elemente. 23. Jan. p. vag.: Uterus anteflektiert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Schleimiges Scheidensekret. Urin frei von Eiweiß.

24. Jan. geheilt entlassen.

Diagnose: Abortus mens 2/3. Nephritis chronica. Anaemia.

Im Laufe der Krankheit wurde die Rivaltasche Probe 1mal gemacht; sie ergab am 18. Jan. 1:400.

Puls, Temperatur und opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Der Fall zeigt ziemlich beträchtliche Senkungen des opsonischen Index bei annähernd normaler Temperatur und anfänglich gesteigertem Puls.

Fall 14. Fräulein Fr. G. (Journ.-Nr. 204), 19 Jahre. Aufnahme 16. Jan. 1914. Vater an Lungenentzündung gestorben. Pat. mit 7 Jahren Lungenentzündung

gehabt; sonst nie krank. Erste Menses mit 13 Jahren, regelmäßig. Kein Partus, kein Abortus. Letzte Menses Anfang September. Klagt seitdem über Ausfluß und Brennen beim Wasserlassen. Am 15. nachts soll angeblich die Frucht abgegangen sein; dabei wenig Blutung.

Status: Mittelgroße, gut genährte Pat. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben. Aus der Vagina hängt die Nabelschnur. Innere Untersuchung ergibt Uterus retroflektiert, Fundus zwischen Nabel und Symphyse. Cervikalkanal für 2 Finger durchgängig; aus demselben hängt die Nabelschnur heraus. Ausräumung der Plazenta und Eihäute. Alkoholspülung.

19. Jan. Im Blute keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl). Das linke Ohr enthält reichlich Eiter.

P. vag.: Uterus schlecht kontrahiert, anteflektiert; Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig. Fluor schleimig-blutig.

Uterusspülung mit Alkohol. Collargol per rectum (15 ccm einer 5-proz. Lösung + 150 ccm Kochsalzlösung). 20. und 21., 23. und 24. Jan. Kollargol desgl. 24. Jan. In einer neuen Blutaussaat wachsen wieder keine Keime (Schmorl). Innere Untersuchung: Uterus kontrahiert, anteflektiert. Leichte Schwellung der linken Adnexe, die etwas druckschmerzempfindlich sind. Rechte Adnexe frei. Mißfarbener Ausfluß.

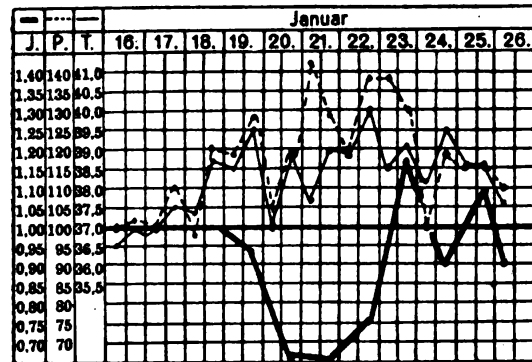
25. Jan. Schüttelfrost. Pat. klagt über Klopfen und Hämmern im rechten Ohr und wird beim Aufsitzen schwindlig. Nystagmus nach rechts. Untersuchung der Augen durch Prof. Best ergibt: Injektion beider Nerv. optici r. > l (beginnende Neuritis optica dextra). Rötung und starke Füllung der Gefäße um die Papilla n. opt. Augenbewegungen und Gesichtsfelder frei. Hörfähigkeit auf dem rechten Ohr herabgesetzt. Paracentese des rechten Trommelfelles ergibt wenig Eiter (Dr. Stöwer).

26. Jan.: Pat. klagt dauernd über Klopfen in der rechten Schädelfälfte; sonst keine subjektiven Schmerzen, auch nicht beim Drücken und Klopfen des Schädelknochens.

p. vag.: Uterus anteflektiert, dextrovertiert. Linke Adnexe hühnerigroß. Rechte Adnexe ebenfalls verdickt und druckschmerzhaft. Schleimiges Scheidensekret.

27. Jan.: Zwecks Aufmeißelung des rechten Felsenbeins nach der Ohrenabteilung verlegt.

29. Jan. p. vag.: Uterus anteflektiert. Cervikalkanal aufgelockert, geschlossen. Die linken Adnexe sind apfelgroß verdickt, druckschmerzempfindlich. Die rechte Tube ebenfalls verdickt und druckschmerzhaft. Schleimiger Ausfluß.



Kurve 14.

30. Jan.: Früh Erbrechen, Leibschmerzen, Kopfschmerzen. Innere Untersuchung ergibt Uterus dextrovertiert, von Exsudaten umgeben; Cervikalkanal geschlossen. Links neben dem Uterus ist der erwähnte Pyosalpinxtumor zu fühlen. Punktion und Inzision der Pyosalpinx, wobei stinkender Eiter abfließt.

Pat. erbricht weiter, ist sehr unruhig und zeitweise unklar.

31. Jan.: Exitus letalis.

Diagnose: Abortus incompletus, mens. 5/6. Otitis media sin. et dext. Pyosalpinx sin. Peritonitis.

Die Rivaltasche Probe wurde am 23. Jan. gemacht, sie ergab 1:450.

Am selben Tage wurde die Abderhaldensche Reaktion gemacht mit folgenden

Resultaten:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

- 1) Serum allein —
- 2) " mit Streptokokken (1. Stamm) —
- 3) " " Streptokokken (2. Stamm) +
- 4) " " Staphylococcus aureus + + + +
- 5) " " Typhusbazillen + +
- 6) " " Bact. coli + + + +
- 7) " " Tuberkelbazillen —

Puls, Temperatur und opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Die Kurven der Pat., auf deren klinisches Verhalten nicht besonders eingegangen zu werden braucht (Komplikation mit

Otitis), zeigen einen bemerkenswerten Antagonismus zwischen der beträchtlichen Senkung des opsonischen Index am 18. bis 22. Jan. und der hohen Pulssteigerung zur selben Zeit. Das Verhalten ist äußerst typisch und geradezu überzeugend.

Fall 15. Frau H. Sch (Journ.-Nr. 84), 22 Jahre alt. Aufnahme 17. Jan. 1914. Immer gesund. Menstruiert mit 15 Jahren, regelmäßig. 3 Entbindungen, normal verlaufen; letzte am 2. Dez. 1913, hier Stat. 56. Im 1. und 2. Wochenbett fieberfrei. Kein Abortus. Am 20. Dez. 1913 aus dem Krankenhause entlassen, fühlt sich Pat. sehr elend, hatte zeitweise Fieber und heftige Kreuzschmerzen. (Bis zum 8. Tage normales Wochenbett, dann leichte Temperatursteigerungen ohne vaginalen Befund.)

Status: Mittelgroße, gering genährte Pat. Thorax, Pulmon. ohne Besonderes.

Cor: Systol. Geräusch an der Herzbasis und -spitze. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus anteflektiert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Die linken Adnexe weisen einen unregelmäßig prallen, etwas druckschmerzhaften Tumor auf. An der rechten Seite oberhalb des Uterus ein apfelgroßer, mäßig druckschmerzhafter Tumor, der der Beckenschaukel fest aufsitzt. Mäßiger Fluor albus.

10. Jan. 14: Blutausaat ohne pathol. Befund (Schmorl). Cystitis.

12. Jan. Untersuchung in Narkose: p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich. Im Bereich der linken Adnexe ziemlich derbe Tumoren von Hühnereigröße; ebenso rechts an der Beckenschaukel ein ziemlich derber, apfelgroßer Tumor. Punktion der Tumoren ergibt keinen Eiter.

17. Jan. 14: Subkutane Injektionen bis 0,01 mit Alt tuberkulin rufen keine allgemeine und keine lokale Reaktion hervor. Cystitis gebessert.

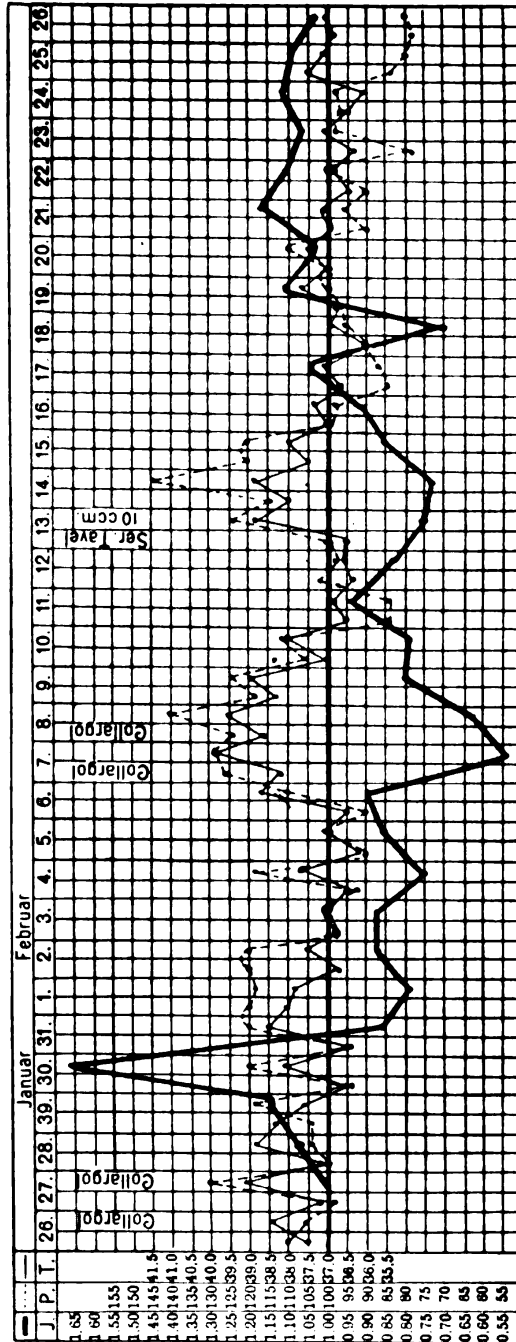
20. Jan.: Punktion des linksseitigen Tumors ergibt keinen Eiter, starke Blutung.

25. Jan.: Im Blute sind wieder keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl).

p. vag.: Uterus anteflektiert, beschränkt beweglich. Cervikalkanal geschlossen. Im Bereich des linken Parametrium findet sich noch jener apfelgroße Tumor (siehe oben), rechts freier.

26. Jan. Kollargolbehandlung: 10 ccm einer 10-proz. Lösung in 100 ccm Kochsalzlösung, per rectum. 27. und 28. Jan. desgleichen.

29. Jan.: Punktion und Inzision des linksseitigen, in derbe parametrische Schwarten eingehüllten Exsudates ergibt wenig blutig-eitrige Flüssigkeit. Drainage mit Gaze.



Kurve 15.

31. Jan.: Drainage entfernt.

7. Febr.: Nachdem das Fieber etwas gefallen war, heute plötzlicher Anstieg. Blutaussaat ergibt keine pathogenen Keime (Schmorl).

Injektion von 10 ccm Antistreptokokkenserum (Tavel).

Rektaleinlauf mit 5 ccm 10-proz. Kollargol mit 100 ccm Kochsalzlösung.

8. Febr.: Wiederum Kollargoleinlauf 5 ccm, 10-proz.

12. Febr.: Nahrungsaufnahme äußerst gering, Erbrechen. Nährklystiere. Gewicht 33 kg!

14. Febr.: Erneuter Fieberanstieg. — Antistreptokokkenserum (Tavel, 10 ccm).

p. vag.: Uterus anteflektiert, klein, beweglich; Cervikalkanal geschlossen; beide Parametrien, besonders links, derb infiltrierte, nicht druckschmerzhaft. Adnexe nicht abzutasten.

27. Febr.: Das Fieber ist seit 8 Tagen dauernd gefallen, subjektives Wohlbefinden. Appetit gut. Gewichtszunahme 2½ kg.

4. März p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich. Parametrien frei. Adnexe erscheinen adhären. Inzisionswunde der Vagina geschlossen.

13. März: Vaginalbefund wie am 4. März 14. Gutes Allgemeinbefinden. Dauernd fieberfrei. In Heilung entlassen.

Diagnose: Parametritis postpuerperalis. Linksseitiges Parametritisexsudat. Cystitis. Anämie.

Die Rivaltasche Probe wurde im Laufe der Krankheit 4mal vorgenommen. Die Resultate sind folgende:

26. Jan. 1:1000	13. Febr. 1:700
7. Febr. 1:600	20. Febr. 1:1000

Die Abderhaldensche Reaktion wurde am 26. Jan. vorgenommen. Die Stärke der Ninhydrinreaktion war:

- 1) Serum allein —,
- 2) Serum mit Streptokokken +,
- 3) Streptokokken allein —.

Temperatur, Puls, opsonischer Index: siehe Kurve.

Resumé: Auch dieser Fall, der mit Kollargol und später mit Antistreptokokkenserum Tavel behandelt wurde, zeigt in äußerst demonstrativer Weise den Antagonismus von Puls und Temperatur einerseits und opsonischem Index andererseits, siehe die hohe Indexsteigerung am 30. Jan. auf 1,65, begleitet von Temperatursenkung auf 36,5; die tiefen Senkungen des Index bis auf 0,55 zwischen dem 6. und 8. Febr., begleitet von Temperatursteigerungen bis auf 38,9; Puls bis 140; desgleichen Senkung des Index zwischen 12. und 15. Febr.; Pulssteigerungen bis auf 145, Temperatur bis auf beinahe 39. Sowohl im Verlaufe des Kollargol wie des Serum Tavel gingen Temperatur und Puls herunter, ohne daß man sagen konnte: post hoc ergo propter hoc.

Fall 16. Fräulein J. St. (Journ.-Nr. 370), 21 Jahre alt. Aufnahme 26. Jan. 1914. Masern, Keuchhusten. Mit 16 Jahren leichter Magenkatarrh und Nierenentzündung, 6—7 Wochen zur Behandlung. Mit 18 Jahren Blutvergiftung (im Finger beginnend), schwer nierenkrank, ½ Jahr gelegen. — Erste Menses mit 13 Jahren. Letzte Menses Ende Juni 1913. Verlauf der Schwangerschaft ohne Besonderes. Geburt am 26. Jan. 1914 außerhalb. Spontan verlaufen, dabei Dammriß, hier in der Klinik genäht. Kind gleich nach der Geburt gestorben. — Am 2. Wochenbetttag Fieber.

28. Jan.: Im Blute Staphylokokken nachweisbar (Schmorl).

Behandlung mit Staphylokokkenvakzine am 30. Jan. und 2. Febr. 1914 (je 20 und 30 Mill. Staphylokokken).

Nach einer fieberfreien Woche tritt am 9. Febr. Schüttelfrost und Fieber ein.

9. Febr. Blutaussaat: Im Blute keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl).

Urin sehr trüb. Mikroskopische Untersuchung des steril entnommenen Urins ergibt Bact. coli. Behandlung der Cystitis.

Diagnose: Sepsis puerperalis, Cystitis.

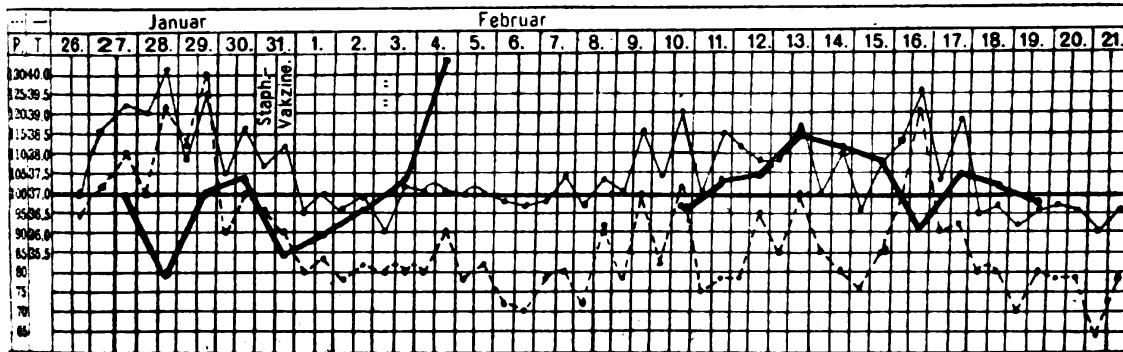
Die Rivaltasche Probe wurde 2mal gemacht; die Resultate ergaben: 29. Jan. 1914 1:600, 12. Febr. 1914 1:1200.

Die Abderhaldensche Probe ergab am 29. Jan. folgendes:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

- 1) Serum allein —,
- 2) „ mit Streptokokken —,
- 3) „ „ Staphylococcus aureus + + + +,
- 4) „ „ Bact. melitensis + + +,
- 5) „ „ Bact. alcaligenes —,

- 6) Serum mit Bact. coli ++,
 - 7) " " Bact. paracoli + + + +,
 - 8) " " Bac. typhus ++,
 - 9) " " Bac. paratyphus ++,
 - 10) " " Tuberkelbazillen - (?).
- Puls, Temperatur und opsonischer Index: siehe Kurve.



Kurve 16.

Resumé: Dieser Fall wurde nach starken Temperatursteigerungen mit Staphylokokkenvakzine (20 resp. 30 Mill. Staphylokokken) behandelt. Nach der ersten Injektion Herabgehen des Pulses zur Norm und 8 Tage Fieberfreiheit. Die zweite Injektion steigert den Index gegen Staphylokokken bis auf 1,35. Bei dem erneuten Fieberanstieg am 9. Febr. wurde die Staphylokokkenbehandlung leider nicht fortgesetzt. Der unmittelbare Erfolg des Staphylokokken ist jedenfalls auffällig.

Fall 17. Frau L. G. (Journ.-Nr. 469), 31 Jahre alt. Aufnahme 1. Febr. 1914. Nie ernstlich krank gewesen. Menstruiert mit 16 Jahren; regelmäßig. 3 Entbindungen, die normal verlaufen sind; eine Fehlgeburt ohne Besond. Pat. war 1910 und 1912 je 4 Monate in Lungenheilstätte. Letzte Entbindung am 28. Jan. 1914. Starke Blutung; danach trat Fieber ein.

Status: Mittelgroße, gut genährte Pat. von blassem Aussehen. Thorax: Lungenschall normal. Ueber beide Lungen einige bronchitische R.-Geräusche. Cor: Anämisches Geräusch. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus faustgroß, sehr weich, anteflektiert. Cervikalkanal für 1 Finger bequem durchgängig. Adnexe frei. Blutiger Ausfluß. Ausstattung fördert einige Plazentabrocken und Fibrinreste sowie geronnenes Blut zutage. Alkoholspülung.

1. Febr. 1914. Im Blute keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl).

16. Febr.: p. vag.: Uterus in Mittelstellung, anteflektiert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Schleimiges Scheidensekret.

18. Febr.: Uterus liegt nach hinten. Ring eingelegt.

21. Febr.: Uterus liegt gut im Ring. Entlassen.

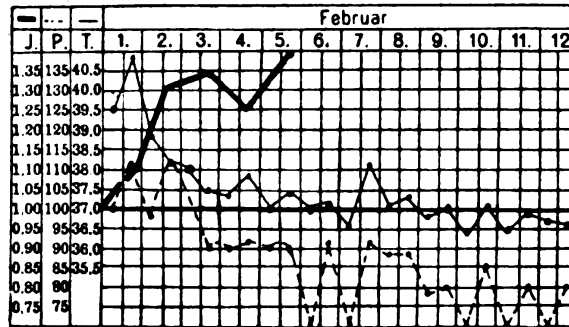
Diagnose: Endometritis puerperalis. Bronchitis.

Die Rivalentasche Probe wurde am 1. Febr. gemacht, sie ergab 1:700.

Puls, Temperatur und opson. Index: siehe Kurve.

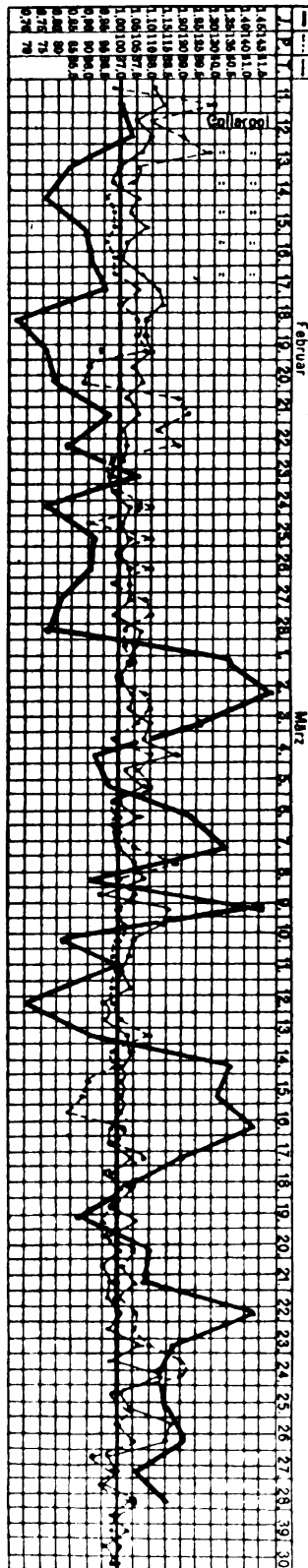
Resumé: Der Fall, der nur durch Ausräumung des Uterus und Alkoholspülung behandelt wurde, zeigt im Laufe der ersten Tage nach der Auskratzung ein spontanes beträchtliches Ansteigen des opsonischen Index bis auf 1,40 und gleichzeitiges Herabsinken von Temperatur und Puls, also auch hier der von uns bisher beobachtete Antagonismus.

Fall 18. Frau M. H. (Journ.-Nr. 100), 41 Jahre alt. Aufnahme 8. Jan. 1914. Maern; Rheumatismus. Menstruiert mit 14 Jahren; regelmäßig; seit 10 Jahren un-



Kurve 17.

regelmäßig, 1—4 Wochen aussetzend. 8 Entbindungen, bei der letzten Zange. Wochenbett fieberfrei. Keine Fehlgeburt. Letzte Menses Ende Dezember 1913.



Kurve 18.

Status: Mittelgroße Frau in gutem Ernährungszustand. Schwerer Krankheitseindruck. Thorax ohne Besond. Pulmon. Cor.: ohne Besond. Abdomenmäßige Adipositas, in den oberen Partien weich und eindrückbar, vom Nabel abwärts sind die Bauchdecken gespannt, es besteht hier Druckschmerzhaftigkeit, besonders links. Durch die Bauchdecken ist links ein Tumor zu palpieren, der nach rechts abfällt, links eine Hand breit über der Symphyse. Vaginal: Hinteres Scheidengewölbe fehlt, Uterus nicht zu palpieren, Tumor links sehr hoch sitzend, wölbt sich nach der Scheide nicht vor. Rechts kleinerer Tumor rektal. Hinter der Portio mäßige, derbe zungenartige Vorwölbung. Urin ohne Besonderes.

12. Jan. 1914: Der Tumor der rechten Seite erweist sich bei der Narkosenuntersuchung als der Uterus; dieser ist durch den links gelegenen doppelfaustgroßen Tumor, der von oben deutlich durch die Bauchdecken zu palpieren ist, nach rechts verdrängt worden. Probepunktion mit der Landauerschen Nadel: derbe Schwarten, Colieiter.

Eröffnung des Abszesses durch Schlittenmesser. Abfluß von 1 l stinkenden, zum Teil eingedickten Eiters, dem etwas Blut beigemischt ist.

28. Jan.: Fieber besteht noch. Im Blute Streptokokken nachweisbar (Schmorl).

10. Febr.: Bis heute Fieber bestanden. Pat. wurde 8mal mit Kollargol behandelt (100 ccm 5-proz. Kollargol mit 100 ccm Kochsalzlösung, rektal Tropfeneinlauf) und 1mal mit 30 ccm Antistreptokokkenserum (Tavel).

15. Febr.: Keine Streptokokken mehr im Blute nachweisbar (Schmorl). Fieber besteht immer noch.

16. Febr.: Vom 11. Febr. bis heute wurde Pat. wieder mit Kollargol behandelt (jeden Tag 200 ccm einer 5-proz. Kollargollösung mit 200 ccm Kochsalz-Tropfeneinlauf).

20. Febr.: Im Laufe der Sepsis entwickelte sich allmählich an der rechten Uteruskante eine dem Uterus aufsitzende Pyosalpinx, die sich mehr und mehr vergrößerte und den Bauchdecken näherte.

Lokalanästhesie, Eröffnung mit Flankenschnitt. Reichliche Eiterentleerung.

5. März: Wieder Puls- und Temperatursteigerung und links im Douglas eine sich vorwölbende schmerzhaftige Schwellung.

Vaginalinzision und Entleerung wieder reichlichen Eiters.

28. März: Das kleine Becken ist durch dicke Schwarten ausgefüllt. Uterus links, vom Abszesse nichts mehr nachweisbar; aus der Fistel keine Entleerung mehr.

Diagnose: Pyosalpinx duplex, Peritonitis, Streptokokkensepsis.

Im Laufe der Krankheit wurde die Rivalta'sche Probe 3mal ausgeführt; sie ergab:

13. Febr.: 1 : 1000, 19. Febr. 1 : 700, 27. März: 1 : 1800.

Die Abderhaldensche Reaktion ergab:

Die Stärke der Ninhydrinreaktion war: 27. März 1914:

- 1) Serum allein —.
- 2) „ mit Streptokokken (vom klin. Fall Nr. 24) + + + +.

- 3) Serum mit Staphylokokken —.
 4) „ mit einer unreinen Kultur von Streptokokken (vom klin. Fall Nr. 24) mit Stäbchen +.

Bei diesem Fall wurden zur Kontrolle zwei andere Proben angestellt:

Serum von Olga Voigt (Stat. 57):

- 1) Serum allein —.
 2) „ mit Streptokokken (Fall 24) +.
 3) „ mit Staph. pyog. aureus +.

Serum von Dr. Bertoloni:

- 1) Serum allein —.
 2) „ mit Streptokokken (Fall 24) +.
 3) „ mit Staph. pyog. aureus +.

Puls, Temperatur und opson. Index: siehe Kurve.

Resumé: An der Kurve dieses Falles imponiert in erster Linie der Tiefstand des opsonischen Index bis zum 28. Febr., wo beträchtliche Steigerung des Index auftrat, die wieder einem normalen, bald stark hypernormalen Verhalten platzmachte, ohne daß aus der Regellosigkeit der Kurven allzuviel herausgelesen werden kann; immerhin korrespondieren Senkungen am 13., 14., 18. und 19. Febr. mit Pulssteigerungen. Die Injektionen von Kollargol und Antistreptokokkenserum Tavel haben anscheinend keinen irgendwie ersichtlichen klinischen oder sonstigen Effekt erzeugt.

Fall 19. Fräulein J. A. (Journ.-Nr. 689), 23 Jahre alt. Aufnahme 14. Febr. 1914. Mutter an Blutvergiftung gestorben. Kinderkrankheiten. Erste Menses mit 20 Jahren, regelmäßig. 2 Jahre darauf Lungenspitzenkatarrh. Eine Entbindung, normal verlaufen (Kgl. Frauenklinik), am 9. Tage geheilt entlassen. 6 Tage später bekommt Pat. Kreuz- und Leibschmerzen, Erbrechen und Fieber.

Status: Mittelgroße mäßig genährte Pat. von blassem Aussehen. Thorax, Pulmon. beiderseits etwas schallverkürzt. Keine R.-Geräusche. Normales Atmen. Cor.: ohne Besond. Abdomen weich, Bauchdecken sehr schlaff, frische Striae.

p. vag.: Uterus retroflektiert, faustgroß, weich. Cervikalkanal offen, für 1 Finger nicht durchgängig. Adnexe frei. Blutiger Ausfluß. Bei vorsichtiger Dilatation der Cervix entleert sich Blut und Eiter aus dem Cavum uteri. Alkoholspülung.

15. Febr.: Im Blute keine pathogenen Keime nachweisbar (Schmorl).

18. Febr. p. vag.: Uterus retroflektiert, groß, weich, beweglich. Cervikalkanal noch offen. Adnexe frei. Alkoholspülung des Uterus.

23. Febr.: Aufrichtung des retroflektierten Uterus. Hodge-Pessar.

26. Febr.: Uterus wieder zurückgesunken. Aufrichtung, wieder Hodge-Pessar.

4. März: Uterus liegt gut im Ring. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Entlassen.

Diagnose: Retroflexio uteri mobilis. Endometritis purulenta. Bronchitis.

Puls, Temperatur und opson. Index: siehe Kurve.

Kurve ohne besondere Bedeutung.

Fall 20. Frau M. K. (Journ.-Nr. 672), 31 Jahre alt. Aufnahme 13. Febr. 1914. Masern und Diphtherie. Menstruiert mit 18 Jahren; immer regelmäßig. 3 Entbindungen, immer mit Zange beendet. 4mal abortiert; dabei immer ausgekratzt. Letzte Menses Mitte Oktober 1913. Leibschmerzen und geringe Blutung.

10. Febr.: Starke Blutung, große Leibschmerzen, Schüttelfrost mit Fieber.

12. Febr.: Spontaner Abgang des Fruchtwassers. Kommt mit Fieber in die Klinik.

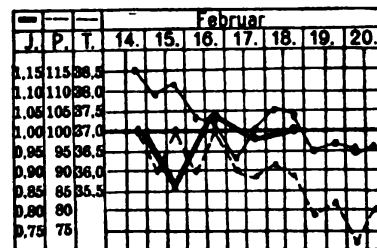
Status: Untermittelgroße, mäßig genährte Pat.

Thorax: Innere Organe ohne Besond. Abdomen weich, durch den graviden Uterus vorgewölbt.

p. vag.: Uterus kindskopfgroß. Fundus 2 Querfinger unter dem Nabel. Cervikalkanal offen, für 1 Finger nicht durchgängig; aus demselben entleert sich Blut.

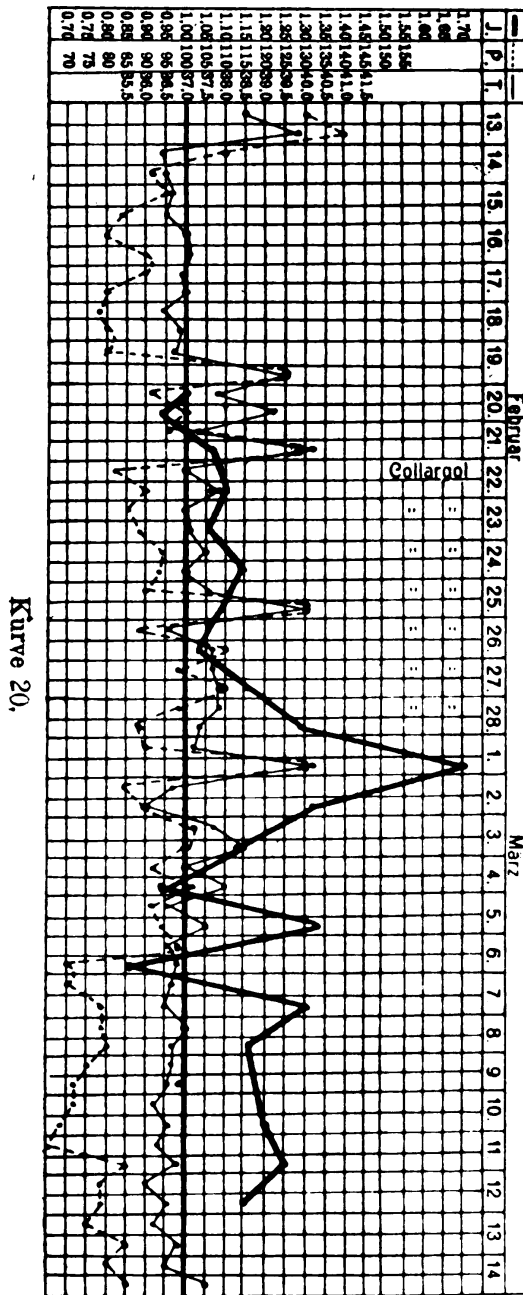
Dilatation mit Hegar. Ausräumung der Fehlgeburt im 5. Monat, Alkoholausspülung des Uterus.

20. Febr.: Temperaturanstieg und Schüttelfrost. p. vag.: Uterus noch groß, kontrahiert, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen. Im Bereich des rechten Parametriums findet sich ein apfelgroßer, derber, druckschmerzhafter Tumor, der rechte Oberschenkel ist etwas geschwollen, die Gesäßgegend druckschmerzhaft.



Kurve 19.

Am 22. Febr. Kollargol rektal: 25 ccm, 5-proz. in 100 ccm Kochsalzlösung. Im Blute keine pathogenen Keime (Schmorl).



Kurve 20.

25. Febr.: Erneuter Anstieg und Schüttelfrost. Der parametritische Tumor tritt tiefer, fühlt sich jedoch sehr derb an. Keine Fluktuation.

1. März 1914: Klagt über starke Schmerzen in der rechten Unterleibsseite.

3. März: Blutaussaat bleibt wieder steril (Schmorl).

5. März: Der rechtsseitige parametritische Tumor wölbt sich nach dem Scheidengewölbe zu vor und zeigt an der tiefsten Stelle deutlich Fluktuation. Punktion, Inzision und Drainage mit Gaze.

7. März: Gazedrainage entfernt.

12. März. p. vag.: Uterus autoflektiert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Die Incisionsöffnung des rechten Parametriums ist noch offen und entleert noch etwas Eiter. Sie ist von derben, schwartigen Resistenzen umgeben. Linke Adnexengegend frei.

16. März: Das rechte Parametrium noch derb infiltriert; noch geringer eitriger Fluor.

18. März: Auf Wunsch in Heilung entlassen.

Diagnose: Abortus febril. mens. V. Thrombophlebitis puerperalis. Parametritis dextra.

Die Kivaltasche Probe wurde 3mal ausgeführt, sie ergab: Am 20. Febr. 1:1000, am 26. Febr. 1:800, am 1. März 1:800.

Puls, Temperatur und opson. Index: siehe Kurve.

Resumé: Die Injektionen scheinen keinen besonders günstigen Einfluß gehabt zu haben.

Fall 21. Frau A. N. (Journ.-Nr. 816), 27 Jahre alt. Aufnahme 22. Febr. 1914. Masern, Diphtherie. Mit 12 Jahren menstruiert, regelmäßig. Im selben Jahre Rippenfellentzündung. — Keine Entbindung, keine Fehlgeburt. Letzte Menses Ende November. Pat. gibt an, am 2. Febr. Blutungen gehabt zu haben: am 17. soll die Frucht unter starker Blutung abgegangen sein. Ausgekratzt. Vom 20. Febr. an Schmerzen, Erbrechen, Fieber.

Kommt am 22. Febr. mit 38,6° Temp. und 112 Puls.

Status: Mittelgroße gutgenährte Pat. von blasser Gesichtsfarbe. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes.

Abdomen in den unteren Partien gespannt, mäßig druckschmerzempfindlich; etwas aufgetrieben.

p. vag.: Uterus vergrößert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe beiderseits nicht abtastbar, wegen Spannens, anscheinend frei. Schleimiger Fluor.

Am Nachmittag 39,1° Temp., Puls 134; 38,9, 124.

23. Febr. Pat. verfällt gegen Mittag plötzlich. Temperatur 38,2, Puls 120; klagt sehr über Leibschmerzen.

Opsonischer Index 1,54.

Laparotomie in Chloroformäthernarkose (Dr. Albert). Bei Eröffnung der Bauchhöhle entleert sich dünnflüssiger trübseröser Eiter; die Darmschlingen sind festverklebt. Der Uterus ist fibrinos belegt, ebenso die Tuben, besonders auf der Vorderfläche. In der Vorderwand des Uterus findet sich eine eitrig belegte Perforationsöffnung mit unregelmäßigem Rande, in die man den Finger einlegen kann. Dieselbe wird drainiert und zusammen mit der Bauchdrainage über der Symphyse nach außen drainiert. Oberhalb werden die Bauchdecken geschlossen, so daß eine 2 Querfinger breite Oeffnung oberhalb der Symphyse bleibt. Naht der Bauchdecken.

Die Pat. erholt sich etwas, hat wenig Schmerzen mehr. Tropfeinlauf, Sauerstoff. Allmählich wird sie jedoch sehr schläfrig, unklar und zunehmend schwächer.

24. Febr. früh 5 Uhr: Exitus letalis.

Diagnose: Peritonitis post abortum. Perforatio uteri.

Fall 22. Frau M. N. (Journ.-Nr. 1911), 27 Jahre alt. Aufnahme 26. Febr. 1914. Masern, Scharlach. Menstruiert mit 14 Jahren; regelmäßig. Eine Entbindung im Sept. 1912; dabei starke atonische Nachblutung. Eine Fehlgeburt am 20. Sept. 1913, wobei in dieser Klinik ausgeräumt wurde; am 1. Nov. wurde die Pat. geheilt entlassen. Pat. kommt wegen Blutungen wieder, die vor 3 Tagen anfangen. Letzte Menstruation war vor 5 Wochen.

Status: Mittelgröße, mäßig genährte Pat. von blassem Aussehen. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus vergrößert, weich, in Mittelstellung. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig; aus demselben entleert sich Blut. Ausräumung einer Fehlgeburt im 2. Monat. Ausspülung mit Alkohol des Uterus.

27. Febr. In der Blutaussaat sind keine pathog. Keime gewachsen (Schmorl).

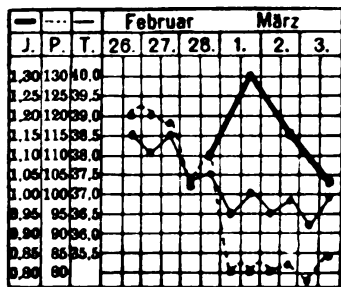
4. März. p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich, leichte perimetritische Schwellung. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Blutig tingierter Ausfluß.

10. März. p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich. Adnexe frei. Schleimiger Ausfluß. Geheilt entlassen.

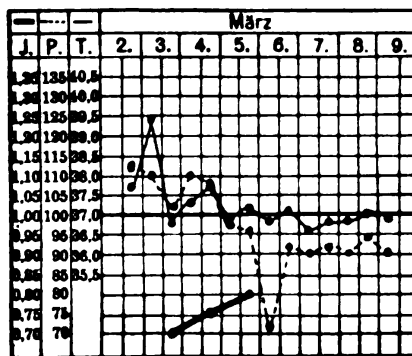
Diagnose: Abortus mens. 2/3. Anämie.

Die Rivaltasche Probe am 28. Febr. ergab 1:800.

Temperatur, Puls und opson. Index siehe Kurve. Kurve ohne Besonderes.



Kurve 22.



Kurve 23.

Fall 23. Fräulein M. H. (Journ.-Nr. 1965), 26 Jahre alt. Aufnahme 2. März 1914. Masern; sonst angeblich nie ernstlich krank. Erste Menses mit 17 Jahren; regelmäßig. Kein Abortus, kein Partus. Letzte Menses Anfang Januar. Pat. blutet seit dem 2. März.

Status: Mittelgröße, gut genährte Pat. von blassem Aussehen. Thorax: Innere Organe ohne Besonderes. Abdomen weich, nicht aufgetrieben.

p. vag.: Uterus anteflektiert, beweglich, vergrößert. Cervikalkanal für 1 Finger durchgängig; aus demselben entleert sich Blut.

Ausräumung einer Fehlgeburt im 3. Monat. Alkoholspülung, Tamponade.

3. März. Tamponade gezogen. Keine Nachblutung.

17. März. p. vag.: Uterus anteflektiert, kontrahiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei, bis auf eine leichte Druckempfindlichkeit der linken Tube.

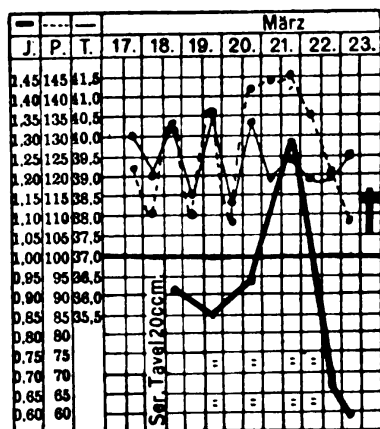
9. März. Normale Genitalien. Geheilt entlassen.

Diagnose: Abortus mens. 2/3.

Puls, Temperatur und op-on. Index siehe Kurve. Kurve ohne Bedeutung.

Fall 24. Frau A. H. (Journ.-Nr. 1246), 41 Jahre alt. Aufnahme 17. März 1914. Masern, Scharlach; sonst gesund. Menstruiert mit 15 Jahren; regelmäßig. 4 Entbindungen sind normal verlaufen. Keine Fehlgeburt. Letzte Periode Ende Nov. 1913. 6. März bekam Pat. leichte Blutungen, die dann stärker wurden, so daß sie in die Klinik kam. Dabei trat Fieber ein.

Status: Mittelgröße, mäßig gut genährte Pat. Thorax, innere Organe ohne Besonderes. Abdomen leicht aufgetrieben, etwas gespannt und druckschmerzempfindlich. Milz vergrößert.



Kurve 24.

p. vag.: Uterus anteflektiert, kontrahiert, durch Adhäsionen fixiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe nicht abtastbar. Die Parametrien sind resistent und druckschmerzempfindlich. Jedoch findet sich kein Exsudat oder Pyosalpinxtumor. Extremitäten: Leichtes Oedem der Knöchel.

18. März: Im Blute sind Streptokokken gewachsen (Schmorl).

Einspritzungen von 20 ccm Antistreptokokkenserum (Tavel) (Sächs. Serumwerk), subkutan.

19. März p. vag.: Uterus kontrahiert, anteflektiert. Cervikalkanal geschlossen. Adnexe frei. Parametrische Schwellung beiderseits. Keine Exsudatbildung. — 2. Injektion von 20 ccm Antistreptokokkenserum (Tavel) subkutan.

20. März: Genitalbefund unverändert. Schleimiger Ausfluß. Allgemeinzustand schlechter. Beschleunigte Atmung. Motorische Unruhe, Fieber und Puls hoch. — 3. Injektion von 20 ccm Antistreptokokkenserum (Tavel) subkutan.

21. März: 4. Injektion von 20 ccm Antistreptokokkenserum subkutan. Camphor. Tropfeneinlauf etc. — Abdomen aufgetrieben, kein Erbrechen. Stuhl und Urin werden von selbst entleert. Zeitweise unklar.

22. März: Pat. ist vollkommen benommen. Zunehmender Verfall.

23. März: Vormittags $\frac{1}{2}$, 11 Uhr Exitus letalis.

Diagnose: Streptokokkensepsis post abortum.

Die Rivaltasche Probe wurde 2mal vorgenommen: Das Resultat war folgendes: 18. März: 1:1400, 23. März (einige Stunden vor dem Tode): 1:1100.

Die Abderhaldensche Reaktion ergab folgendes:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

- 1) Serum allein —,
- 2) „ mit eigenen Streptokokken —,
- 3) - „ „ Staphylococcus pyog. aur. + + +.

Puls, Temperatur, opsonischer Index: siehe Kurve.

Trotz mehrfacher Injektionen von Antistreptokokkenserum geht die Pat. zugrunde, unter intensiver Senkung des Index, der 2 Tage vor dem Tode auf 1,27 gestiegen war, und nun im Laufe des letzten Tages von dieser Höhe auf 0,60 herabstieg.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden 24 klinischen Beobachtungen von Puerperalfiebererkrankungen unter Kontrolle von Puls, Temperatur und opsonischem Index sind zweifellos in mehrfacher Hinsicht interessant. Vor allen Dingen sind sie von prognostischem Wert für die Beurteilung solcher fieberhafter Erkrankungen, und hier müssen wir uns vor allen Dingen die letal verlaufenen 7 Fälle (Nr. 4, 5, 6, 9, 10, 11 u. 24) vor Augen halten, bei denen typisch kurz vor Eintritt des Todes der opsonische Index in höchst exquisiter Weise ganz beträchtlich herabsank. Ein solches Herabsinken des Index etwa mit einer

mangelhaften Zirkulation in diesen prämortalen Zuständen in Zusammenhang bringen zu wollen, dürfte illusorisch sein, da das Herabsinken des Index bei verhältnismäßig niedrigem (Fall 6 u. 11) wie bei sehr hohem Puls (Fall 4, 5, 9, 10) auftritt, während naturgemäß die Temperatur im wesentlichen eine gesteigerte war und auch natürlich die Pulsfrequenz vorwiegend erhöht war. Es ist vielmehr das exquisit tiefe Herabsinken des opsonischen Index als ein Zeichen der Erschöpfung der die Immunität innerhalb der schweren fieberhaften Infektionskrankheit hochhaltenden Faktoren zu betrachten. Die immunisatorischen, dem Widerstande gegen die Infektionen dienenden Kräfte erlahmen eben sichtlich, und deshalb stirbt der Mensch. Dieses Herabsinken der Immunität geht im allgemeinen im umgekehrten Parallelismus mit Puls und Temperatur einher. Die oben angeführten 6 tödlich verlaufenden Beobachtungen von an Puerperalfieber erkrankten Frauen gehören, was ihre schlagende Beweiskraft anlangt, zu den wichtigsten Befunden, welche seit der bekannten Arbeit von Mac Donald (die Prof. Strubell ausführlich in seiner Monographie „Zur Klinik der Opsonine“ zitiert) über das Verhalten des opsonischen Index bei der krupösen Pneumonie erhoben worden sind. Es unterliegt keinem Zweifel: die Patienten sterben unter gleichzeitigem exquisiten Fallen des opsonischen Index. Demgegenüber ist festzustellen, daß mit der klinischen Besserung eine deutliche Steigerung des opsonischen Index stattfindet (s. Fall 17), besonders aber dann, wenn diese Besserung durch Injektionen von Staphylokokkenvakzine herbeigeführt wird (s. Fall 1 u. 16, welche ganz außerordentlich charakteristisch sind).

Des weiteren ist aus einer verhältnismäßig großen Anzahl Kurven (s. Fall 1, 7, 14, 15, 17) das antagonistische Verhalten von Puls und Temperatur zu erkennen. Sinkt die Temperatur zur Norm herab und sinkt die vorher stark frequente Pulszahl, dann steigt der Index resp. nähert sich dauernd der Norm.

Die Injektionen von Kollargol haben wenige deutlich erkenntliche Resultate hervorgebracht; ebenso wie auch die Injektionen mit dem Antistreptokokkenserum Tavel, während die beiden Fälle mit Injektionen von Staphylokokkenvakzine zweifellos einen klinischen, auch aus den Kurven deutlich ersichtlichen guten Einfluß ausgeübt haben.

4. Kapitel.

Kaninchenversuche.

1. Serie: mit Staphylokokkenvakzine-Behandlung.

Kontrolle: Kaninchen Nr. 1. Gewicht 2700 g.

9. Dez. 1913: Feststellung des opsonischen Index und Einspritzung von 1 ccm einer *Staphylococcus albus*-Emulsion intravenös. Die Staphylokokken stammen vom klinischen Fall Nr. 1.

12. Dez.: Da im Blute keine Keime nachweisbar sind, injiziert man wieder 1 ccm von einer Emulsion von Staph. aur., alb., citr. intravenös.

17. Dez.: Untersuchungen des opsonischen Index: im Blute Staphylokokken nachweisbar durch Ausstrichpräparat. Für die nachfolgenden opsonischen Werte: siehe Kurve.

Im Gefolge von 2 Injektionen einer Emulsion lebender Staphylokokken intravenös senkt sich bereits der Index am 11. Dez. auf 0,75 und erholt sich wieder, steigt sogar im Verlaufe von 27 Tagen beinahe wieder bis zur Norm und fällt an diesen letzten beiden Tagen bis zum Exitus auf 0,40. Also auch hier geht dem Tode das Sinken des opsonischen Index voraus.

29. Dez.: Tod. Durch Sektion stellt man multiple Abszesse fest.

Kaninchen Nr. 2. Gewicht: 2500 g.

9. Dez. 1913: Feststellung des opson. Index, Einspritzung von 1 ccm einer Staph. alb.-Emulsion, intravenös. Die Staphylokokken stammen vom klinischen Fall Nr. 1.

11. Dez.: Da im Blute keine Keime nachweisbar sind, injiziert man wieder 1 ccm von einer Emulsion von Staph. aur. citr., intravenös.

17. Dez.: Bakteriologische Untersuchung des Blutes ergibt Staphylokokken.

Einspritzung von Staphylokokkenvakzine (2 Millionen Staphylokokken) subkutan.

19. Dez.: Zweite Einspritzung von Staphylokokkenvakzine (3 Mill. Staph.) subkutan.

21. „ Injektion von 5 Mill. Staph., subkutan.

23. „ „ „ 5 „ „

25. „ „ „ 10 „ „

27. „ „ „ 12 „ „

29. „ „ „ 20 „ „

31. „ Kaninchen wird getötet, um Blut zur Abderhaldenschen Probe zu gewinnen. Die Asche Probe ergibt:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Auf 2 Injektionen einer Emulsion lebender Staphylokokken intravenös sinkt der Index von der Norm herab auf 0,67 (am 17. Dez.), und nun wird jeden 2. Tag Staphylokokkenvakzine injiziert, und zwar verdünnt: Injektionen von 2 Mill., 3 Mill. bis zu 20 Mill. Staphylokokken. Der Index steigt 6 Tage nach der ersten Staphylokokkenvakzineinjektion auf 0,87; sinkt noch einmal bis auf 0,55 herab und steigt auf weitere Injektionen auf 0,87. Das Tier wurde 20 Tage nach der Infektion getötet, das ist an dem Tage, an dem das erste Kontrollkaninchen seiner Staphylokokkeninfektion erlegen ist. Abderhalden siehe oben. Jedenfalls ist der Index dieses mit Staphylokokkenvakzine behandelten Kaninchens am 20. Tage nach der ersten Infektion ungefähr normal.

Kaninchen Nr. 3. Gewicht: 2350 g.

9. Dez. 1913: Feststellung des opson. Index, Einspritzung von 1 ccm einer Staph. alb.-Emulsion, intravenös. Die Staphylokokken stammen vom klinischen Fall Nr. 1.

11. Dez.: Da im Blute keine Keime nachweisbar, injiziert man wieder 1 ccm von einer Emulsion von Staph. aur., alb., citr., intravenös.

17. Dez.: Die bakt. Untersuchung ist negativ. Einspritzung von Staphylokokkenvakzine: 2 Mill. Staph., subkutan.

19. Dez.: Einspritzung von Staphylokokkenvakzine, 3 Mill. Staph., subkutan.

21. „ Injektion von Staphylokokkenvakzine, 5 Mill. Staph., subkutan.

23. „ „ „ 5 Mill. Staph. Im Blut keine Keime nachweisbar. Tier 2mal gemessen: hohes Fieber.

25. Dez.: Injektion von 10 Mill. Staph.

27. „ „ „ 12 „ „

29. „ „ „ 20 „ „

31. „ Kaninchen wird getötet, um Blut zur Abderhaldenschen Probe zu gewinnen. Die Probe ergibt:

Stärke der Ninhydrinreaktion:

Auf 2 Injektionen von lebenden Staphylokokken senkt sich der Index nach kurzem Anstieg von der Norm auf 0,57 und zeigt auf mehrere Staphylokokkenvakzineinjektionen wieder auf 0,95. Das Tier wird ebenfalls am 20. Tage nach der Infektion getötet, und am 20. Tage stand der Index so hoch wie eben erwähnt.

Kaninchen Nr. 4. Gewicht: 2700 g.

9. Dez. 1913: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von 1 ccm einer Staph. alb.-Emulsion, intravenös. Die Staph. stammen vom klin. Fall Nr. 1.

11. Dez.: Da im Blute keine Keime nachweisbar sind, wird weiter injiziert mit 1 ccm einer Emulsion von Staph. aur., alb., citr., intravenös.

17. Dez.: Die bakteriologische Untersuchung ist positiv für Staph. Einspritzung von Staphylokokkenvakzine: 2 Mill. Staph., subkutan.

19. Dez.: Einspritzung von O., 3 Mill. Staph., subkutan.

21. " " 5

23. " Tod. "Kulturen aus dem "Herzblut" ergeben Staphylokokken.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Das Tier bekam 2 Injektionen der hochvirulenten Staphylokokkenemulsion vom klinischen Fall 1. Der Index sinkt nur wenig, steigt wieder bis zur Norm und sinkt nun trotz Staphylokokkenvakzineinjektionen bis zum 23. auf 0,45, wo der Exitus erfolgt.

Hier ist also die Infektion so mächtig gewesen, daß die Staphylokokkenvakzineinjektionen den Exitus nicht haben aufhalten können. Auch hier geht dem Exitus das beträchtliche Sinken des opsonischen Index gegen Staphylokokken voraus.

Die Injektionen von Staphylokokkenvakzine haben in 2 Fällen (2 u. 3) einen unverkennbar günstigen Einfluß gehabt, während in Fall 4 das Tier unter beträchtlicher Senkung des Index genau so zugrunde ging, wie das Kontrolltier.

2. Serie: Sublimatbehandlung.

Kaninchen Nr. 1. Kontrolle. Gewicht: 1580 g.

9. Jan. 1914: Feststellung des opson. Index und Einspritzung von 1 ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

11. Jan.: Keine Keime im Blute nachweisbar.

13. Jan.: Keime nachweisbar. Am Ohr, wo die Einspritzung vorgenommen wurde, hat sich ein Abszeß gebildet. Er wird eröffnet: im Eiter Staphylokokken.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

21. Jan.: Unter zunehmender Kachexie gestorben.

Im Verlaufe der experimentell erzeugten Staphylokokkeninfektion sinkt der Index bis auf 0,60 herunter; das Tier stirbt nach 20 Tagen.

Kaninchen Nr. 2. Gewicht: 1700 g.

9. Jan. 1914: Feststellung des opson. Index, Einspritzung von 1 ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

11. Jan.: Im Blute Staphylokokken nachweisbar.

13. " Erste Sublimatinjektion (1 mg), intravenös.

15. " Zweite " (2 "), "

17. " Dritte " (2 "), "

19. " Vierte " (2 "), "

21. " Tod. Leberabszesse, durch Autopsie festgestellt.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Der Index verhält sich nach intravenöser Injektion von lebenden Staphylokokken zunächst normal; auf Injektion von 1 mg Sublimat intravenös deutliche Steigerung, die den Index bis zu 1,50 hinauftreibt. Der Index bleibt hoch (1,25); nach 13 Tagen Tod. Leberabszeß.

Kaninchen Nr. 3. Gewicht: 1800 g.

8. Jan. 1914: Feststellung des opsonischen Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

10. Jan.: Im Blute Staph. nachweisbar.

13. " Erste Sublimatinjektion, 1 mg, intravenös.

15. " Zweite " 2 " "

17. " Dritte " 2 " "

19. " Vierte " 2 " "

21. " Fünfte " 2 " "

30. " Tod unter zunehmender Kachexie.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Auch hier bewirken ein paar Sublimatinjektionen ganz beträchtliche Steigerungen des opsonischen Index, bis auf 1,55; trotzdem erfolgt nach 22 Tagen der Exitus.

Kaninchen Nr. 4. Gewicht: 1440 g.

9. Jan. 1914: Feststellungen des opson. Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

10. Jan.: Im Blute Staph. nachweisbar.
 13. „ Erste Sublimatinjektion, 1 mg, intravenös.
 15. „ Zweite „ 2 „ „
 17. „ Dritte „ 2 „ „
 19. „ Vierte „ 2 „ „
 21. „ Fünfte „ 2 „ „
 23. „ Getötet, um Blut zur Abderhaldenschen Probe zu gewinnen.

Die Probe ergab:

Durch Sublimatinjektionen nach Infektion mit lebenden Staphylokokken sehr beträchtliche Steigerung des opsonischen Index. Der Index fällt aber wieder herunter auf 0,70. Das Tier wird nach 13 Tagen getötet behufs Blutentnahme für Abderhalden.

In sämtlichen drei Sublimatversuchen imponiert eine sehr beträchtliche Steigerung des Index.

3. Serie: Kollargolbehandlung.

Kaninchen Nr. 1. Kontrolle. Gewicht: 1750.

10. März 1914: Feststellung des opsonischen Index. Einspritzung von 1 ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur. intravenös.

Tod nach 35 Std.

Das Tier geht 18 Std. nach intravenöser Injektion von Staph. pyog. aureus zugrunde; daher keine Kurven.

Kaninchen Nr. 1a. Gewicht: 2100 g.

13. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von 1 ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

16. Jan.: Im Blute Staphylokokken nachweisbar.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Das Tier geht als Kontrolltier trotz der Infektion nach 12 Tagen nicht ein.

Kaninchen Nr. 2. Gewicht: 1500 g.

10. März 1914: Feststellung des opsonischen Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

15. März: Bakteriologische Untersuchung des Blutes ergibt Staphylokokken.

16. „ Erste Einspritzung von 1 ccm Kollargol, 1-proz. Lösung, intravenös.

17. „ Zweite „ 2 ccm dgl. intravenös.

18. „ Dritte „ 2 „ „ „

19. „ Vierte „ 2 „ „ „

20. „ Fünfte „ 2 „ „ „

22. „ Sechste „ 2 „ „ „

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Das Tier bekommt nach Infektion mit Staphylokokken Kollargoleinspritzungen, die zweifellos eine beträchtliche Steigerung des Index hervorrufen, bis auf 1,30; der Index sinkt dann wieder auf 0,82.

Kaninchen Nr. 3. Gewicht: 1800 g.

10. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von Staph. pyog. aur., intravenös.

15. März: Bakteriologische Untersuchung des Blutes ergibt keine Staphylokokken.

16. März: Erste Einspritzung, 1 ccm Kollargol, 1-proz., intravenös. Im Blute wieder keine Staph. nachweisbar.

17. März: Im Blute sind Staphylokokken nachweisbar. Zweite Einspritzung 2 ccm Kollargol, 1-proz., intravenös.

18. März: Dritte Einspritzung 2 ccm Kollargol, 1-proz., intravenös.

19. " Vierte " 2 " " " "

20. " Fünfte " 2 " " " "

22. " Sechste " 2 " " " "

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Auch hier bewirkt die Injektion von Kollargol Steigerung des opsonischen Index. Derselbe geht wieder herunter, steigt wieder und sinkt erneut. Jedenfalls scheint es, als wenn das Kollargol hier eine, wenn auch vorübergehende Wirkung erzielt hätte.

Kaninchen Nr. 4. Gewicht: 1500 g.

10. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von *Staph. pyog. aur.*, intravenös.

15. März: Bakteriologische Untersuchung des Blutes ergibt Staphylokokken.

16. " Erste Einspritzung 1 ccm Kollargol, 1-proz., intravenös.

17. " Zweite " 2 " " " "

18. " Dritte " 2 " " " "

19. " Vierte " 2 " " " "

20. " Fünfte " 2 " " " "

22. " Sechste " " " " " "

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Der weitere Verlauf wurde bei diesen 4 Kaninchen nicht weiter verfolgt. Die Kollargolwirkung ist hier noch ausgesprochener als im vorhergehenden Fall, auch die darauf folgende Senkung. Rückkehr zur Norm.

Der weitere Verlauf wurde bei diesen 4 Kaninchen nicht verfolgt. Jedenfalls erhellt aus diesen Versuchen, daß auch das Kollargol einen gewissen Einfluß auf den opsonischen Index bei infizierten Tieren hat.

4. Serie: Terpentinsbehandlung.

(Fixationsabszesse nach Fochier.)

Kaninchen Nr. 2. Gewicht: 1780 g.

23. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von *Staph. pyog. aur.*, intravenös.

25. März: Im Blute sind keine Bakterien nachweisbar. Es besteht Fieber. Einspritzung von 1 ccm *Oleum terpentini* in die Innenseite beider Oberschenkel, subkutan.

27. März: An beiden Oberschenkeln wenig Reaktion.

28. März: Am rechten Oberschenkel geringes Infiltrat; am linken Nekrose der Haut.

1. April: Das Infiltrat wird geöffnet, es entleert sich ganz wenig steriler Eiter.

2. April: Kaninchen wird getötet.

Opsonischer Index siehe Kurve.

Die Anlegung des Fixationsabszesses durch Einspritzung von *Oleum terpentini* in die Oberschenkel erzeugt eine deutliche Steigerung des opsonischen Index des mit Staphylokokken infizierten Tieres, bis auf 1,30. Der Index sinkt später auf 0,70.

Kaninchen Nr. 1. Kontrolle. Gewicht: 1550 g.

23. Febr. 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung einer Emulsion: $\frac{1}{2}$ ccm von *Staph. pyog. aur.*, subkutan.

25. Febr.: Im Blute sind *Staph.* nachweisbar.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

2. März: Tötung des Tieres.

Die experimentelle Staphylokokkeninfektion des Tieres verläuft ohne beträchtliche opsonische Schwankungen. Das Tier wird getötet.

Kaninchen Nr. 3. Gewicht: 2100 g.

23. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung einer Emulsion: $\frac{1}{2}$ ccm von *Staph. pyog. aur.* subkutan.

Das Tier stirbt nach einigen Stunden (Embolie?).

Kaninchen Nr. 3a. Gewicht 2300 g.

23. März 1914: Feststellung des opson. Index. Einspritzung von $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von *Staph. pyog. aur.*, subkutan.

25. März: Im Blute sind keine *Staph.* nachweisbar. Fieber vorhanden. Einspritzung von 1 ccm *Ol. terpentini* in beide Oberschenkel subkutan.

27. März: Links Nekrose der Haut; sonst keine Reaktion. Rechts kleines Infiltrat; es wird geöffnet, es entleert sich aber kein Eiter.

30. März: Tötung des Tieres.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Hier erzeugt der Fixationsabszeß brüske opsonische Schwankungen nach oben.

Kaninchen Nr. 4. Gewicht: 2000 g.

23. Febr. 1914: Feststellung des opson. Index, Einspritzung $\frac{1}{2}$ ccm einer Emulsion von *Staph. pyog. aur.*, subkutan.

25. Febr.: Im Blute sind Staphylokokken nachweisbar. Einspritzung von 1 ccm *Ol. terpentini* in beide Oberschenkel subkutan.

27. Febr.: Rechts Nekrose der Haut; sonst keine Reaktion. Links geringe Nekrose der Haut und geringes Infiltrat.

1. März: Eröffnung des kleinen Infiltrates; es entleert sich kein Eiter, steril.

2. März: Tier getötet.

Opsonischer Index: siehe Kurve.

Auch hier wie bei dem vorhergehenden Falle erzeugt der Fixationsabszeß brüske opsonische Schwankungen nach oben.

Die bakterizide Kraft des Blutes wurde bei allen 4 Kaninchen untersucht. Es erübrigt sich, darüber zu schreiben, da die Resultate kein abschließendes Urteil erlaubten.

Zusammenfassung.

Meine Kaninchenversuche ergaben, daß die Injektionen von Staphylokokkenvakzine und von Sublimat die günstigsten Erfolge aufwiesen, während die Behandlung künstlicher Staphylokokkeninfektionen mit Kollargol und Terpentin (Fixationsabszeß) keine besonders schlagenden Resultate ergeben hat.

Allgemeine Zusammenfassung.

Die Aufgabe, die ich mir in dieser Arbeit gestellt habe, war, die Bedeutung der verschiedenen Immunitätstheorien und die auf ihnen aufgebaute Methodik für die klinische Diagnose, Prognose und Behandlung des Puerperalfiebers zu erörtern. Der auf solche Weise formulierte Kern der Arbeit führte aber naturgemäß dazu, daß der Rahmen derselben ein ziemlich weiter geworden ist und ihr Umfang viel größer, als ich eigentlich beabsichtigt hatte. Der mit Immunitätsfragen und den einschlägigen Methoden nicht genau Vertraute wird daher manche der hier erörterten Fragen außerhalb des Bannkreises einer Arbeit über das Puerperalfieber verweisen. Der Fachmann aber wird den roten Faden nicht verkennen, der sich durch alle unsere Betrachtungen hindurchzieht. Es ist naturgemäß, daß der *Genius loci* nicht ohne Einfluß auf die Entwicklung meiner Arbeit sein konnte. Und so ist denn, trotz eingehender kritischer Erörterung der einschlägigen Immunitätstheorien

und Methoden, der opsonischen Betrachtungsweise ein um so breiterer Raum gelassen worden, als ja die Untersuchung des opsonischen Index bei unseren Patientinnen sich als die einzige Immunitätsreaktion darstellt, welche wir in Rücksicht auf die brusken Schwankungen des Allgemeinbefindens wie von Temperatur und Puls beim Puerperalfieber und ohne Rücksicht auf die äußerst geringe Belästigung der Patientinnen bei der Blutentnahme, täglich mehrmals wiederholt haben und wiederholen konnten.

Die bei der Feststellung opsonischer Immunitätskurven geleistete Arbeit ist außerordentlich groß, bedeutend größer, als der mit dieser Arbeit nicht genau Vertraute sich vorstellen kann. Die dabei erzielten Resultate sind aber von nicht zu unterschätzender, klinisch-diagnostischer und prognostischer Wichtigkeit, wie denn der Feststellung des opsonischen Index auch für die Therapie dieser Erkrankung eine hohe Bedeutung zugesprochen werden muß. So viel erhellt jedenfalls aus meinen klinischen Untersuchungen, daß die Kurve des opsonischen Index sich in einem umgekehrten Verhältnis befindet zur Höhe des Pulses und der Temperatur. Bei hohem Fieber und entsprechend hohem Verhalten der Pulszahl sinkt der Index oft beträchtlich, während ein Steigen des letzteren mit einem Sinken von Temperatur und Pulszahl ziemlich typisch einhergeht. Bei den 7 von uns hier beobachteten Todesfällen nach Puerperalfieber stürzte der Index am Tage vor dem Tode und am Todestage selbst von der ursprünglichen, oft noch beträchtlichen Höhe herab in einer Weise, welche an der katastrophalen Bedeutung dieses Immunitätssturzes keinen Zweifel übrig läßt (vergleiche Mac Donalds Untersuchungen über das Verhalten des opsonischen Index bei der Krise, Lyse und dem tödlichen Ausgang bei der Pneumonie).

Von den verschiedenen beim Puerperalfieber angewendeten therapeutischen Maßnahmen war klinisch sowohl wie vom Standpunkte der opsonischen Immunitätsreaktion die Behandlung mit Staphylokokkenvakzine am wirksamsten. Leider konnten nur einige wenige Fälle dieser therapeutischen Maßnahme unterzogen werden. — Die Wirkung des Kollargol ist in manchen Fällen eine erfreuliche, erscheint mir aber vom theoretischen sowohl wie vom praktischen Standpunkte aus recht unsicher.

Was nun meine Kaninchenversuche anlangt, so sah ich bei mit virulenten Staphylokokkenkulturen intravenös infizierten Tieren einen günstigen opsonischen Effekt bei der Injektion von Staphylokokkenvaccine wie von Sublimat, während die Anwendung des Kollargols und Terpentins (Fixationsabszeß) keinen sehr dezidierten Einfluß erkennen ließ.

Es ist mir eine angenehme und dringende Pflicht, dem Leiter der Abteilung für Vakzinetherapie, Herrn Prof. Dr. med. A. Strubell, für die lebenswürdige Gastfreundschaft, die er mir monatelang während dieser sehr ausführlichen Experimentalarbeit in seinem Laboratorium in Dresden gewährt hat, sowie für die äußerst mannigfache Anregung und Unterstützung meiner Forschungen wie für sein nimmer ermüdendes Interesse an denselben meinen wärmsten und ergebensten Dank auszusprechen. Herrn Prof. Albert sage ich meinen allerbesten Dank für die sehr freundliche Ueberlassung seines klinischen Materials.

Nachdruck verboten.

Studien über die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Sendai, Japan
(Direktor: Prof. Dr. K. Aoki).]

II. Mitteilung.

Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunseris.

Von Prof. Dr. K. Aoki und Dr. T. Konno.

In der vorigen Mitteilung hatten wir schon bemerkt, daß man bei der Immunisierung der Kaninchen mit Typhusbazillen, je nach dem Grade derselben, Sera erhalten kann, welche Paratyphus B-Bazillen verschieden stark agglutinieren. Wurden die Tiere so stark immunisiert, daß der Titer der Hauptagglutination nicht mehr zunehmen konnte, das heißt, die Tiere überimmunisiert wurden, so agglutinierten Paratyphus B-Bazillen in diesen Immunsera in den meisten Fällen so stark wie die Typhusbazillen selbst. Wir hatten dabei aber als Immunantigen 6 Stämme von Typhusbazillen, als agglutinierende Bakterien aber nur 1 Stamm der Paratyphus B-Bazillen geprüft. Deshalb wissen wir noch nicht, ob alle Stämme von Paratyphus B-Bazillen in den Typhusimmunseris sich immer so verhalten, wie oben angeführt ist. Ferner muß die andere Frage noch genauer erörtert werden, ob die sämtlichen Stämme von Typhusbazillen als Antigen sich immer gleich verhalten. Wir bemerkten nämlich schon, in der 1. Mitteilung, daß man nur mit dem 1 Stamme niemals solche Sera herstellen konnten mit einer so hohen Mitagglutination, wie die Hauptagglutination.

Infolgedessen beabsichtigten wir, hier zuerst die 1. Frage näher zu studieren. Da wir einerseits eine Anzahl von Typhusimmunseren, welche von überimmunisierten Tieren gewonnen wurden und verschieden starke Haupt- und Mitagglutination innehatten, andererseits viele Stämme

von Paratyphus B-Bazillen in unserer Sammlung vorrätig haben, wurde versucht, mit diesem großen Material die obige Frage zu lösen.

24 Arten Typhussera wurden in Anwendung gebracht, welche von Kaninchen mit 6 Stämmen von Typhusbazillen hergestellt worden waren und den Titer der Hauptagglutination von 1:10 000—1:20 000, selten 1:50 000 zeigten. Sie wurden, je nach dem Titer der Mitagglutination, in 3 Gruppen geteilt.

Die 1. Gruppe umfaßte diejenigen Sera, bei welchen die Mitagglutination einen so hohen Titer zeigte, wie die Hauptagglutination. Ihr gehörten im ganzen 10 Sera, nämlich K. 298, 345, 293, 326, 265, 383, 353, 354, 385 und 237 an. Wenn man in diesem Falle die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination durch einen Bruch ausdrückte, wobei der Titer der Hauptagglutination als Zähler und der der Mitagglutination als Nenner genommen wurde, wie in der 1. Mitteilung angegeben, so betrug der Wert des Bruches bei diesen 10 Seren von $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{1}$, selten $\frac{2}{1}$. Diese Sera dürften für diagnostische Zwecke nicht geeignet sein.

Zur 2. Gruppe gehörten die Sera, bei welchen der Titer der Mitagglutination von 1:500—1:2000, selten 1:5000 stark war. Bei ihnen wurde der Wert des Bruches von $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{40}$. Es waren im ganzen 7, nämlich K. 292, 290, 287, 295, 288, 344 und 320.

Die übrigen zu der 3. Gruppe gehörenden Sera gaben den Titer der Mitagglutination von 1:50—1:200. Der Wert des Bruches war bei ihnen $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{250}$, selten $\frac{1}{50}$. Es waren im ganzen 7, nämlich K. 370,

Tabelle I.

Name der Immunsera	Hauptagglutination	Mitagglutination	Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination
I. Gruppe K 298	20 000	20 000	$\frac{1}{1}$
K 345	20 000	20 000	$\frac{1}{1}$
K 293	10 000	20 000	$\frac{2}{1}$
K 326	20 000	20 000	$\frac{1}{1}$
K 265	10 000	10 000	$\frac{1}{1}$
K 383	10 000	10 000	$\frac{1}{1}$
K 353	20 000	50 000	$\frac{2 \cdot 5}{1}$
K 354	20 000	20 000	$\frac{1}{1}$
K 385	20 000	10 000	$\frac{1}{2}$
K 237	10 000	10 000	$\frac{1}{1}$
II. Gruppe K 292	10 000	2 000	$\frac{1}{5}$
K 290	10 000	5 000	$\frac{1}{2}$
K 287	10 000	2 000	$\frac{1}{5}$
K 295	20 000	1 000	$\frac{1}{20}$
K 288	10 000	1 000	$\frac{1}{10}$
K 344	20 000	500	$\frac{1}{40}$
K 320	20 000	500	$\frac{1}{40}$
III. Gruppe K 370	50 000	200	$\frac{1}{250}$
K 235	10 000	200	$\frac{1}{50}$
K 386	50 000	200	$\frac{1}{250}$
K 285	10 000	100 ±	$\frac{1}{100}$
K 286	10 000	50	$\frac{1}{200}$
K 233	10 000	50	$\frac{1}{200}$
K 247	10 000	50	$\frac{1}{200}$

Bemerk.: T. = Typhusbazillen, B. = Paratyphus B-Bazillen.

235, 386, 285, 286, 233 und 247; die Sera würden für diagnostische Zwecke am geeignetsten sein (Tab. 1).

Als Bakterien wurden 30 Stämme von Paratyphus B-Bazillen aus unserer Sammlung ausgewählt, welche alt und frisch von typhös erkrankten Menschen gezüchtet worden waren, wobei nicht versäumt wurde, streng biologisch und agglutinatorisch zu prüfen, daß sie sicher typische Paratyphus B-Bazillen waren.

Versuch 1.

Zuerst wurde geprüft, wie stark sämtliche Stämme der Paratyphus B-Bazillen in 10 Typhusimmunsera agglutinieren können, welche zu der 1. Gruppe gehörten und eine recht hohe Mitagglutination zeigten. Der Titer der Mitagglutination war nämlich bei den Seren ebenso hoch, wie der der Hauptagglutination der betreffenden Sera. Es stellte sich heraus, daß sämtliche Stämme der Paratyphus B-Bazillen agglutinatorisch in 2 Gruppen zu teilen waren, zu deren ersten 19 Stämme gehörten, nämlich Nr. 1,

Tabelle II.

	K. 928, Ty. 38, Im.-Ser., T. 20000, B. 20000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 345, Ty. 38, Im.-Ser., T. 20000, B. 20000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 393, Ty. 39, Im.-Ser., T. 10000, B. 20000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ² / ₁	K. 326, Ty. 41, Im.-Ser., T. 20000, L. 20000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 265, Ty. 40, Im.-Ser., T. 10000, B. 10000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 383, Ty. 41, Im.-Ser., T. 10000, B. 10000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 353, Ty. 39, Im.-Ser., T. 20000, B. 50000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ² / ₁	K. 354, Ty. 40, Im.-Ser., T. 20000, B. 20000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁	K. 385, Ty. 41, Im.-Ser., T. 20000, B. 10000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₂	K. 237, Ty. 42, Im.-Ser., T. 10000, B. 10000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination ¹ / ₁
Paratyph. B 1	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1
2	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
3	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
4	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
8a	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	2·5/1	1/1	1/2	1/1
9	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	2·5/1	1/1	1/2	1/1
10	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
14	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
19	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	2·5/1	1/1	1/2	1/1
20	1/1	1/2	2/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/2	1/2	1/1
22	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/2	2·5/1	1/1	1/2	1/1
23	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/2	2·5/1	1/1	1/2	1/1
24	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2·5/1	1/1	1/2	1/1
25	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2	1/1
26	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/2	2·5/1	1/1	1/2	1/1
27	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	2·5/1	1/1	1/2	1/1
28	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	2·5/1	1/1	1/2	1/1
29	1/2	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
36	1/1	1/1	2/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1
17	1/4	1/4	1/1	1/1	1/1	1/5	2·5/1	1/1	1/2	1/2
11	1/100-1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/100	1/200	1/100
12	1/100	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/100	1/200	1/100
13	1/100	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/100	1/200	1/100
16	1/100	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/100	1/200	1/100
18	1/100	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/200	1/100	1/200	1/100

Bemerk.: T = Typhusbazillen, B = Paratyphus B-Bazillen.

2, 3, 4, 8, 9, 10, 14, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 und 36. Zu der 2. gehörten die 5 Stämme Nr. 11, 12, 13, 16 und 18.

Die Mikroben der 1. Gruppe agglutinierten in den geprüften Seris fast ebenso hoch, wie der angegebene Titer der Mitagglutination derselben Sera. In diesem Falle wurde der Wert des Bruches $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{11}$, selten $\frac{2}{1}$. Die 5 anderen Stämme, welche zu der 2. Gruppe gehörten, zeigten aber ein ganz anderes Verhalten, indem sie 10 Sera ohne Ausnahme in viel geringerem Grade agglutinierten. Dabei war es ganz gleichgültig, ob die Typhusimmunsera eine recht hohe Mitagglutination in den Mikroorganismen zeigten, womit der Titer der Mitagglutination austitriert wurde. Diese 5 Stämme agglutinierten nämlich in allen Sera von 1:50—1:100, ganz selten 1:200. Der Wert des Bruches wurde deshalb von $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{200}$. Hier ist zu bemerken, daß wir noch 1 Stamm übrig haben, welcher gerade zwischen den 2 Gruppen steht, nämlich Nr. 17, der in diesen Immunseren schwächer agglutinierte als die Stämme der 1. Gruppe, aber noch stärker, als die zu der 2. Gruppe gehörenden anderen Stämme (Tab. 2).

Versuch 2

wurde angestellt, um festzustellen, wie stark dieselben Stämme der Paratyphus B-Bazillen in 7 Seren agglutinieren können, welche zu der 2. Gruppe gehörten. Der

Tabelle III.

	K. 292, Ty. 38, Im.-Ser., T. 10000, B. 2000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{5}$	K. 290, Ty. 42, Im.-Ser., T. 10000, B. 5000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{5}$	K. 287, Ty. 39, Im.-Ser., T. 10000, B. 2000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{5}$	K. 295, Ty. 42, Im.-Ser., T. 20000, B. 1000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{50}$	K. 288, Ty. 40, Im.-Ser., T. 10000, B. 1000. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{10}$	K. 344, Ty. 37, Im.-Ser., T. 20000, B. 500. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{40}$	K. 320, Ty. 37, Im.-Ser., T. 20000, B. 500. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{40}$
Paratyphus B 1	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
2	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$
3	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{100}$
4	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$
8a	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
9	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
10	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
14	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
19	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$
20	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
22	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$
23	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
24	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
25	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
26	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
27	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{40}$
28	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
29	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
36	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
17	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{40}$
11	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
12	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
13	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{200}$
16	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
18	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$

Bemerk.: T. = Typhusbazillen, B. = Paratyphus B-Bazillen.

Titer der Mitagglutination war bei ihnen von 1:500—1:2000, selten 1:5000. Das Resultat war bei diesem Versuche im großen und ganzen dasselbe, wie bei dem 1., wo die zu der 1. Gruppe gehörenden Sera gebraucht wurden. Wir konnten nämlich alle Stämme wiederum in 2 Gruppen teilen, welche ganz mit denen übereinstimmten, welche bei dem vorigen Versuche festgestellt worden waren. 19 Stämme der Bakterien, welche der 1. Gruppe zuzurechnen waren, zeigten bei diesem Versuche auch einen gerade so hohen Titer der Mitagglutination, wie die geprüften Sera angegeben hatten, indem der Titer der Mitagglutination von 1:5000—1:500, selten 1:2000 betrug. Der Wert des Bruches zeigte sich deshalb groß, von $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{20}$, selten $\frac{1}{100}$. Hier ist zu bemerken, daß der so kleine Wert wie $\frac{1}{100}$ nur bei solchen Seren nachzuweisen war, welche einen niedrigsten Titer der Mitagglutination unter der Gruppe zeigten, nämlich von 1:500. Die übrigen 5 Stämme, die zu der 2. Gruppe gehörten, mitagglutinierten dagegen darin sehr schwach, ganz unabhängig vom Titer der Mitagglutination der geprüften Sera, wie schon beim 1. Versuche festgestellt wurde; er betrug von 1:50—1:100 und der Wert des Bruches von $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{300}$. Der Stamm Nr. 17 verhielt sich hier ganz ebenso, wie bei dem 1. Versuche (Tab. 3).

Versuch 3.

Zum Schlusse wurde geprüft, wie stark dieselben Stämme der Paratyphus B-Bazillen in den anderen 7 Sera agglutinieren können, welche zu der 3. Gruppe gehörten, deren Mitagglutinationstiter 1:50—1:200, der des Bruches von $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{200}$, selten $\frac{1}{50}$ oder $\frac{1}{250}$ betrug. Es ergab sich, daß der Unterschied der Stämme der Paratyphus B-Bazillen, den man durch die Anwendung der Seren aus der 1. und 2. Gruppe festgestellt hatte, hier kaum deutlich nachgewiesen werden konnte. Die Stämme der 1. Gruppe agglutinierten nämlich in den 3 Seris, nämlich K. 370, 235 und 386, welche 1:200 hohe Mitagglutination zeigten, etwas stärker, als die Mikroorganismen aus der 2. Gruppe. Aber dieser Unterschied war so gering, daß man damit nichts anfangen konnte. In den übrigen 4 Seris, welche einen noch niedrigeren Titer der Mitagglutination hatten, nämlich 1:50, agglutinierten die sämtlichen Stämme in wesentlich geringerem Grade, so daß man hier keinen Unterschied unter den Stämmen finden konnte (Tab. 4).

Aus diesen Ergebnissen kann man wohl schließen, daß die Paratyphus B-Bazillen durch die Anwendung zur 1. und 2. Gruppe gehöriger Typhussera, die eine recht hohe Mitagglutination der Mikroorganismen zeigten, in 2 Unterarten geteilt werden können, deren eine leicht, die andere schwer mitagglutinable Stämme enthält. Durch die Anwendung zu der 3. Gruppe gehöriger Sera mit niedriger Mitagglutination war diese Differenzierung der Stämme kaum nachzuweisen. Deshalb könnte man immer eine niedrige Mitagglutination der Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunsera feststellen, falls ein schwer mitagglutinabler Stamm auffälligerweise zur Anwendung gezogen würde. Der Titer der Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunseris ist nämlich von dem Stamme derselben abhängig, womit der Titer derselben in Typhusimmunsera austitriert wird. Infolgedessen kann man die Erscheinung, daß der Titer der Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunseris in den meisten Fällen ebenso hoch wird, wie der Titer der Hauptagglutination, wenn die Sera von einem überimmunisierten Tiere abstammten, nur in dem Falle erwarten, wo ein leicht mitagglutinabler Stamm gebraucht wird. Gebraucht man dagegen dabei einen schwer mitagglutinablen Stamm, so wird eine ganz andere Erscheinung nachgewiesen.

Nun fragt es sich aber, wie häufig dieser schwer mitagglutinable Stamm unter den anderen gefunden wird und ob diese schwere Mitagglutinabilität des betreffenden Stammes beständiger Natur ist. Nach unseren geringen Erfahrungen scheint dieser schwer mitagglutinable

Stamm nicht so häufig vorzukommen, denn wir konnten nur 4 Stämme dieser Art unter 30 Stämmen von Paratyphus B-Bazillen finden. Ferner scheint diese schwere Mitagglutinabilität derselben beständiger Natur und dem betreffenden Stamme eigentümlich zu sein, denn wir konnten hier wiederum 3 Stämme der Paratyphus B-Bazillen als schwer mitagglutinabel feststellen, die schon 3 Jahre vorher als schwer mitagglutinabel befunden worden waren.

Diese zuerst von uns bemerkte Erscheinung, daß die Paratyphus B-Bazillen durch solche Typhusimmunsera, welche eine recht hohe Mitagglutination dieser Mikroorganismen beibehalten, in 2 Unterarten zu teilen sind, nämlich in eine leicht und eine schwer mitagglutinabel, scheint nicht nur biologisch interessant, sondern auch praktisch insofern bedeutsam, als man durch die Anwendung dieses schwer mitagglutinablen Stammes vielleicht solche Sera feststellen könnte, in welchen

Tabelle IV.

	K. 370, Ty. 37, Im.-Ser., T. 50 000, B. 200. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{250}$	K. 235, Ty. 40, Im.-Ser., T. 10 000, B. 200. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{50}$	K. 386, Ty. 42, Im.-Ser., T. 50 000, B. 200. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{250}$	K. 285, Ty. 37, Im.-Ser., T. 10 000, B. 100 ±. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{100}$	K. 286, Ty. 38, Im.-Ser., T. 10 000, B. 50. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{200}$	K. 233, Ty. 39, Im.-Ser., T. 10 000, B. 50. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{200}$	K. 247, Ty. 41, Im.-Ser., T. 10 000, B. 50. Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination $\frac{1}{200}$
Paratyphus B 1	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
2	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
3	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
4	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$
8a	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
9	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
10	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
14	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
19	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
20	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
22	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
23	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
24	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
25	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
26	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
27	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
28	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
29	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
36	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
17	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
11	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
12	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
13	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
16	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$
18	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{200}$

Bemerk.: T. = Typhusbazillen, B. = Paratyphus B-Bazillen.

Typhus-Paratyphus B-Bazillen sehr hoch im gleichen Grade agglutinieren, gleichgültig, ob sie von mit Typhusbazillen allein oder von gleichzeitig mit Typhus- und Paratyphusbazillen infizierten Tieren abstammten. Wenn die Sera dabei durch die Infektion der Typhusbazillen allein diese Erscheinung gezeigt hätten, das heißt, wenn es sich dabei um die Mitagglutination handelte, so würden die schwer mitagglutinablen Stämme nicht mehr darin so stark sich zusammenballen, wie die leicht mitagglutinablen derselben. Falls aber diese schwer mitagglutinablen Stämme auch so hoch agglutinieren, wie die leicht mitagglutinablen Stämme selbst, so könnte man schließen, daß die 2 Infektionen von Typhus und Paratyphus selbständig nebeneinander stattgefunden hätten. Deshalb könnte man dieses Verfahren statt des Castellianischen in dem Falle anwenden, wo die Unterscheidung schwer ist, ob man eine Typhusinfektion oder eine Mischinfektion von Typhus- und Paratyphusbazillen vor sich hatte. Hier sei aber bemerkt, daß die Sera in diesem Falle eine recht hohe Agglutination der Typhus- und Paratyphus B-Bazillen zeigen müssen, weil der Unterschied der leicht und schwer mitagglutinablen Stämme der Paratyphus B-Bazillen nur in solchen Typhusimmunseris deutlich nachweisbar war, welche eine recht hohe Mitagglutination zeigten.

Zusammenfassung.

1) Man kann Paratyphus B-Bazillen durch die Anwendung solcher Typhusimmunsera, welche von überimmunisierten Tieren abstammten und eine recht hohe Mitagglutination derselben Mikroorganismen zeigen, in 2 Unterarten teilen, eine leicht und eine schwer mitagglutinable.

2) Der Titer der Mitagglutination der Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunseris hängt von dem Stamme derselben ab. Typhussera, worin der leicht mitagglutinable Stamm derselben so stark agglutiniert, wie der Titer der Hauptagglutination, z. B. 1:20 000, zeigen einen ganz niedrigen Titer, z. B. 1:50 oder 1:100, falls ein schwer mitagglutinabler Stamm angewendet wird.

3) Durch die Anwendung dieses schwer mitagglutinablen Stammes der Paratyphus B-Bazillen könnte man deshalb umgekehrt bei solchem Serum, welches eine recht hohe Agglutination gegen Typhus- und Paratyphus B-Bazillen in gleichem Grade zeigte, feststellen, ob es von mit Typhusbazillen allein infizierten, oder von mit Typhus- und Paratyphusbazillen mischinfizierten Organismen abstammt.

Nachdruck verboten

Die Wirkung menschlicher und tierischer Galle auf Bakterien¹⁾.

[Aus dem Hygiene-Institut in Greifswald (Direktor: Prof. Friedberger) und der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Morawitz).]

Von Dr. van der Reis, Assistenzarzt der Klinik.

Verschiedentlich wurde bereits der Einfluß der menschlichen und tierischen Galle auf nichtpathogene und pathogene Bakterien behandelt; aber es ist noch nicht einmal eine Uebereinstimmung darüber erzielt worden, ob die Galle keimfrei ist, und weiter, ob sie antiparasitär wirkt oder im Gegenteil befördernd auf das Bakterienwachstum, wie z. B. sterilisierte Galle in den sogenannten Galleröhrchen auf Typhusbazillen. Die verschiedenen Autoren gelangten zu recht divergierenden Ergebnissen.

In der vorbakteriologischen Zeit standen bereits den Angaben von Bidder und Schmidt, Tiedemann und Gmelin, Bunge, Maly und Emich, die der Galle fäulniswidrige Eigenschaften zusprachen, die von Macfadyen und Hoppe-Seyler gegenüber. Trotzdem blieb diese ursprünglich am weitesten verbreitete Ansicht von der allgemeinen antiseptischen Kraft der Galle noch bis in die bakteriologische Ära hinein die vorherrschende. Als aber immer wieder auf das Vorkommen von Keimen aller Art in der Gallenblase, so z. B. von Choleravibrionen (Kulescha, Tanda, Baroni, Greig), von *Micrococcus Brucei* (Tallo) und insbesondere von Typhusbazillen bei Typhuskranken und -rekonvaleszenten und das oft jahrlange Vorhandensein bei Bazillenträgern (Flexner, Chiari, Blumenthal, Forster und Kayser) hingewiesen wurde, und es den Anschein hatte, als ob die verschiedensten Bakterien in der Gallenblase sogar günstige Nährbodenverhältnisse vorfänden, glaubten die Autoren, die bisherige Meinung von der Bakterizidie der Galle fallen lassen und vielmehr annehmen zu müssen, die Galle enthalte in vivo stets Keime. Denn auch aus der Galle angeblich Gesunder wurden *Coli*-Bazillen, *Bac. aërogenes capsulatus*, *Proteus*, *Pyocyaneus*, Staphylo- und Streptokokken (Williams, Kiralyfi, Kromholz und Kulka) gezüchtet.

Es ist aber zu bedenken, daß diese Befunde größtenteils nur an vereinzelten Fällen erhoben wurden; sie sprechen also nicht ohne weiteres gegen die Angaben anderer Autoren, die bei Serienuntersuchungen den Inhalt der unveränderten Gallenblase in der Mehrzahl der Fälle (85 Proz.) steril fanden (Gilbert und Girode, Fraenkel und Krause, Hirokawa, v. Mieczkowski, Toida, Fornet bei Rindern, Pastia und Twort, letzterer außerdem noch bei Affen und Hunden). Um so weniger, als bei vielen der angeführten Autoren nicht angegeben ist, wieviel Std. post mortem der Gallenblaseninhalte entnommen und untersucht wurde, eine post mortale Einwanderung und Vermehrung von Keimen demzufolge nicht von vornherein von der Hand zu weisen ist, weil sie auf dem toten Nährsubstrat bessere Lebensbedingungen finden (s. auch Tab. I Nr. 20, Tab. II Nr. 21, 24, 25, Tab. III Nr. 48). Zudem stammte die Galle in manchen Fällen von Individuen, die an Erkrankungen des Magendarmtraktes, der Leber und der Gallenwege gelitten hatten. Besonders bei entzündlichen Prozessen des Darms ist einer sekundären Infektion der Galle mit Darmbakterien Tor und Tür geöffnet. Derartige Befunde weichen jedenfalls von der Norm ab und erlauben keine Rückschlüsse auf die Verhältnisse beim Gesunden.

1) Die Tab. II—IV, VI, VII, X—XIII mußten wegen Raummangel ausfallen.

Es erschien deshalb wünschenswert, zunächst an einer Reihe von Leichen und an einer Serie von gesunden Tieren die Galle auf ihren eventuellen Keimgehalt zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde bei 20 Leichen und auf dem Schlachthof bei 112 Stück Schlachtvieh die Galle möglichst bald post mortem entnommen. Der Ductus cysticus wurde doppelt unterbunden, eine kleine Fläche der Wand des Corpus vesicae felleae mittels zweier Pinzetten abgehoben, mit Alkohol abgetupft und mit einem glühenden Messer kauterisiert. Die betreffende Wandstelle konnte somit als steril angesehen werden, und beim Einstechen eines feinen Troikars wurde das Einschleppen von Keimen von außen her verhindert. Zugleich vermied ich dadurch nach Möglichkeit eine Erhitzung der Galle und eine Abtötung resp. eine Schädigung etwaiger Keime in derselben. Die ausfließende Galle wurde in sterilen Kölbchen oder Reagenzgläsern aufgefangen und eine bestimmte Menge davon aërob auf gewöhnlichen Agar, auf Traubenzuckeragarplatten, in Bouillon und Essigsäurebouillon geimpft, ferner anaërob auf Traubenzuckeragarplatten und in Buchner-Röhrchen.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle I.
Menschliche Galle.

Galle Nr.	Autoptischer Befund	Ge- schlecht	Entnahme		Einsaat	Resultat
			post mortem Std.	Std.		
1	Apoplexie	+CO ₂	2	2 ¹ / ₂		steril
2	Peritonitis		2	3 ³ / ₄		"
3	Sepsis		2	3		"
4	Pneumonie		3	3 ³ / ₄		"
5	Appendizitis		3	3 ³ / ₄		"
6	Chron. Glomerulonephritis		3	3 ³ / ₄		"
7	—		3	3 ³ / ₄		"
8	Nephritis		3 ¹ / ₂	4 ¹ / ₄		"
9	Tbc. pulm.		4	5		"
10	"		4	4 ¹ / ₂		"
11	Nephritis		5	6		"
12	Tbc. pulm.		6	7		"
13	Chorionepitheliom		6 ¹ / ₂	7		"
14	—		8	8 ¹ / ₂		"
15	Encephalitis lethargica		8	8 ¹ / ₂		"
16	Pneumonie		9	9 ¹ / ₂		"
17	Mening. epid.		15	16		"
18	Psychose		16	17		"
19	Sepsis		19	19 ¹ / ₂		Staphylokokken
20	Typhus abd.	48	48 ¹ / ₂		Typhusbazillen	

(Tab. II, Rindergalle. Tab. III, Schweinegalle. Tab. IV, Schafgalle wurden auf Wunsch der Redaktion ausgelassen. Ebenso ein Teil der folgenden Tabellen.)

Die Tab. I zeigt also, daß von 20 menschlichen Gallen 18 steril waren. Von 25 Rindergallen waren 22, von 22 Schweinegallen 21 und bei 63 Schafgallen alle keimfrei. In 1 Falle (Tab. I Nr. 20) wurden aus der Galle einer an Typhus abdominalis verstorbenen Frau Typhusbazillen in Reinkultur gewonnen. Es ist aber hierbei zu bedenken, daß es sich beim Typhus um eine Bakteriämie handelt, wobei

die im Blut befindlichen Bakterien *intra vitam* in die Galle ausgeschieden werden können. Andererseits fand die Autopsie erst 48 Std. post mortem statt, so daß es sich auch um eine postmortale, vielleicht enterogene, Einwanderung handeln kann. Wir haben es also bei dieser Galle nicht mit normalen Verhältnissen zu tun. Weiterhin fanden sich in 1 menschlichen Galle (Nr. 19) Staphylokokken.

Aus der Rindergalle wuchsen 3mal (Tab. II Nr. 21, 24, 25) und aus der Schweinegalle (Tab. III Nr. 48) 1mal Stäbchen aus der *Coli aërogenes*-Gruppe. Sonstige Darmbakterien konnten nicht nachgewiesen werden. Ferner geht aus den Tabellen hervor, daß die frühzeitig nach dem Tode entnommenen Gallen alle bakterienfrei waren, während aus den relativ spät entnommenen Bakterien isoliert werden konnten. Recht klar zeigt dieses Tabelle III. Sämtliche Gallen, welche 15—30 Min. post mortem entnommen waren, blieben steril, nur Nr. 48, bei der die Entnahme aus äußeren Gründen erst 65 Min. nach dem Tode vorgenommen wurde, wies eine bakterielle Verunreinigung auf, Dasselbe zeigt sich bei Nr. 24 und 25 in Tab. II. Nur Nr. 21 zeigt eine Abweichung. Bei diesem Rind aber wurde von den Schlachtern die Leber mit den Eingeweiden im Zusammenhang herausgenommen, und der Darm eingeschnitten, bevor die Gallenblase eröffnet werden konnte. Durch diese Manipulationen ist es wohl möglich, daß die Bakterien aus dem Darm in die Galle eindringen konnten. In der menschlichen Galle dagegen finden wir in unserer Tabelle erst nach 19 und 48 Std. Staphylokokken und Typhusbazillen.

Zusammenfassend ergibt sich also aus den Tabellen, daß menschliche und tierische Galle keinen Unterschied in bezug auf ihren Keimgehalt aufgewiesen haben und daß die Galle kurze Zeit post mortem weder aërobe noch anaërobe Keime — letzteres war bislang noch nicht untersucht worden — enthält. Da nicht anzunehmen ist, daß in der kurzen Zeit nach dem Tode etwaige Keime aus der Gallenblase verschwinden können, sind wir wohl zu der weiteren Annahme berechtigt, daß auch *intra vitam* menschliche und tierische Galle unter normalen Verhältnissen aërob und auch anaërob steril ist.

Mit dieser Feststellung ist nun keineswegs das weitere Problem der Bakterizidie der Galle gelöst. Es scheint sogar, als ob gerade die Verquickung der Fragen der Keimfreiheit der Galle und ihrer Wirkung auf Bakterien eine richtige Betrachtungsweise erschwert hat. Die Keimfreiheit könnte ja das Ergebnis einer kompletten Bakterizidie der Galle sein. Wenn man von dieser Annahme ausgeht, müßte der Fund von irgendwelchen pathogenen Mikroben und saprophytischen Darmbakterien in der Gallenblase für eine Schädigung in der Zusammensetzung der Galle oder eine Störung der Sekretion bzw. des Abflusses sprechen.

Eine gewisse bakterizide Kraft gegenüber Typhus- und *Coli*-Bazillen nimmt auch Talma an. Er fand nämlich, ähnlich wie Braun, bei Versuchstieren nach Injektion dieser Bakterien in die möglichst unverletzte Gallenblase eine Schädigung der Keime. Wenn er nun weiterhin meint, der Grad der antiparasitären Kraft der Galle — in diesem Falle gemessen an der Zahl der wiedergefundenen Keime — sei abhängig von der Zeit der Einwirkung, so muß dem entgegengehalten

werden, daß es wohl nicht möglich sein dürfte, aus der Zahl der in der Galle wiedergefundenen Bakterien bindende Schlüsse zu ziehen. Denn mit der Sekretion der Galle in das Darmlumen geht sicherlich eine Ausschwemmung der Keime einher, die zunimmt, je länger der Versuch dauert.

Wenngleich die verschiedensten Autoren der Ansicht von Talma nicht zustimmen, so bleiben doch ihre Befunde zu widerspruchsvoll, als daß sich daraus ein einheitliches Urteil ableiten ließe.

So fand Vignal und nach ihm Leubuscher ein gutes Wachstum von Typhusbazillen und Choleravibrionen in der menschlichen und tierischen Galle. Andere Keime, wie das *Bacterium coli* und *Proteus vulgaris*, sollen dort sogar außerordentlich gut wachsen. Während aber Babes, Fraenkel und Krause, Fischer und Neufeld, Corrado, Hirokawa für Typhus- und Coli-Bazillen den wachstumsbegünstigenden Einfluß der menschlichen Galle auf die oben genannten Keime bestätigen, konnte Pies die Fähigkeit der Galle, auf das Coli-Wachstum fördernd einzuwirken, nicht feststellen. Die frische Rindergalle dagegen (Pies, Fornet) soll einen entwicklungshemmenden Einfluß auf den Eberth'schen Bazillus ausüben.

Macfadyen und Leubuscher wollen ferner keinen schädigenden Einfluß der Galle auf *Bac. anthracis* beobachtet haben, im Gegensatz zu Corrado und Fischer, die direkt von einer Bakterizidie gegenüber diesem Keim sprechen.

Der begünstigende Einfluß auf *Staphylococcus pyogenes* (Fraenkel und Krause) kann von anderen nicht in vollem Umfange bestätigt werden (Hirokawa, Toida). Allgemein angenommen wird nur der mehr oder minder hohe Grad von Bakterizidie gegenüber Streptokokken und vor allem die vollkommene Bakteriolyse des Fraenkel'schen *Pneumococcus* (Neufeld, Hirokawa). Deshalb konnte auf eine Untersuchung des letzten Keimes verzichtet werden (s. weiter unten).

Aus allen diesen divergierenden Meinungen läßt sich jedenfalls kein einheitliches Urteil über die Wirkungsweise der Galle gegenüber den verschiedenen Keimen und ihrem Anteil an der Autosterilisation des Dünndarms ableiten.

Deshalb untersuchte ich in einer Reihe von Gallen tierischer und menschlicher Provenienz ihren Einfluß auf eine Reihe von Mikroorganismen, pathogene, die, im Darmkanal vorkommen können, und saprophytische aus dem Kreis der Darmbakterien, deren Untersuchung bislang ausstand. Wie bei der Prüfung auf Keimfreiheit wurde die nach Möglichkeit früh entnommene Galle baldigst nach der Entnahme untersucht, um Verhältnisse zu schaffen, die den normalen möglichst nahekommen.

In den Kreis der Untersuchungen wurden folgende 10 Bakterien einbezogen:

Bact. typhi, *Bact. paratyphi B*, *Bact. coli*, *Bact. dysenteriae Flexner*, *Bact. dysenteriae Shiga-Kruse*, Darmstaphylokokken, *Streptococcus pyogenes aureus*, *Bac. prodigiosus*, *Bac. putrificus* Bienstock, *Enterococcus Thiercelin*.

Die Darmstaphylokokken und der *Enterococcus* sind Dünndarmbewohner, die mit Hilfe der Darmschiffchen (Ganter und v. d. Reis) aus dem Ileum von Versuchspersonen isoliert wurden. *Bac. putrificus* und *Coli* züchteten wir aus dem Coecum. (Ausführlich wird über die Schiffchenversuche an anderer Stelle berichtet.)

Die Gallen, zu je 5 ccm in Reagenzröhrchen eingefüllt, wurde mit den verschiedenen Bakterien beimpft, und zwar mit 1 Oese einer Auf-

schwemmung von 1 Oese der 48-stünd. Schrägagarkultur des betreffenden Keimes in 5 ccm physiol. Kochsalzlösung. Die 1. Serie der beimpften Röhrrchen wurde kräftig geschüttelt, 10 ccm flüssig gemachter und auf 42° abgekühlter Agar hinzugefügt, nochmals geschüttelt und dann zu Platten ausgegossen und 24 Std. bebrütet.

Die 2. und 3. Serie der beimpften Galleröhrchen wurde vorerst auf 6 resp. 24 Std. in den Brutschrank gebracht und dann erst mit Agar zu Platten verarbeitet, um festzustellen, ob die Dauer der Einwirkung die Wirkungsweise der Galle beeinflusst. Gelegentlich wurde noch eine Zwischenserie nach 12- oder 14-stünd. Bebrütung angelegt. Zu jeder Serie wurde dann eine Kontrolle auf genau die gleiche Art hergestellt, nur wurden die Keime in Bouillon statt in Galle geimpft.

Die Versuche mit *Prodigiosus* wurden bei Zimmertemperatur gehalten, diejenigen mit *Putrificus* Bienstock anaërob bei Bruttemperatur. Die Auszählung der auf den Platten gewachsenen Kolonien nahm ich nach 24 Std. vor, nur der langsam wachsende anaërobe *Putrificus* konnte erst nach 3—4 Tage gezählt werden. Die Auszählung der ganzen Platte geschah mit dem Wolffhügelschen Apparat, solange die Zahl der Kolonien es gestattete. Waren die Kolonien üppiger gewuchert, mußte die mikroskopische Zählung zu Hilfe genommen werden. Es wurden jedesmal 20 Gesichtsfelder ausgezählt, und zwar mit Leitz Okular 1, Obj. 3, bei einer Tubuslänge von 160 mm, wobei der Radius des Gesichtsfeldes 1 mm war. Betrug die Zahl der Kolonien in den einzelnen Gesichtsfeldern mehr als 100, dann unterblieb die Zählung, weil sie nur noch approximative Werte hätte liefern können. Das Resultat wurde mit „zahlreich“, ein noch üppigeres Wachstum mit ∞ bezeichnet.

In den Tab. IV—XII sind die Ergebnisse so zusammengestellt, daß sich ein Ueberblick über die Art und den Grad der Wirkungsweise der Gallen verschiedenster Herkunft auf die einzelnen Bakterien ergibt, von

Tabelle V.

Wachstum von *Bact. typhi* in menschlicher und tierischer Galle.

Provenienz der Galle	Entnahme	Einsaat	Koloniezahl		
			post mortem	sofort	nach 6 Std.
a) Menschengalle Nr. 1	2 Std.	2 1/2 Std.	20	15 000	∞
" " 10	4 "	4 1/2 "	96	—	∞
" " 18	16 "	17 "	76	30 200	∞
b) Rindergalle Nr. 1	20 Min.	2 Std.	129	14 286	9 922
" " 2	30 "	2 "	50	5 033	22 982
" " 12	60 "	1 3/4 "	80	11 340	16 900
" " 20	120 "	1 3/4 "	2904	12 390	32 524
c) Schweinegalle Nr. 29	15 Min.	1 3/4 Std.	12	10 200	∞
" " 30	20 "	2 "	394	26 730	∞
" " 40	30 "	2 "	290	26 523	zahlreich
d) Schafgalle Nr. 52	30 Min.	2 Std.	38	zahlreich	∞
" " 63	30 "	1 3/4 "	67	"	∞
" " 95	60 "	2 "	59	31 500	∞
Kontrolle in Bouillon	—	—	84	∞	∞
" " "	—	—	70	zahlreich	∞

denen nach Möglichkeit die annähernd gleiche Menge eingepft wurde.

Die Versuche zeigen, daß die Vermehrung des Typhusbazillus in den verschiedenen Gallen keine gleichartige ist. In der menschlichen und in der Schafgalle ist sie beträchtlich, weniger üppig aber in der Schweine- und am geringsten in der Rindergalle. Allerdings bleibt die Zahl der nach 6 Std. gewachsenen Kolonien hinter der Bouillonkontrolle zurück; aber nach 24 Std. finden wir, mit Ausnahme der Rindergalle, überall eine unendliche Vermehrung. Während die Kolonienzahl bei der letzteren nach 6 Std. nur wenig hinter jener der Schweinegalle zurückbleibt, hat die Zahl nach 24 Std. nicht wesentlich zu-, sondern in einem Falle sogar etwas abgenommen. Ein Zeichen dafür, daß die Typhuskeime bei längerem Aufenthalt in der frischen Rindergalle eine gewisse Entwicklungshemmung erfahren.

Die geringe Wachstumsvermehrung in der Rindergalle nach 24 Std. steht scheinbar im Gegensatz zur Anwendung dieser Galle als Anreicherungsmedium in den von Kayser und Conradi inaugurierten Galleröhrchen. Hier handelt es sich aber um sterilisierte Rindergalle, die auch nach Fornet weniger entwicklungshemmend wirkt.

Tab. VI, Coli in Galle (fehlt).

In allen Gallen finden wir übereinstimmend eine Vermehrung der Coli-Bazillen, die nur wenig hinter dem Wachstum in der Kontrolle zurückbleibt. Auch die Schnelligkeit der Vermehrung in den Gallen verschiedener Provenienz läßt keinen Unterschied erkennen.

Tab. VII, Bact. paratyph. B in Galle (fehlt).

Bereits nach 6 Std. war die Zahl der Paratyphus B-Kolonien ziemlich angewachsen, und zwar, wie beim Typhus, am meisten in der menschlichen und in der Schafgalle. Der Unterschied gegenüber den übrigen Gallen ist aber nur gering. Nach 12 Std. fanden sich auf den untersuchten Platten bereits „zahlreiche“ Kolonien (also bei der mikroskopischen Zählung in den einzelnen Gesichtsfeldern mehr als 100), nach

Tabelle VIII.
Bact. dysenteriae Shiga-Kruse in Galle.

Provenienz der Galle	Entnahme	Einsaat	Kolonienzahl			
			post mortem	sofort	nach 6 Std.	nach 12 Std.
a) Menschengalle Nr. 14	8 Std.	8 ¹ / ₂ Std.	33	4 646	—	6 540
„ „ 6	3 „	3 ³ / ₄ „	44	3 780	—	11 620
„ „ 7	3 „	3 ³ / ₄ „	108	4 020	—	22 288
b) Rindergalle Nr. 6	30 Min.	2 „	30	9 245	—	12 907
„ „ 16	60 „	1 ³ / ₄ „	25	7 396	—	18 485
„ „ 9	30 „	2 „	20	3 698	—	19 044
c) Schweinegalle Nr. 29	15 „	1 ³ / ₄ „	28	162	—	10 205
„ „ 42	30 „	2 „	32	32	—	9 733
„ „ 32	20 „	2 „	9	206	—	13 540
d) Schafgalle Nr. 57	30 „	2 „	11	—	—	12 200
„ „ 92	30 „	2 „	122	—	259	9 760
„ „ 108	60 „	2 „	98	—	6300	10 476
Kontrolle in Bouillon	—	—	37	127 171	—	∞
„ „ „	—	—	29	19 300	—	∞

24 Std. aber überall unzählige, so daß das Zurückbleiben hinter der Vermehrung in der Kontrolle wieder ausgeglichen war. Es läßt sich also gegenüber dem Wachstum der Coli- und Typhusbazillen in Galle (Rindergalle ausgenommen) nach 24 Std. keine Abweichung konstatieren. Nach 6 Std. allerdings bleibt die Zahl der Paratyphus B-Kolonien noch ziemlich hinter derjenigen der Typhus- und Coli-Kolonien zurück.

Wie bei den Paratyphusbazillen zeigt sich nach 6 Std. bei dem Dysenteriebazillus Shiga-Kruse ebenfalls keine sehr große Vermehrung der Kolonienzahl. Am bedeutendsten ist der Zuwachs in der Rindergalle; dann folgt die Menschengalle. Auch nach 24 Std. sind die Kolonien immer noch zählbar, während sie sich auf den Kontrollplatten unendlich vermehrt haben.

Tabelle IX.
Bact. dysenteriae Flexner in Galle.

Provenienz der Galle		Entnahme	Einsaat	Kolonienzahl			
				post mortem	sofort	nach 6 Std.	nach 12 Std.
a) Menschengalle	Nr. 3	2 Std.	3 Std.	155	1 258	—	14 854
"	" 7	3 "	3 ³ / ₄ "	17	21 575	—	77 440
"	" 8	16 "	17 "	250	13 162	—	80 720
b) Rindergalle	Nr. 10	30 Min.	2 "	54	11 616	—	15 094
"	" 12	60 "	1 ³ / ₄ "	4	10 542	—	2 962
"	" 17	60 "	2 ¹ / ₂ "	476	2 490	—	162
c) Schweinegalle	Nr. 37	20 "	2 ¹ / ₂ "	162	21 940	—	19 940
"	" 38	20 "	2 ¹ / ₂ "	50	2 632	—	734
"	" 47	30 "	2 "	2	24 222	—	20 001
d) Schafgalle	Nr. 110	60 "	2 "	129	—	328	10 200
"	" 60	30 "	2 "	60	—	214	7 200
"	" 49	30 "	4 "	251	—	384	9 002
Kontrolle in Bouillon		—	—	18	2 790	—	58 320
"	" "	—	—	11	14 520	—	∞
"	" "	—	—	138	2 730	—	56 002

Ein ganz anderes Verhalten zeigt der Dysenteriebazillus vom Typus Flexner. Hier findet sich in unseren Versuchen nach 6 Std. ein viel bedeutenderes Anwachsen der Kolonienzahl als beim Typus Shiga-Kruse, vor allem in den Versuchen mit Schweine-, weniger gut mit Menschengalle, während der Shiga-Kruse-Typ in Rindergalle verhältnismäßig besser wächst. Hingegen finden wir nach 24-stünd. Bebrütung der Keime anstatt einer Vermehrung in der Rinder- (ausgenommen Nr. 10) und Schweinegalle eine Verminderung der Kolonienzahl oder mindestens einen Stillstand. Abweichend davon nimmt in der menschlichen Galle die Zahl der Kolonien zu (Hirokawa), ebenfalls in der Schafgalle, doch ist dort die Zunahme eine viel geringere.

In den beiden letztgenannten Gallenarten verläuft das Wachstum der Bakterien annähernd wie in der Kontrollbouillon. Es ist also ein gewisser Unterschied gegenüber dem Shiga-Kruseschen Ruhrbazillus festzustellen. Dort nach 6 Std. eine geringe Vermehrung — im Durchschnitt wie beim Paratyphusbazillus —, die sich auch noch nach 24-stünd. Bebrütung erhalten hat, hier zuerst nach 6 Std.

überall eine Vermehrung, nach 24 Std. dagegen nur in Menschen- und Schafgalle, in der Rinder- und Schweinegalle dagegen eine Verminderung der Kolonienzahl.

Tab. X, Darmstaphylokokken in Galle (fehlt).

Nur bei 1 der 13 untersuchten Gallenproben (Rindergalle Nr. 17) zeigt sich ein rasches und bedeutendes Wachstum der Darmstaphylokokken. In allen übrigen Fällen ist die Zahl der nach 6 Std. gewachsenen Kolonien derjenigen der Kontrollplatten ziemlich gleich. Während nach 24 Std. in den Kontrollen die Zahl auf ∞ anwuchs, blieb sie bei allen Gallenproben bedeutend zurück. Für die Darmstaphylokokken ist also die Galle kein günstiger Nährboden, noch ungünstiger als für den *Staphylococcus aureus* (Hirokawa, Toida). Fraenkel hat hier sogar eine Förderung des Wachstums beobachtet.

Tab. XI, *Streptoc. pyog. aur.* in Galle (fehlt).

Gegenüber der Bouillonkontrolle ist ein wachstumshemmender Einfluß aller Gallenarten festzustellen. Nur 3mal ist eine sehr geringe Zunahme der Keime bzw. ein Stillstand zu verzeichnen.

Tab. XII, *Prodigiosus* in Galle (fehlt).

Der *Bacillus prodigiosus* zeigt in der 2. Serie durchweg ein Anwachsen der Kolonienzahl, das meistens nicht sehr bedeutend ist, und nur einigemal ziemlich beträchtliche Werte annimmt. Nach 24 Std. hat eine weitere Vermehrung stattgefunden, die allerdings bei den tierischen Gallen — ebenso wie nach 6 Std. — sehr hinter den entsprechenden Kontrollen zurückbleibt, während die Vermehrung in der menschlichen Galle den Kontrollen näherkommt. Es ist noch zu bemerken, daß nach 24 Std. die Kolonien 5mal nicht rot gewachsen waren, sondern zum Teil weiß, zum Teil rosa, was jedenfalls auf eine Schädigung des Farbstoffbildungsvermögens der Bazillen hinweist, die 24 Std. in der Galle bebrütet wurden.

Bac. putrificus. Quantitative Untersuchungen über das Wachstum des *Putrificus* in Galle konnten nicht angestellt werden, da dieser Bazillus weder in Bouillon noch in Galle unter anaëroben Verhältnissen zum Anwachsen zu bringen war, während er bei direkter Verimpfung von Agar auf Agar — wenn auch sehr kümmerlich — wuchs.

Tab. XIII, *Enterococcus* in Galle (fehlt).

Der *Enterococcus* vermehrt sich mit Ausnahme der Menschen- galle, in welcher das Wachstum relativ günstig ist, nur spärlich. Eine Hemmung ist allerdings nicht zu beobachten.

Es zeigt also nur der Typhusbazillus in Rindergalle ein prinzipiell abweichendes Verhalten gegenüber den Gallen anderer Provenienz, während für die übrigen Keime nur eine quantitative Differenz in der Beeinflussbarkeit des Wachstums besteht. Vielleicht darf für diese Unterschiede die chemische Zusammensetzung der Galle verantwortlich gemacht werden. Die glykochol- und taurocholsauren Salze, die Hauptbestandteile der Galle, wirken nämlich verschieden auf die Mikroben ein (Meyerstein). Da sie in den Gallen verschiedener Provenienz, in geringerem Maße aber auch bei ein und demselben Individuum in wechselnder Menge vorhanden sind, ist die unterschiedliche Beeinflussung der differenten Bakterien verständlich.

Tabelle XIV.
Skala der Einwirkung der menschlichen und tierischen Galle auf
das Bakterienwachstum.

Wachstums- verhältnisse	Menschengalle	Rindergalle	Schweinegalle	Schafgalle	
sehr günstig	Typhusbazillen Coli	Coli	Typhusbazillen Coli	Typhusbazillen Coli	
günstig	Paratyphus B	Paratyphus B	Paratyphus B	Paratyphus B	
Zunahme	mittlere	Enterococcus	—	—	
		Prodigiosus	—	—	
		Flexner	—	—	
	geringe	Bact. Shiga- Kruse	Bact. Shiga- Kruse	Bact. Shiga- Kruse	Bact. Shiga- Kruse
		Darmstaphylo- kokken	Bact. typhi	Bact. Flexner	Bact. Flexner
Bakterizidie	—	Bac. Flexner	—	Darmstaphylo- kokken	
	—	Darmstaphylo- kokken	Darmstaphylo- kokken	—	
	—	Enterococc.	Enterococc.	Enterococc.	
	Strept. pyog.	Strept. pyog.	Strept. pyog.	Strept. pyog.	

Eine starke Wachstumshemmung erleiden nur der Streptococcus pyogenes und der Putrificus, außerdem eine vollkommene Bakteriolyse — wie aus der Literatur hervorgeht und schon oben erwähnt wurde — der Pneumococcus, während bei den übrigen untersuchten Bakterien keine deletäre Wirkung der Galle festzustellen ist. Wenn- gleich diese Reagenzglasversuche auch nicht ohne weiteres auf die Ver- hältnisse in vivo übertragen werden dürfen, ist es jedenfalls nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich, daß die Galle an der zuerst von Kohlbrugge behaupteten Autosterilisation des Dünndarms keinen wesentlichen Anteil hat. Von den Mikroben, die eine Wachstumsbe- schränkung erfahren, findet sich unter normalen Verhältnissen nur der Putrificus, ein Hauptvertreter der Fäulnisbakterien, im Darm, dieser aber auch nur im Dickdarm, so daß er bei der Betrachtung des Sterili- sationsproblems des Dünndarms nicht in Betracht kommt.

Zusammenfassung.

Die frühzeitig post mortem entnommene normale menschliche und tierische Galle ist steril. Sie wirkt nur auf Pneumokokken (Bakteriolyse) und Putrificus bakterizid, auf Streptococcus pyogenes stark hemmend. Für die übrigen untersuchten Bakterienarten stellt die Galle einen mehr oder weniger günstigen Nährboden dar.

Literatur.

Babes, Berlin. klin. Wochenschr. 1909. S. 362. — Baroni et Ceaparu, Compt. rend. Soc. de Biol. T. 72. 1912. p. 894. — Bidder u. Schmidt, Die Verdauungs- säfte und Stoffwechsel, Leipzig 1852. — Blumenthal, München. med. Wochenschr. 1904. S. 1641. — Braun, Arch. d. Scienc. biol. T. 8. p. 158. — Bunge, Lehrb. d. physiol. u. pathol. Chem. Leipzig 1889. — Chiari, Verhandl. d. Deutsch. Patholog. Gesellsch. 11. Tagg. S. 143. — Conradi, München. med. Wochenschr. 1906. S. 2386.

— Corrado, Atti d. R. Acc. med. Roma. Ser. II. Vol. I. 1891. — v. Drigalsky, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1914. S. 776. — Dupré, Les infections biliaires. Paris 1891. — Fischer, Ueber die Wirkung von Galle auf Typhus- und Milzbrandbazillen. [Inaug.-Diss.] Bonn 1894. — Flexner, Journ. Pathol. a. Bacteriol. Vol. 3. 1894/95. p. 202. — Fornet, Arch. f. Hyg. Bd. 60. 1907. S. 134. — Ders., München. med. Wochenschr. 1906. S. 1053. — Forster u. Kayser, Ebenda. 1906. S. 1473. — Fraenkel, E., u. Krause, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 32. 1899. S. 91. — Ganter u. v. d. Reis, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 236. — Gilbert u. Girode, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 9. 1891. S. 431. — Greig, Ind. Journ. of med. Res. Vol. 1. 1913. p. 90. — Hirokawa, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 53. 1910. S. 12. — Hoppe u. Seyler, Physiol. u. patholog.-chem. Analysen. Berl. 1883. — Kayser, München. med. Wochenschr. 1906. S. 823. — Kiralyfi, Berl. klin. Wochenschr. 1912. S. 1985. — Kohlbrugge, Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 29. S. 571 und Bd. 30. S. 10 u. 70. — Krombholz u. Kulka, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 62. 1912. S. 521. — Kulescha, Klin. Jahrb. Bd. 24. 1910. S. 137. — Leubuscher, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 17. 1890. S. 472. — Levy, E., u. Bruns, Dtsch. med. Wochenschr. 1902. S. 130. — Macfadyen, Jahresber. f. klin. Med. Bd. I. 1887. S. 285. — Maly u. Emich, Sitz.-Ber. d. Akad. d. Wiss. Bd. 87. 1883. Abt. III. — Meyerstein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. S. 434. — v. Mieczkowski, Grenzgeb. d. Med. u. Chir. Bd. 6. S. 307. — Neufeld, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 34. 1900. S. 453. — Pastia et Twort, Compt. rend. Soc. Biol. T. 71. 1911. p. 112. — Pies, Arch. Hyg. Bd. 62. 1907. S. 107. — Ders., Ueber das Wachstum von Typhus- und Colibazillen in Galle. [Inaug.-Diss.] Straßburg 1907. — Roger, Ann. l'Inst. Pasteur. T. 29. 1915. p. 545. — Tallo, Il Policlinico. 1914; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 64. 1916. S. 277. — Talma, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. Bd. 2. S. 1053. — Tanda, G., Hyg. Rundsch. 1911. S. 829. — Tiedemann u. Gmelin, Recherches sur la route, que prennent diverses substances pour passer de l'estomac et du canal intestinal dans le sang. Paris 1821. — Toida, Arch. f. klin. Chir. Bd. 103. 1914. S. 407. — Vignal, Arch. de physiol. norm. et pathol. 1887. — Williams, New York med. Journ. 1911. p. 934. — Ders., ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 54. 1912. S. 291.

Nachdruck verboten.

Parasitologische Untersuchungen und Beiträge zur parasitologischen Technik.

[Hygienisch-parasitologisches Institut der Universität Lausanne.]

Von B. Galli-Valerio.

a) Geographische Verbreitung einiger Parasiten.

1) *Saccharomyces guttulatus* Robin: *Lepus variabilis* (V. d'Arpette, 1600 m, Wallis). — 2) Virus der Hühnerleukose: Ein Fall bei einer Henne in Lausanne. Besonders war bemerkenswert die sehr große, gelbliche Leber. Keine Tuberkelbazillen. — 3) *Menospora polyacantha* Léger: *Agrion* sp., Larva (Vidy, Waadt). — 4) *Eimeria Stiedai* Lind.: *L. timidus* (Caux, 1200 m, Waadt). In derselben Zone, aber höher, habe ich nie Kokzidien bei *L. variabilis* gefunden. Wahrscheinlich infiziert sich *L. timidus*, weil er ganz in der Nähe von Bauernhäusern mit infizierten Kaninchen lebt. — 5) *E. rivoltai* Grassi: Junge Katze (Lausanne), die an weißer Diarrhöe zugrunde gegangen war, mit starker Hyperämie des Darmes und weißlichen, weichen Fäzes, die sehr viele Kokzidien von $30 \times 21 \mu$ von eiförmiger Gestalt und mit einem zugespitzten Ende mit einer Mikropyle enthielten. In Wasser bildeten sie 4 Sporen mit je 2 Sporozoitien. In Darmschnitten waren die Kokzidien in Epithelzellen und in kleinen Geschwüren lokalisiert. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß die Kokzidien den Tod der Katze verursacht haben. — 6) *E. avium* Silv. u. Riv.: *Turdus iliacus* (Ouchy).

Waadt). — 7) *Piroplasma divergens* Mc Fadyean u. Stockmann. Neuer Fall¹⁾ bei einer Kuh aus Cossonay (Waadt). Die Parasiten waren speziell im Blute und in der Milz lokalisiert, aber sehr spärlich in Leber und Nieren. In der Milz waren einige Piroplasmen ganz frei, wahrscheinlich wegen der Zerstörung der roten Blutkörperchen. — 8) *Opalina ranarum* Purk. u. Val.: *Rana temporaria* (Lac Champex, 1465 m, Wallis). — 9) *Herpetomonas melophagi* Flu.: *Melophagus ovinus* (Orbe, Cossonay). — 10) *Trichomonas batrachorum* Perty: *R. temporaria* (Lac Champex), *Sal. atra* (Chalets de Chaude, 1500 m). Bei *S. atra* habe ich Bildung von Zysten bemerkt, sie waren rund, 18–20 μ , oder eiförmig, 18 \times 14 μ , mit feiner Zystenmembran; einige enthielten noch Reste der undulierenden Membran. — 11) *Hymenolepis angulata* Rud.: *Merula nigra* (Lausanne). — 12) *Taenia serrata* Goeze: Hund (La Sarraz, Waadt). — 13) *T. saginata* Goeze: Mensch (Sierre, Wallis). — 14) *T. crassicollis* Rud.: Katze (Rossinières, 900 m; Sierre, Waadt). — 15) *Dipylidium caninum* Rud.: Katze (Sierre). — 16) *Angiostomum rubrovenosum* Schneid.: *Bufo vulgaris* (Vidy). — 17) *Ascaris ensicaudata* Rud.: *Merula nigra* (Lausanne). — 18) *A. canis* Werner (Sierre). — 19) *Oxyuris ambigua* Rud. (Duillier, Waadt). — 20) *Trichocephalus serratus* v. Linsf.: Katze (Sierre). — 21) *Sarcoptes scabiei* var. *equi*: Pferd (Cossonay). — 22) *Sarcoptes scabiei* var. *canis*: Hund (Genf). 2 Frauen waren infiziert. — 23) *S. minor* var. *cati*: Katze (Sierre). — 24) *Chorioptes auricularum* Luc. u. Nic.: Katze (Sierre), war nicht nur in den Ohren, sondern auch auf den Hals lokalisiert. — 25) *Cheiletiella parasitivorax* Mégn.: Kaninchen (Lausanne). — 26) *Lophoptes patavinus* Mégn.: ? Henne (Lausanne). — 27) *Listropoda Blasii* Kol. (Klass. Speiser): Fledermaus sp. (Lausanne). — 28) *Melophagus ovinus*: Schafe (Orbe, Cossonay und Lausanne). — 29) *Rhinestrus nivarleti* Rod. u. Beq.: ? *Potamochoerus porcus* (Lambaréné, Bas Ogoué, Gabon), L. Pelot. — 30) *Hypoderma bovis* De Geer: Vieh (Lac de Fully, 2132 m, und Gruben, 1847 m, Wallis). — 31) *Tabanus aterrimus* Meig.: Mensch (Cape au moine, 1945 m, Waadt, Gruben). — 32) *T. bovinus* L.: Vieh (Gruben). — 33) *T. apricus* Meig. (Klass. Bezzi): Mensch (Rochers de Naye, 2044 m). — 34) *T. bromius* L. (Klass. Bezzi): Mensch (Cape au moine). — 35) *Haematopota pluvialis* L.: Mensch (ebenda). — 36) *Ctenocephalus serraticeps* Gerv.: Mensch (Lambaréné), Katze (Sierre). — 37) *Sarcopsylla penetrans* L.: Einige Weibchen fixiert in einem Geschwür am Hinterbacken einer Negerin (Lambaréné), L. Pelot. — 38) *Trichodectes sphaerocephalus* Nitzsch: Schafe (Orbe), lebten 8 Tage, ohne zu fressen. — 39) *Goniodes heteroceros* N.: *Lyrurus tetrax* (Gruben). — 40) *Nirmus quadrulatus* N.: ebenda.

b) Untersuchungen über Phytoparasiten.

1. Etwas über Streptokokken. Einen Streptococcus, in sehr langen Ketten und sehr stark mit Gram färbbar, habe ich in den Fäzes von Tieren, wie *Putorius herminea*, *Sorex vulgaris* und *Salamandra atra*, die aus den Alpen von Waadt und Wallis stammten, gefunden.

Im Auswurf eines Kranken fand ich sehr lange Ketten eines Streptococcus mit sehr interessanten Involutionsformen. Nach einer Serie von Normalkörnern bemerkte man plötzlich sehr große, ei-, spindel- und speziell keulenförmige Körner. Sehr oft endete eine Kette in eine Keule. Die Involutionskörner färbten sich nicht so gut wie die Normalkörner.

2. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in einem Fall von Pemphigus malignus. In den Blasen eines Falles von Pemphigus habe ich nie eine Kultur von *C. pseudodiphtheriticum* zu Haufen angesammelt gefunden. Schon bei *P. vegetans* hatte man angenommen, daß Pseudodiphtheriebazillen eine Rolle spielen könnten²⁾; es scheint

1) Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 1918. S. 471 und 1919. H. 7/8.

2) Bettmann in Rieckes Handb. d. Haut- u. Geschlechtskrankh. 4. Aufl. Jena 1918. S. 190.

mir aber wahrscheinlicher, daß die Pseudodiphtheriebazillen der Haut in den Pemphigusblasen nur einen guten Boden für ihre Entwicklung finden und keine pathogene Rolle spielen.

c) Untersuchungen über Zooparasiten.

1. Amöbenuntersuchungen. Im Sommer 1919 habe ich in meinen diarrhoischen Entleerungen sehr viele Amöben gefunden von einem Durchmesser von 13—15 μ . Ektoplasma homogen, Endoplasma fein granuliert, mit Vakuolen, sehr deutlicher Kern, Pseudopodien kurz, abgestumpft, mit sehr langsamen Bewegungen. Die Zysten hatten einen Durchmesser von 12—15 μ . Protoplasma fein granuliert; 1, sehr selten 2 Kerne. In den Vakuolen habe ich nie rote Blutkörperchen bemerkt. Diese Amöben habe ich 7 Monate in meinen Entleerungen bemerkt: sie verschwanden aber mit fortschreitender Verminderung. Wahrscheinlich handelte es sich um eine Vahlkampfia, die ich mit Wasser oder Nahrung genommen hatte. Ich glaube nicht, daß sie pathogene Wirkung gehabt hat, weil ich nur von Zeit zu Zeit etwas diarrhoische Entleerungen hatte.

Eine starke Kultur von Amöben fand ich in etwas Wasser, das in einer Vertiefung von getrockneten Viehentleerungen angesammelt war. Ein Tropfen dieses Wassers wimmelte von Amöben von 15—24 μ Durchm. Ektoplasma homogen, Endoplasma granuliert mit spärlichen Vakuolen; sehr deutlicher Kern. Die Bewegungen waren sehr charakteristisch: die Pseudopodien nahmen eine fingerförmige Gestalt an. Zysten habe ich nicht gefunden. Diese Amöben gehören sehr wahrscheinlich zur Gruppe der *A. limax*.

2. Ueber einige Spirochäten. Bei nochmaligen¹⁾ Untersuchungen über die Verbreitung von Spirochäten bei Menschen und Tieren fand ich:

1) Eine Spirochaeta von 15—20 μ , mit breiten Windungen und zugespitzten Enden (Maul einer Katze aus Lausanne). — 2) Eine Spirochaeta von 20 μ , mit 16—18 sehr breiten Windungen und sehr zugespitzten Enden (Maul von *Mus rattus* aus Guttet, 1334 m, Wallis). — 3) Eine Spirochaeta von 6—7 μ , sehr fein, mit 6—7—8 engen Windungen und etwas abgestumpften Enden (Menschenfäzes, Lausanne). — 4) Eine Spirochaeta von 72 μ , mit 8—14 sehr breiten Windungen, abgestumpften Enden und vielen chromatinähnlichen Körnern im Innern (Enddarm von *Salamandra atra*, Chalets de Chaude), mit einem *Bodo* sp., 12 \times 10—18 \times 10 μ , mit 2 Geißeln von 20 μ . Vakuolen ganz mit Bakterien verstopft.

3. Fall von *Strongylus pusillus* Müller bei einer Katze aus Sierre, die hustete, und sehr abgemagert war, daher getötet wurde. Die Lungen waren hyperämisch, mit sehr feinen, weißen Punkten, typischen Embryonen von *St. pusillus*. Sehr wichtig für die Diagnose der Krankheit bei lebenden Tieren ist die große Menge dieser Embryonen im Kehlkopf, Rachen und Magen; weniger zahlreich waren sie im Darne. Lungenschnitte zeigten eine starke Bronchopneumonie. Die Embryonen starben auf dem Schultzeschen beheizbaren Objektisch bei 48—49°

1) Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 1919. H. 7/8.

ab, in etwas Wasser gesetzt und der Einwirkung von Dämpfen (18°—20°) einiger Oele ausgesetzt, gingen sie nach 28 Std. (Terpentinöl) 27 Std., (Nelkendecioethrol) 19 Std., (Heliotropdecioethrol und Pfefferminzdecioethrol) zugrunde. Direkt in einige Lösungen gesetzt, starben sie nach 5—10 Min. (Terpentinöl, Nelken-, Heliotrop-, Pfefferminzdecioethrole), 10—15 Min. (Sublimat 1 ‰), 15 Min. (Kalkwasser), 5 Min. (Chlorkalklösung) ab. Auf Fließpapier gingen sie nach 16 Std., in Wasser nach 9 Tagen und auf feuchter Erde nach 5½ Mon. (Zimmertemp. 18°—20°) zugrunde.

4. Ein Fall von *Ollulanus tricuspis* bei der Katze. Nach Leuckart, dem Entdecker dieses Wurmes, scheint dieser Wurm nicht wieder gefunden worden zu sein.

Ich beobachtete bei einer jungen Katze aus Le Mont s/Lausanne, die nach galligen Erbrechen und dysenterischen Entleerungen zugrunde gegangen war, folgendes: In der rechten Lunge viele Herde von Bronchopneumie, im leeren Magen leichte Hyperämie, im Dünndarm trübe Flüssigkeit und starke Hyperämie; Dickdarm, Coecum und Rectum waren ganz bedeckt mit geronnenem Blut, die Gallenblase mit dicker, grüner Galle erfüllt, Leber hyperämisch, Vergrößerung der Milz und der Mesenterialdrüse, Hyperämie der Nieren, Hyperämie und Oedem des Gehirnes und des Rückenmarkes. In der schleimigen den Magen bedeckenden Masse fanden sich sehr viele Männchen, Weibchen und Embryonen von *Oll. tricuspis*. Im Uterus der Weibchen bemerkte ich ein Ei, das nur segmentiert war oder die ersten Spuren eines Embryos zeigte.

♂ 560 μ \times 12 μ (Vorderende), 27 μ (Mitte), 30 μ (Hinterende), 36 μ (Bursa)

♀ 729—800 μ \times 12 μ (Vorderende), 30 μ (Mitte), 12 μ (Hinterende)

Eier: 54 \times 30 μ . Embryonen: 240—300 \times 15 μ .

Die Embryonen waren in der Magenmucosa zahlreicher als im Schleim. Einige fand ich in der Leber, nicht aber in anderen Organen. Leider konnte ich die Muskulatur nicht untersuchen. Eine weiße Ratte, die ♂, ♀ und Embryonen gefressen hatte und nach 4 Mon. getötet wurde, zeigte keine Infektion.

Krankheit und Tod dieser Katze waren wahrscheinlich nicht durch *Oll. tricuspis* hervorgerufen worden, denn die gefundenen Läsionen waren die des Typhus der Katzen und aus Darm, Lungen und Gehirn habe ich einen *Bac. coli* isoliert. Vielleicht hat die Infektion mit *Oll. tricuspis* vorbereitend dafür gewirkt.

5. Fall von *Linguatula rhinaria* beim Menschen. Im November 1919 operierte Dr. Affolter in der Oto-laryngologischen Klinik der Universität Lausanne einen jungen Mann von 19 Jahren, der an einem Fibrosarkom der Nase und des Cavum. litt. Dabei bemerkte er auf der Geschwulst einen Parasiten, den er mir zusandte und der ein Männchen von *Linguatula rhinaria* war, 1 cm lang und 3 mm breit. Nachdem Laudon 1878¹⁾ den 1. Fall von *L. rhinaria* aus der Nase eines Mannes beschrieben hatte, ist dieser Parasit aus der Nase von Menschen nicht wieder beschrieben worden. Vor einigen Jahren hatte ein Kollege an Epistaxis und Schmerzen in der Nase gelitten und eines Tages einen Wurm ausgestoßen, worauf Epistaxis und Schmerzen verschwanden. Seine Zeichnung des Wurmes erinnerte an ein Weibchen von *L. rhinaria*, worauf ich ihm unter anderen Parasiten eine *L. rhinaria* zeigte, die

1) Berl. med. Wochenschr. 1878. S. 730.

er für ganz ähnlich dem von ihm ausgestoßenen Wurme erklärte. Daher ist erwiesen, daß *L. rhinaria* bei Menschen verbreiteter ist, als man denkt; sie wird aber nicht beachtet. Buri¹⁾ hatte in Bern die Larven von *L. rhinaria* bei 8,48 Proz. vom Vieh gefunden, wogegen bis jetzt kein Fall von *L. rhinaria* aus der Nase des Hundes beschrieben ist. Kollege Socin, den ich gebeten hatte, nachzusehen, ob er in Leichen des Pathologischen Institutes Larven von *Linguatula* finden könnte, hat nach einigen Tagen eine solche Larve in der Leber gefunden.

Ob der Parasit bei der Entwicklung des Fibrosarkoms eine Rolle gespielt hat, ist nicht sicher, da ich in den Schnitten weder *Linguatulae* noch Eier gefunden habe.

6. Nochmals über Parasitismus von *Ornithomyia avicularia* L. beim Menschen. Nachdem ich schon früher einige Fälle von Parasitismus dieser Art auf Menschen beschrieben hatte²⁾, kann ich jetzt einen anderen Fall veröffentlichen:

Ein Herr bewohnte ein Zimmer, an dessen Fenster ein Nest von *Hirundo rustica* fixiert war. Er wurde sehr oft gestochen, speziell am Hals, und litt an starkem Jucken; er fand im Zimmer, im Bett und in seinem Rocke Exemplare von *O. avicularia*. Als die jungen Schwalben fortgezogen waren, hörten auch die angeführten Erscheinungen auf.

7. Untersuchungen über *Melophagus ovinus*. Setzt man Schaflausfliegen in ein Gefäß mit Wattestücken und Schafwolle, so verstecken sie sich darin und bleiben ganz ruhig. Werden sie aber auf den Menschenarm gesetzt, so verstecken sie sich schnell in den Haaren und bleiben auch da ganz unbeweglich. Auf Papier bewegen sich die Schaflausfliegen schnell in ziemlich gerader Linie mit sehr wenigen Windungen. Zwischen zwei 27 cm entfernten Punkten legen sie eine Strecke von 35 cm in 4 Min. zurück, auf einer Schnur aber 7 cm in 3—4 Min. und auf Watte und Wolle 4—5 cm in $\frac{1}{2}$ Min. Auf Glas können sie sich kaum bewegen. Setzt man sie auf 30° erwärmtes Papier so bewegen sie sich sehr schnell und zwar 8—10 cm in $\frac{1}{2}$ Min.; steigt aber die Temperatur auf 40°, so bewegen sie sich nicht mehr und sterben ab. Wenn sie kein Blut saugen, sterben sie in 5—6 Tagen (Zimmertemp. 18—20°). Um festzustellen, ob die Schaflausfliegen Menschen stecken, habe ich solche auf meinen Vorderarm gesetzt, von denen einige nicht stechen wollten, andere aber mich stark gestochen haben. Der Stich ist etwas schmerzlich, das Jucken aber nicht sehr stark. An der Stichstelle bildet sich ein kleiner roter Knopf, der mehr als 1 Monat bleibt. Wurden die Melophagen, die mich gestochen hatten, mit sehr vielen *Herpetomonas melophagi* infiziert, so habe ich in einem Knopfe diese Parasiten und *Leishmania*-Formen vergeblich gesucht. Die Schaflausfliegen scheinen also Menschenblut nicht sehr zu lieben, denn sie saugen nur 2 cg Blut.

8. Untersuchungen über Chironomidae, Simuliidae und Tabanidae: *Ceratopogon pulicaris* L. war im Sommer 1920 eine wahre Plage, speziell auf den Bergen, indem sie in großen Schwärmen die Menschen angriffen und sie nicht nur an unbedeckten Körperteilen

1) Schweiz. Arch. f. Tierheilk. Bd. 55. H. 11.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. 1907. S. 523; Bd. 56. 1910. S. 43; Bd. 65. 1912. S. 304.

stachen, sondern auch unter die Kleider drangen. Die Stiche waren so schmerzhaft, daß es unmöglich war, da, wo sie zahlreich waren, zu bleiben. Sie stachen speziell Menschen in schwarzen Kleidern, und auch ich wurde, wenn ich schwarz gekleidet war, sehr stark angegriffen, wogegen ich in heller Kleidung sehr wenig gestochen wurde. *C. pulicaris* sticht auch am Tage, geht aber nicht in Zimmer. Große Schwärme dieses Parasiten habe ich in Vallée de la Tinière, 1400 m (Waadt), am 30. Mai und im Dorfe Flon, 1043 m, (Wallis) am 6. Juni 1920 sowie in Gruben im August gefunden.

Auch die Simulidae waren im Sommer 1920 sehr zahlreich, und ganz in der Nähe von Lausanne wurde ein Kollege von Simulidae so stark gestochen, daß er 48 Std. an starkem Oedem litt. Ein auf seinem Körper gefangenes Exemplar wurde von Edwards als *Simulium ornatum* Mg. bestimmt. Die Sache ist deswegen interessant, weil nach Edwards¹⁾ es noch nicht sicher war, daß diese Art Blut saugt, und Friederichs²⁾ sagt, daß in Deutschland diese Art Vieh niemals sticht und wahrscheinlich überhaupt nie Warmblüter. Große Schwärme von Simulidae (*S. rufipes* Meig. = *hirtipes* Fries und wahrscheinlich andere Arten)³⁾ habe ich in diesem Sommer auf den Bergen in Kt. Waadt und Kt. Wallis bis zu 2579 m angetroffen, wurde aber nie von ihnen gestochen. Auch wenn ich sie auf meinen Vorderarm setzte, wollten sie nie stechen und gingen in 2 Tagen zugrunde. Da man diese Simulidae sehr weit von Flüssen und Bächen entfernt findet, ist anzunehmen, daß sie sehr weit vom Produktionszentrum wegfliegen können oder daß sie sich nicht in fließenden Gewässern entwickeln. Nach meinen Beobachtungen gehen die Simulidae sehr leicht durch Müllergaze, die die Culiciden nicht traversieren können, weil sie in die Maschen dringen und dann mit ihren starken Körperbewegungen diese erweitern und fortfliegen. Auch da, wo die Simulidae sehr zahlreich waren, habe ich sie nie in Zimmern gefunden. Auch die Tabanidae waren im Sommer 1920 auf den Bergen sehr verbreitet und unangenehm, nicht nur für Tiere, sondern auch für Menschen. In den Alpen von Waadt und Wallis wurde ich von *T. aterrimus*, *T. apricus*, *T. bromius* und *T. pluvialis* bis zu 2044 m gestochen, niemals aber von *T. bovinus*, auch wenn ich sie auf meinen Vorderarm setzte. Dem fast gegenüber habe ich in diesem Jahre bemerkt, daß *T. apricus* 4, *T. bovinus* 3 und *T. aterrimus* 5—7—9 Tage resistent.

9. *Ctenocephalus serraticeps* im Gehirn eines Hundes. Am 15. Aug. 1920 erhielt ich von Prof. v. Meyenburg das Gehirn eines Hundes, der mit starken zerebralen Symptomen zugrunde gegangen war. Am Hinterrande des rechten Hirnventrikels wurde ein kleiner, gelblicher Punkt bemerkt, der sich mit der Lupe als Teil eines Flohes, des Weibchens von *Ct. serraticeps* herausstellte, das mit seinem vorderen Ende im Gehirn so versteckt war, daß ich mit einer Zange nicht nur den Floh, sondern auch ein Stück der Gehirnssubstanz herauszog, die in den Schnitten starke Hyperämie mit kleinzelliger In-

1) Bull. of entomol. research. Vol. 6. 1915. p. 23.

2) Berl. tierärztl. Wochenschr. 1920. S. 567.

3) Edwards (Ann. Mag. Nat. Hist. Jan. 1921) hat die Simulidae, die ich in Gruben gefunden habe, untersucht und eine neue Art als *S. gallii* beschrieben.

filtration und einigen Mikrokokken zeigte. Der Floh war gestorben. Sehr wahrscheinlich hatte der Hund eine eiterige Ohrentzündung mit Durchbohrung des Trommelfelles gehabt, von wo aus der Floh in das Gehirn eingedrungen war.

d) Parasitologische Technk.

1. Ueber Färbung der Wimpern und Geißeln von Ciliaten und Flagellaten. Für diese Tiere habe ich die Methode von Hollande¹⁾, die bei Spirochäten so gute Resultate gibt, angewandt und konnte bei *Paramaecium*, *Opalina*, *Balantidium*, *Bodo* und *Herpetomonas* Wimpern und Geißeln sehr gut färben. Gute Resultate habe ich auch mit solchen Parasiten gehabt, wenn ich feuchte Ausstriche mit einem Tropfen 1-proz. Osmiumsäure fixierte und dann mit Giemsa 1:20 färbte. Bei Flagellaten habe ich gute Resultate auch mit der Methode von Casares-Gil²⁾ erzielt.

2. Aufsuchen von Spirochäten mit Cyanochinlösung. Als Ersatz von Tusche und Kollargol bei der Untersuchung von Spirochäten habe ich die Lösung von Grübler probiert und damit, besonders mit *Spiroch. dentium* und *Sp. bronchialis*, sehr schöne Resultate erzielt.

3. Ein Mikroskop für Arbeiten auf dem Lande und speziell auf den Bergen. Die gewöhnlichen Reisemikroskope sind noch für viele Untersuchungen auf dem Lande und auf den Bergen zu schwer, weswegen ich bei der Firma Leitz anregte, nach etwas anderem für mich zu suchen. Sie hat darauf ihr Reisetaschenmikroskop etwas modifiziert, so daß es jetzt möglich ist, die Stativsäule mit 2 Schrauben auf einer soliden Platte zu fixieren und auch mit Oelimmersionen sehr gut zu arbeiten. Das ganze Mikroskop ist zerlegbar und kann in einer Segeltuchtasche verpackt und mit Schulterriemen am Bandeliere getragen werden; es wiegt nur 1080 g und ist mit dem von mir beschriebenen Tischchen³⁾ sehr praktisch für Arbeiten auf dem Lande.

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 80. 1917. S. 264.

2) Ebenda. Bd. 76. 1915. S. 233; ~~80~~, 1917. S. 264.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. 1916. S. 41.

Inhalt.

Aoki, K., u. Konno, T., Studien über die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination. II. Mitteilung. Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen in Typhus-immuneris, S. 330.

Bertoloni, Giovanni, Ueber die Immunitätsreaktionen beim Wochenbettfieber, mit Berücksichtigung der üblichen Therapie. Mit 23 Kurven im Text, S. 266.

Bieling, E., Methoden zur Differenzierung der Streptokokken und Pneumokokken. S. 257.

Galli-Valerio, B., Parasitologische Untersuchungen und Beiträge zur parasitologischen Technik, S. 346.

van der Reis, Die Wirkung menschlicher und tierischer Galle auf Bakterien S. 337.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 5.

Ausgegeben am 28. Juni 1921.

Nachdruck verboten.

Ueber die Variationsformen der Bakterien und ihre Ueber- einstimmung mit den Variationsformen der Metazoen.

[Aus der Medizinischen Klinik Erlangen (Direktor: Prof. L. R. Müller).]

Von Prof. E. Toennlessen, Oberarzt der Klinik.

Mit 2 Tafeln.

In früheren Untersuchungen¹⁾ über Vererbung und Variabilität bei Bakterien hatte ich folgende Variationsformen unterschieden:

1) Die Modifikation. Unter dem Einfluß äußerer Bedingungen ändert sich eine bestimmte Eigenschaft. Die Veränderung geht bei Wegfall des Variationsreizes mehr oder weniger rasch wieder zurück, ist also nicht erblich. Sie beruht darauf, daß das Zytoplasma (bei Metazoen das Soma im Sinne Weismanns) die Fähigkeit hat, auf einen äußeren Reiz mit Abänderung eines Artmerkmals zu reagieren, ohne daß die Abänderung das Keimplasma ergreift.

2) Die Mutation. Manchmal in erkennbarem Zusammenhang mit äußeren Reizen, manchmal aber scheinbar spontan, treten Veränderungen unter den Nachkommen einer reinen Linie ein. Diese Veränderungen betreffen nur einen Teil der Individuen, erfolgen sprunghaft und sind ohne Fortwirkung des Variationsreizes erblich. Unter gewissen Bedingungen erfolgen jedoch gleichartige Rückschläge in den Ausgangstypus. Diese Variation wurde auf einen Valenzwechsel von Erbfaktoren zurückgeführt, wobei das Verschwinden einer Eigenschaft auf Inaktivierung (Latentwerden) eines Erbfaktors, das Wiederauftreten der Eigenschaft auf Aktivierung eines latenten Faktors bezogen wurde.

3) Die Fluktuation. In deutlicher Beziehung zu äußeren Einflüssen (stärkster Variationsreiz) entsteht eine erbliche Veränderung eines Artmerkmals. Die Veränderung ergreift nur einen kleinen Teil der Individuen. Nach dem Grade der Abweichung vom Typus ließen sich beim Pneumoniebazillus 3 Fluktuanten unterscheiden, die eine kontinuierliche Reihe bildeten. Die Fluktuanten erwiesen sich erblich derart konstant, daß ich die Fluktuation auf einen Verlust von Erbinheiten zurückführte.

4) Die Kombination. Sie beruht auf Amphimixis ungleichartigen Erbmaterials, d. h. auf Bastardierung, und kommt bei Bakterien nicht in Betracht, da sich diese asexuell fortpflanzen.

Diese Einteilung der Variationsformen stammt von Beijerinck²⁾. Ich schloß mich ihr an, da sie alle Möglichkeiten erschöpft, mußte aber schon damals die Begriffe im einzelnen etwas anders fassen. Hinsichtlich anderer Begriffe der Vererbungsforschung, z. B. des Genotypus und Phänotypus, verweise ich auf frühere Arbeiten.

Die meisten Bakteriologen haben die Benennung Modifikation und Mutation in gleichem Sinne gebraucht, wie Beijerinck, doch ist über den Mutationsbegriff in letzter Zeit ein lebhafter Streit entstanden, worauf später noch ausführlich eingegangen werden soll. Eine Fluktuation in dem von mir beschriebenen Sinne wurde von anderen Autoren noch nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu dieser Einteilung unterscheidet die moderne Vererbungsforschung³⁾ nur 2 Variationsformen, nämlich:

1) die Modifikation = Somavariation (von Plate in Somation abgekürzt), welche der bereits oben gegebenen Definition entspricht, und

2) die Mutation = Blastovariation, die auf einer Veränderung des Keimplasmas beruht, also erblich ist. Eine derartige Veränderung des Genotypus kann eintreten durch Mischung ungleichartiger Erbfaktoren, wie sie bei der Bastardierung erzielt wird

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 73 u. 75; Biol. Centralbl. Bd. 35.

2) Folia microbiol. 1912.

3) Vgl. insbesondere Plate, Vererbungslehre 1913 und Selektionsprinzip 1913.

(Amphimutation oder Kombination) oder durch Abänderung, Verlust oder Gewinn von Erbfaktoren (= Idiomutation). Der Begriff der Mutation wird also in der Vererbungsforschung wesentlich anders gefaßt, als in der bakteriologischen Literatur bisher meist üblich. Dies ist unzweifelhaft ein Mißstand, der zur Verwirrung führt und beseitigt werden muß. Da nun die Untersuchungen bei Bakterien jüngeren Datums sind als die bei Metazoen, so bleiben für die Begriffsbildung und Nomenklatur in der Bakteriologie meines Erachtens 2 Möglichkeiten:

- 1) Stellt man sich auf den Standpunkt, daß die Vererbung bei Bakterien ein grundsätzlich anderer Vorgang ist als die Vererbung bei den Metazoen, so müssen für die Variationsformen der Bakterien neue Namen gefunden werden.
- 2) Macht man keinen prinzipiellen Unterschied, so kann man die für Metazoen aufgestellten Begriffe in die Bakteriologie übernehmen, dann aber unbedingt im gleichen Sinne.

Ich möchte mich für die letztere Auffassung entscheiden, und zwar aus folgenden Gründen:

1) Weismann hat gezeigt, daß die Metazoen im Soma und Keimplasma differenziert sind, und daß das Keimplasma eine von den Veränderungen des Somas weitgehende Selbständigkeit besitzt; denn vom Soma erworbene Eigenschaften werden bei den Metazoen nicht vererbt. Im Gegensatz zu den Metazoen fehlt bei den Protozoen und also auch den Bakterien die Differenzierung in Soma und Keimplasma. Da nun die Fortpflanzung der Protozoen durch unmittelbare Teilung der Elternzelle erfolgt, schloß Weismann, daß bei den einzelligen Lebewesen jede erworbene Veränderung unbedingt auf die Nachkommen vererbt werden müsse, daß also zwischen Metazoen und Protozoen ein prinzipieller Unterschied hinsichtlich der Vererbung von Variationen bestehe. Dieser rein theoretisch gefaßte Schluß läßt sich jetzt nicht mehr aufrecht erhalten. Bei Protozoen sind Variationen von sehr verschiedener Beständigkeit schon länger bekannt und auch bei Bakterien in den letzten Jahren gefunden worden. Besonders der Nachweis einer vollkommen sprunghaft, d. h. im Laufe einer Generation einsetzenden Variation, wie sie in folgendem als Alternation beschrieben werden soll, ist als Widerlegung der Weismannschen Anschauung zu betrachten.

2) Die Differenzierung der Metazoen in Soma und Keimplasma bewirkt keinen absoluten Gegensatz zwischen Keimzellen und Somazellen. Denn die Metazoen besitzen nicht nur in den Zellen der Keimbahn, sondern auch in ihren Somazellen Keimplasma, was aus den Regenerationserscheinungen und den Temperaturexperimenten an Schmetterlingspuppen (Aenderung der Flügel Farbe durch Parallelinduktion) hervorgeht. Man unterscheidet infolgedessen nach Roux ein generatives und ein somatisches Keimplasma. Niedere Metazoen können sogar Keimzellen aus differenzierten Somazellen bilden (von Child und Kussokewitsch, zit. nach Roux¹⁾, nachgewiesen). Andererseits kommt bei den einzelligen Organismen nicht das ganze Soma der Elternzelle in gleichem Grade für die Fortpflanzung in Betracht: so hat schon Weismann selbst zugegeben, daß bei Infusorien eine Trennung von somatischer und generativer Komponente morphologisch-entwicklungsgeschichtlich klar hervortritt (zit. nach Jollos²⁾). Auch bei Bakterien liegen Anhaltspunkte für eine Sonderung von generativen und somatischen Bestandteilen bereits vor. So hat Swellengrebel³⁾ am B. „deliense“ nachgewiesen, daß für die Fortpflanzung nicht das ganze Soma der Elternzelle in Betracht kommt, sondern nur ein vom Zytoplasma und dem zentralen Chromatinfaden sich abtrennender Teil, und zwar wird ein Teil der Vererbungssubstanz zur Sporenbildung verwendet — er ist gewissermaßen morphologisch differenziertes Keimplasma — ein anderer Teil bleibt im Bakterienleibe zurück und kann durch Teilung des Bakterienleibes zur Vererbung führen.

3) Der Kernpunkt der Vererbungslehre besteht darin, daß die Artmerkmale durch Keimzellen auf die Nachkommen übertragen werden, und daß den einzelnen Merkmalen bestimmte Erbfaktoren entsprechen. Unter diesem Gesichtspunkte könnte man zwischen sexuellen Organismen und Bakterien einen Unterschied konstruieren, wenn bei den sexuellen Arten die Keimzellen vom Soma gebildet würden, während bei den Bakterien nur das „Soma“ selbst vererbt würde. Diese Auffassung ist aber falsch. Einerseits werden die Keimzellen der Metazoen nicht vom Soma gebildet, sondern umgekehrt: ein Teil der Abkömmlinge der Keimzellen differenziert sich zum Soma, ein anderer Teil bleibt undifferenziert und bildet die Keimbahn (Boveri). Die Vererbung bei Metazoen findet also durch Fortpflanzung der undifferenzierten Keimzellen statt („Kon-

1) Ueber die bei der Vererbung von Variationen anzunehmenden Vorgänge. Leipzig [Engelmann] 1913.

2) Zeitschr. f. ind. Abstamm. u. Vererbungslehre. Bd. 12. 1914.

3) Arch. f. Protistenk. Bd. 31. 1913.

tinuität des Keimplasmas“ Weismanns). Andererseits müssen wir die Bakterien hinsichtlich ihrer Vererbungsfunktion nicht mit dem Soma, sondern mit den Keimzellen der sexuellen Organismen vergleichen; denn sie enthalten Vollkeimplasma (im Sinne von Roux). Jedes Individuum bei den einzelligen Organismen ist also eine Keimzelle.

Wenn nun die Bakterien, im Gegensatz zu den Keimzellen der Metazoen, eine große Variabilität besitzen, welche an die Variabilität des Somas der höheren Tiere erinnert, so sind sie trotzdem nicht mit dem Soma der höheren Tiere zu vergleichen. Ihre unter Umständen sehr rasch in Erscheinung tretende Variabilität ist dadurch bedingt, daß sie neben dem Keimplasma noch Zytoplasma enthalten, welches rasch auf äußere Reize reagieren kann. Diese Reaktionsfähigkeit ist eine Grundbedingung für die Existenz der einzelligen Lebewesen; da sie isoliert in sehr wechselnden Außenbedingungen lebensfähig sind, müssen sie eine gewisse Anpassungsfähigkeit an äußere Reize besitzen. Wie die Variationsformen zeigen, bleibt das Keimplasma dabei fast durchweg unbeeinflusst. — Die Uebereinstimmung der Protozoen mit den Keimzellen der Metazoen wird dadurch noch vollständiger, daß auch die Keimzellen der Metazoen außer dem Keimplasma zytoplasmatische Bestandteile enthalten, welche für die Vererbung nicht oder in geringerem Grade in Betracht kommen (Nährsubstanzen der Eizelle, Bewegungsorgane der Samenzellen).

Hinsichtlich der Vererbungsfunktion sind also die Keimzellen der Metazoen und die Individuen der Protozoen gleich aufgebaut; sie bestehen aus Keimplasma („Vollkeimplasma“ Roux) und Zytoplasma. Das Keimplasma ist zusammengesetzt aus den eigentlichen Erbfaktoren, und diese haben wir uns nach Plates jetziger Auffassung¹⁾ als Reizquellen vorzustellen, welche das Zytoplasma zu seinen spezifischen Leistungen anregen. Das Zytoplasma ist also „ausführendes Organ“; es ist durch äußere, d. h. von der Umwelt, und durch innere, d. h. von den Erbfaktoren ausgehende Reize beeinflusbar.

Bei der Ontogenese der Metazoen differenzieren sich die Zellen zu verschiedenen Organen und Geweben; sie büßen dabei einen Teil des Keimplasmas ein und enthalten nur noch Partialkeimplasma sowie Zytoplasma. Denn sie können bei ihrer Proliferation nie mehr einen neuen, vollständigen Organismus, sondern nur Zellen ihres Differenzierungsstadiums aus sich hervorgehen lassen. Derartige Zellen mit Partialkeimplasma existieren bei Protozoen nicht, da bei ihnen die Differenzierung in Organe und Gewebe fehlt.

Daß eine Somavariation der höheren Metazoen neben dem Zytoplasma der veränderten Organzellen auch das somatische Keimplasma dieser Zellen ergreift, ist unwahrscheinlich, denn man beobachtet, daß diese Somavariationen bei Fortfall des Variationsreizes wieder verschwinden, und zwar oft schon beim gleichen Individuum, von dem sie erworben waren (z. B. Aktivitätshypertrophie von Muskeln, Pigmentationen durch Wärme u. a.). Es liegt also wahrscheinlich nur eine Reaktion des Zytoplasmas auf äußere Reize vor. Die mehr oder weniger große Beständigkeit einer solchen Variation bei Fortfall des Variationsreizes beruht darauf, daß nicht nur das Keimplasma, sondern auch das Zytoplasma ein gewisses Beharrungsvermögen hinsichtlich seiner Funktionen besitzt. (W. v. Leubes Tenazität der Zellen.)

Die Vererbung erworbener Eigenschaften, die ich mir auf dem Wege der zytoplasmatischen Induktion vorstelle, tritt vermutlich so ein, daß das Zytoplasma durch den Variationsreiz so stark verändert wird, daß der somatische Erbfaktor dabei nicht unverändert bestehen kann, und eine Veränderung erleidet. Die Variationsbreite des Artmerkmals wird hierbei überschritten. Natürlich muß das somatische Keimplasma die Fähigkeit haben, auf den Reiz durch eine entsprechende Abänderung zu reagieren und einen neuen Erbfaktor zu bilden; der Reiz muß also eine noch ungeweckte Differenzierungsfähigkeit des somatischen Keimplasmas treffen (vgl. die späteren Ausführungen über die progressive Mutation). In diesem Vorgang, also in der zytoplasmatischen Induktion, liegt meines Erachtens das größte Rätsel. Wesentlich leichter zu verstehen ist es, daß das somatische Keimplasma die eigene Veränderung auf irgendeinem Wege auf das generative Keimplasma überträgt. Bei den einzelligen Lebewesen ist diese Übertragung nicht nötig; hier wird das generative Keimplasma unmittelbar vom Zytoplasma beeinflusst.

1) Herr Prof. Plate war so freundlich, mir einen persönlichen Meinungs austausch über die Ergebnisse vorliegender Arbeit zu gewähren. Bei dieser Gelegenheit äußerte er auch seine jetzige Auffassung über die Bedeutung des Zytoplasmas und der Erbfaktoren. Ich habe daraufhin meine vorherige Annahme eines generativen und somatischen Keimplasmas bei Bakterien fallen lassen und unterscheide in folgendem nur Keimplasma und Zytoplasma. Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Prof. Plate für sein großes Entgegenkommen und für manche Anregung herzlich danken.

Mehr als die bisher erwähnten Tatsachen sprechen die in folgendem zu schildernden Variationsformen der Bakterien dafür, daß hinsichtlich der Vererbung kein prinzipieller Gegensatz zwischen den Keimzellen der Metazoen, also auch den Metazoen selbst und den Bakterien, besteht. Die gleichen, scharf charakterisierten Variationsformen lassen sich ebenso wie bei den Metazoen auch bei den Bakterien nachweisen (mit Ausnahme der Variabilität durch Bastardierung, die jedoch keine Variationsform im strengen Sinne, d. h. eine Erscheinung der Reaktionsfähigkeit des Zytoplasmas oder des Keimplasmas auf äußere Reize ist und somit für den Vergleich nicht in Betracht kommt). Diese Übereinstimmung läßt sich nur verstehen, wenn man ebenso wie bei den Metazoen auch bei den Bakterien ein rasch auf Reize reagierendes Zytoplasma und ein schwer zu beeinflussendes Keimplasma annimmt. Wirken auf die Individuen äußere Reize ein, so können diese entweder nur die sichtbaren Artmerkmale, also das Zytoplasma verändern oder das Keimplasma selbst ergreifen. Wir haben demzufolge unter den Variationen die Somavariation („Somation“ Plates = Modifikation Nägeli's) und die Blastovariation = Mutation zu unterscheiden. Eine weitere Form der Variabilität ist die Variation durch Valenzwechsel von Erbfaktoren. Sie wird von Plate zwar nicht als Form der Variabilität, sondern der Vererbung behandelt, doch ist sie zweckmäßiger unter die Variabilitätserscheinungen einzureihen. Denn sie spielt unter den Variationsformen eine große Rolle bei Protozoen und Metazoen, und wird deshalb in folgendem mit einem besonderen Namen, nämlich als Alternation bezeichnet.

So haben sich durch Berücksichtigung der Vererbungserscheinungen bei den Metazoen neue Gesetzmäßigkeiten aus den früher von mir beschriebenen Variationsformen einer Bakterienart ergeben, die in folgendem aus den Tatsachen abgeleitet werden sollen. An dem experimentell gefundenen hat sich gegen früher nichts geändert, und ich gehe deshalb auf das bereits Beschriebene jetzt nur im wesentlichen ein, soweit es eben für die Ableitung der Gesetzmäßigkeiten unbedingt nötig ist. Zugleich möchte ich den Versuch machen, die von anderen Autoren gefundenen Bakterienvariationen kurz zu analysieren und in bestimmte Formen der Variation einzureihen.

Das Beobachtungsmaterial. Der normale Phänotypus. Sein Konstanthalten. Der Variationsreiz und der konträre (nach dem Typus hin variierende) Reiz.

Die Beobachtungen fanden statt am Pneumoniebazillus Friedländer. Dieser Bazillus (Tafelfig. 1) ist ein breites Stäbchen mit breitem Ektoplasma. Auf das Ektoplasma folgt noch die breite Außenhülle, die sog. Kapsel, welche nach den letzten Untersuchungen¹⁾ aus einem Polysaccharid der Galaktose, einem sog. Galaktan, besteht. Die hinsichtlich der Variierung untersuchte Eigenschaft war die Bildung der Galaktanhülle. Bei einer Variationsform (der bisherigen „Mutation“) stellte sich auch eine morphologische Veränderung des Ento- und Ektoplasmas ein. Als Variationsreiz wurde kein grober chemischer oder physikalischer Reiz gesetzt, sondern lediglich die Einwirkung der Stoffwechselprodukte verwendet. Es kam also ein Variationsreiz zur Wirkung, der bei der üblichen künstlichen Kultivierung bei allen Bakterien zur Wirkung kommt. Die Stoffwechselprodukte bestehen beim Friedländer-Bazillus in den Abbauprodukten des Galaktans. Verschiedene organische Säuren sind als solche bereits nachgewiesen (Frankland²⁾). Da das Galaktan am reichlichsten auf Glycerinagar und bei Sauerstoffzutritt gebildet wird (die Synthese des Glycerins zu Galaktose erfordert Sauerstoffzutritt), so ist es klar, daß der Variationsreiz beim Friedländer-Bazillus am stärksten in der Agarstrich-Kultur einwirkt, im Gegensatz zu anderen Bakterien, die

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85.

2) Zitiert nach Lehmann und Neumann, Bakteriologie. Diagnostik. 5. Aufl.

am leichtesten in alternden Bouillonkulturen variieren. Es ist also von der Biochemie des einzelnen Bakteriums abhängig, auf welchem Nährboden der Variationsreiz der Stoffwechselprodukte am stärksten ist. Ferner ist in der Agarstrichkultur der Variationsreiz stärker als bei der Kultivierung durch den Plattenguß, weil in der Strichkultur das Wachstum von Anfang an im zusammenhängenden Bakterienrasen stattfindet. Man kann den Variationsreiz durch verschieden lange Zwischenräume zwischen den einzelnen Uebertragungen beliebig abstufen. Die stärkste Einwirkung des Variationsreizes wird erreicht, wenn eine mehrere Wochen alte Kultur im ganzen, d. h. der ganze Bakterienrasen und das Kondenswasser des Schrägagars, auf einen neuen Schrägagar übertragen wird.

Der normale Phänotypus läßt sich auch bei künstlicher Kultivierung beliebig lange konstant halten, wenn eine Anhäufung der Stoffwechselprodukte vermieden wird. Dies ist der Fall bei kurzfristiger Uebertragung in Bouillon oder durch das Plattengußverfahren, wobei das Wachstum zunächst aus einem isolierten Keim heraus und erst später im zusammenhängenden Bakterienrasen stattfindet.

Dem Variationsreiz entgegengesetzt wirken Tierpassagen. Sie sind das beste Mittel, um den normalen Phänotypus konstant zu erhalten, und das einzige Mittel, um gewisse Varianten wieder in den Typus zurückzuführen oder wenigstens dem Typus wieder zu nähern.

Die Variationsformen.

1) Die Modifikation.

Durch den geringsten Variationsreiz: am besten Uebertragungen durch Agarstrichkultur in Zwischenräumen von 7 Tagen — nimmt die Bildung der Galaktanhüllen allmählich ab, und ungefähr in der 15. Kulturgeneration ist das Minimum der Galaktanbildung erreicht. Man muß dabei stets von der Mitte des Bakterienrasens abimpfen, denn am Rande, also bei den zuletzt, unter dem stärkeren Einfluß der Stoffwechselprodukte gewachsenen Individuen, tritt eine andere Variationsform ein (vgl. die 2. Variationsform = Alternation). Von einer bestimmten Kulturgeneration ab ist es gleichgültig, ob vom Rande oder von der Mitte weiter übertragen wird.

Der Bakterienrasen ist dann weißlich und flach geworden, während der Typus glasig durchscheinend wächst (Tafelfig. 3) und saftige, erhabene Kolonien bildet. Die einzelnen Individuen einer extrem modifizierten Kultur zeigen bei der Untersuchung in Tusche alle Uebergänge hinsichtlich der Breite der Galaktanhüllen, der sog. Kapsel: einzelne Individuen haben breite Kapseln wie der Typus; die Mehrzahl Kapseln von mittlerer Breite, einige keine Kapseln mehr. Ektoplasma und Entoplasma ist gegen den Typus unverändert. Die Varianten fluktuieren um einen Mittelwert, und man nennt dies individuelle oder fluktuierende Variabilität. Die Erbllichkeit der Modifikation ergibt sich klar, wenn man von einer modifizierten Schrägagarkultur eine Aussaat durch Agarplattenguß macht. Dadurch wird die Nachkommenschaft der einzelnen Individuen der modifizierten Massenkultur in getrennten Kolonien erhalten. Es entwickeln sich dann aus einer modifizierten Massenkultur verschiedenartige Kolonien. Einige sind wie die des normalen Phänotypus: glasig durchscheinend, groß, erhaben. Sie stammen aus den normal gebliebenen Individuen und ergeben bei Fortzüchtung durch

Agarplattenguß nur Kolonien des Typus. Die Mehrzahl der Kolonien dagegen ist wesentlich verändert, und zwar lassen sich bis zu den extrem veränderten alle Uebergänge nachweisen: die Mittelvarianten sind etwas kleiner und flacher wie die des Typus, mit weißlichen Rädien (Tafel fig. 4) durchsetzt, die Extremvarianten sind noch bedeutend kleiner, fast ganz flach, weißlich; sie zeigen nur bei mikroskopischer Betrachtung radiäre Streifen. Die einzelnen Individuen der extrem varianten Kolonie besitzen meist keine oder nur sehr schmale Kapseln, vereinzelt aber breite Kapseln. Sie bestehen also aus einem Gemisch phänotypisch normaler und verschieden stark modifizierter Individuen.

Wird von einer modifizierten Kolonie eine Aussaat durch Plattenguß gemacht, so erhält man ein Gemisch von normalen, mittel- und extrem-modifizierten Kolonien. Dies kann man, wenn man immer wieder von einer extrem modifizierten Kolonie abimpft, durch beliebig viele Kulturgenerationen wiederholen. Stets spalten also die extrem modifizierten Kolonien in ein Gemisch von normalen, mittel- und extrem modifizierten Tochterkolonien.

Daraus folgt, daß aus einem modifizierten Keim eine dem Grade der Variation entsprechend modifizierte Kolonie sich entwickelt. Bei Bildung dieser Kolonie schlägt aber ein Teil der Nachkommen der modifizierten Elternzelle in den Typus zurück, ein anderer Teil bleibt modifiziert, und so kommt es, daß die Nachkommenschaft einer modifizierten Kolonie stets wieder in normale und modifizierte Tochterkolonien gespalten ist. In einem gewissen Grade ist also die Modifikation erblich, d. h. sie bleibt bei einem Teil der Nachkommen ohne Fortdauer des Variationsreizes bestehen. Daß ein Teil der Nachkommen beim Plattengußverfahren in den normalen Typus zurückschlägt, ist dadurch zu erklären, daß hierbei das Wachstum von einem isolierten Keim aus, also in den ersten Generationen ohne den Variationsreiz der Stoffwechselprodukte stattfindet. Wie aber ist es zu verstehen, daß ein Teil der Nachkommen ohne Fortdauer des Variationsreizes modifiziert bleibt? Man könnte daran denken, daß diese modifizierten Individuen erst bei einem gewissen Alter der Kolonie aus bereits wieder zurückgeschlagenen Keimen entstehen, da sich ja beim Größerwerden der Kolonie der Variationsreiz wieder einstellt. Das stimmt aber nicht, denn die weißlichen Rädien, die aus modifizierten Keimen bestehen, reichen bis in das Zentrum der modifizierten Kolonie, die modifizierten Individuen sind also von Anfang an vorhanden; demnach ist die Modifikation auch ohne Fortdauer des Variationsreizes bei einem Teil der Nachkommen erblich. Echte Erbllichkeit liegt jedoch nicht vor, denn bei Wegfall des Variationsreizes verschiebt sich der Mittelwert der Nachkommen sofort nach dem Typus zu.

Später dürfte allerdings der Einfluß der Stoffwechselprodukte wieder zur Geltung kommen insofern, als bei dem Größerwerden der Kolonie ein weiteres Zurückschlagen modifizierter Individuen in den Typus verhindert wird, und dadurch ist es erklärlich, daß sich bei Abimpfung aus einer extrem modifizierten Kolonie stets wieder modifizierte Kolonien neben Uebergangsformen und völlig zurückgeschlagenen Kolonien erhalten lassen.

Die extrem modifizierten Kolonien zeigen nach längerer Zeit (7 bis 10 Tage) an ihrer Peripherie einen Ring ganz normaler Individuen. Dieser entsteht aber nicht aus modifizierten Individuen durch völligen Rückschlag in den Typus, wie ich früher annahm, sondern dadurch, daß

die Keime mit breiten Galaktanhüllen bei gleicher Zahl der Generationen rascher an die Peripherie hervordringen als die kleineren modifizierten Individuen und dann an der Peripherie infolge der viskösen Beschaffenheit ihrer Hüllen ein konfluierendes Band bilden (ähnlich wie bei Tafelfig. 4). Wird hiervon abgeimpft, so erhält man nur phänotypisch normale Kolonien; impft man vom Zentrum ab, so entsteht, wie schon erwähnt, ein Gemisch normaler und modifizierter Kolonien.

Durch Tierpassagen schlägt die Modifikation bei allen Individuen sofort in den normalen Phänotypus zurück.

Vom Standpunkt der Vererbungslehre läßt sich die Modifikation folgendermaßen verstehen: Durch gelinde Einwirkung des Variationsreizes (vgl. hierzu die Entstehung der anderen Variationsformen) geht die Galaktanbildung bei den meisten Individuen der Massenkulturen zurück bis zu einem Nullwert bei den extrem modifizierten. Es werden also die für die Galaktanbildung in Betracht kommenden Zellteile durch die Anhäufung der Stoffwechselprodukte in ihrer Funktion gehemmt. Nun fragt es sich, ob nur das Zytoplasma oder auch das Keimplasma von dem Reiz getroffen ist. Die Veränderung ist bei Wegfall des Variationsreizes nur bei einem Teil der Nachkommen für mehrere Generationen erblich, bei einem anderen Teil schlägt sie sofort in den Typus zurück. Der Mittelwert der Nachkommen verschiebt sich also nach dem Typus zu und dadurch ist bewiesen, daß das Keimplasma nicht verändert sein kann. Es kann also die Veränderung nur das Zytoplasma betroffen haben.

Daß trotzdem die Modifikation auch ohne Fortdauer des Variationsreizes so viele Generationen beständig sein kann, im Gegensatz zu den Modifikationen der höheren Lebewesen, liegt daran, daß bei Bakterien das Zytoplasma zu erheblichen Abänderungen befähigt ist, in derart abgeändertem Zustand auf die Nachkommen übertragen wird und diesen Zustand eine Zeitlang festhält. Solange nun das betreffende Artmerkmal vom modifizierten Zytoplasma regeneriert wird, findet sich die Veränderung bei den Nachkommen wieder und erst, wenn die Nachwirkung des äußeren Reizes auf das Zytoplasma erschöpft ist, tritt durch den inneren Reiz des unveränderten Keimplasmas der normale Typus wieder hervor.

Schwierig ist es, zu erklären, warum bei Wegfall des Variationsreizes die Nachkommen eines modifizierten Individuums zum Teil sofort in den normalen Typus zurückschlagen, zum Teil modifiziert bleiben, also in normale und modifizierte Nachkommen spalten. Auf äußere Einflüsse kann dies nicht zurückgeführt werden, da sich sämtliche Individuen bei dem Wachstum aus einem isolierten Keim heraus unter gleichen Bedingungen befinden. Man könnte annehmen, daß das modifizierte Zytoplasma bei der Teilung der Zellen ungleich vererbt wird (erbungleiche Teilung), oder, was mir wahrscheinlicher ist, daß die galaktanbildende Funktion des Zytoplasmas nicht in der ganzen modifizierten Elternzelle gleich stark verändert ist, und daß dadurch bei der an sich symmetrischen Teilung ungleiche Tochterzellen entstehen. Diese Annahme würde mit der Tatsache übereinstimmen, daß in den modifizierten Massenkulturen die einzelnen Individuen alle Grade der Modifikation zeigen, d. h. daß das Zytoplasma bei den verschiedenen Individuen verschieden stark auf den Variationsreiz reagiert. Ebenso gut wäre dies bei den galaktanbildenden Teilen des Zytoplasmas innerhalb einer einzelnen Zelle möglich.

Daß die Modifikation durch Tierpassagen sofort verschwindet, ist dadurch zu erklären, daß das modifizierte Zytoplasma jetzt von dem konträren Reiz betroffen wird und infolge seiner raschen Reaktionsfähigkeit sofort in den normalen Phänotypus zurückschlägt.

So hat also die Weismannsche Anschauung, daß bei den durch einfache Teilung sich vermehrenden Organismen jede Veränderung erblich sein müsse im Gegensatz zu den höheren Organismen, doch eine gewisse Berechtigung, aber mit der Einschränkung, daß diese Erbllichkeit nicht lediglich durch Uebertragung des Zytoplasmas auf die Nachkommen vermittelt der Zellteilung bedingt ist, sondern durch weitere Proliferation des modifizierten Zytoplasmas in den Nachkommen (vgl. hierzu das gegensätzliche Verhalten und die sprunghafte Entstehung der alternierten Variante). Doch gibt es auch bei höheren Organismen eine ähnliche Vererbung von Modifikationen, nur nicht in solchem Grade wie bei einzelligen Lebewesen. Man führt diese Scheinvererbung oder pseudohereditäre Nachwirkung (Plate) auf Veränderungen des Zytoplasmas der Keimzellen, also nicht der eigentlichen Erbfaktoren, zurück und spricht mit de Vries von einer Erbllichkeit außerhalb der Zellkerne. Bei Plate sind Beispiele dieser Art angeführt.

Auf Grund der geschilderten Gesetzmäßigkeiten sind alle Variabilitätserscheinungen bei Bakterien, die sich allmählich ausbilden, fast alle Individuen der Massenkultur befallen und nach Wegfall des Variationsreizes mehr oder weniger rasch wieder verschwinden, z. B. der allmähliche Virulenzverlust, die Aenderung der Agglutinabilität, des Gärvermögens u. a. als Modifikationen zu betrachten. Die Modifikationen sind also eine sehr häufige Erscheinung der Veränderlichkeit, welche die Bakterien schon bei der üblichen Kultivierung erleiden. Die typischen Eigenschaften der modifizierten Stämme sind meist leicht wiederherzustellen, besonders wenn der konträr wirkende Reiz bekannt ist und zur Anwendung gelangen kann. Ein besonders interessantes Beispiel für eine Modifikation ist meines Erachtens die „Ueberführung“ von Streptokokken in Pneumokokken und umgekehrt, die Rosenow¹⁾ kürzlich beschrieb. Es können hämolytische Streptokokken durch Wachstum auf Blutagar unter hoher Sauerstoffspannung die Eigenschaften des *Streptococcus viridans* annehmen und weiterhin durch Tierpassagen in typische Pneumokokken übergehen. Umgekehrt geht der *Pneumococcus* unter erhöhter Sauerstoffspannung in den hämolytischen *Streptococcus* über. Rosenow deutet seine interessanten Ergebnisse meines Erachtens aber nicht richtig. Er glaubt, eine wirkliche Artumzüchtung oder „wechselseitige Mutation von Pneumokokken und Streptokokken“ erzielt zu haben, was nach dem heutigen Stande der Vererbungsforschung eine absolute Unmöglichkeit bedeutet. Aus der Entstehungsweise der Variation möchte ich vielmehr vermuten, daß lediglich Modifikationen vorliegen. Trotzdem sind die Befunde Rosenows von großer Bedeutung, denn sie beweisen, daß die bisher als besondere Arten angesehenen Varietäten der Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*, *haemolyticus*, *viridans*, *lanceolatus*) keine verschiedenen wirklichen Kleinarten sind, sondern nur verschiedene Phänotypen einer gemeinsamen Grundart, die aus sehr vielen Stämmen von gleichem oder sehr nahe verwandtem Keimplasma besteht. Unsere bisherigen Differenzierungsmethoden unterscheiden also nicht

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 73.

verschiedene Arten (Genotypen), sondern nur verschiedene Zustände der Streptokokken.

Zeigt eine Modifikation größere Beständigkeit als gewöhnlich, so kann man mit Jollos von Dauermodifikation sprechen. Dabei ist aber zu bemerken, daß Jollos mit diesem Namen auch diejenigen Bakterienvariationen bezeichnen will, welche in den letzten Jahren als Mutationen beschrieben worden sind. Diese sogenannten „Mutationen“ sind zwar, wie Jollos mit Recht behauptet, keine Mutationen, sie sind aber auch von der Modifikation grundsätzlich verschieden und beruhen auf Valenzwechsel von Erbfaktoren (vgl. die 2. Variationsform = Alternation).

Das Auftreten „beständig spaltender“ Varietäten ist nicht für die Modifikation allein charakteristisch, sondern kann sich auch bei der folgenden Variationsform finden.

2. Die Variation durch Valenzwechsel von Erbfaktoren: „Alternation“.

Die Begründung des Namens Alternation soll nach Schilderung der Tatsachen erfolgen. Man erhält diese Variationsform beim Pneumoniebazillus am raschesten und sichersten, wenn man durch fortgesetzte Uebertragung auf dem Schrägagar das Wachstum der Bakterien im zusammenhängenden Rasen weiter gehen läßt. Ueberträgt man in 3—7-tägigen Zwischenräumen, so tritt meist in der 3.—4. Kulturgeneration eine plötzliche, auffallende Veränderung ein. Während die ersten Kulturgenerationen aus homogenem, glasig durchscheinendem Bakterienrasen bestanden, zeigen sich jetzt am Rand des Bakterienrasens plötzlich weißliche Sektoren. Impft man von einem solchen Sektor ab, so erhält man durch Agarplattenguß 2 bedeutend verschiedene Arten von Kolonien, die durch keine Uebergangsformen verbunden sind. Ein Teil besteht aus dem normalen Phänotypus, der andere Teil aus kleinen, flachen, weißlichen und homogenen Kolonien, der alternierten Form (Tafelfig. 9). Die einzelnen Individuen dieser Variation sind morphologisch alle gleich: es sind schlanke Stäbchen, welche ein sehr schmales Ektoplasma besitzen und keine Schleimhülle mehr bilden, also auffallend vom Typus verschieden sind (Tafelfig. 8).

Es läßt sich einwandfrei beweisen, daß sich diese Variation sprunghaft vollzieht. Die Individuen, in denen die Variation beginnt (die ersten auftretenden, weißlichen Sektoren) zeigen im mikroskopischen, gefärbten Präparat ein sehr charakteristisches Zwischenstadium zwischen normalem Phänotypus und alternierter Form (Tafelfig. 6). Die Variation kommt bei ihnen nur deshalb nicht zu ihrem äußerlich sichtbaren Extrem, weil das Wachstum der Kultur zur Zeit der Variationsentwicklung bald stillsteht: denn die ersten alternierenden Individuen sind zugleich die zuletzt entstehenden der betreffenden Kulturgeneration (sie entstehen an der Peripherie des Bakterienrasens). Läßt man jedoch das Wachstum durch erneute Uebertragung fortgehen (Agarstrich oder Plattenguß), so finden sich diese Zwischenformen nicht mehr, sondern nur das Endstadium der Variation (Tafelfig. 7), obwohl der Sprung ein sehr bedeutender ist und demnach zahlreiche Zwischenstufen möglich wären (vgl. die später zu beschreibenden verschiedenen, erblichen Stadien der Mutation). Die übertragenen Zwischenformen müssen also entweder noch selbst oder in der nächstfolgenden Generation das Endstadium der Alternation erreicht haben.

Allerdings geht dem Eintritt der Variation eine latente Vorbereitungsphase voraus, auf die schon früher hingewiesen ist.

Aus der Entwicklung dieser Variation ist besonders klar zu ersehen, daß die Variation unter dem Einfluß der Stoffwechselprodukte eintritt, denn nur die zuletzt entstehenden Individuen werden von der Variation befallen, und außerdem, daß der Variationsreiz nur bei solchen Individuen wirksam ist, die während der Einwirkung des Reizes noch in Proliferation begriffen sind; denn die in der Mitte des Bakterienrasens gelegenen ältesten Individuen weisen keine Varianten auf.

Die Eigenschaften der durch Plattenguß rein gewonnenen alternierten Form verändern sich bei weiterer Kultivierung nicht mehr. Die Kolonien sind alle gleich und geben bei erneuter Aussaat — in Zwischenräumen von 1 Tag bis 4 Wochen — stets wieder nur die gleichen Kolonien: der Mittelwert der Nachkommen verschiebt sich nicht. Dies gilt für Uebertragung in Bouillon, auf Schrägagar sowie durch Plattenguß.

Unter gewissen Bedingungen lassen sich aber Rückschläge in den normalen Typus erzielen, welche dann ebenso sprunghaft erfolgen wie die Bildung der alternierten Form aus dem Typus. Der Rückschlag tritt ein, wenn Kulturen der alternierten Form längere Zeit (mindestens 8 Wochen) unübertragen stehen geblieben sind und dann neu überimpft werden. Dabei schlägt ein Teil der Individuen in den Typus zurück (Tafelfig. 10). Frische Kulturen der alternierten Form lassen sich nur durch Tierpassagen (Mäuse) in den Ausgangstypus zurückführen. Man muß wegen der geringen Virulenz der alternierten Form sehr große Mengen ins Tier verimpfen. Der Rückschlag tritt dann in der 2. bis 3. Tierpassage ein. Nach der 1. und eventuell der 2. Passage ist noch keine sichtbare Veränderung wahrzunehmen, dann aber vollzieht sich plötzlich der Rückschlag, und zwar ebenso stoßweise wie ursprünglich die Variation.

Die beschriebene Variationsform erkläre ich ebenso wie früher durch einen Valenzwechsel von Erbfaktoren, stehe jedoch nicht mehr auf dem Standpunkte, sie als Mutation zu bezeichnen. Die Variation zeigt sich darin, daß bestimmte Eigenschaften sprunghaft verschwinden und nach Generationen ebenso sprunghaft wieder auftreten. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Anlagen zu den betreffenden Eigenschaften nicht verloren gegangen, bzw. beim Rückschlag neu entstanden sind, sondern nur ihren Zustand gewechselt haben. Hinsichtlich der Bakterien hat Beijerinck wohl zuerst den Gedanken ausgesprochen, daß bei dieser sehr charakteristischen Variationsform aktive Erbinheiten latent werden. Diese Annahme zur Erklärung des zeitweiligen Verschwindens von Eigenschaften stammt schon von Darwin; sie hat lediglich auf Grund der äußeren Erscheinungsform der „Alternation“ viel Wahrscheinlichkeit für sich, durch den Gegensatz der Alternation zu den anderen Variationsformen erscheint sie mir so gut bewiesen, wie es überhaupt für die ja immerhin hypothetischen Erbfaktoren nur möglich ist. Bei dem äußerlich sichtbaren Verlust von Eigenschaften werden also aktive Erbfaktoren inaktiv = retrogressive Alternation; bei dem Rückschlag werden latente Faktoren wieder aktiv = progressive Alternation.

Man könnte das plötzliche Verschwinden der Galaktanbildung zunächst auch durch die Annahme erklären, daß nur das Zytoplasma von dem Variationsreiz betroffen wird, und zwar, daß die galaktanbildenden Teile nicht nur in verschiedenem Grade gehemmt werden, wie bei der Modifikation, sondern völlig gelähmt sind; denn der Variationsreiz ist

bei der Alternation stärker als bei der Modifikation. Die Veränderung des Zytoplasmas allein genügt meines Erachtens jedoch nicht zur Erklärung der Erbllichkeit dieser Variation; da sich der Mittelwert der Nachkommen ohne Fortdauer des Variationsreizes völlig konstant erhält, muß man eine gleichzeitige Veränderung des Keimplasmas selbst annehmen. Die Fähigkeit zu Rückschlägen läßt vermuten, daß es sich nur um einen Valenzwechsel von Erbfaktoren handelt, d. h. daß Erbfaktoren vom dominanten in den rezessiven Zustand übergegangen sind dadurch, daß der Grundfaktor zwar erhalten, das Supplement aber wirkungslos geworden ist (Grundfaktor-Supplementtheorie Plates). Bei der retrogressiven Alternation werden also durch den verstärkten Variationsreiz gleichzeitig die galaktanbildenden Teile des Zytoplasmas gelähmt und die entsprechenden Erbfaktoren inaktiviert. Nur so ist es verständlich, daß sich die Alternation sprunghaft, d. h. im Laufe einer einzigen Generation, vollzieht.

Das ebenso plötzliche Wiederauftreten der Galaktanbildung beim Rückschlag hätte man sich analog vorzustellen, d. h. Zytoplasma und Erbfaktor müssen gleichzeitig wieder in den aktiven Zustand übergehen. Man sieht aus der Alternation, daß trotz der Fortpflanzung der Bakterien durch unmittelbare Teilung der jeweilige Zustand des Zytoplasmas doch nicht unbedingt auf die Nachkommen übertragen werden muß, wie Weismann annahm; denn sonst wären nur allmähliche, im Laufe vieler Generationen sich entwickelnde Variationen möglich. Der inaktive Zustand der Galaktanbildung müßte sich beim Rückschlag des alternierten Individuums wenigstens zum Teil auf die Nachkommen fortpflanzen und würde so nur eine allmähliche Rückkehr zum normalen Typus ermöglichen. Dies ist aber nicht der Fall. Daraus folgt, daß sich die Alternation bzw. der Rückschlag während der Wachstumsperiode des einzelnen Individuums vollständig ausbildet, bevor die Teilung in die Tochterzellen erfolgt, und so kommt es, daß in den Tochterzellen die Alternation bzw. der Rückschlag voll ausgebildet in Erscheinung tritt.

Der große Unterschied zwischen Typus und Variante ist dadurch bedingt, daß eine Reihe von Erbfaktoren gleichzeitig inaktiv wird. Die Kapselbildung hört im vollen Umfang auf. Sie ist ein polygenes Merkmal, wie bei der Schilderung der nächsten Variationsform bewiesen werden soll, und außerdem wird noch Ekto- und Endoplasma morphologisch reduziert. All diese Eigenschaften erwiesen sich also bei der Alternation als „biologisch zusammengehörige Radikale“.

Die Zurückführung dieser Variationsform auf einen Valenzwechsel von Erbfaktoren stimmt vollkommen überein mit gewissen Variabilitätserscheinungen bei Metazoen. Plate hat in seiner Vererbungslehre zahlreiche Beispiele angeführt, welche einen Valenzwechsel von Erbfaktoren wahrscheinlich machen. Ein solcher Valenzwechsel kann auf vegetativen Wege als auch bei Vererbung durch Keimzellen eintreten (vgl. die Beispiele Vererbungslehre 1913. S. 205); hierher gehören u. a. der Farbwechsel nordischer Säugetiere, abhängig von der Jahreszeit, der Generationswechsel bei vielen Schmetterlingen, die „beständig umschlagenden Varietäten und Zwischenrassen“ des Pflanzenreiches. Ein solcher Valenzwechsel kann physiologisch sein, wie beim Generationswechsel, er kann auch durch experimentelle Variationsreize erfolgen, wie bei den Temperaturexperimenten von E. Fischer und Standfuss an Schmetterlingen. Hier handelt es sich, ebenso wie beim Pneumoniebazillus, um Parallelinduktion, denn die homologen Faktoren des Zyto-

plasmas und des Keimplasmas werden gleichzeitig durch den Variationsreiz verändert. Charakteristisch ist für diese Variationsform, daß sie sprunghaft eintritt, und daß sie oft große Unterschiede zwischen Typus und Variante schafft, da sie oft einen großen „Komplex von biologisch zusammenhängenden Radikalen“ (Plate) befällt, und daß sie stets wieder in den Typus zurückschlägt. Es ist wichtig, zu wissen, daß diese Variationsform anscheinend eine große Rolle in der Natur spielt, viele scheinbare Abweichungen von den Mendelschen Gesetzen dürften durch Valenz- oder „Dominanz“wechsel von Erbfaktoren bedingt sein.

Begründung der Nomenklatur. Die Variation durch Valenzwechsel nannte ich früher Mutation, und zwar hauptsächlich unter dem Eindruck der Arbeit Beijerincks. Es mag an dieser Stelle gestattet sein, ganz kurz die Anwendung des Mutationsbegriffes in der Bakteriologie zu überblicken.

Eingeführt wurde der Mutationsbegriff in die Bakteriologie 1906 durch Neisser und Massini¹⁾. Diese Autoren bezeichneten, in Anknüpfung an de Vries, als Mutation eine sprunghaft einsetzende und erbliche (richtiger: bei kurzfristiger Uebertragung beständige) Variation des *Bact. coli* „mutabile“. In der Folgezeit wurden ähnliche Variabilitätserscheinungen vielfach bei Bakterien beobachtet und als Mutation „im Sinne von de Vries“ gedeutet (vgl. besonders die Arbeiten²⁾ und das Referat Eisenbergs³⁾ und die Arbeiten Baerthleins⁴⁾). Später wurde die Berechtigung dieser Bezeichnung mehrfach abgelehnt, so zunächst von Neisser selbst. Eisenberg glaubt zwar, man könne die sprunghaft und nur bei einem Teil der Individuen einsetzende, bei kurzfristiger Uebertragung erbliche, unter gewissen Bedingungen aber stets zu Rückschlägen in den Typus bereite Variation auch weiterhin Mutation nennen, obwohl auch Eisenberg die Ursache dieser Variation in einem Valenzwechsel von Erbfaktoren erblickt. Baerthlein dagegen wendet jetzt die Bezeichnung Mutation nicht mehr an und sagt „Variant“, was meines Erachtens aber zu allgemein ist. Jollos will, meines Erachtens mit vollem Recht, die Bezeichnung Mutation nur für absolut erbliche Variationen gelten lassen (wie auch Olssen), und schlägt für die sprunghaften, reversiblen Variationen den Namen „Dauermodifikation“ vor. Dies ist jedoch nicht zweckmäßig, denn die Variation durch Valenzwechsel (die bisherige „Mutation“) ist, wie aus der vorausgehenden Schilderung der Modifikation und Alternation ersichtlich, etwas ganz anderes als die Modifikation und darf deshalb nicht als Dauermodifikation, d. h. eine Art Modifikation, bezeichnet werden. Auf die Einwände Pringsheims und Lehmanns komme ich bei Schilderung der nächsten Variationsform (der echten Mutation) zu sprechen.

Nimmt man gegenüber den vielen widerstreitenden Ansichten Stellung, so ist zunächst zu betonen, daß es unrichtig ist, die auf Valenzwechsel beruhenden Variationen sowohl der Bakterien als auch der Metazoen mit dem Namen „Mutation im Sinne de Vries“ zu belegen. Denn einesteils ist der ursprüngliche theoretische Mutationsbegriff von de Vries, der eine sprunghafte, aus inneren Gründen erfolgende, richtungslose erbliche Variation bedeutet, allmählich zum großen Teil gegenstandslos geworden, andererseits ist die Variation der *Oenothera*, die de Vries tatsächlich beobachtet hat, größtenteils auf Spaltungen eines Bastards zurückzuführen. Demnach kommt weder der theoretische Mutationsbegriff, noch die experimentell von de Vries beobachtete Variationsform für die Bakteriologie in Betracht. Aber auch im jetzt gebräuchlichen Sinne kommt die Bezeichnung Mutation für die Variation durch Valenzwechsel nicht in Frage, denn die Vererbungsforschung ver-

1) Arch. f. Hyg. Bd. 61. 1907.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 63, 66, 73, 80, 81.

3) Ergebn. d. Bakt. Bd. 1. 1914.

4) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. 1912. — Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71, 81.

steht jetzt unter Mutation eine wirkliche Veränderung, aber nicht bloß einen Valenzwechsel von Erbfaktoren. Es muß demnach für die Variation durch Valenzwechsel ein neuer Name gefunden werden. Prell schlägt hierfür die Bezeichnung Pleomorphose vor; da für eine ganz andere Erscheinung bei Bakterien schon der Name Polymorphie existiert, ist die Bezeichnung Pleomorphose kaum zweckmäßig. Da der Valenzwechsel ein Variieren zwischen zwei Erscheinungsformen bedingt, die miteinander abwechseln, möchte ich den Namen „Alternation“ vorschlagen (alter — alter = der eine — der andere von zweien, alternare = abwechseln zwischen zwei Möglichkeiten bzw. Zuständen). Plate identifiziert „alternative“ und spaltende Vererbung, weil bei der Bastardierung die beiden Merkmale der Stammeltern in den Nachkommen häufig miteinander abwechseln; er gibt aber selbst zu, daß daneben sich noch Zwischenformen zeigen können. Deswegen ist meines Erachtens der Ausdruck alternierende Vererbung für die Variation durch Bastardierung ethymologisch, d. h. der Bedeutung des lateinischen Wortes alter entsprechend nicht völlig richtig. Dagegen schlägt Plate mit vollem Recht den Namen alternative Vererbung für „das Alternieren von Komplexen von Erbeinheiten (biologischen Radikalen) mit regelmäßigem Valenzwechsel“ vor, denn hier wechselt die Erscheinungsform eines Biotyps zwischen zwei Möglichkeiten. Man kann meines Erachtens diese Art von Vererbung auch als Variationsform betrachten und dann als „Alternation“ (entsprechend der ähnlichen Wortbildung bei der Modifikation und Mutation) bezeichnen. Ich möchte demnach sowohl die von anderen Autoren als auch von mir als Mutation beschriebene und auf einen Valenzwechsel von Erbfaktoren zurückgeführte Variation als Alternation bezeichnen. Sämtliche hierher gehörende Veränderungen haben das Charakteristische, daß sie meist aus alternden oder länger bebrüteten Kulturen gewonnen werden, sprunghaft eintreten, d. h. vom Typus starke Abweichung zeigen (wobei allerdings das Sprunghafte völlig einwandfrei nur beim Pneumoniebazillus zu beweisen war, während bei anderen Bakterien das Auftreten von Zwischenformen weder nachgewiesen, noch ausgeschlossen ist), daß sie nur einen Teil der Individuen der Massenkulturen ergreifen, bei kurzfristiger Uebertragung ohne Fortdauer des Variationsreizes beständig sind, unter gewissen Bedingungen aber sämtlich in den Originaltypus zurückschlagen (Beijerinck, Baerthlein, Eisenberg). Zu dieser Variationsform gehören, um nur die wesentlichsten Beispiele zu nennen, manche Veränderungen des *Bacillus prodigiosus* (Beijerinck), des *B. anthracis*, *B. prodigiosum*, *violaceum*, *fluorescens*, *pneumoniae*, *Sarc. tetragena*, *B. typhi*, *coli* (Eisenberg), verschiedene Kokkazeen, des *V. cholerae*, *B. typhi*, *paratyphi B* und *A*, *enteritidis*, *Coli mutabile*, *dysenteriae*, der Kapselbazillen (Baerthlein), des *Cholera*bazillus (Olssen)¹⁾, des *B. coli* (Prell)²⁾, ferner von Schmitz³⁾ am *Diphtherie*bazillus beschriebene Veränderungen, und einige besonders interessante Variationen des *Milzbrand*bazillus, die von Bail⁴⁾ beobachtet sind. Durch längere Fortzucht bei 42° konnte Bail eine Varietät gewinnen, bei der die Kapselbildung im Blutserum völlig verloren war, nur befanden sich inmitten der kapsellosen Ketten der Bazillen einzelne

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76.

2) Ebenda. Bd. 79.

3) Ebenda. Bd. 77.

4) Ebenda. Bd. 79.

Exemplare mit breiter Kapsel. Dies ist meines Erachtens nicht durch erbungleiche Teilung, wie Bail annimmt, zu erklären, sondern dadurch, daß das inaktivierte Zytoplasma der Kapselbildung bei vereinzelt Individuen in den aktiven Zustand zurückschlägt. Eine analoge Erscheinung sind die auf vegetativem Wege eintretenden „Knospenmutationen“ bei Pflanzen und die „Sektormutanten“ in Blüten.

Die bisher als „Mutation“ bezeichneten Bakterienvariationen haben nicht nur hohes biologisches, sondern auch praktisches Interesse. So wurde z. B. von Schmitz der Uebergang des *B. diphtheriae* in *B. pseudodiphtheriae*, von Reiner Müller¹⁾ und später Baerthlein der Uebergang von Typhusbazillen in Paratyphus B-Bazillen nachgewiesen. Meines Erachtens gehören auch einige, nicht reversible Variationen in die Gruppe der Alternation, da bei ihnen absolute Erblichkeit nicht genügend festgestellt ist. Die Veränderung muß nicht nur bei Fehlen des Variationsreizes, sondern auch bei Anwendung des konträren Reizes hochgradig beständig sein.

III. Variationsform. Die Mutation.

(Früher in Anknüpfung an Darwin als Fluktuation bezeichnet.)

Während die modifizierte und alternierte Form leicht zu gewinnen ist, da die Mehrzahl bzw. ein großer Teil der Individuen von diesen Variationen betroffen werden, ist die Gewinnung der Mutanten schwieriger, da die Mutation nur bei einem ganz geringen Bruchteil der Individuen entsteht. Von einer 20–30 Tage alten Schrägagarkultur des normalen Phänotypus werden Agarplatten gegossen, indem von allen Teilen des Bakterienrasens durch gründliches Verrühren mit der Platinöse Material entnommen, in ein Bouillonröhrchen übertragen und hier durch wiederholtes Hin- und Herneigen des Röhrchens gründlich gemischt wird. Von dieser Mischung werden verflüssigte Agarröhrchen nach dem bekannten Verdünnungsverfahren geimpft und dann zu Platten ausgegossen. Zum Auffinden der Mutanten sind nur diejenigen Platten geeignet, welche eine genügende Zahl von Kolonien enthalten, jedoch mindestens in Abständen von $\frac{1}{2}$ –1 cm. Ist die Aussaat dichter, so kommen die Kolonien nicht vollständig zur Entwicklung ihrer typischen Eigenschaften und können deshalb nicht beurteilt werden.

Man findet auf den geeigneten Platten die schon beschriebenen Kolonien des normalen Phänotypus, die radiär gestreiften der modifizierten und eventuell auch vereinzelt kleine Kolonien der alternierten Form. und ferner in sehr geringer Zahl die Kolonien der Mutanten.

Die Kolonien der Mutanten sind verschieden groß, aber durchweg kleiner als die des Typus, und größer, saftiger als die der alternierten Form. Sie sind, im Gegensatz zur modifizierten Form, homogen (makroskopisch und mikroskopisch). Nach der Größe der Kolonien (entsprechend der Kapselbildung der einzelnen Individuen) lassen sich 3 Mutanten isolieren, die hinsichtlich ihrer Abweichung vom Typus eine kontinuierliche Reihe bilden, für sich jedoch vollkommen konstant sind.

Die dem Typus am nächsten stehende Mutante I bildet nach 3–5 Tagen Kolonien, die ungefähr $\frac{2}{3}$ so groß sind wie die des Typus. Die einzelnen Individuen haben sämtlich eine etwas schmalere Kapsel als

1) München. med. Wochenschr. 1909 u. 5. Tagung d. freien Vereinig. f. Mikrobiol. in Dresden. 1911.

die des Typus, Endoplasma und Ektoplasma sind unverändert (im Gegensatz zur alternierten Form). Werden von einer solchen Kolonie Agarplatten angelegt, so erweisen sich die Tochterkolonien sämtlich der Elternkolonie gleich.

Die Kolonien der stärker abweichenden Mutante II sind noch etwas kleiner, die einzelnen Individuen besitzen eine noch schmalere Kapsel. Sowohl die ganzen Kolonien wie die einzelnen Individuen sind alle gleich. Bei Uebertragung durch Plattenguß erhält man wieder die gleichen Kolonien.

Die Mutante III bildet noch kleinere Kolonien, welche die erhabene, glasige Beschaffenheit der schleimigen Formen vollkommen verloren haben. Sie sind weißlich, völlig flach. Die einzelnen Individuen haben keine Kapsel mehr (besonders bei Hitzefixation und Methylenblaufärbung deutlich, vgl. Tafelfig. 12) das Ektoplasma und Endoplasma ist jedoch ebenso ausgeprägt wie beim Typus. Individuen und Kolonien sind alle gleich und geben bei Aussaat durch den Plattenguß wieder gleiche Nachkommen.

Die einzelnen Individuen der verschiedenen Mutanten unterscheiden sich morphologisch in keiner Weise von den verschiedenen Graden der modifizierten Keime. Erst durch Untersuchung der Nachkommenschaft ergibt sich der Variationscharakter. Dies ist eine bei den Varianten der höheren Organismen längst bekannte Erscheinung. Hinsichtlich der Bakterien hat Barber bereits auf sie hingewiesen. Die alternierte Variante des Friedländer-Bazillus ist jedoch auch morphologisch leicht von den anderen Varianten zu unterscheiden. Das ist aber eine zufällige Ausnahme. Werden die Mutanten in ihre alternierte Form übergeführt, was durch die gleiche Methode wie beim Typus möglich ist, so lassen sie sich morphologisch nicht von der alternierten Form des Typus unterscheiden. Sie sind aber wesensverschieden; denn beim Rückschlag liefern sie wieder die gleiche Mutante, aus der sie gewonnen waren.

Erblichkeit der Mutanten. Bei der Kultivierung auf künstlichem Nährboden sind die Mutanten in ihren Eigenschaften jede für sich absolut beständig (innerhalb einer bestimmten, für jede Mutante charakteristischen Variationsbreite). Die Beobachtungen erstreckten sich über 2 Jahre. Die Fortzüchtung durch das Plattengußverfahren ergibt, daß bei jeder Mutante die Nachkommen vollkommen der Elternkolonie gleichen. Hierin besteht Uebereinstimmung mit der alternierten Form, die ebenfalls ohne Fortdauer des Variationsreizes erblich konstant ist.

Von Interesse ist auch die Erblichkeit der einzelnen Mutanten hinsichtlich ihrer Virulenz. Diese nimmt parallel mit der Kapselbildung nach dem Grade der Mutation ab. Die Virulenz der frisch aus einer 4 Wochen alten Kultur isolierten Mutanten war folgende:

Mutante I	0,01	Bouillonkultur tötet die Maus in	36	Std.
	0,001	"	"	" " " " 52 "
Mutante II	0,1	"	"	" " " " 36 "
	0,01	"	"	" " " " 50 "
Mutante III	0,5	"	"	" " " " 7 Tagen, Blut steril.
	0,1	"	"	Maus bleibt am Leben.

Nachdem die Mutanten $\frac{3}{4}$ Jahr durch Plattengußverfahren fortgezüchtet waren, ergab sich folgende Virulenz:

Mutante I	0,01	tötet die Maus in 48 Std.
	0,001	" " " " 60 "
Mutante II	0,1	" " " " 60 "
	0,01	" " " " 62 "
Mutante III	1,0	" " " " 60 "
	0,1	Maus bleibt am Leben.

Aus diesem Versuch folgt, daß die Virulenz der einzelnen Mutanten von erblicher Konstanz ist. Ueber die Steigerung der Virulenz durch Tierpassagen soll unten berichtet werden.

Die Mutanten erweisen sich jedoch durch folgendes Verhalten von wesentlich stärkerer Erbllichkeit als die alternierte Form.

1) Es findet bei künstlicher Kultivierung nie ein Rückschlag in den Typus statt (was bei der alternierten Form durch langes Stehenlassen der Kulturen bei einzelnen Individuen zu beobachten ist).

2) Es findet selbst bei Anwendung von dem Variationsreiz konträr wirkenden Bedingungen, nämlich durch Tierpassagen, nur eine äußerst langsame und geringgradige Annäherung nach dem Typus hin statt (aber kein vollständiger und sprunghafter Rückschlag schon nach kurzer Einwirkung des konträren Reizes wie bei der alternierten Form). So wurde die Mutante I 10 Mauspassagen unterworfen, ohne daß sie merklich verändert wurde; die Mutante II 20 Mauspassagen mit dem gleichen negativen Erfolg. Bei Mutante III wurden 100 Mauspassagen angewendet, dadurch wurde eine Annäherung an die Mutante II hinsichtlich Kapselbildung und Virulenz erreicht. Die Erbllichkeit dieser Annäherung wurde in folgenden Versuchen über die Virulenz der Mutante III festgestellt:

Vor der Mauspassage:	0,1 ccm	Bouillonkultur.	Maus bleibt am Leben.
Nach 20 Mauspassagen:	0,01	" "	" " " " 48 " Std.
" 40	" 0,01	" "	" " " " 30 "
" 60	" 0,01	" "	" " " " 30 "
" 80	" 0,01	" "	" " " " 30 "
	0,000001 ccm	" "	Maus stirbt in 4 Tagen.

Es war also eine erhebliche Virulenzsteigerung erreicht. Gleichzeitig hatte auch die Kapselbildung (Tierkörper) und die Galaktanbildung (Kultur) wieder zugenommen, jedoch nicht in gleichem Grade wie die Virulenz. Kapselbildung und Virulenz gehen also nicht völlig parallel. Jetzt wurde geprüft, ob die Zunahme der Virulenz eine erbliche war oder durch Züchtung außerhalb des Tierkörpers wieder zurückging. Die Mutante III wurde zu diesem Zweck alle 7 Tage neu auf Agar übertragen und die Virulenz im Laufe der Agarpassagen geprüft, indem von den betreffenden Agarkulturen Bouillonkulturen angelegt und diese nach 24-stündigem Wachstum in die Maus verimpft wurden. Die Virulenz zeigte dann folgendes Verhalten:

Nach 80. Mauspassage	unmittelbar	0,000001 ccm.	Maus stirbt in 4 Tagen.
" 2. Agarpassage		0,001	" " " " 44 Std.
		0,00001	" " bleibt am Leben.
" 5. "		0,001	" " stirbt in 52 Std.
		0,0001	" " " " 72 "
" 10. "		0,001	" " " " 72 "
		0,0001	" " bleibt am Leben.
" 15. "		0,01	" " stirbt in 72 Std.
		0,001	" " " " 11 Tagen.
" 20. "		0,01	" " " " 24 Std.
		0,001	" " bleibt am Leben.
" 25. "		0,01	" " stirbt in 50 Std.
		0,001	" " " " 4 Tagen.

Es geht also die durch 80 Tierpassagen erreichte Virulenzsteigerung der Mutante III durch künstliche Kultivierung zunächst zurück, bleibt aber von der 15. Agarpassage ab mit geringen Schwankungen auf gleicher Höhe. Die kleinste, noch tödliche Dosis ist 0,001 geworden, also ungefähr 1000mal höher als vor den Tierpassagen, jedoch nicht so hoch wie die Virulenz der Mutante II, bei der 0,000001 auch nach beliebig langer künstlicher Kultivierung meist in 48 Stunden tödlich war. Auch die durch Tierpassagen erzielte Zunahme der Galaktanbildung bei der Mutante III bleibt bei der folgenden künstlichen Kultivierung auf einem höheren Wert als vor den Tierpassagen.

Es ließ sich also durch Tierpassagen eine deutliche allmähliche Annäherung der Mutante III an die Mutante II erzielen. Diese Annäherung ging durch künstliche Kultivierung (die gleichen Bedingungen, welche aus dem Typus die modifizierte Form entstehen lassen) zum Teil wieder zurück, beruhte also auf Modifikation, zum Teil blieb sie jedoch erhalten und erwies sich so als progressive Mutation.

Entstehungsweise der Mutanten.

Die Mutanten entstehen durch stärkste Einwirkung des Variationsreizes. Da sie hinsichtlich ihrer Abweichung vom Typus eine kontinuierliche Reihe bilden, war es von Interesse, ob die extreme Mutante unmittelbar aus dem Typus „sprunghaft“ wie die alternierte Form entsteht oder zuerst das Stadium der Mutante I und II durchläuft. Es ließ sich experimentell beweisen, daß durch die größtmögliche Steigerung des Variationsreizes (Anhäufung der Stoffwechselprodukte durch Uebertragung des gesamten Bakterienrasens der gealterten Kultur auf den neuen Schrägagar und erneutes Wachstum unter diesem Variationsreiz, wobei also die neu gebildeten Stoffwechselprodukte zu denen der gealterten Kultur hinzukommen) sowohl aus Mutante I als auch aus Mutante II die extreme Mutante gewonnen werden kann. Daß dies nicht nur eine unter vielen Möglichkeiten für die Entstehung der extremen Mutante ist, sondern die einzige Entstehungsweise, läßt sich aus folgendem entscheiden. Die Mutanten entstehen durch den stärksten Einfluß der Stoffwechselprodukte; denn sie werden in den einzelnen Kulturen später als die anderen Varianten, nämlich zuletzt erhalten. Sie entstehen demnach durch Proliferation der letzten, trotz Anhäufung der Stoffwechselprodukte noch wachsenden Individuen. Dabei kommt zunächst die am wenigsten abweichende Mutante I zur Beobachtung. Etwas später, also bei noch stärkerer Variationsursache, entsteht Mutante II. Dadurch läßt sich mit größter Wahrscheinlichkeit entscheiden, ob die Mutante II unmittelbar aus dem Typus oder aus der Mutante I hervorgeht. Entstände sie unmittelbar aus Individuen des Typus, so müßten diese während einer gewissen Zeit, nämlich solange als die Bedingungen für die Bildung der Mutante I gegeben waren, ihr Wachstum eingestellt haben; denn sonst müßten sie in die Mutante I oder zum mindesten in die modifizierte oder alternierte Form übergegangen sein. Letztere beiden kommen aber als Vorstufen der Mutante II nicht in Betracht, da sie, wie ausführlich untersucht, nicht zur Bildung der Mutante II befähigt sind. Etwas später aber, also unter den Bedingungen des stärkeren Variationsreizes, müßten diese Individuen des normalen Typus ihr Wachstum wieder aufgenommen haben und dadurch sprunghaft in Mutante II übergegangen sein. Das ist aber nicht wahrschein-

lich, denn mit dem stärkeren Variationsreiz hat auch die wachstumshemmende Wirkung der Stoffwechselprodukte zugenommen und es ist nicht einzusehen, daß Zellen, die aus irgendeiner Ursache ihr Wachstum schon einmal eingestellt haben, bei Verstärkung dieser gleichen Ursache ihr Wachstum wieder aufnehmen. Aus diesem Grunde wird eine unmittelbare Entstehung der Mutante II und noch mehr der Mutante III aus dem Typus unwahrscheinlich. Es bleibt also nur die Möglichkeit übrig, daß die Mutante III aus der Mutante II und diese aus der Mutante I entstanden ist. So entsteht eine von Generation zu Generation fortschreitende, quantitativ zunehmende Abänderung. Die Mutation unterscheidet sich also von der Alternation durch ihre bedeutend stärker ausgeprägte Erbllichkeit und besonders dadurch, daß sie durch mehrere, für sich konstante Zwischenstadien, d. h. im Laufe mehrerer Generationen, zu ihrer Terminalform führt. Dabei weicht aber die extreme Mutante nicht soweit vom Typus ab wie die alternierte Form: denn sie besitzt zwar ebenso wie diese keine Kapsel (auf Kulturen also kein Galaktanbildungsvermögen mehr), hat aber noch das gleiche Ekto- und Endoplasma wie der Typus, während die alternierte Form zu einem viel schmälern Stäbchen reduziert ist.

Mit der modifizierten Form haben die Mutanten gemeinsam, daß sie eine kontinuierliche Reihe hinsichtlich der phänotypischen Abweichung bilden. Sie sind jedoch in bezug auf die Erbllichkeit der Abweichung der absolute Gegensatz zur Modifikation.

Die Erscheinungen der Mutation sind hinsichtlich des Keimplasmas folgendermaßen zu erklären, wobei ich zunächst die retrogressive Mutation analysieren möchte. Werden von einer Kolonie einer Mutante Agarplatten gegossen, so zeigen die aufgehenden Tochterkolonien alle die gleiche Beschaffenheit wie die Elternkolonie. Der Mittelwert der Nachkommen verschiebt sich also trotz Wegfallens des Variationsreizes nicht. Dies beweist — ebenso wie bei der alternierten Form — daß nicht nur das Zytoplasma, sondern auch das Keimplasma von der Mutation verändert wurde. Während aber bei der alternierten Form schon auf künstlichen Nährböden (langes Stehenlassen der Kulturen) Rückschläge in den Typus eintreten und bei Einwirkung von Tierpassagen sehr rasch der vollständige Rückschlag eintritt, zeigen die Mutanten auf künstlichen Nährböden unter keinen Bedingungen eine Rückverwandlung in den Typus und selbst bei langdauernder Einwirkung des konträren Variationsreizes nur geringgradige, allmählich stattfindende Wiederannäherung nach dem Typus zu. Die Veränderung des Keimplasmas ist demnach schwererer Art als bei der Alternation und wir müssen deshalb annehmen, daß bei der retrogressiven Mutation die Erbfaktoren der Galaktanbildung nicht nur inaktiviert werden, sondern wirklich zu Verlust gehen, und zwar die galaktanbildenden Teile des Zytoplasmas und die entsprechenden Erbfaktoren gleichzeitig. Die Entstehungsweise der 3 graduell verschieden abweichenden Mutanten wäre dann folgendermaßen zu verstehen: wächst eine Generationsreihe des normalen Typus unter dem schon sehr gesteigerten Einfluß der Stoffwechselprodukte weiter, so geht zunächst ein Teil der Faktoren zu Verlust. Dadurch entsteht die Mutante I, welche für sich konstant bleibt, wenn sie in diesem Stadium durch Plattenguß isoliert und in Reinkultur, also nicht mehr unter dem Einfluß der Stoffwechselprodukte des Typus, fortgezüchtet wird. Geht aber ihr Wachstum in der alten, vom Typus angelegten Kultur noch weiter, so werden durch Verstärkung des Variationsreizes noch weitere

Erbeinheiten zu Verlust gebracht, wodurch die Mutante II entsteht. Diese ist, wenn sie jetzt durch Plattenguß isoliert wird, ebenfalls in dem erreichten Stadium der Variation konstant. Gelangt sie jedoch in der alten Kultur zur weiteren Proliferation, so entsteht durch einen weiteren Verlust von Erbeinheiten — der letzten, die für die Galaktanbildung noch vorhanden sind — die Mutante III. Diese ist die Terminalform der Mutation. Der gleiche fortschreitende Verlust von Erbeinheiten läßt sich erzielen, wenn alte Schrägagarkulturen der Mutante I und II vollständig, d. h. mit ihren Stoffwechselprodukten, auf einen neuen Schrägagar übertragen werden.

Progressive Mutation: Die Mutante III läßt sich durch viele Tierpassagen, welche konträr zum Variationsreiz wirken, der Mutante II allmählich wieder annähern. Diese Wiedergewinnung der Galaktanbildung und Virulenz ist nach 60 Tierpassagen nur zu einem Teil erblich und bleibt bei Wegfall des adäquaten Reizes bestehen. Es wird also ein Teil der durch den Variationsreiz verloren gegangenen Erbfaktoren durch den konträr wirkenden Reiz wiedergewonnen. Ueber diesen erblich fixierten Grad hinaus wird gleichzeitig noch eine weitere Steigerung der Galaktanbildung und Virulenz erreicht, welche nicht erblich ist, demnach nur eine Reaktion des Zytoplasmas auf den äußeren Reiz darstellt. Die Wiederannäherung des Zytoplasmas der Mutante III in der Richtung nach dem Typus geht also der gleichsinnigen Beeinflussung des Keimplasmas voraus.

Nimmt man an, daß eine weitere Fortsetzung der Tierpassagen gleich stark auf die Mutante einwirken würde, so müßte die Mutante III nach $80 \times 6 = 480$ Mauspassagen völlig in den Typus zurückverwandelt sein.

Aus den Erscheinungen der progressiven Mutation läßt sich folgern, daß das Keimplasma nach dem Verlust bestimmter Erbfaktoren die Fähigkeit behält, diese Faktoren durch den adäquaten Reiz wiederzugewinnen. Dabei wird die neue Eigenschaft zuerst nur vom Zytoplasma als Folge seiner Reaktionsfähigkeit auf den äußeren Reiz gebildet und erst später entsteht der gleichsinnige Erbfaktor, und zwar vermutlich unter dem Einfluß des veränderten Zytoplasmas. Ich möchte diesen Vorgang als Grundbedingung für die Erwerbung einer neuen, vererbaren Eigenschaft ansehen und als zytoplasmatische Induktion bezeichnen. Die Regeneration der zu Verlust gegangenen Erbfaktoren findet aber nur durch sehr lange Reizeinwirkung, im Laufe äußerst zahlreicher Generationen und so allmählich statt, daß zwischen den einzelnen Generationen kein Unterschied zu bemerken ist. Diese Tatsache ist wichtig für die Frage der Vererbung erworbener Eigenschaften und macht es verständlich, weshalb progressive Mutationen experimentell so äußerst schwierig zu erzielen sind; es muß ein Reiz zur Anwendung kommen, der eine noch unentwickelte, aber doch in der bisherigen Konstitution des Keimplasmas schon vorhandene Fähigkeit zur Bildung eines neuen Erbfaktors trifft, und wenn es auch gelingt, diese Bedingung zu erfüllen, dürfte es bei den Metazoen kaum möglich sein, die Bildung des neuen Faktors und des sichtbaren Artmerkmals experimentell zu bewirken, da schon bei den relativ einfach gebauten Bakterien eine unzählige Reihe von Generationen hierzu nötig ist. Dagegen können spontan, d. h. aus inneren Gründen einsetzende Mutationen zu plötzlichen, auffallenden Veränderungen führen (z. B. die Entstehung von Zobelmäusen aus orangefarbigem, die Plate jüngst beschrieb (Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 44).

Die verschiedenen Grade der Mutation beweisen ferner, daß die Bildung des Galaktans ein polygenes Merkmal ist, und zwar auf einem Komplex gleichsinniger (Nilsson-Ehle) Erbfaktoren beruht. Nach Plate nennt man dies Homomerie. Hierdurch wird der Unterschied zwischen Mutation und Alternation verständlich. Bei der Alternation besteht die Veränderung des Keimplasmas nur in einem Valenzwechsel, betrifft dagegen gleichzeitig einen großen Komplex biologisch zusammengehöriger Faktoren, und so erklärt sich der große Unterschied zwischen Typus und alternierter Form. Da sich der Valenzwechsel im Laufe einer Generation vollzieht, erklärt sich das Sprunghafte der Alternation. Dieser Gegensatz zwischen Alternation und Mutation legt die Vermutung nahe, daß alle experimentell bewirkten, sprunghaften Variationen keine echten Mutationen sind, sondern nur auf Valenzwechsel beruhen. So nimmt auch Plate an, daß die bisher experimentell erzielten „Mutationen“ (Temperaturexperimente von Standfuß, E. Fischer an Schmetterlingen, von Tower am Koloradokäfer) auf Inaktivierung von Erbfaktoren beruhen oder, wie die von Kammerer experimentell bewirkten Aenderungen des Instinktes sowie der Farbe (Versuche an Alytes und Salamandra) hinsichtlich der Vererbung einer erworbenen Eigenschaft nicht beweisend sind, da das Ausgangsmaterial an sich schon sehr variabel war, „so daß man nicht weiß, ob latente Anlagen geweckt oder neue Variationen erzeugt sind“. Dann dürften diese Veränderungen aber nicht mehr als Mutationen (auch nicht als Verlustmutationen) bezeichnet werden.

Nomenklatur. Die Beobachtung, daß die wirklich erbliche Variation allmählich (richtiger; in unmerklichen, kleinen Sprüngen) stattfindet, gibt der Anschauung Darwins recht, der eine allmähliche Entwicklung neuer Eigenschaften annahm und als Quelle der Artbildung die unbedeutenden Abweichungen ansah, welche die Individuen einer Art gegeneinander aufweisen; er nannte diese Erscheinung fluktuierende, individuelle Variabilität und maß den Sprungvariationen nur geringe Bedeutung für die Artbildung zu. Aus diesem Grunde habe ich früher die erbliche Variation als „Fluktuation“ bezeichnet, halte es aber jetzt im Interesse der Uebereinstimmung mit der Vererbungslehre für zweckmäßiger, den Begriff der fluktuierenden Variabilität nur für die nicht-erbliche, individuelle Variabilität anzuwenden und morphologisch zu fassen, dagegen die wirkliche Veränderung des Keimplasmas als Mutation zu bezeichnen. Dieser Begriff der Mutation wird jetzt allgemein von den Vererbungsforschern vertreten (Bateson, Bauer, Castle, Correns, Johannsen, Plate, Shull), nachdem er 1902 von de Vries zur Bezeichnung der erblichen Variation eingeführt worden ist.

An dieser Stelle möchte ich die Einwände berücksichtigen, welche Pringsheim¹⁾ und Lehmann²⁾ gegen die Anwendung des Mutationsbegriffes in der Bakteriologie erhoben haben.

Pringsheim führt an, daß von de Vries die Bezeichnung Mutation für die erblichen Variationen bei sexueller Fortpflanzung gewählt worden ist. Nun ist aber meines Erachtens der Kernpunkt des de Vriesschen Mutationsbegriffes die mehr oder weniger sprunghafte Entstehung einer neuen erblichen Eigenschaft. Soviel ich finde, legt de Vries nie Nachdruck darauf, daß die Mutation ein von der sexuellen Fortpflanzung abhängiger Vorgang sei, im Gegenteil sagt er (Mutationstheorie Bd. 2 S. 672): „Wann das Mutieren stattfindet, ist die Frage, aber alles spricht dafür, daß die Ei-

1) Variabilität niederer Organismen. Berlin (Springer) 1910.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 77.

oder Pollenzellen bereits mutiert sind, bevor sie sich bei der Befruchtung verbinden“. Also setzt auch nach de Vries der Mutationsvorgang im Keimplasma ein, bevor die Vereinigung der Keimzellen, d. i. die sexuelle Fortpflanzung, stattfindet. Deshalb ist der Einwand Pringsheims nicht stichhaltig.

Lehmann macht folgende Einwände:

1) Von Mutationen dürfte nur innerhalb reiner Linien gesprochen werden. Er zitiert die Definition Johannsens: eine reine Linie ist der Inbegriff aller Individuen, welche von einem absolut selbstbefruchtenden, homozygotischen Individuum abstammen, und schließt: „reine Linien kann es also nur dort geben, wo es Gameten gibt“. Soweit stimme ich mit Lehmann vollkommen überein. Lehmann folgert jedoch weiter: „bei Bakterien können wir zurzeit überhaupt nicht von reinen Linien sprechen. „Denn vegetative Abkommen eines Individuums bieten durchaus keine Garantie einer homozygotischen Natur für die betreffenden Individuen.“ Lehmann vergleicht also die Fortpflanzung der Bakterien mit der vegetativen Vermehrung der Metazoen. Dieser Vergleich trifft jedoch nicht zu. Die Bakterien sind (wie schon einleitend ausgeführt) in Hinsicht der Fortpflanzung mit den Keimzellen der Metazoen zu vergleichen, sind also selber Gameten, ihre Fortpflanzung ist prinzipiell von der vegetativen Vermehrung der Metazoen verschieden, denn die vegetative Vermehrung beruht auf der Teilung von Zellen, welche bereits zu Organen und Geweben differenziert sind. Die Fortpflanzung der Bakterien ist dagegen mit der Fortpflanzung der Keimzellen der Metazoen innerhalb der Keimbahn zu vergleichen: Die Vermehrung außerhalb der Keimbahn, welche bei den Metazoen zur Differenzierung der Organe oder Gewebe führt, fällt bei den Bakterien weg, und deshalb kann bei ihnen von vegetativer Vermehrung nicht die Rede sein. Wären die Individuen der Bakterien nicht homozygotisch, dann müßten unter den Nachkommen auch ohne Variationsreize Spaltungen auftreten, was aber noch nie beobachtet worden ist. Infolgedessen ist der Einwand Lehmanns, daß bei Bakterien nicht die Rede von reinen Linien sein dürfe, nicht anzuerkennen.

2) Lehmann definiert den Mutationsbegriff folgendermaßen: „Eine Mutation ist die Aenderung eines Gens, wobei die Veränderung nicht durch Kombination, d. h. also durch Umgruppierung oder Aufeinanderwirkung von verschiedenen Genen zustande kommt.“ Dem schließe ich mich voll an. Nun geht Lehmann aber weiter: Die Gene sind experimentell durch die Mendelschen Bastardierungsuntersuchungen erschlossen, ohne Bastardierung gibt es keine Genenanalyse, also auch nicht bei Bakterien, und demgemäß darf der Mutationsbegriff, da er auf Genenanalyse hinausläuft, in der Bakteriologie nicht verwendet werden „bis wir Gene auf andere Weise als durch Bastardierung nachweisen können“.

Dazu bemerke ich, daß die Existenz von Erbfaktoren als Grundlage der Artmerkmale allerdings absolut erst durch die Mendelsche Bastardierungsmethode nachgewiesen worden ist. „Die Mendelschen Faktoren sind aber nur ein geringer Bruchteil des Keimplasmas, bei Menschen z. B. nur diejenigen Faktoren, welche das einzelne Individuum gegenüber den Artgenossen unterscheiden, also die individualspezifischen, während die unzähligen Faktoren, welche das Artspezifische ausmachen, nicht mendeln. Trotzdem dürfen wir auf Grund der Mendelschen Forschung annehmen, daß auch die artspezifischen Merkmale auf Erbfaktoren beruhen. Wir können sie nur nicht, wie die „mendelnden“ Eigenschaften abspalten, weil sie bloß homozygotisch vorkommen. Was die Bakterien betrifft, so glaube ich, durch die vorausgegangene Schilderung der Variationsformen bewiesen zu haben, daß auch ohne die Möglichkeit einer Bastardierung eine Genenanalyse bei Bakterien möglich ist, und daß auch bei Bakterien als Grundlage eines Artmerkmals ein Erbfaktor als Reizquelle und das Zytoplasma als ausführendes Organ existiert.

Aus diesen Gründen kann ich die Einwände Lehmanns gegen die Einführung des Mutationsbegriffes in die Vererbungsforschung bei den einzelligen Lebewesen nicht anerkennen. Dagegen bin ich mit ihm vollkommen einer Ansicht über den Mutationsbegriff selbst. „Alle bisherigen Mutationsbegriffe müssen fallen gelassen werden, mit Ausnahme der Mutation im Sinne Waagens zur Bezeichnung der kleinsten, noch

wahrnehmbaren Aenderungen, gewissermaßen für das Differential der organischen Umbildung im Laufe der Zeit“. Denn gerade die Mutanten des Pneumoniebazillus sprechen dafür, daß die Mutation, d. h. die Entwicklung eines neuen, erblichen Artmerkmals als Reaktion auf einen äußeren Reiz sehr langsam verläuft, während die sprunghaften Veränderungen lediglich auf Valenzwechsel von Faktoren beruhen und bedeutend weniger erbliche Festigkeit besitzen. —

Bisher beobachtete, echte Mutationen bei Bakterien.

In der Literatur finden sich nur äußerst wenig Variationen bei Bakterien, denen der Charakter einer Mutation zugesprochen werden kann. Besonders die in den letzten Jahren vielfach als Mutationen beschriebenen Veränderungen, die bei kurzfristiger Uebertragung und bei Wegfall des Variationsreizes konstant bleiben, bei gewissen Bedingungen aber in den Ausgangstypus zurückschlagen, beruhen auf Valenzwechsel (Alternation). Es genügt eben zum Nachweis des höchsten Grades der Erbllichkeit einer Variation nicht, wenn die Variation bei Wegfall des Variationsreizes konstant bleibt, sie muß auch bei Anwendung eines konträr wirkenden Reizes, der die Modifikation sofort und die Alternation ziemlich rasch in den Typus zurückführt, erblich bleiben. So möchte ich als echte Mutationen nur einen Teil der von Preisz¹⁾ und in Anknüpfung an ihn von Bail²⁾ beim Milzbrandbazillus erzielten retrogressiven Variationen (Verlust der Kapselbildung) gelten lassen, welche auch nach vielen Tierpassagen (80 Mäuse) nicht in den Typus zurückschlagen, sowie die von mir erzielten Mutanten beim Friedländer-Bazillus. Außer der Erbllichkeit ist bei letzteren die Bildung kontinuierlicher Reihen durch die Mutation nachgewiesen.

Als experimentell erzielte, erbliche Variationen gelten vielfach noch der von Hansen³⁾ beobachtete Verlust der Sporenbildung bei einer Heferasse, einige Variationen bei *Aspergillus niger* (E. Schiemann)⁴⁾ und bei *Bacillus prodigiosus* (Wolf)⁵⁾. Ich halte es für fraglich, ob wirklich Mutationen vorliegen. Denn ein Teil der Varianten zeigte spontane Rückschläge, der andere Teil blieb zwar bei der üblichen Fortzucht konstant, doch wurde die Erbllichkeit gegenüber einem dem Variationsreiz konträren Reiz nicht festgestellt. Vielleicht sind unter den von Barber durch eine besondere Methode der Selektion gefundenen Varianten einige als Mutanten anzusprechen.

Häufigkeit der verschiedenen Variationsformen.

Bei der Einwirkung des Variationsreizes auf die Massenkulturen werden die meisten Individuen von der Modifikation ergriffen, so daß es ohne Selektion (mittels des Plattengußverfahren) gelingt, Kulturen der modifizierten Form zu gewinnen. Ebenso wird die alternierte Variante bei Verstärkung des Variationsreizes in den weißlichen Sektoren des Bakterierasens so zahlreich gebildet, daß man durch Abimpfung von diesen Partien leicht schon auf dem Schrägagar, also ohne Selektion

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15 und 18.

4) Zeitschr. f. inekt. Abstammungs- und Vererbungslehre. Bd 8.

5) Ebenda Bd 2.

durch den Plattenguß reine Kulturen der alternierten Form gewinnen kann. Im Gegensatz hierzu werden die Mutanten nur in so geringer Zahl gebildet, daß sie nur aus einer großen Zahl durch das Plattengußverfahren isolierter Kolonien herausgefunden werden können. Sie würden also bei der üblichen Form der Uebertragung in Massenkulturen nicht zur Beobachtung kommen, da sie von der enormen Mehrzahl der normalen bzw. modifizierten Keime überwuchert werden. Auch durch die Selektionswirkung von Tierpassagen können sie nicht gewonnen werden, da sie schwächer virulent sind als der Typus.

Diese Beobachtungen stimmen überein mit den Befunden Barbers¹⁾. Barber konnte mit einer besonderen Methode morphologisch abweichende Individuen unter dem Mikroskop isolieren und weiterzüchten. Die meisten der Varianten schlugen in ihren Nachkommen mehr oder weniger rasch in den Typus zurück (Modifikation), einige vollzogen erst nach längerer erblicher Konstanz plötzlich den Rückschlag in den Typus (Alternation), ganz vereinzelt blieben aber dauernd variiert, können also Mutanten gewesen sein.

Beziehungen der einzelnen Variationsformen zueinander.

Wie scharf die einzelnen Formen der Variabilität sich gegeneinander unterscheiden, ergibt sich aus ihren gegenseitigen Beziehungen. Zugleich tritt dabei die Bedeutung der Stoffwechselprodukte als Variationsreiz besonders klar zutage. Der Variationsreiz ist am stärksten in Kulturen des normalen Phänotypus, da bei diesen die üppigste Galaktanbildung und die stärkste Anhäufung der Stoffwechselprodukte sich findet. Zugleich hat hier der Variationsreiz die größte Wirkungsmöglichkeit, da das variiierende Merkmal, d. i. die Galaktanbildung am stärksten beim Typus ausgeprägt ist. So kommt es, daß aus Kulturen des Typus alle Varianten (auch diejenigen, die den stärksten Variationszweig erfordern) gewonnen werden können. Die Mutanten II und III durchlaufen dabei erst das Stadium der Mutante I bzw. II.

Die modifizierte Form wächst hinsichtlich der Galaktanbildung viel weniger üppig als der Typus. Weitaus die Mehrzahl der Individuen bildet keine Kapsel mehr. Deshalb lassen sich aus einer modifizierten Agarkultur keine alternierten Formen oder Mutanten gewinnen, auch bei langem Stehenlassen der Kulturen werden immer nur wieder modifizierte Kolonien erhalten. Die Gewinnung der alternierten und mutierten Form ist erst wieder möglich, wenn durch Selektion (Plattenguß) oder Tierpassagen der normale Typus in Reinkultur wieder gewonnen ist.

Die Mutanten sind leicht zu einer weiteren Reduktion der Kapselbildung durch Modifikation zu bringen, denn durch fortgesetzte Kultivierung auf dem Schrägagar bilden die Mutanten allmählich schmalere Kapseln, bei Mutante III ist dann keine Spur von Kapsel vorhanden, sondern nur noch Ektoplasma. Die ursprüngliche Mutante läßt sich aber ebenso rasch aus der modifizierten Mutante und auf dieselbe Methode wiedergewinnen wie der Typus aus seiner modifizierten Form.

Die Mutanten I, II und III zeigen in gleicher Reihenfolge eine zunehmende Reduktion der Galaktanbildung und damit eine Abnahme des Variationsreizes. Zur Bildung einer alternierten Variante (auf die gleiche Weise wie der normale Typus) sind nur die Mutanten I und II befähigt,

1) Zitiert nach Jollos, Zeitschr. f. ind. Abstam. u. Vererb. Bd. 9. 1914.

die Mutante III erst nachdem sie durch 80 Mauspassagen der Mutante II wieder genähert war. Die alternierten Formen der einzelnen Mutanten (morphologisch völlig der alternierten Form des normalen Typus gleich) zeigen dasselbe Verhalten hinsichtlich des Rückschlags wie die alternierte Form des normalen Typus, sie schlagen aber nicht in den Typus zurück, sondern in die gleiche Mutante, aus der sie sprunghaft entstanden waren.

Die alternierte Form zeigt die stärkste Reduktion der Galaktanbildung und damit unterliegt sie dem geringsten Variationsreiz. So wird es verständlich, daß sie keine weiteren Varianten abspaltet, ja daß sie in alten Kulturen spontan in den Typus zurückschlägt. Nur zu einer geringfügigen Modifikation ist die alternierte Form befähigt. Das Ektoplasma nimmt bei sehr langer Kultivierung auf dem Schrägagar bis zum fast völligen Verschwinden ab, und umgekehrt durch Tierpassagen zum ursprünglichen Wert (d. i. zur Größe kurz nach der Gewinnung aus dem Typus) wieder zu, bevor der Rückschlag in den Typus eintritt.

Zusammenfassung.

Die Bakterien besitzen die gleichen Formen der Variabilität wie die Metazoen. Nur die Variation durch Bastardierung fehlt ihnen selbstverständlich; diese hat aber mit der Variabilität im strengen Sinne, d. i. mit der Reaktionsfähigkeit des Zytoplasmas und des Keimplasmas auf äußere Reize unmittelbar nichts zu tun. Die Formen der Variabilität sind die Modifikation, die Alternation und die Mutation. Diese Formen sind bei Bakterien im einzelnen ebenso scharf ausgeprägt und gegeneinander scharf unterschieden wie bei den Metazoen. Zur Erklärung der Variationsformen muß man bei Bakterien ebenso wie bei den Metazoen das gleiche Grundprinzip in der Vererbung annehmen, nämlich eine Uebertragung der Artmerkmale durch das Keimplasma mit stärkster Vererbungsfähigkeit und eine Uebertragung durch das Zytoplasma mit geringerer Vererbungsfähigkeit.

Die Bakterien sind hinsichtlich ihrer Vererbungsfunktion den Keimzellen und nicht den differenzierten Somazellen der Metazoen gleichzustellen. Sie unterscheiden sich aber von den Keimzellen der Metazoen durch hochgradige, experimentell zu erzielende Variabilität und durch die Unfähigkeit, bei ihrer Vermehrung Zellkomplexe abzuspalten, welche sich zu Organen und Geweben differenzieren. Bei der Einwirkung eines Variationsreizes wird zunächst das Zytoplasma verändert, bei stärkerem Variationsreiz gleichzeitig das Keimplasma, und zwar sowohl bei den Verlust- wie den Gewinnvariationen. Das Problem der somatischen Induktion existiert bei Bakterien nicht, da sie kein somatisches, sondern nur generatives Keimplasma (= Vollkeimplasma) besitzen. Dagegen ist eine zytoplasmatische Induktion auf Grund der beobachteten progressiven Mutation des Pneumoniebazillus als wahrscheinlich anzunehmen. Ein äußerer Reiz wird dabei durch Vermittlung des Zytoplasmas zu einem inneren Reiz (= Erbfaktor) umgewandelt.

Will man die verschiedenen Formen der Variation an einem Bakterium nachweisen, so müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1) Die variable Eigenschaft muß deutlich ausgeprägt und auch dem jeweiligen Variationsgrade nach quantitativ sicher zu beurteilen sein.

2) Es muß feststehen, unter welchen Bedingungen der normale Phänotypus konstant ist.

3) Es muß bekannt sein, welcher Reiz die Variation des betreffenden

Artmerkmale auslöst. Dieser Variationsreiz muß in seiner Intensität abstufbar sein.

4) Zur Feststellung des Erblichkeitsgrades der Varianten muß auch der dem Variationsreiz konträr wirkende Außenfaktor bekannt und experimentell in verschiedener Intensität anwendbar sein.

Diese Bedingungen sind nur selten erfüllt, und so erklärt es sich, warum trotz der zahlreichen Beobachtungen über Bakterienvariabilität stets nur bald die eine, bald die andere Variationsform oder bald das eine, bald ein anderes Artmerkmal verändert gefunden wurde, nie aber systematisch die verschiedenen Variationsformen an einer bestimmten Eigenschaft nachgewiesen wurden. Nur so aber ist die Erforschung der verschiedenen Formen der Variabilität und ihre Bedeutung für die Artbildung möglich.

Beim Pneumoniebazillus sind die Bedingungen für die Variationsstudien in besonders günstiger Weise erfüllt. Die variable Eigenschaft ist hier eine Stoffwechselfunktion, nämlich die Galaktanbildung. Sie ist makroskopisch als Schleimbildung, mikroskopisch als mehr oder weniger breite Kapsel leicht festzustellen. Der Variationsreiz besteht in der Anhäufung der bei der Galaktanbildung entstehenden Stoffwechselprodukte (vermutlich beim Abbau des Galaktans). Dieser Variationsreiz entsteht durch Wachstum im zusammenhängenden Bakterienrasen (Schrägagar) und kann durch mehr oder weniger langes Stehenlassen der Kulturen beliebig gesteigert werden. Er wirkt retrogressiv auf die Galaktanbildung ein. Als neutrales Milieu erweist sich das Wachstum aus isolierten Keimen heraus (Bouillon, Agarplattenguß) wobei konstante Vererbung des normalen Phänotypus stattfand. Dem Variationsreiz konträr wirken Tierpassagen (Maus).

Die einzelnen Variationsformen sind folgende:

1) Die Modifikation. Durch gelinde Einwirkung des Variationsreizes geht die Galaktanbildung im Laufe mehrerer Kulturgenerationen immer mehr zurück bis zum völligen Verschwinden bei den extrem modifizierten Individuen, die übrigen Individuen der Massenkulturen zeigen alle Uebergänge zwischen normalem Phänotypus und extremer Modifikation. Durch Tierpassagen stellt sich die Galaktanbildung sofort, beim Wachstum in isolierten Kolonien bei einzelnen Individuen sofort, bei anderen langsamer wieder in normalem Umfange ein. Die Modifikation beruht in einer Hemmung der galaktanbildenden Teile des Zytoplasmas, die bei Wegfall des Variationsreizes bei einem Teil der Nachkommen sofort, bei einem anderen Teil langsamer (pseudohereditäre Nachwirkung durch Proliferation des modifizierten Zytoplasmas) ihren normalen Funktionsgrad wieder erreichen. Durch Tierpassagen werden alle modifizierten Individuen sofort wieder in den Typus verwandelt.

Die modifizierten Massenkulturen bleiben bei beliebiger Uebertragung in gleicher Weise modifiziert; sie bilden keine weiteren regressiven Variationen mehr, da der Variationsreiz durch die Modifikation stark verändert wird.

Die Modifikation ist die häufigste Form der Variation. Sie tritt bei längerer künstlicher Kultivierung fast bei allen Bakterienarten mehr oder weniger in Erscheinung und kann die verschiedensten Eigenschaften betreffen.

2) Die Alternation. Durch stärkere Einwirkung des Variationsreizes geht die Galaktanbildung bei einem geringen Teil der Individuen einer Kulturgeneration plötzlich ganz verloren. Zugleich wird auch das Ekto-

und Entoplasma stark reduziert, so daß die alternierte Form von allen Varianten die stärkste Abweichung vom normalen Typus zeigt. Diese Veränderung vollzieht sich ohne Uebergänge im Laufe einer einzigen Generation, also „sprunghaft“. Sie ist bei der üblichen Art der Uebertragung (in kurzfristigen Zwischenräumen) erblich und ist auch ohne Fortdauer des Variationsreizes erblich völlig konstant, schlägt aber durch mehrere Tierpassagen (also schwerer wie die Modifikation) und auch durch Aussaat alter Kulturen (hierbei nur in einem Teil der Nachkommen) wieder in den Typus zurück, und zwar ebenso sprunghaft wie sie entstanden war. Bei der Alternation handelt es sich um einen Valenzwechsel von Erbfaktoren, und zwar eines Komplexes biologisch zusammenhängender Radikale. Bei der regressiven Alternation werden Faktoren inaktiv (latent), beim Rückschlag, d. h. der progressiven Alternation werden latente Faktoren wieder aktiv. Das Sprunghafte der Alternation ist nur dadurch zu erklären, daß gleichzeitig das Zytoplasma und das Keimplasma verändert wird (Parallelinduktion). Ein Valenzwechsel von Erbfaktoren wird auch bei vielen Variabilitätsvorgängen der Metazoen (z. B. beim Generationswechsel, den Temperaturvariationen bei Schmetterlingen und Käfern) zur Erklärung herangezogen. Das Charakteristische dieser Variation ist der oft große, stets sprunghaft auftretende Unterschied zwischen Variante und Typus (da ein mehr oder weniger großer Komplex von Faktoren betroffen ist) und die Fähigkeit der Variante zum Rückschlag. Da der Phänotypus und ebenso auch der Genotypus zwischen 2 verschiedenen Zuständen abwechselt, habe ich für diese Variationsform den Namen Alternation (alternare = abwechseln zwischen 2 Möglichkeiten) gewählt.

Die frisch isolierte alternierte Form unterliegt bei weiterer Kultivierung noch einer geringfügigen Modifikation, indem das Ektoplasma allmählich immer schmaler wird und schließlich kaum mehr sichtbar ist. Die Fähigkeit zum Rückschlag leidet dabei nicht.

Zur Alternation gehören die in den letzten Jahren sehr zahlreich beobachteten sogenannten Bakterienmutationen, d. h. meist bei Aussaat alternder Kulturen gefundener, sprunghaft in Erscheinung tretender Varianten mit stets erhaltener Fähigkeit zum Rückschlag.

3) Die Mutation. Durch stärkste Einwirkung des Variationsreizes entstehen mehrere Varianten, die sich immer nur in sehr spärlicher Zahl in den Massenkulturen finden. Nach dem Grade ihrer Abweichung bilden sie eine kontinuierliche Reihe. Es wurden 3 Mutanten isoliert. Es ließ sich zeigen, daß die extremen Mutanten nicht unmittelbar aus dem Typus, durch einen „Sprung“ wie die alternierten Individuen entstehen, sondern durch eine allmähliche, im Laufe vieler Generationen zunehmende Abänderung (Verminderung der Galaktanbildung), die zu erblichen Zwischenformen führt.

Die Mutation zeigt den weitaus höchsten Grad von Erbllichkeit. Selbst durch eine große Reihe von Tierpassagen ließ sich kein Rückschlag der Mutante III in den Typus erzielen, nicht einmal in die Mutante II. Doch trat hierbei eine stetig zunehmende, also ebenso allmählich wie die retrogressive Mutation verlaufende und zwar zum großen Teil erbliche Wiederannäherung der extremen Mutante III an die Mutante II ein. Es ist infolgedessen wahrscheinlich, daß bei Fortsetzung der Tierpassagen völlige Rückkehr in den Typus zu erzielen wäre.

Die Mutanten des Friedländer-Bazillus können, ebenso wie der normale Phänotypus, eine alternierte Form abspalten. Die alternierte

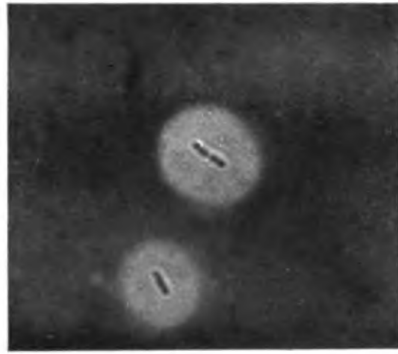


Fig. 1.

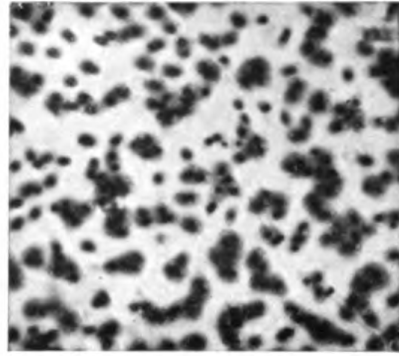


Fig. 2.

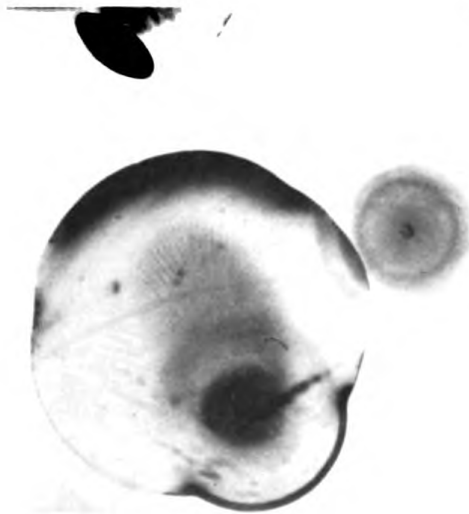


Fig. 3.

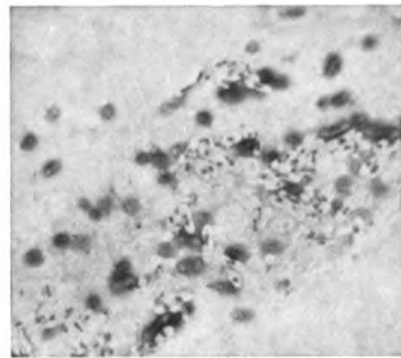


Fig. 6.



Fig. 4.

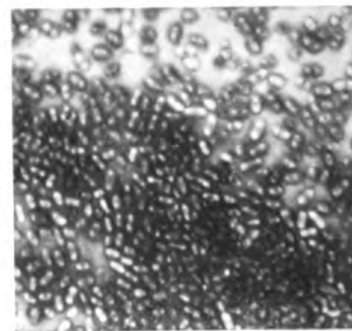


Fig. 5.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Form schlägt beim Rückschlag in die gleiche Mutante zurück, aus der sie entstanden war. Auch zu einer geringgradigen Modifikation sind die Mutanten befähigt, indem ihre Galaktanbildung bei künstlicher Kultivierung ebenso wie beim Typus in nicht erblicher Weise abnimmt.

Die Mutation führt als retrogressive Mutation wahrscheinlich zu einem Verlust von Erbfaktoren. Die verschiedenen Stadien der Mutation zeigen, daß die Galaktanbildung ein polygenes Merkmal ist. Nach dem exogen bedingten Verlust von Erbfaktoren behält das Keimplasma die Fähigkeit, die verloren gegangenen Faktoren durch den adäquaten Reiz wieder zu bilden, und zwar auf dem Wege der zytoplasmatischen Induktion. Die Mutation ist die artbildende Form der Variation, während die Modifikation und Alternation nicht zur Ueberschreitung der Artgrenzen führt.

Außer der beschriebenen Mutation des Pneumoniebazillus möchte ich nur einige der von Preisz und Bail gefundenen Varianten des Milzbrandbazillus als echte Mutation gelten lassen. Als experimentell erzielte, progressive Mutation kann bisher nur die Wiederannäherung der extremen Mutante des Pneumoniebazillus an die Mutante II angesehen werden. Echte Mutationen sind demnach äußerst selten. Daraus ergibt sich, daß die Lehre Robert Kochs von der Beständigkeit der verschiedenen Bakterienarten in praktischer Beziehung vollkommen zu Recht besteht, wenn man diese Lehre auf den Genotypus bezieht. Dagegen besitzt der Phänotypus eine früher nicht geahnte Variabilität und überschreitet die bisherige Abgrenzung der Arten nach den äußeren Merkmalen in vielen Fällen.

Erklärung der Mikrophotogramme.

Die Mikrophotogramme sind früheren Arbeiten (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 69 und 73) entnommen. Herr Prof. Heim hat die Aufnahmen nach meinen Präparaten angefertigt. Da die Benennung der Varianten eine andere geworden ist, lasse ich die Bilder mit abgeändertem Text nochmals folgen.

Tafel I.

Fig. 1. Normaler Phänotypus in Tusche aufgeschwemmt. Man sieht deutlich die Zusammensetzung des Bacillus aus Endo- und Ektoplasma sowie die Schleimhülle.

Fig. 2. Agarkultur des phänotypisch normalen Bazillus, auf dem Objektträger ausgestrichen, durch Hitze fixiert und mit Methylenblau gefärbt. Sämtliche Individuen erscheinen in gleicher Weise in die Schleimschubstanz eingebettet.

Fig. 3. Agarkolonie (Gußplatte), phänotypisch normal, 4 Tage alt (war 24 Stunden bei 37°, 3 Tage bei 15° C gewachsen). 7-fache Vergrößerung. Die Kolonie zeigt nur eine Spur von Radiärstreifung.

Fig. 4. Zwei in mittlerem Grade modifizierte Kolonien, 8-fach vergrößert. Deutliche Radiärstreifung. Die konfluierende Partie ist homogen und besteht nur aus Individuen, welche in den Typus zurückgeschlagen sind.

Fig. 5. Ausstrichpräparat einer modifizierten Kolonie (Hitze-fixation, Methylenblaufärbung). Die Individuen erscheinen je nach Menge der gebildeten Kapselschubstanz heller oder dunkler.

Fig. 6. Nicht zum Abschluß gekommene Alternation. Die alternierenden Individuen erscheinen als helle Gebilde, da sie keine Schleimhüllen bilden.

Tafel II.

Fig. 7. Die Alternation vollendet. Neben den normal gebliebenen Bazillen die schlanken Stäbchen der alternierten Form.

Fig. 8. Reinkultur der alternierten Form.

Fig. 9. Kolonie der alternierten Form, 4 Tage alt, 7-fach vergrößert. Keine Radiärstreifung. Die kleinen Kolonien sind tiefliegende.

Fig. 10. Beispiel für den Rückschlag. Eine Reinkultur der alternierten Form blieb vom 30. Juni 1912 unübertragen stehen bis zum 18. Nov. 1912. Bei erneuter

Uebertragung schlug ein Teil der dünnen kapsellosen Stäbchen in den Ausgangstypus der dicken, mit Schleimhüllen versehenen Stäbchen zurück. Die Schleimhüllen sind an einigen Bazillen besonders deutlich als eine geschrumpfte, unregelmäßig begrenzte und homogen hellgefärbte Substanz zu sehen, welche den Bazillus umgibt.

Fig. 11. Kolonie der Mutante III. 4 Tage alt, 7-fach vergrößert. Keine Radiärstreifung.

Fig. 12. Mutante III (Hitze-fixation, Methylenblaufärbung). Die Schleimhüllen fehlen, das Endoplasma ist unverändert geblieben. Die Bazillen liegen als plumpe, fast farblose, säckchenförmige Gebilde eng aneinander. In ihrem Innern zeigen sie besonders deutlich die zu kugeligen oder ovalen Formen geschrumpfte Chromatinsubstanz.

Nachdruck verboten.

Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen.

[Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. H. Braun) des Hygienischen Universitäts-Institutes in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. M. Neisser).]

III. Mitteilung.

Die Bedeutung des Stoffwechsels für die Entbehrlichkeit oder Unentbehrlichkeit des Sauerstoffes.

Von H. Braun und C. E. Cahn-Bronner.

Bei Untersuchungen über die synthetischen Fähigkeiten verschiedener pathogener Bakterien sind wir auf die Tatsache gestoßen, daß Keime, die als fakultative Anaerobier bekannt sind, wie Paratyphus B., Typhus- und Shiga-Kruse-Ruhrbazillen, unter besonderen Bedingungen ein erhöhtes Sauerstoffbedürfnis zeigen und nur in einer flach ausgebreiteten Flüssigkeitsschicht wachsen, ohne Sauerstoff aber überhaupt nicht leben können.

I. Versuche mit Paratyphus B-Bazillen.

Vom Paratyphus B-Bazillus haben wir bereits dargestellt¹⁾, daß er in einem Nährboden, der aus 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat und so viel Natriumbikarbonat zusammengesetzt ist, daß die Lösung lackmusneutral wurde und darüber hinaus 0,7 Proz. Normalsodalösung enthielt, wohl aërob, aber nicht anaërob zu wachsen vermag. Wir beobachteten dies z. B. in einer Agarschüttelkultur dieses Nährbodens; hierin wachsen die in der ganzen Schicht gleichmäßig verteilten Keime nur an der Oberfläche zu Kolonien aus, dagegen können sie sich in der Tiefe nicht vermehren. Wie stark ihr Sauerstoffbedürfnis in diesem Nährboden ist, ersieht man daraus, daß sie nur an der Oberfläche selbst, bis höchstens 1 mm darunter, gedeihen, tiefer aber, wohin der Sauerstoff der Luft in fortschreitend geringerem Maße eindringt, weder mit einer Lupe noch unter dem Mikroskop Kolonien zu finden sind. Die Dicke der Wachstumszone kann uns also als brauchbarer Maßstab für das Sauerstoffbedürfnis eines Bakteriums in dem betreffenden Nährboden dienen. Diesen Befunden entsprechend,

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 86. 1921. Heft 1.

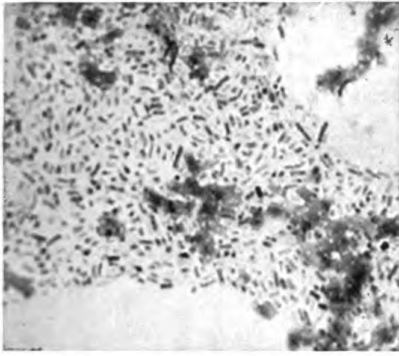


Fig. 7.



Fig. 8.

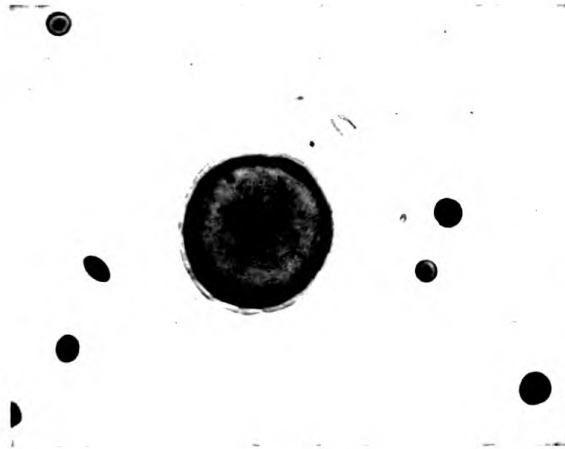


Fig. 9.

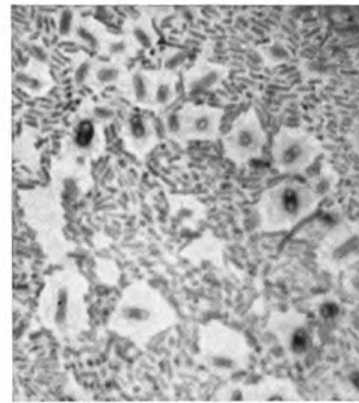


Fig. 10.

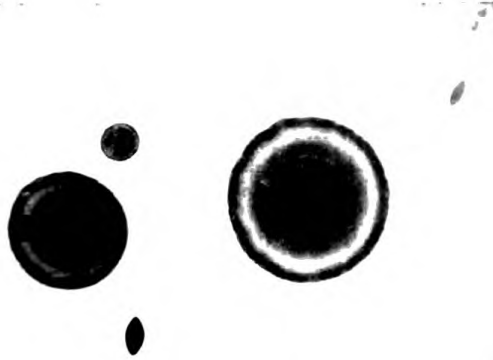


Fig. 11.

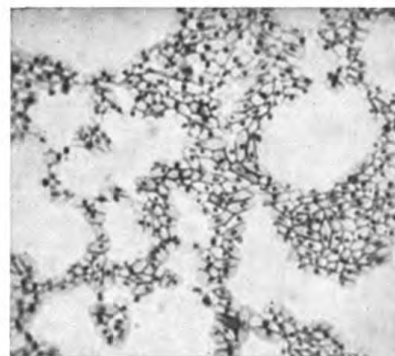


Fig. 12.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

bleibt in einem Schrägagarröhrchen obiger Zusammensetzung jedes Wachstum des Paratyphus B-Bazillus aus, sobald aus diesem z. B. durch Pyrogallol-Kalilauge der Sauerstoff entfernt ist; auch im flüssigen Nährboden ist ihm bei Sauerstoffabschluß jegliche Vermehrung unmöglich. In diesem Milchsäure-Ammoniaknährboden¹⁾ ist der Stoffwechsel des Paratyphus B-Bazillus durch besonders weitgehende Synthesen von einfachsten Bausteinen zu hoch komplizierten Verbindungen und gleichzeitig durch besonders geringe verfügbare Energiequellen charakterisiert, während in unseren üblichen Fleischbouillonnährböden mit Pepton- und event. Zuckerzusätzen sein Stoffwechsel unter besonders großen verfügbaren Energievorräten und geringerer synthetischer Leistung abläuft. Es liegt nahe, den Mehrverbrauch an Energie, der durch die Synthesen aus einfachen chemischen Körpern bedingt ist, dafür verantwortlich zu machen, daß das Sauerstoffbedürfnis so gewachsen ist und der Energiebedarf nicht mehr anders als durch Oxydationen mittels freien Sauerstoffes gedeckt werden kann.

Wir haben uns deshalb die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, was man diesem Milchsäure-Ammoniaknährboden zusetzen muß, damit der Paratyphus B-Bazillus den freien Sauerstoff entbehren kann. Daß ein Zusatz der in unserem oben angegebenen Nährboden fehlenden, meist als Protoplasmabestandteile geltenden, chemischen Elemente wie Schwefel, Kalzium, Magnesium und Eisen, die Anaërobie nicht ermöglicht, haben wir bereits früher besprochen. Wir prüften nun, welche Bedeutung hierbei organische Stickstoffverbindungen und höhere Kohlenstoffverbindungen für die Anaërobie haben.

Zusatz von Aminosäuren zum Milchsäure-Ammoniaknährboden.

Zuerst wollen wir verfolgen, wie sich der Paratyphus B-Bazillus bezüglich der Entbehrlichkeit des Sauerstoffes bei Zusatz höherer stickstoffhaltiger Substanzen verhält. Die zugesetzten Verbindungen zeichnen sich vor dem Ammoniak dadurch aus, daß sie Stickstoff an Kohlenstoff gebunden enthalten und somit dem Bakterium die Herstellung dieser Bindung erspart wird. Dem Milchsäure-Ammoniaknährboden wurden zunächst einzelne Aminosäuren zugesetzt. Diese sind uns von Herrn Geheimrat Ellinger und Herrn Priv.-Doz. Dr. Lipschitz in reiner Form zur Verfügung gestellt worden. Beiden Herren möchten wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Einfache Aminosäuren, nämlich 0,5 Proz. Glykokoll, 0,5 Proz. d-Alanin und 0,5 Proz. l-Leuzin, Aminodikarbonsäuren, wie 0,5 Proz. Asparaginsäure, ihr Amid 0,5 Proz. Asparagin und 0,5 Proz. Glutaminsäure wurden zugesetzt. Alle diese geben den Paratyphus B-Bazillen nicht die Möglichkeit, anaërob zu wachsen. Auch ein Repräsentant der stickstoffhaltigen aromatischen Säuren, 0,25-proz. l-Tyrosin und 0,5-proz. l-Tryptophan, als Vertreter der heterozyklischen Verbindungen, machen den freien Sauerstoff nicht entbehrlich. Es wäre falsch, anzunehmen, daß diese Aminosäuren für den Paratyphus B-Bazillus gar nicht als Nährsubstanzen in Betracht kommen. Aus einigen unter ihnen, dem Alanin, der Asparaginsäure, der Glutaminsäure und auch aus dem Tryptophan

1) Wir bezeichnen der Kürze halber die einfachen künstlichen Nährlösungen durch die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen unter Weglassung des in jedem Nährboden enthaltenen Kochsalzes und Biphosphats.

kann er, wie wir früher zeigten, unter aëroben Verhältnissen seinen ganzen Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiebedarf decken. Andere allerdings, wie Glykokoll, Leucin, Tyrosin, kann er nur dann als Stickstoffquellen benutzen, wenn er noch außerdem eine andere organische Substanz, z. B. Milchsäure, zur Verfügung hat; er kann sie aber jedenfalls — ob nach vorheriger Spaltung oder direkt als solche bleibt offen — zum Aufbau seines Körpereißes verwenden. Trotzdem aber ändern sie die Stoffwechselverhältnisse des Bakteriums nicht derartig, daß er mit ihnen ohne Sauerstoff zu leben vermag. Auch der gleichzeitige Zusatz verschiedener solcher Aminosäuren, wobei ihm also zahlreiche verschiedene Körper und vermehrte Energievorräte zur Verfügung stehen, befähigt ihn nicht zu anaëroben Wachstum. So kann er sich in 2 Nährböden, von denen der eine Glykokoll, Alanin und Tryptophan¹⁾, der andere Glykokoll, Alanin, Leuzin, Asparagin, Tyrosin und Tryptophan²⁾ als Zusätze zum Milchsäure-Ammoniaknährboden enthalten, nur bei Sauerstoffgegenwart, nicht bei Sauerstoffabschluß, vermehren. Diesen letzten beiden Nährböden haben wir außerdem 0,1 Proz. Magnesiumsulfat, 0,05 Proz. Kalziumchlorid und Spuren von Eisensulfat zugesetzt; denn es war ungewiß, ob nicht doch diese Elemente, die zwar allein den Sauerstoff nicht entbehrlich machen, in Verbindung mit anderen Stoffen für die Anaërobie nötig seien. Auch damit ist nur aërobes Wachstum des Paratyphus B-Bazillus aufgetreten.

Da die Energiefrage in diesen Erörterungen einen so großen Raum einnimmt, durfte man nicht nur der qualitativen Zusammensetzung der Nährböden seine Aufmerksamkeit schenken und die Quantität der Substanzen ganz außer acht lassen. Es war zu untersuchen, ob in einem Milchsäure-Ammoniaknährboden durch gleichzeitige Vermehrung der energiespendenden Milchsäure und des Ammoniaks ein anaërobes Wachstum zu erzielen ist. Wir haben einen solchen Nährboden mit der 5-fachen Menge Ammoniumlaktat hergestellt, der also 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 3 Proz. Ammoniumlaktat bei der üblichen schwach alkalischen Reaktion enthielt. Auch darin ist nur aërobes Wachstum des Paratyphus B-Bazillus zu beobachten. Diesem quantitativ verbesserten Milchsäure-Ammoniaknährboden haben wir eine Aminosäure zugesetzt, und zwar sowohl in der Menge von 0,5 Proz., wie in der 3-fachen Quantität. Wir haben dazu das Tryptophan gewählt, weil es, wie später gezeigt wird, unter besonderen Bedingungen Wachstum des Paratyphus B-Bazillus ohne Sauerstoff ermöglicht. Auch dabei ist kein anaërobes Wachstum aufgetreten; es hat also auch die gleichzeitige Vervielfachung der energiespendenden Milchsäure und des Tryptophans nicht zu einer Vermehrung unter Sauerstoffabschluß geführt. Es genügte also nicht, in einem Nährboden, der aërobes Wachstum gewährleistet, die vorhandenen Energiequellen quantitativ zu erhöhen, um Vermehrung ohne Sauerstoff zu erzielen.

Zusatz von Albumosen und Peptonen zum Milchsäure-Ammoniaknährboden.

Erst als wir dem Milchsäure-Ammoniaknährboden 2 Proz. Witte-Pepton oder 2 Proz. Pepton Chapeau t hinzufügten, konnte der Paratyphus B-Bazillus ohne Sauerstoff gedeihen. Auch bei Zusatz von 2 Proz.

1) Der Nährboden enthielt je 0,16 Proz. jeder Aminosäure.

2) Der Nährboden enthielt 0,14 Proz. Tryptophan, 0,28 Proz. Tyrosin und je 0,07 Proz. der anderen Aminosäuren.

Erepton, einem natürlichen Gemisch von Aminosäuren, das durch künstliche, bis zu abiureten Spaltprodukten führende Eiweißverdauung gewonnen wird, wächst der Paratyphus B-Bazillus anaërob. In derartigen flüssigen Nährböden unter Pyrogallol-Kalilauge und in der Tiefe einer Agar-Schüttelkultur gleicher Zusammensetzung wachsen die Keime sehr langsam, im Agar nach mehreren Tagen zu Kolonien heran, die unter dem Mikroskop sichtbar sind. Gibt man 5 Proz. anstatt 2 Proz. dieser Substanzen zu, so läßt sich schnelleres und reichlicheres Wachstum beobachten.

Nährböden, welche eines von diesen 3 Präparaten enthalten, weisen aber nicht mehr, wie das in dieser Arbeit sonst grundsätzlich durchgeführt ist, eine qualitativ und quantitativ bekannte chemische Zusammensetzung auf. Denn da diese Gemische alle aus verschiedenen Eiweißkörpern gewonnen sind, haben sie, je nach der Art des Fleisches usw., gerade wie eine Bouillon eine unterschiedliche Zusammensetzung, und sie enthalten die Spaltprodukte des Eiweißes, der Fette, der phosphorhaltigen Kernsubstanzen und außerdem Salze und andere Stoffe mehr, die wir nicht kennen. Wir arbeiten hier also nicht mehr mit chemisch definierten Substanzen. Infolgedessen werden die Stoffwechselverhältnisse undurchsichtig. Das Erepton (2 Proz.), das natürliche Gemisch der Aminosäuren¹⁾, ermöglicht den Paratyphus B-Bazillen anaërobes Wachstum; in einem künstlichen Gemisch der reinen Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Leuzin, Asparagin, Tyrosin und Tryptophan kann er, wie oben beschrieben, den Sauerstoff nicht entbehren. Daraus müssen wir wohl schließen, daß es entweder die verschieden gewählten absoluten Mengen oder die quantitativ andere, natürliche Zusammensetzung der Aminosäuren im Erepton, oder aber viel wahrscheinlicher ganz andere, uns aber unbekannt Beimpungen, vielleicht phosphorhaltige Substanzen, sind, welche hier die Anaërobie gestatten. Gestützt wird diese letzte Annahme besonders dadurch, daß man zur Erzielung anaëroben Wachstums recht viel dieser Substanzen zusetzen muß. So beobachtet man z. B. mit 5 Proz. Pepton Chapoteaut schon nach 24 Std. Vermehrung ohne Sauerstoff, mit 2 Proz. erst nach 5—7 Tagen, mit 0,5 Proz. tritt aber kein Wachstum ohne Sauerstoff auf, während aërob noch üppigste Vermehrung der Paratyphus B-Bazillus zu beobachten ist. Wie wir eben gesehen haben, zeigen sich in Nährböden, die nur bekannte chemische Stoffe enthalten, bei solchen quantitativ variierten anaëroben Versuchen ganz andere Ergebnisse. Wir sind deshalb geneigt, diese große Rolle der Quantität des „Pepton Chapoteaut“ so zu erklären, daß an Menge sehr geringe unbekannt Beimpungen und nicht Eiweißspaltprodukte allein das Wachstum ohne Sauerstoff unterhalten, Substanzen, die eben bei 2- oder 5-proz. Lösung der Präparate genügend reichlich, in 0,5-proz. dagegen nicht mehr ausreichend vorhanden sind.

Der Stoffwechsel des Bakteriums in einem solchen Milchsäure-Ammoniaknährboden mit Zusatz von Witte-Pepton usw. unterscheidet sich wohl kaum wesentlich von dem in einer gewöhnlichen Nährbouillon mit ihrem Peptonzusatz. Unser Thema, das Verhalten der Bakterien unter übersichtlichen Stoffwechselverhältnissen, d. h. in chemisch definierten Nährböden, zu studieren, ist also mit diesen letzten Versuchen überschritten. Es läßt sich nicht entscheiden; ob der Paratyphus B-Bazillus zu anaëroben Wachstum entweder die Albumosen und Peptone, oder aber andere in diesen Präparaten enthaltene, unbekannt Stoffe benützt. Wir haben diese Versuche nur deshalb besprochen, weil aus

1) Der Gehalt unseres Präparates an Aminosäuren war uns nicht bekannt.

ihnen hervorgeht, daß zu anaëroben Wachstum ein komplizierterer Nährboden notwendig ist als ein Milchsäure-Ammoniaknährboden mit reinen Aminosäuren.

Deshalb erwies es sich nun von besonderem Interesse, dem Milchsäure-Ammoniaknährboden allein oder gleichzeitig mit den organischen Stickstoffverbindungen noch ein Kohlehydrat als 2. Energiequelle hinzuzufügen und zu untersuchen, ob dadurch der Sauerstoff entbehrlich gemacht werden kann.

Zusatz von Traubenzucker zum Milchsäure-Ammoniaknährboden.

Setzt man dem Milchsäure-Ammoniaknährboden, der 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat enthält, 1 Proz. Traubenzucker zu, so beobachtet man in einer Schüttelkultur an der Oberfläche kräftiges Wachstum des Paratyphus B-Bazillus, in der Tiefe aber keine Koloniebildung. Dort, wo der Sauerstoff nicht mehr hingelangt, bleibt die Vergärung des Traubenzuckers und die Zerreißen des Agars durch die Gasbildung aus. Das Wachstum erfolgt in ziemlich breiter Zone bis zu 3 oder 4 mm unterhalb der Oberfläche, woraus wir erkennen, daß bei Traubenzuckerzusatz zwar mit geringerer Sauerstoffmenge als ohne Traubenzucker noch eine Vermehrung möglich, bei Fehlen des Sauerstoffes aber auch mit dem Kohlehydrat unmöglich ist. Im flüssigen Nährboden gleicher Zusammensetzung tritt unter Pyrogallol-Kalilauge überhaupt kein Wachstum auf.

Der Paratyphus B-Bazillus ist also nicht imstande, im Milchsäure-Ammoniaknährboden unter Sauerstoffabschluß Traubenzucker anzugreifen und sich des in ihm enthaltenen Energievorrates zu bedienen. Die Frage, ob er unter den Bedingungen dieses Nährbodens den Traubenzucker überhaupt nicht zu spalten vermag, wird dadurch beantwortet, daß er im Milchsäure-Ammoniaknährboden, wie früher ausführlich beschrieben, unter aëroben Verhältnissen aus Traubenzucker Gas und Säuren bildet, auch vermag er, wie wir ebenfalls schon darlegten, bei Sauerstoffgegenwart in einem Nährboden, der Traubenzucker als einzige Kohlenstoffquelle enthält, gut zu wachsen. Daß es ihm tatsächlich nur an Sauerstoff fehlt, um unter diesen Verhältnissen in der Tiefe einer Agarsäule den Traubenzucker zu vergären, geht aus folgendem Versuch hervor:

Einem Milchsäure-Ammoniak-Agar-Nährboden wurde 1 Proz. Mangansuperoxyd zugesetzt, indem das Pulver im flüssigen Agar aufgeschwemmt und mit diesem durch Kochen sterilisiert wurde. Eine Probe dieses schwarz gefärbten Nährbodens enthielt keinen Zuckerzusatz, eine zweite 1 Proz. Traubenzucker. Das anaërobe Wachstum des Paratyphus B-Bazillus konnte dabei nur an der Gasbildung erkannt werden; denn die Feststellung der Kolonien in der Tiefe war wegen der Undurchsichtigkeit dieses Nährbodens unmöglich. In der mit Traubenzucker versetzten Probe trat schon nach 12 Std. Gasbildung und Zerreißen des Agars auf; das Ausbleiben der Gasblasen in der Probe ohne Traubenzucker beweist, daß das Gas der Traubenzuckerspaltung entstammt und nicht etwa aus dem Mangansuperoxyd abgespaltener Sauerstoff war. Die beim Kochen und eventuell später aus dem Mangansuperoxyd freigewordenen, im Nährboden gelösten geringen Sauerstoffmengen genühten, um dem Paratyphus B-Bazillus auch in der Tiefe des Agars die Traubenzuckerspaltung zu ermöglichen, während ohne das Peroxyd Wachstum und Traubenzuckervergärung unmöglich war. Genau so verhielt sich der Colibazillus, nur daß er natürlich wie Traubenzucker so auch Milchzucker zu spalten und dadurch in der Tiefe eines solchen festen Nährbodens zu gedeihen vermochte.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß auch der Zusatz des für anaërobes Wachstum allgemein als bedeutungsvoll anerkannten Traubenzuckers den Milchsäure-Ammoniaknährboden zur Vermehrung ohne Sauerstoff nicht geeignet macht.

Ob ein Ersatz der Milchsäure durch eine höhere organische Säure, wie z. B. Zitronensäure, bei Traubenzuckeranwesenheit Anaërobie ermöglicht, haben wir bis jetzt nicht geprüft¹⁾.

Gleichzeitiger Zusatz von Traubenzucker und Aminosäuren zum Milchsäure-Ammoniaknährboden.

Daß die verschiedenen Aminosäuren als Zusätze zum Milchsäure-Ammoniaknährboden dem Paratyphus B-Bazillus ein anaërobes Wachstum nicht ermöglichen, haben wir vorhin besprochen. Es fragt sich nun, ob diese Aminosäuren ihm die Fähigkeit verleihen, den Traubenzucker ohne Sauerstoffgegenwart anzugreifen und sich dessen Energievorrat zu anaëroben Wachstum nutzbar zu machen. Wir haben uns Schüttelkulturen hergestellt, denen 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat gemeinsam war, und die außerdem entweder 0,5 Proz. Glykokoll und 1 Proz. Traubenzucker, oder 0,5 Proz. Alanin und 1 Proz. Traubenzucker, oder 0,5 Proz. Leucin und 1 Proz. Traubenzucker enthielten. Auch hier ermöglicht der Traubenzuckerzusatz kein anaërobes Wachstum, und es fehlt die Traubenzuckervergärung in der Tiefe. Setzt man 0,5 Proz. Asparaginsäure und 1 Proz. Traubenzucker zu, so bleibt ebenfalls meistens in der Tiefe einer Schüttelkultur Gasbildung und Wachstum aus, doch haben wir gelegentlich bei mehreren solchen, gleichzeitig angelegten Kulturen in einzelnen von ihnen nach mehr als 4 tägiger Bebrütung doch noch das Heranwachsen von Kolonien und Gasbildung beobachtet. Dieses späte, plötzliche Wachstum trat meistens nur an umschriebenen Stellen in der Tiefe der Agarsäule auf; wir konnten uns durch Identifizierung der Kolonien überzeugen, daß Paratyphus B-Bazillen in Reinkulturen vorhanden waren. Bemerkenswert ist nun, daß 0,5 Proz. Tyrosin und 1 Proz. Traubenzucker dem Paratyphus B-Bazillus unter anaëroben Verhältnissen auch nach 6-tägiger Bebrütung weder Traubenzuckervergärung noch Wachstum ermöglichen, trotzdem doch das Tyrosin mit seinem fertig vorgebildeten Kohlenstoffring eine kompliziert gebaute und kalorienreiche Aminosäure ist. Setzt man aber dem Milchsäure-Ammoniaknährboden 0,5 Proz. Tryptophan und 1 Proz. Traubenzucker zu, so tritt regelmäßig, gelegentlich schon nach 7 Std., Gasbildung auf; nach 12—24 Std. sind Kolonien in der ganzen Agarschicht zu sehen.

Wir haben also durch diese Versuche erfahren, daß von den untersuchten Aminosäuren nur das Tryptophan mit Traubenzucker zusammen regelmäßig den Paratyphus B-Bazillus befähigt, das Kohlehydrat unter Sauerstoffabschluß zu spalten und sich so auf anderem Wege als durch Oxydationen mittels freien Sauerstoffes die zum Leben nötige Energie zu verschaffen. Ob andere organischen Stickstoffverbindungen oder ob Kohlenstoffverbindungen anderer Elemente, wie z. B. des Phosphors oder Schwetels das Tryptophan in seiner Rolle als energiesparender, vorgebildeter Baustein des Bakterienprotoplasmas bei der Anaërobie ersetzen können, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Daß bei gleichzeitigem Zusatz von Pepton und Traubenzucker Wachstum unter Sauerstoffabschluß auftritt, ist bekannt. Ein Nährboden, der

1) In unserer II. Mitteilung findet sich bei der Besprechung der Ernährungsbedingungen der Gärtner-, Voldagsen- und Mäusetypusbazillen (Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 86. S. 204) eine Angabe, die mißverstanden werden könnte. Die dort erwähnten anaëroben Versuche sind nur mit Milchsäure, nicht mit Zitronensäure usw. ausgeführt worden.

nur 0,5 Proz. Pepton enthält, eine Menge, die, wie besprochen, zu anaëroben Wachstum nicht ausreicht, wird durch Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker geeignet, Vermehrung des Paratyphus B-Bazillus ohne Sauerstoff zu gewährleisten.

Die Technik dieser anaëroben Züchtungen muß selbstverständlich mit besonderer Sorgfalt gehandhabt und kritisch beurteilt werden. Wir sind uns darüber klar, daß eine Anaërobie nur in einer Wasserstoffatmosphäre als vollkommen gelten darf. Dem Einbringen von Pyrogallol-Kalilauge und Abschluß nach außen durch einen Gummistopfen, ein Verfahren, das wir in langhalsigen Kölbchen (nach Burri) und auch in Reagenzröhrchen zur Anwendung brachten, muß man besonders im letzteren Fall Mühen entgegenbringen. Jedenfalls erwies es sich als unmöglich, mit Regelmäßigkeit in zahlreichen solchen Röhrchen auf diese Weise Sauerstofffreiheit zu erzielen, sobald die Gefäße mehr als 1—2 Tage bei 37° gehalten wurden, was in unseren Versuchen immer notwendig war. Der darin durch Sauerstoffabsorption entstehende Unterdruck bedingt schließlich ein Eindringen der äußeren Luft, besonders bei Erkalten und Volumverminderung der eingeschlossenen Gasmenge infolge der Herausnahme aus dem Brutschrank, und das zu einer Zeit, wo das Pyrogallol schon verbraucht ist und die eintretenden Sauerstoffspuren nicht mehr absorbieren kann. So haben wir mit dieser Methode Unregelmäßigkeiten beobachtet. Auch diese waren lehrreich: Im Milchsäure-Ammoniaknährboden mit oder ohne Traubenzucker arbeitet die Methode zuverlässig. Dabei trat fast niemals Wachstum auf; denn hier sind, wie wir das bereits aus der äußerst schmalen Wachstumsschicht in Schüttelkulturen erschlossen, größere Sauerstoffmengen zum Wachstum nötig. Dort aber, wo eine ganz geringe Sauerstoffspannung bereits zur Vermehrung genügt, wie bei Gegenwart von Alanin und Traubenzucker, traten die durch die unvollständige Beseitigung des Sauerstoffes bedingten Unregelmäßigkeiten auf. Bei dieser Methode ist nur das Ausbleiben des Wachstums verwertbar, aber nicht das Wachstum selbst.

In Agarshüttelkulturen dagegen, die durch Kochen von Sauerstoff befreit und in hoher Schicht mit allen Vorsichtsmaßnahmen beimpft waren, haben wir Unregelmäßigkeiten, die auf Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen wären, nicht erlebt. Dabei ist bei mehrtätiger Bebrütung besonders darauf zu achten, daß nicht der Agar infolge Austrocknung schrumpft, und so die Luft seitlich zwischen Glas und Agarsäule eindringt. Deshalb darf man nur frisch bereitete Nährböden für diese Versuche verwenden. Selbstverständlich muß der zur Nährbodenbereitung benutzte Stangenagar durch sorgfältiges Wässern von wachstumsbefördernden Beimengungen befreit werden. Selbst nach Zusatz aller anorganischen Nährbodenbestandteile und des Traubenzuckers darf er kein anaërobes Bakterienwachstum ermöglichen.

Damit sind unsere mit dem Paratyphus B-Bazillus ausgeführten Versuche besprochen.

Ein Ueberblick über aërobes und anaërobes Wachstum unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen mag aus der auf S. 388 und 389 eingefügten Tabelle gewonnen werden. Die Versuchsergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Ein Wachstum ohne Sauerstoff wird nicht immer dadurch ermöglicht, daß man einem aëroben Wachstum gestattenden Nährboden einfach eine höhere Energiequelle in Form eines Kohlehydrates hinzufügt: Im Milchsäure-Ammoniak-Nährboden wächst der Paratyphus B-Bazillus aërob gut, anaërob weder mit noch ohne Traubenzucker. Auch dadurch ist keine Vermehrung ohne Sauerstoff zu erzielen, daß man anstatt des Kohlehydrates eine Aminosäure zusetzt. Erst wenn gleichzeitig ein Kohlehydrat und ganz bestimmte Aminosäuren verfügbar sind, wird der Sauerstoff entbehrlich: Dies trifft für Tryptophan einerseits und Traubenzucker andererseits zu. Weder die Stickstoffverbindung allein noch der Traubenzucker allein, sondern nur beide Stoffe zusammen ermöglichen Wachstum ohne Sauerstoff. Unter diesen Verhältnissen ist die Befähigung, den Traubenzucker unter Sauerstoffabschluß zu spalten, gleichbedeutend mit dem Vermögen, anaërob zu wachsen; das eine ist ohne das andere unmöglich. Obzwar die Energiefrage

also eine sehr wesentliche Rolle spielt, so ist sie doch nicht allein ausschlaggebend; denn wenn wir einen dieser beiden gleichzeitig notwendigen Stoffe weglassen, den anderen aber vervielfachen oder die in den besprochenen Nährböden immer als 2. Energiequelle vorhandene Milchsäure unter Weglassung des Traubenzuckers vermehren, so tritt zwar ein reichlicheres aërobes, aber kein anaërobes Wachstum auf. Es läßt sich die Qualität der beiden notwendigen Stoffe, der Aminosäure und des Traubenzuckers, nicht durch eine größere Quantität des einen oder anderen von ihnen ersetzen. Daraus geht hervor, daß der Paratyphus B-Bazillus die Aufgabe, unter Sauerstoffabschluß seine Leibessubstanz aufzubauen, nur dann vollbringen kann, wenn sowohl bestimmte energetische als auch chemische Vorbedingungen erfüllt sind; er muß zu diesem Zweck erstens eine ausgiebige Energiequelle, zweitens aber einen vorgebildeten Baustein verfügbar haben, in dem er unter anderem die Stickstoff-Kohlenstoffverbindung bereits vollzogen vorfindet. Damit wollen wir nicht sagen, daß diese Substanzen direkt unverändert zum Aufbau verwendet werden müssen, aber jedenfalls kann sich das Bakterium, wenn dies unmöglich ist, daraus leicht einen als Ausgangspunkt seiner Synthesen geeigneten Körper schaffen. Ob eine Verbindung für diesen Zweck paßt oder nicht, läßt sich aus ihrer chemischen Konstitution oder ihrem Energiegehalt nicht ablesen. Das Einzige, was wir in dieser Beziehung sagen können, ist, daß der Paratyphus B-Bazillus unter den gewählten Verhältnissen bei anaërobem Wachstum die Bindung von Stickstoff an Kohlenstoff nicht mehr selbsttätig vollbringen kann. Wie schwierig es sein wird, allgemeine Beziehungen zwischen chemischer Struktur und Nährfähigkeit für Bakterien aufzufinden, läßt sich aus diesen Versuchen ersehen; denn es zeigt sich, daß eine an und für sich nachgewiesenermaßen nährfähige Substanz, wie z. B. der Traubenzucker, unter speziellen Verhältnissen, wie z. B. der Anaërobie, erst dann benützt werden kann, wenn noch ein anderer Stoff mit ganz bestimmten Eigenschaften, nämlich eine organische Stickstoffverbindung, gleichzeitig vorhanden ist.

II. Die Bedingungen anaëroben Wachstums für die Ammoniak nicht assimilierenden Stämme von Typhus- und Shiga-Kruse-Dysenteriebazillen und für Paratyphus A-Bakterien¹⁾.

Wir vergegenwärtigen uns, daß diese Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Dysenteriebazillen in Milchsäure-Ammoniaknährboden auch bei Sauerstoffgegenwart nicht wachsen, ebensowenig nach Zusatz der einzelnen Aminosäuren, mit Ausnahme des Tryptophans, das bei allen 3 genannten Bakterien als Zusatz zum Milchsäure-Ammoniaknährboden, aber nicht als Ersatz des Ammoniumlaktates aërobes Wachstum ermöglicht²⁾. In einem solchen tryptophanhaltigen Nährboden, der also 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Ammoniumlaktat, 0,5 Proz. Tryptophan enthält, ist aber anaërobes Wachstum dieser Bakterien ausgeschlossen. Also auch Typhus-, Paratyphus A-, und Shiga-Kruse-Bazillen zeigen den Verlust ihrer Fähigkeit, ohne Sauerstoff zu wachsen, sobald ihr Stoffwechsel sich auf aus-

1) Ueber die besonderen Ernährungsbedingungen der Ammoniak assimilierenden Typhus- und Shiga-Kruse-Stämme werden wir später berichten.

2) Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 86. 1921. Heft 3.

giebigere Synthesen bei knappen Energievorräten einstellen muß. Es fragt sich nun, ob der Zusatz eines Kohlehydrates zu dem Tryptophan den Sauerstoff entbehrlich macht. Die diesbezügliche Prüfung der übrigen Aminosäuren erübrigt sich von selbst, da sie ja diesen Stämmen nicht einmal mit Traubenzucker zusammen aërobes Wachstum gestatten. Es zeigt sich nun, daß ein Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker zu dem tryptophanhaltigen Milchsäure-Ammoniaknährboden für alle drei Bakterienarten ein Wachstum ohne Sauerstoff ermöglicht.

Dabei müssen wir betonen, daß dies alles nur für die von uns gewählten Zusammensetzungen der Nährböden bewiesen ist. Deshalb haben wir auch die Nährlösungen jedesmal nach Qualität und Quantität genau angegeben. Diese Versuche wurden mit je einem Stamme jeder Bakterienart ausgeführt, weil uns von den kostbaren, dazu nötigen Aminosäuren nur relativ sehr geringe Mengen zur Verfügung standen.

In diesem Zusammenhang wollen wir es nicht unterlassen, daran zu erinnern, daß die von uns geprüften pathogenen grampositiven Bazillen (Milzbrand, Diphtheriebazillen) in den besprochenen chemisch definierten Nährböden nicht zum Wachstum zu bringen sind, einerlei, ob sie Traubenzucker zugesetzt erhielten oder nicht. Sie vermögen nicht einmal bei reichlichster Sauerstoffzufuhr in den Nährböden zu wachsen, in denen Bakterien wie Typhus- und Shiga-Kruse-Bazillen sich anaërob zu vermehren vermögen.

Wir sehen also, daß Typhus-, Paratyphus A- und Shiga-Kruse-Bazillen analog den Verhältnissen beim Paratyphus B-Bazillus zu anaëroben Wachstum zwei Stoffe, das Tryptophan und den Traubenzucker gleichzeitig brauchen, von denen jeder, einzeln dem Milchsäure-Ammoniaknährboden zugesetzt, entweder überhaupt kein Wachstum (Traubenzucker) oder nur ein aërobes ermöglicht (Tryptophan). Auch hier müssen wieder 2 Stoffe zusammentreffen, von denen der eine als ein vorgebildeter Baustein — als Nährstoff — der andere als Energiequelle — als Betriebs-

Stickstoffquellen	Kohlenstoffquellen	Paratyphus B-Bazillus		Typhus-, Paratyphus A-, Shiga-Kruse-Baz.)	
		aërob	an-aërob	aërob	an-aërob
Ammonium	Milchsäure	+	0	0	0
„	„ und Traubenzucker	+	0	0	0
	Glykokoll	0	0	0	0
Glykokoll	Milchsäure	+	0	0	0
Ammonium und Glykokoll	„ und Traubenzucker	+	0	0	0
	Alanin	+	0	0	0
Alanin	Milchsäure	+	0	0	0
Ammonium und Alanin	„ und Traubenzucker	+	0	0	0
	Leucin	0	0	0	0
Leucin	Milchsäure	+	0	0	0
Ammonium und Leucin	„ und Traubenzucker	+	0	0	0
	Asparaginsäure	+	0	0	0
Asparaginsäure	Milchsäure	+	0	0	0
Ammonium u. Asparaginsäure	„ und Traubenzucker	+	0 ²⁾	0	0

1) Ammoniak nicht assimilierende Stämme.

2) Anaërobes Wachstum selten erfolgt (s. Text).

Stickstoffquellen	Kohlenstoffquellen	Paratyphus B-Bazillus		Typhus-, Paratyphus A-, Shiga-Kruse-Baz. 1)	
		aërob	an-aërob	aërob	an-aërob
	Tyrosin	0	0	0	0
Tyrosin	Milchsäure	+	0	0	0
Ammonium und Tyrosin	„ und Traubenzucker	+	0	0	0
	Tryptophan	+	0	0	0
Tryptophan	Milchsäure	+	0	+	0
Ammonium und Tryptophan	„ und Traubenzucker	+	+	+	+

stoff — anzusprechen sein dürfte. Dabei ist nicht zu übersehen, daß Typhus- und Shiga-Kruse-Bazillen aus der Traubenzuckerspaltung weniger Energie zu gewinnen vermögen als der Paratyphus A-Bazillus, der ja das Kohlehydrat bis zur Kohlensäure spalten kann. Auch hieraus ersehen wir, daß nicht allein der Energieumsatz für das Zustandekommen der Anaërobiöse maßgebend ist.

Die vorstehende Tabelle faßt das Wesentlichste der besprochenen Versuche mit Paratyphus B- und Paratyphus A-Bazillen und mit den Ammoniak nicht assimilierenden Stämmen von Typhus- und Shiga-Kruse-Bazillen zusammen.

Ueberblicken wir an Hand der vorstehenden Tabelle die mit den verschiedenen Bakterienarten durchgeführten Versuche, so konstatieren wir, daß der unter aëroben Verhältnissen so außerordentlich anspruchslose Paratyphus B-Bazillus und die viel anspruchsvolleren Paratyphus A-Bazillen und die Ammoniak nicht assimilierenden Stämme von Typhusbazillen ganz ähnliche Ernährungsverhältnisse für anaërobes Gedeihen benötigten. Unter aëroben Bedingungen sind Paratyphus B- einerseits, Paratyphus A- und diese Typhusbazillen andererseits scharf geschieden, indem die ersteren selbsttätig Stickstoff an Kohlenstoff zu binden vermögen, die letzteren fertige Stickstoff-Kohlenstoffverbindungen geliefert bekommen müssen. Unter anaëroben Verhältnissen aber kommen sich diese beiden Gruppen von Bakterien sehr nahe, beide brauchen gleichzeitig eine Aminosäure und ein Kohlehydrat, um ohne Sauerstoff leben zu können.

Will man z. B. Paratyphus A- und B-Bazillen durch ihre ernährungsphysiologischen Eigenschaften unterscheiden, so eignet sich demnach zu diesem Zwecke ihre Züchtung unter anaëroben Verhältnissen nicht. Es ist nicht ratsam, zur Differenzierung dieser Arten solche Nährböden zu wählen, in denen sie sowohl aërob als anaërob gedeihen können. Denn bei anaërober Züchtung sind ihre Ernährungsbedürfnisse überhaupt nur sehr wenig verschieden, und das aërobe Wachstum kann in diesen Anaërobiöse gestattenden Nährboden keinen Aufschluß über ihre differenten synthetischen Fähigkeiten geben. Unsere üblichen Nährböden sind nun sehr kompliziert zusammengesetzt, weil sie zur Züchtung möglichst vieler Bakterienarten dienen, und gleichzeitig ein Wachstum unter anaëroben Verhältnissen, z. B. zur Prüfung der Gärfähigkeit der Keime in hohen Agarschichten, gestatten sollen. Darin können

1) Ammoniak nicht assimilierende Stämme.

also tatsächlich verschiedene synthetische Fähigkeiten der Arten nicht zum Ausdruck kommen. Dadurch erklärt es sich, daß Bakterienarten, wie Paratyphus A- und B-Bazillen in den üblichen Bouillonnährböden ein so ähnliches Verhalten zeigen, während sie doch in bezug auf ihre Stickstoffassimilation verschieden sind.

III. Schein-Anaërobiose.

Der streng aërobe *Pyocyanus* vermag bekanntlich dadurch ohne Luftsauerstoff zu wachsen, daß er befähigt ist, Nitrat zu reduzieren und sich so Sauerstoff zu verschaffen. Wenn er in einer Fleischbouillon-Agar-Schüttelkur, der 0,5 Proz. Natriumnitrat zugesetzt ist, in der Tiefe des Agars wächst und durch Reduktion des Nitrats gasförmigen Stickstoff frei macht und so den Agar zerreißt, so könnte man versucht sein, dies als Anaërobiose zu deuten und zu bezeichnen. Hier haben wir aber einen ganz andersartigen Vorgang vor uns. Hier dreht es sich nicht um die Frage, wie anstatt der Energiebeschaffung durch Oxydationen mittels freien Sauerstoffes andere zum Leben notwendige Energiequellen erschlossen werden können, sondern es handelt sich darum, anderswoher als aus der Luft Sauerstoff zu gewinnen. Diesen Vorgang der selbsttätigen Sauerstoffgewinnung unter anaëroben Verhältnissen wollen wir als Schein-Anaërobiose bezeichnen, weil hier nur scheinbar wegen des Luftabschlusses der Sauerstoff fehlt. Trotzdem aber das Wesen dieses Prozesses eine Sauerstoffgewinnung, nicht an Stelle davon Energiegewinnung ist, spielt doch die Energiefrage sehr wesentlich herein. Wir wollen deshalb den Ablauf des Stoffwechsels bei echter fakultativer Anaërobiose und Schein-Anaërobiose miteinander vergleichen. Die Fragestellung lautet: Ist der *Pyocyanus* in allen Nährböden zu seiner Schein-Anaërobiose befähigt? Oder ist vielleicht auch seine Fähigkeit, Nitrat unter Luftabschluß zu reduzieren, in ähnlichem Sinne von seinem sonstigen Stoffwechsel abhängig, wie es die Entbehrlichkeit des Sauerstoffes für Paratyphus-, Typhusbazillen und wahrscheinlich für alle Bakterienarten ist.

Es ist bekannt, daß die Reduktion des Nitrates für den *Pyocyanus* mit einem Energieaufwand verknüpft ist. Bei der Besprechung seiner Ernährungsphysiologie haben wir dementsprechend festgestellt, daß er unter aëroben Verhältnissen mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle nur dann leben kann, wenn er gleichzeitig einen oxydierbaren Körper, in unseren Versuchen Milchsäure oder Traubenzucker, zur Verfügung hat; mit Nitrat und Karbonat vermochte unser Stamm nicht zu leben, wogegen er sich mit Ammoniak und Karbonat vermehren konnte. Es stellte sich nun heraus, daß er mit Milchsäure und Nitrat nur aërob zu wachsen vermag; mit Hilfe des Luftsauerstoffes greift er die Milchsäure an und gewinnt daraus die Energie, um das Nitrat zu reduzieren und so seinen Stickstoffbedarf zu befriedigen. Er kann aber nicht gleichzeitig aus dieser Nitratreduktion seinen Sauerstoffbedarf decken. Fehlt ihm der Luftsauerstoff, so kann er sich nicht mehr aus Milchsäureoxydation die Möglichkeit der Nitratreduktion verschaffen; in Schüttelkulturen mit 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Natriumnitrat und 0,6 Proz. Natriumlaktat wächst er nur an der Oberfläche, aber nicht in der Tiefe. Was muß man diesem Nährboden zusetzen, damit er unter Sauerstoffabschluß die Energie erfordernde Nitratreduktion vornehmen kann? Wir haben zunächst Traubenzucker zu-

gesetzt. In Uebereinstimmung mit älteren Autoren ließ sich, wie früher schon besprochen wurde, zeigen, daß der *Pyocyaneus* unter aëroben Verhältnissen Traubenzucker unter Säurebildung zu spalten vermag. Aber auch bei Zusatz von 1 Proz. dieses Kohlehydrates kann er sich unter Luftabschluß nicht aus dem Nitrat den zu seinem Leben nötigen Sauerstoff und Stickstoff verschaffen. Immerhin zeigt das Wachstum in ziemlich breiter, bis über 0,5 cm in die Tiefe reichender Schicht einer Schüttelkultur, daß der Gehalt des Nährbodens an Nitrat und Traubenzucker die zum Leben notwendige Sauerstoffspannung gegenüber den Verhältnissen des Milchsäure-Ammoniaknährbodens deutlich herabsetzt. Dabei haben wir in solchen Schüttelkulturen eine besondere Beobachtung gemacht:

In dieser aëroben Wachstumszone reduziert der *Pyocyaneus* das Nitrat, da es ja die einzige Stickstoffquelle ist. Dabei kommt es meist in 2—4 Tagen durch die Bildung freien Stickstoffes zu einem kleineren oder größeren Spalt in dieser etwa $\frac{1}{2}$ cm hohen obersten Schicht. Dieser pflegt mit dem einen Ende die Agaroberfläche zu erreichen. Mit dem anderen aber reicht er über die schmale Wachstumszone in die Tiefe hinunter. So kann jetzt der Luftsauerstoff durch den Spalt ein Stück weit in die Agarsäule eindringen, und ihm folgt entlang den Wänden des Spaltes eine Vermehrung der ja überall in der Schüttelkultur verteilten *Pyocyaneus*-Keime. An der tiefsten Stelle des Spaltes spielt sich nun dasselbe Schauspiel wie vorher an der Agaroberfläche ab. Wieder diffundiert der Luftsauerstoff vom Grunde des Spaltes aus ein Stück weit in die Agarsäule hinein, dadurch können sich die dort liegenden Keime vermehren und müssen dabei das Nitrat reduzieren. Wieder wird gasförmiger Stickstoff frei, und es kommt zu einem neuen Spalt, der in einem Winkel zum ersten diesen mit dem oberen Ende berührt, mit dem unteren wiederum tiefer in den Agar hineinragt, als das Wachstum derjenigen Bakterien gereicht hat, die ihn durch ihre Nitratreduktion gebildet haben. Nun wiederholt sich das Spiel von neuem. So sprengt sich gewissermaßen der *Pyocyaneus* durch Gasbildung den Weg in die Tiefe und klettert dann scheinbar in der Schicht schrittweise weiter hinunter. Zu jeder solchen Sprengung, deren natürlich gleichzeitig von den Seiten der Spalten aus mehrere erfolgen können, bedarf es einer Reihe von Tagen. Am 10.—14. Tag bietet so die Kultur ein Bild, das über den Weg, wie es zustande gekommen ist, nichts mehr erkennen läßt. Der Anblick kann jetzt nicht mehr entscheiden, ob das Wachstum sich langsam von oben nach unten dem in den Spalten eindringenden Luftsauerstoff folgend ausgebreitet hat, oder ob es wie z. B. in einem gewöhnlichen Bouillon-Agar mit Nitratzusatz unter Luftabschluß zu gleichzeitiger Vermehrung der Keime in der ganzen Agarschicht und zu gleichzeitiger Zerreißen des Agars gekommen ist. Nur die fortlaufende Beobachtung kann über den wahren Sachverhalt Aufklärung geben. Eine solche „verdeckte Aërobiöse“ ist auch in einem Milchsäure-Nitratnährboden, der keinen Traubenzucker enthält, zu beobachten.

Da der *Pyocyaneus* also in einem Milchsäure-Nitratnährboden mit oder ohne Traubenzuckerzusatz bei Sauerstoffabschluß sich nicht gleichzeitig des Nitratsauerstoffes und des Nitratstickstoffes bemächtigen kann, haben wir Ammoniak zugesetzt, damit er daraus seinen Stickstoffbedarf decken könne, und er aus dem Nitrat nur Sauerstoff zu gewinnen brauche. Aber auch in einem solchen Nährboden, der also 0,5 Proz. Kochsalz, 0,2 Proz. Kaliumbiphosphat, 0,6 Proz. Natriumnitrat und 0,6 Proz. Ammoniumlaktat enthält, ist weder mit noch ohne Traubenzuckerzusatz unter Sauerstoffabschluß Vermehrung möglich. Wir haben daraufhin höhere Stickstoff-Kohlenstoffverbindungen versucht und die Asparaginsäure dazu gewählt. Bei Zusatz von 1 Proz. dieser Aminosäure zu obigem Nährboden ohne Traubenzucker gelingt es nun dem *Pyocyaneus*, in der Tiefe einer Schüttelkultur das Nitrat zu reduzieren und sich auf diesem Wege den Sauerstoff, ohne den er nicht leben kann, zu verschaffen. Die gewählte Aminosäure bedingte, dem Milchsäure-Nitrat-Ammoniaknährboden zugesetzt, das Zustandekommen der Schein-Anaërobiöse. Hingegen genügte sie, wie entsprechende Versuche zeigten, dazu nicht, wenn in diesem Nährboden das Nitrat fehlte.

Rückblickend betrachten wir zunächst die Analogie zwischen echter fakultativer Anaërobie beim Paratyphus B-Bazillus und der Schein-Anaërobie beim *Pyocyaneus*, wie sie sich aus unseren Versuchen ergibt. Darüber könnte man sich folgende Vorstellung bilden:

Bei beiden Vorgängen sind durch den Wegfall der Oxydationen mittels Luftsauerstoffs zunächst kompliziertere Nährstoffe zum Leben notwendig. Beide Male konnte in unseren Versuchen dazu eine höhere stickstoffhaltige Verbindung, eine Aminosäure, dienen, während aërobes Wachstum ohne eine solche Stickstoff-Kohlenstoffverbindung vor sich gehen kann. Es bleibt allerdings unentschieden, ob andere organische Stickstoffverbindungen oder ganz andersartige Körper diese Rolle der Aminosäure übernehmen können. Beide Male genügte aber diese organische Stickstoffverbindung nicht zur Vermehrung unter Sauerstoffabschluß, sondern es mußte noch ein zweiter Körper gleichzeitig vorhanden sein: Der Paratyphus B-Bazillus brauchte dazu noch Traubenzucker, der *Pyocyaneus* Nitrat. Hiermit hört die Analogie auf. Der Traubenzucker entspricht nur scheinbar dem Nitrat. Denn die beiden Stoffe dienen ganz verschiedenen Zwecken. Der Paratyphus B-Bazillus greift den Traubenzucker an, gewinnt daraus Energie und verwendet diese direkt zum Leben. Der *Pyocyaneus* greift das Nitrat an, muß dazu Energie aufwenden und gewinnt daraus den ihm unentbehrlichen Sauerstoff. Diesen Sauerstoff benützt er zu Oxydationen und verschafft sich erst dadurch die zum Leben nötige Energie. Aber sowohl Paratyphus B- wie *Pyocyaneus*-Bazillen gewinnen ohne freien Sauerstoff, der eine durch Spaltungen, der andere durch Oxydationen, nicht so viel Energie, daß sie alle diejenigen Synthesen vollbringen können, zu denen sie bei Luftzutritt fähig sind. Deshalb müssen beide Bakterienarten zum Leben ohne Luftsauerstoff solche Nährstoffe fertig geliefert bekommen, deren Bildung ihnen besondere Schwierigkeiten macht. In unseren Versuchen war dies in beiden Fällen die Herstellung der organischen Stickstoffbindung. Darin liegt eine Gemeinsamkeit zwischen fakultativer Anaërobie und der Schein-Anaërobie. Es muß durch eingehendere Versuche geprüft werden, ob die entwickelte Vorstellung in allen ihren Einzelheiten richtig ist. Sicher sind beide Prozesse in ihrem Wesen grundverschieden.

Wir haben so die besonderen ernährungsphysiologischen Bedingungen kennen gelernt, welche dem bei Sauerstoffgegenwart anspruchslosen Paratyphus B-Bazillus und den bei Sauerstoffgegenwart anspruchsvolleren Paratyphus A-Bazillen und den Ammoniak nicht assimilierenden Stämmen von Typhus- und Shiga-Kruse-Bazillen Anaërobie gestatten.

Außerdem haben wir untersucht, wie sich die Schein-Anaërobie des *Bazillus pyocyaneus* zu der fakultativen Anaërobie des Paratyphus B-Bazillus verhält.

So ist es möglich gewesen, unter bekannten, übersichtlichen chemischen Verhältnissen Einblicke in Stoffwechselforgänge einiger pathogener Bakterienarten zu tun, die in den gewöhnlichen Nährböden unbekannter und schwankender Zusammensetzung nicht gewonnen werden können.

Nachdruck verboten.

Histologische Veränderungen in den Organen an experimenteller Trypanosomiasis verendeter Tiere¹⁾.

Von **Dr. Mario Battaglia**,

Privatdozenten der pathol. Anatomie u. Histologie
an der Kgl. Universität Neapel.

Bei Untersuchung der histologischen Veränderungen in den Organen an experimenteller Trypanosomiasis verendeter Tiere habe ich neben dem früher Veröffentlichten (1. Hepatitis bei experimenteller Trypanosomiasis. Centralbl. f. Bakt. Bd. 46. 1908. H. 4. 2. Einige Untersuchungen über das Nagana-Trypanosoma. Ebenda. Bd. 47. 1908. H. 3. 3. Einige anatomo-pathologische Läsionen bei der Nagana. Ebenda. Bd. 67. 1912. H. 3. 4. Einige durch Trypanosomiasis dromedarii erzeugte Läsionen; Ebenda. Bd. 71. 1913. H. 2/3. 5. Biologische Differentialcharaktere für einige Trypanosomen. Ebenda. Bd. 74. 1914. H. 7) bei den durch Trypanosoma vespertilionis, Tryp. Lewisi, Tryp. Brucei, Tryp. dromedarii, Tryp. gambiense verendeten Tieren in Leber, Milz, Herz, Nieren, Respirationsapparat, Magendarmapparat, Speicheldrüsen, Hoden, Hirn, Rückenmark und periphen Nerven dieselben histologischen Läsionen angetroffen. Somit gewinnt das biologische Differentialkriterium zwischen diesen einzelnen Trypanosomen, das von mir nach wiederholten Versuchen aufgestellt und veröffentlicht wurde, große Bedeutung. Ich will es deshalb hier kurz anführen:

„Das Trypanosoma vespertilionis ist immer pathogen beim Kaninchen und ruft keine Keratitis hervor.

„Das Trypanosoma Lewisi ist nicht immer pathogen, noch ruft es Keratitis oder ulzerierendes Granulom an den Geschlechtsorganen hervor.

„Das Trypanosoma Brucei ist stets pathogen beim Kaninchen und ruft häufig progressive Keratitis hervor, die sämtliche Häute des Auges ergreift, und an den Geschlechtsorganen ein ulzerierendes, hartes, knorpeliges Granulom.

„Das Trypanosoma dromedarii (Abart des Trypanosoma Evansi) ist stets beim Kaninchen pathogen, ruft häufig Keratitis hervor, die zur Resorption neigt und nie progressiv ist, erzeugt ein ulzerierendes Granulom an den Geschlechtsorganen, das aber nicht so hart und knorpelig ist, wie das durch die Einimpfung des Trypanosoma Brucei hier erzeugte.

„Das Trypanosoma gambiense ruft selten Keratitis beim Kaninchen, für das es immer pathogen ist, hervor. Oertlich in die Geschlechtsorgane eingeimpft, ruft es nur ein Oedem hervor, kein Granulom.“ —

Bei den einzelnen an experimenteller Trypanosomiasis verendeten Tieren findet man in ihren einzelnen Organen fast dieselbe makroskopische und histologische Veränderung.

1) Ins Deutsche übertragen von Dr. Carl Muth.

Da ich die Hepatitis bei experimenteller Trypanosomiasis schon beschrieben hatte, so setzte ich, sobald mich meine Berufsarbeiten frei ließen, die Untersuchung der bereits zweckmäßig konservierten und für die histologische Untersuchung hergerichteten Organe fort und ich werde hier beschreiben:

1) Die Splenitis. Die Milz der Hunde, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, die an Trypanosomiasis vespertilionis, Tryp. Lewisi, Tryp. dromedarii, Tryp. Brucei oder Tryp. gambiense verendet waren, zeigt glatte und glänzende Peritonealbekleidung, die Kapsel jedoch ist verdickt und an den Schnitten sind die intraparenchymalen Bindegewebszüge sichtbar. An den mikroskopischen Schnitten sind sowohl die Kapsel wie diese intraparenchymalen Züge verdickt und zeigen sich durch Lymphzellen mit basophilen Körnern infiltriert. Die ganze Pulpa ist reich an körnigen, lymphoiden Elementen mit basophilen Körnern und das Reticulum zeigt sich verdickt und durch embryonale Bindegewebszellen infiltriert. Das Reticulum der Malpighischen Körperchen ist stark verdickt, die arteriellen und venösen Gefäße und die lakunären Räume sind infarziert mit Cruorocyten und ihre Wände sind verdickt und durch lymphoide Elemente mit basophilen Körnern infiltriert. Die Verdickung ist am ausgesprochensten in der Intima der Arterien und Venen, und die Endothelzellen dieser Wände zeigen sich abgeschiefert; ihr Kern befindet sich in Pyknose.

2) Das subendokardiale und subepikardiale Gewebe ist durch Lymphocyten mit basophilen Granulis infiltriert. Die Endothelzellen sowohl des Endokards wie des Epikards sind im allgemeinen gut erhalten, zeigen aber hier und da Stellen, wo sie abgeschiefert sind und ihr Kern sich in Pyknose befindet. Die Muskelbündel und -fasern sind intakt, aber weiter auseinander gedrängt durch glattes Bindegewebe, das infiltriert ist durch lymphoide Zellen mit denselben Eigenschaften wie oben beschrieben. Diese lymphoide Infiltration ist am ausgeprägtesten an den Klappen, sowohl an den atrioventikulären wie an denen der großen Gefäße, und um die arteriellen und venösen Wände der intrakardialen Gefäße, denn an den mikroskopischen Schnitten zeigen sie nicht nur alle ihre Wände verdickt und infiltriert, sondern lassen auch erkennen, daß ihre Intima stark verdickt und das Gefäßendothel abgeschiefert und pyknotisch ist.

3) Die Nieren weisen die makroskopischen Merkmale einer bedeutenden Hyperämie auf, und an den mikroskopischen Schnitten beobachtet man lymphoide Infiltrationen sowohl in der Rindensubstanz als in der Marksubstanz. Diese Infiltration ist ausgebreitet in dem interkanalikulären und intervaskulären Bindegewebe und charakterisiert durch kleine lymphoide Zellen mit basophilen Granulis. Die B o w m a n s c h e n Kapseln sind in die Augen fallend mit abgeschiefertem und nekrotischen Endothelzellen. Die Malpighischen Glomeruli zeigen verdickte Gefäße und sind ganz infiltriert durch die oben beschriebenen Elemente. Infiltriert und verdickt sind die Gefäßwände und die Wände der Ausführungskanälchen, bei denen sämtlich die Epithelzellen pyknotischen Kern und stark körniges Protoplasma aufweisen und das Lumen häufig voll von körnigen epithelialen und hyalinen Zylindern ist.

4) Sämtliche Speicheldrüsen, auch die kleinen sublingualen, sind hyperämisch, mit körnigen, lymphoiden Elementen infarziert. Das inter-

lobuläre Bindegewebe ist verdickt und das glanduläre und tubuläre Epithel weist abgeschieferte körnige und pyknotische Zellen auf.

5) Das Pankreas zeigt dieselben Merkmale wie die Speicheldrüsen, und die Langerhansschen Inseln lassen dieselbe kleinzellige Infiltration beobachten. Die Epithelzellen weisen ausgeprägt körniges Protoplasma und einen stark pyknotischen Kern auf.

6) Der ganze Magendarmapparat von der Zunge bis zum Rectum zeigt eine erhebliche Hyperämie mit kleinzelliger Infiltration, bestehend aus basophilen körnigen Lymphoidzellen. Besonders ausgeprägt ist diese Infiltration in der Submucosa.

7) Dieselbe Hyperämie mit Infiltration des interlobulären und subpleuralen Bindegewebes durch lymphoide Elemente beobachtet man bei der histologischen Untersuchung des ganzen Respirationsapparates.

8) Der Hoden zeigt die Albuginea verdickt und mit lymphoiden Elementen infiltriert und diese Infiltration folgt den inter- und perikanalikulären Zügen. Bei sämtlichen Gefäßen sind die Wände verdickt und infiltriert, namentlich die Intima. Die endokanalikulären Zellen sind normal in der Struktur und reagieren normal auf die Färbung. Die Spermatogenese aber ist stark gestört, so daß zwar Spermatoblasten und Spermiden beobachtet werden, die karyokinetischen Phasen aber in diesen Zellen selten sind; die Sertolischen Zellen sind arm an Spermatozoen, mit Lymphocyten infiltriert und befinden sich in ausgeprägter hyaliner Entartung.

9) Sowohl die Dura wie die Pia des Gehirns und Rückenmarkes sind stark hyperämisch und sämtliche Gefäße verdickt und mit Lymphoidzellen infiltriert. Diese Infiltration setzt sich in die Kapillaren der Nervensubstanz fort. Sämtliche Gefäße, besonders die arteriellen, zeigen die Intima verdickt. Sehr in die Augen fallend ist der Raum um die Nervenzellen, bei denen sich die Kerne in Chromatolyse befinden und die Nisslischen Granula wenig färbbar sind. Keinerlei Veränderung beobachtet man an den Myelinfasern und an den Achsenzylindern auch an den peripheren Nerven, deren Perineurium und Endoneurium sich jedoch verdickt und mit den oben beschriebenen lymphoiden Elementen infiltriert zeigt.

Wie man aus den Untersuchungen an den einzelnen Organen der an experimenteller Trypanosomiasis verendeten Tiere ersieht, tritt die Infektion in allen Organen auf und verhältnismäßig kein Merkmal ist für das *Trypanosoma* charakteristisch, das die Infektion und den Tod hervorrief. Aus diesem Grunde gewinnt das oben von mir angeführte biologische Kriterium die größte Bedeutung für die Bestimmung der *Trypanosoma*-Art.

Neapel, November 1920.

Nachdruck verboten.

Die Zersetzung von Blut und Blutfarbstoff durch Cholera- und Tor-Vibrionen.

[Aus dem Institut für tropische Hygiene in Amsterdam, Abteilung des Kolonial-Instituts.]

Von Prof. Dr. J. Snapper, Direktor der Med. Klinik in Amsterdam.

Auf Grund von Untersuchungen über die Zersetzung von Blutfarbstoff im Darmkanal habe ich untersucht, welche Zersetzungsprodukte entstehen, wenn Bakterien in blutenthaltenden Medien kultiviert werden. Hierbei stellte sich heraus, daß es bestimmte Bakterien sind, welche, auf eine Blutagarplatte geimpft, imstande sind, den Blutfarbstoff umzusetzen, so daß rund um die Kolonie ein nicht oder nur wenig gefärbter Ring entsteht. Am geeignetsten für eine derartige Untersuchung erschienen mir bestimmte Vibrionen und besonders die Choleravibrionen. Gerade bei der Cholera ist nämlich die Kreisbildung genau studiert worden, weil diese Eigenschaft den Bakteriologen als Hilfsmittel bei der Differentialdiagnostik der Choleravibrionen hinsichtlich verwandter Vibrionen wichtige Dienste leistet. So hat Van Loghem¹⁾ mit Nachdruck darauf hingewiesen, wie auf einer Blutagarplatte rings um eine Cholerastrichkultur ein breiter, vollkommen durchsichtiger Ring entsteht, in dem der Blutfarbstoff ganz verschwunden ist, so daß spektroskopisch keine Spur vom Oxyhämoglobin- oder Hämoglobinspektrum mehr sichtbar ist. Dieser eigenartige Verdauungsprozeß des Blutfarbstoffes wurde durch van Loghem „Hämodigestion“ benannt. Die Zersetzungsprodukte, die bei dieser Verdauung des Blutfarbstoffes entstehen, waren aber nicht bekannt.

Die Ausführung dieser Versuche wird einerseits erschwert durch die Tatsache, daß, während alle frisch abgeschiedenen Cholerastämme einen deutlichen Kreis bilden, die alten Stämme, die während langer Zeit im Laboratorium gezüchtet wurden, ihre hämodigestiven Eigenschaften verlieren. Jedoch ist es geglückt, unter 28 Laboratoriumsstämmen 2 Cholerastämme zu finden, die noch deutliche Höfe bildeten.

Die folgenden Versuche wurden alle mit Ziegenblutagarplatten, d. h. Agarplatten, die mit ungefähr 10 Proz. ungewaschenem Ziegenblut vermischt waren, angestellt. Wird eine „hämodigestive“ Cholera in Strichkultur auf eine derartige Blutagarplatte geimpft, dann beobachtet man nach 24 Std. ein deutliches, strichförmiges Wachstum mit einem grünen Glanz, ohne daß aber gewöhnlich von Kreisbildung etwas zu bemerken ist. Erst nach 2mal 24 Std. war bei meinen Stämmen dieser Kreis deutlich entwickelt²⁾. Der Hof ist dann sofort sehr breit; wenn die Strichkultur ungefähr 3 mm breit ist, sieht man an jeder Seite einen Hof von ungefähr 5 mm. Auffallend ist die Helligkeit des Hofes, der gänzlich durchsichtig ist und denselben lichtgrünen Schein hat, wie die

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57, 67 u. 70.

2) Vgl. van Loghems Lumièrephotographien. I. c. p. Bd. 70. H. 1/2.

Kolonie selbst und der in den folgenden Tagen noch etwas breiter wird. Jetzt verändert sich sowohl die Farbe des Hofes als die der Kolonie. Der Hof bekommt einen gelblichen Schein, während die Kolonie braun wird. Weder im Hof noch in der Kolonie (letzteres bis auf eine Ausnahme, worüber nachher mehr) ist spektroskopisch etwas von Absorptionsstreifen wahrzunehmen. Bei der spektroskopischen Untersuchung erhält man, wenn keine besonderen Reaktionen angewandt werden, den Eindruck, als ob der Blutfarbstoff spurlos verschwunden sei.

Nähere Untersuchung lehrt jedoch nach 2mal 24 Std., wenn der Hof also noch ganz frisch ist, daß durch Hinzufügen von starker Salzsäure die Blutplatte ebenso wie die Kultur graubraun, der Hof aber lichtrosa wird. In der Blutagarplatte entsteht ein flaves, eigentlich nicht mit Sicherheit zu erkennendes Spektrum von saurem Hämatin. Nur im Grünen ist der Streifen angedeutet, doch würde man mit Sicherheit hieraufhin keine Diagnose wagen dürfen. Auch in dem Hof und in der Kultur ist eine Andeutung dieses Streifens zu sehen, doch ebenfalls nicht scharf genug für eine Diagnose.

Bei Hinzufügen nur von Pyridin wird das Oxyhämoglobinspektrum der Blutagarplatte undeutlich; der Hof und die Kultur bekommen einen hellrosa Schein, doch ein Spektrum entsteht nicht. Fügt man jedoch gleichzeitig Pyridin und Schwefelammonium hinzu, dann ändert sich das ganze Bild und der Hof nimmt eine lebhaft rosa Farbe an und die Kolonie wird rot. In der ganzen Platte entsteht das (Pyridin)-Hämochromogenspektrum, ein kräftiger Streifen von λ 560— λ 550 und ein schwächerer Streifen λ 540— λ 530.

Auf zwei Eigentümlichkeiten hat man sogleich zu achten: 1) ist das Hämochromogenspektrum, welches man in dem Hof sieht, dort an Ort und Stelle entstanden; es kommt nicht durch das Hämochromogen zustande, welches in der Blutagarplatte sich bildet und mit den Reagentien über den Hof fließt. Denn wenn man mit der Platinschlinge vorsichtig einen kleinen Tropfen Pyridin und einen ebensolchen von Schwefelammonium auf den Hof legt, ohne daß die Reagentien die Kolonie oder den Rest der Platte berühren, so entsteht nur an Stelle des Tropfens, d. h. ausschließlich in dem Hof, das Hämochromogenspektrum, als Beweis, daß im Hofe selbst die Blutfarbstoffderivate vorhanden sind.

2) besteht auf der frischen Blutagarplatte (48 Std.) kein Unterschied in der Stärke zwischen dem Hämochromogenspektrum, das in der Kolonie, im Hof und in dem Rest der Blutagarplatte durch Hinzufügen von Pyridin und Schwefelammonium entsteht, woraus also folgt, daß auch in dem gänzlich entfärbten und durchsichtigen Hof noch beinahe ebensoviel Blutfarbstoff gefunden wird, wie ursprünglich vor dem Impfen darin vorhanden war, wenn auch in veränderter Form.

Bevor ich zu der Besprechung der Frage übergehe, was diese spektroskopische Reaktion lehrt, sei noch daran erinnert, daß der Blutfarbstoff aus einem eisenhaltigen Kern, dem Hämatin besteht, das an Eiweiß gebunden ist. Wird das Hämatin reduziert, z. B. durch Schwefelammonium, dann entsteht Hämochromogen mit dem soeben genannten 2-streifigen Spektrum. Hinzufügung von Pyridin verstärkt dies Hämochromogenspektrum noch bedeutend. Pyridin und Schwefelammonium zusammen sind jedoch imstande, auch bereits aus Oxyhämoglobin Hämochromogen zu bilden. Entsteht das Hämochromogenspektrum also nur durch Schwefelammonium, dann hat

man es mit Hämatin zu tun; entsteht es aber ausschließlich, wenn außer Schwefelammonium auch Pyridin zugefügt ist, dann war kein Hämatin, jedoch noch ein zusammengesetzterer Körper, möglicherweise noch an Eiweiß gebunden, anwesend. In unserem Falle, also bei der Kreisbildung durch die Choleravibrionen auf der Blutagarplatte, müssen wir also schließen, daß, wo Schwefelammonium und Pyridin zusammen ein Hämochromogenspektrum verursachen, in dem Hof und in der Kolonie Zersetzungsprodukte von Blutfarbstoff vorhanden sind, die höchstens bis zum Hämatin zersetzt sind. Es zeigt sich nun, daß diese Zersetzungsprodukte aus hämatinartigen Körpern bestehen, denn ein vollkommen frisches und gesättigtes Schwefelammonium allein läßt auch bereits in dem Hof und in der Kolonie eine rote Farbe mit deutlichem Hämochromogenspektrum entstehen. Beim Ausführen dieser Reaktion muß man sehr scharf auf die Eigenschaften des Schwefelammoniums achten. Ueberall wo auch der Blutfarbstoff in der Agarplatte verteilt ist, muß das Schwefelammonium eindringen, bevor es reduzieren kann. Dieses, zusammen mit den Eigenschaften des Agars, bewirkt, daß nur vollkommen frisches und gesättigtes Schwefelammonium ein Hämochromogenspektrum entstehen läßt. Ist das Schwefelammonium schon etwas älter und für andere Reaktionen, z. B. zusammen mit Pyridin, noch gut geeignet, dann ist es jedoch gut möglich, daß das Reagens in dem Hof kein Hämochromogenspektrum mehr hervorruft.

Aus dieser Reaktion mit Schwefelammonium allein folgt bereits, daß das Oxyhämoglobin in dem Hof zu Hämatin zersetzt ist. Inzwischen ist diese Reaktion durch die hohen Ansprüche, denen das Schwefelammonium genügen muß, etwas schwierig. Es war darum erwünscht, auch durch eine andere Reaktion die Anwesenheit von Hämatin zu beweisen. Ich wählte hierfür die Reaktion mit Zyankalium, dessen Einfluß auf den Blutfarbstoff bereits seit 1865 bekannt ist¹⁾, wenn auch lange Zeit Meinungsverschiedenheiten über die auf diese Weise entstandenen Produkte²⁾ bestanden. Es hat sich gezeigt, daß Oxyhämoglobin und reduziertes Hämoglobin durch Zyankali erst nach langer Zeit oder durch gleichzeitiges Erwärmen angegriffen werden. Braunes Methämoglobin verändert sich unter dem Einfluß von Zyankali in einen roten Stoff mit einem Spektrum, das dem von reduziertem Hämoglobin gleicht. Dieses Zyanhämoglobin ist eine ziemlich feste Verbindung, die unter anderem durch Schwefelammonium nicht verändert wird³⁾.

Hämatin verändert sich unter dem Einfluß von Zyankali ebenfalls in einen rotgefärbten Körper, das Zyanhämatin, mit einem Spektrum, das mit dem von Zyanhämoglobin übereinstimmt. Dieses Zyanhämatin verändert sich jedoch sehr leicht unter dem Einfluß von Reduktionsmitteln, z. B. verdünntem Schwefelammonium, in Zyanhämochromogen, welches ein Spektrum hat, das, obwohl in vieler Hinsicht übereinstimmend, sich doch sehr gut von dem gewöhnlichen Hämochromogenspektrum unterscheiden läßt. Das Zyanhämochromogenspektrum hat nämlich 2 Streifen, in der Lage ungefähr übereinstimmend mit denen des Hämochromogenspektrums, doch etwas nach rot zu verschoben. Während jedoch der 2. Streifen in dem Hämochromogenspektrum viel schwächer ist als der 1., sind die beiden Streifen in dem Zyanhämochromogenspektrum beide gleich stark⁴⁾. Bringt man nun in den Hof der Cholerakolonie einen kleinen Kristall von Zyankali, so entsteht rings um diesen in dem Hof eine rote Ver-

1) Preyer, Die Blausäure.

2) Szigeti, Vierteljahresschr. f. gerichtl. Med. Bd. 6. Suppl. 1893. S. 9.

3) Kobert, Lehrb. d. Intoxikationen.

4) Grünwald, Centralbl. f. inn. Med. 1907. Nr. 14.

färbung mit einem undeutlichen Spektrum. Sobald hierzu ein Tröpfchen verdünntes Schwefelammonium zugesetzt wird, wird die Farbe lebhaft rot und es erscheint das gerade skizzierte Spektrum des Zyanhämochromogens. Dasselbe gilt von der Cholera-kolonie selbst. Hierdurch wird also aufs neue gezeigt, daß in dem Hof und in der Cholera-kolonie selbst Hämatin entstanden ist.

Jetzt ist auch die grüne Verfärbung des Hofes erklärt: wo die Hofbildung bei saurer Reaktion nicht zustande kommt, muß in dem Hof eine alkalische Reaktion herrschen. In der Tat ist das alkalische Hämatin in dünnen Lagen olivengrün. Das Spektrum von alkalischem Hämatin ist nur in konzentrierten Lösungen sichtbar, so daß man sich also über die Tatsache nicht zu wundern braucht, daß in dem Hof ohne Gebrauch von Reagentien kein Spektrum sichtbar ist. Doch ist unter bestimmten Umständen auch das Spektrum des alkalischen Hämatins selbst sichtbar. Manchmal sieht man nämlich in der „hämodigestiven“ Kultur selbst, also nicht in dem Hof, einen roten Farbstoff entstehen. Dieses Pigment liegt in dem axialen Teil der Kolonie, hauptsächlich an den Endpunkten der Kultur, und wird nur von Zeit zu Zeit, namentlich in älteren Kulturen, gefunden. Stellt man scharf auf den roten Farbstoff ein, so sieht man ein breites Band von λ 590— λ 575 in der Lage ungefähr mit dem 1. Streifen des Oxyhämoglobins übereinstimmend, doch viel schwächer begrenzt. Der 2. Oxyhämoglobinstreifen fehlt jedoch einerseits und an seiner Stelle sieht man manchmal einen schwachen Streifen in dem Rot bei λ 615. Daß hier ein Hämatinspektrum vorhanden sein muß, ergibt sich bei dem Zufügen von Schwefelammonium, wodurch sofort ein kräftiges Hämochromogenspektrum entsteht.

Diese rote Verbindung mit dem deutlichen Streifen in der Nähe der D-Linie ist ein alkalisches Hämatinspektrum; vermischt man 1 ccm Blut mit 20 ccm 15-proz. KOH, und verdünnt man nach einigen Minuten mit Wasser bis auf 100 ccm, so ist in einer dicken Lage dasselbe Spektrum deutlich wahrzunehmen¹⁾. Offenbar entsteht in dem axialen Teil der Kultur unter bestimmten Umständen besonders viel Hämatin, so daß es sich unmittelbar zeigt, und nicht erst, wie in dem Hof, mittels Schwefelammonium in Hämochromogen umgesetzt werden muß.

Wie schon am Anfang dieser Arbeit mitgeteilt ist, sind alle Cholera-bazillen, welche frisch aus dem Stuhl von Cholera-patienten abgesondert wurden, imstande, auf der Blutagarplatte einen Hof zu bilden. Nach dem Fortzüchten auf künstlichen Nährböden in Laboratorien verlieren beinahe alle Cholera-stämme diese Eigenschaft; die ältesten Cholera-stämme bilden auf der Blutagarplatte grüne Strichkulturen, ohne daß von einer Hofbildung die Rede ist. Jedoch kann man beweisen, daß auch diese alten Stämme noch Hämatin, wenn auch nur in bestimmter Menge, bilden können. Tropft man auf eine Blutagarplatte, auf welche alte Cholera-stämme geimpft sind, nach 2mal 24 Std. Schwefel-Ammonium, dann entsteht an der Stelle, wo der Kulturstreifen liegt, ein schwaches, jedoch deutliches Hämochromogenspektrum, ein Beweis dafür, daß in der Kultur hämatinartige Körper entstanden sind.

Die Umgebung der Kulturen zeigt unter diesen Umständen nur das Spektrum des reduzierten Hämoglobins. Rein örtlich hat sich also noch Hämatin gebildet, aber diese Zersetzung des Blutfarbstoffs hat sich auf die Kultur selbst beschränkt und sich nicht, wie es bei den frischen Cholera-stämmen der Fall ist, hofförmig auf der Platte verbreitet.

1) Schumm, Klinische Spektroskopie. 1909. Taf. 3. Fig. 1.

Die echten Cholerabazillen können wohl einen Hof auf der Blutagarplatte bilden, doch verursachen sie in einer Emulsion von Ziegenblutkörperchen keine Hämolyse; sie sind also, wie van Loghem sich ausgedrückt hat, wohl hämodigestiv, doch nicht hämolytisch¹⁾.

Nun gibt es andere Vibrionen, welche sicher mit den Cholerabazillen verwandt sind, die sogenannten Tor-Vibrionen, die auch einen Hof auf der Blutagarplatte machen, aber außerdem in Ziegenblutemulsionen Hämolyse verursachen. Diese Tor-Vibrionen haben also hämolytische Eigenschaften, welche von den „hämodigestiven“ Eigenschaften der Choleravibrionen unterschieden werden müssen. Dieser Unterschied zwischen Cholera- und Tor-Vibrionen ist lange Zeit verkannt worden.

Im Gegensatz zu den Tor-Vibrionen ist ein Choleravibrio, aus dem Stuhl eines echten Cholerakranken gezüchtet, nie imstande gewesen, rote Blutkörperchen in Suspension aufzulösen. Van Loghem hat darauf hingewiesen, daß auch die Hofbildung auf der Blutagarplatte, wie sehr diese auch einander gleichen mögen, bei Cholera- und Tor-Vibrionen verschieden sind; während in dem Cholerahof jede Spur eines Oxyhämoglobinspektrums verschwunden ist, bleibt in dem Hofe der Tor-Vibrionen stets ein schwaches Oxyhämoglobinspektrum sichtbar. Es lag daher nahe, bei den Tor-Vibrionen nachzuforschen, welche Zersetzungsprodukte von Blutfarbstoff bei der Hofbildung entstehen. Zunächst kann ich die Wahrnehmung von van Loghem vollkommen bestätigen, daß in dem Cholerahof niemals ein Oxyhämoglobinspektrum sichtbar ist, im Torhof aber immer. Zweitens zeigt sich bei Zufügen von Schwefelammonium, daß nach 2mal 24 Std. gegenüber dem starken Hämochromogenspektrum im Cholerahof, in dem Torhof nur ein schwaches, kaum sichtbares Hämochromogenspektrum entsteht. Die Tor-Vibrionen zersetzen also in der Blutagarplatte nur sehr wenig Hämoglobin in hämatinartige Körper.

Was geschieht nun bei der Wirkung eines Tor-Stammes auf die Blutagarplatte? Wahrscheinlich ist, daß die Tor-Vibrionen in der Blutagarplatte, ebenso wie in der Blutemulsion, die roten Blutkörperchen auflösen. Das freigewordene Oxyhämoglobin diffundiert nun über die ganze Platte hin. Die kleine Menge Oxyhämoglobin, die in dem Hof frei wird, verteilt sich gleichmäßig über die ganze Oberfläche der Petri-Schale. Folglich bleibt nur sehr wenig Oxyhämoglobin in dem Hofe übrig, aber da das Oxyhämoglobin nicht verschwindet, sondern sich nur über eine große Oberfläche verteilt, werden stets schwache Oxyhämoglobinspektren in dem Hof der Tor-Vibrionen sichtbar bleiben.

Man muß also zwischen der Hofbildung der Tor-Vibrionen und der Cholerabazillen unterscheiden. Bei den ersten werden die roten Blutkörperchen aufgelöst und diffundiert das nicht zersetzte Oxyhämoglobin durch die Platte hin; bei den Cholerabazillen findet sich dagegen keine Hämolyse mit Diffusion, jedoch Zersetzung des Blutfarbstoffes in hämatinartige Körper, welche am Orte liegen bleiben. Es ist nicht schwierig, für diese Auffassung ein deutliches Argument anzuführen: wenn nämlich die Hofbildung der Tor-Vibrionen hauptsächlich auf der Bildung von Hämolysinen beruht, welche den Blutfarbstoff wohl auflösen, jedoch nicht zersetzen, während Diffusion des freigewordenen Blutfarbstoffes über die ganze Platte hin den Hof entstehen läßt, dann muß diese Hofbildung

1) Bestätigt durch Creig, Ind. Journ. of Med. Res. 1917. Wollmann, Wien. klin. Wochenschr. 1917, und Meggendorfer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 80. 1918. S. 273.

der Tor-Vibrionen fehlen, wenn der Blutfarbstoff nicht als rote Blutkörperchen, sondern als Oxyhämoglobin geboten wird. Der Cholera-bazillus jedoch, welcher durch Zersetzung des Blutfarbstoffs einen Hof hervorbringt, muß unter diesen Umständen wohl bei der Hofbildung bleiben, wie dieser Versuch lehrt.

Macht man sich eine Platte, zu der statt 10 Proz. Ziegenblut 10 Proz. hämolysierte Ziegenblutkörperchen zugesetzt werden, und impft hierauf sowohl Tor- als Choleravibrionen, so entsteht rings um die Tor-Kulturen kein Hof, rings um die Cholerakulturen aber der bekannte grünliche Hof. In diesem grünen Hof sind wieder nach Zusatz von Schwefelammonium starke Hämochromogenspektren zu sehen. Auch in den Tor-Kulturen sieht man manchmal nach 2mal 24 Std. ein sehr schwaches Hämochromogenspektrum entstehen, das aber unbeständig und schwach ist und ausschließlich unter der Kultur selbst zu sehen, nicht hofförmig um die Kultur verbreitet ist, wie dies bei der Cholera der Fall ist. Hieraus geht hervor, daß die hauptsächlichste Ursache der Hofbildung bei den Tor-Vibrionen in der Auflösung der roten Blutkörperchen beruht, denn sowie das Blut in hämolysierter Form dargeboten wird, bildet der Torbazillus keinen, der Cholerabazillus dagegen einen kräftigen Hof. Wir werden gleich noch ein Argument für diese Ueberlegung anführen können.

Ist also das Entstehen des Hofes rings um die Tor-Vibrionen am besten durch die Diffusion des freigewordenen Blutfarbstoffes der aufgelösten roten Blutkörperchen über die ganze Platte hin zu erklären, so ist diese Hämolysen nicht die einzige Wirkung, die der Tor-Vibrio auf den Blutfarbstoff hat. Der Tor-Vibrio hat, wie ich gefunden habe, mit vielen anderen Bakterien die Eigenschaft gemeinsam, daß er aus Blutfarbstoff anorganische Eisenverbindungen abscheiden kann. Das Eisen, das im Blutfarbstoff vorhanden ist, ist darin ziemlich fest an Eiweiß gebunden. Aus diesem Grunde kann man das Eisen des Blutfarbstoffes mit den gewöhnlichen Reagentien nicht nachweisen, bevor man das Eiweiß mittels stark oxydierender Substanzen zersetzt hat. Bringt man z. B. ins Blut eine Lösung von Ferrozyankali und Salzsäure, dann entsteht keine Blaufärbung, und erst, nachdem man den Blutfarbstoff längere Zeit mit einer Mischung von Salpetersäure und Salzsäure behandelt hat, ist das Eisen in eine anorganische Verbindung übergegangen, so daß es vermöge der genannten Reagentien als Berliner Blau nachweisbar ist. Verschiedene Bakterien sind imstande, das Eisen aus dem Blutfarbstoff in anorganischer Form freizumachen; zu dieser Gruppe von Bakterien gehört der Tor-Vibrio, im Gegensatz zu den einen echten Hof bildenden Choleravibrionen. Impft man den Tor-Vibrio auf eine Blutagarplatte, die etwas konzentrierter als gewöhnlich ist (20 Proz. Blut statt 10 Proz. Blut), und setzt man der Platte nach 3- oder 4mal 24 Std. Ferrozyankali und Salzsäure zu, dann färbt sich die ganze Tor Kultur blau, während der Hof, der rund um den Tor-Vibrio entstanden ist, farblos bleibt. Die Tor-Vibrionen haben also, außer der Eigenschaft, den Blutfarbstoff aus den Blutkörperchen freizumachen, bzw. Hämolysen zu verursachen, auch die Fähigkeit, Blutfarbstoff so weit zu zersetzen, daß Eisen in anorganischen Verbindungen frei wird.

Man muß natürlich zwischen diesen beiden Eigenschaften der Tor-Vibrionen einen Unterschied machen. Dies geht schon gleich aus der Tatsache hervor, daß die hämolysierenden Fermente sich außerhalb der Tor-Kultur in der Blutplatte verbreiten und dadurch den Hof bilden,

während die Fermente, die das Eisen des Blutfarbstoffes in anorganische Verbindungen übergehen lassen, an die Körper der Tor-Vibrionen gebunden sind. Jedoch ist die Eisenreaktion niemals in dem Hof sichtbar und bleibt stets auf den Kulturstreifen beschränkt. Mit einem einigermaßen gewagten Vergleich könnte man diese letzteren Fermente, die das anorganische Eisen bilden, am besten mit Endotoxinen vergleichen.

Also ergibt sich aufs neue ein deutlicher Unterschied zwischen dem Tor- und hofbildenden Choleravibrio. Untersucht man einen Cholera-stamm, der eine starke Hofbildung zeigt, dann wird die Kultur nach 3- oder 4mal 24 Std. durch Zusatz von Ferrozyankali und Salzsäure nicht blau, sondern weiß, durch den Niederschlag von Eiweiß, höchstens mit einer zweifelhaften grauen Beifärbung. Die Wirkung des Choleravibrio auf die Blutagarplatte besteht also aus einer Zersetzung des Blutfarbstoffes in hämatinartige Körper, die der Tor-Vibrionen also aus dem Verursachen von Hämolyse rings um die Kultur mit hierauf folgender Diffusion von Blutfarbstoff durch die Platte hin. Außerdem wird der Blutfarbstoff in der Tor-Kultur selbst in anorganische Eisenverbindungen zersetzt.

Endlich ist es auf indirekte Weise möglich, zu beweisen, daß der Hof, welchen die Tor- und Choleravibrionen auf der Blutagarplatte bilden, durch ganz verschiedene Einflüsse verursacht wird. Bestimmte Umstände, welche die Hofbildung der Cholerabazillen befördern, hemmen die Hofbildung des Tor-Vibrios. Wir haben oben bereits gesagt, daß jeder Cholera-stamm, der eben aus dem menschlichen Stuhl abgesondert ist, starke Hofbildung auf der Blutagarplatte zeigt, während die Stämme, die seit längerem im Laboratorium gezüchtet wurden, beinahe alle die Eigenschaft der Hofbildung verloren haben, weswegen gerade die Untersuchung der Hofbildung durch Cholerabazillen in Europa so mühsam ist, weil es an Material fehlt. Es ist jedoch auch möglich, alte Cholera-kulturen, die diese Eigenschaft schon lange verloren zu haben scheinen, wieder zur Hofbildung zu bringen, indem man sie auf Blut-Galleagarplatten impft. Mischt man 2 Teile Galle mit 1 Teil Ziegenblut und macht man hiervon 20-proz. Agarplatten, dann zeigt sich, daß auf diesem Nährboden die Hofbildung der Cholerabazillen ansehnlich verstärkt ist. Dieselben Cholera-stämme, die auf der gewöhnlichen Blutagarplatte erst nach 2mal 24 Std. einen Hof bilden, erzeugen auf der Blut-Galleagarplatte schon nach 24 Std. einen breiten Hof. Ferner zeigen mehr als 50 Proz. der alten Laboratorium-Cholera-stämme, die schon seit Jahren auf Blutagarplatten keinen Hof mehr bilden konnten, auf den Blut-Galleagarplatten schon nach 24 Std. und vor allem nach 2mal 24 Std. breite Höfe. Die hofbildende Fähigkeit war in latenter Form in diesen alten Stämmen noch vorhanden und wirkt auf den Blut-Galleagarplatten wieder deutlich. Während nun Beimischung von Galle die Hofbildung durch die Cholerabazillen ansehnlich befördert, hat die Galle bei den Tor-Vibrionen gerade einen umgekehrten Einfluß auf die Hofbildung. Die Tor-Kultur wächst auf Blut-Galleagar ausgezeichnet, mindestens ebenso gut wie auf der gewöhnlichen Blutagarplatte. Die Hofbildung durch die Tor-Vibrionen ist auf diesen Platten aber stark gehemmt. Nach 24 Std. ist keine Spur von Hofbildung sichtbar und nach 2mal 24 Std. nur ausnahmsweise eine Andeutung vom Hof. Auch von der Bildung von

anorganischem Eisen ist auf diesem Nährboden bei den Tor-Vibrionen nichts wahrzunehmen.

Bei einigem Nachdenken wird es klar, warum die Hofbildung der Tor-Vibrionen auf den Blut-Galleagarplatten bedeutend gehemmt werden muß. In letzteren vollziehen sich nämlich auch ohne Bakterienwachstum bereits wichtige chemische Umwälzungen. 1) wird das Blut durch den Zusatz der Galle durch die Wirkung der gallensauren Salze hämolytisch; außerdem zeigt sich, daß, wenn man eine Blut-Galleagarplatte, die unmittelbar nach der Anfertigung rot ist, ohne sie zu impfen, 24 Std. in den Brutofen legt, die rote Farbe sich in eine grüne verändert und das Oxyhämoglobinspektrum gänzlich verschwunden ist. Setzt man zu einer derartigen Platte Schwefel-Ammonium zu, dann entsteht über die ganze Platte ein starkes Hämochromogenspektrum oder, mit anderen Worten, in der Blut-Galleagarplatte werden die Blutkörperchen hämolysiert und der Blutfarbstoff in hämatinartige Körper verwandelt. Da nun die Hofbildung durch die Tor-Vibrionen auf Hämolyse und Diffusion des Blutfarbstoffes durch die Platte beruht, ergibt sich deutlich, daß in der Blut-Galleagarplatte von Hofbildungen keine Rede sein kann. Die Tor-Vibrionen finden nämlich in dieser Platte keine roten Blutkörperchen, jedoch hämatinartige Körper, und das hämolytische Ferment, das die Tor-Vibrionen ausscheiden, kann hier also keinen Hof bilden. Bei den Cholera Bazillen ist es ganz anders. Die Hofbildung, durch die Cholera-vibrionen auf der Blutagarplatte verursacht, ist größtenteils bedingt durch eine Zersetzung von Blutfarbstoff, gemäß den Spaltungsprodukten, die in der Platte nachzuweisen sind. Diese Zersetzung von Blutfarbstoff findet in der Blut-Galleagarplatte ebensogut statt wie in der Blutagarplatte, ja selbst in noch stärkerem Maße. Bei Gebrauch von Blut-Galleagarplatten zeigt sich, daß die Fermente, die durch die Cholera Bazillen ausgeschieden werden, imstande sind, auch das Hämatin umzusetzen. Setzt man nämlich zu einer Blut-Galleagarplatte, die seit 2mal 24 Std. mit Cholera kulturen geimpft ist, und wo also kräftige Hofbildung eingetreten ist, Schwefel-Ammonium hinzu, dann entsteht in der Kultur und in dem Hofe um die Kultur nur ein schwaches Hämochromogenspektrum, in der übrigen Platte aber ein starkes. Das Hämatin, das in der Blut-Galleagarplatte den Cholera-vibrionen geboten wurde, ist also in dem Hofe teilweise verschwunden und wieder in andere Verbindungen umgesetzt. In welche, hat sich hierbei nicht ergeben.

Die Cholera- und Tor-Vibrionen stimmen in so vieler Hinsicht miteinander überein, daß durch eine Anzahl von Forschern die Tor-Vibrionen als Cholera Bazillen angesehen werden, vor allem, weil sie auch gleiche serologische Reaktionen (Agglutination) zeigten. Der Unterschied zwischen diesen beiden Vibrionen ist jedoch der:

1) die Tor-Vibrionen stammen aus dem Stuhl von Menschen, die nicht an Cholera litten;

2) die Tor-Vibrionen verursachen Hämolyse in einer Emulsion von Ziegenblutkörperchen, die Cholera-vibrionen nicht.

Beim Vergleich des Verhaltens dieser beiden Sorten von Vibrionen hinsichtlich bluthaltiger Medien bedenke man, daß die Tor-Stämme bereits seit 13 Jahren abgeschieden sind und seitdem stets wieder durch Weiterimpfen im Laboratorium am Leben erhalten sind. Es ist daher ratsam, dies im Auge zu behalten, wenn man die schwachen „hämogestiven“ Eigenschaften der gegenwärtigen Tor-Vibrionen der kräftigen

Hämodigestion der hofbildenden Cholerabazillen gegenüberstellt. Ja, selbst wenn die Tor-Vibrionen ursprünglich kräftig „hämodigestiv“ gewesen wären, würde durch das lange Züchten im Laboratorium diese Eigenschaft beinahe sicher verloren gegangen sein. Am wahrscheinlichsten scheint mir, daß die Tor-Vibrionen, als sie ausgeschieden wurden, in der Tat hämodigestiv waren. Auf der Blut-Galleagarplatte bilden nämlich 2 von den 5 Tor-Vibrionen noch nach 2mal 24 Std. einen schwachen Hof, welcher nur durch ein hämodigestives Ferment entstehen kann; wogegen das hämolytische Ferment in einer solchen Platte, worin keine unveränderten roten Blutkörperchen anwesend sind, keinen Hof bilden kann.

Außerdem besitzen die Tor-Vibrionen ein stark hämolytisch wirksames Ferment, das bei den Choleravibrionen nicht vorkommt, und das, im Gegensatz zu dem hämodigestiven Ferment, auch bei sehr alten Stämmen noch erhalten ist. Dieses Hämolysin verursacht auf der gewöhnlichen Blutagarplatte den Hof der gegenwärtigen, bereits so alten Tor-Vibrionen. Der Hof der Cholerabazillen entsteht durch ein ganz anderes Ferment, das den Blutfarbstoff zersetzt. Bei alten Cholerastämmen ist dieser letztere, das „hämodigestive“ Ferment, verloren gegangen; alte Cholera Stämme bilden also keinen Hof auf der Blutagarplatte. Die alten Tor-Vibrionen haben ebenfalls ihr ursprünglich „hämodigestives“ Ferment verloren; dank dem hämolytischen Ferment, das sie behalten haben — und welches Choleravibrionen niemals besitzen —, bilden sie auch jetzt noch einen Hof auf der Blutagarplatte, und so entsteht also bei oberflächlicher Betrachtung der Hofbildung auf Blutagarplatten eine Uebereinstimmung zwischen alten Tor- und frischen Choleravibrionen, die bei näherer Untersuchung verschwindet.

Ergebnisse: In dem Hofe rings um eine Cholerakultur auf einer Blutagarplatte und in der Kultur selbst entsteht Hämatin; der Hof entsteht also durch Zersetzung von Blutfarbstoff. In dem Hofe rund um eine Tor-Kultur entstehen höchstens Spuren von Hämatin. Dieser Hof der Tor-Vibrionen wird durch Hämolyse und Diffusion des freigewordenen Blutfarbstoffes durch die ganze Platte hin gebildet. Als Beweis hierfür kann dienen, daß auf Hämoglobinplatten, die nur aufgelösten Blutfarbstoff enthalten, die Tor-Vibrionen keinen, die Cholerabazillen aber einen deutlichen Hof bilden.

In der Tor-Kultur selbst entstehen auf der Blutagarplatte anorganisches Eisen enthaltende Verbindungen, wogegen in der Cholerakultur selbst auf der Blutagarplatte kein anorganisches Eisen, jedoch Hämatin, gebildet wird.

Auf Blut-Galleagarplatten ist die Hofbildung durch die Cholerabazillen viel kräftiger als auf gewöhnlichen Blutagarplatten. Auf ersteren können auch Cholera Stämme, die die Hofbildung schon lange verloren zu haben scheinen, noch große Höfe bilden, in denen das Hämatin, das spontan in der Blut-Galleagarplatte entstanden ist, weiter zersetzt wird.

Auf den Blut-Galleagarplatten bildet der Tor-Vibrio meist keinen, und nur ausnahmsweise einen schwachen Hof. Dieses hemmende Vermögen der genannten Agarplatte hinsichtlich der Hofbildung der Tor-

Vibrionen ist zu verstehen, weil das hämolysierende Ferment, durch welches die Tor-Vibrionen auf der gewöhnlichen Blutagarplatte einen Hof bilden, auf die Blut-Galleagarplatte keinen Einfluß haben kann. In einer solchen Platte sind nämlich keine unveränderten roten Blutkörperchen mehr und aller Blutfarbstoff ist in hämatinartige Körper umgesetzt.

Möglicherweise, ja selbst sehr wahrscheinlich, waren die Tor-Vibrionen ursprünglich nicht allein hämolytisch, sondern auch „hämodigestiv“. Die „hämodigestiven“ Eigenschaften würden sich dann durch das jahrelange Fortzüchten im Laboratorium verloren haben, wie dies bei den Choleravibrionen stets der Fall ist. Nur das hämolytische Ferment der Tor-Vibrionen, das echte Cholerabazillen niemals besitzen, ist noch übrig geblieben. Hierdurch sind die Tor-Vibrionen imstande, auf der Blutagarplatte einen Hof zu bilden, der bei oberflächlicher Untersuchung eine irreführende Ähnlichkeit mit dem Hofe von hämodigestiven Cholerabazillen zeigt.

Mai 1918.

Nachdruck verboten.

Versuche über die Dauer der Abschwächung des Milzbrandbazillus.

[Aus dem Hygienischen Institute der deutschen Universität Prag.]

Von Dr. Seiji Morihana.

Von den in neuer Zeit mit vielem Erfolge, wenn auch noch ohne allgemein zureichende Erklärung, unternommenen Studien über die von selbst eintretende oder künstlich hervorgerufene Veränderung von Eigenschaften der Bakterien gehören jene zu den interessantesten, welche sich auf die pathogenen Eigenschaften derselben beziehen. Zwar sind diese an sich leicht veränderlich, und bei vielen Bakterien erscheint die „Virulenz“ von vornherein als die labilste der physiologischen Fähigkeiten. Immerhin gibt es Bakterienarten, bei denen die Erzeugung einer Krankheit beim Tiere zu den so regelmäßigen Merkmalen gehört, daß ihr Fehlen bei einem irgendwo aufgefundenen Stamme gegen dessen Zugehörigkeit zu der betreffenden Art spricht. Dazu gehören der Tetanus und der Milzbrandbazillus. Von beiden kommen in der Natur nicht selten „Doppelgänger“ vor, die kaum anders von den echten Krankheitserregern zu unterscheiden sind, als durch das Fehlen der Pathogenität und bisher hat man diese eben deshalb streng vom echten Starrkrampf- oder Milzbrandbazillus ferngehalten und unterschieden. Um so wichtiger ist es, in Versuchen, die nicht nur unter Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln, sondern auch genügend lange Zeit fortgeführt werden, zu zeigen, daß auch bei diesen Bakterien Verlust oder starke Veränderungen der Pathogenität nicht nur entstehen, sondern dauernd bleiben können.

Der Milzbrandbazillus eignet sich aus mehrfachen Gründen besonders gut zu solchen Versuchen. Einerseits ist er durch eine Reihe von morphologischen und kulturellen Merkmalen gut und leicht zu charakterisieren, andererseits sind gerade bei ihm seit Pasteur die Methoden zur Abschwächung und Aufhebung der Pathogenität mit großer Sicherheit bekannt und leicht zu beherrschen, seitdem durch die Arbeiten von Preisz gezeigt wurde, daß die abschwächenden Eingriffe immer nur die Individuen einer Kultur, nicht aber die ganze Kultur betreffen.

Wählt man das klassische Abschwächungsverfahren der Züchtung bei 42°, so enthält nach einiger Zeit die mehr oder minder dürftig gewachsene Kultur Individuen, die in verschieden hohem Grade ihrer Pathogenität beraubt sind, und zwar so, daß sie ihren Abschwächungsgrad erblich konstant beibehalten. Da nach den ausgedehnten Untersuchungen von Bail zwischen der Pathogenität eines Milzbrandbazillus und seinem seit den Arbeiten von Johnne, Gruber und Futaki, Preisz, Deutsch u. v. a. viel studierten Vermögen der Kapselbildung strenge Korrelation besteht, so ergibt sich die Möglichkeit, auf dem Wege der Züchtung in flüssigem Serum und mikroskopischer Beobachtung den Abschwächungsgrad sofort zu erkennen und nur gelegentlich durch den langwierigen und kostspieligen Tierversuch zu kontrollieren.

Eine der ersten Aufgaben der folgenden Versuche bestand darin, festzustellen, daß einmal erlangte Veränderungen des Kapselbildungsvermögens und damit auch der Pathogenität tatsächlich dauernde sind. Hierfür stand eine Anzahl der durch Bail vor rund 7 Jahren auf dem Wege der Zucht bei höherer Temperatur gewonnenen und seither mehrfach studierten Stämme zur Verfügung. Sie waren in dieser langen Zeit absolut keiner anderen Einwirkung unterworfen als derjenigen, die Bakterien einer Sammlung auszuhalten haben. Ihre Ueberimpfung fand in der Regel erst zweimonatlich, dann monatlich auf Agar statt; nur gelegentlich, während langer Ferien, traten längere Pausen bis 2½ Mon. ein. Mehrere Male wurden seit 1917 Serienüberimpfungen auf Serum in der Weise eingeschoben, daß die Stämme aus den Agarkulturen in Serum übertragen wurden, daselbst 24 Std. bei 37° wuchsen, dann auf Agarplatten kamen, von denen eine Kolonie wieder auf Serum überimpft wurde, usf.¹⁾ Es wirkte also kein anderer Einfluß auf die Stämme als der des Nährstoff- und gelegentlichen Temperaturwechsels von 37° bzw. Zimmertemperatur ein, wozu noch der unbestimmte, aber aus den sonstigen Mutationsversuchen als wichtig erkannte, des natürlichen Alterns kam. Niemals während dieser ganzen Jahre war bei Züchtung in Serum eine Aenderung gegen den 1914 von Bail beschriebenen Zustand der Kapselbildung beobachtet worden. Die nunmehrigen, in großem Umfange angestellten Versuche sollten das abschließend und so genau als möglich feststellen. Es ist nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse selbstverständlich, daß dafür nicht etwa das Studium einer aus einer Kolonie erwachsenen Kultur genügen konnte, sondern daß möglichst viele Einzelindividuen zur Entwicklung gebracht werden mußten.

Einzellkulturen anzulegen, ist ja bei Milzbrand keineswegs schwierig, aber immerhin ein so umständliches Verfahren, daß es durch die einfache Plattenkultur bei genügend verdünntem Ausgangsmaterial ersetzt

1) Wirkliche Einzelkulturen nach Burri wurden dabei nicht angelegt; doch hat die wiederholte Plattenimpfung stark verdünnter Bakterienaufschwemmungen wohl den gleichen Erfolg.

wurde. Natürlich sind viele, wohl die meisten, derartigen Kolonien nicht aus einer Einzelzelle im strengen Wortsinne hervorgegangen, sondern aus mehr oder weniger langen Fäden. Da aber ein Faden im allgemeinen aus Abkömmlingen eines Individuums besteht, so kann man das mit in Kauf nehmen. Allerdings würden gerade die überaus interessanten Stämme D, E, F, die unten neuerlich beschrieben werden, die Anwendung einer Einzelkultur dringend erwünscht machen. Sie zeichnen sich nämlich dadurch aus, daß bei ihnen das Kapselbildungsvermögen nicht gänzlich erloschen ist und in der eigentümlichen Weise auftritt, daß unter vielen Tausenden nackten Fäden sich solche finden, die an einem Gliede in der Mitte oder am Ende des Fadens eine typische Kapsel ausbilden. Bei diesen Stämmen, die dem Verständnisse der Vererbung bei Bakterien ein schwer zu lösendes Rätsel aufgeben, wäre es von besonderer Wichtigkeit, ein kapseltragendes Glied zu isolieren und zur Entwicklung zu bringen. Derartiges ist aber nie gelungen, auch technisch kaum durchführbar. Bei der Seltenheit der Erscheinung ist auch die mikroskopische Beobachtung des Auswachsens solcher Fäden Sache eines günstigen Zufalls, der bisher nicht eingetreten ist, trotz vieler darauf verwendeten Mühe.

Stamm A von Bail (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 75. S. 159), durch verhältnismäßig kurzdauernde Erhitzung von virulentem Materiale gewonnen, zeigte vor fast 7 Jahren im Serum vollständige Kapselfreiheit und infizierte Mäuse nur gelegentlich unter abnormem Krankheitsverlaufe. (Ebenda. Bd. 76. S. 30, 330; Bd. 79. S. 439.) Wiederholte Versuche, ihn durch verschiedene Eingriffe, durch Züchtung im Tierkörper wieder zur Kapselbildung zu bringen, waren erfolglos. Die Züchtung aus der zum Ausgang genommenen, fast 2 Mon. alten Agarstichkultur ergab über Agarplatten Kolonien, die sich von denen des typischen Milzbrandbazillus höchstens dadurch unterschieden, daß sie im Anfang langsamer wuchsen, also nach etwa 24 Std. deutlich kleiner waren. Die charakteristische Anordnung des Fadengewirres war unverändert. Im Laufe der früheren Versuche von Bail wurde der Stamm einer mehr als 100-fachen Ueberzüchtung in Serum verschiedener Tiere, meist aber Rinderserum, ausgesetzt und dann durch Platten wieder in Einzelkulturen zerlegt. Gegen 3000 solcher Einzelkolonien wurden in ihrem Verhalten auf Serum untersucht, ohne daß sich jemals auch nur die Andeutung einer Kapselbildung zeigte. Seither und durch eigene Versuche sind diese Zahlen gewiß weit mehr als verdoppelt worden; die Zahl der aus Einzelkolonien angelegten und mikroskopisch durchmusterten Serumkulturen geht in viele tausende, aber niemals ist auch nur die Andeutung einer Kapselbildung festgestellt worden. Soweit daher ein solcher Nachweis überhaupt möglich ist, ist durch jahrelange und ausgedehnteste Untersuchung endgültig ermittelt, daß die Form A, sicher aus gewöhnlichem, kapseltragendem Milzbrande hervorgegangen, die Fähigkeit zur Kapselbildung für immer und nach unseren bisherigen Kenntnissen auch unwiderbringlich verloren hat.

Denn auch der Reiz, von dem man zu allererst eine Wiederkehr der Kapselbildung erwarten könnte, der im Tierkörper ausgeübte, versagte jetzt, wie in den früheren von Bail und Bail und Flaumenhaft angestellten Versuchen.

Bail konnte zwar gelegentlich mit diesem Stamme A Mäuse töten, aber das Bild der Infektion wich von dem einer typischen Milzbrandinfektion ab, bis auf die Bildung von subkutanem Oedem, die aber doch

zu vieldeutig ist, um ihr große Bedeutung zuzuschreiben. Die Bazillen aus den Tieren waren kapsellos und blieben auch bei den daraus angelegten Serumkulturen ohne Kapseln. Von eigenen Versuchen seien in aller Kürze angeführt:

Maus 4 erhielt am 25. Juni 0,01 ccm Bazillenkultur A intraperitoneal. Nach 2 Std. ergab eine Kapillarentnahme viele Kolonien auf der Agarplatte; auch nach 20 h ließen sich noch ca. 100 Kolonien von Milzbrand gewinnen. Die aus fast 100 isoliert gut abimpfbaren Kolonien angelegten Serumkulturen ergaben ohne Ausnahme Kulturfäden. nirgends auch nur Andeutung einer Kapselbildung. Das am Leben gebliebene Tier wurde am 27. Aug. neuerdings mit 0,1 ccm Serumkultur des Stammes A subkutan geimpft, nachdem derselbe 2mal im Mäuse-, 2mal im Meerschweinchenkörper, 12mal in Serum verweilt hatte. Die mikroskopische Untersuchung von Kapillarentnahmen ergab sofort nach der Injektion Lymphozyten und zahlreiche Kulturfäden; nach 2 Std. war die Zahl der letzteren bei Auftreten von Leukozyten vermindert und nahm nach 4 Std. weiter stark ab, während die Leukozyten sich vermehrten und hier und da Phagozyten zeigten. Nach 8 und 24 Std. waren wieder mehr kapsellose Kulturfäden zu sehen, nach 30 Std. und später war mikroskopisch und auch durch Kulturen kein Milzbrand mehr nachzuweisen. Die mit einer kleinen Oese von der Kapillarentnahme aus angelegten Platten lieferten in diesen Zeiten 1500, 71, 7, 419, 456, keine Kolonien. Von da aus angelegte 52 Serumkulturen ergaben ein Wachstum in Kulturfäden ohne jede Spur von Kapselbildung. Das Tier überlebte ohne jeden Schaden.

Meerschweinchen 4 erhielt am 5. Juni 1 ccm Serumkultur subkutan. Mikroskopisch zeigten sich nach 2 Std. an der Impfstelle wenige Fäden, dicker als Kulturfäden, aber ohne Kapseln; die Agarplatten ergaben ziemlich reichlich Milzbrandkolonien, von denen 20, auf Serum übertragen, meist Kulturfäden, öfters dickere Formen, aber nirgends Kapseln zeigten. Nach 4 Std. waren neben Leukozyten nur wenige kapsellose Bazillen aufzufinden. Von der Platte abgeimpfte 15 Kolonien ergaben im Serum den gleichen Befund wie oben. Nach 8 Std. war der Befund bei reichlichem Leukozytengehalt ungefähr der gleiche; 10 aus der Plattenkultur angelegte Serumkulturen wuchsen kapsellos. Nach 24, 48 und 70 Std. waren Milzbrandbazillen weder mikroskopisch noch kulturell nachweisbar. Zu einer Oedembildung oder überhaupt einer stärkeren Beeinflussung der Infektionsstelle war es bei dem ohne Krankheit überlebenden Tiere nicht gekommen.

Meerschweinchen 13 erhielt 1 ccm Serumkultur des Stammes A subkutan, nachdem dieser 3mal im Meerschweinchenkörper verweilt hatte und 13 Serumübertragungen durchgemacht hatte. Die sofortige Entnahme ergab neben wenigen Zellen Mengen von kapsellosen, mitunter verknäuelten Kulturfäden, deren Zahl sich nach 1 Std. verminderte und bei denen nach 2 Std. Verquellungen und Deformationen auftraten. Nach 4 Std. war ihre Zahl sehr gering geworden, von der 6. Std. an waren sie mikroskopisch nicht mehr zu finden. Die Kultur jedoch ergab nach 1 Std. 202, nach 2 Std. 107, nach 4 Std. 37, nach 6 Std. 7, nach 22 Std. 12, nach 34 Std. 99, nach 56 Std. 5, nach 66 Std. 56, nach 72 Std. 1 Kolonie; später war Milzbrand auch kulturell nicht mehr auffindbar. Von diesen Kolonien wurden teils alle überhaupt aufgegangenen, mindestens aber jedesmal 20 auf Serum übertragen und untersucht; im ganzen 137, die in keinem Falle auch nur andeutungsweise Kapselbildung zeigten. (Ueber die weitere Behandlung dieses Tieres später.)

Somit hat auch der längerdauernde und wiederholte Aufenthalt dieses Stammes im Tierkörper, für den er nach wie vor, von lokalen Erscheinungen abgesehen, keine Pathogenität erkennen ließ, nicht das geringste von Kapselbildungsvermögen wiederhergestellt. Auch für diese Methode kann das Resultat als endgültig angesehen werden: der Verlust der Kapselbildung und der Virulenz kann als ein, wenn auch nur negatives, so doch beständiges und durch Vererbung absolut festgehaltenes Merkmal betrachtet werden. Würde ein solcher Stamm irgendwo in der Natur gefunden, so würde ihn kein Bakteriologe nach unserer heutigen Kenntnis als Milzbrand ansprechen dürfen. Es gibt kein Mittel, seine Herkunft vom gewöhnlichen, virulenten Milzbrande mehr festzustellen, zumal auch die Immunitätserzeugung bei ihm, wie später zu zeigen sein wird, versagt.

Ein besonderes Interesse bot die abschließende Untersuchung der ebenfalls von Bail durch Abschwächung bei höheren Temperaturen erhaltenen Stämme E und F. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß bei ihnen die Kapselbildung nicht vollständig verloren gegangen ist. Sie äußert sich in der Serumkultur so, daß Kapseln nur noch gelegentlich gebildet werden. Unter einer großen Zahl von ganz nackten Bazillen und Fäden finden sich solche, die schöne, manchmal ganz besonders stark ausgebildete Kapseln aufweisen. Das Auftreten dieser kann so selten sein, daß man mitunter in Serumkulturen überhaupt keine findet, wohl aber in den nächsten oder übernächsten von dieser abgeimpften Kultur. Seit ihrer Bildung vor fast 6 Jahren hatten auch diese Stämme, die ganz analog dem Stamme A gehalten worden waren, ihre Eigentümlichkeit beibehalten. Darunter war auch der einer Erklärung besondere Schwierigkeiten bietende Befund geblieben, daß bei E und F die Kapselbildung an einem einzelnen Gliede eines langen, sonst vollständig nackten Fadens auftrat.

Die neuerliche Untersuchung, die auch hier den Zweck hatte, die Konstanz dieses Merkmales endgültig festzustellen, ergab in Serumkulturen sogleich, daß die Stämme unverändert geblieben waren: die Kapselbildung war erhalten, aber nur in der erwähnten eigenartig rudimentären Form. Die lange Fortzüchtung hatte also eine weitere Abschwächung der Kapselbildung nicht zu erzielen vermocht. Der umgekehrte Erfolg, die Stämme wieder zur besseren Kapselerzeugung anzuregen, wurde wieder auf dem Wege der Tierimpfung angestrebt.

Maus 2 erhielt 0,01 ccm Bazillenkultur E ip. Die sofort nach der Injektion durchgeführte Kapillarentnahme ergab mikroskopisch keinen besonderen Befund; das Tier war bereits am Abende tot. Es zeigte im Peritoneum spärliche Bakterien, die keine Kapseln zeigten, meist dünn, mitunter auch dicker aussahen. Kulturen ließen sich sowohl aus Peritoneum, wie aus Milz gewinnen. Die von den Einzelkolonien abgeimpften, zahlreichen Serumkulturen zeigten das gewöhnliche Bild des Stammes, wobei aber eine deutlich ausgesprochene Kapselbildung überhaupt nicht recht gefunden wurde. Offenbar ist der rasche Tod dieses Tieres nicht auf Milzbrand zurückzuführen.

Maus 8 erhielt 0,05 ccm einer Serumkultur E subkutan, nachdem der Stamm 2mal in der Maus, 2mal im Meerschweinchen verweilt und 10 Serumübertragungen durchgemacht hatte. Mikroskopisch ließen sich Bazillen von der Impfstelle bis zu 24 Std., daneben viel Leukozyten nachweisen; eigentliche Kapselbildung wurde nicht bemerkt, Dickerwerden der oft fast quadratischen Bazillen. Agarplatten, sofort nach der Injektion, dann nach 2, 4, 8, 24 und 40 Std. angelegt, lieferten 1200, 84, 55, 34, 123, 3 Kolonien, später keine mehr. Von diesen Kolonien wurden im ganzen 58 Serumkulturen angelegt, in denen allen eine eigentliche Kapselbildung nicht aufgefunden wurde. — Das Tier, bei dem es zur Ausbildung von fühlbarem Oedem nicht kam, sondern das nur eine rasch vergehende Infiltration der Impfstelle aufwies, blieb am Leben.

Meerschweinchen 2 erhielt 0,2 ccm Bouillonkultur E subkutan. Es kam danach nur zur Ausbildung eines kleinen Infiltrates. Die Platten ergaben nach 2 Std. etwa 20, nach 4 Std. wenige Kolonien bei Verunreinigung durch große, weiße Kokken, nach 8 Std. nur noch eine einzige, später keine Kolonien mehr. Alle überhaupt abimpfbaren Kolonien wurden auf Serum übertragen, ergaben aber nur den gewöhnlichen Befund des Stammes; Kapselbildung trat fast nicht auf.

Meerschweinchen 16 erhielt 1 ccm Serumkultur E subkutan, nachdem der Stamm 3mal im Mäuse-, 2mal im Meerschweinchenkörper verweilt und 11 Serumübertragungen durchgemacht hatte. Die sofortige Entnahme ergab massenhaft kapsellose Kulturfäden, deren Zahl sich nach 2 Std. verminderte. Nach 4 Std. hatte sich an der Impfstelle eine geringe Schwellung gebildet, in deren Flüssigkeit sich bereits viel Leukozyten, zum Teil mit Phagozyten, erkennen ließen; Bazillen fanden sich einzeln und in kurzen Ketten, oft gequollen, aber durchaus ohne Kapseln. Der gleiche Befund ergab sich nach 8 Std. Am nächsten Tage zeigte sich eine kleine Verhärtung, aus der eitrige Flüssigkeit austrat, mit zahlreichen Bazillen, die tierisches Aussehen hatten (dick), aber keine Kapseln zeigten. Nach 48 Std. und später war mikroskopisch nichts mehr

von Bazillen nachzuweisen, die Infiltration war nach 72 Std. verschwunden. Alle Serumkulturen aus den Kolonien der Agarplatte, darunter auch 4, die aus den letzten, nach 48 Std. aufgegangenen Milzbrandkolonien angelegt worden waren, zeigten nur den Befund des Stammes, nichts von einer Wiederkehr der Kapselbildung.

Der Stamm E war von Bail anfangs 1915 nach 7-tägiger Züchtung des virulenten Ausgangsstammes in Bouillon bei 42,7° erhalten worden. Schon damals hatte er nur so selten Kapseln gebildet, daß diese (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. S. 335) erst in der 7. Serumkultur aufgefunden wurden. In dieser Hinsicht ist er vollständig gleichgeblieben. Eine gewisse Aenderung zeigt sich aber im Tierversuch an Mäusen. 1914 vermochte der frisch gewonnene Stamm noch Mäuse zu töten, wenn auch oft unter abnormen Erscheinungen und nach ungewöhnlich langer Lebensdauer. Nach einigen Passagen hörte die Infektiosität auf, so daß schließlich selbst 0,25 ccm Serumkultur wirkungslos blieben. Derzeit scheint die Mäusevirulenz auf diesem gesunkenen Stande verblieben zu sein. 1915 war der frische Stamm dann weiter dadurch von hohem Interesse, daß er in Mäusen Kapseln bildete, die dann aber bei der Züchtung im Serum zum größten Teile ausblieben. Von dieser Besonderheit ist jetzt nichts mehr zu merken.

Meerschweinchenversuche ergaben Ende 1914 und Anfang 1915 niemals eine erfolgreiche Infektion; wohl aber bildeten sich bei subkutaner Impfung Infiltrate aus, in welchen sehr häufig bekapselte Bazillen nachweisbar waren. Die Serumkultur derselben ergab wieder die dem Stamme eigentümliche, vereinzelte Kapselbildung. Meerschweinchenimpfungen 1917 (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 79. S. 439) ergaben ebenfalls nach subkutaner Einspritzung von 1 ccm und 5 ccm Serumkultur sowie 1 Oese Agarkultur nur geringe lokale Schädigungen, in denen Bazillen meist nur kurze Zeit und spärlich nachweisbar waren. Diese Versuche stimmen etwa mit den vorliegenden gut überein. Damals so wie heute ergaben die Serumkulturen aus dem Tierkörper lediglich das Bild des Stammverhaltens.

Es ist also auch dieser Stamm nunmehr endgültig als unveränderlich zu bezeichnen. Höchstens könnte von einer geringen und, wie zugegeben werden muß, schwer zu beweisenden Abnahme eines Restes von Tierpathogenität die Rede sein. Die Kapselbildung im Serum war gleichgeblieben.

Der ebenfalls von Bail gleichzeitig mit E gewonnene Stamm F (Ende 1914) verhielt sich diesem sehr ähnlich. Er wurde diesmal einer genauen Untersuchung unterzogen. In Serumkulturen verhielt er sich bei wiederholter Uebertragung und nach dem Befunde an zahlreichen abgeimpften Einzelkolonien ganz wie E, d. h. bildete nur ganz spärlich und vereinzelt Kapseln.

Maus 3 erhielt 0,1 ccm Bouillonkultur F ip. Nach 2 Std. wurden mittels Kapillarentnahme Bazillen nicht nachgewiesen (?), nach 20 Std. fanden sich Bazillen schon mikroskopisch zahlreich, zeigten oft dicke, verhältnismäßig kurze Stäbchen, näherten sich also dem „tierischen“ Zustande, ohne aber irgend deutliche Kapseln auszubilden. In dem Exsudate des nach 40 Std. gestorbenen Tieres und ebenso in der Milz fanden sich mäßig reichlich Kulturformen, seltener dickere, den „tierischen“ ähnliche Stäbchen, aber wieder keine Kapselbildung.

Maus 9 erhielt unter die Haut 0,1 ccm Serumkultur des Stammes F, nachdem dieser 2mal in der Maus, 5mal im Meerschweinchen verweilt und 23 Serumkulturen durchgemacht hatte. Die sofortige Kapillarentnahme ließ zahlreiche kurze und mittellange Milzbrandfäden ohne Kapseln erkennen. Nach 2, 4 und 8 Std. hatte sich deren Zahl vermindert, während Leukozyten in zunehmender Menge und mit öfteren Phagozyten auftraten, Kapseln fanden sich nicht. Nach 24 Std. war ein deutliches Oedem

ausgebildet mit Leukozyten, die noch Phagozytose zeigten. Bazillen fanden sich ziemlich zahlreich, erschienen nur zum Teil als dünne Kulturformen, öfter dick, aber ohne deutliche Kapseln. Der gleiche Befund wurde im Oedem des am 3. Tage gestorbenen Tieres erhoben, in dem sich aber auch spindelförmige und sonst deformierte Bazillen fanden. Die Milz war nicht vergrößert, blaß und zeigte nur sehr spärliche kapsellose Bazillen. In Leber und Herzblut waren sie noch seltener. Platten mit den Kapillarentnahmen sofort und nach 2, 4, 8 und 24 Std. ergaben 1350, 99, 81, 90 und 159 Kolonien, von denen insgesamt 55 im Serum übertragen wurden. Vom toten Tiere ließen sich aus Oedem sehr zahlreiche, aus Milz 300, aus Leber 12, aus Herzblut 23 Kolonien erhalten, von denen insgesamt 40 Serumkulturen angelegt wurden, somit aus dem Tiere überhaupt 95. Alle diese ergaben den Befund des Stammes mit geradezu verschwindender Kapselbildung.

Meerschweinchen verhielten sich verschieden. 2 Tiere, die am 28. Juni subkutan mit je 0,4 ccm Serumkultur geimpft wurden, starben beide, und zwar am 2. und 3. Aug. 2 Std. nach der Impfung zeigte die Kapillarentnahme neben bereits auftretenden Leukozyten mit etwas Phagozyten reichliche Bazillen, die zum Teil die dicke Form des Bazillus im Tierkörper angenommen hatten, aber nur sehr selten etwas von Kapselbildung zeigten. Nach 4 und 7 Std. war der Befund ziemlich derselbe. Nach 24 Std. war Oedem bemerkbar, Bazillen nicht selten, aber wieder nur mit äußerst spärlicher Kapselbildung. Auf der Platte hatte um diese Zeit die Zahl der aufgegangenen Milzbrandkolonien stark abgenommen. Die toten Tiere zeigten lokal eitrig-hämorrhagisches Exsudat, vergrößerte, dunkle, weiche Milzen. Ausstriche von der Injektionsstelle zeigten nur wenig zahlreiche Bazillen, meist dick, aber ohne Kapsel. Reichlicher fanden sich die Bazillen ein in der Milz, wo öfters Fäden vorkamen, die, ganz wie in flüssigen Serumkulturen, nur an einem einzigen Gliede Kapselbildung zeigten. Von allen bei den einzelnen Entnahmen und nach dem Tode aus den Organen angelegten Agarplatten wurden zahlreiche Einzelkolonien (im ganzen 112) auf Serum übertragen. In sämtlichen trat nur der charakteristische Stammesbefund mit sehr spärlicher Kapselbildung auf, die in den meisten dieser Kulturen überhaupt nicht festgestellt werden konnte. 3 andere Meerschweinchen, von denen 2 mit 0,4 und 0,5 ccm Serumkulturen aus den gestorbenen Tieren (also nach erfolgreicher Tierpassage) subkutan geimpft waren, überlebten und zeigten auch lokal nur ganz geringe Erscheinungen. An der Impfstelle nahm die Zahl der mikroskopisch nachweisbaren Bazillen einmal schon nach 7, sonst nach 24 Std. stark ab, womit das Ergebnis der Plattenkulturen übereinstimmte. Kapseln wurden mikroskopisch nicht gesehen, waren also jenseits außerordentlich selten. Die aus den erlangten Kolonien angelegten, im ganzen 120, Serumkulturen, ergaben lediglich den Befund des Stammes.

Die Tierversuche mit dem Stamm F ergaben also einen Befund, der mit dem, den Bail 1915 beim Stamme E beschrieben hatte, die größte Ähnlichkeit aufweist. Nur die damals im Tiere so häufig beobachtete Kapselbildung war hier auf ein Minimum reduziert. Hervorgehoben sei hier nochmals, daß die an Serumkulturen beobachtete, merkwürdige Besonderheit der Kapselbildung an einem einzelnen Gliede eines sonst vollkommen nackten Fadens auch hier im Tierkörper (Milz) auftrat. Von den Eigenschaften, die den „tierischen“ Zustand des Milzbrandbazillus auszeichnen, dem Dickerwerden und der Kapselbildung der Stäbchen, war nur das erstere Merkmal, und zwar keineswegs durchgängig, vorhanden.

Gänzlich der Infektiosität beraubt war der Stamm F nach dem Ausfall der Tierversuche, besonders der an Meerschweinchen angestellten, nicht. Aber diese ist einerseits unsicher, andererseits weicht das Infektionsbild weit von dem gewohnten des Impfmilzbrandes ab. Rest von Kapselbildungsvermögen und Rest von Infektiosität stehen somit auch hier in enger Korrelation, wobei es aber nicht erst der Erläuterung bedarf, daß diese keine ursächliche sein kann, daß also die im Tiere so selten aufgetretene Kapsel etwa die Ursache der Widerstandskräftigkeit gegen den Tierkörper sei. Kapselbildung und Infektiosität erscheinen vielmehr als 2 engverbundene Aeußerungsformen eines seinem Wesen nach noch unbekanntem Zustandes des Milzbrandbazillus.

Hervorzuheben ist noch die aus den Meerschweinchenversuchen besonders klar hervorgehende Erscheinung, daß die anfängliche geringe Infektiosität sich im Laufe der Tierversuche nicht steigerte, sondern eher abnahm, wie dies auch Bail 1915 für den Stamm E beobachtet hatte. Es trifft somit keineswegs allgemein zu, daß ein abgeschwächter Milzbrand, der einmal zur Infektion gebracht werden kann, in der Folge dadurch seine frühere Infektiosität wieder annimmt.

In allen wesentlichen Eigenschaften hat sich somit der Abschwächungsgrad der Stämme A, E, F als dauernd und durch alle angewendeten Eingriffe nicht mehr veränderlich erwiesen: in Anbetracht der langen, diesen Stämmen gewidmeten Untersuchungen müssen sie als durchaus neue und konstante Rassen des Milzbrandbazillus betrachtet werden, die ohne Kenntnis ihrer Herkunft nicht mehr mit ihm zu identifizieren wären.

Interesse verdienen die neuen Befunde an dem Stamme D. Er war ebenfalls von Bail Ende 1914 durch Abschwächung bei höherer Temperatur erhalten worden (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. S. 44) und bildete in Serumkulturen nie Kapseln. Geimpfte Mäuse erkrankten anfangs und starben mit mehr oder minder deutlicher Vermehrung der Bazillen, die aber im Tiere und aus demselben auf Serum übertragen, keinerlei Kapselbildung zeigten. Die wiederholte Mäusepassage, darunter auch Ueberimpfung der Organe gestorbener Tiere, führte nicht nur zu keiner Steigerung, sondern sogar zum Verluste der anfänglichen Pathogenität. Meerschweinchen zeigten nur Oedembildung, in der die Bazillen sich einige Zeit am Leben erhielten. 1917 (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. S. 439) wurde bei Meerschweinchen im wesentlichen der gleiche Befund erhoben. In der neuerdings vorgenommenen Untersuchung (Details wie bei den übrigen Stämmen) erwies sich der Stamm in Serum zunächst als kapselfrei.

Maus 6, mit 0,001 ccm Bouillonkultur ip. geimpft, zeigte nach 2 Std. ein leukozytenarmes Exsudat, daß aber weder mikroskopisch noch kulturell Bakterien ergab. Nach 4 Std. fanden sich neben Leukozyten sowohl dünne Kulturfäden, als tierische dicke Bazillen ohne, aber auch solche mit deutlichen Kapseln. Auf der Platte gingen reichlich Kolonien auf, von denen 10 in Serum übertragen wurden. In 2 dieser Kulturen waren Kapseln nachzuweisen. Das Tier starb nach 20 Std. und zeigte in der Bauchhöhle wenig dünne Kulturfäden, aber zahlreiche „tierische“ Fäden des Milzbrandbazillus, zum Teil mit Kapseln. Schön bekapselte Fäden waren auch in der Milz, weniger gut entwickelte in der Leber zu sehen. Aus der sehr zahlreich bewachsenen Agarplatte von der Milz des Tieres wurden 15 Kolonien im Serum geimpft, von denen 5 deutliche Kapselbildung zeigten.

Maus 10 erhielt 0,05 ccm Serumzucht, nachdem der Stamm bereits den Mäusekörper passiert und 15 Serumkulturen durchgemacht hatte. Die Entnahmen lieferten zunächst kapselfreie Bazillen, deren Zahl sich nach 2—4 Std. stark verminderte; nach 8 Std. waren Bazillen wieder zahlreich nachweisbar und zeigten metachromatische Säume. Nach 24 Std. hatten sie sich entschieden vermehrt und Kapseln waren in geringer Zahl nachweisbar. Das nach 45 Std. gestorbene Tier zeigte keine deutliche Oedembildung, vergrößerte Milz und überall reichliche Bazillen, meist mit schön ausgebildeten Kapseln. Die von den während des Lebens und nach dem Tode angelegten Agarplatten im Serum abgeimpften Kolonien ergaben sehr oft tierische, dicke Stäbchen, aber nur selten irgend deutliche Kapseln.

Meerschweinchen 6 erhielt 0,6 ccm Serumkultur von D (ohne vorherige Mäusepassage) subkutan. Nach 2 Std. wurde Milzbrand sowohl in dünner Kultur als in dicken tierischen Fäden gefunden, welche hie und da Kapseln zeigten. Nach 4 Std. gelang der Nachweis der Kapseln mühelos, manchmal in der für die Stämme E und F so charakteristischen Weise, daß nur ein einzelnes Glied eines sonst nackten Fadens eine Kapsel aufwies. Nach 8 Std. fanden sich bekapselte und unbekapselte Stäbchen nebeneinander. Nach 24 und 48 Std. waren nur spärlich Bazillen vorhanden, an denen von Kapselbildung nichts gesehen wurde. Das Tier überlebte ohne besondere

lokale Erscheinungen. Die von den Agarplatten der Entnahmen abgeimpften Serumkulturen (im ganzen 73) ergaben der Mehrzahl nach Kapselbildungen, in manchen recht reichlich.

Offenkundig hatte sich der Stamm D (von dem später weitere Tierversuche folgen) gegenüber seiner ersten Beschreibung verändert. Mäuse hatte er zwar auch damals zu töten vermocht, aber im Körper dieser Tiere und, von da aus in Serum überimpft, keine Kapseln bilden können, was er jetzt wieder vollkommen tat. Meerschweinchen tötete er jetzt ebensowenig als früher, aber auch hier bildete er Kapseln und regte die Fähigkeit dazu auch für Serumkultur an.

Während also alle anderen alten Stämme ihren Abschwächungsgrad unverändert und mit großer Zähigkeit festgehalten hatten, so daß sie als neue, konstante Rassen betrachtet werden müssen, hat der ursprünglich anscheinend vollkommen kapsellos gewordene Stamm D die Fähigkeit von Kapselbildung, etwa dem Stamme E entsprechend, wiedererlangt, ohne daß sich eine Ursache dafür angeben ließe. Jedenfalls ist seit 6 Jahren ein besonderer, auf „Kapselzüchtung“ gerichteter Eingriff an dem Stamm nicht vorgenommen worden; lediglich die Weiterzüchtung in verhältnismäßig langen Zwischenräumen hat dafür ausgereicht.

Bereits Preisz hat in seinen bekannten Versuchen nachgewiesen, daß eine nach Pasteur abgeschwächte Milzbrandkultur Einzelbakterien verschiedenen und dabei erblich festgehaltenen Abschwächungsgrades aufweist. Dieses Ergebnis muß nach den obigen Versuchen noch erweitert werden, indem nicht nur der augenblickliche Grad der Abschwächung wechselt, sondern auch die Form seiner erblichen Festigung. Während die Stämme A, E, F so vollständig fest geworden sind, daß weder die Länge der Zeit, noch die Art der Züchtung, noch der Aufenthalt im Tierkörper eine Rückkehr der Kapselbildung (und der früheren Infektiosität) herbeiführen konnten, hat der Stamm D, dessen Abschwächungsgrad anfangs beträchtlich höher als der von E und F zu sein schien, Kapselbildung und Infektiosität zurückerlangt. Durch diese Feststellung erklären sich auch manche widersprechende Angaben der Literatur, so insbesondere die, daß eine Abschwächung durch einen erzwungenen Aufenthalt im Tierkörper bis zur Erlangung der ursprünglichen Infektiosität zurückgehen soll; das kann sich nur auf Stämme, ähnlich dem Stamme D, bezogen haben, nicht auf solche wie E oder F. Beim Arbeiten mit „abgeschwächten Kulturen“, also äußerst bunten Gemischen verschiedener Abschwächung und Vererbung, ist eben alles möglich.

Wendet man die in der Vererbungslehre üblichen Ausdrücke an, so erscheinen nach Baur die Stämme A, E, F als wirkliche Mutationen, der Stamm D als bloße Modifikation, allerdings als eine solche von beträchtlicher Dauer.

Im Anschlusse sei über die Immunität berichtet, welche sich nach Behandlung mit diesen 4 abgeschwächten Milzbrandstämmen gegen infektiösen Milzbrand (den keiner Abschwächung unterworfenen, im übrigen in gleicher Art fortgeführten Ausgangsstamm) erreichen läßt. Zur Vorbehandlung wurden teils die Tiere verwendet, die bei der Prüfung die Infektion überlebt hatten, teils frische Tiere. Als beweisend werden die Versuche an Meerschweinchen angesehen. Mäuse mit Sicherheit aktiv oder passiv gegen Milzbrand zu immunisieren, bildet ja auch heute noch ein, trotz gelegentlichem Gelingen, ungelöstes Problem. Kaninchen sind wieder allzu leicht immunisierbar. Hingegen ist das hochempfang-

liche Meerschweinchen ein vorzüglich geeignetes Tier. Es sei hier gleich bemerkt, daß die Stämme A, E, F nicht zu immunisieren vermochten, obwohl eine bis 3mal wiederholte und anstandslos vertragene Vorbehandlung mit großen Mengen vorgenommen wurde¹⁾. Der Impfung mit geringen Gaben des Ausgangsstammes erlagen diese Tiere ohne Widerstand, was mit den entsprechenden Befunden von Bail übereinstimmt. Gleichzeitig mit der Infektiosität und dem ganz oder größtenteils abhanden gekommenen Kapselbildungsvermögen war also auch die Fähigkeit, Immunität zu erzeugen, verloren gegangen. Diese kann also nicht an die Substanz der Bazillen und auch nicht an deren Leben (zur Immunisierung wurden nur lebende Kulturen verwendet) geknüpft sein, sondern muß auf einem besonderen Lebensprozesse, wie an die Ausbildung besonderer Stoffe geknüpft sein.

Hingegen entfaltet der abgeänderte Stamm D eine so gute Wirkung, daß die von ihm beim Meerschweinchen hervorgerufene Immunität als eine absolute bezeichnet werden kann.

Als Beispiel sei zunächst das schon beschriebene Meerschweinchen 6 erwähnt, welches etwa 1 Mon. nach der Impfung mit D mit der hohen Dosis von 0,5 ccm Serumkultur des Ausgangsstammes subkutan geimpft wurde. Die sofortige Untersuchung mit der Kapillare ergab reichlich Kapselbazillen, keine Zellen. Nach 2 Std. ungefähr der gleiche Befund, aber viele Bazillen als dünne, kapselfreie Fäden. Nach 4 Std. traten in dem bereits fühlbaren Oedem Leukozyten auf, hier und da mit Phagozytose. Freie Bazillen vermindert, mit und ohne Kapsel, nach 8 Uhr ungefähr das gleiche Bild. Nach 24 Std. hatte sich an der Impfstelle eine rote, weiche Schwellung ausgebildet, aus der sich eine dickliche Flüssigkeit mit Leukozyten und Phagozytose, ferner nebeneinander bekapselten und kapselfreien Bazillen gewinnen ließ. Am nächsten Tage war das Oedem bis auf ein rasch zurückgehendes Knötchen verschwunden. Sehr zahlreiche über Agarplatten angelegte Serumkulturen aus den Entnahmen ergaben ausnahmslos Kapselbildung.

Schon 4 Tage danach wurde die subkutane Impfung mit 2 ccm Kultur wiederholt. Der mikroskopische Befund der Entnahmen war ungefähr der gleiche, Phagozytose nachweisbar, ohne hohe Grade zu erreichen. Nach 24 Std. fand sich ein Oedem, das aber keinen Bazillenfund lieferte und unter Verhärtung rasch zurückging.

Nach weiteren 5 Tagen erhielt das Tier neuerlich den Satz von 5 ccm virulenter Serumkultur unter der Haut. Der Befund entsprach zunächst ganz dem früheren; nach 24 Std. hatte sich eine gut abgegrenzte, pflaumengroße Anschwellung gebildet, in der Leukozyten mit wenig Phagozytose, bekapselte und kapselfreie, aber sonst als tierisch anzusprechende Bazillen vorhanden waren. Solche fanden sich noch in dem Infiltrat, das nach 48 Std. entstanden war, nicht mehr nach 70 Std.

Nach weiteren 11 Tagen erhielt das Tier 0,5 ccm virulenter Serumkultur intraperitoneal. Zu Beginn waren bei der Kapillarentnahme fast keine Zellen, sehr zahlreiche, zum guten Teil bekapselte Bazillen zu finden. Nach 2 Std. war die Zahl kapselloser und bekapselter Stäbchen sehr gesunken. Zellen zum Teil mit Phagozytose traten auf. Nach 4 und 8 Std. stiegen die Leukozyten unter nicht seltener Phagozytose weiter an, die Zahl der Bazillen, die zum großen Teil bekapselt waren, sank stark ab. Nach 24 Std. waren sie in der eitrigen Bauchhöhle sehr spärlich und nach 48 Std. nicht mehr zu finden. Das Tier überstand auch diese Infektion ohne Schaden.

Ganz ähnlich verliefen Versuche an den Meerschweinchen 14, 17 und 18, die aber dreimal subkutan mit D (0,5, 1 und 5 ccm, 0,5, 1 und 4 ccm, 0,5, 2 und 5 ccm Serumkultur) vorbehandelt worden waren. Meerschweinchen 14 vertrug 0,5 ccm, nach 10 Tagen neuerlich 2 ccm, nach weiteren 6 Tagen 5 ccm virulenter Serumkultur des Ausgangsstammes subkutan ohne Schaden und schließlich 0,5 ccm intraperitoneal.

Meerschweinchen 17 und 18 wurden subkutan mit 0,5, 2 und 5 ccm der gleichen virulenten Serumkultur subkutan in Intervallen geimpft und zeigten, von geringen Lokalerscheinungen abgesehen, nicht die geringste Krankheit, während Kontrolltiere nach 30—48 Std. typisch starben. Die erlangte Immunität war also bei einer so schwer zu immunisierenden Tierart, wie das Meerschweinchen, eine vollkommene.

1) Bei allen Vorbehandlungen wurden immer Kapillarentnahmen gemacht und die von da über Agarplatten gewonnenen Kolonien in Serumkulturen, deren Zahl sich auf mehrere Hunderte belief, überimpft. Die Befunde entsprachen immer den früher geschilderten.

Nachdruck verboten.

Bakteriologische und klinische Untersuchungsergebnisse bei Encephalitis lethargica.

[Aus dem Staatlichen Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten
Saarbrücken und dem Knappschaftskrankenhaus Sulzbach.]

II. Mitteilung.

Von Prof. Dr. Hilgermann, Dr. Lauxen, Charlotte Shaw,
Direktor des Instituts, Chefarzt des Krankenhauses, wissenschaftliche Hilfs-
arbeiterin des Instituts.

Hierzu 2 Tafeln.

In Nr. 16 der Med. Klin. 1920¹⁾ berichteten wir über bakteriologische Befunde bei Encephalitis leth. Soweit es noch das Abklingen der Epidemie in den nächsten 2 Monaten nach unseren ersten Beobachtungen über die fragliche Erregernatur der Erkrankung gestattete, wurden die gemachten Feststellungen zu ergänzen und auszubauen versucht. Ueber die Ergebnisse sei in nachfolgendem berichtet.

I. Klinische Beobachtungen.

Wie soeben erwähnt, kam bald nach Abschluß unserer 1. Arbeit über Encephalitis lethargica die Epidemie hierselbst zum Erlöschen, und wir wurden dadurch der Möglichkeit beraubt, an neuen Fällen weitere Beobachtungen zu machen. Dagegen erlauben uns die Einrichtungen des Saarbrücker Knappschaftsvereins, unsere ehemaligen Patienten, soweit sie Bergleute sind, jederzeit wieder zu erreichen. Wir nützten diese Gelegenheit aus und unterzogen sämtliche, zu unserem Krankenhause gehörenden Bergleute, die wir wegen Encephalitis behandelt hatten, im Oktober und November, also etwa $\frac{1}{2}$ Jahr nach durchgemachter Erkrankung, einer eingehenden Untersuchung. Das hierbei gewonnene Resultat ist ein recht trauriges. Von den Untersuchten ist kein einziger vollkommen gesund. Alle leiden noch mehr oder weniger an Folgeerscheinungen der Erkrankung oder haben die Primärsymptome noch nicht völlig verloren.

Im ganzen haben wir 18 Fälle schwerer, ausgesprochener Encephalitis lethargica klinisch behandelt. Nur diese berücksichtigen wir statistisch. Die leichteren Fälle und die zahlreich vorgekommenen Formen frustes, die vielfach ganz oder teilweise ambulant behandelt wurden, lassen wir hier außer Betracht. Wir hoffen, später einmal auf sie zurückkommen zu können. Von den 18 Fällen kamen 7 zum Exitus. Die überlebenden 11 haben wir bis auf 2 nachuntersucht. Von den 2 nicht erreichbaren soll einer, ein Kaufmann, nach Aussage seines Bruders, der Arzt ist, körperlich und geistig vollkommen wiederhergestellt sein.

1) Hilgermann-Lauxen-Shaw, Bakteriolog. u. klin. Untersuchungsbefunde bei Encephalitis lethargica. Protozoen als Krankheitserreger.

Von dem anderen, einem inzwischen ins rechtsrheinische Deutschland verzogenen Arbeiter, wissen wir, daß er beim Wegzug noch an den Nachfolgen der Erkrankung zu leiden hatte.

Wir müssen es uns leider versagen; die ganzen Statistiken der 9 Nachuntersuchten hier wiederzugeben. Nur das Auffallendste daraus sei erwähnt:

Von den 9 klagten 5 über starke Schläfrigkeit, die zum Teil einen recht hohen Grad erreicht. 1 gibt z. B. an, daß er immer noch hin und wieder beim Essen einschlafe. 3 von den 4 Restierenden leiden unter Schlaflosigkeit. Bei einzelnen besteht neben Schläfrigkeit am Tage nächtliche Schlaflosigkeit. Die Arbeitsfähigkeit aller 9 hat durch die Krankheit wesentlich gelitten. Sie sind, bis auf 1 Arbeiterin, sämtlich Bergleute. Keiner von ihnen ist mehr imstande, die wesentlichste und schwerste bergmännische Arbeit, die des Hauers vor dem Stoß, zu verrichten; sie sind mit leichteren und schlechter bezahlten Arbeiten in der Förderung oder über Tag beschäftigt. Die Arbeiterin hat ihre Lohnbeschäftigung ganz aufgeben müssen. Weit über die Hälfte klagt über Gedächtnisschwäche, diejenigen, die geistig etwas regsamer waren als der Durchschnittsarbeiter, geben fast alle an, daß ihr Denkvermögen gelitten habe. 2 erklären spontan, dauernd unter gemüthlicher Verstimmung zu leiden. Bei einem weiteren Nachuntersuchten veranlaßte uns eine sehr schwere Depression mit kataleptischen Zuständen zur Ueberführung in eine Heil- und Pflegeanstalt. Ueber verschlechtertes Sehen klagten 3, über noch bestehende Krampfzustände in einzelnen Muskelgruppen ebenfalls 4. Ueber Kopfschmerzen wird noch von zweien berichtet.

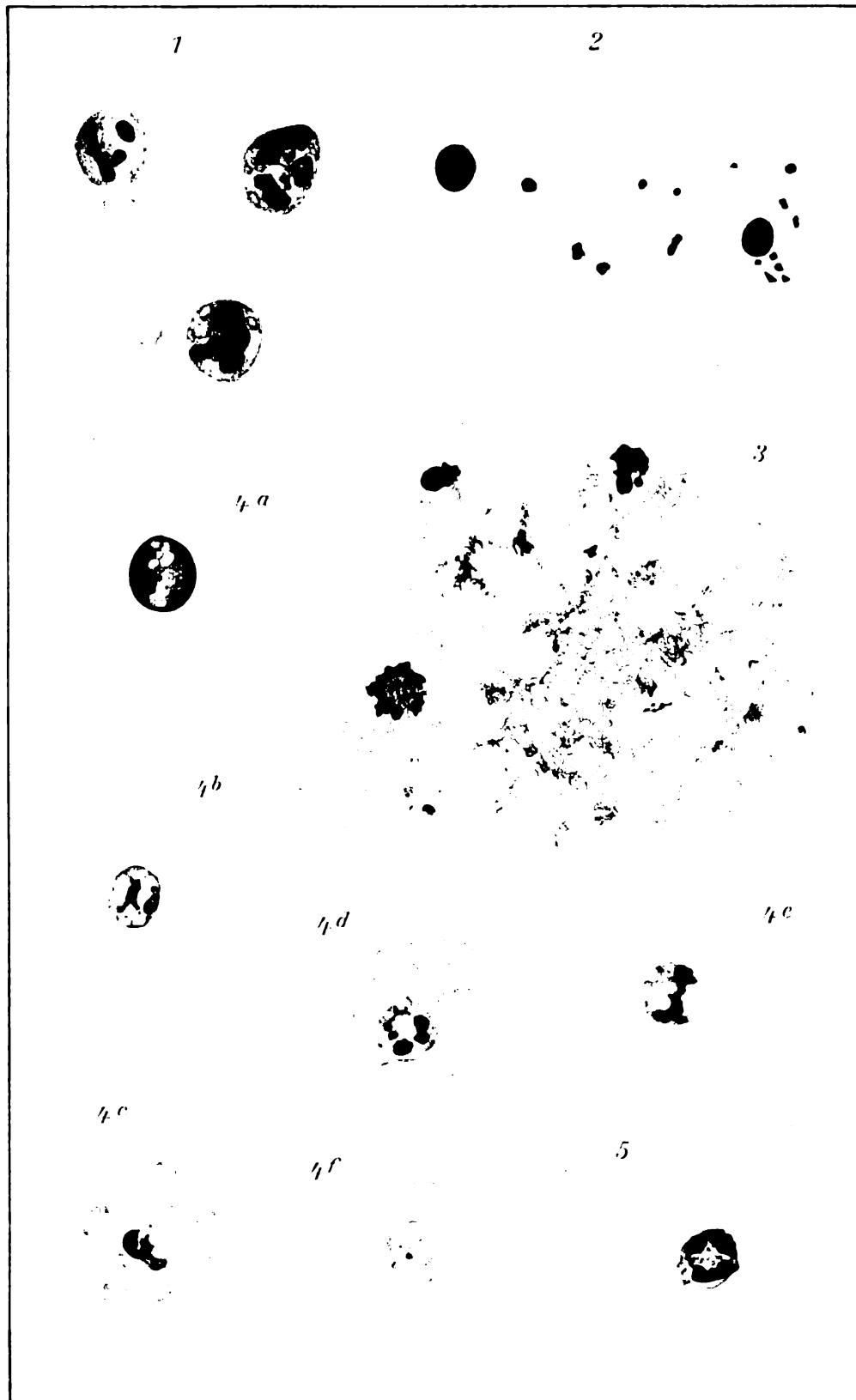
Die sämtlichen vorgebrachten Beschwerden erscheinen nach dem ganzen Befunde vollkommen glaubhaft. Es liegt auch bei keinem ein Anlaß zur Uebertreibung oder gar zur Simulation vor. Trotzdem sind die objektiv nachweisbaren Erscheinungen im Vergleich zu den Klagen verhältnismäßig gering. Allerdings fallen bei nicht weniger wie 5 starre Gesichtszüge auf, bei dem in die Irrenanstalt Verbrachten war das Gesicht noch direkt maskenartig. 5 leiden noch an Augenmuskelerkrankungen, die jedoch bei keinem sehr hochgradig sind. Lidflattern bei geschlossenen Augen und Nystagmus wurde bei 2 weiteren bemerkt. Ganz intakt ist das Auge bzw. seine Umgebung bei keinem. 2 haben noch einen zeitweiligen Kieferkrampf. Zuckungen klonischer Art wurden ebenfalls bei 2 beobachtet. Grobe Veränderungen der Sehnen-, Haut- und Schleimhautreflexe waren bei keinem nachweisbar. Auch fand sich bei niemand eine hochgradige Veränderung der Organe der Brust- und Bauchhöhle, die man auf die Encephalitis beziehen könnte.

Aus den ganzen Nachuntersuchungen gewinnt man den Gesamteindruck, daß die Encephalitis lethargica, soweit sie in schwerer Form auftritt, fast ausnahmslos eine starke Herabsetzung der körperlichen und ganz besonders der geistigen Leistungsfähigkeit im Gefolge hat. Sie ist deshalb von Geistesarbeitern sehr zu fürchten.

Die leichten Fälle scheinen im Gegensatz hierzu in der Mehrzahl vollkommen auszuheilen. Können wir hierüber auch kein einwandfreies statistisches Material liefern, so kennen wir doch eine ganze Reihe derartiger Erkrankter, die von ihren körperlichen und geistigen Fähigkeiten nicht das Geringste eingebüßt haben.

II. Bakteriologische Beobachtungen.

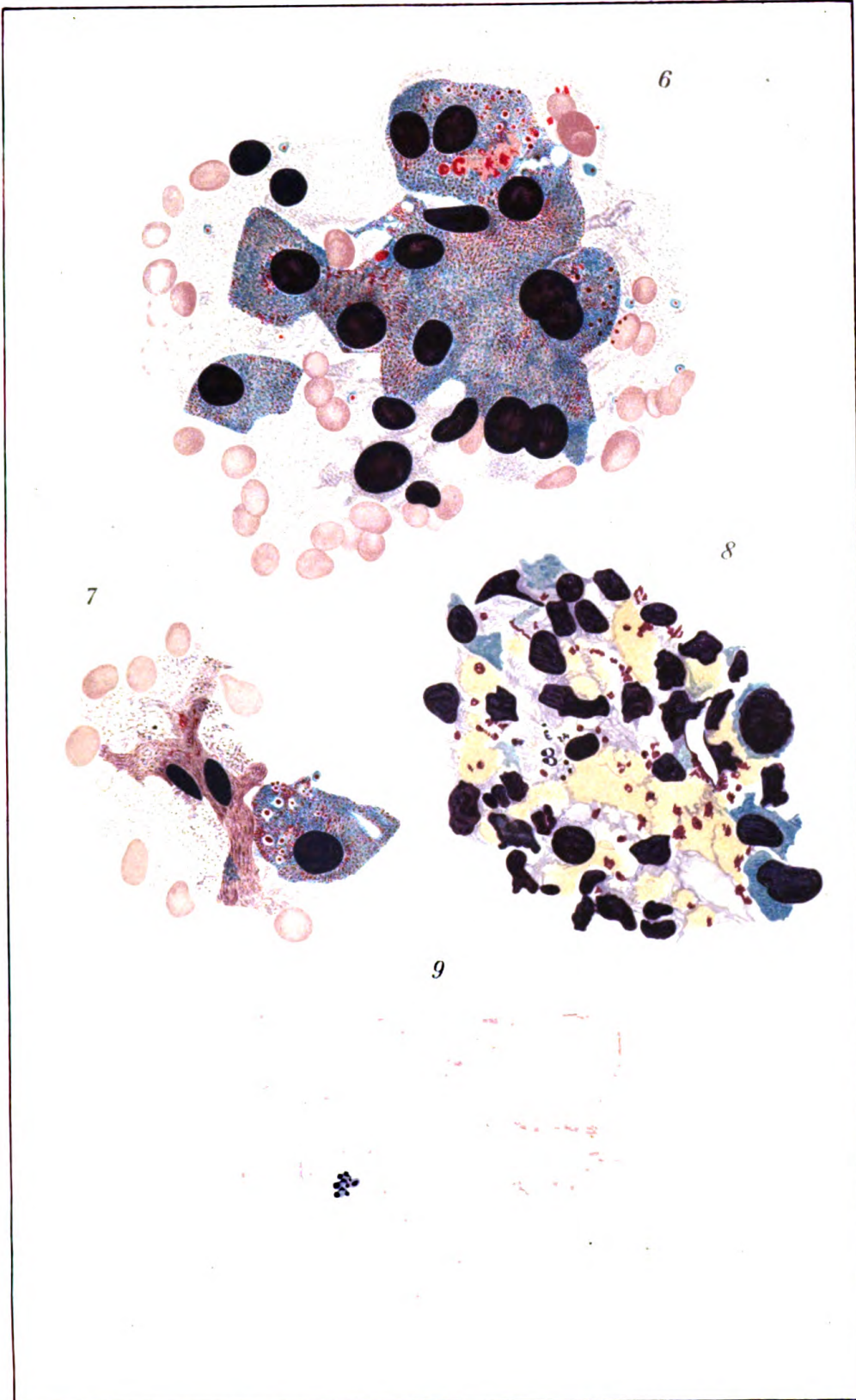
Was die Lebendbeobachtung der von uns als Erreger der Erkrankung gedeuteten Gebilde anbetrifft, so wurden dieselben im Dunkelfeld sowohl im Blut, der Blutanreicherung als auch im Leberpunktat gesehen.



E. Schulz-Heine gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

P. Weise lith. Jena



E. Schultzenhenke gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

P. Weise Lith. Jena.

Im Dunkelfeld sind diese Gebilde bei fieberhaften schweren Erkrankungensfällen verhältnismäßig leicht, besonders innerhalb weißer Blutkörperchen, aufzufinden. Bei leichteren Erkrankungsfällen findet man sie erst und nur vereinzelt nach Durchsicht vieler Präparate. Innerhalb der weißen Blutkörperchen erscheinen sie als runde, kleine Bläschen von rotierender Bewegung, welche sich in ihrem Aufbau nicht differenzieren lassen.

Freiliegend sieht man sie als kleine, zarte, grünlich-gelb schimmernde birnen- und scheibenähnliche Gebilde, deren Endpole sich als stärker lichtbrechend hervorheben, auch kann man innerhalb des Bläschens selbst mitunter heller leuchtende Flecken erkennen. An einem Pol befindet sich oft ein stab- oder ruderförmiger oder auch aufgelockerter Fortsatz. Durch letztere scheinen sich diese Gebilde in rudernd-schwankender Bewegung fortzuweg.

Sind sie innerhalb der weißen Blutkörperchen als Bläschen erkennbar, kann man die nicht befallenen, also normalen Plasmateile gut differenzieren, bei anderen sieht man wieder das ganze Blutkörperchen wie durch eine mattleuchtende Verdichtung überdeckt.

Einmal sahen wir eine wellenförmige, lange, fadenähnliche, ca. 9 bis 12 μ lange Form, in ihrer Struktur einer in unregelmäßigen Abständen geknüpften Schnur vergleichbar, welche, an dem einen Ende breiter, bläschenförmig verdickt, sich durch peitschenartige, lebhaft schlagende Bewegungen fortzubewegen schien. Die größeren knotenförmigen Verdickungen waren stärker lichtbrechend. Kleine, in dieser Art zusammengesetzte, dann aber unbewegliche Formen waren öfters zu finden, anscheinend Teile vorbeschriebener Form.

Nach Giemsa gefärbte Präparate sowohl von Blutausrichen als auch dicken Tropfen erhärteten die Beobachtungen im Dunkelfeld, indem sie ergänzend zeigten, daß charakteristisch für diese Gebilde ihr Zellparasitismus ist. Die von den Gebilden befallenen Zellen zeigen aber insofern keine einheitliche Veränderung, als einmal diese Gebilde ihre Entwicklung nur im Plasma der Zelle, einmal auf dem Kern vollziehen. Ein großer Unterschied besteht dabei zwischen Blutzellen und Organzellen. In den Blutzellen von Ausstrichpräparaten oder dicken Tropfen sieht man diese Gebilde sich deutlich vom Plasma (Taf. I, Fig. 1) als Bläschen-Birnformen abheben. Sie bestehen aus dem blaugefärbten Plasma und teils zentral, teils peripher gelagertem Chromatin. Die zentrale Lagerung des Chromatins ist durchschnittlich bei den mehr bläschenförmigen, die periphere Anordnung bei den mehr birnförmigen oder länger ausgezogenen Formen ausgeprägt. Bei der Behandlung des Blutes mit Essigsäurelösung, wodurch etwa vortäuschende Granula der Leukozyten fortfallen, sieht man deutlich die Struktur dieser Gebilde in ihrer Gliederung in Plasma und Chromatin (Taf. I, Fig. 2 und 3). Auch sieht man hier die im Dunkelfeld beobachteten Scheibenformen mit den stärker hervortretenden Endpolen und die länglichen Formen mit der ruderförmigen Verlängerung an 1 Polende.

In Erkrankungsstadien mit sehr hohen Temperatursteigerungen zeigen diese Gebilde die Neigung (Taf. I, Fig. 4, Nr. a, b, c), den Kern mit in ihre Entwicklung hineinzuziehen. Zunächst siedeln sie sich an der breiten Basis der Kernsegmente an, von wo aus sie die ganze Form des Kernes überziehen, und scheinen hierdurch allmählich den Kern zu zerstören. Diese Lagerung dicht am Kern scheint nicht willkürlich, vielmehr scheint die Kernmembran günstige Verhältnisse für ihre Ent-

wicklung zu bieten. Schließlich erfolgt (Taf. I, Fig. 4, Nr. d, e) ein Austritt dieser Gebilde in Bläschenform. Diese Besitzergreifung von der Kernsubstanz der weißen Blutkörperchen beobachtet man auch in den zum Exitus führenden Fällen in den Ausstrichen des Leberblutes und der Organsubstanz. Hier erfolgt die Entwicklung anscheinend so schnell, daß man in den Leukozyten die Gebilde als die genaue vergrößerte Form des Kernes infolge Ueberwucherung feststellen kann. Es machte den Eindruck, als ob die Parasiten zu 3 oder 4 oder mehreren ineinander verschmolzen wären. Bei diesem Uebergreifen auf den Kern überziehen sie dann gewissermaßen in Form des Kernes diesen selbst. Hierbei sieht man deutlich bei Giemsa-Färbung die noch nicht überzogenen, aber noch blaurot gefärbten Teile des Kernes in ihrem natürlichen Zustand kleiner, die überwucherte Partie hingegen größer. Hat z. B. das Virus einen Schenkel völlig überzogen, so erscheint dieser Teil in einer vergrößerten, aber noch unveränderten Form. Erst bei weiterer Zerstörung, wenn dieser befallene Teil von dem Virus aufgezehrt wird, wird die ursprüngliche Form aufgegeben, der Kern zerstört.

Bemerkenswert ist das öftere Auftreten von eosinophilen Myelozyten, deren Kern starke Lappung mit schön rotvioletter Färbung aufweist und bei denen äußerst grobe Granula schmutziggrau, bisweilen mehr trübgraublau erscheinen. Außer Myelozyten treten auch, wenn auch geringer, Megaloblasten hervor.

In den Blutzellen des Leberpunktates haben wir die Gebilde auch noch in der Ausbuchtung des Plasmas (Taf. I, Fig. 5) zwischen den Kernsegmenten gefunden. Stets waren im Leberpunktat verhältnismäßig viel mehr Zellen derartig befallen als im strömenden Blut zur gleichen Entnahmezeit.

In den Organzellen selbst haben wir Kernzerstörungen in vorgenanntem Sinne nicht beobachten können. Hier sahen wir diese Gebilde nur innerhalb des Plasmas, in welchem sie sich verschieden weit ausbreiteten, ohne aber den Kern in Mitleidenschaft zu ziehen. Ihre Entwicklung erfolgt hier hauptsächlich in den Randpartien der Zelle, von wo aus auch Austritte (Taf. II, Fig. 6, 7) zu beobachten waren.

Reichlich fanden wir diese Gebilde in der Ventrikelflüssigkeit, hier aber nicht intrazellulär, sondern mehr den zerrissenen Gebilden gleichend, wie wir sie beim Tierversuch (siehe später) beobachten konnten.

Auch Levaditi¹⁾ stellte in den Lymphräumen einer Anzahl Kapillaren der grauen Substanz Häufchen von regelmäßig geformten Körperchen mit einem Durchmesser von 4–5 μ fest, welche aus einer zentral gelagerten Chromatinmasse und blaugrün gefärbtem Plasma bestanden (Färbung nach Unna). Die Deutung dieser Körperchen läßt Levaditi unklar²⁾.

Daß die von uns beschriebenen Gebilde nicht etwa aufgenommene Reste zerfallener Leukozyten sind, läßt sich bei sorgfältiger Giemsa-Färbung leicht erkennen. Die für diese Gebilde charakteristische, sich immer wiederholende Grundform als Bläschen, Birnenform, amöboide

1) Levaditi, *Bullet. et Mém. Soc. méd. des Hôpit. de Paris*. 1920. No. 5–7.

2) Anmerkung bei der Korrektur: Ebenso wies Mittasch (*Med. Kl.* 1921. 5) in den Ganglienzellen Zelleinschlüsse nach, teils kleine scheibenförmige runde oder längliche Gebilde, teils als Konglomerat kleiner, kommaförmiger Körperchen, oft in rosettenförmiger Anordnung.

Ausbreitung beweist, daß diese Gebilde fremde, einem bestimmten Virus eigentümliche Formen sind.

Letztere Beobachtung scheint auch gegen die Annahme zu sprechen, daß es sich vielleicht um Veränderungen im Plasma infolge Reizung durch ein unbekanntes Virus handeln könnte.

Umfassende Untersuchungen mit Blut andersartiger fieberhafter Erkrankungen, Blut von Luetikern, Malariakranken und normalen Blutes ließen stets diese Gebilde vermissen. Nur in einem Fall von Leukämie fanden wir annähernd ähnliche Gebilde in den Zellen der Milz und Leber, jedoch keineswegs in der für die bei Encephalitis leth. beobachteten Gebilde typischen Form. In den Leukozyten der Organe dieser leukämischen Erkrankung konnten wir Einlagerungen irgendwelcher Art nicht feststellen¹⁾.

Wären weiterhin diese Gebilde etwa Zerfallsprodukte des Kernes, oder handelte es sich um einen Uebertritt von Kernsubstanz ins Plasma, dann müßte dieses durch eine Veränderung des Kernes betreffend seiner Form, seiner Färbung angedeutet sein, es müßte bei einer Kernzertrümmerung, resp. Austritt von Kernsubstanzen die Veränderung vom Kern selbst ausgehen. Bei den Befunden bei Encephalitis leth. hingegen erfolgt die Kernveränderung erst durch das Besitzergreifen des Gebildes infolge Ueberwucherung der Kernmembran, Ausbreitung auf den Kern selbst und spätere Zerstörung des Kernes. Auch erfolgt diese Besitzergreifung des Kernes nur bei bestimmten Krankheitsperioden, ist sowohl bezüglich Blut- oder Organzellen als auch des Krankheitsverlaufes verschieden.

So sehen wir als Beweis dafür, daß diese Gebilde nicht Kernprodukte sind, in den Organzellen diese Gebilde nur innerhalb des Plasmas, in welchem sie sich verschieden weit ausbreiten, sogar die Neigung zeigen, sich in der äußeren Peripherie der Zelle zu entwickeln. Dieses Verhalten tritt besonders deutlich bei Giemsa-Färbung hervor, indem die Kerne der Organzellen die typisch tief lilarote, gleichmäßige Kernfärbung des homogenen ungelokerten Kernes zeigen (Taf. II, Fig. 6, 7, 8). Bei den Blutzellen findet man ebenfalls diese Gebilde hauptsächlich im Plasma, ohne den Kern in Mitleidenschaft zu ziehen. Erst in bestimmten Krankheitsperioden, als bei hohen Temperatursteigerungen, tiefstem Stadium der Schlafsucht, findet man bei den befallenen Blutzellen (gemäß Taf. I, Fig. 4) auch die Kerne in der bereits beschriebenen typischen Weise in Mitleidenschaft gezogen.

Die Annahme, daß etwa diese in der Zelle vorhandenen fremdartigen Gebilde als Reaktionsprodukte der Zelle auf das unbekanntes eingedrungene Virus aufzufassen wären, möchten wir ablehnen, da wir diese Gebilde im Dunkelfeld mit Eigenbewegung ausgestattet sahen. Ferner zeigen diese von uns beobachteten Gebilde, selbst wenn sie dicht aneinander liegen, nie die zusammengeschlossene Form eines sogenannten Einschlusses, wie bei Variola z. B., sondern machen an der Stelle ihres Auftretens mehr eine selbständige Entwicklung, resp. Verbreitung durch. Auch die Verschiedenartigkeit der Form dürfte durch letzteres bestimmt sein, ferner weisen sie Chromatin auf und zeigen verschiedene Entwicklungsphasen.

Zahlreiche Untersuchungen wurden mit defibriniertem Blut durchgeführt. Sie boten den Vorteil der Beobachtung dieser Gebilde in

1) Vgl. Wechselmann u. Hirschfeld, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 66. H. 3/4.

natürlichem Zustande, auch brauchte man Quellungen nicht zu befürchten, und ließen sich Verwechslungsmöglichkeiten mit Gewebsbestandteilen oder Abfallsprodukten aus dem Blutplasma ausschalten. In diesen defibrinierten, mit Natrium citr.-Lösung behandelten Patientenblutes, waren gleichfalls diese Gebilde gut differenzierbar.

Weiterhin konnten wir bei einer Rekonvaleszentin, einer der schwerst Erkrankten, welche sich unter Chinin-Salvarsan-Therapie allmählich erholt hatte, aber immer noch über Krankheitsgefühl, Mattigkeit und öftere Temperatursteigerung klagte, in der Rekonvaleszenz 2 Monate später die gleichen Gebilde nachweisen, jetzt aber nur noch in Blutanreicherungen. Bei ihr waren, der Schwere der Erkrankung entsprechend, während derselben zahlreiche Parasitenformen bereits im Blutaussstrich nachzuweisen gewesen. Bei dieser Rekonvaleszentin war Blut sowohl im natürlichen Zustande als auch defibriniert in Natrium citr.-Kochsalzlösung gegeben worden. In letzterem Falle erschienen diese Gebilde viel klarer und reichlicher, in ihrer Form auch deutlicher ausgeprägt als in ersterer Anreicherung. Man wird nach diesen Befunden an Virus-träger denken müssen¹⁾.

Nach Rogers durchgeführte Kulturversuche mittels Anreicherung in Natriumcitrat-physiol. Kochsalzlösung bei 22° bewirkten zunächst eine weitere Entwicklung der fraglichen Gebilde in der Weise, daß die sonst in Blutaussstrichen kaum erkennbaren einzelnen kleinen, bläschenförmigen Gebilde in der Zelle in ihrer Entwicklung nicht gehemmt waren, sondern größer und deutlicher sich entfalten konnten. In den hierdurch in ihrer Entwicklung geförderten Gebilden sah man nunmehr das Chromatin viel deutlicher und prägnanter hervortreten (Taf. II, Fig. 9).

In 2 Fällen, und zwar bei Schwererkrankten im Anfangsstadium der Erkrankung vor Einleitung jeder spezifischen Therapie, konnten wir dann weiterhin lang ausgezogene, birnenförmige Gebilde mit sich verjüngendem, geißelartigem Fortsatz auswachsen sehen.

Weitere Kulturversuche waren, da inzwischen stets sofort die spezifische Therapie (Chinin-Salvarsan) in den Krankenhäusern eingeleitet wurde, erfolglos. Auch machte das Erlöschen der Epidemie Anfang Juni weitere diesbezügliche Versuche unmöglich.

Die roten Blutkörperchen zeigten keine typischen Formveränderungen, nur in der Färbung erschienen sie vereinzelt nach Giemsa bläulich verfärbt und mit punkt- bis stäbchenförmigen Auflagerungen.

Tierversuche.

Die Verimpfung von Patientenblutanreicherung auf Mäuse und Meerschweinchen rief ein charakteristisches Krankheitsbild hervor. Bei Mäusen wurde 0,5 ccm, bei Meerschweinchen 1 ccm verimpft. Die Impfung erfolgte sowohl intravenös als auch intraperitoneal.

In den ersten Tagen nach der Injektion zeigten die Tiere eine starke, abnorme Unruhe. Etwa am 3. Tage setzten die ersten Zeichen der Erkrankung ein. Die Tiere, — besonders die Mäuse, welche viel empfindlicher als Meerschweinchen waren — ließen im Fressen nach, verkrochen sich ängstlich in die im Behälter liegende Watte. Am 6. Tage zeigte sich schon bei geringster Berührung starke Empfindlichkeit. Die Tiere sahen außerordentlich matt, ausgesprochen kraftlos, aus, waren teilnahmslos, die Haare

1) Vgl. auch Netter, Soc. méd. des Hôpit. et Acad. de méd., April—Juillet 1920.

des Fells wie zusammengebacken. Das Gewicht verminderte sich zusehends, und verfielen die Tiere unter den Zeichen der Kachexie. Besonders hervortretend war die außerordentliche Abmagerung der Tiere bis zum Skelett. Bei Blutentnahmen in dieser Zeit zeigte das Blut eine auffallend schnelle Gerinnbarkeit, so daß glatte Blutaustriebe kaum noch anzufertigen waren. In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung trat bei der Blutentnahme aus der Wunde fast nur noch etwas Serum, aber kein eigentliches Blut mehr hervor. Der Exitus erfolgte meist am 10. Tage. Ueberstanden die Tiere die Erkrankung, so erholten sie sich nur sehr langsam, und blieben die Zeichen der Schwäche und Mattigkeit noch lange Zeit bestehen. Wenn wir auch unter dem Mangel an Tieren zu leiden hatten, so konnte doch immerhin eine Anzahl von Tieren — Mäuse und Meerschweinchen — infiziert werden. Bei diesen glückte die Uebertragung resp. die Auslösung der Krankheitserscheinungen in 60 Proz. Von den erkrankten Tieren aus ließ sich durch weitere Verimpfung von Blut ein gleicher, wenn auch bedeutend schwächer ausgeprägter Symptomenkomplex bei neugeimpften Tieren erzielen. Mithin gelang es, eine Passage von Tier auf Tier zu erhalten.

Die Sektion der Tiere ergab als regelmäßige Zeichen eine auffallend weiche Leber, eine tiefdunkel verfärbte, zerfließliche Milz. Das Blut war in den einzelnen Organen, besonders auch im Herzen, kaum noch vorhanden. Am ausgeprägtesten waren, wie bereits betont, diese Erscheinungen bei weißen Mäusen, bei Meerschweinchen geringer hervortretend.

In den von den geimpften Tieren gefertigten Blutaustriechen sah man die Leukozyten nicht derart befallen wie beim Kranken. Die Gebilde selbst waren, wie bereits früher hervorgehoben, noch nachweisbar, jedoch anscheinend nicht vermehrt. Es dürfte dies mehr auf eine Wirkung von Toxinen hindeuten, zumal bei der 2. Passage diese Gebilde nicht mehr nachweisbar waren.

Aërobe und anaërobe Züchtungsversuche auf den verschiedenartigsten Nährböden mit Zusatz von menschlichem Eiweiß, desgleichen Anreicherung des Blutes, Leberpunktats, Spinal-, Ventrikelflüssigkeit blieben stets steril. Die von manchen Seiten angegebenen Bakterienbefunde lassen sich wohl mit der leichteren Ansiedlungsmöglichkeit pathogener Keime in dem durch das Virus bereits geschädigten Organismus erklären.

Nachdruck verboten.

Zur Biologie von *Oxyuris vermicularis*

Von Prof. Dr. E. Rodenwaldt, Heidelberg und
Dr. W. Röckemann, Frankfurt a. M.

Die Biologie der Helminthen ist ein Gebiet der Ueberraschungen. Es sei nur an die Ergebnisse der letzten Jahre über die Wanderung der Ascariden und den mehrfachen Wirtswechsel bei *Bothriocephalus latus* erinnert. Trotzdem widerstreitet es unseren biologischen Erfahrungen stracks, wenn wir einem Tatbestand begegnen, welcher darauf hindeutet, daß ein darmbewohnender Nematode seine volle Entwicklung in ein und demselben Wirt erfährt, d. h. seine Entwicklung von dem im Wirtskörper abgesetzten Ei zur Larve in demselben Wirtskörper weiterführt.

Wir haben über die nachstehende Beobachtung zu berichten:

Am 29. Sept. 19 kam eine Patientin von 21 Jahren mit folgender Anamnese zur Aufnahme in klinische Behandlung.

Schon in den ersten Schuljahren häufig Leibschmerzen und Durchfälle mit Schleimbeimengungen. Im Alter von 15—18 Jahren Durchfälle, deren fader Geruch auffiel, ebenfalls wieder mit Schleimbeimengung, die jedoch ohne Tenesmen entleert wurden. 1916 Schmerzen in der rechten Oberbauchgegend (über welche die Pat. auch jetzt noch klagt). Man nahm damals zuerst ein Duodenalgeschwür an. Später wurde eine Appendektomie gemacht, ohne daß eine Besserung der Beschwerden eingetreten wäre. Die Beschwerden der Pat. in den letzten Jahren waren Schmerzen nach dem Essen in der Magengegend, die zur Schulter ausstrahlten, Druckschmerzhaftigkeit der Oberbauchgegend, Schmerzen im Leibe nach Aufregungen. 1917 suchte die Pat. deshalb zum ersten Male die Klinik auf. Da weder Röntgen-Untersuchung spez. Nieren-, Magenuntersuchung und Untersuchung in der Frauenklinik irgendwelchen Anhaltspunkt für eine organische Grundlage der Beschwerden abgaben, wurde mit großer Wahrscheinlichkeit, auch auf Grund anderer Stigmata, an eine psychogene Grundlage der Beschwerden gedacht. Jedoch wurden damals nach den Notizen des Krankenblattes zahlreiche dünne Stühle mit Schleimbeimengung beobachtet, in deren Schleim Leukozyten und Erythrozyten nachweisbar waren. Die Terpentinguaajakprobe war negativ.

Bei ihrer diesmaligen Aufnahme (am 29. Aug. 19) zeigten sich ebenfalls wieder schleimhaltige, dünne Stühle von auffallend widerlichem Geruch und saurer Reaktion. Guaajakprobe wiederum negativ.

Der Stuhl wurde diesmal sofort auf Parasiten untersucht und es fanden sich in zahlloser Menge lebhaft bewegliche Wurmlarven von Rhabditis-Form, welche ihrer Größe und Morphologie nach zunächst als Larven von *Strongyloides stercoralis* aufgefaßt wurden. Jedoch blieb die sofort angesetzte Kultur mit einem Tierkohle-Stuhlbrei ohne Ergebnis und bei den in den nächsten Tagen dauernd in gleicher Weise von der Pat. mit dem dünnen Stuhl ausgeschiedenen Larven fiel die Größendifferenz einzelner Würmer auf. Wurmeier irgendwelcher Entwicklungsgrade wurden niemals gefunden. Die genauere Untersuchung eines auffallend großen, bereits makroskopisch erkennbaren Würmchens ergab dann mit großer Wahrscheinlichkeit, daß es sich um *Oxyuris vermicularis* handelte, und die weitere Untersuchung der lebenden und fixierten Larven zeigte daß es tatsächlich *Oxyuris*-Larven in allen Entwicklungsstadien waren, vorwiegend Weibchen mit beginnender Entwicklung der Genitalien, daneben auch ziemlich zahlreiche Männchen.

Pat. schied diese Larven täglich in großen Mengen aus bis zum 9. Sept. 19, dem Tage, wo Santonin verordnet wurde und woran sich dann eine auf 6 Wochen berechnete ambulante Wurmkur mit Naphthalin, Alum. subacet., Einlaufen von essigs. Tonerde anschloß. In den ersten Tagen der Kur wurden im durchgespülten Stuhl auch reife Weibchen gefunden.

Bei der Entlassung der Pat. und in den nächsten 6 Wochen wurden weder Wurmlarven noch Wurmeier jemals wieder festgestellt.

Hinzuzufügen ist noch, daß Pat. vor der Kur eine Eosinophilie von 12 Proz. gezeigt hatte, während nach der Kur die Zahl der eosinophilen Zellen auf die Norm sank. Jedoch bleibt zu betonen, daß die subjektiven Beschwerden der Pat. ihrer Angabe gemäß nach der Kur nicht behoben waren. Sie hat später die Poliklinik nicht wieder aufgesucht.

Das parasitologisch Interessante an diesem Fall ist das Erscheinen junger *Oxyuris*-Larven im Stuhl. Wir sind wegen dieser eigenartigen, jeder Erfahrung über die Biologie von *Oxyuris vermicularis* widersprechenden Beobachtung mit 2 erfahrenen Parasitologen in Verbindung getreten, von denen der eine sich speziell mit diesem Nematoden befaßt hatte, und erhielten die Antwort, daß es ausgeschlossen sei, daß das Ei von *Oxyuris* sich bereits im Dickdarm weiterentwickle. Jedoch wurden von dem genannten Herrn, dem wir alsdann Präparate zusandten, die Würmchen ebenfalls als junge *Oxyuris* diagnostiziert. An der Tatsache, daß es sich um *Oxyuris* handelte, ist kein Zweifel möglich.

Nach der bisher gültigen Lehre infiziert sich der Mensch mit den vom Weibchen nach der Auswanderung in der Umgebung des Anus abgesetzten, mechanisch per os aufgenommenen Eiern. Wir haben Larven aller zunehmender Entwicklungsstadien zwischen Magen und Coecum zu erwarten. Dort, im Coecum, soll der Wurm, gereift, stationär werden;

die Männchen schreiten zur Begattung, gehen dann wahrscheinlich zugrunde, die Weibchen begeben sich dann nach vollendeter Heranreifung der Eier durch den Dickdarm hindurch ins Freie und legen alsbald dort die Eier ab.

In unserem Falle fanden sich im Stuhl weder reife Weibchen noch Eier, sondern vorwiegend jüngste, zum Teil auch etwas ältere, aber durchweg unreife Würmer im Stuhl, und zwar in ungeheuren Mengen.

Zwei Möglichkeiten bestehen. Die eine würde mit der bisherigen Auffassung vereinbar sein. Nimmt man nämlich an, daß Pat. sich längere Zeit fortdauernd mit ungeheuren Mengen reifer *Oxyuris*-Eier infiziert hätte, vielleicht sogar ganze, reife Weibchen zufällig verschluckt hätte, so könnte bei der Unregelmäßigkeit ihrer Darmtätigkeit — es wäre auch an das Fehlen des Appendix und narbige Veränderungen im Coecum zu denken — die Durchwanderung der sich entwickelnden Larven durch den erkrankten Darmtraktus sehr rasch erfolgt sein, so rasch, daß eine Ansiedelung der Larven an den normalen Fundorten im oberen Dickdarm nicht stattfand, die Larven also noch unreif im Stuhl erschienen. Gegen diese Erklärung, die man am ersten annehmen möchte, spricht aber, daß Pat. auf bestimmtes Befragen in Abrede gestellt hat, in den letzten Monaten Oxyuren ausgeschieden zu haben, geschweige denn, an ihnen gelitten zu haben. Allerdings will sie vor Jahren Oxyuren bei sich bemerkt haben. Weiter ist aber diese Erklärung unwahrscheinlich angesichts der gleichmäßigen, von uns 11 Tage lang beobachteten Ausscheidung von Larven ziemlich gleicher Größe und Entwicklung. Noch am letzten Tage vor der Kur waren die kleinsten Larven nicht größer als am 1. Tage. Während der ganzen Zeit aber haben wir im Stuhl niemals ein erwachsenes *Oxyuris*-Weibchen zu Gesicht bekommen; eine sukzessive Neuinfektion war daher nicht anzunehmen.

Es bleibt daher mehr Wahrscheinlichkeit für eine 2. Annahme, daß doch, entgegen der dogmatischen Auffassung der *Oxyuris*-Biologie, eine Entwicklung im Darm stattfinden kann, vielleicht nur unter den besonderen Verhältnissen einer pathologisch veränderlichen Schleimhaut oder unter pathologischen Verhältnissen der Darmfunktion.

Wenn aber, wie es hier der Fall war, eine Entwicklung von *Oxyuris* auch im Dickdarm von Ei zur Larve stattfinden kann, so erscheint es auch nicht ausgeschlossen, daß die so entwickelten Würmer nicht den Weg ins Freie antreten oder durch dünnen Stuhl fortgetrieben werden, sondern daß sie sich an Ort und Stelle ansiedeln, daher auf diese Weise im Dickdarm selbst eine fortdauernde Neuinfektion stattfinden kann.

Dieser eine Fall genügt keineswegs, um eine Entscheidung über ein so eigenartiges Verhalten des Parasiten herbeizuführen, über dessen Lebenslauf wir völlig klar zu sehen glaubten. Beide Erklärungen stehen zur Wahl; wir verkennen nicht, daß die erste lieber ergriffen werden wird, um die Ketzerei der zweiten zu vermeiden. Aber es bleibt daran zu erinnern, wieviel Fälle wir kennen, in denen erwachsene Menschen, deren Zeugnis zuverlässig ist, jahrzehntelang unter *Oxyuris* leiden, wie sie trotz peinlichster Sauberkeit und Innehaltung aller erdenklichen Vorschriften die lästigen Parasiten immer wieder erscheinen sehen und durch die Quälgeister in unangenehme nervöse Zustände kommen. Wenn es möglich ist, daß sich *Oxyuris* im Dickdarm entwickelt, ohne den Weg über die Außenwelt und von dort her durch den oberen Teil des Darmtraktus zu nehmen, so wären diese häufig so rätselvollen und klinisch

gegenüber den bestimmten Angaben der Patienten schwer zu deutenden Fälle chronischer Oxyuriasis beim Erwachsenen erklärt.

Wenn nicht die allgemein übliche Vernachlässigung der Untersuchung des frischen Stuhlpräparates im klinischen Betrieb zugunsten einseitig geübter bakteriologischer Methoden dem entgegenstände, könnte man wohl erwarten, daß ähnliche Beobachtungen hie und da zur weiteren Klärung dieses Problems beitragen könnten.

Nachdruck verboten.

Ueber Selbstbereitung von bakteriologischer Peptonlösung und über Trypsinbouillon zur Prüfung auf indolbildende Bakterien.

[Aus dem Städt. Hygienischen Universitäts-Institut in Frankfurt a. M. (Dir.: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Neisser).]

Von Dr. Walther Frieber.

Seit Anfang 1920 haben wir im Hygienischen Institut unseren ganzen Jahresbedarf, entsprechend etwa 15 kg Trockenpepton, in Form von Peptonlösung gewonnen, und möchten, da wir mehrere 1000 M. erspart haben, in der Absicht, auch die Schwesterinstitute, soweit sie noch nicht zur Selbstdarstellung des Peptons übergegangen sind, durch Mitteilung unserer Erfahrungen zu eigenen Versuchen anregen.

Peptone sind bekanntlich die durch Hitze oder Säuren aus Lösung nicht fällbaren Bausteine des Eiweißes und können sowohl durch tryptische Spaltung mittels Trypsin oder Pankreatin in schwach sodaalkalischer Lösung, wie auch in salzsaurem Medium mittels natürlichen Magensaftes oder pepsinhaltiger, künstlicher Verdauungsflüssigkeit gewonnen werden. Beide Spaltungen sind aber nicht gleichwertig. Während die peptische Spaltung bei der Pepton-Albumosestufe halt macht, bleibt die Trypsinwirkung hier nicht stehen, sondern geht, ihren Abbau fortsetzend, bis zu den freien Aminosäuren.

Wenn auch Hottinger sowie Teruuchi und Hida in sehr beachtenswerten Arbeiten die tryptischen Peptone empfehlen, so scheint es, daß, von besonderen Fällen abgesehen, die Pepsinpeptone für die Bereitung der bakteriologischen Nährböden am zweckmäßigsten sind. Wir möchten daher in diesen Zeilen nur die Darstellung der Peptonlösung durch peptische Verdauung, wie es auch von Steusing geschehen, empfehlen, weil dadurch allein ein sicheres Arbeiten gewährleistet wird und andererseits noch die Möglichkeit besteht, die tiefergehende Spaltung mittels tryptischen Fermenten anzuschließen, worauf zum Schluß noch unter Trypsinbouillon zurückzukommen ist.

Als Ausgangsmaterial für die Peptonlösung kommt wohl nur Fibrin in Frage, welches in den für bakteriologische Nährböden benötigten Mengen stets zu haben ist¹⁾.

1) Wir selbst sind durch das Entgegenkommen des Frankfurter Schlachthofes, namentlich durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Obertierarzt Berdel, dem dafür auch an dieser Stelle gedankt sei, niemals in Verlegenheit gekommen.

Gewässertes, weißes und mit der Hand abgepreßtes Fibrin von Pferd oder Rind mit etwa 25 Proz. Trockensubstanz wird in Flaschen zu etwa $\frac{1}{3}$ ihres Volumens eingefüllt. Sodann gibt man für jeden Liter Flascheninhalt 3—5 g Pepsinpulver hinzu und füllt mit Wasser, dem pro Liter 10 ccm konz. Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zugesetzt sind, auf, jedoch so, daß der Inhalt noch tüchtig geschüttelt werden kann. Das Fibrin quillt glasig unter Dunkelfärbung. Man schüttelt täglich mehrmals tüchtig durch, — bei größeren Mengen eignen sich am besten dazu sog. Rollflaschen bis zu 20 l Inhalt, nicht Ballons — und ersetzt die zunächst abnehmende Flüssigkeitsmenge durch obiges Salzsäurewasser. Die Flaschen können natürlich in den Brutschrank gestellt werden; wegen des täglich erforderlichen Schüttelns ist jedoch das Stehenlassen bei Zimmertemperatur wesentlich einfacher.

Die Verdauung setzt auch hier sofort ein; in demselben Maße aber wird die freie Salzsäure gebunden und verschwindet. Es ist deshalb darauf zu achten, daß die Salzsäurekonzentration durch Zugabe geringer Mengen stärkerer Säure (etwa 5 Proz.) so stark bleibt, daß Kongorotpapier schwach gebläut wird. Andernfalls kann die Verdauung zum Stillstand kommen. Ein Ueberschuß an Salzsäure ist aber ebenfalls zu vermeiden. Erst, wenn gegen Ende der Verdauung nach 10—14 Tagen fast alles Fibrin gelöst ist, darf die Reaktion bis auf lackmussauer heruntergehen. Dann hebert man die tiefbraune Lösung nach 2—3 Tage ruhigem Stehen mittels Gummischlauchs vom Bodensatz ab und achtet darauf, daß die auf der Oberfläche schwimmenden Fetteilchen nicht mit übergehen.

Bei größerem Verbrauch an Nährböden sei folgendes Rezept zur Darstellung der Peptonstammlösung empfohlen:

In einem Emailletopf von etwa 70 l Innenraum gibt man:

Fibrin		20 kg
Wasser	bis zu	60 l
konzentr. Salzsäure (1,19)		400 ccm

sodann nach gutem Mischen:

Pepsinum germanicum Witte	30—40 g
---------------------------	---------

Wenn durch öfteres Umrühren für eine gute Durchmischung gesorgt wird, so ist bei Zimmertemperatur am nächsten Tage das Fibrin größtenteils, nach 2 Tagen vollständig gelöst. Diese schwachsaure Verdauungsflüssigkeit, die etwa das spez. Gewicht von 1,016—1,020 hat, kann in dieser Form als Peptonstammlösung in der gleichen Weise wie Blutserum durch Zusatz von 1 Proz. Chloroform und Toluolüberschichtung monatelang aufbewahrt werden, falls man durch häufiges Schütteln der Flasche für gute Verteilung der Antiseptika sorgt und durch dichten Verschuß ihr Verdunsten verhindert. Ferner muß, um eine Säurehydrolyse zu vermeiden, vor Zusatz des Chloroforms die Säure neutralisiert werden.

Zwecks Herstellung der zirka 1-proz. Peptonlösung verdünnt man die konservierte oder die frische konz. Stammlösung etwa dreifach mit Wasser und macht die Reaktion durch Zusatz von etwa 5-proz. Natronlange lackmusneutral, wodurch eine bald grobflockig werdende Fällung entsteht. Ein Laugenüberschuß muß vorsichtig vermieden werden, weil dadurch der Niederschlag wieder gelöst wird und wachstumhemmende Stoffe zurückbleiben können.

Die Flüssigkeit wird nun gekocht und stellt, nachdem sie durch Filtration oder Absitzenlassen des Niederschlages geklärt ist, eine hellgelbe,

zirka 1-proz. Peptonlösung dar, die in dieser Form, in Kolben sterilisiert, unbegrenzt lange aufbewahrt werden kann.

Vorteilhaft ist es, das Verdünnen der konz. Verdauungsflüssigkeit in größeren Quanten vorzunehmen, weil dadurch die einzelnen Peptonlösungen gleichmäßiger werden. Wir bedienen uns dazu eines etwa 70 l fassenden Emailtopfes (Preis etwa M 200) und bereiten darin 60 l verdünnte Peptonlösung. Diese wird im großen Dampfsterilisator 2 Std. ohne Ueberdruck gekocht und nach 2—3 Tage Absitzen mittels Schlauchs von dem grobflockigen, ziemlich fest gewordenen Bodensatz, aus dem durch Filtration auch noch mehrere Liter gewonnen werden, klar abgehoben und auf 5 l Rundstehkolben (aus bestem Jenaer Gase!) gefüllt, die mit Wattestopfen und Pergamentpapier überbunden, 2 Std. ebenfalls im Dampf sterilisiert werden (Rollflaschen eignen sich, da sie den Dampf von oben nicht aushalten, hierzu nicht). Hiervon halten wir uns ständig einen Vorrat von etwa 100 l.

Die Lösung ist frei von koagulierbaren Eiweißstoffen, enthält jedoch noch Albumosen (schwefelhaltig), die aber der Verwendung für bakteriologische Zwecke nicht entgegenstehen. Eine Trennung des Peptons von Albumosen mittels Ammonsulfatsättigung, oder Fällung mit Alkohol, sowie Herstellung trockenen Peptonpulvers, sind ganz entbehrlich und würden nur Zeit kosten und das Endprodukt außerordentlich verteuern.

Der Kochsalzgehalt der Peptonlösung beträgt, wie sich aus wiederholten titrimetrischen Bestimmungen mittels Silbernitrat und Rhodan-ammon in der Asche ergab, etwa 0,1—0,2 Proz. und kann vernachlässigt werden; man setzt also zur Nährbodenbereitung wie auch sonst noch 0,5 Proz. Kochsalz zu.

Die Verdauungsflüssigkeit kann natürlich statt 1+2 auch 1+3, oder 1+4, oder noch weiter verdünnt werden. Will man sich über den Peptongehalt der Lösung schnell orientieren, so vergleiche man die Fällungen, die in 10 ccm etwa 0,1-proz. Lösung gegenüber 0,1-proz. Witte-Peptonlösung auf Zusatz von 0,5 ccm Salpetersäure und 1,0 ccm 10-proz. Phosphormolybdänsäure oder Phosphor-Wolframsäurelösung nach 1—2 Std. entstanden sind. Hier sei auch die Arbeit von Steusing empfohlen, die sehr wertvolle Hinweise gibt. Eine schnelle Orientierung über gleichmäßige Beschaffenheit etc. gestattet auch die Bestimmung der Refraktion mit dem Zeisschen Eintauchrefraktometer.

Ausschlaggebend ist jedoch die bakteriologische Prüfung der daraus hergestellten Nährböden. Dazu eignen sich besonders die zartwachsenden Bazillen des Schweinerotlaufs, der Hühnercholera und pathogene Streptokokken, die große Ansprüche an den Nährboden stellen.

Wichtig erscheint es, darauf hinzuweisen, daß das käufliche Pepsin, namentlich das von der Apotheke gelieferte, einen Zuckerzusatz (Saccharose) enthalten kann (Pepsinum saccharatum), wodurch seine Verdauungskraft herabgesetzt ist, und andere Schwierigkeiten bei den kohlehydrat-spaltenden Bakterien entstehen können. Es sei daher besonders die Verwendung von Pepsinum germanicum Witte-Rostock (1 kg M. 250.—) empfohlen.

Niemals setze man Fibrin in Salzsäure allein ohne Pepsinzusatz an.

Wo genügend Plazenten zur Verfügung stehen, kann man die Verdauungsflüssigkeit auch, anstatt mit Wasser, mit Plazentawasser (hergestellt durch Auskochen von 1 kg Plazenta mit 2 l Wasser) verdünnen, wodurch namentlich günstige Mineralstoffe hinzugefügt werden.

Trypsinbouillon.

Obige zirka 1-proz. Peptonlösung verwenden wir auch noch zur sog. Trypsinbouillon, deren Herstellung zum Schluß noch erwähnt werden soll, da sie ein wertvolles Medium für die Prüfung der Bakterien auf Indolbildung ist. 1 l dieser Peptonlösung, dem 5 g Fleischextrakt Liebig (reagiert sauer!) + 5 g Kochsalz, + 7 ccm n-Sodalösung ab Lackmusneutralpunkt zugesetzt sind, werden aufgekocht, dann in gutschließender Glasstopfenflasche auf 40° C abgekühlt, mit 0,2 g Trypsin-Grübler, 10 ccm Chloroform und 5 ccm Toluol versetzt, tüchtig geschüttelt und 24 Std. im Brutschrank angedaut, durch feuchtes Filter gegossen, 4-fach (1+3) mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt, und zu etwa 5 ccm auf Röhrchen gefüllt, 1 Std. im Dampftopf sterilisiert. Indol-positive Bakterien geben in der ziemlich hellen Lösung nach 24-std. Wachstum auf Zusatz von 5–10 Tropfen Indolreagens (5 g p-Dimethylamidobenzaldehyd + 50 ccm konz. Salzsäure + 50 ccm Aethyl- oder Methylalkohol, aufbewahrt in Glasstopfenflasche) eine tiefrote, kräftige Indolreaktion. Indolfreie Röhrchen bleiben farblos¹⁾.

Literatur.

Hottinger, Nachprüfung und Kritik der üblichen Bouillonbereitung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 67. 1913. S. 178.) — Steusing, Herstellung des Pepton für bakteriologische Zwecke. (Wien. klin. Wochenschr. 1919. S. 858.) — Teruuchi u. Hida, Beitrag zur bakteriologischen Choleradiagnostik. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 63. 1912. S. 570).

Nachdruck verboten.

Peptonselbstbereitung.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Jena (Direktor: Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. Abel).]

Von Fritz Bramigk.

Infolge der großen Preissteigerung des Witte-Peptons wurde mir vor einigen Monaten von Herrn Geheimrat Abel der Auftrag erteilt, zur Selbstherstellung von Pepton ein geeignetes Verfahren für das Hygienische Institut auszuarbeiten.

Die Aufgabe konnte nach 2 Richtungen in Angriff genommen werden:

1) es ist ein Präparat anzustreben, welches dem Pepton Witte ähnlich, bzw. praktisch gleichwertig oder möglichst auch chemisch vollkommen gleich ist;

Weitere Angaben finden sich in der Arbeit von M. Neisser u. W. Frieber „Indol- und Phenolbildung bei Bakterien“ in dem demnächst erscheinenden Handbuch der bakteriologischen Technik von Kraus-Uhlenhuth, Berlin u. Wien (Urban u. Schwarzenberg).

2) es wird in Betracht gezogen, daß für die Kultur gewisser Bakterien nur sehr wenig abgebautes Eiweiß, für andere tiefer, bzw. tief abgebautes Eiweiß sich als zweckdienlich erwiesen hat¹⁾.

Ferner mußte die Frage des Ausgangsmaterials entschieden werden. Günstige Berichte liegen vor über die Verarbeitung von Fleisch, Serum, bzw. Plasma, Fibrin, Plazenta, Blutkuchen und Fleisch verschiedener Tierarten, auch Leguminosenmehl.

Zunächst mußte der erste Weg beschritten werden, damit die laufenden Arbeiten in den beiden im Institut befindlichen Untersuchungsämtern auf den bisherigen, mit Witte-Pepton gemachten Erfahrungen fußen konnten und ein mehr oder minder atypisches Wachstum, wie es zuweilen auf den Hottinger-Brühen beobachtet wird, zunächst ausgeschaltet war.

Als Ausgangsmaterial wurde Blutfibrin, welches vom Schlachthof jetzt wieder leicht und billig erhältlich ist, gewählt. Zwar berichtet Siegfried²⁾: „Jedenfalls aber besitzen die aus Witte-Pepton und aus Fibrin dargestellten Antipeptone ein verschiedenes Drehungsvermögen. Somit liegt die Annahme nahe, daß Witte-Pepton nicht aus Fibrin hergestellt wird.“ Auf Grund von Erfahrungen, die ich auf diesem Gebiete gemeinsam mit Herrn Privatdozent Dr. Hirsch im Pharmakologischen Institut der Universität Jena gemacht habe und über die ich an anderer Stelle berichten werde, glaube ich jedoch gegenteiliger Ansicht sein zu dürfen.

Da Witte-Pepton keine Reaktion auf freies Tryptophan gibt, so liegt die Vermutung nahe, daß es sich um ein Pepsinverdauungsprodukt handelt. Pepsin ist befähigt, Eiweiß bei saurer Reaktion abzubauen. Sein Wirkungsoptimum liegt bei 38—40° und ist in erstnr Linie von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig,

Die Wirksamkeit des Pepsins verhält sich in einem bestimmten Bereich der Wasserstoffionenkonzentration ($[H^+]$ im Mittel bei $1,5 \cdot 10^{-2}$) fast vollständig gleich. Das Optimum liegt nach L. Michaelis und A. Mendelsohn unabhängig von der Art der Säure und der Gegenwart von Salzen bei annähernd derselben $[H^+]$ ³⁾.

Salzsäure wird in einer Konzentration von 0,4 Proz. angewendet. Aus zwei Gründen wurde aber Schwefelsäure vorgezogen. Die stärkere Konzentration, in der diese angewendet werden darf, hält bakterielle Verunreinigungen leichter zurück und bei der kurzen Dauer der Einwirkung des selbstgewonnenen Pepsins konnte auf die Anwendung des sonst zur Hintanhaltung von Fäulnisregern erforderlichen, kostspieligen Toluol und Chloroform verzichtet werden. Wichtiger aber war für mich noch der Umstand, daß ich bei Verwendung von Schwefelsäure die Möglichkeit offen ließ, diese Säure mit Bariumhydroxyd gänzlich wieder zur Abscheidung bringen zu können, und so den Aschegehalt der erhaltenen Peptone bedeutend herabzudrücken vermochte. Auf diesen Umstand wurde Wert gelegt, da die erhaltenen Peptone in ihrer Zusammensetzung

1) Kruse, Mikrobiologie. 1910. — Deycke u. Voigtländer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. S. 618 ff. — Nawiasky, Ueber die Ernährung einiger Spaltpilze in peptonhaltigen Nährböden. (Arch. f. Hyg. Bd. 64. 1908. S. 33—61.)

2) Siegfried, II. Mitteil. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35. 1902. S. 179.

3) Michaelis, L., u. Mendelsohn, A., Die Wirkungsbedingungen des Pepsins. (Biochem. Zeitschr. 65. S. 3.)

chemisch identifiziert werden sollen und so die Grundlagen zu weiteren Arbeiten bilden können.

Ueber die Pepsinschwefelsäureverdauung wurde bereits von anderen Autoren berichtet¹⁾.

Die Bereitung erfolgte somit, wie folgt:

Ein Eimer Blutgerinnsel vom Schlachthof wird in fließendem Wasser gewaschen und so vom Blute befreit (der Eimer wurde mit einem Tuche überbunden und unter die Wasserleitung gestellt, des öfteren umgestürzt, um alles Wasser ausfließen zu lassen). Hierauf wird es gut ausgepreßt (1 kg feuchten Blutgerinnsels entspricht ca. 230 g trockenem Fibrin) und in folgende Lösung gebracht: 3 l Wasser + 15 ccm konz. H_2SO_4 , in welcher sie über Nacht verbleiben.

Am anderen Morgen läßt man das Fibrin auf einem Siebe abtropfen und drückt es gut aus, darauf kommt es in eine auf ca. 50° erwärmte Mischung von 3 l Wasser + 18 ccm H_2SO_4 . Diesem Gemisch wird folgende auf 35° erwärmte Zubereitung zugesetzt:

Von 2 frischen Schweinemagen (diese dürfen nicht gesalzen sein, wie sie die Fleischer meist liefern) wurde die Schleimhaut abpräpariert, kleingeschnitten (event. Fleischwolf) und über Nacht in einem Gemisch aus 1 l Wasser + 8 ccm H_2SO_4 stehen gelassen.

Das Gemisch (Fibrin + Magen + Schwefelsäure) wird zur Verdauung 48 Std. unter häufigem Umrühren in das 37° warme Brutzimmer gestellt. Etwaiges Fett setzt sich ab. Dann wird koliert, die Kolatur aufgekocht und entweder mit Ammoniak neutralisiert und in kleine Gefäße abgefüllt und sterilisiert, oder mit Bariumhydroxyd ca. 40,0 g neutralisiert und dann so lange gekocht, bis die überstehende Flüssigkeit klar ist. Alle Schwefelsäure ist dann ausgefällt. Man läßt absetzen und neutralisiert, falls Bariumhydroxyd im Ueberschuß, mit Schwefelsäure bis zur ganz schwach sauren Reaktion. Durch Dekantieren wird die erhaltene Lösung geklärt, der Rest filtriert und der Rückstand auf dem Filter mit Wasser ausgewaschen. (Ein Ueberschuß an Barium ist streng zu vermeiden.) Es ergibt eine hellgelbe klare Lösung, die ca. 10 Proz. Pepton enthält.

Zur Gehaltsbestimmung werden 10 ccm in einer tarierten Schale auf dem Wasserbade fast zur Trockne gebracht, im Exsikkator getrocknet und die Schale mit Inhalt gewogen und so der Gehalt an Pepton bestimmt. Steusing²⁾ bestimmt den Gehalt mit dem Esbachschen Albuminometer mit 10 Proz. Phosphorwolframsäure, was aber der Kostspieligkeit wegen zurzeit nicht empfehlenswert ist.

Will man trockenes Pepton erhalten, so wird die erhaltene Lösung eingedampft; kleine Mengen praktischerweise im Faust-Heimschen Apparat, größere im Vakuum oder auch in offener Schale auf dem Wasserbade, wobei eine syrupartige Masse erhalten wird. Diese wird in Fäden ausgezogen und im Exsikkator getrocknet.

Auf diese Weise hergestelltes Pepton erwies sich mir bei der bakteriologischen Prüfung als dem Witte-Pepton gleichwertig; die in der praktischen Diagnostik am meisten in Frage kommenden Bakterien, wie z. B. *Bact. typhi*, *Bact. coli*, *Staphylococcus aureus*

1) Henninger, Compt. rend. T. 86. 1878. p. 1413 u. 1464. — Mühle, Diss. Leipzig, 1901.

2) Steusing, Wien. klin. Wochenschr. 1919. S. 858.

und *Bact. diphtheriae* gedeihen, wie Privatdozent Dr. Wagner feststellte, zum mindesten nicht schlechter, als auf Witte-Peptonnährböden.

Zu 2. Es liegt eine große Anzahl von Arbeiten vor, die über Nährsubstrate berichten, die durch Trypsinverdauung gewonnen worden sind. Deycke und Voigtländer, l. c., stellten sich die Frage, „ob die verschiedenen Eiweißkörper für die Ernährung und Züchtung der einzelnen Bakterien die gleiche Bedeutung haben und wie vor allem sich die verschiedenen Spaltpilzarten gegenüber denjenigen natürlichen Abbauprodukten der Eiweißkörper verhalten, welche durch den physiologischen Vorgang der Magen- und Darmverdauung gebildet werden“. Sie kamen zur Verdauung von Pferdefleisch mit Pepsin und verglichen damit eine Nährlösung, die aus Fleisch durch Pepsin und darauf folgende Trypsinverdauung gewonnen worden war.

Streptococcus erysipelatos, *Bac. typhi*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus pyogenes flavus*, *Bac. pyocyaneus* und *Bacterium coli* wiesen auf den durch Pepsin und Pankreatinverdauung gewonnenen Nährboden ein deutlich ausgiebigeres und intensiveres Wachstum als auf gewöhnlichem Agar und auf dem nur mit Pepsinverdauung hergestellten Nährboden.

Die Zeit der Pankreatineinwirkung schien aber bei allen diesen Mikroben keinen wesentlichen Einfluß auf ihr Wachstumsvermögen auszuüben. Eine besondere Beachtung verdiente das Verhalten des Erregers der Diphtherie und des Schweinerotlaufes auf diesen Nährmedien. Der Diphtheriebazillus entfaltete auf den mit Pepsin und Pankreatinverdauung bereiteten Nährböden eine um so größere Wachstumsenergie, je länger das Pankreasferment eingewirkt hatte; umgekehrt ist beim Bazillus des Schweinerotlaufes die Ausgiebigkeit der Entwicklung dann am größten, wenn das Pankreatin nur relativ kurze Zeit (6 Std.) eingewirkt hat.

Während Deycke und Voigtländer mit einer unmittelbaren Einwirkung des Pankreasfermentes auf die noch ungelösten Eiweißkörper unter Ausschaltung der Pepsinverdauung zu einem durchaus negativen Resultate kamen, hat Hottinger¹⁾ die direkte Pankreasverdauung des Fleisches eingehend bearbeitet und ihre Ergiebigkeit dargetan. Neuerdings berichtet v. Angerer²⁾ erneut über die Hottingersche Technik der Pankreasverdauung, für deren Verfolgung er die Phenolphthalein-Methylrostitration einführte.

So sind in der Literatur bereits viele Angaben enthalten, die Wege zu dem zweiten Ziele, das mir vorschwebte, vorzeigen. Dem hiesigen Institut lag zunächst besonders an der Beschaffung eines Kulturmediums; mit dessen Hilfe so schnell als möglich eine deutliche Indolreaktion sicher zu erzielen ist.

Zipfel³⁾ empfiehlt dafür Tryptophannährlösung. Ich stellte mir daher im Pharmakologischen Institut Tryptophan aus Nutrose her, aber die Herstellung erwies sich in jetziger Zeit als zu kostspielig; ich erstrebte daher, durch Trypsinverdauung der nach 1) erhaltenen Peptonlösung zum Ziele zu kommen, und erhielt ein Pepton, welches in

1) Hottinger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 67. S. 178.

2) v. Angerer, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 60.

3) Zipfel, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 64. S. 65.

2-proz. und auch 1-proz. Lösung innerhalb 12 Std. mit Ehrlichs Reagens eine schön rote Indolreaktion ergab. Dieses Pepton ergab, zu 0,1 Proz. zum Nähragar verwendet, gleich gutes Wachstum wie 1-proz. Witte-Pepton.

Zur Herstellung dieses Pepsin-Trypsinpeptons wurde, wie folgt, verfahren: 2,5 l der bei der Herstellung des Pepsinpeptons erhaltene Lösung, die mit Bariumhydroxyd bis zur schwach sauren Reaktion neutralisiert und bis zur Klärung gekocht worden war, wurde ohne vorherige Filtration mit 5,0 ccm wasserfreier Soda, 5 ccm Toluol und 5 ccm Chloroform, sowie 2,0 g Pankreatin „Rhenaria“ vermischt. (Zur Selbstbereitung des Pankreatins wird eine Pankreasdrüse des Schweines 2mal durch den Fleischwolf getrieben, 24 Std. auf Eis gelegt, dann mit 40 g Glycerin und 160 ccm Wasser gemischt, und nach mehreren Tagen wird der Saft ausgepreßt. Von diesem selbstbereiteten Trypsinglycerin werden 50 ccm angewandt.

Das Verdauungsgemisch wurde unter häufigem Schütteln 12 Std. bei 37° gehalten und täglich 2mal je 1 ccm mit Bromwasser auf Tryptophan geprüft.

Nach 24 Std. trat bei Zugabe von	0,3 ccm	Bromwasser	beginnende Rötung ein,
die nach Zugabe von insgesamt	1,3	„	verschwand
nach 48 Std. trat nach Zugabe von	0,35	„	Rötung
„ 72 „ „ „ „ „	1,4	„	Entfärbung
„ 72 „ „ „ „ „	0,4	„	Rötung
„ 96 „ „ „ „ „	1,5	„	Entfärbung
„ 96 „ „ „ „ „	0,4	„	Rötung
„ 120 „ „ „ „ „	1,7	„	Entfärbung
„ 120 „ „ „ „ „	0,4	„	Rötung
„ „ „ „ „	1,8	„	Entfärbung

Die Hauptmenge wurde durch Salzsäurezusatz vor weiterem Abbau geschützt. Eine Probe blieb stehen und ergab am anderen Tag bei Zugabe von 0,4 ccm Rötung, aber bereits bei Zugabe von 1,4 ccm Entfärbung.

Wäre die Verdauung nicht unterbrochen worden, so würde der Gehalt an Tryptophan rasch abgenommen haben.

Wenn ich mich, trotz der Arbeit von Hottinger, dazu entschloß, das Trypsin nicht direkt einwirken zu lassen, sondern erst auf das durch Pepsin vorverdaute Fibrin, so geschah dies aus folgendem Grunde:

Hottinger sagt l. c. S. 190: „Früher hat man angenommen, daß sich Fleisch nicht direkt mit Pankreatin verdauen lasse (Deycke und Voigtländer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. S. 617), sondern daß erst eine peptische Verdauung oder Hydrolyse voranzugehen habe. Dies hat auf der Unkenntnis der Antifermente beruht, die allerdings eine Verdauung unmöglich machen können, nämlich dann, wenn vom Ferment nicht genügend zugesetzt wurde — das Antiferment läßt sich mit dem Fermente absättigen — wird übrigens durch das Sieden schon teilweise zerstört.“

Nach Hirsch¹⁾ nimmt Plimmer im Eiweißmolekül die Anwesenheit von Anhydridringen an. Diese Ringschlüsse entstehen durch Vereinigung von endständigen NH- und CO-Gruppen. Daneben nimmt Plimmer auch noch die Möglichkeit von Ringschlüssen durch Salz-

1) Hirsch, Fermentstudien. Jena (Fischer) 1917.

bildung der freien, von einer dibasischen Säure sich ableitenden Karboxylgruppe mit dem immer endständigen Prolin oder der ebenfalls immer endständigen Guanidingruppe des Arginin an.

Diese Strukturannahme kann nun das verschiedene Verhalten der Fermente erklären: Trypsin kann eine Kette von Aminosäuren mit endständigen Amino- und Karboxylgruppen spalten, Pepsin dagegen öffnet nur den Anhydridring, d. h. es liefert nur Ketten mit endständigen Amino- und Karboxylgruppen, die ihrerseits von dem Pepsin nicht weiter verdaut werden können, die aber der Trypsinwirkung unterliegen.

Da es auch Proteine gibt, die erst nach Pepsinverdauung durch Trypsin gespalten werden — sie enthalten wohl alle Aminosäuren im Anhydridring — so gewinnt die Vorstellung von Plimmer¹⁾ an Wahrscheinlichkeit.

Zusammenfassung.

1) Durch Pepsinverdauung (entweder in schwefelsaurer Lösung, wie angegeben, oder in 0,4-proz. salzsaurer Lösung) des feuchten Fibrins können sich die Institute dem Witte-Pepton gleichwertige Produkte selbst herstellen.

2) Durch Weiterverdauung des Pepsinpeptons mit Pankreatin wird eine Peptonlösung erhalten, die schneller und deutlicher als Witte-Pepton die Indolreaktion gibt.

1) Plimmer, Die chem. Konstitution der Eiweißkörper. Dresden 1914. S. 156.

Inhalt.

- | | |
|--|--|
| <p>Battaglia, Mario, Histologische Veränderungen in den Organen an experimenteller Trypanosomiasis verendeter Tiere, S. 393.</p> <p>Bramigk, Fritz, Peptonselbstbereitung, S. 427.</p> <p>Braun, H., u. Cahn-Bronner, C. E., Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. III. Mitteilung. Die Bedeutung des Stoffwechsels für die Entbehrlichkeit oder Unentbehrlichkeit des Sauerstoffes, S. 380.</p> <p>Friber, Walther, Ueber Selbstbereitung von bakteriologischer Peptonlösung und über Trypsinbouillon zur Prüfung auf indolbildende Bakterien, S. 424.</p> | <p>Hilgermann, Lauren, u. Shaw, Charlotte, Bakteriologische und klinische Untersuchungsergebnisse bei Encephalitis lethargica. II. Mitteilung. Mit 2 Tafeln, S. 415.</p> <p>Morihana, Seiji, Versuche über die Dauer der Abschwächung des Milzbrandbazillus, S. 405.</p> <p>Rodenwaldt, E., u. Röckemann, W., Zur Biologie von <i>Oxyuris vermicularis</i>, S. 421.</p> <p>Snapper, J., Die Zersetzung von Blut und Blutfarbstoff durch Cholera- und Tor-Vibrionen, S. 396.</p> <p>Toenniessen, E., Ueber die Variationsformen der Bakterien und ihre Uebereinstimmung mit den Variationsformen der Metazoen. Mit 2 Tafeln, S. 353.</p> |
|--|--|

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 6.

Ausgegeben am 8. Juli 1921.

Nachdruck verboten.

Echte Diphtherie- und diphtherieähnliche Bazillen im Phagozytoseversuch.

[Aus dem Hygienischen Institut in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Bürgers).]

Von Dr. W. Bachmann, I. Assistent des Instituts.

In seinem Aufsatz „Zu Behrings neuester Diphtherietheorie“ (1) zitiert Schanz unter anderem folgende Worte Behrings, die dessen Arbeit aus Colers Bibliothek Bd. 2 entnommen sind:

„Es ist nur noch die Schar der Kleinen in der medizinischen Bakteriologie, die unermüdlich die Sisyphusarbeit des Suchens nach konstanten und charakteristischen Merkmalen zwischen echten Diphtheriebazillen und Pseudodiphtheriebazillen weiter fortsetzt; für diejenigen Forscher, welche wissen, daß mit der sich ändernden Virulenz immer auch mehr oder weniger zahlreiche morphologische und kulturelle Umwandlungen vorhanden sind, konnte es nichts Ueberraschendes sein, wenn die Bazillenlänge, die Lagerung der Bazillen zueinander, die Zweigbildung, die größere oder geringere Neigung, Ernstsche Körperchen zu bilden, das mehr oder weniger feuchte oder glänzende Aussehen in Agarkulturen — als Kriterien für eine botanische Differenzierung beim Diphtheriebazillus sich nicht bewährt haben.“

Behring bekennt sich hier in der Frage, ob Diphtherie-, Pseudodiphtherie- und sogenannte Xerosebakterien grundsätzlich voneinander zu trennende Mikroorganismen oder nur verschiedene Formen einer zusammengehörigen variablen Gruppe sind, zur unitaristischen Auffassung und sagt mit wenigen Worten, daß alle Versuche, auch weiterhin eine strenge Abtrennung der zur Diphtheriegruppe gehörigen Bakterien zu gewinnen, letzten Endes eine falsche Fragestellung bedeuten würden. Da jedoch das praktische Interesse des Klinikers eine sichere Diphtheriediagnose verlangt, so haben auch bis in die jüngste Zeit die Bestrebungen nicht aufgehört, nach Unterscheidungsmerkmalen zu suchen, die es erlauben, die echten Diphtheriebazillen auch ohne den entscheidenden, aber zeitraubenden Tierversuch zu erkennen, sei es daß man neue Nährböden verwendete, oder durch besondere Färbeverfahren und das Verhalten der Diphtheriebazillen gegen verschiedene Zuckerarten zu einer Entscheidung zu kommen suchte.

Unsere Fragestellung zielt nun darauf hin, ob es möglich wäre, im Phagozytoseversuch unterschiedliches Verhalten zwischen Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillen festzustellen und damit eine Methode zu gewinnen, die den Tierversuch in fraglichen Fällen entbehrlich machte. Obwohl nach den bisherigen spärlichen Erfahrungen keine Parallelität zwischen dem phagozytischen Index und der Toxizität der virulenten Diphtheriestämme bestehen soll, war es immerhin möglich, daß der Unterschied des Index — analog dem Verhalten von anderen virulenten und nicht virulenten Bakterien — solcher Stämme von dem der Pseudodiphtheriebazillen genügte, um praktisch eine Trennung zu ermöglichen. Es war von vornherein zu erwarten, daß avirulente Diphtherie im

Phagozytoseversuch ebensowenig wie durch den Tierversuch würde erfaßt werden können.

Um die zu diesen Versuchen notwendigen Reinkulturen zu gewinnen, wurden von den Ausstrichplatten (Loeffler-Serum) Einzelkolonien wiederum auf Serumplatten und Aszitesagar verimpft, wo dies nicht möglich war, Verdünnungsplatten angelegt, so daß meist am 3. Tage spätestens eine Reinkultur der Diphtherie- oder Pseudodiphtheriebazillen vorlag. Zur Stellung der bakteriologischen Diagnose wurde neben den üblichen Unterscheidungsmerkmalen (morphologisches Verhalten im direkten Ausstrich und im Ausstrich von der Platte, Aussehen der Kolonien, Gram-, Methylenblau- und Neisser-Färbung, Tierversuch) eine Reihe von neueren Untersuchungsmethoden geprüft, und zwar die von Langer (2) angegebene, verlängerte Gram-Färbung, das Verhalten gegenüber Saccharose nach Lubinski (3), das Wachstum auf dem von Conradi angegebenen Tellurnährboden (4) und auf der von Costa, Troisier und Dauvergne empfohlenen Schwefelsäureplatte (5). Die beiden letzteren Verfahren interessierten besonders deshalb, weil sie vielleicht erlaubten, schon nach 24 Std. sicher Einzelkolonien von echten Diphtheriebazillen zu unterscheiden und damit spätestens nach 48 Std. Reinkulturen zu gewinnen. Die für diese Untersuchungsmethode gegebenen Vorschriften sind in der angegebenen Literatur einzusehen.

Ich führe nur folgendes an: 1) nach Langer unterscheiden sich echte Di-Bazillen von Pseudodiphtheriebazillen durch ihre geringere Gram-Festigkeit, so daß sie bei verlängerter Entfärbung (15 Min.) mit Alkohol gramnegativ werden. 2) Lubinski unterscheidet von echter Diphtherie einmal die Pseudodiphtheriebazillen und weiterhin die von ihm sogenannten Paradiphtheriebazillen, die sich von den beiden ersten dadurch unterscheiden, daß sie Saccharose nach spätestens 48 Std. unter lebhafter Säurebildung vergären. Paradiphtherie und Pseudodiphtherie vergären außerdem nach 48 Std. Galaktose, Glukose, Lävulose und Mannose, während Pseudodiphtherie im engeren Sinne auch diese Zuckerarten nicht angreift. 3) Echte Diphtheriebazillen wachsen auf dem Tellurnährboden schwarz bis tiefschwarz, während Pseudodiphtherie grau bis grauschwarz wächst. 4) Auf der Schwefelsäureplatte (Pferdeserum 100 ccm, 30-proz. Traubenzuckerlösung 10 ccm, konz. Lackmuslösung 30 Tr., 3 ccm n/5 H₂SO₄) bilden die Diphtheriebazillen stecknadelkopffähnliche, eingesunkene, auf der Durchsicht rot, im auffallenden Licht grau auf rotem Untergrunde erscheinende Kolonien, die schon frühzeitig die charakteristische, nabelähnliche Einsenkung zeigen. Die Kolonien der Diphtheroiden bleiben blau.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen angegeben.

Aus den in Tab. I angeführten Versuchen, die mit Reinkulturen der betreffenden Stämme angestellt wurden, geht hervor, daß die Stämme 1—11, bei denen sicher echte Diphtherie vorlag, nach der Langerschen Methode ihre Färbbarkeit nach Gram einbüßten, während die Stämme 12—15, bei denen morphologisch Diphtherie diagnostiziert wurde, der Tierversuch jedoch nur bei 14 und 15 positiv ausfiel, trotz verlängerter Entfärbung grampositiv blieben. Stamm 5 behielt nur einen Schein der Gram-Färbung bei, wie es Schmitz (6) in seiner Nachprüfung der Langerschen Methode bereits angibt. Die übrigen 19 Stämme, bei denen teils sicher Pseudodiphtherie schon morphologisch zu diagnostizieren war, oder fragliche Diphtherie, die auch durch den Tierversuch nicht festgestellt werden konnte, blieben alle grampositiv. Dabei machte ich die Erfahrung, daß die Art der Differenzierung mit Alkohol nicht gleichgültig für den Ausfall der Untersuchung ist. Während ich bei den in Tab. I angegebenen Resultaten stets frischen Alkohol während 15 Min. auf den Objektträger tropfte, hatte ich in älteren Unter-

Tabelle I.

Nr.	Stamm	Klinischer Befund	Neisser	Tier- ver- such	Gram ver- läng.	Bemerkungen
1	7 252	Rachendiphtherie	+	+	SS —	
2	6 978	Diphtherie (Exit.)	?	+	SS —	
3	9 275	Nasen- u. Rachendiphtherie	+	+	SS —	
4	9 280	Nasendiphtherie?	?	+	SS —	
5	8 807	Rachendiphtherie	+	+	SS (±)	
6	8 818	Lungentumor; Rachen-Di	+	+	SS —	
7	7 557	Diphtherie	+	±	SS —	Morphol. sicher Di
8	7 579	Nasendiphtherie	+	+	SS —	
9	3 862	Rachendiphtherie	+	±	SS —	" " "
10	10 253	Angina catarrh., Laryngitis	?	+	SS +	
11	10 960	Diphtherie?	+	+	SS —	
12	9 707	Angina	+	±	SS +	
13	9 708	Entzündung des Rachenringes	+	—	SS +	
14	9 728	Intertrigo, Nährschaden	+	+	SS +	
15	9 730	Rachendiphtherie	+	+	SS +	
16	9 052	Nasendiphtherie	Pseudo- diphtherie	—	SS +	
17	9 063	o. B.	dgl.	—	SS +	
18	9 411	Rachendiphtherie	?	—	SS +	
19	9 501	Chronische Bronchitis	Ps.-Di	—	SS +	
20	9 502	Lues congenita	Ps.-Di	—	SS +	
21	9 666	Rachendiphtherie?	?	—	SS +	
22	9 617	Diphtherie?	?	—	SS +	
23	9 688	Nasen- u. Rachendiphtherie	—	±	SS +	
24	9 778	Rachendiphtherie	?	—	SS +	
25	9 849	Scharlach	—	—	SS +	
26	10 037	Diphtherie?	?	±	SS +	
27	10 047	Atrophie	—	—	SS +	
28	10 081	Rachendiphtherie	?	—	SS +	
29	10 125a	Angina catarrh.	—	—	SS +	
30	10 496		?	—	SS +	
31	10 670		—	—	SS +	
32	10 807	Rachendiphtherie	?	±	SS +	
33	10 831		?	—	SS ±	
34	10 843		?	±	SS +	Im Tierversuch bereits am 3 Tage Abklingen der Infiltration u. Rö- tung, kleine Nekrose

Tabelle II.

Stamm	Klinischer Befund	Morpholog.	Tierversuch	Gram verläng.
4044	Nasendiphtherie	Diphtherie	±	SS —
3698	Nasendiphtherie?	"	+	SS —
4071	Rachendiphtherie	?	+	SS —
3845		Diphtherie?	—	SS —
3099	Rachendiphtherie	"	—	SS —
3539	Diphtherie (Exitus)	Diphtherie	—	SS —
4133	Nasendiphtherie?	Diphtherie?	+	SS —
4143	Nasendiphtherie	" ?	—	SS —
4026	Nasendiphtherie	" ?	—	SS —
4010		" ?	—	SS +
3988		" ?	—	SS +
4029	kein krankhafter Befund	Diphtherie	+	SS —

28*

suchungen die Objektträger die vorgeschriebene Zeit ruhig im Alkohol stehen lassen und machte dabei die Erfahrung, daß auch viele Pseudodiphtherien und fragliche Diphtherien (im Tierversuch negativ) die Färbbarkeit nach Gram einbüßten. Die in Tab. II aufgeführten 12 Reinkulturen sind nur nach dieser 2. Methode geprüft und zeigen, trotz negativen Ausfalls des Tierversuchs, auffallend häufige Entfärbung. Da diese vor etwa $\frac{3}{4}$ Jahr herausgezüchteten Stämme verloren gingen, konnten sie mit der Alkohol-Tropfenmethode nicht verglichen werden. Es liegt wohl am nächsten, diese Erscheinung auf nicht mehr nachprüfbar Verschiedenheit im Prozentgehalt des verwendeten Alkohols zurückzuführen.

Immerhin zeigen die angeführten Versuche, daß die Langersche Methode bei der Prüfung von echten Diphtherie- und Pseudodiphtheriestämmen, die sowohl morphologisch wie im Tierversuch als solche erkannt waren, im allgemeinen nicht versagt; in fraglichen Fällen möchte ich ihr aber nicht die entscheidende Bedeutung geben, wie Langer seinerzeit es glaubte, tun zu dürfen.

Ein weniger befriedigendes Ergebnis hatte unsere Prüfung von 28 Diphtherie- und Pseudodiphtheriestämmen auf ihr Verhalten gegenüber Saccharose, wie es von Lubinski angegeben war. Folgende Tabelle zeigt unsere Ergebnisse:

Tabelle III.

Nr.	Stamm	Klinischer Befund	Neisser-Färbung	Tier-versuch	Saccharose		nach 10 Tagen
					nach 24 Std.	nach 48 Std.	
1	7 252	Rachendiphtherie	+	+	—	—	Rötung
2	6 978	Diphtherie +	?	+	—	—	"
3	9 275	Nasen- u. Rachendiphtherie	+	+	—	—	"
4	9 280	Nasendiphtherie?	?	+	—	—	"
5	8 807	Rachendiphtherie	+	+	—	—	"
6	8 818	Lungentumor, Rachen-Di	+	+	—	—	"
7	7 557	Diphtherie	+	±	Rötung	—	"
8	7 579	Nasendiphtherie?	+	+	—	—	—
9	3 862	Rachendiphtherie	+	±	—	—	Rötung
10	10 125b	Angina catarrh., Laryngitis	+	+	—	—	—
11	10 960	Diphtherie?	+	+	—	—	—
12	9 707	Angina	+	±	—	—	—
13	9 708	Entzündung des Rachenrings	+	—	—	—	—
14	9 728	Intertrigo, Nährschaden	?	—	—	violett	Rötung
15	9 730	Rachendiphtherie	?	—	Rötung	Rötung	"
16	9 911	Rachendiphtherie	?	—	—	—	"
17	9 501	Chronische Bronchitis	—	—	—	—	—
18	9 502	Lues congenita	—	—	Rötung	Rötung	Rötung
19	9 666	Rachendiphtherie?	?	—	—	—	"

Entgegen den Angaben Lubinskis zeigen von den sicher echten Diphtheriestämmen 1—13 nur die Stämme 8 und 10—13 die Eigenschaft, Saccharose auch nach 10-tägiger Bebrütung nicht zu vergären, während die übrigen eher oder später einen Farbumschlag hervorriefen. Die St. 14 und 15, die ursprünglich sowohl morphologisch wie im Tierversuch als echte Diphtherie erkannt wurden, hatten sich bei der Umzüchtung jedoch so stark verändert (völlig fehlende Körnchenfärbung, atypische Lagerung), daß ich sie zum Vergleich nicht heranziehen möchte. Die St. 18, 24 und 25 zeigten das Verhalten der von L. so genannten

Tabelle IV.

Nr.	Stamm	Klinischer Befund	Neisser-Färbung	Tier-versuch	Saccharose		
					nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 10 Tagen
20	9 667	Nasen-Rachendiphth.?	?	—	—	—	
21	10 037	Rachendiphtherie?	?	±	—	Rötung	
22	10 047	Atrophie	—	—	—	—	
23	10 081	Rachendiphtherie	?	—	—	—	
24	10 125a	Angina catarrh. Laryng.	—	—	—	Rötung	
25	10 670		—	—	—	—	
26	10 807	Rachendiphtherie	?	±	—	”	
27	10 831		?	—	—	—	
28	10 843		?	±	—	Rötung n. 72 Std.	

Paradiphtheriebazillen, während die St. 17, 20, 22, 23 und 27 zur Pseudodiphtherie im engeren Sinne zu stellen wären. Die übrig bleibenden St. 16, 19, 21, 26 und 28 zeigten eine Rötung der Saccharose erst nach längerer Zeit als 48 Std., entgegen den Angaben Lubinskis, so daß diese fraglichen Stämme nach seiner Methode nicht eingereiht werden können. Die ebenfalls beabsichtigte Prüfung der Stämme gegenüber anderen Zuckerarten mußte leider unterbleiben, da ein großer Teil derselben verloren ging und der verbliebene kleine Rest diese Untersuchung nicht mehr lohnend erscheinen ließ. Die Abweichung meiner Befunde von denen Lubinskis möchte ich zum Teil dadurch erklären, daß meine Stämme zum großen Teil schon mehrere Monate alt waren, als ich seine Arbeit zu Gesicht bekam, und daß ihr biologisches Verhalten infolge der mehrfachen Umzüchtung sich vielleicht geändert hatte.

Die nun folgenden Untersuchungen mit der von Costa, Troisier und Dauvergne angegebenen „Schwefelsäureplatte“ hatten ein so schlechtes Ergebnis, d. h. absolut keine Gesetzmäßigkeit, daß ich sie hier nicht anführen möchte, vor allem da mir nur die im Referatenteil des Centralbl. f. Bakt. angegebene Bereitungsweise des Nährbodens zur Verfügung stand, während die Originalarbeit nicht eingesehen werden konnte, so daß eine fehlerhafte Herstellung des Nährbodens nicht ausgeschlossen werden kann.

Von der absoluten Zuverlässigkeit des Conradischen Nährbodens konnte ich mich ebenfalls nicht überzeugen, wie die folgende Tabelle (S. 436) zeigt.

Die Prüfung auf den Tellurnährboden ergab also nicht das erwartete Ergebnis, da auch unter den echten Diphtherien 1—14 mehrere Stämme grau und grauschwarz wuchsen, so daß makroskopisch eine Abtrennung von Pseudodiphtherie nicht möglich schien. Erwähnen möchte ich, daß nicht, wie in der Vorschrift, Fleischextrakt verwendet werden konnte, da er nicht zu bekommen war, so daß wir uns mit Fleischwasser helfen mußten. Ob das von ausschlaggebender Bedeutung ist, kann ich nicht beurteilen, dagegen spricht, daß eine Untersuchungsreihe von über 300 Nasen- und Rachenabstrichen zeigte, daß eine ziemlich große Zahl anderer Bakterien auf denselben Platten ebenfalls schwarz wuchs.

Unser Bestreben, mit Hilfe der soeben besprochenen Spezialverfahren für unsere geplanten Phagozytoseversuche eine breitere diagnostische Grundlage zu gewinnen, kann also als fehlgeschlagen bezeichnet

Tabelle V.

Nr.	Stamm	Klinischer Befund	Neisser-Färbung	Tier-versuch	Tellurnährboden
1	7 252	Rachendiphtherie	+	+	schwarzgrau
2	6 978	Diphtherie +	?	+	grau
3	9 275	Nasen-Rachendiphtherie	+	+	grauschwarz
4	9 280	Nasendiphtherie?	?	+	grauschwarz
5	8 807	Rachendiphtherie	+	+	schwarz
6	8 818	Rachendiphtherie?	+	+	grau
7	7 557	Diphtherie	+	±	grau
8	7 579	Nasendiphtherie	+	+	schwarzgrau
9	3 862	Rachendiphtherie	+	±	grau
10	10 125b	Angina catarrhalis	+	+	schwarzgrau
11	9 707	Angina	+	±	schwarz
12	9 708	Entzündung des Rachenringes	+	—	schwarz
13	9 728	Intertrigo	+	+	grau
14	9 730	Rachendiphtherie	+	+	grau
15	9 411	Rachendiphtherie	—	—	grau—schwarzgrau
16	9 501	Chronische Bronchitis	—	—	grau
17	9 502	Lues congenita	—	—	grauschwarz
18	9 666	Rachendiphtherie?	?	—	schwarz—schwarzgrau
19	9 667	Nasen-Rachendiphtherie	?	—	grauschwarz
20	10 037	Rachendiphtherie?	?	±	grauschwarz
21	10 047	Atrophie	—	—	grauweiß
22	10 081	Rachendiphtherie	?	—	schwarzgrau
23	10 125a	Angina catarrhalis, Laryngitis	—	—	grauweiß

werden, mit Ausnahme vielleicht der Langerschen Methode, die in fraglichen Fällen aber auch nicht genügende Sicherheit bietet, so daß wir bei der Diagnosestellung: Diphtherie oder Pseudodiphtherie? uns nur auf das morphologische und färberische Verhalten, das Aussehen der Kolonien und den Tierversuch (Intrakutanmethode nach Römer) stützen zu dürfen glaubten.

Zur Phagozytierung der einzelnen Stämme diente die Wrightsche Technik, wie sie ausführlich in Reiters „Vakzinediagnostik“ beschrieben ist. Im größten Teil der Fälle wurde aktives menschliches Serum verwendet, das derselben Versuchsperson entnommen wurde, von der auch die Blutkörperchenemulsion stammte. Als Kontrolle wurde bei jedem Versuch gleichzeitig je eine Kapillare mit physiol. Kochsalzlösung und eine mit einer Aufschwemmung von Typhusbazillen oder *Staphylococcus aureus* beschickte Kapillare angelegt. Die Stämme, die phagozytiert wurden, waren durchschnittlich 18 Std. alt und stets frisch aus dem betreffenden Untersuchungsmaterial herausgezüchtet. Die Aufschwemmung dieser Stämme glich im Aussehen etwa einer 100-fach verdünnten Milch, was durch Verreiben einer Normalöse Reinkultur in 9,5 ccm physiol. Kochsalzlösung erreicht wurde. Die beschickten Kapillaren wurden 10 Min. bei Bluttemperatur bebrütet und mit dem Ausstreicher auf abgeglühten Objektträgern ausgestrichen. Die Färbung ergab mit Karbolthioninlösung gute Präparate, die bei künstlicher Beleuchtung ausgezählt wurden. Es wurden stets 100 Leukozyten ausgezählt und danach der phagozytische Index bestimmt.

Die Ergebnisse unserer Phagozytoseversuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle VI.

Nr.	Stamm	Klinischer Befund	Neisser-Färbung	Tier-vers.	Phagoz.-Index	Kontrolle Ph. I		
						NaCl	Typhus	Staphyl.
1	7 252	Rachendiphtherie	+	+	1,1			
2	2 862	Rachendiphtherie	+	±	1,1	0,01		3,1
3	7 579	Nasendiphtherie?	+	+	0,46	0		"
4	6 978	Diphtherie +	?	+	0,8	0		"
5	8 807	Rachendiphtherie	+	+	1,0	0	3,0	"
6	8 818	Rachendiphtherie?	+	+	0,17	0	"	"
7	9 280	Nasendiphtherie?	?	+	3,8	0	"	"
8	9 275	Nasen-Rachendiphtherie	+	+	0,99	0	2,3	"
9	7 557	Diphtherie	+	±	0,73	0	3,0	"
10	9 707	Angina	+	±	0,48	0	3,5	"
11	9 708	Entzündung des Rachenringes	+	—	1,56	0	3,05	"
12	9 728	Intertrigo, Nährschaden	+	+	1,86	0	"	"
13	19 730b	Rachendiphtherie	+	+	4,21!	0	"	"
14	10 125	Angina, Laryngitis	?	+	1,0	0	"	3,83
15	10 960	Diphtherie?	+	+	1,28	0	"	7,0
16	9 052	Nasendiphtherie?	—	—	3,0	0	3,0	"
17	9 063	o. B. (Nase)	—	—	3,1	0	"	"
18	9 411	Rachendiphtherie	?	—	1,39	0	2,3	"
19	9 501	Chronische Bronchitis	—	—	0,96	0	"	"
20	9 502	Lues congenita	—	—	1,0	0	"	"
21	9 666	Rachendiphtherie?	?	—	1,0	0	3,5	"
22	9 667	Nasen-Rachendiphtherie?	?	—	1,1	0	"	"
23	9 688	Nasen-Rachendiphtherie	—	±	0,94	0	"	"
24	9 778	Rachendiphtherie?	?	—	1,36	0	"	3,83
25	9 849	Scharlach	—	—	1,55	0	"	"
26	10 037	Rachendiphtherie?	?	±	0,9	0	1,81	"
27	10 047	Atrophie, Nase	—	—	0,96	0	"	"
28	10 081	Rachen-Nasendiphtherie	?	—	0,59	0	"	"
29	10 125a	Angina catarrhalis	—	—	1,77	0	"	"
30	10 496		?	—	2,2	0	"	"
31	10 670	o. B. Nase	—	—	1,3	0	"	3,83
32	10 807	Rachendiphtherie	?	±	1,3	0	"	"
33	10 831		?	—	0,87	0	"	"
34	10 843		?	±	1,47	0	"	"
35	8 322	Bindehautentzündung	Xerosebakterien	—	3,8	0	"	3,0

Es zeigt sich also, daß der phagozytische Index von echter Diphtherie einerseits (St. 1—15), fraglicher und Pseudodiphtherie andererseits keine genügend große Differenz aufweist, um eine Trennung vornehmen zu können. Es macht allerdings den Eindruck, daß echte Diphtheriebazillen im allgemeinen schlechter gefressen werden als Pseudodiphtheriebazillen, da jedoch auch die echten Diphtheriestämme 7 und 13 einen ziemlich hohen Wert zeigen, so kann dieses Unterscheidungsmerkmal allgemeine Gültigkeit nicht beanspruchen. Auch muß berücksichtigt werden, daß die Fehlergrenzen der Wrightschen Technik mindestens 15 Proz. betragen, so daß ein einwandfreier Vergleich nur solcher Stämme gestattet ist, deren phagozytischer Index eine entsprechend hohe Differenz aufweist. Mit Meerschweinchen- und Kaninchenserum soll es gelingen,

Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillen besser freßbar zu machen, so daß es vielleicht aussichtsreich ist, mit dem Serum dieser Tiere unsere Versuche zu wiederholen.

Literaturverzeichnis.

- 1) Bibliothek von Coler. Bd. 2. — 2) Langer, Berlin. klin. Wochenschr. 1917. S. 943; Dtsch. med. Wochenschr. 1916. S. 722. — 3) Lubinski, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. 1920. H. 2. — 4) Leo Tompakow, Arch. f. Hyg. Bd. 83. — 5) Costa, Troisier, Dauvergne, Compt. rend. Soc. de Biol. T. 80. 1917. p. 658 und daselbst T. 81. 1918. p. 32; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 70. 1920. Nr. 78. — 6) Schmitz, Berlin. klin. Wochenschr. 1917.

Nachdruck verboten.

Zur Methodik der bakteriologischen Diphtheriediagnose.

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern.
Direktor: Prof. Dr. G. Sobernheim.]

Von Dr. S. Zurukzöglu.

In der Praxis der bakteriologischen Untersuchungsämter spielt die Diphtheriediagnose in der Regel die Hauptrolle. Meist wird zum kulturellen Nachweis der Diphtheriebazillen als Nährboden das Loeffler-Serum benutzt. Da man, wie von Neisser und vielen anderen angenommen wird, bei der Diphtheriediagnose zur sicheren Beurteilung der Befunde im allgemeinen nicht isolierte Kolonien und Reinkulturen zu erhalten braucht, wendet man neuerdings wohl ziemlich allgemein das „Schmierplatten“-Verfahren an. Die Anwendung der Neisser-Färbung gestattet alsdann, soweit das Material aus Rachen oder Nase stammt, erfahrungsgemäß eine zuverlässige Diagnose.

In manchen Laboratorien, wie z. B. in Frankreich, scheint man sich weder des Schmierplattenverfahrens noch der Neisserschen Färbungsmethode zu bedienen, sondern es wird danach getrachtet, isolierte Kolonien zu gewinnen, indem man das Material mit Hilfe einer Oese oder eines Platinspatels auf der Oberfläche eines Loeffler-Serumröhrchens austreibt. Nach 24-std. Bebrütung werden von verdächtigen Kolonien Präparate angefertigt, die man nach Gram färbt. Die Diagnose gilt als gesichert und endgültig, wenn die charakteristische Form und Lagerung der großen, schlanken Diphtheriebazillen gefunden wird. Dagegen wird die Untersuchung fortgesetzt und dem Arzte nur eine vorläufige Mitteilung gemacht, wenn die kurze, weniger typische Form der Diphtheriestäbchen vorliegt. In diesem Falle werden weitere Untersuchungsmethoden zur Identifizierung herangezogen (Anaërobenkulturen nach Martin und Loiseau, Lackmustraubenzuckeragar in hoher Schicht, Zuckeragar nach Veillon usw.). Bei Bazillenträgeruntersuchungen wird grundsätzlich in dieser Weise vorgegangen (vgl. Dopter et Sacquépée)¹⁾. Ein solches Verfahren hat vielleicht gewisse Vorteile, verzögert aber unter Umständen die Diagnose. Die Neissersche Färbung hat

1) Précis de bactériologie. Paris (Baillièrre et fils) 1921.

sich eben so weit bewährt, daß sie in Kombination mit dem Schmierplattenverfahren den Anforderungen der bakteriologischen Diphtheriediagnose in weitgehendem Maße genügt und vor allen Dingen auch praktische Rücksichten — schnelle Diagnose — befriedigt, ohne daß dadurch die Zuverlässigkeit der Befunde geschädigt würde.

Bei der Bedeutung der Diphtherieuntersuchungen für ärztliches und hygienisches Handeln hat es begreiflicherweise nicht an Versuchen gefehlt, die bakteriologische Methodik trotz ihrer allgemein befriedigenden Leistungsfähigkeit noch weiterhin zu verbessern. Wenn man jedoch die vorliegenden Veröffentlichungen überblickt, gewinnt man den Eindruck, daß die vorgeschlagenen Verbesserungen der Diphtheriediagnose das erstrebte Ziel doch nicht ganz erreicht haben. Das bestätigen auch die in dem hiesigen Institut gemachten Erfahrungen.

In der letzten Zeit sind auf diesem Gebiete zwei Arbeiten veröffentlicht worden: das Kleinsche Verfahren, Zusatz eines durch Natronlauge ungerinnbar gemachten Serums zum Agar, so daß ein sicher sterilisierbarer und durchsichtiger Nährboden erzielt wird, und die Methode von Wang, Verwendung flüssigen, durch fraktionierte Erhitzung keimfrei gemachten Rinderserums, in das der mit dem zu untersuchenden Material beschickte Tupfer eintaucht.

Beide Autoren geben an, daß sich mit ihrem Verfahren, das sie an Hand eines großen Materials geprüft haben, gleichwertige oder bessere Resultate als mit dem Loeffler-Serum erzielen lassen. Da das Kleinsche Verfahren und die Wangsche Methode sowohl in prinzipieller wie auch in praktischer Hinsicht großen Wert zu haben schienen, habe ich es unternommen, beide auf ihre Brauchbarkeit und Leistungsfähigkeit zu prüfen.

Zur Untersuchung stand mir das Material zur Verfügung, das der Untersuchungsabteilung des Instituts täglich von den Aerzten und Kliniken zugeht. Es stammt, wie überall, teils von akuten, diphtherieverdächtigen Erkrankungen, teils von Rekonvaleszenten und von Bazillenträgern. Eine genaue Sichtung des Materials nach diesen 3 Gruppen der Herkunft konnte ich nicht vornehmen, weil die Einsender nur zu einem geringen Teil die entsprechenden Angaben beizufügen pflegen.

Das Kleinsche Verfahren ¹⁾.

Bei der Prüfung habe ich mich genau an die Angaben des Autors gehalten. Seine Vorschrift lautet, daß zur Herstellung des Diphtherienährbodens 9 Teile Serum mit 1 Teil offizineller Natronlauge gemischt und 2 Tage lang bei 37° gehalten werden. Dann wird das Gemisch mit Salzsäure neutralisiert, mit 4 Teilen Nähragar versetzt und bei 105° 1/2 Std. lang erhitzt. Die Neutralisation habe ich mit Lackmuspapier kontrolliert. In der Arbeit Kleins findet sich hierüber nichts Näheres angegeben. Die Herstellung bereitete mir keine Schwierigkeiten, wenigstens gelang es jedesmal, ein Substrat zu gewinnen, das äußerlich der von K. gegebenen Beschreibung entsprach.

Ich ging bei der Verarbeitung des Untersuchungsmaterials so vor, daß die gleichen Proben sowohl auf dem Loefflerschen Nährboden, als auch auf dem Kleinschen Substrat zur Aussaat gebracht wurden,

1) Klein, Ein neuer Diphtherienährboden. (Deutsche med. Wochenschr. 1920. S. 297.)

und zwar begann ich die Untersuchungen zunächst so, daß der Kleinsche Nährboden an 2. Stelle kam. Sehr bald schon machte ich die Beobachtung, daß die Diphtheriebazillen auf dem Kleinschen Nährboden atypische Formen aufwiesen und schwer zu diagnostizieren waren, ja, daß die Erkennung der Diphtheriebazillen meist nur möglich war durch den Vergleich mit den Präparaten von Loeffler-Platten. Ich war fast nie sicher, ob es sich um echte Diphtheriebazillen oder um verwandte Bakterienarten (Diphtheroide) handelte. Während auf dem Loeffler-Nährboden in dem gleichen Falle echte, schlanke Diphtheriebazillen mit der typischen Lage und Färbung zu konstatieren waren, fand ich in der Regel bei der Kleinschen Züchtungsmethode nur mit großer Mühe einige typische Exemplare. Der Rest bestand aus plumpen und kurzen Stäbchen, gewöhnlich ohne Polfärbung und ohne typische Lagerung. Diese Beobachtung, die ich an Hand von mehr als 13 positiven Fällen (unter 30 Proben) machte, veranlaßte mich, die Nachprüfung nunmehr zunächst mit reinen Diphtheriestäbchen vorzunehmen und zugleich den Nährboden häufiger frisch zu bereiten. Es war ja denkbar, daß der erste Nährboden, trotz genauer Einhaltung der Vorschriften und trotz scheinbar einwandfreier äußerer Beschaffenheit, nicht geraten war.

Zu diesem Zwecke wurden 2 Versuchsreihen mit je 3 Nährböden verschiedener Herstellungszeit angesetzt, im ganzen also 6 Nährböden nach Klein geprüft.

Das erforderliche Serum stammte jedesmal von einem anderen Pferde, so daß 6 verschiedene Serumlieferungen verwendet wurden. Die Zubereitung geschah auch diesmal genau nach den Angaben Kleins.

Im ganzen wurden 22 verschiedene Diphtheriestämme für diese Versuche verwendet, für jede Versuchsreihe 11.

Bei der Aussaat der Bakterien wurde stets in der gleichen Weise verfahren, und zwar so, daß das mit Hilfe der Platinöse entnommene Kulturmaterial der Reihe nach auf dem Loeffler-Serum und dem Kleinschen Nährboden ausgestrichen wurde. Die Anfertigung der mikroskopischen Präparate nach 24 Std. erfolgte für je einen Stamm auf demselben Objektträger, um etwaige Unterschiede, die durch die Färbung bedingt sein könnten, auszuschalten. Es wurden also auf dem einzelnen Objektträger 4 Ausstriche (Loeffler-Serum, Klein-Serum I, II, III) angelegt und gleichzeitig nach Neisser gefärbt.

In der 1. Versuchsreihe hat der Kleinsche Nährboden fast völlig versagt. Alle 3 Nährbodenproben zeigten zwar gutes Wachstum der Diphtheriebazillen, genau wie das Loeffler-Serum, doch waren die Diphtheriebazillen im mikroskopischen Bilde kaum in 1 Falle als solche zu diagnostizieren. Eine Ausnahme machte lediglich 1 Stamm (Nr. 9), der auf Kleinschem Substrat II und III, weniger auf I, einigermaßen typische Formen der Diphtheriebazillen zur Entwicklung gelangen ließ. Auf dem Loeffler-Serum verhielten sich sämtliche Kulturen in jeder Hinsicht typisch. Demgegenüber waren in den Präparaten von Kleinschen Nährböden die Bakterien in der Form wesentlich verändert, sie sahen plump und dick aus und man vermißte dabei auch vielfach die charakteristische Lagerung. Im übrigen war die Polkörperchenbildung bzw. -Färbung, eines der wichtigsten Merkmale für die Diphtheriediagnose, oft sehr spärlich, ja manchmal überhaupt nicht vorhanden.

In der 2. Versuchsreihe lagen die Verhältnisse für den Kleinschen Nährboden viel günstiger. Der Unterschied zwischen diesem Nährboden

und dem Loeffler-Serum war in keinem Falle so in die Augen springend wie bei der 1. Serie, ja sogar meist unbedeutend. Alle 3 Nährbodenproben dieser Versuchsreihe reichen hinsichtlich des Wachstums, der morphologischen und färberischen Eigenschaften von Diphtheriebazillen ziemlich nahe an das Loeffler-Serum heran. Trotzdem war das Verhalten kein ganz regelmäßiges und konstantes. Nur 1 Stamm (Nr. 5) ließ auf dem Kleinschen Substrat vollständig typische Formen der Diphtheriebazillen zur Entwicklung gelangen; die mikroskopischen Präparate waren hier bei dem Loeffler-Serum und bei dem Klein-Serum (IV, V, VI) überhaupt nicht voneinander zu unterscheiden. Aehnlich lagen die Verhältnisse für 2 andere Stämme (Nr. 2 und 9), doch trat hier schon ein Unterschied insofern zutage, als das Substrat IV weniger typische Formen und mangelhafte Polkörperchenbildung zeigte. Einwandfreie Resultate ergaben ferner 1 Stamm (Nr. 1) bei der Kleinschen Nährbodenprobe V und 1 Stamm (Nr. 8) bei der Kleinschen Nährbodenprobe VI, deren mikroskopische Präparate in morphologischer und färberischer Hinsicht gleich dem Loeffler-Serumpräparate waren. Die übrigen Stämme (6) verhielten sich einigermaßen gleichmäßig. Die Diphtheriebazillen wuchsen, mit ganz geringen Unterschieden, auf dem Kleinschen Nährboden Probe V und VI fast wie auf Loeffler-Serum, dagegen ergab die Kleinsche Probe IV zum Teil atypische und verwaschene Formen und keine klare Neissersche Färbung.

Hiernach hat Probe IV am wenigsten befriedigt, die Proben V und VI gaben günstigere Resultate, in einigen Fällen fast so gut wie das Loeffler-Serum. Es hat also den Anschein, als könne der Kleinsche Nährboden unter Umständen das Loeffler-Serum ersetzen. Da der Nährboden auch über eine ausgesprochene Elektivität verfügt, wie ich mich bei den ersterwähnten Untersuchungen von diphtherieverdächtigem Material überzeugen konnte, und da er infolge seiner Durchsichtigkeit, bequemen Sterilisierbarkeit und Haltbarkeit entschiedene Vorzüge besitzt, so würde vielleicht nach dem von Klein angegebenen Prinzip eine Verbesserung der Methode zu erzielen sein. In der vorliegenden Form des Nährbodens und der Nährbodenbereitung ist das freilich noch nicht der Fall. Offenbar spielen bei der Herstellung unkontrollierbare Zufälligkeiten eine Rolle, die das Resultat der Untersuchung beeinflussen und damit den Wert des Verfahrens auf alle Fälle vermindern.

So sind von den von mir geprüften 6 Nährbodenproben höchsten 2 als Ersatz des Loeffler-Serums brauchbar gewesen, ohne daß sich für diese Unterschiede ein Grund hätte finden lassen. Bei dieser Unsicherheit habe ich daher auch davon Abstand genommen, die Versuche an Patientennmaterial fortzusetzen.

Wangsche Methode ¹⁾.

Die Herstellung des von Wang vorgeschlagenen Serumnährbodens geschieht folgendermaßen:

- 1) Es werden sterile Reagenzgläser mit 2,5 ccm möglichst steril entnommenem Rinderblutserum gefüllt.
- 2) Das Rinderserum wird durch Erhitzen im Wasserbad während 3 Std. bei 56° an drei aufeinanderfolgenden Tagen, also durch frak-

1) Wang, Detection of diphtheria bacilli in swabs by means of fluid serums. (Journ. of Pathol. & Bacteriol. Vol. 22. 1918. p. 229 -234.)

tionierte Sterilisation keimfrei gemacht. Das so hergestellte Kulturmedium soll dickflüssig sein und ist nach Sterilitätsprüfung zur Verwendung fertig.

Die Anwendung des Nährbodens geschieht so, daß der mit Untersuchungsmaterial imprägnierte Wattetupfer in das Reagenzglas gebracht wird, so daß er in das Serum eintaucht. Dann verbleibt das Röhrchen 24 Std. im Brutschrank, und zwar am geeignetsten in möglichst horizontaler Lage, jedoch ist darauf zu achten, daß der Tupfer die Oberfläche des Serums berührt. Zum Zwecke der Untersuchung wird das Reagenzglas gut geschüttelt, der Wattetupfer herausgenommen und auf einem Objektträger ausgestrichen, das Präparat dann in der gewöhnlichen Weise fixiert und nach Neisser gefärbt.

Bei der vergleichenden Prüfung dieses Verfahrens erzielte Wang äußerst günstige Ergebnisse. Unter 250 Proben lieferte ihm seine Methode in 68 Fällen einen positiven Befund von Diphtheriebazillen, wogegen mit dem Loefflerschen Plattenverfahren nur 52mal Diphtheriebazillen gefunden wurden. Hiernach würden also auf 100 positive Fälle bei dem Wangschen Serum nur ca. 77 für das Loeffler-Serum entfallen. Die Erklärung für seine so wesentlich besseren Untersuchungsergebnisse ist nach Wang darin zu suchen, daß, wenn der Wattetupfer auf dem Loeffler-Originalnährboden auch ganz gründlich abgestrichen wird, dennoch ein Teil des Materials unvermeidlich auf dem Tupfer zurückbleiben muß. Dieser Uebelstand wird eben durch das Verbleiben des Wattetupfers in dem flüssigen Kulturmedium beseitigt, so daß bei diesem Verfahren sämtliche Keime zur Entwicklung gelangen können. Der letztere Gesichtspunkt leuchtet in der Tat von vornherein sehr ein. Das ist der Grund, weshalb ich bei später zu berichtenden Versuchen mich ebenfalls dieser Technik bedient habe.

Wang betrachtet aber auch weiter die anderen bekannten und bewährten Nährböden als nicht ganz elektiv und nimmt an, daß deshalb auf ihnen manche Diphtheriekeime durch die Begleitbakterien im Wachstum zurückgehalten bzw. unterdrückt werden. Auch dieser Nachteil soll durch seine Methode beseitigt werden. Ob das letztere zutrifft oder nicht, wird weiter unten zu erörtern sein.

Zur Prüfung der Wangschen Methode habe ich mich bei der Herstellung des flüssigen Nährbodens streng an die von dem Autor¹ angegebene Technik gehalten, mit dem einzigen Unterschiede, daß die Sterilisation nicht im Wasserbad, sondern im Thermostaten bei 56°—57° an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, jedesmal 3½—4 Std., vorgenommen wurde. Die Nachprüfung auf Keimfreiheit im Brutschrank war befriedigend, so daß die Neuerung keinen ungünstigen Einfluß auf die Ergebnisse der Untersuchung haben konnte.

Die mir von der Untersuchungsabteilung zur Verfügung gestellten Wattetupfer wurden zuerst auf dem Loeffler-Serum ausgestrichen und, nachdem zuvor noch ein Originalpräparat zur sofortigen Untersuchung angefertigt worden war, in das Wangsche flüssige Serum hineingebracht. Am nächsten und eventuell übernächsten Tage wurden die Loeffler-Platten sowohl wie die Wangschen Röhrchen in der üblichen Weise untersucht. Bei diesem Gang der Untersuchung war die Wangsche Methode von vornherein in beständigem Nachteil, weil sie stets als letztes Glied an die Reihe kam. Eine Umkehrung der Reihenfolge war aber unmöglich, weil eben der Tupfer im Reagenzglas verbleiben mußte.

Um mich zunächst zu versichern, daß die Diphtheriebazillen auf dem zu prüfenden Nährboden überhaupt gut gedeihen, und gestützt auf die Erfahrung, die ich bei der Prüfung des Kleinschen Nährbodens in dieser Richtung gemacht hatte, prüfte ich das Wangsche Serum mit einzelnen Diphtheriestämmen. Diese Prüfung ergab sehr gute Resultate, so daß ich nunmehr ohne weiteres zu der eigentlichen Vergleichuntersuchung übergehen konnte.

Es wurden im ganzen 140 Fälle verglichen, von denen 52 positiv und 88 negativ ausgefallen sind. Unter diesen 52 positiven Fällen gelang der Nachweis von Diphtheriebazillen 40mal nach beiden Methoden (Loeffler-Platten und Wang), 8mal nur auf Loeffler-Platten, 4mal nur durch das Wangsche Verfahren. Somit ergab die Loefflersche Methode unter 140 Proben 48 positive Befunde, die Wangsche Methode 44, oder in Prozenten ausgedrückt 34,3 Proz. bzw. 31,4 Proz.

In quantitativer Hinsicht (Bakterienzahl) habe ich bei positivem Befunde von Diphtheriebazillen keine bemerkenswerten Unterschiede festgestellt. Was die Schnelligkeit des Nachweises der Diphtheriebazillen anbetrifft, so steht die Wangsche Methode dem Plattenverfahren etwas nach. Von den 40 für die beiden Methoden positiven Fällen waren 29 bereits nach 24 Std. auf beiden Nährboden diagnostiziert worden. Dagegen fand ich in 7 von den übrigen 11 positiven Fällen die Diphtheriekeime mittels des Plattenverfahrens schon nach 24 Std., mit der Wangschen Methode aber erst nach 48 Std.; in den 4 anderen Fällen wurden sie umgekehrt bei der Plattenmethode erst nach 48 Std. und bei der Wangschen Methode schon nach 24 Std. gefunden.

Bei einer zweiten Versuchsreihe von 26 Fällen mit insgesamt 9 positiven Befunden, bei welcher Wangs Methode noch mehr im Nachteil war, d. h. als 4. an die Reihe kam, durch Einschaltung eines 3. Nährbodens (Loeffler-Serum und Klein-Serum gingen voran), hatte ich in jedem der 8 beim Loefflerschen Verfahren positiven Fälle auch bei Wangs Methode positive Resultate zu verzeichnen. Ein einziger Fall ist überdies noch zugunsten der Wangschen Methode ausgefallen, während die übrigen Methoden versagten. Quantitativ waren keine besonderen Unterschiede zu verzeichnen, auch zeitlich nicht. Alle positiven Befunde konnten schon nach 24 Std. erhoben werden.

Diese letzten, allerdings wenig zahlreichen Versuche sprechen für die Güte des Wangschen Verfahrens. Dennoch bleiben, alles in allem betrachtet, die nach Wang erhaltenen Ergebnisse hinter den Resultaten der Loeffler-Platten etwas zurück, selbst wenn man die oben angeführte Benachteiligung berücksichtigt, d. h. daß das Wangsche Verfahren immer die letzte Stelle einnahm. Zu diesem Urteil veranlaßten mich auch noch folgende Beobachtungen:

1) Das Wangsche flüssige Serum zeigt nicht nur eine geringere Elektivität, sondern erlaubt, im Gegensatz zu den Angaben Wangs, ein sehr üppiges Wachstum der Begleitbakterien. Das muß selbstverständlich störend wirken.

2) Die Präparate lassen sich schwer in dünner Schicht herstellen, was ebenfalls die Besichtigung stört.

3) Zuweilen ließ sich schließlich noch ein 3. Nachteil konstatieren, daß nämlich das Serum, trotz energischer Hitzefixation, sehr ungenügend an dem Objektträger haftete.

Somit scheint mir das Wangsche Verfahren noch nicht imstande, das klassische Loeffler-Serum zu verdrängen.

Die oben im einzelnen besprochenen Resultate der vergleichenden Prüfung des Wangschen Verfahrens und hauptsächlich der positive Fall, den allein die Wangsche Methode ergab, wobei die anderen Verfahren versagten, weisen darauf hin, daß die Wangsche Methode vielleicht noch verbesserungsfähig ist. Es wäre wünschenswert, weitere Nachprüfungen anzustellen und event. durch Zusatz von irgendwelchen Substanzen, wie z. B. Kaliumsulfocyanid, welches nach v. Rankin die Begleitbakterien in ihrer Entwicklung hemmen soll, seine Spezifität zu erhöhen.

Ich habe auf die experimentelle Prüfung dieses Gedankens verzichtet, vielmehr im Anschluß an die Untersuchung der beiden neu empfohlenen Methoden versucht, eine andere methodische Frage zu entscheiden.

Vergleich zwischen dem Plattenverfahren und dem Röhrenverfahren (Loeffler-Serum).

Wenn zur Ermittlung von Diphtheriebazillen das Plattenverfahren im allgemeinen der Verwendung von Röhren vorgezogen wird, so gründet sich dies wohl hauptsächlich auf die Anschauung, daß die Platte dem Röhren gegenüber den Vorteil der größeren Nährbodenoberfläche besäße. Das Gleiche gilt ja eigentlich nicht nur für den speziellen Fall der Diphtheriediagnose, sondern auch sonst für bakteriologische Untersuchungen eines bakterienreichen Materials. In der Tat liegt es ja auch sehr nahe, von vornherein eine möglichst große Aussaatfläche zu wählen, weil hierdurch einmal reichere Mengen des Untersuchungsmaterials verarbeitet werden können, dann aber auch infolge der besseren Verteilung ein leichteres Auskeimen selbst spärlicher Diphtheriebazillen zu erwarten und deren Ueberwucherung durch Streptokokken, Staphylokokken und andere Keime offenbar weniger zu fürchten ist, als bei der relativ kleinen Oberfläche des Serumröhrens. Namentlich für den „Schmierausstrich“ scheint das Röhren weniger günstig zu sein. Infolge der in den letzten Jahren zumeist notwendig gewordenen Sparmaßnahmen ging man trotzdem vielerorts, wo man bis dahin nur die Serumplatten verwendet hatte, zu der Röhrenmethode über, da hierfür bedeutend weniger Hilfsmaterialien benötigt werden. Auch im hiesigen Institut werden seit längerer Zeit Serumschrägröhren benutzt. Die Erfahrungen, die man damit machte, schienen keineswegs zuungunsten der Schrägröhren zu sprechen; die regelmäßigen Untersuchungen von diphtherieverdächtigem Material lieferten etwa in dem gleichen Prozentsatz wie auch sonst positive Befunde, und vor allen Dingen standen die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung gut im Einklang mit den ärztlichen, epidemiologischen und hygienischen Beobachtungen. Namentlich zeigten sich bei der bakteriologischen Kontrolle Kranker und Gesunder im Falle von Massenerkrankungen (Diphtherie in Schulklassen und anderen Anstalten) keine wesentlichen Lücken. Immerhin war es erwünscht, die Leistungsfähigkeit des Plattenverfahrens und der Röhrenmethode einer genaueren vergleichenden Prüfung zu unterziehen. Ich habe es daher unternommen, an Hand einer Reihe von Versuchen festzustellen, inwieweit das Vorurteil gegen die Serumröhren tatsächlich begründet sei und ob sich bei geeigneter Arbeitsweise damit nicht ebenso sichere Resultate erzielen lassen, wie mit den Serumplatten. Traf diese letztere Annahme zu — und die bisherigen Beobachtungen schienen dafür zu sprechen —

so müßte man wohl annehmen, daß das ausgleichende Prinzip bei den Röhrchen das auf ihrem Boden angesammelte Kondenswasser sei. Es wäre ja ganz gut möglich, daß die Diphtheriekeime durch das Hineintauchen des Tupfers dort zur Anreicherung kämen und somit trotz der relativ kleinen Serumfläche nachgewiesen werden können. Diesen Vorteil besitzen die Platten nicht, welche gerade vom Kondenswasser befreit und trocken benutzt werden.

Die Versuche wurden, wie folgt, vorgenommen:

Es wurden im ganzen 197 Fälle untersucht, und zwar so, daß bei der einen Hälfte (95 Fälle) der Tupfer zuerst auf einer Serumplatte und dann auf einem Serumröhrchen ausgestrichen, bei der anderen Hälfte (102 Fälle) in umgekehrter Reihenfolge verfahren wurde. Es sollte dadurch vermieden werden, daß sich etwa beständig das eine Medium im Nachteil befände. In jedem Falle wurde außerdem im Anschluß an die kulturelle Verarbeitung des Materials ein Originalpräparat angefertigt. Als Nährboden gelangte stets das erstarrte Loeffler-Serum zur Verwendung.

In der ersten Versuchsreihe wurden 95 Fälle verglichen, von denen 59 ein negatives und 36 ein positives Resultat ergaben. Von den 36 positiven Fällen waren sowohl bei dem Platten- wie auch bei dem Röhrchenverfahren 31 Fälle positiv. Von den übrigen 5 Fällen entfallen 3 nur auf das Plattenverfahren und 2 nur auf die Röhrchenmethode, welche wohlbemerkt bei dieser Versuchsreihe als zweites Glied an die Reihe kam. Was die Menge der Diphtheriebazillen bei den positiven Befunden anbetrifft, so waren bei den Präparaten einerseits des Plattenverfahrens und andererseits der Röhrchenmethode keine bemerkenswerten Unterschiede zu verzeichnen. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als sich die oben erörterte Vermutung, daß auf der relativ kleinen Oberfläche eines Röhrchens die Diphtheriekeime von den Begleitbakterien im Wachstum zurückgehalten werden könnten, nicht als zutreffend herausgestellt hat. Da auch die Schnelligkeit des Nachweises der Diphtheriebazillen großen praktischen Wert hat, so sei ferner darauf hingewiesen, daß bei den 31 Fällen, in welchen die Auffindung von Diphtheriebazillen mittels beider Methoden gelang, 23mal bereits übereinstimmend nach 24 Std. Diphtheriebazillen festgestellt werden konnten. In 6 von den übrigen 8 positiven Fällen fand ich erst nach 48 Std. auf beiden Nährböden Diphtheriebazillen, in einem Falle wurden sie bei dem Plattenverfahren nach 24 Std. und bei der Röhrchenmethode nach 48 Std. und in dem letzten Falle umgekehrt bei dem Plattenverfahren nach 48 Std. und bei der Röhrchenmethode nach 24 Std. gefunden. Also steht in jeder Hinsicht das Röhrchenverfahren auf der gleichen Stufe wie das Plattenverfahren.

Die zweite Versuchsreihe bestätigte die guten Resultate der ersten.

Die 102 Fälle, welche für die vergleichende Prüfung benutzt worden sind, wurden genau nach der oben angegebenen Methode untersucht, mit dem schon erwähnten Unterschied, daß die Röhrchen zuerst an die Reihe kamen. Von diesen 102 Fällen waren 65 negativ und 37 positiv. Von den 37 positiven Fällen lieferten beide Methoden (Plattenverfahren und Röhrchenmethode) 34 positive Ergebnisse. Die übrigen 3 Fälle verteilen sich in der Art, daß 2 auf das Röhrchenverfahren und 1 auf das Plattenverfahren fielen. In quantitativer Hinsicht (Bakterienzahl)

habe ich auch diesmal keine Unterschiede gefunden. Was den Zeitpunkt der Auffindung der Diphtheriebazillen anbetrifft, so waren von den 34 für beide Methoden positiven Fällen 28 bereits nach 24 Std. und 5 nach 48 Std. auf beiden Nährböden diagnostiziert worden. Der übrig bleibende Fall lieferte das positive Resultat nach 24 Std. bei der Röhrenmethode und nach 48 Std. beim Plattenverfahren. Somit sind die Resultate der 2. Versuchsreihe übereinstimmend mit denjenigen der 1. und fast eher noch günstiger für die Röhrenmethode.

Die Resultate, über die oben berichtet worden ist, sprechen eine klare Sprache. Die Röhrenmethode ist dem Plattenverfahren gleichwertig und kann es, ohne daß besondere Nachteile entstehen, ganz ersetzen. Der Umstand, daß bei der 1. Versuchsreihe ein Plus von 1 Fall zugunsten der Plattenmethode verzeichnet werden konnte, fällt nicht ins Gewicht, gleichgültig, ob man darin lediglich einen Zufall erblicken will oder nicht, und es darf vor allen Dingen nicht vergessen werden, daß gerade in dieser Versuchsreihe stets die Röhrenmethode an zweiter Stelle kam und damit von vornherein im Nachteil war. Die Kontrolle liegt in der 2. Versuchsreihe, wobei nach der Umkehrung der Versuchsanordnung (zuerst Röhren und dann Platten) auch die Ergebnisse sich umkehrten und die Röhrenmethode um 1 positiven Fall überlegen war. Zusammenfassend kann ich also sagen, daß die Röhrenmethode gleich wie die Plattenmethode den Anforderungen der Diphtheriediagnose genügt.

Röhrenmethode (Loeffler-Serum) mit und ohne Verbleiben des Tupfers in dem Röhren.

Im Anschluß an die erwähnten Ueberlegungen, daß beim Verbleiben des Tupfers im Röhren sich vielleicht größere Vorteile für die Diphtheriediagnose erzielen lassen, weil alle auf dem Tupfer befindlichen Keime damit ausgenutzt werden, habe ich versucht, an Hand von 40 Fällen dieses Prinzip bei dem Loeffler-Serumröhren anzuwenden. Hierzu veranlaßte mich vor allem auch der Umstand, daß der Vergleich zwischen Röhren- und Plattenmethode fast keinen Unterschied ergeben hatte, und daß hierbei die Kondenswasserflüssigkeit der Serumröhren wahrscheinlich eine ausgleichende Rolle spielte.

Bei der Untersuchung ging ich so vor, daß die Diphtherietupfer zuerst auf der Oberfläche eines Serumröhrens ausgestrichen, dann in gleicher Weise über ein 2. Röhren hingeführt und zuletzt zur Anfertigung eines Originalpräparates auf dem Objektträger ausgestrichen wurden. Dann wurde der Tupfer in das 2. Röhren zurückgebracht, worin er verblieb. Dabei wurde ganz besonders beachtet, daß der Tupfer mit dem Kondenswasser in Berührung kam und sich mit der Flüssigkeit tränkte.

Es konnten in 11 von den 40 untersuchten Proben Diphtheriebazillen nachgewiesen werden. In allen diesen Fällen gelang die Auffindung der Bazillen in beiden Serumröhren, also auch nach einfachem Schmierausrich, ohne Verbleiben der Tupfers. Insofern war keinerlei Unterschied zu konstatieren. Hingegen hat die Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse, d. h. der Zahl der Diphtheriebazillen bei positivem Befunde, eine ausgesprochene Ueberlegenheit des Tupferverfahrens ergeben. In 5 von 11 positiven Fällen habe ich nämlich bei

der Röhrcben-Tupferkombination entschieden mehr Keime gefunden als in dem Präparate der einfachen Röhrcbenmethode, und dies, obschon die letztere Methode jedesmal als 1. Glied an die Reihe kam und daher im Vorteil war. 6 Fälle haben gleiche quantitative Resultate geliefert.

In zeitlicher Hinsicht waren Unterschiede nicht vorhanden; der positive Befund wurde in allen 11 Fällen bei beiden Verfahren innerhalb 24 Std. erhoben.

Eine Untersuchungsziffer von 40 Fällen ist verhältnismäßig gering, und es wird nötig sein, diese vergleichenden Prüfungen auf breiterer Grundlage fortzuführen. Immerhin läßt sich aus meinen Ergebnissen schon das eine entnehmen, daß durch das Belassen des Tupfers in dem Serumröhrcben die Untersuchungsergebnisse verbessert werden. Wenn in 5 unter 11 positiven Fällen die Diphtheriebazillen in größerer Menge als bei dem einfachen Ausstrichverfahren nachgewiesen werden konnten, so ist das unzweifelhaft ein Vorteil. Es wird hierdurch nicht nur die Auffindung der Diphtheriebazillen im mikroskopischen Präparat erleichtert, sondern es besteht vielleicht auch die Möglichkeit, sie in solchen Fällen noch zu entdecken, wo die gewöhnliche Röhrcbenmethode versagt. Ich habe zwar selbst keinen solchen Fall feststellen können, doch ist mein Untersuchungsmaterial, wie gesagt, nur ein beschränktes. Auch bietet das Tupferverfahren den Vorteil, daß bei der Anfertigung mikroskopischer Präparate die an dem Tupfer zurückgebliebenen Keime noch mit ausgestrichen werden, was ja gleichfalls die Aussichten eines positiven Befundes erhöht. Die Befürchtung, daß durch Belassen des Tupfers in dem Kondenswasser des Serumröhrcbens die Begleitbakterien eine starke Vermehrung erfahren und die Diphtheriebazillen leichter überwuchern können als sonst, hat sich bei meinen Beobachtungen nicht bestätigt. Es macht sich auch hier offenbar die Elektivität des Nährbodens geltend.

Zusammenfassung.

Die Nachprüfung der beiden von Klein und von Wang empfohlenen Methoden zum Nachweis von Diphtheriebazillen und der Vergleich mit Loeffler-Serum hat zu dem Resultat geführt, daß keines der beiden Verfahren in der vorliegenden Form geeignet ist, die bisher übliche Methode zu ersetzen.

Der Kleinsche Nährboden fällt aus unkontrollierbaren Gründen in seiner Zusammensetzung sehr verschieden aus; manche Male sind mit dem Nährboden gute Resultate zu erzielen, andere Male können, wie Versuche mit Reinkulturen einer größeren Zahl von Diphtheriestämmen dargetan haben, die Diphtheriebazillen in ihrer Form und ihrem Verhalten bei der Neisser-Färbung so verändert werden, daß ihre Identifizierung kaum möglich ist.

Das Wangsche Verfahren hat bei 140 Proben 44 positive Befunde ergeben gegenüber 48 bei Anwendung des Loeffler-Serums, ein zahlenmäßig nur geringer Unterschied, zumal bei Berücksichtigung des Umstandes, daß die Wang-Röhrcben immer zuletzt beimpft wurden.

Neben dem Vorzug der Einfachheit und des geringeren Materialverbrauchs hat der Nährboden den Nachteil, daß auch andere Bakterien

sehr reichlich zur Entwicklung gelangen, daß die Anfertigung genügend dünner Präparate erschwert ist, und daß die Schicht nicht immer fest genug haftet.

Vergleich des Loeffler-Serums in Form von Platten und schräg erstarrten Röhrchen, an ca. 200 Fällen durchgeführt, ergab Gleichwertigkeit beider Methoden. Die Röhrchenmethode kann daher sehr wohl an Stelle des Plattenverfahrens angewendet werden. Auf Grund weiterer Untersuchungen, die allerdings nur an kleinem Material (40 Proben) vorgenommen wurden, dürfte es sich empfehlen, nach Beimpfung des Schrägserumröhrchens den Tupfer im Kondenswasser zu belassen.

Nachdruck verboten.

Die weitere Anwendung unserer neuen Methode zur Wertbestimmung der antiinfektiösen Cholera- sowie Paratyphussera.

[Aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut der med. Akademie Osaka, Japan.

Von Prof. Y. Fukuhara.

Unsere frühere Arbeit¹⁾ über eine neue Methode zur Bestimmung des Typhusserums hat gezeigt, daß die alte übliche Bestimmungsmethode mit unkonstantem Testobjekte, nämlich mit lebenden Bazillen, deren Virulenz bzw. Rezeptorenapparate nach der Art der Stämme und der Züchtungsweise sehr variabel sind, eine sehr unsichere ist. Auf Grund unserer Versuche wählten wir ein Standardserum als Träger der Einheit zur Bestimmung und führten für das Prüfungsverfahren des antibakteriellen Serums außer dem seit Pfeiffer üblichen Begriff der Dosis letalis noch die Begriffe Limes Tod und Limes Null ein.

Seitdem ich ein Standardserum als einen einheitlichen und konstanten Maßstab zur Bewertung der antiinfektiösen Wirkungskraft des Typhusserums eingeführt habe, war mein Streben darauf gerichtet, diese neue Methode weiter zu entwickeln. Eine Reihe von interessanten und beweiskräftigen Arbeiten von mir und meinen Mitarbeitern Yoshioka und Uëno konnte, gestützt auf umfangreiche Versuche, den Nachweis dafür erbringen, daß meine Methode, praktisch auf die Bestimmung der anderen antiinfektiösen Sera angewendet, zu den zuverlässigsten Methoden gerechnet werden darf. Die Paratyphusversuche wurden durch Dr. Yoshioka und die Choleraersuche durch Dr. Uëno ausgeführt.

1) Vortrag, gehalten auf dem 5. Japan. med. Kongr. (April 1918). Fukuhara u. Yoshioka, Die neue Methode zur Bestimmung des Typhusserums (Japan. Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 15. 1919. Nr. 1; Festschr. f. Prof. Sata zu seinem 25-jähr. Professorenjubiläum 1920), und A new method of testing antityphoid serum. (The Journ. of Immunol. Vol. IV. 1919. Nr. 5.)

1.

Bei dem bisher üblichen Versuche zur Bestimmung der antiinfektiösen Choleraserum in vivo (z. B. an Meerschweinchen) pflegte man, das 5—10-fache Multiplum der letalen Dosis der Bazillen zu verwenden, also Dosen, die nicht größer als 1 Oese (2 mg) sind. Nachstehende übersichtliche Tabellen (Tab. 1 u. 2) veranschaulichen uns aber die Unbrauchbarkeit der alten, üblichen Methode zum Zwecke der genauen Austitrierung nicht allein des antiinfektiösen Choleraserums (Pferd 246), sondern auch des Paratyphusserums (Pferd 291).

Beim nachstehenden Versuche verwendeten wir dieselbe Versuchsanordnung, wie sie Pfeiffer für Cholera angegeben hatte. Nach Pfeiffer wird diejenige Dosis des Serums, die gerade noch ausreicht, um das Tier vor dem 10-fachen Multiplum der Dosis letalis zu schützen, als Immunitätseinheit (I.E.) bezeichnet.

Wir ersehen aus Tab. 1a, daß wir durch die Titrierung mit der gleichbleibenden Menge der verschiedenen Stämme, welche sich in ihrer Virulenz auch verschieden verhielten, keine gleichen Resultate erzielen können. Aus Tab. 1b und 2 geht hervor, daß bei den Versuchen mit dem 10-fachen Multiplum der letalen Dosis die Abschätzung sehr variabel ist, je nach der Art der Stämme.

Tabelle 1a.

Übersicht über die Ergebnisse der Versuche zur Bewertung des Choleraserums (246) mit den gleich bleibenden Bazillenmengen verschiedener Cholerastämme.

Stamm	Einfache letale Dosis	Gebrauchsdosis zur Wertprüfung	Der Serumwert wird bestimmt auf
„Oishi“	$\frac{1}{150}$ mg	2 mg	70 000 I.E.
„C“	$\frac{1}{75}$ „	2 „	60 000 „
„Yoshioka“	$\frac{1}{75}$ „	2 „	50 000 „

Tabelle 1b.

Übersicht über die Ergebnisse der Versuche zur Bewertung des oben genannten Serums mit dem 10-fachen Multiplum der letalen Dosis verschiedener Stämme.

Stamm	Einfache letale Dosis	Gebrauchsdosis zur Bestimmung	Der Serumwert wird bestimmt auf
„Oishi“	$\frac{1}{150}$ mg	D.L. \times 10	800 000 I.E.
„C“	$\frac{1}{75}$ „	dgl.	350 000 „
„Yoshioka“	$\frac{1}{75}$ „	„	200 000 „

Tabelle 2.

Übersicht über die Ergebnisse der Versuche zur Bewertung des Paratyphus B-Serums mit dem 10-fachen Multiplum der letalen Dosis zweier Paratyphusstäme.

Stamm	Einfache letale Dosis	Gebrauchsdosis zur Bestimmung	Der Wert des Serums 291 wird bestimmt auf
„Biwa“	0,4 Striche	D.L. \times 10	30 000 I.E.
„I“	0,5 „	dgl.	10 000 „

2.

Auf Grund obiger Versuche konnten wir die alte Methode als eine unsichere bezeichnen. Die einzig zuverlässige Wertbestimmung wird

selbstverständlich durch Benutzung eines Standardserums erzielt. Hierzu dient die Immunitätseinheit (antiinfektiöse Einheit); diese ist natürlich eine willkürlich gewählte Größe. Als Einheit bezeichneten wir diejenige Menge Antiserum, welche ein mit der 10-fachen Dosis letalis der damals zur Verfügung stehenden Kultur geimpftes Tier so schützte, daß es am Leben blieb.

Die Einheitsbestimmung des ersten, zu Standardzwecken verwandten Cholera- bzw. Paratyphusstandardserums wurde also in derselben Weise ausgeführt, wie wir dies in der früheren Typhusarbeit angegeben hatten. Zur 10-fachen Dosis letalis der Agarkultur wurden abgestufte Mengen (1 ccm verschiedener Verdünnungen) des Serums zugesetzt und diese Mischungen Meerschweinchen von ca. 250—300 g intraperitoneal gespritzt. Es wurde darauf diejenige Dosis des Serums zu ermitteln gesucht, die genügt, um das Tier vor dem Tode zu schützen.

Nach genau ausgeführten Versuchen wurde der antiinfektiöse Titer des Cholerastandardserums auf 6730 I.E. in 1 g Trockenserum (225) und derselbe des Paratyphusstandardserums auf 151 I.E. (Bock A) festgestellt. Tab. 3 und 4 illustrieren die Ergebnisse.

Der Virulenztitel der damals gebrauchten Stämme betrug 0,11 Striche bei Cholera-bazillen (Stamm „Oishi 15“) und 0,8 Striche bei Paratyphusbazillen (Stamm „Murata“).

Zur Bemessung der Bakterienmenge benutzten wir das Bakteriometer nach Fukuhara, eine unten zugeschmolzene Kapillare, bei der eine in 50 halbe mm eingeteilt

Tabelle 3.
Die Wertbestimmung des Cholerastandardserums „225“.

Serumverdünnung	Resultate	Serumverdünnung	Resultate
1 : 700 dgl.	davon "	1 : 5000 dgl.	davon "
1 : 1000 dgl.	davon "	1 : 6600 dgl.	davon "
..... 1)		1 : 6700 dgl.	davon "
1 : 2000 dgl.	davon † 13 Std. *)	1 : 6730 dgl.	davon "
"	davon "	1 : 6740 dgl.	davon "
.....		1 : 6740 dgl.	† 15 Std. davon
1 : 3000 dgl.	davon "	1 : 6750 dgl.	† 15 Std. davon
"	† 15 Std. davon	1 : 6780 dgl.	davon † 15 Std.
.....		1 : 6800 dgl.	† 15 Std. davon
1 : 4000 dgl.	davon "	1 : 6900 dgl.	† 15 Std. davon
.....			
1 : 5000 dgl.	davon "		
1 : 6000 dgl.	" "		

1) Zeichenerklärung: Wegen Raumersparnis wurden einige Teile des Protokolls ausgelassen.

2) † 20 Std. = tot innerhalb 20 Std.

Skala die Ablesung des Sedimentvolumens gestattet, das wir durch die Zahl der Teilstriche ausdrücken. 3 Striche des Bakteriometers entsprachen ca. 1 Oese.

Um individuelle Schwankungen in der Empfänglichkeit der Versuchstiere sicher auszuschalten, empfiehlt es sich natürlich, mehrere Tiere für die kritischen Werte einzustellen.

„Davon“ in den Tabellen bedeutet, daß die Tiere innerhalb 24 Std. nicht gestorben sind. Bei Paratyphus sterben häufig die anscheinend geschützten Tiere noch später (nach 3—14 Tagen). Das Verhalten in den späteren Tagen bei den Paratyphusversuchen bildet kein sicheres Kriterium zur Serumbemessung (s. Tab. 4.)

Tabelle 4.

Die Wertbestimmung des Paratyphus-Urstandardserums.

Serumverdünnung	Resultate	Serumverdünnung	Resultate
1:40 dgl.	davon († 5) ¹⁾ „ († 6)	1:155 dgl.	davon († 7) „
1:50 dgl.	davon „ († 13)	1:156 dgl.	† 18 Std. dgl.
1:100 dgl.	davon († 6) „ († 12)	„ „	„ davon
1:135 dgl.	davon († 7) „	1:157 dgl.	davon († 3) „
1:140 dgl.	† 20 Std. ²⁾ davon	1:158 dgl.	† 18 Std. dgl.
1:145 dgl.	davon († 3) „	1:159 dgl.	† 20 Std. dgl.
1:147 dgl.	davon († 7) „ († 3)	⋮	⋮
1:149 dgl.	davon († 3) „	1:170 dgl.	davon „
1:150 dgl.	davon († 6) „ († 3)	⋮	⋮
„	„ († 9)	1:180 dgl.	† 20 Std. dgl.
„	„ († 7)	⋮	⋮
1:151 dgl.	davon († 7) „	1:190 dgl.	† 20 Std. dgl.
1:154 dgl.	† 26 Std. davon († 4)		

3.

Bei unserer neuen Methode zur Bewertung der antiinfektiösen Sera kommt an Stelle des direkten Wertes der indirekte, d. h. die Limes-Tod- bzw. Limes-Null dosis, zur Anwendung. Unter Limes-Toddosis versteht man die kleinste Menge Bazillen, die, mit einer Immunitätseinheit gemischt und intraperitoneal injiziert, Meerschweinchen von 250—300 g im Laufe von 24 Std. tötet, unter Limes-Null dosis die größte Menge Bazillen, die, mit einer Serumeinheit geimpft und intraperitoneal eingespritzt, nicht imstande ist, innerhalb 24 Std. den Tod der Tiere herbeizurufen.

1) Die Zahl in Klammern bedeutet den späteren Tod. † 5 = tot am 5. Tage.

2) † 20 Std. = tot innerhalb 20 Std.

3) Zeichenerklärung: Wegen Raumerparnis wurden einige Teile des Protokolls ausgelassen.

Wir haben den indirekten Wert verschiedener Stämme mit dem Standardserum geprüft und gefunden, daß der indirekte Wert der Bazillen je nach der Art der Stämme sich verschieden verhielt und, daß nicht nur die letale Dosis, sondern auch der indirekte Wert der Testkultur mit der Zeit fortschreitend zunimmt (Tab. 5 u. 6). Infolgedessen muß man bei Bemessung irgendeines Serums zuerst den indirekten Wert der Testkultur mit dem Standardserum einstellen.

Aus unseren mehrmals angestellten Versuchen ergibt sich, daß die Untersuchung mit Limes-Null dosis (Ueberleben sämtlicher Versuchstiere) eine unpraktische ist. Wir ziehen deswegen die Serumprüfung mit Limes-Toddosis vor. Bei Limes-Toddosisverfahren ist das Entscheidende der Tod des Tieres innerhalb 24 Std.

Tabelle 5.
Der indirekte Wert und die letale Dosis der Cholerastämme.

Stamm	Letale Dosis	Limes-Toddosis	Limes-Null dosis
„Oishi 16“	ca. 0,0006 Str.	3,9 Str.	2,7 Str.
„Sakiti“	„ 3,8 „	15,0 „	10,0 „
„Oishi 15“	„ 0,11 „	3,8 „	nicht bestimmt

Tabelle 6.
Der indirekte Wert und die letale Dosis der Paratyphus B-Stämme.

Stamm	Letale Dosis	Limes-Toddosis	Limes-Null dosis
„Murata“	0,8 Str. (Nov. 1919)	11,7 Str. (Nov. 1919) 13,8 Str. (Dez. 1919) 14,8 Str. (März 1920)	11,0 Str. (Nov. 1919)
„Biwa“	0,4 Str. (Febr. 1920)	14,6 Str.? (Febr. 1920) 19,0 Str. (März 1920)	13,0 Str. (Febr. 1920)
„Ejima“	7,0 Str. (Aug. 1920)	13,0 Str. (Aug. 1920)	.
„Moribe“	30,0 Str. (Aug. 1920)	10,7 Str. (Aug. 1920)	10,0 Str.? (Aug. 1920)

Ist die Limes-Toddosis für irgendeinen Stamm festgestellt, so mischt man mit dieser Menge verschiedene Verdünnungen des zu prüfenden Serums, läßt das Gemisch 30 Min. bei 37° C stehen und spritzt es Meerschweinchen intraperitoneal ein; darauf findet man diejenige Menge, die den Tod der Tiere innerhalb 24 Std. bewirkt. Ist hierzu z. B. 1:850 ccm Serum (vgl. Tab. 7) erforderlich, so sagt man folgerichtig: das Serum enthält in 1 ccm 850 Immunitätseinheiten (I.E.).

Wie wir in unserer früheren Typhusarbeit gezeigt haben, bewährte sich diese Methode auch bei der Prüfung der Cholera- und Paratyphussera. Aus der großen Zahl der Untersuchungen, welche seit 2 Jahren durch meine Mitarbeiter bezüglich der Bewertung der Cholera- und Paratyphussera angestellt wurden, seien nur einige Versuchsprotokolle unten wiedergegeben. Bei jeder Untersuchung wurde ein und dasselbe Serum

mittels verschiedener Stämme gleichzeitig in parallelen Versuchsreihen ausstitriert (Tab. 7 u. 8):

Tabelle 7.
Die Wertbestimmung des Paratyphusserums „291“ mittels Limes-Toddosis.

Serumverd.	Stamm „Murata“	Serumverd.	Stamm „Murata“	Stamm „Biwa“
1:200 dgl.	† 18 Std. davon	1:740 dgl.	.	davon
1:250 dgl.	davon † 18 Std.	1:770 dgl.	.	davon
1:280 dgl.	davon „	1:800 dgl.	.	davon
1:300 dgl.	† 18 Std. davon	1:830 dgl.	† 18 Std. davon	† 15 Std. davon
1:320 dgl.	davon „	1:840 dgl.	davon „	davon
1:360 dgl.	davon „	1:850 dgl.	† 18 Std. † 20 „	† 18 Std. † 18 „
1:560 dgl.	davon „	1:860 dgl.	† 18 Std. † 18 „	† 18 Std. † 18 „
1:640 dgl.	davon † 22 Std.	1:870 dgl.	† 18 Std. † 18 „	† 18 Std. † 18 „
1:690 dgl.	davon „			

Tabelle 8.
Die Wertbestimmung des Choleraserums „246B“ mittels Limes-Toddosis.

Serumverd.	Stamm „Oishi 16“	Stamm „Sakiti“	Serumverd.	Stamm „Oishi 16“	Stamm „Sakiti“
1:1700 dgl.	davon „	davon † 22 Std.	1:2000 dgl.	† 15 Std. † 15 „	.
1:1800 dgl.	† 15 Std. davon	davon † 15 Std.	1:2300 dgl.	† 15 Std. † 15 „	† 15 Std. † 15 „
1:1900 dgl.	† 15 Std. † 22 „	† 15 Std. † 15 „	1:3500 dgl.	† 15 Std. † 15 „	† 15 Std. † 15 „

Aus den oben angeführten Versuchen können wir ersehen, daß sich bei Verwendung verschiedener Stämme fast die gleiche Titerhöhe eines und desselben Serums feststellen ließ.

4.

Die Wertbemessung mittels der Limes-Null dosis ist zwar ein unpraktisches Verfahren; man kann jedoch auch damit ein Serum titrieren und die gleichen Resultate wie bei der Messung mittels der Limes-

Toddosis gewinnen. Darüber haben wir bereits in unserer früheren Arbeit gesprochen. Dies ließ sich auch in folgenden Versuchen zeigen (Tab. 9 u. 10):

Tabelle 9.

Die Wertbestimmung des Choleraserums „246“ mittels Limes-Toddosis vom Stamm „Oishi 16“

Serumverd.	„Oishi 16“	Serumverd.	„Oishi 16“	Serumverd.	„Oishi 16“
1:200 dgl.	davon „	1:600	† 15 „	1:780 dgl.	† 22 Std. dgl.
1:300 dgl.	davon † 15 Std.	1:660 dgl.	davon „	„	† 15 Std. dgl.
1:400 dgl.	davon † 15 Std.	1:700 dgl.	davon † 15 Std.	1:800 dgl.	† 15 Std. dgl.
1:500 dgl.	davon † 15 Std.	1:740 dgl.	davon † 20 Std.	1:820 dgl.	† 15 Std. davon
1:550 dgl.	davon „	1:760 dgl.	davon † 22 Std.	1:840 dgl.	† 15 Std. dgl.
1:600	† 15 Std.	„	† 15 Std.		

Tabelle 10.

Die Wertbestimmung des Choleraserums „246“ mittels Limes-Null dosis von Stamm „Sakiti“.

Serumverd.	„Sakiti“	Serumverd.	„Sakiti“	Serumverd.	„Sakiti“
1:660 dgl.	davon „	1:740 dgl.	davon „	1:780 dgl.	davon „
1:700 dgl.	davon „	1:760	davon	1:800 dgl.	davon † 27 Std.
		1:780 dgl.	davon „	1:820 dgl.	davon † 26 Std.
				1:840 dgl.	† 15 „ davon

Aus Tab. 9 ergibt sich, daß unter Benutzung der Limes-Toddosis des Stammes „Oishi“ das Serum „246“ als 780-fach anzusehen ist. Genau dasselbe Ergebnis hatte der Parallelversuch (Tab. 10) unter Benutzung der Limes-Null dosis von Stamm „Sakiti“.

5.

Daß der indirekte Wert der Bazillen einer zeitlichen Veränderung unterliegt, kann man aus Tab. 5 und 6 sowie aus der Uebersichtstabelle 11 entnehmen:

Tabelle 11.

Stamm	Datum	Limes-Toddosis	Limes-Nulldosis
„Oishi 16“	August 1918	2,4 Str.	
	Oktober „	3,9 „	2,7 Str.
	Dezember „	7,7 „	5,4 „
„Sakiti“	Oktober „	15,0 „	10,0 „
	Dezember „	18,0 „	

Mit der Zeit nimmt also nicht nur die letale Dosis, sondern auch die Limes-Tod- sowie die Nulldosis fortschreitend zu. Das schadet aber nichts. Da wir einen einheitlichen und konstanten Maßstab, das Standardserum, zur Bestimmung der antiinfektiösen Wirkungskraft eines Serums haben, können wir ruhig beliebige Kultur zur Prüfung anwenden, ohne uns um die Virulenz zu bekümmern. Eine Virulenzsteigerung durch Tierpassage ist unnötig. Selbst der Stamm „Sakiti“, von dem mehr als 1 Oese Meerschweinchen nicht sicher töten konnte, hat sich bei der Wertbemessung des Serums ebenso brauchbar erwiesen, wie der andere hochvirulente Stamm „Oishi 16“ (letale Dosis: $\frac{1}{150}$ Oese (s. Tab. 8).

Zusammenfassung.

1) Wir dehnten unsere Untersuchungen über die antiinfektiöse Wertbemessung auf Cholera- und auch auf Paratyphussera aus. Die Versuche hatten das Ergebnis, daß die in unserer früheren Typhusarbeit bereits mitgeteilte Prüfungsmethode der antiinfektiösen Sera sich auch für die Bewertung des antibakteriellen Cholera- und Paratyphusserums verwenden läßt.

2) Das Prinzip der Wertbestimmung des Cholera- und Paratyphusserums ist ganz dasselbe wie bei Typhus. Die Methode ist also folgende: Man bestimmt zuerst die Limes-Toddosis einer beliebigen Cholera- bzw. Paratyphuskultur mittels unseres Standardserums. Mit der gefundenen Titerdosis mischt man verschiedene Mengen eines zu prüfenden Serums und findet diejenige Dosis, die eben den Tod der Tiere innerhalb 24 Std. bewirkt. Ist hierzu z. B. 0,001 ccm Serum erforderlich, so sagt man: das Serum enthält 1000 antiinfektiöse Immunitätseinheiten in 1 ccm.

3) Als Prüfungsbakterien kann man jede beliebige Kultur verwenden. Die Kontrolle der Virulenz ist gar nicht wichtig. Eine Virulenzsteigerung durch Tierpassage ist auch unnötig.

4) Bei den Paratyphusversuchen kommt es häufig vor, daß die anscheinend mit Serum geschützten Tiere noch später (nach 4–14 Tagen) zugrunde gehen. Bei Anwendung unserer Methode zur Wertbestimmung der Paratyphussera ist das Spätsterben gar nicht störend, denn das Verhalten der Tiere in den ersten Tagen nach der Injektion bildet ein entscheidendes Kriterium.

5) Eine gleichartige Wertbemessung sowie auch ein Vergleich der in verschiedenen Instituten hergestellten und mit verschiedenen Stämmen

abgeschätzten Serumpräparate läßt sich am sichersten und besten durch die Einführung unserer Methode erreichen.

Zum Schlusse fühle ich mich zu Danke verpflichtet Herrn Fujishige, der für mich mit großer Mühe Material gesammelt hat, und meinem Assistenten, Herrn Suko, der die gute Hälfte dieser Arbeit geleistet hat, sowie Herrn Gymnasiallehrer Mizoguchi in Takeda, der in so liebenswürdiger Weise für meine Arbeit wertvolles Material aus weiter Ferne hergeschickt hat und schließlich Herrn Prof. K. Miyairi, für die immerwährende Anregung und Anleitung sowohl den Herren Dr. M. Suzuki und T. Nishio für ihre guten Ratschläge.

Nachdruck verboten

Vergleichende Untersuchungen über neuere Färbemethoden für Tuberkelbazillen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Jena.]

Von Dr. Otto Hermann Spreitzer.

Für die Färbung der Tuberkelbazillen in Auswurfpräparaten und anderen tuberkelbazillenhaltigen Materialien ist noch immer die Ziehl-Neelsensche Methode der Färbung mit Karbolfuchsin, Entfärbung mit Mineralsäure und Alkohol und Nachfärbung mit Methylenblau die beliebteste und am meisten verwendete. Sie hat die ursprüngliche Kochsche Färbung (alkalisches Methylenblau-Vesuvin) ganz verdrängt und sich auch gegenüber mannigfachen anderen Färbemethoden behauptet, obwohl ihr gewisse Mängel zum Vorwurf gemacht werden. So wird angegeben, daß die Methode manche Tuberkelbazillen nicht erkennen lasse, weil diese die Gegenfärbung mit Methylenblau annähmen. Auch sei der Farbkontrast zwischen blau und rot nicht immer genügend stark, um bei schwach positiven Untersuchungsobjekten mit Sicherheit und Leichtigkeit vereinzelte Tuberkelbazillen erkennen zu können.

Wir haben einige neuerdings empfohlene anderweite Färbemethoden für Tuberkelbazillen im Vergleich zu dem Ziehl-Neelsenschen Verfahren geprüft und wollen im folgenden über die Ergebnisse berichten:

Die geprüften neuen Verfahren waren folgende:

1. Färbung Joetten-Haarmann. Sie stellt eine vereinfachte Modifikation der Spenglerschen Färbemethode dar. Nach der Vorfärbung mit Karbolfuchsin wie bei Ziehl-Neelsen wird das Präparat ungefähr 20 Sek. lang mit 15-proz. Salpetersäure entfärbt, dann kurz in Wasser abgespült und weitere 10 Sek. mit Salpetersäure behandelt. Dann wird wieder abgespült und ungefähr 30 Sek. lang mit Spenglers Pikrinsäure-Alkohol (gesättigte wäßrige Pikrinsäure und Alkohol absolut zu gleichen Teilen) nachgefärbt. Nachdem nochmals mit Wasser abgespült und das Präparat getrocknet ist, ist es mikroskopierfertig.

2. Färbung Schaedel. Zur Färbung der Tuberkelbazillen wird eine konzentrierte alkoholische Lösung von Methylviolett B. N. bereit-

gehalten, die zum Gebrauch filtriert und mit 9 Teilen 2-proz. Karbolwassers vermischt wird. Der Gang der Färbung ist folgender: Erhitzen des mit der Farblösung beschickten Objektträgers bis zum 3-maligen Aufkochen, dann Abspülen in Wasserstrahl. Es folgt die Entfärbung in 3-proz. Salzsäure-Alkohol, bis das Präparat grau aussieht. Danach wird abgespült und mit Bismarckbraun oder Chrysoidin 2 Min. nachgefärbt.

3. Färbung Marx. Sie besteht darin, daß das die Gegenfärbung liefernde Methylenblau der Ziehl-Neelsenschen Methode überhaupt fortgelassen oder durch Chrysoidin ersetzt wird. Verwandt wird zur Färbung der Tuberkelbazillen Karbolfuchsin und zur Gegenfärbung die von M. Neisser für die Diphtheriefärbung angegebene Chrysoidinlösung (1,0 Chrysoidin in 300 ccm kochendem Wasser gelöst und dann filtriert). Mit dieser Lösung wird 3—5 Sek. gegengefärbt.

4. Färbung Ulrichs. Man färbt zunächst mit Ziehl-Karbolfuchsin in der üblichen Weise, sodann wird mit 15-proz. Salpetersäure und 70-proz. Alkohol entfärbt und 60 Sek. lang mit Chromsäure-Alkohol gegengefärbt. (Acidum chromicum 1,0—60-proz. Spiritus ad 100,0). Danach kurzes Abspülen im Wasserstrahl und Trocknen.

5. Färbung Konrich. $\frac{1}{2}$ bis 2 Min. lang mit heißem Karbolfuchsin — Konrich verwirft ausdrücklich das Kochenlassen, um Farbstoffniederschläge zu vermeiden — färben, kräftig abspülen mit Wasser, entfärben mit 10-proz. wäßriger Natriumsulfatlösung bis zur völligen Entfärbung, wiederum abspülen mit Wasser. Die Kontrastfärbung wird mit wäßriger Malachitgrünlösung $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Min. vorgenommen. (50,0 gesättigte wäßrige Malachitgrünlösung + 100,0 Wasser).

Diese 5 Färbeverfahren wurden an 360 Sputis geprüft. Es geschah dies so, daß die Sputa, von außerhalb zur Diagnosenstellung eingesandt im Betriebe des Instituts, wie üblich, nach dem Ziehl-Neelsenschen Verfahren und daneben von mir nach den 5 erwähnten neuen Verfahren untersucht wurden. Dann wurden die Untersuchungsergebnisse des Instituts mit den meinigen verglichen.

Unter den 360 Sputis befanden sich 100 nach den neueren Verfahren einwandfrei positive Sputa. Unter diesen 100 waren jedoch 6, die zunächst nach der Ziehl-Neelsenschen Methode nicht als positiv erkannt worden waren. Erst bei der 2. Untersuchung mittels dieser Methode wurden nach langem Suchen vereinzelt Tuberkelbazillen gefunden. Es zeigte sich, daß nach allen ausgeführten neuen Verfahren die Tuberkelbazillen viel leichter zu erkennen waren als nach Ziehl-Neelsen. Auch war durchweg die Anzahl der in einem Gesichtsfeld gefundenen Tuberkelbazillen nach den neuen Färbemethoden viel größer. Um dies zahlenmäßig zu bekräftigen, habe ich in 50 untersuchten Sputis je 10 Gesichtsfelder nach den verschiedenen Färbemethoden durchgezählt und dann die Durchschnittszahl der gefundenen Tuberkelbazillen notiert. Das Ergebnis war, daß, während bei den 50 Sputis nach Ziehl-Neelsen durchschnittlich nur 5,76 Tuberkelbazillen im Gesichtsfeld zu finden waren, es nach Joetten-Haarman 13,04, nach Schaedel 12,56, nach Marx 14,5, nach Ulrichs 12,5 und nach Konrich sogar 14,94 waren.

Fraglos sind also die neuen Färbeverfahren den Ziehl-Neelsenschen überlegen. Im einzelnen ist über sie folgendes zu sagen:

Joetten und Haarmann haben ihre Färbemethoden an Hand von vergleichenden Untersuchungen mit anderen Färbeverfahren erprobt. Sie färbten zunächst nach dem Spenglerschen Verfahren, kamen dann aber auf ihre oben beschriebene Modifikation, die eine Vereinfachung ist, denn sie spart Zeit und verlangt keine so komplizierte Färbungs- und Entfärbungsweise. Die Vorzüge der Färbung Joetten liegen einmal darin, daß der Farbkontrast stärker ist, andererseits, daß durch die Behandlung mit Pikrinsäure-Alkohol das Gewebe aufgehellert und durchsichtiger wird, so daß auch die unter Gewebs- und Zellbestandteilen liegenden Tuberkelbazillen leichter zu Gesicht kommen als bei Ziehl-Neelsen.

Schaedel empfiehlt seine Methode einmal für Farbenblinde und dann für Normalsichtige zum Nachweis der granulären Form. Leider hatte ich nicht Gelegenheit, diese Färbemethode bei Farbenblinden erproben zu können. Jedoch leuchtet es wohl allgemein ein, daß die nach Schaedel schwarzviolett gefärbten Tuberkelbazillen auf braunem Grunde leichter zu erkennen sind als rote auf tiefblauem. Schaedel führt in seiner Beschreibung an, daß nach Fuchs etwa 3—4 Proz. aller Männer gerade vorwiegend rot-blau-blind sind. Was die Vorzüge in bezug auf den Nachweis der granulären Form anbetrifft, so kommt tatsächlich nach dem Verfahren eine Menge des granulären Tuberkelvirus zur Darstellung. Schließlich ist auch hier wieder hervorzuheben, daß der Farbkontrast größer ist als bei Ziehl-Neelsen und daß der klare Chrysoidingrund die schwarzviolette Farbe der Tuberkelbazillen gut durchscheinen läßt.

Marx geht von einem Vorschlage Kayzers aus, die Nachfärbung der Untersuchungsobjekte zu unterlassen oder mit Vesuvin nachzufärben (Herrmannsche Färbung). Die von Kayser angeführten Vorzüge — 8 Proz. mehr positive Resultate als bei anderen Verfahren — führt Marx auf das Fortfallen der Gegenfärbung oder auf die Gegenfärbung mit Vesuvin zurück. Er schlägt nur eine andere Gegenfärbung vor, und zwar verwendet er Chrysoidin statt Vesuvin. Ich schließe mich der Ansicht von Marx an, daß durch die Gegenfärbung die Zahl der erkennbaren Tuberkelbazillen nicht merkbar verändert wird. Infolgedessen habe ich die Methode, bei der er die Gegenfärbung fortläßt, in meinen Untersuchungen nicht berücksichtigt, sondern stets mit Chrysoidin nachgefärbt. Der Vorzug der Marxschen Methode liegt darin, daß Tuberkelbazillen ohne weiteres bei dem ersten Blick in das Mikroskop zu erkennen waren, während oft in den Präparaten, die nach Ziehl-Neelsen gefärbt waren, nach Tuberkelbazillen gesucht werden mußte. Mit anderen Worten stellt die Methode Marx eine Verkürzung der Arbeitszeit dar und außerdem zeigt sie Tuberkelbazillen in größerer Zahl als Ziehl-Neelsen.

Ulrichs schließt sich an die Färbemethoden von Spengler und Kronberger an, von denen die Kronbergersche an Stelle des Pikrinsäure-Alkohols von Spengler Jod-Alkohol verwendet. Besondere Vorzüge konnte ich an der Methode von Ulrichs nicht entdecken. Daß auch hier mehr Tuberkelbazillen zur Darstellung kommen, liegt wohl an der Vermeidung des Methylenblaus der Ziehl-Neelsenschen Methode. Die Gegenfärbung ist jedoch nicht so kontrastreich als bei den Färbungen von Joetten, Schaedel, Marx und auch der von Konrich.

Statt der Nachfärbung mit Methylenblau hatte ich bereits auf Veranlassung von Herrn Geheimrat Abel einen grünen Farbstoff benutzt und von den versuchten Farben Jodgrün, Methylgrün und Malachitgrün das letztere in wäßriger Lösung hinsichtlich Färbung und Kontrast be-

sonders geeignet gefunden, als die Methode Konrich veröffentlicht wurde. Ich ging nun zu dieser über aus Sparsamkeitsrücksichten, denn ich entfärbte mit Salzsäure-Alkohol, demgegenüber die wäßrige 10-proz. Natriumsulfitlösung von Konrich eine wesentlich billigere Entfärbungsflüssigkeit darstellt. [1 g Natriumsulfit kostet jetzt 1,5 Pf., also 100 g der Entfärbungsflüssigkeit 20 Pf. (einschließlich Aqua dest.), während die gleiche Menge Salzsäure-Alkohol sich fast auf das 10-fache beläuft.]

Die Methode Konrich brachte die besten Resultate, denn sie ließ am meisten Tuberkelbazillen im Gesichtsfeld erkennen. Sie ist sicher, billig, da sie keinen Alkohol, nur das auch heute noch wohlfeile Natriumsulfit braucht, und gibt schöne deutliche Bilder. Ihr einziger Nachteil wäre, daß sie für Rot-grün-Farbenblinde nicht in Betracht kommt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die geprüften neueren Färbeverfahren einen Fortschritt gegenüber der Ziehl-Neelsenschen Methode bedeuten. Sie lassen mehr Tuberkelbazillen finden, stellen sie deutlich und leicht erkennbar dar und bieten keinerlei Schwierigkeiten in der Technik der Färbung gegenüber der Ziehl-Neelsenschen Methode, so daß sie jederzeit im Laboratorium eingeführt werden können. Die Konrichsche Färbung empfiehlt sich besonders durch Billigkeit und gute Ergebnisse.

Literatur.

1) Caan, Vergleichende Untersuchungen über neuere Methoden der Tuberkelpilzfärbung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909.) — 2) Ders., Enzyklop. d. mikroskop. Technik. S. 309 ff. — 3) Heim, Lehrb. d. Bakteriologie. S. 63 ff. — 4) Joetten u. Haarmann, Neuere Färbungsverfahren für Tuberkelbazillen. (Münch. med. Wochenschr. 1920. S. 692.) — 5) Kayser, Vergleichende Untersuchungen mit neueren Methoden des Tuberkelbazillennachweises. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1910.) — 6) Koch, Die Aetiologie und die Bekämpfung der Tuberkulose. (Klassiker d. Med. Bd. 19.) — 7) Konrich, Eine neue Färbung für Tuberkelbazillen. (Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 741.) — 8) Lenhartz-Meyer, Mikroskopie u. Chemie am Krankenbett. — 9) Marx, Notiz zur Färbung tuberkuloseverdächtiger Sputa. (Münch. med. Wochenschr. 1919. S. 416.) — 10) Schaedel, Eine einfache Tuberkelbazillenfärbung (1. für Farbenblinde, 2. für Normalsichtige zum Nachweis der granulären Form.) (Ebenda. 1920. S. 693.) — 11) Ulrichs, Färbung der Tuberkelbazillen mit Karbolfuchsin-Chromsäure. (Dtsch. med. Wochenschr. 1919. S. 468.)

Nachdruck verboten.

Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbazillen im Sputum.

[Aus der bakteriologischen Untersuchungsabteilung (Leiter Prof. Dr. C. Prausnitz) des Hygienischen Institutes der Universität Breslau (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Willy Bender, Assistent.

Unter den Methoden zum färberischen Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum hat bisher die von Ziehl und Neelsen angegebene den Vorrang behauptet. Der verhältnismäßig hohe Grad diagnostischer Sicherheit, die leichte Herstellung und Haltbarkeit der Farblösungen, sowie die nur wenige Minuten dauernde Fertigstellung des Präparates

sind ihre bisher unübertroffenen Vorzüge. Wo die Bazillen im Sputum nur spärlich vorhanden waren, leistete sie nach vorhergegangener Homogenisierung und Ausschleuderung Vorzügliches. Unter den vielen sogenannten Anreicherungsverfahren hat sich die Uhlenhuthsche Antiformin-Methode am besten bewährt. Ueber Einwände gegen dieses Verfahren, seine Vorzüge und weiteren Verbesserungen der Technik verweise ich auf die eingehenden Arbeiten von Hundeshagen, Jötten, Voigt, Vogelbach und Friedland. Aus allen diesen Arbeiten geht der Wert der Antiforminanreicherung nach der von Hundeshagen angegebenen Technik sowohl gegenüber der Untersuchung des einfachen Originalausstriches als auch gegenüber den übrigen Anreicherungsverfahren deutlich hervor. Der allgemeinen Anwendung stehen jedoch immerhin praktische Schwierigkeiten im Wege, die in der heutigen Zeit erheblich ins Gewicht fallen, da sie bedingt sind durch die Kostspieligkeit und die lange Dauer des Verfahrens.

Daher ist immer versucht worden, den Nachweis der Bazillen im direkten Ausstrich möglichst sicher zu gestalten. Die Möglichkeit der Verfeinerung ist in der Veränderung dreier Bedingungen der Präparatherstellung gegeben, der eigentlichen Tuberkelbazillenfärbung oder Intensivfärbung, der Entfärbung der übrigen Bestandteile oder Differenzierung und der Nachfärbung der letzteren oder Gegenfärbung. Als Mißerfolg haben sich alle Methoden herausgestellt, die Differenzierung und Gegenfärbung zu gleicher Zeit vornehmen wollen, so die Verfahren von Torchetti, Johnes, Rondelli und Buscalioni, Gabbet, Weichselbaum und anderen.

Es soll hier nur die Rede sein von eigentlichen Tuberkelbazillenfärbemethoden, während die Muchsche Granulafärbung eine Sonderstellung einnimmt; um so mehr, als bisher kein vollgültiger Beweis für die Möglichkeit der Diagnosestellung der Tuberkulose allein auf Grund vorhandener Granula erbracht erscheint.

Von den Methoden mit veränderter Intensivfärbung verdient die von Hermann angegebene Beachtung (als Intensivfärbung Kristallviolett). Nach den Angaben vieler Autoren (z. B. Naegeli, Akersblom und Vernier, Adam, Caan, Berka, Kayser, Krumwiede und Blackburn, Frei, Kongsted u. a.) gibt sie öfters positive Resultate in Fällen, in denen Ziehl-Neelsen versagt. Die neueste und allgemein bestätigende Arbeit von Kongsted über diese Hermannsche Färbung scheint aber doch ein Bedenken zu enthalten, das die uneingeschränkte Anwendung zu empfehlen verbietet. Es kommt nämlich in vereinzelt Fällen vor, daß Kokken sich nicht völlig entfärben. Nicht entfärbte Kokken können aber nach meiner Meinung zur Verwechslung mit Tuberkelbazillensplittern führen und so die Diagnosestellung gefährden. Kongsted erhebt auch den nicht zu vernachlässigenden Einwand, „daß nicht alle Bazillen, die sich nach der Hermannschen Methode färben lassen, tatsächlich Tuberkelbazillen sind, wogegen aber ihre typische Gestalt deutlich spricht“. Aber bekanntlich gibt auch Ziehl-Neelsen nach dieser Richtung ausnahmsweise Fehlresultate, wovon auch ich mich überzeugt habe. Auf den wahrscheinlichen Grund des Vorteils der Hermannschen Methode komme ich weiter unten zu sprechen.

Soweit ich die Literatur übersehe, sind sonstige weitere Aenderungen der Intensivfärbung bisher nicht angegeben worden. Aber ein oft nicht

beachteter Punkt verdient hervorgehoben zu werden: die Färbung der Tuberkelbazillen muß maximal sein (Krönig und Hundeshagen), d. h., es muß ein Erwärmen der Karbolfuchsinlösung bis zum gerade beginnenden Bläschenspringen und mehrere Minuten dauerndes Färben stattfinden. Die unzureichende Färbung hat zur Folge, daß ein Teil der Bazillen zu schwach gefärbt oder zu leicht entfärbt und deshalb übersehen wird.

Die Flüssigkeiten zur Differenzierung der Präparate sind in den letzten Jahren mit Ausnahme des Verfahrens von Konrich kaum im wesentlichen verändert worden, nur wird immer wieder auf die Gefahr einer zu starken Entfärbung durch zu hohe Konzentration oder zu langes Einwirkenlassen einer schwächeren Lösung hingewiesen. Gerade dieser Mißstand wird angeblich von Konrich vermieden, indem er die Differenzierung mit 10-proz. Natriumsulfitlösung vornimmt. Dieses Differenzierungsmittel wird auch bereits in einigen Krankenhäusern, z. B. von Schulte-Tiggens in der Heilstätte in Honnef a. Rh., zur Anwendung gebracht. Die Einfachheit und Billigkeit des Verfahrens, die Schönheit der Präparate, bedingt durch die schnelle und ausgiebige Entfärbung, sowie die Angabe von Konrich, daß ein Entfärben der Tuberkelbazillen bei dem Sulfitverfahren nicht möglich ist, sind Vorzüge dieser Methode. Sie ist aber erst dann allgemein anwendbar, wenn der Nachweis erbracht worden ist, daß die Sulfitfestigkeit wirklich gleichbedeutend ist mit der Säurealkoholfestigkeit. Besonders wichtig dürfte dies Bedenken bei der Darstellung der Tuberkelbazillen-Splitter sein, deren relativ schwächere Färbung durch ihre leichtere Entfärbbarkeit bedingt sein dürfte.

Aufmerksam machen möchte ich noch auf die Möglichkeit einer gewissen Weiterentfärbung durch die Gegenfarbe. Schon R. Koch erwähnte die Entfärbung der Tuberkelbazillen durch Anilinfarbstoffe, z. B. Vesuvin, und besonders Czaplewski warnt vor zu langer Einwirkung wässriger oder alkoholischer Methylenblaulösungen wegen „Entfärbung mehr oder weniger zahlreicher Tuberkelbazillen“.

Vorteile und Nachteile der Gegenfärbung scheinen mir noch nicht die Beachtung gefunden zu haben, die zur besten Ausgestaltung der Methode nötig ist. Das Wesen der Gegenfarbe liegt in der Erzielung eines deutlichen Farbenunterschiedes des gesamten Präparates gegenüber der spezifischen Rotfärbung der Tuberkelbazillen. Es scheidet daher von vornherein alle die Methoden aus, die dieser Forderung nicht gerecht werden, indem ihre Gegenfarbe mehr oder weniger rote Strahlen enthält. Hierbei wären zu nennen Tropäolin (Boit), Jod (Kronberger), Chrysoidin (Marx), Bismarckbraun (Koch), Kaliumpermanganat (Weiß-Wien) u. a.

Einen weiteren Mißstand bildet die Tatsache, daß die Tuberkelbazillen manche der gebräuchlichen Gegenfarben annehmen. Vom wäßrig-alkoholischen und besonders vom alkalischen Methylenblau ist dies seit Koch und Ehrlich bekannt, weshalb die alkalische Loefflersche Lösung zu vermeiden ist. Vielleicht ist auch die Schwierigkeit des Nachweises der Splitter im Ziehl-Neelsen-Präparat ebenso wie durch ihre leichtere Entfärbbarkeit, so auch durch ihre Färbbarkeit in der Gegenfarbe bedingt.

Viel störender wirkt die Gegenfarbe, wenn ihr Ton so dunkel ist, daß die Bazillen in dichteren Stellen des Präparates verdeckt werden.

Die Ueberlagerung mit Blau verleiht der leuchtend roten Farbe einen violetten Ton und nimmt den Bazillen ihren scharfen Kontrast. Auch deshalb schadet die stark färbende Loefflersche Lösung und längeres Färben. Ich halte diese ihrem eigenen Zweck zuwiderlaufende Eigenschaft der Gegenfarbe für den Hauptnachteil des Methylenblaus. Darauf hingewiesen ist schon von Koch, Kühne u. a. Die Ueberlegenheit der Hermannschen Färbung beruht nach Marx auf der Anwendung einer nicht verdeckenden Gegenfarbe (Farbkontrast: Kristallviolett-Chrysoidin).

Merkwürdig ist, daß ein Weg zum Vermeiden dieses Uebelstandes, der bereits 1890 von Kühne angegeben ist, bisher so wenig Beachtung gefunden hat, nämlich die Untersuchung des differenzierten Präparates in einem Tropfen mit Pikrinsäure leicht gelb gefärbten Anilinöls. Mehr zu morphologisch-differentialdiagnostischer Verwendung ist der Pikrinsäure-Alkohol später von Spengler empfohlen worden. Tribondeau vereinfachte Spenglers Methode 1917 durch Anwendung der üblichen Karbolfuchsin-Färbung, Entfärbung mit Salpetersäure und Nachfärbung mit pikrinsaurem Alkohol. Im Juni 1920 erschien eine beachtenswerte Arbeit von Jötten und Haarmann. Die Autoren untersuchten in einer 1. Reihe 108 Sputumproben gleichzeitig nach Ziehl-Neelsen (44 positive), Kronberger und Weiß (je 47 positive), Spenglers Originalmethode (48 positive). Den Vorteil der Spenglerschen Methode führen sie zurück auf die Aufhellung des Gewebes durch Pikrinsäure-Alkohol und den Fortfall der verdeckenden Blaufärbung. Anstatt der umständlichen und zeitraubenden Spengler-Methode färbten sie in einer 2. Versuchsreihe 170 Sputumproben mit Karbolfuchsin, entfärbten in 15-proz. Salpetersäure ungefähr 10 Sek., spülten kurz mit Wasser, und entfärbten noch einmal mit 15-proz. Salpetersäure 10 Sek. Nach nochmaliger Wasserspülung wurde 30 Sek. mit Pikrinsäure-Alkohol (gesättigte wäßrige Pikrinsäure + Alkohol absolutus ana) nachgefärbt. Dieselben Sputa wurden gleichzeitig nach Ziehl-Neelsen und Spenglers Originalmethode gefärbt. Dabei wurden positive Befunde erhalten mit Ziehl-Neelsen in 59, mit Original-Spengler in 61, mit der Jötten'schen Modifikation in 62 Fällen.

Tabelle I.

	Absolute Zahlen			Prozent-Zahlen		
	Ziehl-Neelsen	Original Spengler	Jötten-Haarmann	Ziehl-Neelsen	Original Spengler	Jötten-Haarmann
1. Reihe (108 Fälle)	44	48	—	40,74	44,44	—
2. „ (170 Fälle)	59	61	62	34,70	35,88	36,47

Beide Reihen, die zu verschiedenen Zeiten und wohl auch mit etwas verschiedenartigem Material ausgeführt wurden, sprechen also für eine Unterlegenheit der Ziehl-Neelsen-Methode. Dafür spricht noch besonders die Beobachtung, daß die Summe der durchschnittlich im Gesichtsfeld gefundenen Tuberkelbazillen nach Ziehl-Neelsen nur 13, nach ihrer Methode aber 31 betrug. Ende Oktober 1920 veröffentlichte

Schulte-Tigges einen kurzen Artikel, in dem er mitteilt, daß in der Heilstätte Honnef a. Rh. nach vorhergegangener Konrichscher Differenzierung als Gegenfarbe wäßrige, konzentrierte Pikrinsäure angewandt wird.

Die hohe Bedeutung, die für die Diagnose, Therapie und Epidemiologie dem Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum zukommt, hat mich bereits im Juli 1920 veranlaßt, das Verfahren von Jöttem und Haarmann einer Nachprüfung an einem größeren Material zu unterziehen.

Bei der Betrachtung der so gefärbten Präparate fiel zunächst auf, daß die Farbe der Tuberkelbazillen einen leicht braunen Ton annahm. Systematische Untersuchungen ergaben, daß dieser Farbton durch die Verwendung der Salpetersäure und der alkoholischen Pikrinsäure bedingt ist. Das Entstehen eines gelbbraunen Farbtones nach Behandlung mit Salpetersäure ist bereits von Ziehl angegeben und auf Bildung einer triaziden Verbindung zurückgeführt worden. Seine Beseitigung durch Spülen in Wasser (nach Ziehl) wurde versucht, scheint jedoch nicht immer zu gelingen. Ich sehe auch keinen Grund, von der gut bewährten Differenzierung mit 3-proz. Salzsäurealkohol abzusehen. Außerdem scheint bei Behandlung mit alkoholischer Pikrinsäure das Eindringen der gelben Pikrinsäure in die Tuberkelbazillen durch den Alkohol erleichtert zu werden, denn bei Färbung mit gesättigter wäßriger Pikrinsäure fehlte der bräunliche Farbton.

Die mir als optimal erscheinende Färbung gestaltete sich nun folgendermaßen:

- 1) 2 Min. dauerndes Färben mit Karbolfuchsin (Ziehl-Neelsen) unter anfänglichem Erwärmen bis zum beginnenden Bläschenspringen;
- 2) Entfärben mit 3-proz. Salzsäurealkohol unter abwechselndem Waschen mit Wasser bis möglichst zum völligen Schwinden der Rotfärbung;
- 3) Färben mit gesättigter, wäßriger Pikrinsäurelösung (ca. 1 Proz.) 1 Min. lang mit nachfolgendem, gutem Spülen in Wasser.

Da bei Beginn meiner Arbeit unter den Anreicherungsverfahren diejenige von Uhlenhuth nach der von Hundeshagen angegebenen Technik als die beste erschien, zog ich diese mit in den Kreis der vergleichenden Untersuchung neben der alten Ziehl-Neelsen-Methode. Bei letzterer wurde als Gegenfärbung gesättigte, alkoholische Methylenblaulösung mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt angewendet.

Zur Methodik wäre noch zu bemerken, daß sämtliche Sputa von mir selbst untersucht wurden und alle diejenigen Präparate, bei denen sich gegenüber einer der anderen Färbungsmethoden Abweichungen zeigten, von den Kollegen des Instituts nachuntersucht wurden.

Die beiden verschieden gefärbten Originalausstriche wurden durch Zerquetschen von verdächtigen Sputumteilchen zwischen 2 Objektträgern gewonnen, die zur Färbung benutzt wurden. Die Ausstriche selbst wurden möglichst gleichmäßig und nicht zu dick angefertigt, wie es für die Ziehl-Neelsensche Färbung erforderlich ist; die Anreicherung geschah durch Mischung gleicher Mengen von Sputum mit 20 Proz. Antiformin; nach vollendeter Auflösung (20—30 Min.), Zentrifugieren 25 Min. bei 3000 Touren; Nachbehandeln der Zentrifugenröhrchen genau nach Hundeshagen; auf die nach Ziehl-Neelsen angefertigten Präparate wurde das Antiforminsediment aufgetragen. Hierbei kommt

eine Abschwemmung des Antiforminsedimentes bei der späteren Färbung nicht vor.

Ich habe nun bis zum Mai 1921 folgendes Ergebnis erhalten:

Von 1012 Sputa, die nach allen 3 Methoden untersucht wurden, waren im ganzen positiv 200 = 19,76 Proz. Die positiven Zahlen verteilen sich, wie folgt:

Tabelle II.

1	positiv 2	von den Zahlen in Stab 2 waren auch positiv	
		nach Pikrinsäure-Gegenfärbung 3	nach Anreicherung 4
1) nach Ziehl-Neelsen	163	163	162
2) nach Pikrinsäure-Gegenfärbung	193	193	190
3) nach Anreicherung	197	190	197

Tabelle III.

Es waren also positiv	
nur nach Ziehl-Neelsen	0
nur nach Ziehl-Neelsen und Pikrinsäure-Gegenfärbung	1
nach Ziehl-Neelsen, Pikrinsäure-Gegenfärbung und Anreicherung	162
nur nach Pikrinsäure-Gegenfärbung	4
nur nach Pikrinsäure-Gegenfärbung und Anreicherung	26
nur nach Anreicherung	7
Summa	200

Aus diesen Tabellen ergibt sich zunächst, daß die Summe der positiven Befunde (mit 98,5 Proz.) am größten ist bei Anreicherung, etwas kleiner (mit 96,5 Proz.) bei Färbung mit Pikrinsäure und viel geringer (mit 81,5 Proz.) nach Ziehl-Neelsen. Mit Anreicherung allein wurden in 3,5 Proz., mit Pikrinsäure allein in 2 Proz. der Fälle bei Versagen der anderen Methoden Bazillen gefunden. Die Ziehl-Neelsen-Methode hat allein nie ein positives Resultat ergeben. Anreicherung und Pikrinsäure-Methode zusammen ergaben in 13 Proz. positives Resultat bei negativem Ziehl-Neelsen. 3mal versagte die Anreicherung, während die beiden anderen Methoden spärliche Bazillen ergaben. Der Fehler war nicht zu klären, da zur Nachuntersuchung kein Material mehr vorhanden war; er ist aber wohl zufällig bedingt. Demnach ist der Grad der Ueberlegenheit der Pikrinsäurefärbung über Ziehl-Neelsen fast ebenso groß, wie die Ueberlegenheit der Antiforminmethode über Ziehl-Neelsen. Würde man anstatt eines mit Pikrinsäure gefärbten Originalausstriches mehrere solche untersuchen, so dürfte die Wahrscheinlichkeit des positiven Ergebnisses noch gesteigert werden. Daher scheint für die Mehrzahl der Sputa, in denen deutliche Sputumkerne vorhanden sind, die Pikrinsäuremethode in der von mir vorgeschlagenen Modifikation das Verfahren der Wahl zu sein. Unersetzbar aber bleibt selbstverständlich das Antiformin für diejenigen Sputa, die keine Sputumkerne enthalten oder sehr reich an Eiter, Schleim usw. sind.

Der hohe Wert der Pikrinsäurefärbung erscheint durch die vorliegenden Versuche bewiesen. Die färbetechnischen Gründe erblicke ich

ebenso wie Jötten und Haarmann hauptsächlich in der Vermeidung der verdeckenden Blaufärbung und der Aufhellung des Gewebes. Daher besteht auch die Möglichkeit, die Ausstriche dicker als üblich zu machen, aber jedenfalls nur so dick, daß eine gute Differenzierung mühelos gelingt. Eine zu starke Differenzierung braucht nicht sehr gefürchtet zu werden, da auch bei stark entfärbten Präparaten der Kontrast zwischen Bazillen und übrigen Präparat deutlich erhalten bleibt. Mit der Steigerung der Dicke der Präparate wird die in der Zeiteinheit untersuchte Sputummenge wesentlich vergrößert.

Zusammenfassung.

Die Vereinfachung der Spenglerschen Färbung durch Tribondeau, Jötten und Haarmann erscheint auf Grund theoretischer Erwägungen und der bisherigen praktischen Ergebnisse beachtenswert.

In meinen Untersuchungen hat sich jedoch die Differenzierung mit Salzsäure-Alkohol und die Gegenfärbung mit konzentrierter, wäßriger Pikrinsäure besser bewährt.

Bei der Untersuchung von 1012 Sputa mit 200 positiven Resultaten ist die von mir angegebene Methode (193 positive Originalausstriche) fast gleichwertig der Uhlenhuth-Hundeshagenschen Methode (98,5 Proz. positive Ergebnisse in der Anreicherung), während die Ziehl-Neelsensche Färbung (81,5 Proz. positive Originalausstriche) erheblich zurückbleibt.

An Schnelligkeit, Einfachheit und Billigkeit steht sie auf gleicher Stufe mit der Ziehl-Neelsenschen Methode.

Literatur.

Adam, Inaug.-Diss. Leipzig 1900. — Berka, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. S. 450. — Biedert, Berlin. klin. Wochenschr. 1910. S. 1451. — Boit, Zeitschr. z. Klin. d. Tuberkul. Bd. 36. 1916. S. 227. — Caan, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1919. — Frei, Ebenda Bd. 61. 1912. — Friedland, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 91. 1921. H. 3. — Gabbet, Lancet. 1887. p. 751. — Hermann, Ann. de l'Inst. Past. T. 22. 1908. — Hundeshagen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. 1919. — Johnes, nach Böhm, Ebenda. Bd. 62. 1912. S. 497. — Jötten u. Haarmann, München. med. Wochenschr. 1920. S. 692. — Jötten, Arb. a. d. Reichsgesundheitsa. Bd. 52. S. 103. — Kayser, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 55. 1920. — Koch, Mitt. a. d. kaiserl. Gesundheitsa. Bd. 2. 1884. — Kongsted, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. — Konrich, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 741. — Krönig, Med. Klin. 1907. No. 24. — Kronberger, Brauers Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. Bd. 16. H. 2. — Krumwiede u. Blackburn, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 35. S. 530. — Kühne, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 8. 1890. — Marx, München. med. Wochenschr. 1919. No. 15. — Much, Beitr. z. Klin. d. Tbkul. Bd. 8. 1907. — Naegeli, Akerblom u. Vernier, Ther. Monatsh. 1909. S. 212. — Neelsen, Centralbl. f. med. Wissensch. 1883. — Rondelli u. Buscalioni, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 21. 1897. S. 70. — Schulte-Figges, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 1225. — Spengler, Ebenda. 1907. S. 387. — Tribondeau, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69. p. 387. — Uhlenhuth u. Xyländer, Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsa. Bd. 32. H. 1. — Vogelbach, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 83. 1919. — Voigt, Ebenda. Bd. 85. 1920. — Weichselbaum, Wien. klin. Wochenschr. 1883. S. 63. — M. Weiss, Zeitschr. f. Tbkul. Bd. 30. 1919. — Ziehl, Dtsch. med. Wochenschr. 1882. S. 451 u. 1883. S. 247.

Nachdruck verboten.

Zur Morphologie des *Bact. pseudotuberculosis rodentium* (Preis) L. et N.

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien (Direktor: Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf) und der Králschen Sammlung in Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. Přibram)].

Von Dr. med. vet. **Stjepan Plasaj.**

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine eingehende Untersuchung der Begeißelungsverhältnisse des *Bact. pseudotuberculosis rodentium*.

Ueber die Begeißelung des Erregers der bazillären Pseudotuberkulose der Nagetiere¹⁾ ist seit A. Pfeiffer, der in die Aetiologie der tuberkuloseähnlichen Erkrankungen, die mit dem Kochschen Bazillus nichts gemein haben, die notwendige Ordnung und Klarheit gebracht hat, in der Literatur folgendes zu finden:

a) Angaben über das Vorhandensein der Geißeln.

Klein²⁾ berichtet: „Obgleich die Bazillen im hängenden Tropfen keine Eigenbewegung zeigen lassen sich dennoch durch die van Ermengemsche Silbermethode an einzelnen Bazillen 1 oder selbst 2 endständige kurze spiralige Geißeln nachweisen.“ K. hat mit dem Absatze des durch Kanaljauche beschmutzten Wassers zweier Flüsse durch subkutane Injektion bei Meerschweinchen und Kaninchen den von A. Pfeiffer genauer beschriebenen Prozeß der Pseudotuberkulose erzeugt und aus den nekrotischen Knötchen der Lymphdrüsen, der Leber, der Milz und auch der Lunge das *Bact. pseudotuberculosis* rein gezüchtet.

Byloff³⁾ fand bei seinem, aus einer Meerschweinchenseuche isolierten *Bacterium* (*B. pestis intestinalis caviae cob.*), das er als identisch oder wenigstens als sicher sehr nahe verwandt mit den von Pfeiffer und Zlatorogoff untersuchten Bakterien betrachtet und der 1., beweglichen Abteilung der Gruppe der hämorrhagisch-septikämischen Bakterien nach der von Kruse in Flügges Handbuch (2. Aufl. Leipzig 1896. S. 399) gegebenen allgemeinen Charakteristik zurechnet, Eigenbewegung und Begeißelung. „Im hängenden Tropfen und in kapillarer Schicht untersucht, zeigen die Bazillen Eigenbewegung, die aber nicht ohne weiteres festzustellen ist, da sie nur gering im Verhältnisse zu anderen gut beweglichen Bakterienarten ist. Immerhin ist sie aber doch noch so ausgesprochen, daß sie mit der sonst auch bei unbeweglichen Bakterien vorkommenden Molekularbewegung nicht leicht verwechselt werden kann. Daß keine Täuschung vorliegt, beweisen nach Zettnow gefärbte Agarkulturausstriche, in denen unzweifelhafte Geißeln zu beobachten waren. Der Bazillus besitzt nach diesen Präparaten eine Geißel an einem Polende. Dieselbe ist nicht ganz so lang wie der Bazillenleib, was vielleicht zusammengekommen mit der Einzahl eine Erklärung für die schlechte Beweglichkeit wäre.“ „Wollte man, von dem Erfolge ausgehend, die Bazillen charakterisieren, so müßte man sie als geißeltragende monotriche Stäbchen bezeichnen.“

b) Aus jüngerer Zeit stammende Angaben über das Nichtvorhandensein der Geißeln.

Albrecht⁴⁾ fand seinen Stamm als unbeweglich; die Geißeln konnte er nicht nachweisen. Das Bakterium wurde aus käsig-eitrigem Inhalte der Abszeß eines Lymphknotens bei Enteritis follicularis suppurativa (beim Menschen) herausgezüchtet und als

1) Tuberculose zoogléique der älteren Autoren.

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 26.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 41 u. 42.

4) Wien. klin. Wochenschr. 1910. S. 27.

ein typisches *Bact. pseudotuberculosis rodentium* im Sinne A. Pfeiffers gefunden.

Messerschmidt und Keller¹⁾ untersuchten ein *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, das sie aus an Pseudotuberkulose spontan erkrankten Laboratoriumskaninchen herausgezüchtet hatten. Geißeln ließen sich nicht darstellen.

Weltmann und Fischer²⁾ fanden das von ihnen aus dem im Mittelohr einer Patientien angesammelten Eiter rein gezüchtete, in morphologischen und kulturellen Eigenschaften mit dem Pfeiffer-Stamme weitgehend übereinstimmende Bakterium ohne Eigenbewegung und ohne Geißeln; weder im Ultramikroskop nach mit Hilfe des Tuscheverfahrens noch nach der Zettnowschen Methode waren Geißeln nachweisbar.

Nach diesen Literaturberichten sind wir berechtigt, zu sagen, daß eine gut wahrnehmbare Eigenbewegung bei *Bact. pseudotuberculosis rodentium* nicht vorkommt und daß seine Begeißelung noch immer fraglich ist. Also ähnliche Verhältnisse, wie sie auch sonst in der Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie bis jetzt bekannt waren. Da ich aber festgestellt habe³⁾, daß es in dieser Gruppe, außer den Varietäten, bei denen keine Eigenbewegung und keine Begeißelung nachzuweisen ist, auch eine Anzahl solcher gibt, die, obzwar sie keine Eigenbewegung zeigen, doch begeißelt sind (z. B. einige Geflügelcholera- und Schweineseuchestämme, dann *B. equisepticum*), so habe ich die fragliche Begeißelung des *Bact. pseudotuberculosis rodentium* einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Das Interessanteste war es für mich, festzustellen, ob bei *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, wenn die Geißeldarstellung bei ihm gelingt, die von Byloff (bzw. von Klein) beschriebene polare (endständige) Art der Begeißelung tatsächlich besteht, die mit meiner bei *B. septicaemiae haemorrhagicae* festgestellten extrapolaren Monotrichie nicht übereinstimmt. Wenn dies der Fall wäre, so müßte die von verschiedenen Forschern [Zlatorogoff⁴⁾, Byloff⁵⁾, Albrecht⁶⁾ u. a.] ausgesprochene und sonst ganz begründete Ansicht, daß das *Bact. pseudotuberculosis rodentium* in die Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie hineingehört, wegen der durchgreifenden morphologischen Differenzen fallen gelassen werden.

Zur Untersuchung wählte ich Stämme, die ich aus dem Králschen Museum (Vorstand: Prof. Dr. E. Příbram) in Wien bezog, und zwar sind es die Stämme:

1) von Preisz(?), Budapest, 2) von Sanfelice, Modena, 3) von Vincenzi, Sassari, 4) von Albrecht, Wien, 5) von Lieske, Karlsruhe, 6) von Weltmann, Wien, dann 7) *B. opale aliaceum* (Vincenzi) L. et N., ein von Vincenzi⁷⁾ gezüchteter Erreger der bazillären Pseudotuberkulose, der sich jedoch wegen des bläulichen Farbtones der auf Gelatine gewachsenen Kolonien und des starken Knoblauchgeruches der bei Zimmertemperatur gehaltenen Kulturen von dem Pfeifferschen Typus unterscheidet.

Gut gelang mir die Geißeldarstellung nur bei Stämmen Albrecht und Sanfelice und beim (atypischen) Stamm Vincenzi. Die Geißeldarstellung gelang nur in äußerst seltenen Fällen. Es wurden nur 1-geißelige Bakterien beobachtet. Die Geißel steht nicht polar, sondern extrapolar, zwischen Pol und Äquator, gerade so wie bei Bakterien der

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 77.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 78.

3) Wird gleichzeitig erscheinen im Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig.

4) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 37.

5) l. c.

6) l. c.

7) l. c. Bd. 44 u. 50.

Colityphusgruppe, wenn sie nur 1 Geißel tragen. Die Geißel ist mehrfach so lang als der Bakterienkörper.

Bei anderen Stämmen sieht man in Präparaten nur Andeutungen von Geißeln, die in Körner zerfallen sind. An einigen Individuen haben aber die kaum sichtbaren, bräunlichen Körner die wellenförmige Anordnung beibehalten, und man sieht, wie das perlschnurartige Gebilde immer an der typischen Stelle, des Bakterienkörpers, zwischen Pol und Aequator, seinen Ursprung nimmt. Sehr groß ist die Anzahl jener Individuen, bei denen solche perlschnurartige Gebilde kurz sind, nur aus 3 bis 4 Körnern bestehend, die aber auch nicht polar, sondern wie die gut gefärbten Geißeln, zwischen Pol und Aequator, angebracht sind.

Wir haben keinen Grund, zu behaupten, daß jene Gebilde, die, wenn auch diskontinuierlich gefärbt, in bezug auf ihre Breite (und Länge), wellenförmigen Verlauf und konstante Lokalisation an dem Bakterienkörper mit den gut dargestellten Geißeln übereinstimmen, keine Geißeln sind. Sie sind Geißeln, bei welchen sich nur die Körner (leicht) gefärbt haben, während die Zwischensubstanz farblos blieb. Die Körnerstruktur der Geißeln ist eine Tatsache, von der ich mich bis jetzt unzählige Male bei allen untersuchten Bakterien überzeugt habe.

Bact. pseudotuberculosis rodentium ist also begeißelt. In gefärbten Geißelpräparaten, falls die Geißeldarstellung klar gelingt, zeigt es eine extrapolar stehende Geißel, eine extrapolare Monotrichie. Ob das, was wir in einem solchen Geißelbilde als eine Geißel sehen, wirklich nur eine Geißel repräsentiert, oder ob es sich da nicht etwa um einen Geißelschopf handle, diese Frage muß offen bleiben. Hier und da sind nämlich die Körner um den Bakterienkörper so angeordnet, daß man sich der Vorstellung, diese Bakterien seien polytrich, nicht entziehen kann. Wenn es sich wirklich um Geißelschöpfe handeln würde, so wäre es uns eher verständlich, warum die Geißeldarstellung so selten und zufallsweise gelingt; die Geißelschöpfe kommen nämlich nicht in jedem Präparate vor; sie sind jedenfalls bedeutend resistenter, als die einzelnen, äußerst dünnen Geißeln, welche wahrscheinlich schon bei der Verdampfung der Ausstrichflüssigkeit körnig zerfallen.

Es gilt, daß das Bakterium eine Eigenbewegung nicht zeigt. Nur Byloff berichtet über die Eigenbewegung, die aber nicht ohne weiteres festzustellen sei. Ich habe die Stämme nicht einer eingehenden Untersuchung auf Eigenbewegung unterzogen. Beim flüchtigen Betrachten zeigten sie keine sichere Eigenbewegung. Nach den morphologischen Befunden ist es aber wahrscheinlich, daß die begeißelten Individuen unter günstigen Bedingungen eine Eigenbewegung ausführen, die zu bestimmen allerdings schwer sein muß. Eine Trennung des Subjektiven, Illusorischen vom Objektiven, Tatsächlichen ist hier für gewöhnlich kaum gut möglich, denn es mischen sich ineinander Komponenten zweierlei Bewegungen, der aktiven Eigen- und passiven Brownbewegung.

Kritisches.

Wenn wir den morphologischen Befund mit den Angaben über die polare Begeißelung, über die Klein und Byloff berichteten, vergleichen, so ergibt sich, daß es sich um 2 verschiedene Begeißelungsarten handelt. Die von mir festgestellte extrapolare Begeißelungsart muß als konstant betrachtet werden, denn nie sah ich bei *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, daß die Geißel polar stehen würde, und sonst ist es

wiederm bekannt, daß polar begeißelte Bakterien (Migulas „Pseudomonas“) nicht in anderen Begeißelungsformen auftreten, sondern nur in polarer Begeißelungsform. Was übrigens die Beschreibung Byloffs anbelangt, „die Geißel sei nicht ganz so lang als der Bazillenleib“, muß ich bemerken, daß, wenn auch sicher erscheint, daß die Geißelbilder in Geißelpräparaten von der wahren natürlichen Form der Geißeln in lebendem Zustande ganz verschieden sind, wir doch bei der Erklärung eines Gebildes als Geißel in bezug auf die Länge derselben etwas mehr verlangen müssen, denn es gibt nur selten Präparate, die nach der Geißelfärbungsmethode hergestellt sind, in welchen nicht verschiedenartige, besonders ganz kurze Anhängsel vorkämen, von welchen man nicht behaupten kann, daß sie nicht von Geißelsubstanz abstammen. Falls die von Klein beschriebene polare Begeißelungsart nicht auf unscharfer Beobachtung beruhte, so handelte es sich in seinem Falle vielleicht überhaupt nicht um ein *Bact. pseudotuberculosis rodentium*.

Die negativen Berichte über die Begeißelung, sind sehr verständlich. Wie schon erwähnt, gelingt die Geißeldarstellung nur in äußerst seltenen Fällen, und wir wissen gar nichts davon, wann sie gelingt; es können Tage verstreichen in mühsamer Arbeit, bis man — selbst mit dem vorzüglichen Zettnowschen Versilberungsverfahren, nach welchem ich gearbeitet habe — ein positives Geißelpräparat bekommt und dann sind in ihm nur an einzelnen Bakterien schwach gefärbte, perlschnurartige Geißeln bald mehr, bald weniger klar sichtbar. Aus dem Grunde mache ich keinen differentialdiagnostischen Unterschied zwischen den Stämmen, bei denen mir die Geißeldarstellung klar gelang, und jenen, bei denen ich nur Andeutungen von Geißeln sah; die Verschiedenheiten beruhen nur auf Zufälligkeiten, und alle die Stämme sind morphologisch einheitlich, das *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, welches nebst seinen biologischen und allgemeinen morphologischen Merkmalen also auch speziell „trichologisch“ in die Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie hineingehört, in welcher es neben den Varianten, bei denen eine gute Geißeldarstellung gelingt, auch solche gibt, bei denen sie nicht gelingt.

Zusammenfassung.

Es wurde die Begeißelung bei 7 Stämmen des *Bact. pseudotuberculosis rodentium* untersucht. Bei 3 von ihnen gelang eine Geißeldarstellung, bei anderen sah man nur Andeutung von Geißeln. Die Bakterien tragen eine extrapolare, zwischen Pol und Äquator stehende Geißel, übereinstimmend mit einigen anderen Repräsentanten der Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie.

Für die aus der Králschen bakteriologischen Sammlung mir zur Verfügung gestellten Kulturen und für die bei der Ausführung der Untersuchung mir zuteil gewordene Unterstützung spreche ich dem Herrn Professor Dr. Ernst Přibram auch an dieser Stelle meinen verbindlichen Dank aus.

Nachdruck verboten.

Experimentelle Untersuchung mit einer beim Kaninchen spontan vorkommenden und dem *Treponema pallidum* ähnlichen Spirochäte.

Vorläufige Mitteilung.

[Aus der Klinik für kleine Haustiere (Prof. Dr. H. Jakob) und dem Institut für parasitäre und Infektionskrankheiten (Prof. Dr. L. de Blicq) der Tierärztlichen Hochschule zu Utrecht, Holland.]

Von Dr. A. Klarenbeek,

Konservator an der Klinik für kleine Haustiere.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei 5 gut ernährten Kaninchen, welche alle demselben Besitzer gehörten, beobachtete ich im Oktober 1920 folgendes klinische Bild:

Umgebung von Anus und Vulva (in einem Fall von Präputium) mehr oder weniger stark entzündet; Schwellung des Gewebes durch Gewebshyperplasie und Oedematierung, wodurch das ganze Gebiet etwas prominert. Anus und Geschlechtsöffnung schwer zu finden (Abbild. 1). Die entzündete Stelle ist nicht behaart, etwas rot gefärbt und an der Peripherie mit kleinen Schuppen (weiß oder gelblich) bedeckt. Die rötlich gefärbte Fläche ist mit langen, braunroten trockenen Krusten besetzt, welche ziemlich fest anliegen und bei bilateralem Druck an der Peripherie sich von der Unterlage ablösen. Die von Krusten nicht mehr bedeckte Fläche blutet schnell und ist feucht und rot. Nach einigen Stunden bildet sich wieder eine neue Kruste. Ein solches klinisches Bild habe ich schon früher bei anderen Kaninchen beobachtet.

Im Tuschepräparat nach Burri konnten im abgeschabten Gewebe nach Entfernung der Krusten stets zahlreiche Spirochäten vom Typus des *Treponema pallidum* konstatiert werden, die bei Dunkelfeldbelichtung (bei Zimmertemp.) kräftige, wellenförmige Bewegung der ziemlich langen, erst nach einiger Uebung sichtbaren, schwach lichtbrechenden Spirochäten erkennen ließen. Bisweilen sind deutlich mehrere Wellen zu sehen. Auch eine rotierende Bewegung in der Art, daß die Enden der Parasiten ruhig bleiben und der dazwischen liegende Teil (ähnlich der Bewegung eines Seiles beim Seilspringen) sich bewegte, konnte beobachtet werden, die, sobald der Parasit auf einen Gegenstand stößt, intensiv wird, denen einer getretenen Schlange oder eines Wurmes ähnelt.

Im Tuschepräparat erhalten sich die natürlichen Formen sehr gut, und es zeigte sich ein langgestreckter Parasit mit 8—24 regelmäßigen, nicht sehr tiefen Windungen. Bei einigen langen Spirochäten findet sich in der Mitte eine Unterbrechung oder ein Flacherwerden derselben. Länge sehr verschieden. Die Fontanasilbermethode eignet sich für das Aufsuchen spärlicher Spirochäten im Ausstrichpräparat am besten, und man kann durch einige Modifikationen des Verfahrens die Dauer der Färbemethode von $\frac{1}{2}$ Std. auf ca. 5 Min. abkürzen, wobei sich die Parasiten schwarz färben, aber etwas von ihrer natürlichen Form verlieren, doch kann man auch hier die verschiedene Länge des Parasiten und die Regelmäßigkeit der Windungen in Höhe und Länge

studieren. Nicht selten sind aber die Windungen hier unregelmäßig, wobei sehr starke Windungen mit bisweilen gestreckt verlaufenden Stellen abwechseln. Der Parasit ist bald gerade, bald stark gebogen und nicht selten in der Mitte geknickt. Auch kann man oft bei dieser Färbung einen windungslosen mittleren Teil (transversale Teilung?) beobachten, insbesondere bei langen Individuen. Die Enden des Parasiten sind sehr dünn. Der Parasit wird durch OH aufgelöst, ist also kein Spirillum.

Die Bakterienfärbungsmethoden gelangen nicht; die Färbung nach Giemsa dauert bisweilen 24 Std. oder länger. — In abgeschabten Teilen der entzündeten Stellen wurden nach Entfernung der Krusten nur sehr vereinzelt Bakterien gefunden (Methylenblau, Gram, Ziehl-Neelsen). Auch Petri-Schalen mit Agar oder Gelatine blieben nahezu steril. Gewebstückchen aus der Randpartie der entzündeten Stelle, welche nach der Levaditi-Methode behandelt waren, ließen in Schnitten die Spirochäten im Gewebe erkennen (schwarze Färbung, gelber Untergrund).

Zahlreiche Untersuchungen, besonders von Uhlenhuth und Mulzer (Arb. a. d. kaiserl. Ges.-Amte Berlin 1913 und Atlas der exper. Kaninchensyphilis 1914), haben bewiesen, daß *Treponema pallidum* des Menschen experimentell auf Kaninchen zu übertragen ist, und daß, je nach der Art des Infektionsmodus, ein verschiedenes Bild lokaler oder allgemeiner Infektion nachgewiesen werden konnte. Die von mir verwendete Spirochäte stimmt morphologisch und auch in anderer Hinsicht mit *Treponema pallidum* überein. Obwohl spontane Infektionen des Kaninchens mit der Syphilisspirochäte nicht bekannt sind, ist doch der Nachweis, ob die Identität der beiden Spirochäten auch bei experimentellen Impfungen bestehen bleibt, von ganz besonderer Bedeutung. Die vorläufig erzielten Resultate sind die folgenden:

1) Die Skarifikation der Perinealregion mit einer Emulsion von Gewebstückchen mit sehr vielen Spirochäten (Gewebe unter der Kruste) ergab stets positive Resultate. Die kürzeste Inkubationszeit betrug 11 Tage; meistens konnte man aber erst nach 3—4 Wochen Spirochäten nachweisen. Ulzerationen mit deutlich harten und indurierten Rändern konnten nicht nachgewiesen werden. Die entzündeten Stellen glichen Exkorationen ohne weitere entzündliche Symptome. Sie waren nur leicht gerötet, aber nicht geschwollen. Die mit gelben Pseudomembranen bedeckten haarlosen Stellen waren im allgemeinen feucht und befanden sich in der Mehrzahl der Fälle an der Seitenfalte neben der Vulva. Wo die Vulva selbst entzündet war (Mucosa oder Haut), war stets Hyperämie und Schwellung zu beobachten. Bei alten und schon längst bestehenden Fällen glichen diese Stellen dem erstbeschriebenen klinischen Bild. Ein einziger Fall heilte bis jetzt spontan nach vielen Wochen ab.

2) Die Skarifikation der Rückenhaut mit demselben Material wie sub 1 ergab in 4 von 6 Fällen ein positives Resultat. Die Inkubationszeit schwankte zwischen 1—2 Mon. Bei allen positiven Fällen



Fig. 1. Perinealgegend eines erkrankten Kaninchens.

waren die Affektionen oberflächlich, nicht sehr tief, nicht oder nur wenig prominierend und mit weißen, bisweilen dunklen, kleinen, meistens nicht festanliegenden Krusten oder Schuppen bedeckt. In den veränderten Stellen waren viele Spirochäten nachweisbar.

3) Die subkutane Injektion in das obere Augenlid mit Material wie sub 1 verursachte das Auftreten von Ulzerationen in dieser Region. Inkubationszeit: 5—8 Wochen. Die Ulzerationen prominieren mehr oder weniger, hatten die Größe eines Schrotkorns und waren mit weißen Schuppen, später mit dunklen Krusten bedeckt. Nach Entfernung derselben war darunter eine schwachrote Hautfläche zu erkennen, in welcher sich sehr viele Spirochäten befanden.

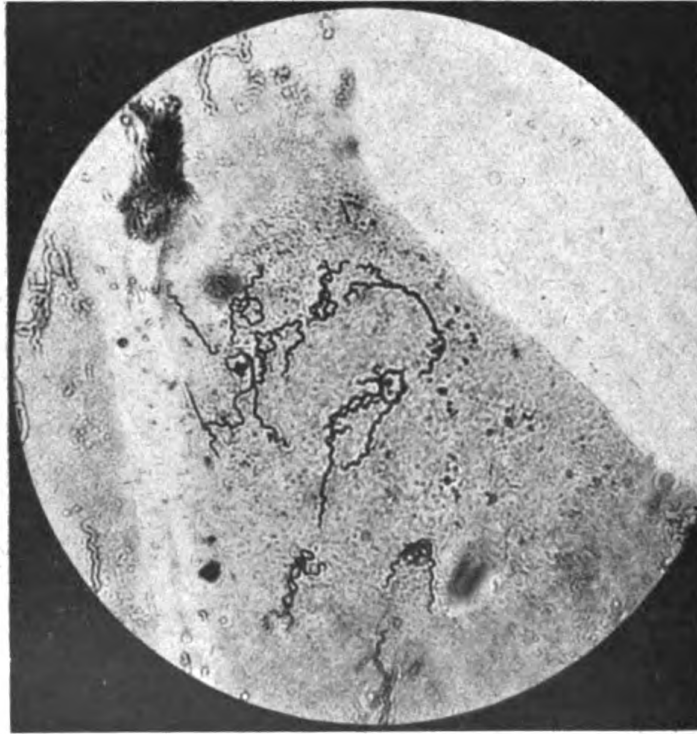


Fig. 2. Spirochäten in oberflächlich abgeschabten Korneateilen. 6 Wochen nach intraokularer Impfung. Vergr. 1050. Färbung nach Fontana.

sprach dem sub 3 geschilderten. Nach Impfung kleiner Stückchen Perinealgewebe (Sp. +) in die vordere Augenkammer konnte nach einer Inkubationszeit von 41—43 Tagen nach oberflächlicher Skarifikation der Kornea eine Spirochätenkeratitis nachgewiesen werden.

Bei einigen Impfversuchen, bei denen nach Einbringen eines Stückchens Gewebe (Sp. +) in die vordere Augenkammer in oberflächlich abgeschabten Korneateilen niemals Spirochäten nachzuweisen waren, entstanden nach ca. 8 Wochen Ulzerationen am oberen Augenlide, wie sie sub 3 beschrieben sind. In 1 Falle zeigte sich nach einem derartigen Verlauf auch noch eine ziemlich starke, harte Gewebswucherung der Conjunctiva scleralis, die für eine weitere Impfung ausgeschnitten wurde.

5) Die intratestikuläre Impfung mit Gewebstückchen von

4) Die intraokuläre Impfung ergab ebenfalls positive Resultate. In 1 Falle wurde dazu dasselbe Material wie sub 1 verwendet und als Emulsion bei beiden Augen in je einer Menge von 0,5 ccm in die vordere Augenkammer eingespritzt. Ein Auge zeigte nach ungefähr 3 Mon. noch keine Reaktion, während im anderen, das selbst ohne wahrnehmbare Aenderungen blieb, nach 2 Mon. Ulzerationen am oberen Augenlide auftraten, insbesondere in der Randgegend, in denen sehr viele Spirochäten nachgewiesen werden konnten. Das klinische Bild ent-

Material sub 4 bedingte in 3 Fällen nach ca. 8 Wochen Erosionen auf der Skrotalhaut vom Typus wie sub 2. Stets war der Spirochätenbefund positiv.

Ein linsengroßer Tumor, welcher verschiebbar und mit der Haut oder dem Testikel nicht verwachsen war, konnte ebenfalls im Skrotum nachgewiesen werden. In der feinzerriebenen Tumormasse ließen sich zahllose Spirochäten erkennen.

6) Intravenöse Injektionen mit filtrierten Emulsionen von Gewebe, das reich an Spirochäten war, hatten bis jetzt noch keine positiven Resultate. Verschiedene Tiere starben an Beinfektionen. Für die anderen Tiere, die später mit besserem Material geimpft wurden, war die Inkubationszeit noch zu kurz.

7) Ein Fall generalisierter Infektion konnte bei einem Kaninchen, das ca. 10 Wochen vorher intraokulär mit Material von sub 5 und ca. 2 Wochen vorher intratestikulär mit demselben Material geimpft war, nachgewiesen werden. Abgesehen von einer ca. 6 Wochen später auftretenden Keratitis (Sp. +), entstanden auf der Rücken- und Ohrbasis, der Nasenseitenfläche und der Augenregion starke und ausgebreitete Ulzerationen. Der geimpfte Testikel wurde nach 2 Wochen sklerotisch und hart. Mit dem Blute dieses Tieres wurden intravenös weitere Impfungen vorgenommen, von denen die Resultate noch abzuwarten sind.

Spontane Infektion wurde bei einem weiblichen Kaninchen, das ca. 2 Mon. mit einem spontan erkrankten Tier (einem Rammler) zusammen in einem Käfige war, beobachtet. — Es entstanden dabei die beschriebenen flachen Erosionen der Perinealgegend (Sp. +).

Schon 1914 (Wien. klin. Wochenschr. Nr. 23) entdeckten Arzt und Kerl diese spontane Entzündung der Genitalien bei Kaninchen und konnten zwischen dieser Spirochäte und dem *Treponema pallidum* keine Unterschiede finden. Ebenda 1914 Nr. 29 publizierten sie die Resultate ihrer weiteren Untersuchung. Von ca. 800 Kaninchen in der nächsten Umgebung von Wien konnten sie bei 28,9 Proz. die Krankheit nachweisen. Bei ihren Impfversuchen gelang ihnen jedoch nur die Infektion durch Skarifikation der Perinealgegend. In einer Veröffentlichung in der *Dermatol. Zeitschr.* Bd. 29 1920. H. 2 machte Arzt keine Mitteilungen über experimentelle Nachweise, wohl aber fand er in der Umgebung von Innsbruck bei einem Besitzer ebenfalls spontan infizierte Kaninchen. Unbekannt mit dieser Literatur, beschrieb Jacobsthal (*Dermatol. Wochenschr.* Bd. 7 1920. Nr. 33) dieselbe Krankheit und erwähnte die experimentelle Uebertragung der Krankheit durch Skarifikation der Perinealregion, aber auch ihm mißlangen andere versuchte Impfungen. Die auf Anregung dieses Artikels publizierte Mitteilung von Kerl und Arzt (*Dermatol. Wochenschr.* 1920. Nr. 52) bringt uns ebenfalls bei der Feststellung der Identität dieser Spirochäte keinen Schritt weiter. Endlich beschreibt auch noch Schereschewsky in der *Berlin. klin. Wochenschr.* 1920. Nr. 48 „die geschlechtlich übertragbare originäre Kaninchensyphilis“.

Vergleicht man die Resultate dieser positiven Befunde mit denjenigen, die mit *Treponema pallidum* experimentell erzielt wurden, so kann man den Gedanken nicht los werden, daß die bei diesen Kaninchen gefundene Spirochäte mit dem *Treponema pallidum* vollkommen identisch oder ihm jedenfalls sehr nahe verwandt ist.

Der absolute Beweis, daß man es hier mit spontaner Kaninchensyphilis zu tun hat, dürfte wohl niemals sicher auf experimentellem Wege geliefert werden können; selbst wenn die Impfungen auf Affen, welche bereits durch mich angestellt sind, positiv ausfallen, dürfte das letzte Verbindungsglied der Untersuchungen, nämlich die Infektion eines Menschen, nicht möglich werden.

Zusammenfassung.

Die Resultate dieser Experimente verringern ebenfalls den Wert der experimentellen Syphilisforschung, da die Impfungen dabei so lange unsicher sein dürften, bis die Identität dieser Spirochäte nachgewiesen ist. Selbst wenn diese festgestellt werden kann, bleibt doch noch zweifelhaft, ob das Kaninchen für die Syphilisforschung das geeignetste Versuchstier ist. Zweifellos bleibt die Möglichkeit bestehen, daß man ein augenscheinlich gesundes, aber latent an dieser Spirochätose erkranktes Kaninchen mit Syphilisvirus impft und dann mit Material von den später auftretenden Ulzerationen, welche aber nicht-syphilitischen Charakter tragen müssen, weiterimpft.

Auch wenn diese spontan bei Kaninchen vorkommende Spirochäte sich wirklich als *Treponema pallidum* herausstellt, wird wohl daraus noch eine Reihe verkehrter Schlußfolgerungen bezüglich der Inkubationszeit usw. gezogen werden.

Januar 1921.

Nachdruck verboten.

Ueber das wechselnde kulturelle Verhalten von Ruhrstämmen auf den zur Differentialdiagnose angegebenen Zuckernährböden.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes
(Direktor: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Haendel).]

Von Reg.-Rat Dr. G. Wolf.

Ueber den Wert und die Zuverlässigkeit der zur Unterscheidung der einzelnen Ruhrtypen angegebenen Zuckernährböden herrschen noch immer verschiedene Anschauungen. Auch die während des Krieges gewonnenen Erfahrungen haben in dieser Hinsicht zu keiner einheitlichen Auffassung geführt. Namentlich wird für die Stämme der Flexner-Y-Gruppe über ungleichmäßiges Verhalten auf der Maltoseplatte berichtet und deshalb der Wert dieses Nährbodens für die Differentialdiagnose der Ruhrstämmen angezweifelt.

Auch von Lentz¹⁾ wird dieses wechselnde Verhalten auf der Maltoseplatte für ältere Laboratoriumsstämme zugegeben, während er andererseits daran festhält, daß bei frisch isolierten Stämmen sich auf Grund ihres Verhaltens auf der Maltoseplatte eine sichere Unterscheidung der Flexner- und der Y-Stämme ermöglichen lasse.

In der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes werden die Zuckerplatten bei der Ruhrdiagnose regelmäßig verwendet. Sie haben sich dabei in Uebereinstimmung mit den Angaben von Lentz im allgemeinen insofern bewährt, als auch nach unseren Beobachtungen bei frisch isolierten Stämmen das kulturelle und das serologische Ver-

1) Kolle u. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 2. Aufl. Bd. 3. S. 930.

halten meist übereinstimmt, wenn auch schon nach kurzer Weiterzüchtung im Laboratorium die Stämme dann nicht selten ihr Verhalten auf den Zuckernährböden ändern können. Verschiedentlich wurden nun aber auch bei der Isolierung frischer Ruhrstämmen Beobachtungen gemacht, über die im folgenden berichtet werden soll, weil sie darauf hinweisen, daß bei der Differentialdiagnose der Ruhr, selbst bei ganz frisch isolierten Stämmen, Irrtümer keineswegs ausgeschlossen sind, wenn die Unterscheidung der Ruhrtypen auf Grund des kulturellen Verhaltens auf den Zuckerplatten gestellt und für die serologische Diagnose nur Esel-Immunserum verwendet wird.

Daß die Zuverlässigkeit der Differentialdiagnose der Ruhr auf Grund der Maltoseplatte von verschiedener Seite angezweifelt wird, ist bereits eingangs erwähnt. Es liegen jedoch auch einzelne Angaben vor, nach denen Ruhrstämmen, welche die Mannitplatte zunächst unverändert ließen, doch bei näherer Untersuchung sich als der Flexner-Y-Gruppe angehörig erwiesen, so z. B. der Dysenteriebazillus Tuckahoe von Park und Carey¹⁾.

Auch Kruse erwähnt neuerdings, daß die Mannitprobe nicht ganz beständig sei.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich auf eine Anzahl von Stämmen, von denen 6, welche ihr Verhalten auf der Mannitplatte und zum Teil auch auf der Maltoseplatte geändert hatten, näher besprochen werden sollen.

Unter diesen Stämmen waren 5 ganz frisch aus Fäzes gewonnen. Sie ließen bei ihrer Isolierung die 3 zur Differentialdiagnose herangezogenen Lackmus-Zuckernährböden — die Mannit-, die Maltose- und die Saccharoseplatte — unverändert und wurden von Shiga-Kruse-Eselserum bis zur Titergrenze agglutiniert (vgl. Tab. I).

Tabelle I.

Stamm	Mannit	Maltose	Saccharose		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	Normal-Eselserum	Phys. Kochsalzlösung
T.	blau	blau	blau	Shiga-Eselser. Titer: 1:3200	++	++	+	+	+	+	—	—	—
C.	"	"	"		++	++	+	+	+	±	—	—	—
K.	"	"	"		++	++	+	+	+	±	—	—	—
A.	"	"	"		++	++	+	+	+	+	—	—	—
M.	"	"	"		++	++	+	+	+	+	—	—	—
B.	"	"	"		++	++	+	+	+	+	—	—	—

Diese Stämme zeigten also ein Verhalten wie Shiga-Kruse-Ruhrkulturen, wenn die Diagnose allein auf Grund des angegebenen Wachstums auf den Zuckernährböden und der Agglutination durch ein Esel-Immunserum gestellt wurde.

Da aber nach den Untersuchungen von Haendel den Ruhr-Eselseris keine unbedingte Spezifität für die einzelnen Ruhrtypen zukommt, sondern auch Kulturen vom Flexner- und Y-Ruhrtypus durch Shiga-Kruse-Eselsera weitgehend beeinflusst werden, so erfolgte die serologische Prüfung der Ruhrstämmen in der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes regelmäßig auch gleichzeitig mit Kaninchenseris. Bei der Agglutinationsprüfung mit solchen Seris wurden nun alle 5 Stämme

1) Kollé u. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 2. Aufl. Bd. 3. S. 931.

nicht von Shiga-Kruse, wohl aber durch Flexner- und durch Y-Kaninchenserum mehr oder weniger hoch beeinflusst.

Infolge dieser auffallenden Erscheinung wurden die Stämme weiterhin genauer verfolgt und in kurzen Zwischenräumen hinsichtlich ihres serologischen und kulturellen Verhaltens geprüft. Dabei ergab es sich, daß schon nach kurzer Zeit bei Wiederholung der Prüfung die 3 Stämme „T“, „C“ und „K“ Mannit und die beiden Stämme „A“ und „M“ Mannit und Maltose angriffen und somit im ersten Fall das typische Wachstum von Y-, im letzten von Flexner-Ruhr aufwiesen (vgl. Tab. II).

Tabelle II.

Stamm	Mannit	Maltose	Saccharose
T.	rot	blau	blau
C.	„	„	„
K.	„	„	„
A.	„	rot	„
M.	„	„	„

Man hätte hier vielleicht an die Erscheinung denken können, die Kruse beobachtete, als er auf Nährböden mit reichlicherem Gehalt an Fleischzucker auch echte Dysenteriestämme gelegentlich rot wachsen sah. Diese Annahme kann aber für unsere Fälle nicht zutreffen, denn erstens wuchsen echte Shiga-Kruse-Bazillen auf denselben Nährböden stets in der gewöhnlichen Weise, d. h. blau, ferner behielten die von uns beobachteten Stämme nun dasselbe Wachstum auch auf Zuckernährböden bei, welche an verschiedenen Tagen hergestellt waren, und endlich entsprach ja auch nunmehr das Verhalten auf den Zuckernährböden der serologischen Stellung der Stämme, wie sie bei der Agglutination mit Kaninchenseris festgestellt war.

In diesem agglutinatorischen Verhalten trat bei der Prüfung mit Eselseris und mit Shiga-Kaninchenserum keine Aenderung mehr ein. Dagegen zeigten dem Flexner- und dem Y-Kaninchenserum gegenüber die Stämme „T“, „C“ und „K“ nach weiteren Ueberimpfungen insofern eine Aenderung, als „T“ weniger hoch als früher, „C“ und „K“ gar nicht mehr agglutiniert wurden. Eine weitere Aenderung auch dieses Verhaltens wurde nur bei dem Stamme „K“ beobachtet, der sich später vorübergehend wieder agglutinabel fast bis zur Titergrenze für dieselben Y- und Flexner-Kaninchenimmunsere erwies, die ihn zu anderer Zeit selbst in der Konzentration von 1:100 unbeeinflusst ließen.

Viel eher als die oben erwogene Annahme, die Rotfärbung des Nährbodens sei in den erwähnten Fällen auf reichlicheren Gehalt an Fleischzucker zurückzuführen, könnte die Erklärung für unsere Fälle in Betracht kommen, welche Lentz für die Beobachtung von Shiga gibt, der eine Anzahl Ruhrstämmen in Lackmus-Mannitlösung bis zum 4. Tage wieder von Rot in Blau umschlagen sah. Lentz erklärt dieses Verhalten aus einer abnorm stark ausgeprägten Avidität von frisch aus dem Menschen gezüchteten Ruhrbazillen zu den Peptonen der Nährlösung, also um eine Betätigung ihres parasitären Charakters, welcher in den Hintergrund tritt, nachdem sich die Stämme durch längere Fortzüchtung auf künstlichem Nährboden mehr an ein saprophytisches Dasein gewöhnt haben.

Aber auch diese Erklärung erscheint nicht befriedigend, weil wir an einem alten, schon lange Zeit im Laboratorium gezüchteten Stamme

ähnliche Schwankungen des Wachstums auf der Zuckerplatte beobachtet haben, wie bei den eben besprochenen, frisch aus dem Körper gezüchteten Stämmen.

Der alte Laboratoriumsstamm B gehörte nach seinem serologischen Verhalten der Flexner-Y-Gruppe an. Am 25. April 1919 wuchs er überraschenderweise sowohl auf der Mannit- als auch auf der Maltoseplatte und der Saccharoseplatte blau. Dieses Verhalten zeigte er wiederholt bei mehreren Prüfungen auf jedesmal neu hergestellten Nährböden. Jede Plattenserie war mit einer Anzahl Kontrollen geprüft. Ein daraufhin mit dem Stamm hergestelltes Serum agglutinierte nur die Ruhrstämmen der Flexner-Y-Gruppe neben dem homologen Stamme.

Der Stamm B wurde nun fortlaufend kontrolliert, und zwar in mehreren aus Einzelkolonien hergestellten Kulturen. Dabei wurde eine Variante festgestellt, die weder von Shiga-Kruse noch Flexner- oder Y-Serum agglutiniert und auch von dem mit dem Stamme B hergestellten Kaninchenserum nicht beeinflußt wurde. Auf den Zuckerplatten einschließlich der Mannitplatte wuchs auch diese Variante blau. Ein mit ihr hergestelltes Kaninchenserum verhielt sich genau wie das erste mit dem Stamme B hergestellte Serum. Es beeinflußte den eigenen Stamm nicht, wohl aber die agglutinable Variante des Stammes B sowie die Stämme der Flexner-Y-Gruppe.

Bei der weiteren Prüfung der beiden Abspaltungen wurde am 15. Aug. beobachtet, daß die inagglutinable Variante auf einmal auf der Mannitplatte rot wuchs; die agglutinable Variante bildete auf derselben Platte blaue Kolonien. Einen Monat später begann aber auch die agglutinable Variante aus Mannit Säure zu bilden, so daß nunmehr beide gleich, und zwar wie Y-Stämme, wuchsen. Weitere 2 Monate später fing die inagglutinable Variante auch an, Maltose anzugreifen; es verhielten sich somit von demselben Stamme B, der anfangs auf den Zuckerplatten wie eine echte Dysenterie gewachsen war, die eine Variante (die agglutinable) wie ein Y-, die andere (die inagglutinable) wie ein Flexner-Stamm (vgl. Tab. III).

Tabelle III.

Prüfung am	Stamm	Mannit	Maltose	Saccharose
1. 25. März	B	blau	blau	blau
2. 25. April	agglutinable Variante inagglutinable "	blau "	blau "	blau "
3. 15. Aug.	agglutinable Variante inagglutinable "	blau rot	blau "	blau "
4. 8. Sept.	agglutinable Variante inagglutinable "	rot "	blau "	blau "
5. 11. Nov.	agglutinable Variante inagglutinable "	rot "	blau rot	blau "

Da es sich in diesem Falle um einen alten Laboratoriumsstamm handelte, der die sowieso außergewöhnlichen parasitären Eigenschaften längst verloren haben müßte, so reicht die von Lentz gegebene Erklärung zum mindesten für diesen Fall nicht aus. Wir glauben denn auch, daß hier nicht eine ungewöhnlich starke Alkalibildung aus Pepton mit der Zeit weggefallen ist, sondern daß der Stamm plötzlich die Fähigkeit erlangt hat, die im Nährboden enthaltene Zuckerart anzugreifen, und zwar auf Grund von Abspaltungsvorgängen, deren sprung-

haftes Auftreten ja auch sonst häufig beobachtet ist. Wir schließen uns somit der Auffassung von Sonne¹⁾ an, welcher das plötzliche Auftreten von Maltose zersetzenden Varianten bei giftarmen Ruhrstämmen systematisch untersucht hat. Er beobachtete seine Stämme auf Lackmus-Maltosebouillon und fand, daß diese niemals nach 24 Std., sondern frühestens nach 2 und oft mehr Tagen gesäuert wurde. Er strich nun täglich aus den Bouillonkulturen eine Oese auf Lackmus-Maltoseagar aus. Es wuchsen hier zunächst nur blaue Kolonien; es traten aber um die Zeit, zu der die Bouillon sich rötete, auch auf dem Agar blaue und rote Kolonien nebeneinander auf. Sonne vermutet daher, daß die Säuerung auf einer plötzlich erworbenen Eigenschaft (Mutation) bei einem oder wenigen Bakterien der Kultur beruht.

Eine Stütze für die Auffassung scheint auch der oben bereits erwähnte Fall „M“ zu bilden. Bei diesem wurden zu gleicher Zeit aus dem Stuhle neben den Ruhrbazillen, die auf Mannit blau wuchsen, auch solche gezüchtet, welche diesen Nährboden sogleich röteten, so daß man nach dem Ausfall dieser Probe an eine Doppelinfektion mit echter Dysenterie (Shiga-Kruse) und mit Bazillen der Flexner-Y-Gruppe denken mußte. Da aber, wie bereits beschrieben, der auf Mannit blau wachsende Stamm sich serologisch nicht als Shiga-Kruse-Ruhr erwies und auch bald Mannit zu zersetzen lernte, so glauben wir, die auf Mannit blau wachsenden Keime als eine Variantenbildung auffassen zu müssen, bei der dann der Rückschlag in die gewöhnliche Wuchsform erfolgt ist.

Trotz unserer Beobachtungen möchten wir aber auf die Mannitprobe für die Differentialdiagnose der Ruhr nicht verzichten, denn es konnte von uns bisher niemals ein echter Shiga-Kruse-Dysenteriestamm gefunden werden, der aus Mannit Säure gebildet hätte, und andererseits hat keiner der von uns beobachteten Ruhrstämmen der Flexner-Y-Gruppe auf die Dauer diese Säurebildung aus Mannit unterlassen. Unsere Ergebnisse beweisen aber, daß man sich bei der Differentialdiagnose der Ruhrbazillen, die nun einmal große Neigung zu Uebergängen und Variantenbildung besitzen, auf den Ausfall der Prüfung auf den Zuckernährböden allein nicht verlassen darf, und daß auch die Kontrolle durch die Agglutination nur mit Eselseren nicht genügt; es ist vielmehr zu fordern, daß jeweils die Stämme auch mit sicher spezifischen Kaninchenimmunsereis auf ihr serologisches Verhalten geprüft werden. Dagegen erscheint es uns nach unseren Beobachtungen nicht zweckmäßig und auch praktisch nicht notwendig, noch weiterhin eine scharfe Trennung von Y- und Flexner-Ruhr beizubehalten. Da es nicht möglich ist, mit Hilfe von Kaninchenimmunsereis diese beiden Gruppen sicher voneinander abzutrennen, und gerade die zu diesen beiden Gruppen gerechneten Stämme auch nach zahlreichen Befunden von anderer Seite ihr Verhalten auf der Maltoseplatte sehr oft ändern können, so sprechen alle diese Beobachtungen dafür, die Trennung solcher Ruhrstämmen gesondert nach Flexner-Ruhr und Y-Ruhr aufzugeben und nur von einer „Flexner-Y-Gruppe im Gegensatz zu der Shiga-Kruse-Gruppe zu sprechen.

1) Centralbl. f. Bakt. 1915. S. 408.

Nachdruck verboten.

Bemerkung zum Referat betreffend Fleckfiebertvirus — Dörr (Basel).

8. Tagung der Vereinigung für Mikrobiologie, Jena 1920.
(Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. H. 6/7.)

Von Prof. Dr. R. Hilgermann und Dr. W. Arnoldi.

Bei Erwähnung verschiedener Impfverfahren schreibt Dörr S. 16: „Impfstoff aus irgendwelchen Bakterien (Caldwell, Hilgermann und Arnoldi usw.)“; S. 17 von Kyriazidis: „daß er ausgezeichnete Resultate bei Immunisierung mit abgetöteten Kulturen von X 19 erzielt haben will“.

Dem nicht mit der Literatur völlig Vertrauten muß es beim Lesen des Referats den Anschein erwecken, als ob Hilgermann-Arnoldi mit irgendwelchen beliebigen Bakterien, Kyriazidis hingegen zum 1. Mal mit X 19-Bakterien immunisiert habe.

Demgegenüber legen wir Wert darauf, zu betonen, daß wir nicht mit irgendwelchen beliebigen Bakterien, sondern vielmehr als erste 1917¹⁾ unsere, wenn auch an kleinem Material gewonnenen, doch mit gutem Erfolge durchgeführten Impfverfahren mit abgetöteten und phenolisierten Kulturabschwemmungen von X 19 bei subkutanen und vor allem intravenösen Injektionen erzielt haben. Kyriazidis würde dementsprechend unsere ersten günstigen Ergebnisse nur bestätigt haben.

Nachdruck verboten.

Immunisatorische Studien über die Polyederkörperchen bei Gelbsucht von Seidenraupen (Zelleinschluss).

[Aus dem Forschungsinstitut für Seidenzucht, Nakano, bei Tokió (Dir.: Prof. Dr. T. Kagayama), Bakt. Abt., Leiter: Prof. Dr. K. Aoki.]

Von Prof. Dr. K. Aoki²⁾ und Dr. Y. Chigasaki.

Wenn man Seidenraupen, welche an Gelbsucht erkrankt sind, histologisch untersucht, so sind in allen Epithelzellen, und zwar in den Zellkernen, merkwürdige, polyedrische Gebilde leicht nachzuweisen.

Ihre Größe ist ziemlich verschieden; sie zeigen keine Struktur, lassen sich durch die verschiedenen Anilinfarbstoffe, womit man gewöhnlich die Kerne zu tingieren pflegt, fast nicht färben, und sind als Polyederkörperchen bekannt. Sie bleiben im Anfangsstadium der Erkrankung nur in den Zellkernen, treten aber in dem späteren Krankheitsstadium aus den Zellen ins Blut aus. Diese aus den Zellen befreiten Polyederkörperchen schwimmen mit dem Fortschreiten der Krankheit in so großer Zahl im Blute herum, daß dieses dadurch getrübt aussieht. Schließlich wird das Blut nicht nur undurchsichtig, sondern auch so dickflüssig, als ob

1) Hilgermann-Arnoldi, Behandlung und Schutzimpfung bei Fleckfieber mittels Vakzinierung mit Proteus X 19. (Dtach. med. Wochenschr. 1917. Nr. 51.)

2) Zurzeit beauftragt mit der Leitung der bakteriologischen Abteilung.

man Eiter vor sich habe. Wenn die Krankheit so weit fortschreitet, verliert das Chitinepithelgewebe seine Elastizität und wird leicht so zerbrechlich, daß die Tiere selbst durch irgendeinen leichten Eingriff verletzt werden.

Wenn man eine minimale Menge dieses Blutes entweder per os oder per Spritzung in den Körper gesunder Seidenraupen einführt, so erkranken sämtliche Tiere ohne Ausnahme und gehen zugrunde.

Man hat sich bis jetzt viel bemüht, die Erreger dieser Krankheit nachzuweisen und das Wesen der Polyederkörperchen festzustellen. Heutzutage herrschen zwei Ansichten darüber, wovon die eine behauptet, daß die Polyederkörperchen entweder die Erreger selbst oder Träger derselben seien (Bolle, Fischer, Marzochi, Knoche, Escherlich und Miyashima und Hajashi). Die andere Ansicht, welche von Prowazek aufgestellt wurde, besagt, daß die Erreger selbst filtrierbar, nämlich zu den Chlamydozoen gehörig und in den Kernen lokalisiert seien. Die Polyederkörperchen müssen als Reaktionsprodukte betrachtet werden, welche durch den Reiz der Erreger teils aus Kernen, teils aus den Erregern selbst hervorgegangen sind, wie die Guarnierischen Körperchen bei den Pocken, oder die Negrischen Körperchen bei der Lyssaerkrankung. Sie wurden deshalb als kristallisierte Nukleoproteide angesehen (Prowazek, Glasser und Chapman).

Meines Wissens ist aber noch nicht geprüft worden, ob die Polyederkörperchen als Antigen wirken, nämlich ob eine Immunreaktion bei solchen Tieren, welche mit den Polyederkörperchen vorbehandelt worden sind, zum Vorschein kommt. Deshalb haben wir beabsichtigt, zuerst Kaninchen mit denselben zu immunisieren. Wenn die Immunreaktion dabei deutlich nachzuweisen wäre, so könnte man vielleicht durch diese Reaktion eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Polyederkörperchen und Epithelkörperchen feststellen.

Reindarstellung der Polyederkörperchen.

Das Blut von schwer an Gelbsucht erkrankten Seidenraupen wurde in 0,85-proz. physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die Aufschwemmung mit dem Schüttelapparate 2 Std. lang geschüttelt und dann scharf abzentrifugiert.

Auf diese Weise konnten wir einen reichlichen, schön weißen Niederschlag von Polyederkörperchen bekommen. Dieser Bodensatz wurde in derselben Weise mehr als 10mal gewaschen. Die Waschung war so ausgiebig, daß die überstehende Flüssigkeit schließlich in Raupenserum-immunserum keine Präzipitation mehr zeigte. Nun konnten wir annehmen, daß die so gewaschenen Polyederkörperchen auch keine Blutzellen mehr enthielten, weil die von Natur aus ganz spärlich vorhandenen Blutzellen durch die wiederholte, ausgiebige Waschung zertrümmert und wegen der Verschiedenheit der spezifischen Gewichte beseitigt worden seien. So gut gewaschene Polyederkörperchen behalten aber ihre normale Gestalt ganz gut bei, und konnten Tiere so gut infizieren, wie ungewaschene Polyederkörperchen.

Immunisierung.

4 Kaninchen wurden zuerst mit einer Menge von Polyederkörperchen vorbehandelt. Ferner wurden steigende Dosen in 7-tägigen Intervallen eingespritzt. So wurden die Tiere im ganzen 5mal vorbehandelt. Die Kaninchen vertrugen diese Einspritzung sehr gut. Am 7. Tage nach der letzten Einspritzung wurde eine Blutprobe von den Ohrenvenen ab-

genommen. Wenn man die Sera, mit Polyederkörperchen gemischt, bei 37° C im Brutschrank stehen ließ, so fanden wir dieselben darin sehr deutlich agglutiniert.

Agglutinationsreaktion.

Wir fügten der gut gewaschenen Polyederkörperchenaufschwemmung das Immunserum in verschiedenen Verdünnungen hinzu und stellten diese Agglutinationsproben bei 37° C in den Brutschrank, wo sie 3 Std. lang stehen gelassen wurden. Daraufhin beobachteten wir sie genau, mit den Kontrollröhrchen vergleichend. Es stellte sich heraus, daß die Polyederkörperchen in den Röhrchen, welche das Immunserum in genügender Menge enthielten, sehr deutlich, dagegen in den anderen Röhrchen, welche das Normalserum in derselben Menge enthielten, nicht agglutinierten (Tab. I).

Tabelle I. Agglutination.

Verdünnung:	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
Polyederimmunserum							
389	+	+	+	+	+	±	—
413	+	+	+	+	+	±	—
416	+	+	+	+	+	+	±
417	+	+	+	+	+	+	±
Normalkaninchenserum							
389	—	—	—	—	—	—	—
413	—	—	—	—	—	—	—
416	—	—	—	—	—	—	—
417	—	—	—	—	—	—	—
Seidenraupenimmunserum							
S.R.I.S.	—	—	—	—	—	—	—

Präzipitationsreaktion.

Da man erfahrungsmäßig weiß, daß die Polyederkörperchen in schwachen Alkalien ganz leicht löslich sind, waren wir imstande, von ihnen bequem ein für die Präzipitationsreaktion brauchbares Antigen darzustellen. Wir lösten nämlich große Mengen Polyederkörperchen in 0,05-proz. Natronlauge. Diese Lösung sah so klar aus wie Wasser. Mit dieser Lösung konnten wir Kaninchen ebensogut immunisieren, wie mit den ungelösten. Sie agglutinierten nämlich im Immunserum, welches durch die Einspritzung der gelösten Polyederkörperchen hergestellt worden war, ebensogut wie im anderen Immunserum, welches mit nicht gelösten Polyederkörperchen gewonnen wurde. Als man diesen Immunsere die Lösung der Polyederkörperchen in verschiedenen Verdünnungen hinzufügte, entweder überschichtet oder gemischt, so trat die Präzipitation sehr deutlich ein. Es war aber dieselbe Erscheinung im Normalserum des Kaninchens nur in ganz minimalem Grade nachzuweisen (Tab. II). Hier muß

Tabelle II. Präzipitation.

Immunsere:	Polyederimmunserum			Seidenraupenimmunserum S.R.I.S.	Normalkaninchenserum
	416	417	432		
Antigen:					
Polyederlösung	1:100	1:100	1:100 ±	1:10	1:10
Seidenraupenserum	—	—	—	1:2000	—
Normalkaninchenserum	—	—	—	—	—
Eiweißgehalt der Antigene (Kochprobe).					
	Polyederlösung		1:100		
	Seidenraupenserum		1:1000		

bemerkt werden, daß die Polyederkörperchen von Anfang an streng serumfrei gewaschen werden müssen, da es sonst leicht möglich ist, daß die durch das Blutserum der Seidenraupen hervorgerufene Präzipitation die von Polyederkörperchen selbst veranlaßte vortäuscht.

Komplementbindungsreaktion.

Ferner versuchten wir, ob die Komplementbindungsreaktion in diesen Sera stattfinden könne. Wie aus Tab. III ersichtlich ist, konnten wir

Tabelle III. Komplementbindung.

Immuns Serum:	Polyederimmuns Serum		Normalserum	Seidenraupenserum
	416	417		
Antigen:				
Polyederlösung	0,1	0,1	—	—
Seidenraupenserum	—	—	—	0,01

nachweisen, daß diese Reaktion auch durch die Polyederkörperchen deutlich hervorgerufen werden kann.

Die lytische Wirkung der Immuns era auf die Polyederkörperchen war aber weder in vitro noch in vivo nachzuweisen.

Da es uns gelungen war, nachzuweisen, daß die Polyederkörperchen bei Kaninchen als Antigen wirken können, versuchten wir, durch die Immunreaktion die Beziehung zwischen den Epithelzellen und den Polyederkörperchen festzustellen, welche in diesen Zellen gebildet waren. Zu diesem Zwecke wurden die Magen- und Chitinepithelgewebe aus den Seidenraupen herauspräpariert. Beide Gewebe wurden getrennt so ausgiebig gewaschen, daß das Waschwasser nicht mehr, weder im Magensaftimmuns erum, noch im Blutserumimmuns erum, präzipitieren konnte. Wir hatten mit den gut gewaschenen Epithelgeweben einerseits Kaninchen immunisiert, andererseits Extrakte hergestellt. Die beiden Immuns era zeigten in den homologen Antigenen die Präzipitation ganz deutlich. In dieser Weise konnten wir dreierlei Antigene und die ihnen entsprechenden Antisera darstellen. Mit diesen 3 Antigenen und Antisera wurde die Präzipitation kreuzweise ausgeführt, wobei sich herausstellte, daß die Antigene der Polyederkörperchen in den ihnen entsprechenden Antisera sehr stark, dagegen in den Immuns eren von den Magen- und Epithelzellen nur so stark präzipitierten, wie im Normalserum des Kaninchens. Die Extrakte der Magen- und Chitinepithelzellen zeigten eine positive Reaktion in den ihnen entsprechenden Antisera gegenseitig, aber eine negative Reaktion im Immuns erum der Polyederkörperchen (Tab. IV). Das gleiche Verhalten konnten wir bei der Komplementbindungsreaktion feststellen.

Tabelle 4.

Immuns era:	Polyederimmuns erum	Magenepithel	Chitinepithel	Kaninchennormalserum
Antigen:				
Polyederlösung	1:200 ±	1:10	1:10	1:10
Magenepithelextrakt	—	1:10	1:5	—
Chitinepithelextrakt	—	1:10	1:20	—
Seidenraupenserum	—	1:10 ±	1:10	—

Eiweißgehalt der Antigene (Kochprobe).

Magenwandextrakt	1:10 ±
Chitinepithelextrakt	1:5
Polyederlösung	1:100

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Polyederkörperchen mit den Bestandteilen der Epithelzellen, worin sie gebildet sind, keine direkte Verwandtschaft haben. Infolgedessen ist es gerechtfertigt, anzunehmen, daß die Polyederkörperchen, die als Nukleoproteid betrachtet werden, nicht von den Epithelzellen der Magen- und Chitingewebe, sondern von irgendwelchen anderen Zellen, vielleicht von Parasitenzellen, abstammen müssen. Es läßt sich aber auch annehmen, daß die Polyederkörperchen, wenn sie auch von den Körperzellen der Seidenraupen stammen, doch physikalisch-chemisch so verändert sind, daß sie eine andere Zustandsspezifität bekommen haben. Infolgedessen könnten die Polyederkörperchen den originalen Bestandteilen der Epithelzellen gegenüber nicht mehr reagieren. Diese letzte Annahme scheint aber insofern nicht wahrscheinlich, als die Polyederkörperchen nicht die geringste verwandtschaftliche Beziehung den Epithelzellen gegenüber zeigen.

Zusammenfassung.

1) Man kann die Polyederkörperchen aus den an der Gelbsucht erkrankten Seidenraupen ganz rein darstellen. 2) Mit diesen Polyederkörperchen kann man Kaninchen immunisieren. 3) Die Immunsera zeigten Agglutinations-, Präzipitations- und Komplementbindungsreaktion deutlich. 4) Eine lytische Erscheinung war aber dabei nicht nachzuweisen. 5) Durch diese Immunreaktion konnten wir feststellen, daß die Polyederkörperchen mit den Körperzellen, worin sie ausgebildet sind, keine verwandtschaftliche Beziehung haben. 6) Nach diesen Ergebnissen könnte man annehmen, daß die Polyederkörperchen nicht von den Körperzellen der Seidenraupen stammen, worin sie gebildet sind, sondern von Parasitenzellen stammen. Die andere Annahme, daß die Polyederkörperchen denaturiertes Nukleoproteid der Epithelzellen seien, scheint insofern unwahrscheinlich, als die Polyederkörperchen zu den Epithelzellen keine verwandtschaftliche Beziehung zeigten.

Literatur.

Bolle, Ber. üb. d. Tätigk. d. k. k. landwirtschaftl. Versuchstat. Göry. 1908. — Fischer, Entomol. Zeitschr. Jahrg. 20. 1907. — Knoche, Vortrag über Wipfelkrankheit der Nonne. Stuttgart 1902. — Marzochi, Arch. d. parasit. T. 12. 1909. — Escherlich u. Miyashima, Naturwiss. Zeitschr. f. Forst u. Landwirtsch. 1911. — Prowazek, Arch. f. Protistenk. Bd. 10. 1907. — Ders. Centralbl. f. Bakt. Abt. I Orig. Bd. 67 1912. — Ders., Handb. d. pathog. Protozoen. 1912. — Glasser u. Chapman, Biolog. Bull. Vol. 0 1916.

Nachdruck verboten.

Ueber die Einwirkung von „205 Bayer“ auf Trypanosomen ausserhalb des Tierkörpers.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamts (Direktor: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Haendel)].

Von Dr. W. von Schuckmann, Reg.-Rat im Reichsgesundheitsamt.

Mit 4 Abbildungen im Text.

In einer in der „Berlin. klin. Wochenschr.“ 1920. No. 35 erschienenen Mitteilung haben Haendel und Joetten über Versuche mit einem von den Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer u. Co. in Elberfeld

hergestellten Präparat „205 Bayer“ berichtet, das sich bei den Laboratoriumsversuchen gegenüber verschiedenen Trypanosomen-Infektionen hervorragend bewährt hatte und alle anderen bisher bekannten trypanoziden Mittel in therapeutischer und prophylaktischer Hinsicht durch seine absolut sichere und außerordentlich viel stärkere Wirkung weit übertraf. Die Autoren hatten dabei bereits kurz darauf hingewiesen, daß die abtötende Wirkung des Präparates nicht an den Tierkörper gebunden ist, sondern auch im Reagenzglas eintritt und auch hier mikroskopisch festzustellen ist. Die unter der Wirkung des Präparates in vitro an den Trypanosomen zu beobachtenden morphologischen Veränderungen sind von mir im mikroskopischen Präparat genauer verfolgt worden und sollen nachstehend des näheren geschildert werden.

Die Einwirkung von „205 Bayer“ auf Trypanosomen wurde bei den Reagenzglasversuchen in der Weise kontrolliert, daß jeweils 0,5 ccm inaktives Meerschweinchenserum und 0,2 ccm Trypanosomenaufschwemmung in Natriumzitratlösung in sogen. Neufeldschen Röhrchen mit 0,1 ccm einer 1—10-proz. Lösung von „205 Bayer“ versetzt wurden, während in Kontrollröhrchen der gleichen Menge Meerschweinchenserum und Trypanosomenaufschwemmung statt des „205 Bayer“ 0,1 ccm physiol. Kochsalzlösung zugesetzt wurde. Während anfänglich die Röhrchen entweder bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank bei 37 ° C gehalten wurden, blieben sie bei späteren Versuchen stets bei Zimmertemperatur stehen, da sich herausgestellt hatte, daß durch die Temperatur nicht die Art der an den Trypanosomen morphologisch in die Erscheinung tretenden „205“-Wirkung, sondern nur die Geschwindigkeit ihres Eintritts beeinflußt wurde, und zwar in dem Sinne, daß die „205“-Wirkung bei 37 ° C schneller erkennbar wurde als bei Zimmertemperatur. In gewissen Zeitabständen (z. B. nach $\frac{1}{2}$, 1, 2 etc. Std.) wurden dann den Röhrchen mittels Kapillare Proben entnommen und teils frisch untersucht, teils auf Deckgläschen ausgestrichen, mit Sublimat-Osmiumsäure (konz. wässrige Sublimatlösung 9 Teile + 2-proz. Osmiumsäure 1 Teil) feucht fixiert und nach Giemsa gefärbt.

Die dabei infolge der Einwirkung von „205 Bayer“ zu beobachtenden morphologischen Veränderungen konnten in fast völlig übereinstimmender Weise an *Trypanosoma brucei*, *Tr. congolense* und *Tr. equiperdum* festgestellt werden. Sie sollen im folgenden für das zuletzt genannte Trypanosom, den Erreger der Dourine oder Beschälseuche, der im Reichsgesundheitsamt in Meerschweinchen weitergezüchtet wird, genauer beschrieben werden.

Das normale Aussehen des *Trypanosoma equiperdum* Dofl. im Tierblut kann wohl als bekannt vorausgesetzt werden. Nur auf die beim normalen Dourine-Trypanosom ebenso wie bei einer Reihe anderer Trypanosomenarten zwar nicht immer, aber doch häufig unmittelbar vor dem Blepharoplast, zwischen diesem und dem Kern sichtbare Vakuole, die sich unter günstigen Umständen auch am lebenden Trypanosom erkennen läßt, sei hier noch besonders hingewiesen¹⁾. Von einigen Autoren²⁾ wird diese Vakuole als ein infolge schlechter Fixierung auftretendes Kunstprodukt aufgefaßt. Gegen die Richtigkeit dieser Auffassung spricht wohl, wie auch Doflein (a. a. O. S. 479) hervorhebt, ihr regelmäßiges Vorkommen an derselben Stelle der Trypanosomenzelle, nämlich un-

1) Vgl. Doflein, Lehrb. der Protozoenk. 4. Aufl. 1916. S. 480. Fig. 455 A—G.

2) z. B. Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis. 2^e édit. 1912. p. 732.

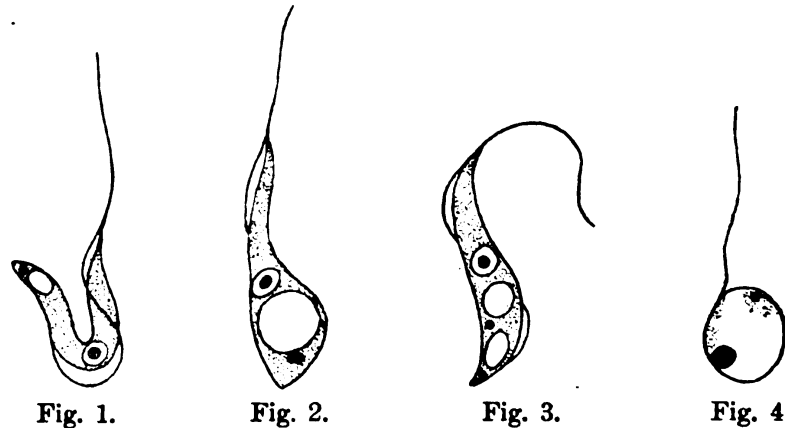
mittelbar vor dem Blepharoplast. Auch der bereits erwähnte Umstand, daß die Vakuole unter Umständen auch im lebenden Trypanosom an der gleichen Stelle sichtbar ist¹⁾, deutet darauf hin, daß es sich nicht um ein durch die Fixierung hervorgerufenes Kunstprodukt handeln kann. Im gleichen Sinne zu deuten ist wohl die Beobachtung, daß Trypanosomen, welche vor der Teilung stehen und bereits 2 Blepharoplaste enthalten, zuweilen auch 2 Vakuolen erkennen lassen, von denen je 1 dicht vor jedem der beiden Blepharoplaste liegt. Man wird also wohl der von Doflein (a. a. O.) vertretenen Ansicht beistimmen können, daß die erwähnte Vakuole kein Kunstprodukt darstellt, sondern in irgendeinem „Zusammenhang mit dem Bau der Trypanosomen“ steht. Die unten zu schildernden morphologischen Verhältnisse bei den in vitro mit „205 Bayer“ behandelten Trypanosomen dürften ebenfalls zugunsten dieser Auffassung sprechen.

Bei den von mir angestellten Reagenzglasversuchen über die Wirkung des „205 Bayer“ behielten in den Kontrollröhrchen, welche das Mittel nicht enthielten, die dem Meerschweinchenblut entstammenden Dourine-Trypanosomen mit wenigen Ausnahmen während der ganzen Versuchsdauer ihr normales Aussehen. Soweit sie die oben erwähnte Vakuole erkennen ließen, war dieselbe nicht größer als in den dem Tierblut direkt entstammenden Trypanosomen und beeinflusste in keiner Weise die äußere Kontur des Trypanosomenhinterendes. Kern und Blepharoplast zeigten im gefärbten Präparat die normale Färbbarkeit und Größe. Im frischen Präparat ließ sich allerdings, nachdem die Trypanosomen einige Stunden im Reagenzglas gewesen waren, bei einem Teil derselben eine Abnahme der Beweglichkeit feststellen, doch waren stets auch noch normal bewegliche Trypanosomen in großer Zahl vorhanden. Ein Verkleben der Trypanosomen mit ihren Hinterenden zu zum Teil außergewöhnlich großen, aus Hunderten von Trypanosomen bestehenden Klumpen wurde in den Kontrollröhrchen nur 1mal beobachtet, und zwar bei einem Versuch, für welchen das Trypanosomenmaterial einem Meerschweinchen entnommen war, bei dem die Trypanosomen, nachdem sie im Anfang der Infektion sehr zahlreich gewesen waren, bereits einmal völlig aus dem peripheren Blut verschwunden waren; es hatte den Anschein, als ob die bei der Blutentnahme sehr zahlreich vorhandenen Trypanosomen im Begriff waren, zum 2. Mal aus dem peripheren Blut zu verschwinden, doch konnte darüber Genaueres nicht festgestellt werden, weil das Meerschweinchen noch am Tage der Blutentnahme einging.

In den mit „205 Bayer“ beschickten Röhrchen nahmen dagegen die Trypanosomen im Laufe der Versuche ein von der normalen Form wesentlich verschiedenes Aussehen an, das in der Hauptsache auf eine starke Vergrößerung der vor dem Blepharoplast gelegenen Vakuole zurückzuführen war (Fig. 1 und 3). Diese Vakuole, welche bei normalen Trypanosomen nur wenig größer ist als der Blepharoplast (Durchm. ca. 1–2 μ), erfuhr bei den in „205“-Röhrchen befindlichen Trypanosomen je nach der Konzentration des Mittels und der Temperatur, bei welcher die Röhrchen gehalten wurden, früher oder später eine allmählich zunehmende, oft sehr beträchtliche Vergrößerung, die auf das Aussehen der ganzen Trypanosomenzelle von

1) Vgl. Castellani, Die Aetiologie der Schlafkrankheit der Neger. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904. S. 63.)

großem Einfluß war (Fig. 2). Es wurde nämlich durch die vergrößerte Vakuole das Hinterende der Trypanosomen blasenartig aufgetrieben, so daß häufig Trypanosomenformen entstanden, bei denen der ganze, hinter dem Kern gelegene Teil der Zelle zu einem etwa kugeligen, blasenartigen Gebilde aufgebläht war, dem das Vorderende, das zuweilen einige rotgefärbte Körnchen enthielt, mit dem freien Geißelende wie ein kleines Schwänzchen anhing. In der „Wandung“ dieses blasenartigen Gebildes, die in der Regel nur dünn war, lag dann der Blepharoplast. Nicht selten fanden sich auch Formen mit 2 Blepharoplasten und 2 vergrößerten Vakuolen (Fig. 3); der eine Blepharoplast lag in solchem Fall ganz am äußersten Hinterende des Trypanosoms, während der andere in eine, die beiden Vakuolen voneinander trennende Protoplasmabrücke eingebettet war. Auch im frischen Präparat war diese außerordentlich auffallende und charakteristische morphologische Veränderung an den lebenden Trypanosomen deutlich erkennbar. Sie trat bei den Versuchen in vitro stets ausschließlich in mit „205 Bayer“ versetzten Röhrchen auf und wurde in den Kontrollröhrchen niemals beobachtet, darf also wohl mit Recht als eine Folge der Einwirkung des Mittels auf die Trypanosomen angesehen werden. Bei Zusatz von



0,1 ccm einer 10-proz. „205“-Lösung (= 0,01 g „205 Bayer“ auf 0,8 ccm Flüssigkeit), d. h. in einer 1,25-proz. „205“-Lösung konnte die Vakuolenvergrößerung zuweilen schon $\frac{1}{2}$ Std. nach Beginn des Versuches beobachtet werden; bei Zusatz schwächerer „205“-Lösung begann die Vakuolenvergrößerung entsprechend später und machte langsamere Fortschritte. Nach Zusatz von 0,1 ccm einer 1-proz. „205“-Lösung (= 0,001 g „205 Bayer“ auf 0,8 ccm Flüssigkeit), d. h. also in einer 0,125-proz. „205“-Lösung, war sie 1—2 Std. nach Beginn des Versuches ebenfalls deutlich zu erkennen.

Die Vergrößerung der Vakuole blieb jedoch im weiteren Verlauf der Versuche nicht die einzige morphologische Veränderung an den Trypanosomen. Vielmehr fanden sich 2—3 Std. nach Beginn der Versuche, zuweilen auch erst später, in den mit „205“ versetzten Röhrchen neben den Trypanosomen mit mehr oder weniger stark aufgeblähtem Hinterende ziemlich viele birnförmige oder vollständig abgerundete Trypanosomen (Fig. 4) mit einer langen, freien Geißel, die zuweilen nur noch mit ihrem Hinterende in dem nach Giemsa schwach blau oder kaum noch färbbaren Protoplasma verankert war. Kern und Blepharoplast dieser abgerundeten Trypanosomen waren im gefärbten Präparat noch deutlich erkennbar; während aber bei Trypanosomen, die noch nicht abgerundet waren, der Kern noch, wie bei normalen Trypanosomen,

eine rot gefärbte Randschicht und einen blau gefärbten Binnenkörper erkennen ließ (Fig. 1—3), bildete er in den abgerundeten Trypanosomen eine homogene, stark färbbare Masse, die bei Giemsa-Färbung einen ähnlichen roten Farbton annahm, wie der Blepharoplast, was wohl ebenso wie die starke Deformation der Trypanosomen als ein Anzeichen der durch „205 Bayer“ hervorgerufenen Degeneration der Trypanosomen aufgefaßt werden muß. Der Umstand, daß in gefärbten Präparaten auf späteren Stadien der Versuche auch freie Trypanosomengeißeln ohne Protoplasmakörper gefunden wurden, deutet darauf hin, daß diese abgerundeten Trypanosomen schließlich zerfallen und von ihnen dann nur noch die Geißel übrig bleibt. Beobachtet konnte dieser Zerfall leider nicht werden.

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen sind jedoch, wie schon Haendel und Joetten mitgeteilt haben, nicht die einzigen Anzeichen für eine in vitro stattfindende Einwirkung von „205 Bayer“ auf die Trypanosomen. Es läßt sich vielmehr häufig schon vor dem Beginn der Vakuolenvergrößerung eine Verlangsamung der Beweglichkeit, sowie eine gewisse Klebrigkeit der Trypanosomen erkennen, die zur Bildung mehr oder weniger umfangreicher Trypanosomenklumpen führt. Die im frischen Präparat häufig schon 1—2 Std. nach Beginn des Versuches in Erscheinung tretende Verminderung der Durchschnittszahl der in einem Mikroskop-Gesichtsfeld sichtbaren Trypanosomen ist wohl in der Regel auf die Zusammenballung der Trypanosomen zu größeren Klumpen zurückzuführen, da ein Zerfall der Trypanosomen in größerem Umfang erst später einzutreten pflegt. Wie bereits oben erwähnt, trat bei einem der angestellten Versuche auch in den Kontrollröhrchen eine sehr starke Zusammenballung der Trypanosomen ein, was aber vielleicht auf schädigende Einflüsse zurückzuführen war, die bereits im Tierblut auf die Trypanosomen eingewirkt hatten. Erwähnt sei schließlich noch, daß mehrfach in den mit „205“ beschickten Röhrchen bei Trypanosomen, welche noch eine durchaus normale Form besaßen, eine Ablösung der Randgeißel ihrer ganzen Länge nach beobachtet wurde. Häufig wurden auch mit „205“ behandelte Trypanosomen, ohne irgendwelche morphologische oder sonstige Anzeichen für die Einwirkung des Mittels erkennen zu lassen, völlig unbeweglich, während bei der Mehrzahl der im Präparat befindlichen Trypanosomen die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen eingetreten waren. Jedenfalls unterliegt es aber nach all meinen Beobachtungen keinem Zweifel, daß die geschilderten Veränderungen durch „205 Bayer“ ausgelöst wurden, und daß sich so die schädigende Wirkung des Mittels auf die Trypanosomen auch im Reagenzglas unter dem Mikroskop zeitlich verfolgen und feststellen läßt.

Es sei im Anschluß an die Schilderung meiner Befunde darauf hingewiesen, daß ganz ähnliche Veränderungen, wie sie von mir festgestellt wurden, auch nach Einwirkung von Brillantgrün auf Nagana-Trypanosomen im Rattenblut von Wendelstadt und Fellmer¹⁾ beobachtet worden sind. Die genannten Autoren sahen 9—10 Std. nach Behandlung stark infizierter Ratten mit Brillantgrün „bei der großen Mehrzahl der Trypanosomen am hinteren Ende ein zystenartiges Gebilde, in dessen Wandung die deutlich gefärbte Geißelwurzel liegt“. Aus den der Arbeit beigegebenen Tafelabbildungen geht deutlich hervor, daß dieses sogen.

1) Wendelstadt und Fellmer, Ueber die Einwirkung von Brillantgrün auf Nagana-Trypanosomen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52. 1906. S. 263—281. Taf. 5.)

„zystenartige Gebilde“ nichts anderes war, als die von mir oben beschriebene vergrößerte Vakuole, deren Vergrößerung wohl als eine Folge der Brillantgrüneinwirkung auf die Trypanosomen anzusehen ist. Wendelstadt und Fellmer geben an, daß sie „eine derartige Cystenbildung bei dem normalen Untergang der Trypanosomen auch, aber nur ganz vereinzelt, gefunden haben“. Sie konnten außerdem feststellen, daß „unter dem Einfluß von Brillantgrün die Trypanosomen die Fähigkeit verlieren, sich durch normale Längsteilung zu vermehren“, daß sie aber später wieder auftreten, mithin also „gegenüber der Wirkung des Medikamentes, daß ihre normalen Formen vernichtet, ein Mittel finden müssen, die Art zu erhalten“. Im Hinblick hierauf geben sie der Vermutung Ausdruck, daß dem erwähnten „zystenartigen Gebilde“ bei dem Vorgang des Verschwindens und Wiederauftretens der Trypanosomen „vielleicht eine Bedeutung zur Erhaltung der Art unter ungünstigen Verhältnissen zuzuschreiben sei“. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß die Vermutung der genannten Autoren nicht richtig war, daß vielmehr das Auftreten des „zystenartigen Gebildes“ am Hinterende der Trypanosomen ein Anzeichen für die schließlich zum Untergang der Trypanosomen führende Einwirkung des Brillantgrüns war, zumal Wendelstadt und Fellmer im weiteren Verlauf ihrer Untersuchungen auch die oben beschriebenen abgerundeten Trypanosomenformen mit langer freier Geißel, sowie zahlreiche freie Geißeln ohne Protoplasmakörper in ihren Präparaten gefunden haben. Offenbar treten also unter der Einwirkung von Brillantgrün auf Nagana-Trypanosomen im Tierkörper bei den Trypanosomen Veränderungen auf, die mit den von mir unter der Einwirkung von „205 Bayer“ beobachteten eine gewisse Aehnlichkeit zeigen.

Von Mayer und Zeiss, welche auch über ausgezeichnete Erfolge mit „205 Bayer“ bei verschiedenen Trypanosomeninfektionen berichtet haben¹⁾, wurde die Wirkung des Mittels auf die Trypanosomen ebenfalls mikroskopisch verfolgt. Sie geben an, daß nach ihren Beobachtungen die Wirkung des Mittels auf die Trypanosomen im Tierkörper hauptsächlich in einer Beeinflussung der Teilungsvorgänge besteht, indem die Trypanosomen die Fähigkeit der körperlichen Trennung bei der Teilung verlieren, so daß sich bei der mikroskopischen Beobachtung im geeigneten Zeitpunkt fast nur unvollendete Teilungsformen im sogen. „Zwillings“- bzw. „Drillings“-Stadium finden, bei denen eine körperliche Trennung später ausbleibt. Dagegen haben diese Autoren im Reagenzglas, abgesehen davon, daß die Trypanosomen unbeweglich wurden, eine schädigende Wirkung des „205 Bayer“ auf Trypanosomen nicht beobachtet. Vermutlich liegt das an der von ihnen angewandten anderen Technik und der kürzeren Beobachtungszeit, da bei der von mir angewandten Versuchsanordnung die geschilderten morphologischen Veränderungen sowohl im frischen, wie im gefärbten Präparat regelmäßig deutlich sichtbar wurden. Auch Mießner und Berge geben in einer kürzlich erschienenen Arbeit²⁾ an, daß im Reagenzglas „schon 1 Proz. Bayer-Lösungen die Trypanosomen nach Verlauf von 1 Std. zu schädigen vermögen“, wobei allerdings nähere Mitteilungen über bestimmte morphologische Veränderungen an den Trypanosomen nicht gemacht werden.

1) Mayer und Zeiss, Versuche mit einem neuen Trypanosomenheilmittel („Bayer 205“) bei menschen- und tierpathogenen Trypanosomen. (Arch. f. Schiff- u. Trop.-Hyg. Bd. 24. 1920. S. 257—294.)

2) Mießner und Berge, Chemotherapeutische Versuche mit „Bayer 205“ bei Beschälseuche. (Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1921. No. 11 v. 12. 3. 1921.)

*Nachdruck verboten.***Einiges über Zysten der Entamoeba coli.**Von Prof. **Walther Fischer** in Göttingen.

Ich möchte hier ein paar Beobachtungen mitteilen, die an Amöbenzysten aus dem Stuhl einer 38-jähr. Frau gemacht worden sind¹⁾. Diese Frau litt seit etwa $\frac{1}{2}$ Jahre an immer wiederkehrenden, schweren Durchfällen; Blut war im Stuhl mit bloßem Auge nie zu erkennen. Die bakteriologische Untersuchung auf Ruhrbazillen, Typhus u. ä. ergab negatives Resultat; dagegen wurden bei mikroskopischer Untersuchung außer Schleim und Blut Flagellaten und ferner in großer Anzahl vegetative Amöben gefunden. Ich selbst habe mehrere frische Proben dieses Stuhles untersuchen können, und darin noch bewegliche, vegetative Amöben, späterhin solche gleichzeitig mit Zysten, und späterhin nur noch Zysten gefunden. Morphologisch waren diese Amöben als Exemplare der Gattung *Entamoeba coli* zu bezeichnen; wenn das auch bei vegetativen Formen sehr schwer mit Sicherheit zu sagen ist, so sprachen doch die Befunde an den Zysten zwingend für diese Klassifizierung. Ich will hier dahingestellt sein lassen, ob man diese gefundenen Amöben in ätiologische Beziehung zu den bestehenden Darmbeschwerden bringen kann; nach den klinischen Befunden wäre das recht wohl möglich. Diese Frage ist in einer Dissertation von Frl. Grunewald (Göttingen 1921) näher behandelt.

Von diesem Falle habe ich nun mehrere Stuhlproben, von verschiedenen Tagen, untersuchen können, und anfangs immer sehr reichlich Zysten darin gefunden. Später ist eine chirurgische Operation bei der Patientin vorgenommen worden (Appendikostomie), als alle Mittel interner Behandlung versagten, und daraufhin ist dann Genesung eingetreten; ich habe den Stuhl dann noch 2mal mikroskopisch untersucht und keine Zysten mehr darin gefunden.

1) Größe der Zysten. Die Proben wurden alle frisch in Kochsalz- oder Ringer-Lösung mit Zusatz von Lugolscher Lösung untersucht; die Zysten erscheinen dabei leicht gelblich-braun, und ihre Kerne treten aufs schärfste hervor.

Die Auszählung von 400 Zysten hat ergeben:

14,4—16 μ , fast 2 Proz.	20,8—22,4 μ , 16 Proz.
16—17,6 " 12,5 "	22,4—24 " 4,5 "
17,6—19,2 " fast 30 "	über 24 " 0,6 "
19,2—20,8 " " 34 "	

Am häufigsten waren also Werte zwischen 19 und 21, fast ebenso häufig solche von 17,5—19; dann folgen Werte um 21 und dann solche um 16—17,6 μ . Der Durchschnittswert liegt ungefähr bei 19 μ .

Diese Werte ergaben sich, wie erwähnt, aus der Zählung von 400 Zysten. Die Werte, die jeweils bei der Durchzählung von Proben an verschiedenen Tagen und nach längerer Aufbewahrung des Stuhls gefunden wurden, stimmen damit aufs beste überein; so betrug z. B. der Durchschnittswert bei Untersuchung ein und derselben Probe nach 1, 2,

1) Der Fall wurde im Landkrankenhaus in Cassel von Herrn Prof. Rosenblath behandelt; ihm und Frl. Grunewald habe ich für Ueberlassung des Materials und der klinischen Daten verbindlichst zu danken.

3, 7, 9, 10 und 13 Tagen: 19,0, 19,2, 18,4, 19,4, 18,0, 19,4 und 19 μ . Der kleinste überhaupt gefundene Wert ist 14,4 μ , der größte 27,2 μ .

Diese Messungen haben Bedeutung, weil sie unter Umständen leicht eine Unterscheidung der Zysten der *Entamoeba coli* von denen der *Ruhramöbe* ermöglichen. Bei der *Ruhramöbe* finden wir Zysten zwar auch in der Größe zwischen 10 und 20 μ , aber nie über 20 μ — darin stimme ich vollkommen den Angaben Dobells zu. Der Durchschnittswert liegt bei den Zysten der *Ruhramöbe* um 12 μ ; Werte über 15 μ sind etwas ganz Ungewöhnliches, dagegen Werte unter 10 μ nicht so selten. Man glaubte früher, daß auch bei der *Entamoeba coli* solch kleine Zysten vorkommen, aber neuere Untersuchungen lehren, daß dem nicht so ist, und daß die kleinen, früher der *Entamoeba coli* zugeschriebenen Zysten einer anderen Gattung, der *Endolimax nana*, zuzurechnen sind (siehe darüber Näheres in einem Aufsatz im Centralbl. f. Pathol. Bd. 31. 1921. Nr. 14.).

Die genauere Feststellung der Größenverhältnisse dieser Zysten hat aber auch noch in anderer Hinsicht ein gewisses Interesse. Nach Mathews existieren nämlich verschiedene Rassen von *Entamoeba coli* (ähnlich, wie auch für die *Ruhramöbe* verschiedene Rassen angenommen werden), und zwar sollen die Durchschnittswerte für deren Zysten sein: 15 μ , 18,7 μ , 21,7 μ , und wahrscheinlich auch 16,5 μ . Dobell ist der Ansicht, daß wohl noch mehr verschiedene Rassen zu unterscheiden seien. Wenn die Autoren zu diesem Schluß gelangen, offenbar, weil bei Untersuchung verschiedener Fälle sich die eben angegebenen Werte am häufigsten finden, so ist es doch recht eigentümlich, daß wir bei Untersuchung der Zysten nur eines Falles zu ganz ähnlichen Resultaten gelangt sind. Nun wäre es aber doch verwunderlich, wenn wir annehmen wollten, es liege bei unserem Falle Infektion mit verschiedenen Rassen von *Entamoeba coli* vor. Sehr ähnlich wie unsere Befunde sind auch die von Kuenen und Swellengrebel mitgeteilten; aus der von ihnen mitgeteilten Kurve ergibt sich, daß die Zystengröße am häufigsten (je etwa 21 Proz.) 18 und 20 μ war, dann folgt an Häufigkeit der Wert von 19, dann der von 16 μ . Wahrscheinlich beziehen sich diese Angaben auch nur auf einen Fall (die Autoren haben insgesamt nur 3 Fälle von Infektion mit *Entamoeba coli* verzeichnet). Sollte sich in künftigen Untersuchungen ergeben, daß in jedem einzelnen Falle die Größenverhältnisse der Zysten ähnlich sind wie in unserem, so würde das doch gegen die Annahme verschiedener Rassen sprechen.

2) Die Zahl der Kerne in den Zysten. Hier ist nur zu bemerken, daß in den ersten untersuchten Stühlen, zu der Zeit, als sich auch noch vegetative Formen fanden, auch 1-, 2- und 8-kernige Zysten fanden, ferner aber auch ein paar 4-kernige. Diese trifft man bei der *Entamoeba coli* eigentlich recht selten (im Gegensatz zur *Ruhramöbe*), und das hat eine gewisse differentialdiagnostische Bedeutung: denn bei diesem Befund kann man vorsichtigerweise eine Mischinfektion (*Entamoeba coli* und *Ruhramöbe*) nicht ausschließen. In den späteren Proben war der Befund nun allerdings ganz anders: 4-kernige Zysten wurden unter mehreren hundert Zysten nur 1mal gefunden. War die Probe einmal ein paar Tage alt, so wurden nur noch 8-kernige Zysten angetroffen, und nur ausnahmsweise solche mit 6 Kernen; einmal eine 5-kernige, 2mal Zysten mit mehr als 8 Kernen, nämlich 1 mit 12 Kernen, 22:24 μ groß, und 1 mit 14 Kernen, 24 μ groß.

Ueber die Größe der Kerne in den Zysten ist zu sagen, daß sie

gewöhnlich zwischen 3 und 4 μ lag; der größte Durchmesser, der gefunden wurde, war 5,4 μ , nämlich in einer 8-kernigen Zyste von 17,6 μ .

3) Ueber die Form der Zysten ist nicht viel zu sagen. Der Regel nach sind die Zysten ziemlich genau kreisrund, manchmal ein wenig oval; doch übertrifft nur selten der längere Durchmesser den kürzeren um mehr als 2 μ . Bisweilen wurden — zumal in altem Material — auch wesentlich unregelmäßigere Formen der Zysten beobachtet; nicht so ganz selten auch, daß eine Zyste wie eingedrückt erschien.

4) Es interessierte, zu erfahren, ob sich die Zysten bei längerer Aufbewahrung des Stuhles verändern oder vermindern würden. Es wurden verschiedene Proben in kleinen Glasröhren (ohne Zusatz von irgendwelchem Desinfiziens) aufbewahrt, und diese mehr oder weniger fest zugekorkt. In 2 Proben mit dickbreiigem Stuhl wurden Zysten bei jeder Untersuchung in Menge vorgefunden, und es ergab sich weder nach Zahl der Zysten, nach ihrer Größe und Form, nach der Zahl und dem Verhalten ihrer Kerne nach längerer Aufbewahrung ein Unterschied. Nach 114 Tagen war der Befund ganz gleich wie zu Anfang. In einer anderen Probe war das Material gegen Austrocknung nicht so geschützt, da der Kork nur lose aufgesetzt war; der Stuhl trocknete allmählich völlig ein und es entwickelte sich eine Menge von Schimmel. Trotzdem war auch hier, sogar nach 114 Tagen, der Befund noch ganz wie zu Anfang, und keinerlei Verminderung der Zysten festzustellen. Nur in einer 4. Probe verhielt es sich anders: Bis zum 20. und 30. Tag waren Zysten immer noch wie zu Anfang zu finden; dann trocknete das Material ein und verschimmelte, und vom 50. Tag ab waren nun trotz genauester, wiederholter Untersuchung keine Zysten mehr zu entdecken.

Auf Zusatz von verdünnter Eosinlösung färbten sich die Zysten auch in den alten Proben niemals rosa; ebensowenig färbten sie sich mit Neutralrotlösung. Wir sehen also, daß, trotz langer Aufbewahrung des Stuhles und trotz Austrocknung, die Zysten nicht zugrunde gegangen sind, sondern sich noch in ziemlich gleicher Menge wie zu Anfang nachweisen lassen; daß in ihrer Form auch gar keine wesentlichen Aenderungen eingetreten sind. Und ferner wäre aus dem Verhalten gegenüber Eosin und Neutralrot (nach Kuenen-Swellengrebel, und Yoshida) zu schließen, daß die Zysten noch nicht abgestorben sind, denn tote Zysten sollen diese Farbstoffe aufnehmen. Eine biologische Probe, durch Verimpfung auf Tiere, konnte ich leider nicht vornehmen.

Die Coli-Zysten wären also gegen Austrocknung doch recht widerstandsfähig, viel mehr als die Ruhramöbenzysten, nach den Versuchen von Kuenen-Swellengrebel zu schließen. Nur bei der 1. Probe sind die vorher reichlich vorhandenen Zysten späterhin offenbar zugrunde gegangen. Sicher sind also nicht alle Zysten so sehr widerstandsfähig. Dafür haben wir auch noch andere Anhaltspunkte: Wir sahen nämlich bisweilen an den Zysten gewisse Veränderungen an den Kernen, die vermutlich als degenerative zu deuten waren: nämlich unregelmäßige, große Kernbildungen, die offenbar durch Verschmelzen mehrerer Kerne entstanden waren. Bisweilen sah man auch 2 ganz ungleich große Kerne aneinander hängend; und dann manchmal starkes Hervortreten von Chromatingranulis an der Peripherie der Kerne. Daß etwas eckige Kernformen nicht so ganz selten gesehen wurden, sei erwähnt; aber das kann man auch in ganz frischem Stuhl finden. Dann fiel noch auf, daß manchmal die Kerne auffallend dicht gedrängt zusammenlagen, und zwar im Zentrum der Zyste, nicht, wie normalerweise, ziemlich regelmäßig über die ganze Zyste verstreut.

Diese abweichenden Befunde an Kernen sind unserer Ansicht nach sicher mindestens teilweise degenerative Veränderungen; denn sie wurden in den älteren Proben (ab 7. Tag) viel häufiger gesehen, als in den frischen, und besonders auch in der Probe, in der später die Zysten überhaupt verschwanden. Ich glaube, es wird sich lohnen, diesen Dingen etwas mehr nachzugehen. Vor allem deshalb, weil von mancher Seite Teilungsvorgänge an den Kernen von Coli-Zysten beschrieben worden sind, die ganz ähnlich sind; vor allem auch sind Prozesse von Autogamie beschrieben worden, deren Deutung doch nicht so ganz sicher erscheint. In einer neuesten Arbeit von Yoshida sind zum Beispiel auch derartige Autogamievorgänge beschrieben und abgebildet, die mir keineswegs sichergestellt erscheinen; mindestens muß man degenerative Prozesse auch in Betracht ziehen. Damit soll keineswegs gesagt sein, daß die hier beschriebenen Veränderungen unbedingt alle als degenerative aufgefaßt werden müßten; ich will nur sagen, daß es sich dabei sehr wahrscheinlich um solche handelt. Und man hat früher überhaupt die Möglichkeit degenerativer Veränderungen an Amöben und ihren Zysten viel zu wenig beachtet; das hat dann vielfach zu ganz falschen Folgerungen geführt, zumal über Fortpflanzung und Teilung von Amöben. In dieser Hinsicht wird man sicher der scharfen Kritik Dobells in seinem Buche: „The amoebae living in man“ beistimmen können, so wenig man auch mit seinen Ausfällen vor allem gegen Schaudinn sich einverstanden erklären kann.

Zusammenfassung.

Die Messung von Zysten der *Entamoeba coli*, aus dem Stuhl einer Patientin mit chronischer rezidivierender Diarrhöe, ergab als häufigste Größe 19,2—20,8 μ , dann 17,6—19,2, dann 20,8—22,4 und 16—17,6 μ . Größere und kleinere Werte nur selten. In den meisten Stuhlproben waren die Zysten auch nach langer Aufbewahrung (114 Tage), sogar trotz Austrocknung und Verschimmelung des Kotes, noch unverändert nachweisbar. Bisweilen wurden allerdings gewisse Veränderungen zumal an den Kernen gefunden, die als degenerative gedeutet werden.

Literatur.

Brug, S. L., De parasitaire Protozoen van den menschelijken darm. Batavia 1918. — Dobell, The Amoeba living in man. London 1919. — Fischer, W., Vortrag auf d. Naturforscherversamml. in Nauheim 1920. (Ref. Centralbl. f. Pathol. 1920. S. 171.) — Grunewald, El., Entamoeba coli als mutmaßlicher Krankheitserreger. [Inaug.-Diss.] Göttingen 1921. — Kuenen u. Swellengrebel, Die Entamöben des Menschen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71. 1913.) — Mathews, zit. bei Dobell. — Mayer, M., Klinische, morphologische und experimentelle Beobachtungen bei Amöbenerkrankungen. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1919.) — Yoshida, K., Journ. of exper. Med. Vol. 32. 1920.

Nachdruck verboten.

Wirkung von Bakteriengiften auf Ziliaten.

[Aus dem Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. W. Kolle).]

Von Dr. Rud. Oehler, Frankfurt a. M.

Es ist bekannt, wie in Heu- und Blätteraufgüssen die verschiedenen Arten der Aufgußeinzeller schubweise auftreten und verschwinden. Ge-

wiß mit Recht hat man als bestimmend hierfür die Sauerstoffzehrung der Bakterien und den Grad der Alkali- und Säurebildung im Aufguß angesehen. Einzelversuche hierüber sind nur möglich mit gereinigten Ziliatenzuchten, die neben einer Ziliatenspezies nur eine reine Bakterienart als Bewohner enthalten.

Mir stehen zurzeit 3 heterotriche Ziliartensorten zur Verfügung: 1) *Colpidium colpoda*, 2) *Colpoda Steini* und 3) *Colpoda cucullus*, welchen ich nach Wahl eine gewünschte Bakterienart in Reinkultur begeben kann. *Colpidium colpoda* ist schlank, 50—70 μ groß. Von ihm kennt man keine Zysten. *Colpoda Steini* ist klein, 20—35 μ groß, gerundet. *Colpoda cucullus* ist ebenfalls rundlich, mit einer Mundeinbuchtung an einer Seite. Seine Größe beträgt 80 bis 110 μ . Beide *Colpoda*-Arten bilden Zysten und sind durch Wasser aus der Zystenform leicht zur Ziliatenform zu erwecken.

Ueber die Gewinnung der gereinigten Ziliatenzuchten sei folgendes berichtet:

Die Zucht von *Colpoda Steini* ist nun schon 4 Jahre alt. Sie wurde auf Agarplatten gewonnen, die mit Bakterien in Reinkultur vorbeschickt waren. Es gelang, eine Zucht mit reinen lebenden Colibakterien zu gewinnen, schließlich auch eine Zucht, die nur getötete Bakterien enthielt, die also bakteriensteril war¹⁾. Von dieser Sterilzucht wurden die Ziliaten *Colpoda Steini* einfach in Wasser oder verdünnte Bouillon übergeführt und als Reinkultur eine kleine Oese Bakterienmasse von *B. coli* oder Heubazillus oder Diphtheriebazillen St. 5²⁾ zugegeben. Die angehenden Röhrchen enthielten nun *Colpoda Steini* + *B. coli*, + Heubazillus, + Diphtheriebazillen, alle in Reinkultur und unvermischt mit fremden Beigaben, wie Probeimpfungen auf Schrägagarröhrchen erwiesen.

Die Zucht von *Colpidium colpoda* wurde durch Verdrängung der Wildbakterien im Röhrchen gewonnen. Eine Sterilkultur konnte nicht erreicht werden. Doch gelang es, die Bakterien der rohen, ungereinigten Zucht durch den Heubazillus zu verdrängen. Von dieser Zucht wurden Ansätze auf verdünnte Bouillon übertragen.

In gezuckerten Lösungen gelang es, den Heubazillus durch *B. coli* zu verdrängen. Bouillonansätze mit *Colpidium colpoda* + *B. coli* konnten dann gemacht werden.

Durch Hefe in gezuckerter Lösung konnte ebenfalls der Heubazillus verdrängt werden und durch Aufnahme der Ziliaten in Wasserröhrchen + Diphtheriebakterien St. 5 ab Agar wurden Zuchten gewonnen, die *Colpidium colpoda* + Hefe + Diphtheriebakterien enthielten. Fortgesetzte Uebertragung auf Folgeröhrchen von Wasser + *B. diphtheriae* St. 5 gaben nach 5—6 Uebertragungen schließlich reine Zucht von *Colpidium colpoda* + *Bact. diphtheriae*.

Die gereinigte Zucht von *Colpoda cucullus* wurde im Sommer 1920 gewonnen; und zwar nach einem anderen, bisher nicht beschriebenen Verfahren. Weder das Plattenverfahren, noch der Versuch, die Begleitbakterien der ungereinigten Zucht durch Nahrungsansätze zu verdrängen, gelang. Dagegen bot die Zystenbildung Gelegenheit zur Reinigung. *Colpoda cucullus* bildet Zysten, wenn die Nahrung knapp wird.

1) Vgl. hierüber Oehler, Gereinigte Ciliatenzucht. (Arch. f. Protistenk. Bd. 36. 1916. S. 175; ferner Bd. 40. S. 16 und Bd. 41. 1920. S. 34.)

2) Das ist der bekannte amerikanische Stamm, der als besonders starker Giftbildner in den Anstalten gehalten wird.

Diese vertragen in getrocknetem Zustande Erhitzung auf 45° bis zu 8 Tage, ein Eingriff, den die Wasserbakterien, welche *Colpoda cucullus* gewöhnlich begleiten, nicht aushalten. Werden die Zysten-besetzten Röhrrchen trocken gelegt, dann erhitzt und nach der Erhitzung wieder mit sterilem Wasser beschickt, so schlüpfen die Ziliaten aus den Zysten aus und können steril abgehoben werden. Ich übertrug sie in Wasser + *Saccharomyces exiguus*, eine Hefe, die *Colpoda cucullus* aufnimmt und verdaut. Solche Röhrrchen von Wasser + *Saccharomyces exiguus* + *Colpoda cucullus* gedeihen gut und bleiben wohl 8—12 Tage belebt. Erfolgt dann Zystenbildung, so kann man das Röhrrchen trocken legen. In diesem Zustand lassen sich die Zysten monatelang aufheben. Bei Bedarf werden sie durch Wasserzusatz frisch belebt und mit *Saccharomyces exiguus* aus Agar gefüttert. Arbeitet man sauber, so bleiben alle Fremdbakterien fern und man erhält eine Zucht von *Colpoda cucullus*, die keine Bakterien, sondern nur die Hefe *Saccharomyces exiguus* enthält.

Wünscht man, statt der Hefe ein Bakterium als Begleiter und Ernährer der Ciliaten einzuführen, so wird ein Wasserröhrrchen mit einer Oese Bakterienmasse gewünschter Art beschickt, dazu kommen einige Ziliaten ab der Zucht + *Saccharomyces*. Das 1. Röhrrchen enthält nun *Colpoda cucullus* + das neue Zusatzbakterium + etwas *Saccharomyces exiguus*. Fortübertragung auf Folgeröhrrchen von Wasser + das neue Zuchtbakterium führt nach 4—6—8 Uebertragungen zur gesäuberten Zucht, die frei von Hefe ist und nur das neue Zuchtbakterium als Begleiter und Ernährer der Ziliaten enthält. So wurden die 3 Zuchten von *Colpoda cucullus* + *B. coli*, + *Heubazillus* und + *B. diphtheriae* St. 5 gewonnen. Sie wurden, gleich den vorerwähnten Ansätzen, auf Röhrrchen mit reiner und verdünnter Bouillon übertragen.

Einheitlich ist nun zu sagen, daß alle 3 Ziliaten, *Colpoda Steini*, *Colpoda cucullus* und *Colpidium colpoda* anfangs in den reinen Bouillonansätzen nicht recht angehen wollten. Bouillonverdünnungen von $\frac{1}{100}$ oder $\frac{1}{10}$ machten keine Schwierigkeiten. In den stärkeren Nährlösungen $\frac{1}{8}$ Bouillon, $\frac{2}{8}$ Bouillon und reiner Bouillon kamen die Heubazillen und *B. coli* zu starker Entwicklung. Von den Ansätzen mit Diphtheriebazillen, wo diese Bakterienwucherung nicht so bedeutend auftritt, sei später berichtet. Die Bouillonröhrrchen + *B. coli* oder Heubazillus + den Ziliaten trübten sich; die Ziliaten *Colpoda cucullus* gingen gar nicht, *Colpoda Steini* wenig an und auch *Colpidium colpoda* versagte gelegentlich. Offenbar war die Salzspannung in der Bouillon zu stark und vor allem der Sauerstoffmangel in den Röhrrchen mit *B. coli* und Heubazillus zu drückend. Am empfindlichsten war *Colpoda cucullus*; merklich fester war *Colpoda Steini*; am zähesten erwies sich *Colpidium colpoda*. Von diesem konnten Bouillonröhrrchen + *B. coli* oder + Heubazillus angesetzt werden, die 10 bis 20 Tage belebt blieben. *Colpoda Steini* gedieh erst in Röhrrchen von $\frac{2}{8}$ — $\frac{1}{8}$ Bouillon. *Colpoda cucullus* ging erst bei Bouillonverdünnungen von $\frac{1}{10}$ an. Die Bakterienwucherung in all diesen Ansätzen, auch bei Verdünnung auf $\frac{1}{10}$ Bouillon, ist stark. Die Flüssigkeiten sind getrübt und flockig, später übelriechend. Die Ziliaten in diesen Ansätzen waren nur bei *Colpidium colpoda* reichlich; sonst spärlich oder mäßig zahlreich. Immer weniger wie in den stärkeren Verdünnungen von $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{100}$, welche die stärkste Hochentwicklung der Ziliaten zeitigen. Es ist immerhin erstaunlich, daß Ziliaten in den stark

getrübten, gar stinkenden Bouillonröhrchen neben den Colibakterien und Heubazillen überhaupt leben können. Ihr Sauerstoffbedürfnis ist offenbar recht gering. Das zeigt sich auch, wenn man Zuchtröhrchen unter der Luftpumpe auspumpt und zuschmilzt. Alle 3 Ziliatensorten unserer Versuche bleiben 2—6 Tage im luftverdünnten Raum bei einem Luftdrucke von 20 mm Hg am Leben. *Colpoda cucullus* ist am empfindlichsten. Sie halten 24—48 Std., gehen dann in Zystenbildung über und verschwinden. *Colpoda Steini* dauert etwas länger aus, enzystiert sich aber auch nach 2—3 Tagen. *Colpidium colpoda*, welches keine Zysten bildet, wird im sauerstoffarmen Raum körnchenarm und licht in der Zellmasse. Abkuglung, Erstarrung und Zerfall beenden den Vorgang nach 4—6 Tagen. Es geht also die Wachstumsfähigkeit in sehr bakterienreichen Nährflüssigkeiten parallel mit der Ausdauer im sauerstoffarmen Raume. *Colpoda cucullus* verschwindet unter der Luftpumpe schon nach 24 Std. Es geht erst in $\frac{1}{10}$ verdünnter Bouillon neben *B. coli* oder Heubazillus an. *Colpoda Steini* ist ausdauernder unter der Luftpumpe und verträgt stärkere Bouillonansätze. *Colpidium colpoda* ist am ausdauerndsten.

Alle angegangenen Ziliatenzuchten verfallen nach gewisser Zeit. Die Ansätze in unverdünnter Bouillon natürlich rascher als die in dünnen Nährflüssigkeiten.

Das empfindliche *Colpoda cucullus* hält sich in $\frac{1}{10}$ Bouillon + *B. coli* oder + Heubazillus etwa 6—8 Tage. Dann tritt Zystenbildung ein.

Auch *Colpoda Steini* verschwindet in $\frac{1}{3}$ Bouillon + *B. coli* oder + Heubazillus nach etwa 10 Tagen. Manchmal findet man gegen Ende gequollene, von Vakuolen durchsetzte Ziliaten.

Viel deutlicher sind diese Zellveränderungen bei *Colpidium colpoda* zu beobachten. Die Zuchten von *B. coli* und Heubazillus in reiner Bouillon + *Colpidium colpoda* sind reichlich bewachsen und halten sich so etwa 10—18 Tage. Die Tiere sind groß und stark. Sie zeigen reichlich gefüllte Nahrungsvakuolen und im Endoplasma, besonders am Vorderende, eine Ansammlung von stark lichtbrechenden, ziemlich groben, 2—5 μ großen Körnern.

Vom 10. Tag ab treten mehrfach lichte, mit Flüssigkeit gefüllte Vakuolen auf. Später werden die Tiere dick und rundlich, so blähen die lichten Vakuolen den Leib auf. Gegen Ende wird die Bewegung träge und sturzartig, von einem Tag auf den anderen sind alle Ziliaten verschwunden. Offenbar zerreißen die Vakuolen die Leibeshülle, was Tod und Auflösung herbeiführt.

Noch rascher und ausgesprochener ist dieser Verfall, wenn statt Bouillon $\frac{1}{10}$ Peptonlösung oder $\frac{1}{10}$ Serumeiweiß als Zuchtflüssigkeit verwendet wird. Die Flüssigkeiten sind alle stark getrübt, stinken deutlich und reagieren alkalisch. Heubazillus und *B. coli* geben ohne Unterschied dieselben Erscheinungen.

Nachbeimpfung abgängiger Röhrchen mit frischen Ziliaten geht nicht an. Auch nicht, wenn die alkalische Reaktion neutralisiert wird. Die Vakuolenbildung hängt wohl zum Teil mit der alkalischen Reaktion zusammen. Sie ist stärker in den stark alkalisch werdenden Ansätzen von $\frac{1}{10}$ Pepton und $\frac{1}{10}$ Serumeiweiß. Bokorny¹⁾ konnte bei *Paramaecium* durch Ammoniakzusatz $\frac{1}{10\ 000}$ reichlich Vakuolenbildung in

1) Pflügers Arch. Bd. 59. 1895. S. 557.

der Leibesmasse hervorrufen. Bei *Colpidium colpoda* gelang mir dies nur unvollkommen. Die vakuoläre Entartung kommt offenbar leichter zustande, wenn die Alkaleszenz ganz langsam steigt. Sie ist auch keineswegs der alleinige Grund für das Absterben der Ziliaten. Man kann Bouillon- und Peptonröhrchen, deren Ziliaten dem Verfall entgegengehen, neutralisieren, ohne daß das Eingehen der Ziliaten dadurch verhindert wird. Welcher der vielen Stoffe, die von *B. coli* und den Heubazillen in den Nährlösungen gebildet werden, das Eingehen der Ziliaten veranlaßt, ist schwer zu sagen. Die Akalibiidung allein ist es jedenfalls nicht.

Stärker verdünnte Nährlösungen zeigen den Verfall der Ziliaten weniger ausgesprochen. Sie bleiben viele Wochen reichlich belebt, vermindern sich dann nach und nach. Zellveränderungen bei stark verdünnten Nährlösungen fehlen oder sind nur angedeutet. In Asparaginlösung gibt es keine Zellveränderungen, kein sturzartiges Absterben. In starken Lösungen $\frac{1}{100}$ gehen die Ziliaten nicht an. In $\frac{1}{1000}$ Asparagin + *B. coli* oder + Heubazillus halten sie sich wochenlang unverändert.

Es folgen nun die Versuche mit Diphtheriebakterien und deren Einwirkung auf die Ziliaten. Zunächst seien die Abtötungsversuche mit fertigem Diphtheriegift erwähnt:

Das Diphtheriegift ist offenbar ein ausgesprochenes Warmblütergift. Auf die Zellen des Frosches wirkt es nur, wenn der Frosch bei Warmblütertemperatur gehalten wird. Immerhin war es geboten, auch die Wirkung auf frei lebende Einzeller zu prüfen; und dazu boten die rein gezüchteten Ziliaten Gelegenheit.

Wenn man eine gereinigte Ziliatenzucht mit Diphtheriegift versetzt, kann man nach 24 Std. finden, daß bei Zugabe einer beträchtlichen Menge Gift die Ziliaten abgetötet werden. Am raschesten *Colpoda cucullus*, weniger rasch *Colpidium colpoda*; am längsten widersteht das kleine *Colpoda Steini*. Man sieht daraus schon, daß von einer ausgezeichneten Starkwirkung des Giftes auf die Infusorienzellen keine Rede sein kann: denn man braucht auf 1 ccm ziliatenhaltige Flüssigkeit fast die gleiche Menge Diphtheriegift¹⁾, um eine Wirkung zu erreichen. Länger als 24 Std. kann man die Giftwirkung nicht verfolgen, weil bei den ungereinigten Zuchten die Begleitbakterien in der bouillonhaltigen Giftflüssigkeit zu wuchern beginnen und das Ergebnis stören. Um die Wirkung des Diphtheriegiftes auf Ziliaten eingehender zu prüfen, braucht man Ziliatenzuchten, die nur Diphtheriebazillen als Nahrung enthalten; bei denen also alle störenden Begleitbakterien ausgeschaltet sind. Das heißt also, statt des Abtötungsversuches mit fertigem Diphtheriegift muß der Zuchtungsversuch in gifthaltiger und giftbildender Bouillon + Diphtheriebakterien herangezogen werden.

Hier zeigen sich einige Schwierigkeiten. Schon wenn man Diphtheriebakterien in Wasser aufschwemmt und dann die Ziliaten *Colpoda Steini*, *Colpoda cucullus* oder *Colpidium colpoda* zugeibt, ist das Wachstum nicht so gut wie bei Fütterung mit *Bact. coli*. Das entspricht einer früher schon gemachten Erfahrung, daß grampositive Bakterien von den Ziliaten schlechter verdaut werden wie gramnegative. Die Schwierigkeit steigert sich, wenn statt Wasser $\frac{85}{10000}$ Kochsalzlösung genommen wird. So wollen denn auch die Ziliaten in reiner Bouillon, der Diphtheriebakterien ab Agar beigegeben wurden, nicht recht angehen. Das ist keine Giftwirkung der Diphtheriebakterien,

1) Dessen tödliche Dosis für Meerschweinchen von 250 g bei 0,13 ccm Giftflüssigkeit liegt.

sondern es sind Zuchtschwierigkeiten von der Salzspannung der Bouillon. Dieselben lassen sich aber durch langsam, steigende Eingewöhnung in immer weniger verdünnte Bouillonansätze überwinden. *Colpoda cucullus* allerdings kommt nicht über $\frac{1}{10}$ Bouillon hinaus, ist also für diese Versuche nicht verwendbar. *Colpoda Steini* und *Colpidium colpoda* hingegen können durch beharrliche Eingewöhnung dazu gebracht werden, daß sie in unverdünnter Bouillon, der Diphtheriebakterien ab Agar zugegeben wurden, angehen und gedeihen. Diese angegangenen Zuchten halten sich wochenlang belebt und können auf Folgeröhrchen fortgeführt werden. Eine Giftwirkung kommt bei Zimmertemperatur nicht zustande. Erhöhung der Zuchttemperatur ist untunlich, da die Ziliaten bei 30° bis 32° schon eingehen. Dagegen ist es möglich, Bouillonröhrchen, mit Diphtheriebakterien beschickt, im Brutschrank zu halten, so daß daselbst Gift gebildet wird und diese Röhrchen nach gegebener Zeit mit Ziliaten zu beimpfen.

Colpoda Steini, welches schon im Vergiftungsversuch gegen Diphtheriegift sehr unempfindlich war, kann auch in allen, stark gifthaltigen Ansätzen von Bouillon + Diphtheriebakterien zum Wachsen gebracht werden. Bouillonröhrchen, die mit Diphtheriebakterien St. 5 beimpft waren und bei gutem Oberflächenwachstum der Bakterien 10 bis 20 Tage im Brutschrank gestanden hatten, züchteten, mit *Colpoda Steini* beschickt diese Ziliaten so gut wie frische Bouillon + Diphtheriebakterien ab Agar. Hier ist somit eine Giftwirkung auf die Ziliaten überhaupt nicht nachzuweisen.

Nicht ganz so einfach lagen die Dinge bei *Colpidium colpoda*: Hier gingen Röhrchen mit frischer Bouillon + Diphtheriebakterien ab Agar + *Colpidium colpoda* an und hielten sich 20–30 Tage lang. Röhrchen mit langbebrüteter Bouillon + Diphtheriebazillen gingen nicht an. Röhrchen mit Bouillon + Diphtheriebakterien, die nur 1–2 Tage giftbildend im Brutschrank gestanden hatten, gingen leichter an als solche, die 10–20 Tage bebrütet waren. Es ist also in altbebrüteten Diphtheriebouillonröhrchen eine Wachstumshemmung der Ziliaten *Colpidium colpoda* zu bemerken. Fragt sich nur, ob dieselbe auf das Diphtherietoxin bezogen werden darf. Das Diphtheriegift ist kenntlich an seiner Wirkung auf Warmblüter und an der Neutralisierung durch das Diphtherieheilserum. Es wurden Ansätze gemacht, welche neben der altbebrüteten Diphtheriebouillon noch steigende Gaben von Heilserum enthielten. Die Ziliaten entwickelten sich ebensowenig. Das Heilserum hebt die hemmende Wirkung der altbebrüteten Diphtheriebouillon nicht auf.

Die Hemmung kann also nicht auf Rechnung des besonderen Diphtheriegiftes gesetzt werden.

Es ist nicht schwer, andere Gründe zu finden. Allein schon der längere Aufenthalt im Brutschrank bringt eine Eindickung der Bouillon zuwege, welche hemmend auf das Ziliatenwachstum wirkt. Dann erzeugen die Bakterien sonstige Spaltungserzeugnisse, unter anderem auch merkliche Mengen von Alkali. Alles Hemmnisse für das Ziliatenwachstum, Hemmnisse, die durch leichten Wasserzusatz ausgeglichen werden können. Was das Serum in Gaben von $\frac{1}{3}$ nicht vermag, das leistet ein gleicher Zusatz von Wasser.

Wir dürfen also aussprechen: eine Wirkung des besonderen Diphtheriegiftes auf die *Colpidium colpoda* ist nicht nachweisbar.

Dagegen tritt in altbebrüteter Diphtheriebouillon, wenn die Ziliaten darin angehen und längere Zeit darin wachsen, eine Wirkung sonstiger

Bakterienprodukte auf. Die ausgesprochen alkalische Reaktion dieser altbewachsenen Röhren und die sonstigen Spalterzeugnisse des Diphtheriebazillus rufen in den hier gezüchteten Colpidien ähnliche Erscheinungen hervor, wie sie bei Zucht in Bouillon mit Heubazillus oder *B. coli* beobachtet wurden. Die Ziliaten werden nach 14-tägigem guten Gedeihen auch von lichten Vakuolen durchsetzt, quellen auf, werden dick, unförmlich und buckelig, und schließlich, nach 3–4-wöchentl. Bestand zerreißt die Leibeshülle und alles zerfällt. Auch Körnelung der Leibmasse tritt auf; nur ist dieselbe mehr feinkörnig; nicht so grobkörnig wie bei Zuchten mit Bouillon und Heubazillus. Auch erfolgt das Absterben der Ziliaten in alter Diphtheriebazillenbouillon nach und nach; nicht so sturzartig wie bei Zuchten mit *B. coli* oder Heubazillus.

Anschließend an die Abtötungsversuche mit Diphtherietoxin, habe ich auch Tetanustoxin in seiner Wirkung auf *Colpoda Steini*, *C. cucullus* und *Colpidium colpoda* geprüft und erst bei stärkeren Gaben einen Einfluß gefunden, der ebenso mehr auf Bouillonwirkung, weniger auf die besondere Toxinwirkung bezogen werden kann. Dementsprechend war auch das Tetanusheils serum unfähig, die Wirkung aufzuheben.

Zusammenfassend sei gesagt:

Die Ziliaten *Colpoda Steini*, *Colpoda cucullus* und *Colpidium colpoda* lassen sich in reiner Zucht mit *B. coli* und Heu- und Diphtheriebazillus in reiner und in verdünnter Bouillon züchten. Die Zuchten verfallen nach 10–40 Tagen unter Veränderungen, die vornehmlich am Endoplasma auftreten und in Körnelung und Vakuolenbildung bestehen. Die Zuchten mit Diphtheriebakterien weisen Erscheinungen auf, die ganz den Wirkungen anderer, nicht toxischer Bakterien entsprechen. Eine Wirkung des besonderen Diphtherietoxins auf die genannten Ziliaten ist nicht nachweisbar.

Daß es gelingt, diese Ziliaten, die doch aus Tümpeln und Gewässern stammen, in so dicken Nährlösungen wie Bouillon oder $\frac{1}{10}$ Pepton neben den Bakterien zu züchten, ist immerhin bemerkenswert. Es regt das an, dieselben Ziliaten, wenn möglich, noch weiter von ihren natürlichen Lebensbedingungen abzubiegen und Zuchten etwa in Gärungsansätzen oder im Tierkörper zu versuchen.

Nachdruck verboten.

Das Lungen-Distoma, der Schmarotzer wilder, krabbenfangender und -verzehrender Tiere.

I. Mitteilung.

Von Dr. Y. Onji, Hygienisches Institut der Universität Kijushu, Japan.

Der Entwicklungszyklus des Lungen-Distomas war lange in Dunkel gehüllt, bis es endlich im Frühjahr 1915 K. Nakagawa in Formosa gelang, in gewissen Krabbenarten, nämlich *Geothelphusa obtusipes* Stimpson und *Geothelphusa dehaanii* White seinen 2. Zwischenwirt ausfindig zu machen.

Gleich beim Lesen des betreffenden Berichts schienen mir aber die Verhältnisse bei uns etwas anders zu sein als in Formosa. Bei uns wird von den Krabben namentlich *Eriocheir japonicus* de Haan gegessen, nicht aber *Geothelphusa*.

Aus *Eriocheir*, gefangen in den Flüssen Kotō und Ariho, gelang es mir, die Zysten unseres *Distoma* herauszupräparieren, und zwar weniger aus der Leber als aus den Kiemenblättchen, worin sie sehr häufig waren.

Somit war zunächst anzunehmen, daß die Quelle der zerstreuten Paragonimiasisfälle im Gebiete der beiden genannten Flüsse in dieser Krabbenart zu suchen ist.

Bei weiteren Untersuchungen unserer *Distoma*-Zysten bei Krabben frug ich mich bald, wie sich die Verbreitung der *Distoma*-Zysten bei den Krabben zu dem Vorkommen der menschlichen Paragonimiasis verhält. Diese letztere findet sich nämlich auch da, wo die Krabben nicht mit *Distoma*-Zysten behaftet sind, und umgekehrt kommen da, wo die Krabben regelmäßig und stark damit behaftet sind, nicht notwendig Paragonimiasisfälle vor. So z. B. ist *Eriocheir* in Sawae, einer Ortschaft beim Dorfe Misumi, Prov. Otsu, stark damit behaftet, desgleichen in Zuikō, einer Ortschaft beim Dorfe Kosei, Prov. Asa, sowie *Geothelphusa dehaanii* in Kurameki, Prov. Aunō. Trotzdem sind die 3 Ortschaften aber vollkommen frei von menschlicher Paragonimiasis. Vielleicht ist die verschiedene Zubereitungsweise der Krabben zur Speise, wobei die Zysten völlig unschädlich gemacht werden, dort aber nicht, die Ursache.

Viel schwerer ist jedoch die Tatsache zu erklären, daß *Geothelphusa dehaanii* in ungeheuren Mengen dort vorkommt und jedes Stück derselben 10—100 Zysten beherbergt. Am Oberlaufe des Baches leben bloß einige 10 Landleute, und selbst in dem Falle, daß diese Leute alle *Paragonimus*-Träger wären, was aber nicht der Fall war, reichen die von ihnen in den Sputis abgegebenen Eier lange nicht hin, die ungeheure Verbreitung der *Distoma*-Zysten unter den Krabben zu erklären. Auch gelangen die menschlichen Sputa wohl nicht so häufig in das Bachwasser, und im Freien ausgespuckte werden bald so weit eintrocknen, daß die darin enthaltenen Eier ohne weiteres zugrunde gehen. Es müssen daher notwendigerweise außer Menschen noch irgendwelche andere Wirte unseres Wurmes existieren, welche in der Nähe des Baches leben und Krabben fangen und verzehren. Da Vögel wohl nicht in Betracht kommen können, sind eher die wilden Tiere verdächtig.

Nach eifrigem Suchen erhielt ich zunächst 3 Marder, bei denen meine sorgfältigen Sektionen leider bloß einige Exemplare des Pankreas-*Distoma* und 1 *Strongylus*-Art ergaben. Im April 1917 brachte mir dann ein Bauer aus Shimochäya im Dorfe Funaki wieder 1 Marder aus einer Entfernung von etwa 12 km, bloß um mir eine Freude zu machen. Bei der sofort vorgenommenen Sektion bemerkte ich viele gelblich-bräunliche Flecke auf der Pleurafläche, die sich bei mikroskopischer Untersuchung als aus Haufen der gesuchten *Distoma*-Eier bestehend erwiesen. Hierdurch aufgemuntert, suchte ich sorgfältig in den Lungen nach den Muttertieren, von denen ich dann auch ein Exemplar auffand, das ich einige Wochen später auf dem medizinischen Kongreß in Yamaguchi demonstrieren konnte.

Mit dem Herannahen der Jagdzeit beauftragte ich jeden Jäger, den ich erreichen konnte, mir Material zu beschaffen. Im Dezember bekam ich dann 1 Fuchs und im Februar 1918 2 Marderhunde, bei denen ich viele Exemplare des gesuchten Wurmes sammeln konnte.

Somit ist meine Erwartung vollauf erfüllt worden und ich mußte mich wundern, daß dieses *Distoma* so stark unter den Raubtieren verbreitet ist. Bei meinen geringen Kenntnissen der Lebensgewohnheiten der genannten Raubtiere kann ich nicht viel darüber mitteilen, und zwar um so weniger, weil Füchsen und Dachsen viel in unerlaubter Weise nachgestellt wird und die Jäger aus Furcht vor Strafe nicht leicht etwas davon berichteten. Ich muß mich daher auf folgende Tatsachen beschränken:

1. *Mustela melamps* Temm.; Vorkommen: Yamaguchi-Ken, Asa-Gun, Funaki-Mura, Chäya. Geschlecht: Erwachsenes Männchen. Aeußerlich: Hier und da gequetscht, besonders am Kopfe. — Sektionsbefund: In der Pleura- und Peritonealhöhle etwas Flüssigkeit, blutig verfärbt. Gelblich-bräunliche Flecke auf der Pleurafläche, mikroskopisch Haufen unzähliger Eier des Lungen-*Distoma* festgestellt, ein besonders großes und stark gefärbtes am Herzbeutel. In der Lungenoberfläche ein zum Teil freiliegendes, mittelgroßes Muttertier. In der Peritonealhöhle sehr viele kleine, weißliche Punkte, die, mit der Pinzette aufgehoben und auf dem Objektglas leicht mit dem Deckglas gedrückt, sich als junge Würmer von 1—2 mm Länge und noch mit dem Bohrstachel am Mundsaugnapf ausgestattet zeigen. Lungen hyperämisch, hier und da Blutungsherde. Beim Betasten ziemlich viele harte Knoten; mit dem Aufschneiden bloß geronnene Blutmasse mit den Eiern freierwiegend, aber keine Spur von Muttertieren. In dünnen Schnittpräparaten im Lungengewebe: 1) Erweiterung der kleinen Bronchien und 2) geronnene Blutmasse mit unzähligen Eiern. Muttertier leicht gedrückt, 6,5 mm lang und 3,0 mm breit. Mundsaugnapf 0,342 mm l., 0,315 mm br.; Bauchsaugnapf 0,81 mm l., 0,792 mm br. Eierstöcke noch nicht hinreichend entwickelt. Uterus kurz, mit wenigen Eiern von leicht gelblicher Farbe. Die unzähligen Eier in der Pleura und im Lungengewebe können unmöglich von diesem jungen Mütterchen herkommen. Mein Suchen nach reiferen Muttertieren war leider vergeblich. Eier von bekannter Gestalt, Farbe und Deckel, 0,063 mm l. und 0,049 mm br.

II. *Canis japonicus* Gray. Vorkommen: Yamaguchi-Ken, Asa-Gun, Funaki-Mura, Ōno. Geschlecht: Altes Männchen. — Aeußerlich: Wangenverletzung. Sektionsbefund: Auf der Pleura zerstreute, gelbe Flecke. Haufen der Eier unseres *Distoma*. Weder in der Pleura- noch in der Peritonealhöhle Flüssigkeitsansammlung, noch Bluterguß. An den Baucheingeweiden nichts Abnormes. Lungen im allgemeinen blutreich, hier und da elastische Blutpunkte (nach Protokoll von Tierarzt Fujishige). Aus den aufgeschnittenen Knoten kommen die reifen Muttertiere hervor; in den sackartigen Höhlen geronnenes Blut und halbflüssige, blutige Masse mit zahlreichen Eiern.

Muttertiere gut ausgewachsen, lassen sich nicht bequem plattdrücken; in Kaiserling-Mischung konserviert und so etwas geschrumpft und dicker geworden: 6,0 bis 12,0 mm lang, 2,5—8,0 mm breit. Körperorganisation und Eier entsprechen bis ins einzelne der Beschreibung von *Paragonimus westermani* in den Lehrbüchern, weswegen auf die Wiederholung der Beschreibung verzichtet wird.

III. *Nyctereutes procyonoides* Schreg. (japanisch Mamidanuki). Vorkommen: Yamaguchi-Ken, Asa-Gun, Magura-Mura. Geschlecht: Junges Männchen. Aeußerlich: Nichts Besonderes. Sektionsbefund: Peritoneum und Pleura glatt, in beiden Höhlen keine Flüssigkeitsansammlung. Eingeweide anscheinend normal, bis auf die Lungen, welche einige Blutungsherde und Knoten aufweisen. 1 Muttertier.

In den Lungen konnte ich zuerst keinen Wurm finden. Im Darminhalt finden sich bei mikroskopischer Untersuchung die bekannten gedeckelten Eier neben vielen *Ascaris*- und wenigen *Strongylus*-Eiern. Nach langem Suchen in den Lungen endlich ein Muttertier.

IV. *Nyctereutes procyonoides* Schreg. Vorkommen: Wie oben. Geschlecht: Ziemlich altes Weibchen. Aeußerlich: Nichts Besonderes. Sektionsbefund: Blutige Flüssigkeit in der Bauchhöhle, wenige auch in der Pleurahöhle. Zahlreiche Flecke der Eierhaufen. Viele Knoten und Blutungsherde in den hyperämischen Lungen, einige elastische Knoten in der Pleurahöhle; beim Aufschneiden wird ein Muttertier und blutige Flüssigkeit frei sowie zahlreiche Eier. Auf der Leberoberfläche viele rote Streifen. Im Darminhalt zahlreiche Eier des Lungen-*Distoma* und einige von *Strongylus* und *Ascaris*.

V. *Canis japonicus* Gray. Vorkommen: Ōita-Ken, Naouri-Gun, Takeda-Machi-Umgebung. Lungen in Formalin konserviert erhalten, etwas hyperämisch, aber ohne Knoten und Blutung.

VI. *Nyctereutes spec.* Vorkommen: Wie oben. Nur Lungen allein da, konserviert wie oben; keine Knoten und Blutungen.

VII. *Meles spec.* (jap. Hondanuki). Vorkommen: Yamaguchi-Ken, Asa-Gun, Funaki-Mura, Ōno. Geschlecht: Erwachsendes Männchen. Aeußerlich: Hier und da Bißwunden (durch Jagdhunde). Sektionsbefund: Nichts Abnormes in Brust- und Bauchorganen. Lungen mit zerstreuten Blutungen und knotenartigen Infiltrationen, welche aber nicht an die bekannten Herde erinnern. Kein Wurm. Im Darminhalt: Kaki-Kerne und andere pflanzliche Ueberreste, wenige Eier einer *Ascaris*- und *Trichocephalus*-Art.

VIII. *Meles spec.* (jap. Hondanuki). Vorkommen: Wie oben. Geschlecht: Erwachsendes Männchen. Aeußerlich: Gut ernährt, mehrere Bißwunden. Sektionsbefund: In den inneren Organen nichts Abnormes. Darminhalt: Vorwiegend pflanzliche Ueberreste, viele *Ascaris*-, wenig *Trichocephalus*- und mäßig viel *Metagonimus*-Eier.

Zusammenfassung.

Bisher bekannt als Endwirte von *Paragonimus westermani* sind Mensch und von Haustieren Hund, Katze, Schwein, ferner ein lange in der Gefangenschaft (im Tiergarten) gewesener Tiger. Wilde Raubtiere ohne nähere Beziehung zu Menschen wurden m. W. bis jetzt niemals als Endwirte unseres *Distoma* betrachtet.

Tatsächlich sind aber die Nachttiere in Gegenden, wo menschliche Paragonimiasis vorkommt, bis zu 67 Proz. befallen, und zwar besonders Marder, Fuchs und Marderhund, hier vermutlich bis zu 100 Proz. Meine Fälle sind selbstverständlich nicht zahlreich genug; aber sie einfach als zufällig hinzustellen, dünkt mich etwas zu viel. Die Tatsache, daß die Hondanuki nicht befallen sind, ist wohl begründet in der Lebensgewohnheit dieser Tiere, welche vorwiegend von pflanzlicher Nahrung leben. Sicherlich ist unser Wurm sehr weit und stark unter den Raubtieren verbreitet.

Die zweiten Zwischenwirte unseres Wurmes sind bekanntlich Krabbenarten, von denen bis jetzt 7 als solche sichergestellt worden sind, von denen bei uns 2 Arten vorkommen: 1) *Geothelphusa dehaanii* und 2) *Eriocheir japonicus* de Haan.

Zu den wilden, krabbenverzehrenden Tieren gehören von Fleischfressern: Fischotter, Marder, Fuchs, Marderhund und Bär; von Allesfressern: Wildschwein und Affen. Mangus kommt bei uns nicht vor. Da jetzt zweifellos bewiesen ist, daß Marder, Fuchs und Marderhund Wirte des Lungen-Distoma sind, kann man mit gutem Grunde auch Fischotter, Bär, Wildschwein und Affen als Wirte des Wurmes annehmen.

In Gegenden mit menschlicher Paragonimiasis gibt es voraussichtlich eine ziemliche Anzahl wilder Tiere, welche Krabben verzehren. Sind diese wilden Tiere stark mit dem Wurm behaftet, so kommen fortwährend ungeheuerer Mengen von Eiern mit ihrem Kot in das fließende Bachwasser, wo frischer Kot leicht in Stücken zerteilt und weiter talabwärts fortgetragen wird, so daß die Eier überall an den Bachufern verbreitet werden. Bei günstiger Temperatur kommt im Ei allmählich das *Miracidium* zur Entwicklung, was bei künstlicher Bebrütung genügend bekannt ist. Das frei gewordene *Miracidium* dringt nach kurzem Suchen leicht durch die Epidermis in den ersten Zwischenwirt ein. Als solcher sind mit Sicherheit 2 Arten Wasserschnecken festgestellt worden: 1) *Me-*

lania paucicincta Martens, 2) *Melania extensa* Martens; beide, besonders aber die erstere, kommen in unserer Paragonimiasisgegend in ungeheurer Menge in den den kleinen sandigen, vielfach durch Steingeröll und Felsblöcke beengten Bächen in dem kristallhellen Wasser vor. Sehr viele *Geothelphusa dehaanii*, welche hier heimisch sind, hausen an deren Ufern, zu denen sich dann noch der *Eriocheir japonicus* gesellt, der von ansehnlicher Größe ist und als junges Tier vom Meeresufer aus den Fluß entlang weit in alle Winkel der Gebirgstäler hineinwandert, um hier seine Nahrung, darunter auch unsere Wasserschnecken, zu suchen. Geschlechtsreif geworden, kehrt er dann ans Meeresufer zurück.

In diesen somit lückenlos abschließenden Kreislauf gehört der Mensch somit eigentlich nicht, da er in der Regel Krabben roh nicht genießt. Nur in dem Falle, wo er dies doch tut, wie das bei den Wilden der Fall ist, kommt auch er ausnahmsweise als Wirt dieses Wurmes in Betracht.

Zur Bekämpfung der menschlichen Paragonimiasis hat zunächst Belehrung und Warnung vor dem Genuße roher oder ungenügend gekochter Krabben zu erfolgen. Da die Zysten des Lungen-*Distoma* im fließenden Bachwasser frei werden, wenn die Krabben darin zugrunde gehen, ist auch der Genuß von ungekochtem Bachwasser als mögliche Quelle der menschlichen Paragonimiasis zu betrachten.

Krabben vor der Invasion der Cercarien zu hüten, erfordert Ausrottung der Wasserschnecken; um diese vor Miracidien zu schützen, sind Maßregeln zu treffen, damit die Eier des *Distoma* nicht ins Wasser gelangen.

Solange der Mensch für den eigentlichen Wirt dieses *Distoma* galt, wäre für sorgfältige Behandlung der Sputa von Paragonimusträgern zu sorgen gewesen, was aber nicht mit Erfolg möglich ist. Wenn z. B. ein Bauer oder Fischer mit Lungen-*Distoma* inmitten des Reisfeldes beim Beseitigen des Unkrautes hustet, so ist das nicht zu verhindern, und was soll der Fischer mit seinen Auswürfen machen, wenn er am Bachufer entlang auf Beute ausgeht?

Seitdem die die Krabben verzehrenden wilden Tiere als eigentliche Wirte unseres Wurmes erkannt worden sind, hat die bisherige Belehrung erst recht keinen Sinn mehr; hier kann zur Bekämpfung nur die Ausrottung dieser Tiere helfen, denn wo die genannten Tiere fehlen, können die Krabben ruhig gegessen werden. Da die Tiere ihres Pelzes willen rastlos verfolgt werden und ihre Zahl sich immer mehr verringert, ist ihre endliche Vernichtung wohl zu erwarten.

Freilich darf man dabei nicht vergessen, daß diese Tiere auch zugleich Erbfeinde der Ratten und Mäuse sind und welchen Schaden die Ratten auf isolierten Inseln anrichten können, wo weder Fuchs noch Dachs lebt.

Zum Schluß sage ich meinen Dank Herrn Fujishige, der für mich mit großer Mühe Material gesammelt hat, und meinem Assistenten, Herrn Suko, der die gute Hälfte dieser Arbeit geleistet hat, sowie Herrn Gymnasiallehrer Mizoguchi in Takeda, der in so liebenswürdiger Weise für meine Arbeit wertvolles Material aus weiter Ferne geschickt hat, und schließlich Herrn Prof. K. Miyairi für die immerwährende Anregung und Anleitung, sowie den Herren Dr. M. Suzuki und T. Nishio für ihre guten Ratschläge.

Nachdruck verboten.

Ueber Stärke- und Massentiter.

Von W. A. Collier und E. Knoller in Helgoland, Staatl. biol. Anstalt.

Nachdem einer von uns (Collier) in einer Reihe von Versuchen gefunden hatte, daß sich die Immunitätsverhältnisse der Echinodermen (speziell der Seesterne) analog denen der warmblütigen Tiere verhielten, fanden wir, daß bei der Präzipitation nach oftmaliger Antigenvorbehandlung bei einer verdünnten Anwendung des Serums und konzentrierter Anwendung des Antiserums eine Grenze im Titer erschien, nach dessen Erreichung eine weitere Steigerung des Titers nicht mehr erfolgte. Umgekehrt aber stieg bei Verdünnung des Antiserums und Verwendung des unverdünnten Serums der Titer immer weiter an und erreichte nicht eine solche Grenze.

Um dieses Verhalten näher zu untersuchen, machten wir folgenden Versuch: Ein *Solaster papposus* wurde mit Extrakt aus *Asterius rubens* vorbehandelt und stets vom 5. Tage ab untersucht. Es wurde jedesmal der Titer möglichst genau festgestellt von a) Antiserum unverdünnt + Serum verdünnt, b) Antiserum verdünnt + Serum unverdünnt.

Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurden im 1. Fall Verdünnungen des Serums im gleichen Abstand gemacht, und zwar 1:500,

Injektion	Tag	Serum verdünnt präzipitiert bis	Antiserum verdünnt präzipitiert bis	Injektion	Tag	Serum verdünnt präzipitiert bis	Antiserum verdünnt präzipitiert bis
2	5	1: 500	0	6	25	1: 14 000	1: 800
	6	1: 1 000	0		26	1: 13 500	1: 750
	7	1: 2 500	1: 50		27	1: 14 500	1: 700
	8	1: 3 000	1: 150		28	1: 14 000	1: 900
3	9	1: 4 000	1: 150	7	29	1: 14 000	1: 950
	10	1: 5 500	1: 200		30	1: 14 000	1: 1050
	11	1: 5 000	1: 200		31	1: 13 000	1: 1050
	12	1: 7 000	1: 300		32	1: 15 000	1: 1150
	13	1: 7 500	1: 250		33	1: 13 500	1: 1200
4	14	1: 8 500	1: 350	34	1: 14 000	1: 1350	
	15	1: 9 500	1: 350	35	1: 14 000	1: 1450	
	16	1: 9 500	1: 300	36	1: 14 000	1: 1500	
	17	1: 11 500	1: 450	37	1: 13 500	1: 1550	
	18	1: 12 500	1: 500	38	1: 13 500	1: 1550	
5	19	1: 13 000	1: 550	39	1: 13 500	1: 1600	
	20	1: 13 500	1: 550	40	1: 13 000	1: 1700	
	21	1: 13 000	1: 550	41	1: 13 500	1: 1700	
	22	1: 13 000	1: 600	42	1: 13 500	1: 1700	
	23	1: 14 000	1: 700	43	1: 14 000	1: 1650	
	24	1: 14 000	1: 700				

1:1000, 1:1500 etc., wobei jede folgende Verdünnung gleichmäßig um 500 anstieg. Bei der Verdünnung des Antiserums wurden in steigenden Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:150 etc. die Versuche angestellt, wobei jedesmal die Verdünnung um 50 anstieg.

Es ergab sich hierbei vorstehende Tabelle.

Hieraus geht hervor, daß einerseits nach der 5. Injektion bei der Verdünnung des Serums keine deutliche Erhöhung des Titers mehr erfolgt, andererseits sich aber der Titer ständig bei der Verdünnung des Antiserums erhöht.

Dies ließe sich ungezwungen folgendermaßen erklären: Bei der Verdünnung des Serums ist in stets der gleichen Menge des Antiserums auch die gleiche Menge der Antistoffe vorhanden. Das Serum aber ist verdünnt, und zwar verringern sich in steigendem Maße in ihm jene Stoffe, mit denen die Antikörper reagieren können. Können sie noch mit einer sehr geringen Menge dieser Stoffe reagieren, so ist dies ein Zeichen dafür, daß die Antikörper außerordentlich reaktionsfähig sind. Es wird also die Stärke der Antikörper angegeben, und man dürfte wohl mit Recht von einem Stärketiter reden.

Umgekehrt ist aber das Verhältnis, wenn das Antiserum in verdünntem und das Serum in unverdünntem Zustande angewendet wird. Hier sind wohl die Stoffe, mit denen die Antikörper reagieren, in stets gleicher Menge enthalten, wohl aber nimmt die Menge der Antikörper mit der Verdünnung ab. Hier wird also nicht die Stärke, sondern die Menge der Antikörper angegeben, und aus diesem Grunde dürfte man also wohl von einem Mengentiter sprechen.

Man darf hier also nicht ohne weiteres von einem Titer, z. B. von 1:10000, reden, da daraus noch nicht hervorgeht, ob es sich um Menge oder Stärke der Präzipitine handelt. Vielmehr wäre es wünschenswert, wenn es sich um genaue Bestimmungen handelt, sowohl den Mengen- als auch den Stärketiter anzugeben.

An Warmblütern haben wir aus materiellen Gründen keine Untersuchungen anstellen können, doch erscheint es sehr wünschenswert.

Damit steht auch die Tatsache der heterogenetischen Antikörper im Einklang. Wenn z. B. ein Solaster mit Buccinum vorbehandelt ist, so zeigt er 5 Tage nach der 4. Injektion einen Stärketiter von 1:12000 und einen Mengentiter von 1:2500. Sein Serum wirkt aber auch heterogenetisch gegen Asterias, und zwar in einem Stärketiter von 1:8000, aber in einem Mengentiter von nur 1:200 (vgl. folgende Tab.).

Solaster, vorbehandelt mit Buccinum, wirkt gegen	Mengentiter -	Stärketiter	Verhältnis zwischen Mengen- und Stärketiter
Buccinum	1:2500	1:12000	1:4,8
Asterias (heterogenet.)	1:200	1:8000	1:40

Es geht hieraus also hervor, daß in unserem Falle die heterogenetischen Antikörper wohl in einer ziemlichen Stärke, aber in einer verhältnismäßig geringen Menge vorhanden sind. Das Verhältnis der Menge zur Stärke ist in dem einen Falle 1:4,8, im anderen, bei der Heterogenese, aber nur 1:40. Aus diesen Gründen hatte man auch schon zur Trennung der heterogenetischen von den spezifischen Antikörpern den Weg eingeschlagen, daß man das Antiserum verdünnt und das Serum unverdünnt anwandte. Hier wird eben der Mengentiter gemessen, der größere Unterschiede zeigt als der Stärketiter.

Nachdruck verboten.

Die Konservierung schwer haltbarer Bakterienkulturen, insbesondere des Gonococcus (Modifikation der Ungermanschen Methode).

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Neisser).]

Von Dr. med. **Max Michael.**

Um den Mißstand des schnellen Absterbens von Gonokokken- etc. Reinkulturen zu beheben, hat Ungermann (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 51. H. 1) eine Methode angegeben, die sich sowohl zur Konservierung von Gonokokken, Meningokokken wie von Strepto- und Pneumokokken eignet.

Ungermann überimpfte diese Stämme mittels steriler Glaskapillaren auf steriles Kaninchenserum, sei es konzentriert oder verdünnt, das nach Erhitzung auf 60° mit sterilem Paraffinöl überschichtet war. Er konnte auf diese Weise Meningokokken bis zu 16 Mon., Gonokokken 8 Woch. lebensfähig erhalten, Streptokokken und Pneumokokken ebenfalls lange, ebenso konnte U. bei Typhus- und Cholerastämmen eine längere Erhaltung der Virulenz von hochpathogenen Typhus- und Cholerastämmen gegenüber den in der gewöhnlichen Weise fortgezüchteten Stämmen beobachten. U. führt die Vorzüge seiner Methode auf den Reichtum des tierischen Serums an geeigneten Nährstoffen einerseits zurück, auf die nur sparsame Vermehrung infolge des Sauerstoffmangels andererseits.

Die Nachprüfung dieser letzteren Ueberlegung legte den Gedanken nahe, statt der Verwendung des von U. angegebenen Kaninchensersums die gewöhnlichen Nährböden einer Paraffinüberschichtung zu unterziehen und zu prüfen, inwieweit damit eine Konservierung der genannten schwer züchtbaren Erreger zu erzielen sei. Im folgenden seien die Ergebnisse dieser Untersuchungen mitgeteilt:

Stamm I, aus weiblicher Harnröhre gezüchtet, 22. Passage auf Aszitesagar wird am 1 Febr. mit sterilem Paraffin. liqu. zur Hälfte überschichtet. Das Röhrchen im Brutschrank aufbewahrt.

3. Febr. Mit Platinöse (langer Draht) wird je ein Abstrich aus dem nicht überschichteten Teil der Kultur wie aus dem überschichteten Teil durch das Paraffin hindurch auf ein Aszitesröhrchen vorgenommen. Ausstrich ergibt mikroskopisch im oberen Teil der Kultur beginnende Degeneration, unten keine Degeneration.

5. Febr. Abstrich von beiden Röhrchen auf Aszitesagar hat Reinkulturen ergeben. Vom Stammröhrchen ergibt Abstrich aus dem nicht überschichteten Teil nur noch vereinzelte, deutliche Gonokokken.

7. Febr. Ein mit Material aus dem oberen Teil des Stammröhrchens beschicktes Aszitesagarröhrchen ist nicht bewachsen, das vom überschichteten Teil des Stammröhrchens aber üppig gewachsen.

13. Febr. Der mit Paraffin überschichtete Teil des Stammröhrchens zeigt sich völlig unverändert, der darüber hinausragende Teil der Kultur beginnt auszutrocknen und sich zu bräunen. Das Röhrchen wird für 2 Mon. in den Brutschrank gestellt (37°) und am 13. April untersucht. Der obere Teil ist völlig vertrocknet und als aufgerollte Masse von der Glaswand abgelöst. Der mit Paraffin überschichtete Teil zeigt das Aussehen einer frischen Gonokokkenkultur. Mikroskopisch ist kein Unterschied von frischen Gonokokken festzustellen. Uebertragung auf Aszitesagar ergibt üppiges Wachstum; auf Agar- und Loeffler-Röhrchen kein Bakterienwachstum.

Die fortlaufende Kontrolle ergibt bis zum 26. Mai normales Wachstum auf Aszitesagar, ohne Veränderung des mikroskopischen Bildes und ohne Wachstum auf Agar und Loeffler. Aus unbekanntem Gründen (Ueberhitzung oder Auskühlung des Brutschrankes?) erweist sich das Stammröhrchen am 8. Juli als abgestorben. Die Lebensdauer der Kultur erstreckt sich ohne Veränderung des kulturellen und mikroskopischen Verhaltens auf fast 5. Mon.

Stamm II, aus männlicher Harnröhre stammend, wird am 10. Aug. auf Aszitesagar abgestochen, am 18. Aug. als Reinkultur mit Paraffin überschichtet, und in derselben Weise bis zum 18. Sept. kontrolliert, ohne irgendwelche Veränderung des kulturellen oder mikroskopischen Verhaltens im mit Paraffin überschichteten Teil aufzuweisen. In Zimmertemperatur stirbt eine mit Paraffin überschichtete Aszitesagarkultur in gleicher Weise ab wie ein Kontrollröhrchen. Ein sofort nach dem Ausstreichen des Kulturmaterials mit Paraffin überschichtetes Röhrchen zeigt bei 37° normales Wachstum, und in der üblichen Weise über mehrere Wochen kontrolliert, keine Degenerationserscheinungen.

Meningokokken.

17. Sept. Ueberschichtung je einer Aszitesagar- und Loeffler-Meningokokkenkultur mit Paraffin.

18. Okt. Beide Röhrchen, im Brutschrank aufbewahrt und 2tägig kontrolliert, haben ihr normales Aussehen bewahrt. Mikroskopisch zeigen sie das Bild nicht degenerierter, gramnegativer (relativ lange Entfärbung!) Diplokokken.

Uebertragung auf Loeffler-Agar ergibt normales Wachstum, ein Kontrollabstrich auf Agarröhrchen ergibt kein Wachstum.

23. Okt. Ein Loeffler-Röhrchen wird mit Meningokokken bestrichen und, sofort mit Paraffin überschichtet, in den Brutschrank gesetzt.

24. Okt. Es erfolgt normales Wachstum gut übertragbarer Meningokokken, die sich durch Kontrolluntersuchung als solche erweisen.

Kontrolle auf Loeffler-Serum: Wachstum.

25. Sept. Ein mit Paraffin überschichtetes Meningokokkenröhrchen (Aszitesagar) wird der Zimmertemperatur ausgesetzt.

29. Sept. Mikroskopische Untersuchung des Röhrchens ergibt kaum erkennbare einzelne Meningokokken in einer Masse abgestorben eingebettet. Eine Uebertragung auf Aszitesagar oder Loeffler ist nicht möglich.

Pneumokokken.

Wiederholte Versuche mit Pneumokokken ergeben keine längere Haltbarkeit als einmal bis zu 21 Tagen. Der Kulturrasen bleibt nicht am Loeffler-Substrat haften, sondern löst sich in kleinen Partikelchen ab, die das Paraffin trüben und darin herumschwimmen, auch eine Weiterübertragung auf andere Röhrchen erschweren.

29. April. Eine am 28. April auf Loeffler-Serum übertragene Pneumokokkenkultur wird, mit Paraffin überschichtet, in den Brutschrank gestellt.

30. April. Kontrolle im hängenden Tropfen und Ausstrich ergibt Pneumokokken.

3. Mai. Abimpfung positiv, ein am 29. April ohne Ueberschichtung im Brutschrank aufbewahrtes Röhrchen weist keine lebenden Pneumokokken mehr auf.

5. Mai. 6. Mai. Abimpfung ergibt normales Wachstum von Pneumokokkenkultur

9. Mai. Der Kulturbelag beginnt sich vom Loeffler-Substrat abzuheben, und es lassen sich nur schwer Partikel zur mikroskopischen Kontrolle und Uebertragung auf ein anderes Röhrchen abheben.

10. Mai. Abstrich ergibt üppiges Wachstum.

19. Mai. Das Paraffin ist durch herumschwimmende Partikel getrübt. Abstrich mühsam, im hängenden Tropfen lebende Pneumokokken. Uebertragung auf Loeffler-Röhrchen ergibt am

20. Mai normale Pneumokokken, ebenso am 21. und 26. Mai.

Am 8. Juli zeigt sich eine völlige Trübung des Paraffins; in dem Loeffler-Belag, der stark eingetrocknet ist, sind Pneumokokken nicht nachweisbar. Uebertragung auf Loeffler-Röhrchen nicht möglich.

Influenza.

26. April. Von einer Influenzaskultur werden 2 Abstiche auf je 1 Taubenblutröhrchen vorgenommen.

27. April. Beide Röhrchen dicht mit kleinen Kolonien bewachsen. 1 Röhrchen davon wird mit Paraffin überschichtet und in den Brutschrank gestellt.

3. Mai. Ein Abstrich von dem überschichteten Röhrchen zeigt noch deutliches Wachstum; aus dem nicht überschichteten ist eine Uebertragung nicht möglich.

7. Mai. Uebertragung auf Taubenblutagar gelingt, Kontrollröhrchen bleibt unbewachsen.

11. Mai. Kolonien in überschichteten Röhrchen sind kleiner geworden, mikroskopisch vereinzelt, kleine Stäbchen. Uebertragung auf Taubenblutagar gelingt.

18. Mai. Uebertragung auf Taubenblutagar nicht mehr möglich.

Bei Verwendung eines größeren Ausgangsmaterials, 2 große Platinösen werden auf 1 Taubenblutagarröhrchen verstrichen, bleibt die Kultur vom 16. Sept. bis 22. Okt. am Leben. Auch hier ist von der 3. Woche ab eine Abnahme der Uebertragbarkeit festzustellen. Die am 22. Okt. auf Taubenblut übertragenen Kolonien machen einen zarten Eindruck, ebenso zeichnen sich die Stäbchen im mikroskopischen Bild durch besondere Kleinheit aus.

Streptokokken.

Verschiedene Streptokokken lassen sich ohne Mühe über 1 Monat auf Agarnährböden unter Paraffinüberschichtung konservieren. Eine Formveränderung der Streptokokken läßt sich mikroskopisch nicht konstatieren. Streicht man Streptokokken auf ein Agarröhrchen aus und überschichtet sofort mit Paraffin, so ist ebenfalls üppiges Wachstum und Konservierung zu erzielen.

Die Bazillen eines Coli-, Typhus-, Shiga-, Proteus-, Alkaligenes-Stammes lassen sich monatelang unter Paraffinüberschichten konservieren, ohne ihre Uebertragbarkeit auf Kulturen und ihre charakteristischen Eigenschaften darin zu verändern.

Der *Bacillus pyocyaneus* läßt sich ebenfalls mit Leichtigkeit übertragen. Im überschichteten Teile verschwindet die charakteristische Fluoreszenz, während sie im darüber befindlichen Teil deutlich vorhanden ist. Bei Uebertragung aus dem mit Paraffin überschichteten Röhrchen auf ein zweites tritt wieder die charakteristische Färbung auf.

Unter den vielen übrigen gelungenen Konservierungsversuchen verdienen die beim Cholera vibrio und Diphtheriebazillus besondere Erwähnung:

29. April. Ein Cholera stamm wird auf Choleraagar ausgestrichen und, soweit der Agar im Röhrchen reicht, mit Paraffin überschichtet.

Wiederholte Kontrollen bis zum 15. Okt. ergeben stets unveränderte Uebertragbarkeit auf Kulturröhrchen mit sämtlichen charakteristischen Reaktionen. Auch mikroskopisch zeigen die Vibrionen, am 15. Okt. den Stammröhrchen entnommen, keinerlei Veränderungen.

Diphtheriebazillen.

15. April. Abstrich auf Loeffler-Röhrchen. Wiederholte Kontrollen bis zum 15. Okt. ergeben eine völlig unveränderte Uebertragbarkeit auf Loeffler-Röhrchen. Mikroskopisch zeichnen sich die Stäbchen durch starke Keulenbildung aus, wie man sie auch sonst bei älteren Stämmen beobachtet.

Sucht man nach einer Erklärung des Ergebnisses dieser Versuche, so kann es einem Zweifel wohl kaum unterliegen, daß die Sauerstoffarmut in erster Linie dafür verantwortlich zu machen ist. Durch das Paraffin hindurch findet eine beschränkte Diffusion von Luft statt, die genügt, um einen so strengen Aërobier wie den Cholera vibrio am Leben zu erhalten. Nicht nur, wie Ungermann annimmt, die günstigen natürlichen Nährstoffzusammensetzungen, durch die das Serum den künstlichen Nährsubstraten überlegen ist, ermöglicht die Dauerzüchtung beispielsweise des Gono- und Meningococcus, sondern auf jedem der sonst gebräuchlichen Nährböden ist eine solche Fortzüchtung möglich, sofern nur durch Entziehung von Sauerstoff eine zu rasche Vermehrung und dadurch eine zu rasche Konsumption der im Kultursubstrat vorhandenen Nährstoffe vermieden wird.

Für diese Auffassung sprechen auch die Versuche von Lorenz, dem es gelang, auf Kulturen, die in Petri-Schälchen im luftverdünnten Raume gezüchtet wurden, ein erheblich besseres Wachstum zu erzielen. [Lorenz, F. H., Gonokokkenzüchtung in verdünnter Luft. (München. med. Wochenschr. 1919. Nr. 18)].

Freilich nicht alle Bakterien lassen sich dabei in gleicher Weise fortzüchten, insbesondere ergaben die Versuche für den Pneumococcus- und Influenzabazillus für die Praxis unsichere Resultate. Auch die Herabsetzung der Temperaturempfindlichkeit, die Ungermann angibt, konnte leider in den bisherigen Versuchen nicht bestätigt werden, was die Verwendbarkeit dieser Fortzüchtungsmethode auf das Laboratorium beschränkt.

Die Methode der Paraffinüberschichtung bedeutet erhebliche Ersparnis an Zeit und Kosten, ebenso wie sie die Gefahr der Unterbrechung begonnener Arbeiten durch Absterben eines seltenen Stammes herabmindert. Für die technische Anwendung der Methode sei bemerkt, daß zur Uebertragung und Entnahme des Kulturmaterials eine mit langem Draht armierte gewöhnliche Oese benutzt wird, damit der Stiel nicht das Paraffin verunreinigt. Mit dieser Oese wird durch die Paraffinschicht hindurchgegangen und beim Präparatausstrich unterlaufende Paraffintröpfchen werden durch Erhitzen des Objektträgers leicht entfernt.

Als Paraffin wurde Paraffin. liquid. der Pharmakopoe verwendet, das durch 1-std. Erhitzen im Autoklaven sterilisiert wurde. Auch bereits zum Ueberschichten verwandtes Paraffin wurde von der Kultur wieder abgossen und durch 1-std. Sterilisieren im Autoklaven der Benutzung ohne Nachteil wieder zugänglich gemacht. Eine Trübung im Paraffin, die durch Wassertröpfchenaufnahme im Autoklaven erfolgt war, ließ sich leicht durch nachfolgendes Erwärmen des Paraffins im Brutschrank beseitigen.

Anm.: Die während der Drucklegung erschienene Arbeit von Buschke und Langer (Deutsch. med. Wochenschr. 1921. Nr. 3) konnte noch nicht berücksichtigt werden.

Nachdruck verboten.

Ueber den Pilznährboden Much-Pinner.

[Aus dem Institut für exper. Therapie Hamburg-Eppendorf (Prof. H. Much).]

Von K. Lanke und M. Meyer, Laboratoriumsgehilfen.

Die Grundlage für die im Gebrauch befindlichen Nährböden ist die Nährbouillon, die zum größten Teil aus einer Fleischabkochung mit Peptonzusatz besteht. Da beides bei den heutigen Verhältnissen schwer zu beschaffen und teuer ist, wurde nach einem billigeren, gleichwertigen Ersatz gesucht. Ein solcher wurde von Much und Pinner in Pilzen gefunden.

Der Pilznährboden Much-Pinner besteht nur aus einem Pilzauszug mit dem nötigen Kochsalzzusatz. Die damit angestellten Versuche zeigten ein sehr befriedigendes Ergebnis; denn es ist damit nicht nur ein Ersatz für Fleisch, sondern auch für Pepton im Nährboden gefunden. Die Vorteile des Pilznährbodens sind zunächst seine Billigkeit anderen Nährböden gegenüber und seine überaus einfache Herstellung, dann das damit erreichbare bessere und kräftigere Wachstum und schließlich die Möglichkeit, stets ein gleichwertiges Nährbodenmaterial zu besitzen. Wenn im Sommer genügend Pilze gesammelt und getrocknet werden, kann man sich für den Winter genügend eindecken.

Wie die von uns angestellten Versuche gezeigt haben, ist aber nicht jeder Pilz brauchbar. Von der größeren Reihe der versuchten erwiesen sich als brauchbar: der Mordschwamm, Rübbling, weiße Reizker und der Wolfschwamm.

Für die Herstellung von Nährböden werden die Pilze in größeren Mengen gesammelt, von anhaftendem Schmutz befreit und in der Fleischmaschine gemahlen; dann wird der Pilzbrei in flachen Schalen getrocknet und danach zu einem Pulver zerrieben, welches, trocken aufbewahrt, längere Zeit haltbar ist. 25 g dieses Pulvers werden 24 Std. bei Zimmertemperatur mit 1 l Wasser ausgezogen und dann filtriert. Das Filtrat muß klar sein; sonst gibt man etwa einen Teelöffel Kieselgur hinzu, schüttelt kräftig um und filtriert ein 2. Mal.

Zu dem klaren Filtrat werden 5 g NaCl zugesetzt und nach Stehenlassen für $\frac{1}{2}$ Std. mit 10-proz. Sodalösung alkalisch gemacht, bis rotes Lackmuspapier schwach gebläut wird. Dann wird 3 Tage hintereinander je $\frac{1}{2}$ Std. im Dampftopf sterilisiert. Die so erhaltene Bouillon gibt ein sehr gutes Wachstum. Um feste Nährböden zu erlangen, setzt man nach dem Alkalisieren 2 Proz. Agar hinzu und behandelt, wie vorher.

Das auf so erhaltenem Pilzagar erzielte Wachstum zeigt die folgende Tabelle. Versuche, die frischen Pilze zu Nährböden zu verarbeiten, ergaben ebenfalls ein sehr gutes Bakterienwachstum, doch stellten sich hierbei beim Filtrieren gewisse Schwierigkeiten ein.

Bakterienwachstum auf Pilznährböden.

Bakterien	Gew. Agar mit 1% Pepton	Lactarius turpis. Mord- schwamm	Lactarius turminosus. w. Reizker	Lactarius rufus. Rübbling	Lactarius vulnerius. Wolf- schwamm
Milzbrand	+	++	+++	+++	+++
Staphylokokken	+	++	+++	++	+++
Typhus	+	++	+++	+	++
Paratyphus A	+	++	+++	++	+++
" B	+	+++	+++	+++	+++
Coli	+	+++	+++	+++	+++
Pyocyaneus	+	+++	+++	+++	+++
Diphtherie	∓	∓	+	+	∓
Aktinomyces	+	++	++	∓	++
Cholera	—	+++	+++	—	—
Streptococcus vi- ridans	∓	—	+	+	∓
Streptococcus mu- cosus	—	—	—	—	—
Pneumokokken	∓	+	+	+	—
Hämolsierende Streptokokken	—	—	—	—	—
Nicht hämolsierende Streptokokken	∓	—	+	+	—
Pilznährboden mit Blutzusatz.					
Streptococcus vi- ridans	+	—	+	+	∓
Streptococcus mu- cosus	+	—	+	+	+
Pneumokokken	+	+	+	+	+
Hämolsierende Streptokokken	+	+	+	+	+
Nicht hämolsierende Streptokokken	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: — Kein Wachstum, ∓ schwaches Wachstum, + gutes Wachstum, ++ starkes Wachstum, +++ äußerst stark und kräftig.

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, daß die meisten Bazillen im Vergleich zu dem gewöhnlichen Peptonagar ein besseres Wachstum zeigen; nur für die Kokken scheint der Pilznährboden aber ohne Zusätze nicht zu genügen, obwohl einige ein schwaches Wachstum aufweisen. Blutzusatz führt bei den pathogenen Kokken zu besseren Ergebnissen.

Der Pilznährboden zeigt uns, daß es durchaus nicht notwendig ist, einen Fleischauszug als Grundlage der Nährböden für menschenpathogene Bakterien zu benutzen, und daß die an tierisches Eiweiß gewöhnten Bakterien auch in der Lage sind, aus pflanzlichen Auszügen ihren zum Zellaufbau nötigen Nährstoff herauszuziehen.

Bei der weiteren Suche nach geeigneten Ersatzstoffen fand sich, daß auch Fischfleisch in getrocknetem wie frischem Zustande ein gutes Ausgangsmaterial gibt. Die daraus gewonnene Bouillon ist stark eiweißhaltig.

In der Erwägung, daß der Kot von fleischfressenden Tieren noch genügend Nährmaterial in Form von mehr oder weniger abgebautem Eiweiß enthält und somit in der Lage wäre, dadurch das Pepton zu ersetzen, wurden aus Hunde- und Menschenkot Kochauszüge hergestellt. Auch auf so erhaltenen Nährböden wurde üppiges Wachstum, wenn auch nicht ganz so stark wie auf den Pilznährböden Much-Pinner, erzielt, wobei die Beobachtung gemacht wurde, daß im allgemeinen älterer Kot sich besser eignet als ganz frischer. Die Zubereitung solcher Nährböden ist einfach und deckt sich im wesentlichen mit dem oben für Pilze angegebenen Verfahren, nur müssen größere Mengen Ausgangsmaterial verarbeitet werden, etwa 400 g nicht getrockneten Kotes auf 1 l Wasser.

Inhalt.

- Aoki, K., u. Chigasaki, Y.,** Immunisatorische Studien über die Polyederkörperchen bei Gelbsucht von Seidenraupen (Zelleinschluß), S. 481.
- Bachmann, W.,** Echte Diphtherie- und diphtherieähnliche Bazillen im Phagozytoseversuch, S. 433.
- Bender, Willy,** Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbazillen im Sputum, S. 461.
- Collier, W. A., u. Knoller, E.,** Ueber Stärke- und Massentiter, S. 505.
- Fischer, Walther,** Einiges über Zysten der Entamoeba coli, S. 491.
- Fukuhara, Y.,** Die weitere Anwendung unserer neuen Methode zur Wertbestimmung der antiinfektiösen Cholera- sowie Paratyphuseera, S. 450.
- Hilgermann, R., u. Arnoldi, W.,** Bemerkung zum Referat betreffend Fleckfiebertivirus — (Dörr) Basel, S. 481.
- Klarenbeek, A.,** Experimentelle Untersuchung mit einer beim Kaninchen spontan vorkommenden und dem Treponema pallidum ähnlichen Spirochäte. Vorl. Mitt. Mit 2 Abbild. im Text, S. 472.
- Lanken, K., u. Meyer, M.,** Ueber den Pilznährboden Much-Pinner, S. 510.
- Michael, Max,** Die Konservierung schwer haltbarer Bakterienkulturen, insbesondere des Gonococcus (Modifikation der Ungermanschen Methode), S. 507.
- Oehler, Rud.,** Wirkung von Bakteriengiften auf Ziliaten, S. 494.
- Onji, Y.,** Das Lungen-Distoma, der Schmarotzer wilder, krabbenfangender und -verzehender Tiere. I. Mitt., S. 500.
- Plasaj, Stjepan,** Zur Morphologie des Bact. pseudotuberculosis rodentium (Preiszl. L. et N.), S. 468.
- v. Schuckmann, W.,** Ueber die Einwirkung von „205 Bayer“ auf Trypanosomen außerhalb des Tierkörpers, S. 485.
- Spreitzer, Otto,** Vergleichende Untersuchungen über neuere Färbemethoden für Tuberkelbazillen, S. 458.
- Wolf, G.,** Ueber das wechselnde kulturelle Verhalten von Ruhrstämmen auf den zur Differentialdiagnose angelegten Zuckernährböden, S. 476.
- Zurukzoglul, S.,** Zur Methodik der bakteriologischen Diphtheriediagnose, S. 440.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 86. Heft 7/8.

Ausgegeben am 10. August 1921.

Nachdruck verboten.

Ueber Variabilitätserscheinungen bei säurefesten Bakterien. [Aus der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes in Berlin-Dahlem.]

Von Prof. Dr. E. Gildemeister.

Mit 3 Abbildungen im Text.

Auf der 7. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie berichtete Baerthlein ¹⁾ in Gemeinschaft mit Toyoda über das Auftreten von Variabilitätserscheinungen bei säurefesten Bakterien. Er konnte zeigen, daß Variabilitätserscheinungen, wie sie bei zahlreichen anderen Bakterienarten von ihm beobachtet worden waren, auch bei säurefesten Bakterien nachweisbar sind. Das Arbeiten mit derartigen Bakterien erwies sich jedoch wegen des langsamen Wachstums der Kulturen, wegen des leichten Absterbens der Stämme und der außerordentlichen Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber geringen Schwankungen in der Zusammensetzung der Nährböden als sehr schwierig und zeitraubend. Aus diesen Gründen sah sich Baerthlein genötigt, seine Versuche mit Kulturen des verhältnismäßig schnell wachsenden Froschtuberkelbazillus anzustellen.

Die Froschtuberkelbazillen entwickelten in schwach alkalischen Glycerinagarkulturen nebeneinander trockene, bröcklige, blumenkohlartig wuchernde Kolonien, die sich fast gar nicht verreiben ließen, und feuchte, glänzende Kolonien mit glatter Oberfläche. Diese Kolonievarianten ließen sich monatelang getrennt fortzüchten; auch wiederholte Tierpassagen veranlaßten keine Aenderung. Auch morphologische Unterschiede konnten festgestellt werden. Die trockene, bröckelige Kolonie wurde von kurzen, ziemlich plumpen Stäbchen gebildet, während die feuchte, glattrandige aus längeren, schlanken Stäbchen bestand. Unterschiede in der Säurefestigkeit konnten nicht nachgewiesen werden. Was das zeitliche Auftreten der Kolonievarianten bei Froschtuberkelbacillen anbetrifft, so geben Baerthlein und Toyoda an, daß es dazu einer ziemlich langen Frist bedarf; in der Regel traten die Abspaltungsvorgänge erst in mehrere Monate alten Agarkulturen auf, die dann bereits an der Grenze der Lebensfähigkeit angelangt waren. Einen Rückschlag, wie ihn Baerthlein regelmäßig bei allen bisher von ihm geprüften Bakterienarten feststellen konnte, in der Art, daß aus einer Kolonievariante nach einer bestimmten Zeit plötzlich wieder die Ausgangsform sich aenspaltete, konnte trotz Verwendung von älteren Bouillonkulturen, die sich bei anderen Bakterienarten als sehr geeignet erwiesen hatten, nicht nachgewiesen werden.

In der an diesen Vortrag sich anschließenden Aussprache teilte Neufed mit, daß in seinem Laboratorium Georg Meyer in einer Kultur

Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Ref. Bd. 57. 1913. S. 281.

Erste Abt. Orig. Bd. 86.

Heft 7/8.

säurefester Stäbchen gleichfalls zwei Typen beobachtet hat, die in der Kolonieform und noch mehr in der Morphologie der Stäbchen Unterschiede aufwiesen. Aus äußeren Gründen waren diese Beobachtungen, namentlich in bezug auf die Frage des Rückschlages, nicht fortgesetzt worden. Neufeld zweifelt jedoch nicht, daß es sich bei den säurefesten Bakterien um dieselbe gesetzmäßige Erscheinung wie bei anderen Bakterienarten handelt, hält aber eine weitere Fortsetzung der Untersuchungen betreffs der Rückschläge für nötig.

Da es mir von Wert zu sein schien, diese Frage zur endgültigen Klärung zu bringen, habe ich eingehende Untersuchungen über Variabilitäterscheinungen bei säurefesten Bakterien angestellt, über deren

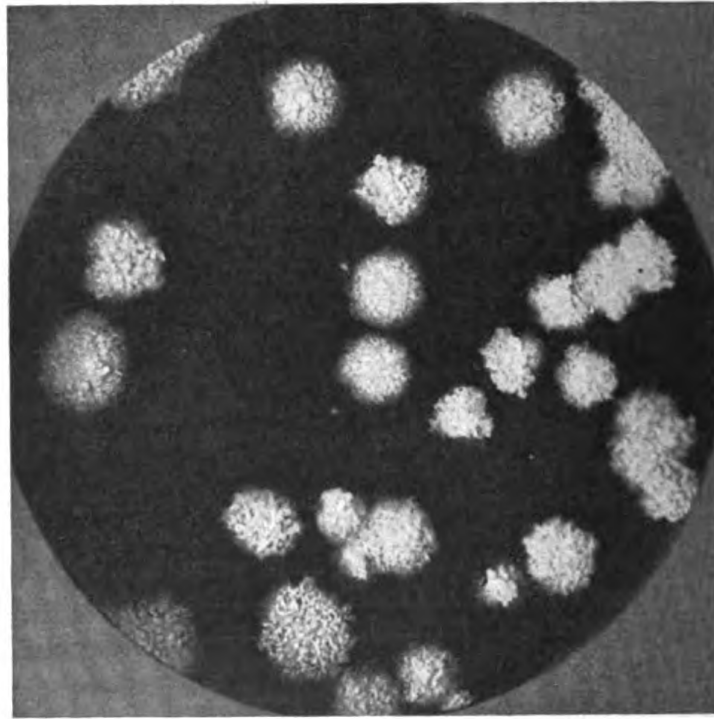


Fig. 1. Normalform des Friedmannschen Schildkröten-tuberkelbazillus auf Glycerinagar.

Ergebnis ich nachstehend kurz berichten möchte. Auch ich wandte mich aus den gleichen Gründen wie Baerthlein alsbald relativ schnell wachsenden und bezüglich des Nährbodens weniger anspruchsvollen säurefesten Kulturen zu und fand in dem Friedmannschen Schildkröten-tuberkelbazillus ein für meine Zwecke sehr geeignetes Objekt. Es gelang mir, aus einer älteren Glycerinagarkultur 2 verschiedene Kolonieformen zu isolieren und getrennt weiterzuzüchten. Die eine (s. Fig. 1.), die ich als die normale Form bezeichnen möchte, wächst auf leicht alkalischem Glycerinagar in flachen, trockenen, unregelmäßig umrandeten Kolonien mit bröckeliger, glanzloser Oberfläche, während die andere, die als die Variante anzusprechen ist, in kreisrunden, porzellanweißen stark gewölbten Scheibchen mit völlig glatter, glänzender Oberfläche sich entwickelt (s. Fig. 2). Die Normalform läßt sich mit der Oese schwer aufnehmen und in physiol. Kochsalzlösung nur in groben Bröckeln ver-

reiben; die Variante dagegen haftet leicht an der Oese und gibt eine fast homogene Trübung. Die schönsten Variantenbilder erhält man, wenn das Wachstum bei Zimmertemperatur erfolgt; aber auch bei 37° gezüchtete Varianten sind deutlich als solche erkennbar; die Kolonien sind in letzterem Falle weniger glänzend. Die Wachstumsdifferenzen dieser beiden Koloniefornien des Friedmannschen Bacillus entsprechen somit durchaus den von Baerthlein und Toyoda beim Froschtuberkelbazillus beobachteten Erscheinungen. Im Gegensatz zu diesen beiden Autoren konnte ich morphologische Differenzen zwischen den Bazillen der beiden Koloniefornien des Friedmannschen Bazillus nicht feststellen; Größe und Form der Stäbchen weisen keine bemerkbaren Unterschiede auf. Auch die Säurefestigkeit sowie die Antiforminfestigkeit der Stäbchen

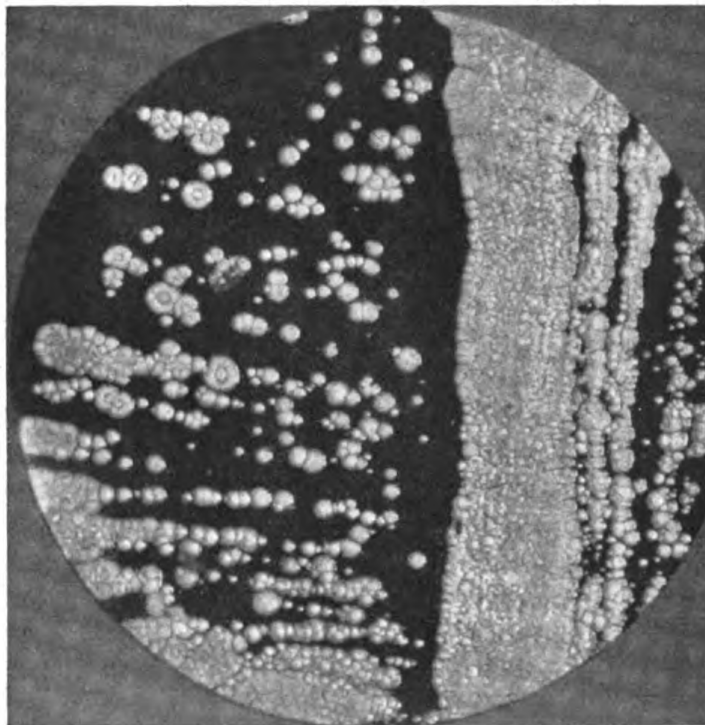


Fig. 2. Variante des Friedmannschen Schildkrötentuberkelbazillus auf Glycerinagar.

der Variante wies keine Abweichungen von den Eigenschaften der Bazillen der Normalform auf.

Nachdem es mir gelungen war, die Variante von der Normalform zu trennen und sie rein zur Darstellung zu bringen, machte ihre Fortzucht keinerlei Schwierigkeiten. Auch auf anderen Nährböden (Glycerinserum, Loeffler-Serum, Glycerinbouillon) ließ die Variante gleichfalls deutliche Unterschiede gegenüber der Normalform erkennen.

Meine Versuche, aus der Kolonievariante des Friedmannschen Bazillus einen Rückschlag zur Normalform zu erzielen, waren zunächst ebenfalls durchaus negativ. Aus mehrere Monate alten Agar- und Bouillonkulturen der Variante erhielt ich immer wieder nur die Variante; dagegen ist es mir wiederholt noch gelungen, aus älteren Agar- und Bouillonkulturen der Normalform die gleiche feuchte Variante zur Ab-

spaltung zu bringen. Nach langem Bemühung gelang schließlich auch der Rückschlag aus der Variante. In Ausstrichen aus einer fast 7 Monate alten Glycerinbouillonkultur der Variante, die in den ersten Wochen bei 37°, dann bei Zimmertemperatur gestanden hatte, auf Glycerinagar wuchsen neben den porzellanartigen Knöpfen der Variante typische Normalformen (s. Fig. 3). Damit ist der Ring geschlossen, d. h. der Nachweis erbracht, daß es sich bei den von Baerthlein und Toyoda und von mir beobachteten Varianten.

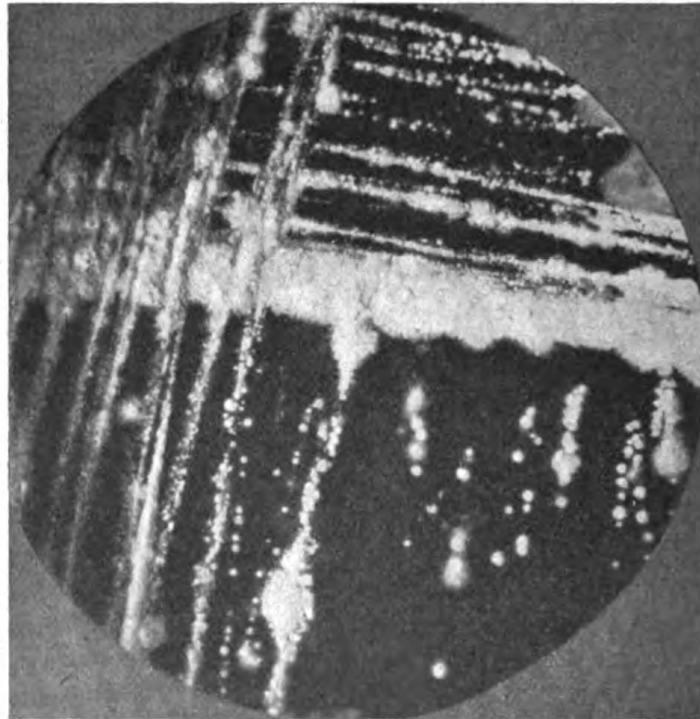


Fig. 3. Rückschlag aus der Variante zur Normalform.

bildungen bei säurefesten Bakterien um dieselben gesetzmäßigen Erscheinungen wie bei anderen Bakterienarten handelt.

Erwähnt sei noch, daß meine Versuche bei anderen säurefesten Bakterien (Smegmabazillen, Stamm Petri, Stamm Harnpilz, humanen und bovinen Tuberkelbazillen) Abspaltungen zu erzielen, bisher ergebnislos verlaufen sind. Es geht daraus hervor, daß derartige Erscheinungen unter den gegebenen Versuchsbedingungen wesentlich schwerer zu erzielen sind als bei nicht säurefesten Bazillen. Meine Versuche in dieser Richtung werden fortgesetzt.

Nachdruck verboten.

Vergleichende Untersuchungen über die fermentativen Leistungen der Bakterien Paratyphi A und B sowie des *Bacterium coli commune*.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. Kisskalt).]

Von **Erich Burow**.

Die Untersuchungen über die biologischen und physiologischen Eigenschaften der verschiedenen Bakterienarten haben in wenigen Jahrzehnten einen Umfang angenommen, der zu einer beinahe erdrückenden Fülle von Material geführt hat. In erster Linie sind es auch heute noch die Mediziner, die größtenteils in dem Bestreben, zur Differentialdiagnose brauchbare Anhaltspunkte zu gewinnen, sich diesem Gebiete zugewandt haben. Während diese Arbeiten naturgemäß durchweg pathogene Bakterien betreffen, haben sich die Chemiker, die sich diesem Gebiet zuwandten, zunächst im wesentlichen mit den für die Gärungstechnik so wichtigen Hefen und Schimmelpilzen, dann aber auch mehr und mehr mit den eigentlichen Bakterien befaßt.

Diejenige Lebensäußerung der Bakterien, bei der sich ihre biologischen und physiologischen Eigenschaften am besten studieren lassen, ist die mit dem allgemeinen Namen der Gärung bezeichnete, und die Mehrzahl der ausgeführten Arbeiten betrifft daher dieses für Technik und Wissenschaft gleichermaßen wichtige Gebiet.

Leider haben aber die zahlreichen, von verschiedenen Seiten und zu verschiedenen Zwecken ausgeführten Arbeiten zu beinahe ebenso vielen verschiedenen Ergebnissen und daraus abgeleiteten Theorien geführt.

Dies hat seinen wesentlichen Grund in folgendem: Das exakte Studium der durch die Bakterien hervorgerufenen Gärungserscheinungen stellt sehr hohe Anforderungen an die Versuchstechnik sowohl des Bakteriologen wie des Chemikers. Das dazu nötige wissenschaftliche Rüstzeug ist aber erst in den letzten Jahrzehnten durch mühevollen Arbeiten erworben und bedarf noch immer der Vervollkommnung. Infolgedessen besitzt ein großer Teil mit vieler Mühe ausgeführter Arbeiten früherer Jahre nur noch historisches Interesse, da sie in versuchstechnischer Beziehung zahlreiche Mängel aufzuweisen haben. Diese sind besonders: mangelnde Reinheit der Kulturen und unzuverlässige Methoden der auf diesem Gebiete noch jungen analytischen Chemie.

Wenn man nun noch bedenkt, wie überaus empfindlich die Bakterien auf jeden von außen auf sie wirkenden Reiz reagieren, mit anderen Worten, wie sehr verschieden sich ihre Lebensäußerungen bei wechselnden Versuchsbedingungen irgendwelcher Art gestalten, wovon wir heute zahlreiche Beispiele kennen, so wird man sich über die so überaus zahlreichen verschiedenen Befunde nicht mehr wundern. Dazu kommt noch die Tatsache, daß sich durchaus nicht alle Bakterien derselben Art gleich verhalten.

An Versuchen zur Verbesserung dieser verschiedenen Fehlerquellen hat es nicht gefehlt.

So betont schon Robin (1) die Notwendigkeit gleichmäßiger chemischer Beschaffenheit von Nährböden für bakteriologische Untersuchungen. Aus den letzten Jahren ist an dieser Stelle die Arbeit von Fieber (2) besonders erwähnenswert, der in vortrefflicher Weise die Mängel der bisherigen bakteriologischen Gasanalyse klarlegt und beseitigt hat.

Wie schon erwähnt, sind die Eigenschaften der pathogenen Bakterien bisher meist von medizinischer Seite studiert worden. Ich habe daher

als Chemiker mit großem Interesse die sich mir bietende Gelegenheit benutzt, einige Vertreter dieser Art zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit zu machen, um so mehr, als bisher relativ wenige Untersuchungen über die fermentativen Leistungen der in meiner Arbeit in Frage kommenden beiden pathogenen Arten, *Bact. paratyphi* A und B, vorlagen. Veranlassung zu dieser Arbeit gaben die über diese, dem größeren Verband der Typhus-Coli-Gruppe angehörenden, Bakterien in den letzten Jahren im hiesigen Hygienischen Institut angestellten Untersuchungen von Wagner (3 u. 4).

In der zuletzt hier ausgeführten Arbeit unterzieht Wagner die fermentativen Leistungen von Typhus-, Paratyphus A und B-Bakterien gegenüber verschiedenen Alkoholen, Zuckern und Glykosiden einer vergleichenden Untersuchung, die indessen, wie er selbst betont, bei der von ihm angewandten Versuchsanordnung nur relative Werte ergibt. Man kann jedoch sagen, daß die Anzahl der herangezogenen Stämme und untersuchten Stoffe, sowie die Vollkommenheit der angewandten Versuchstechnik den vom Verf. gezogenen Schluß berechtigt, „daß das Paratyphus B-Bakterium dem A-Bakterium sowohl qualitativ als auch quantitativ an Gärvermögen überlegen ist“. Wagner befindet sich hier in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen der von ihm zitierten Arbeiten Lehmanns und Bielings.

Wagner wirft nun die Frage nach dem Grunde der beobachteten enzymatischen Minderwertigkeit des *Bact. paratyphi* A auf und fordert weitere Untersuchungen zur Beantwortung derselben.

Entweder, so sagt Wagner, fehlen dem A-Bakterium einige Enzyme, dann muß man einen qualitativ weniger weitgehenden Abbau der vergorenen Stoffe beobachten können, oder die Wachstums- und Lebensenergie des A-Keimes ist auf künstlichen Nährböden geringer als die des B-Bakteriums. Dies muß sich entweder in quantitativen Unterschieden der gebildeten Gärungsprodukte oder in einer geringeren Vermehrung und einem schnelleren Absterben der Keime ausdrücken und auf die eine oder andere Art feststellen lassen. Soweit die Ansicht Wagners.

Demgegenüber möchte ich auf Grund meiner nachstehend verzeichneten Versuchsergebnisse folgende Ansicht diskutieren:

Bei der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen haben wir, wie auch bei anderen Lebewesen, nach Rubner (5) zu unterscheiden zwischen Nutrition = Wachstum und Dissimilation = Umsatz. Die mit dem Begriff der Gärung bezeichnete Lebensäußerung der Mikroorganismen stellt nach den heute vorliegenden Versuchsergebnissen in den meisten Fällen einen Vorgang des Umsatzes dar. Ein solcher ist jedoch ohne gleichzeitiges Wachstum nicht möglich. Wenn man geglaubt hat, aus dem Umstand, daß man in einigen Fällen durch überreichliche Aussaat das Wachstum der Bakterien bei gleichzeitiger Gärtätigkeit ausschließen konnte, das Gegenteil folgern zu können, so ist dieser Schluß, wie Rubner gezeigt hat, als irrig zu bezeichnen.

Die Energiequelle ist für beide Vorgänge bei einigen Bakterienarten die gleiche, bei anderen eine verschiedene. Erstere werden nach Rubner als monotroph, letztere als ditroph bezeichnet. Als Quelle für das Wachstum kommen in erster Linie stickstoffhaltige Stoffe in Betracht; zum Wachstum im engeren Sinne sind überhaupt stickstoffhaltige Stoffe unentbehrlich, während die stickstofffreien Nährstoffe im wesentlichen den Energiebedarf des Umsatzes decken. Ditroph sind z. B. die Hefen,

die einen für die Stickstoff- und Kohlehydraternährung scharf getrennten Stoffwechsel besitzen, und alle Bakterien, mit Ausnahme der echten Fäulniserreger, welche letztere das gleiche Ernährungsmaterial, die Stickstoffverbindungen, für alle Zwecke benutzen. Nawiasky (6) kommt auf Grund eingehender Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß von den von ihm untersuchten Bakterien nur *Bact. Proteus vulgaris* ein echter monotropher Mikrobe ist.

Zweifellos sind nun die von mir untersuchten *Bact. coli*, *paratyphi A* und *B* als ditrophe Bakterien im Sinne Rubners zu bezeichnen. Nun geht aus zahlreichen, von verschiedenen Seiten angestellten Untersuchungen hervor, daß verschiedene Arten ditropher Bakterien eine ungleich stark ausgeprägte Neigung besitzen, die ihnen bei Gärversuchen zur Verfügung gestellten Nährstoffe, die Eiweißstoffe einerseits, die Kohlenhydrate andererseits, auszunutzen.

Ich möchte nun vorschlagen, der Kürze halber die jene bevorzugenden Formen proteinophil, die anderen glykosophil zu nennen.

Um Irrtümer zu vermeiden, möchte ich ausdrücklich betonen, daß diese beiden Tendenzen, die proteinophile und die glykosophile, in ein und derselben Bakterienart nebeneinander vorhanden sind, allerdings in verschiedener Stärke und bei den verschiedenen Bakterien verschieden stark ausgeprägt.

Ferner ist eine bekannte Tatsache, daß Wachstumserscheinungen bei Bakterienkulturen durchweg, durch Zersetzung der Eiweißstoffe, mit Alkalibildung verknüpft sind. So erfolgt nach Smith (7) das Wachstum bei fakultativ anaëroben Bakterienarten fast ausschließlich im offenen Schenkel des Gärröhrchens unter gleichzeitiger Alkalibildung. Andererseits sind die Produkte des durch Zersetzung der Kohlehydrate gedeckten Umsatzes bei den Bakterien in der Hauptsache saurer Natur.

Von den ditrophen Bakterien, die hier allein in Frage kommen, wird nun ein mehr proteinophiler Mikrobe, da er die Kohlehydrate unter gleichen Bedingungen weniger stark angreift als ein mehr glykosophiler, auch sicher schwächere Gärungserscheinungen hervorrufen. Dabei ist es durchaus nicht notwendig, anzunehmen, daß ihm Enzyme fehlen, oder daß seine Vitalität in dem gegebenen Nährmedium geringer sei.

Im Gegenteil wird er sich im Verlaufe des Gärprozesses widerstandsfähiger als der mehr glykosophile erweisen, da er durch Bildung größerer Alkalimengen die schädliche Wirkung der gleichzeitig gebildeten Säuren länger wird ausgleichen können. Was letzteres betrifft, verweise ich hier auf eine Arbeit Hellströms (8), der der Meinung Ausdruck verleiht, daß die größere Widerstandsfähigkeit gewisser Bakterienarten in saueren Gärlösungen darin begründet ist, daß sie stärker als andere die Eiweißkörper der Nährlösung angreifen und so Produkte hervorbringen, die die Azidität vermindern. Auf die Bedeutung der gebildeten Säure für den physiologischen Zustand der Bakterien werde ich später noch zurückkommen.

Hier möchte ich auf Grund meiner Versuchsergebnisse der Ansicht Ausdruck verleihen, daß die „enzymatische Minderwertigkeit“ des *A-Bakt.* gegenüber *Bact. paratyphi B* und *Bact. coli commune* weder in dem Fehlen einzelner Enzyme, noch in schwächerer Wachstums- und Lebensenergie ihren Grund hat, sondern nur in dem Umstande, daß das *A-Bakt.* ein mehr proteinophiler Mikrobe ist als letztere.

Untersuchungsplan.

In meinen, nun folgenden Untersuchungen habe ich versucht, den Nachweis zu führen, welche der von Wagner in Betracht gezogenen Ursachen für das schwächere Gärvermögen des A-Bakt. als zu Recht bestehend anzusehen ist. Hierfür boten sich, wie Wagner selbst angibt, verschiedene Möglichkeiten.

Der Nachweis für eine geringere Lebensenergie des Bact. paratyphi A konnte einmal durch quantitative Analyse der gesamten gebildeten Gärungsprodukte geführt werden. Da nun nach Wagner diese Eigenschaft des Bact. paratyphi A sich am deutlichsten in einer geringeren Gasbildung ausprägt, so lag der Gedanke nahe, die qualitative und quantitative Gasanalyse in 1. Linie zur Beweisführung heranzuziehen. Hierauf mußte ich aber aus folgendem Grunde verzichten:

Wie Frieber in seiner schon erwähnten Arbeit nachgewiesen hat, haben die schwankenden Ergebnisse verschiedener Forscher über die Natur und Menge der bei Gärungen erzeugten Gase ihren Grund darin, daß bis zur Arbeit Friebers in fast allen Fällen die in der Nährlösung gelösten Gase keine Berücksichtigung fanden. Für die exakte quantitative Bestimmung der absorbierten Gase hat nun Frieber einen geeigneten Gärungsapparat erdacht. Dieser war jedoch, bei der Art der Zubehörteile, bei den heutigen Preisverhältnissen nicht zu beschaffen. Ich habe daher, mit Ausnahme der quantitativen Bestimmung des Restzuckers, der Gesamtsäure, sowie der flüchtigen- und nichtflüchtigen Säure, auf eine eingehende quantitative Bestimmung der Gärprodukte, wie sie Frieber ausgeführt hat, Verzicht geleistet, besonders, da zu der fehlenden Möglichkeit einer wirklich einwandfreien Gasanalyse noch der schon von Mendel (9) erwähnte Umstand in Betracht zu ziehen war, daß bei einer, ohne einen neutralisierenden Bodenkörper (CaCO_3) verlaufenden Gärung die Mengen der verschiedenen Gärungsprodukte häufig so gering sind, daß sich eine quantitative Bestimmung derselben schwerlich mit der nötigen Genauigkeit wird durchführen lassen. Von dem Zusatz eines neutralisierenden Bodenkörpers zur Gärlösung mußte ich aber absehen, da ich bei dem Zwecke der von mir angestellten Untersuchungen die Bakterien durchaus den von ihnen selbst geschaffenen natürlichen Bedingungen überlassen mußte. Aus demselben Grunde durfte ich auch bei der fakultativ aëroben Lebensweise der in Frage kommenden Bakterien den Luftsauerstoff nicht völlig ausschließen. Ich wählte daher aus Zweckmäßigkeitsgründen, da ja die entwickelten Gase für mich nicht wichtig waren, als Gärgefäße einfache Stehkolben von ca. 500 ccm Inhalt, die mit einem, nach dem Vorgange Mendels, möglichst gleichmäßig dicken Wattebausch verschlossen wurden. Zur besseren Vermeidung einer Mischinfektion wurde der Kolbenhals außerdem mit einem gleichzeitig sterilisierten, gläsernen Ueberfangdeckel versehen. Die Menge der Gärflüssigkeit betrug bei allen Hauptversuchen genau 300 ccm.

Der nach Fortfall der quantitativen Analyse sich bietende und von mir benutzte 2. Weg ist nun folgender:

Außer durch quantitative Verschiedenheit der Gärprodukte kann sich nach Wagner die geringere Vitalität des A-Bakteriums durch eine geringere Vermehrung und ein schnelleres Absterben der Keime ausdrücken. Einen Einblick in diese Verhältnisse kann man sich verschaffen durch Zählung der Keime in den einzelnen Phasen des Gärprozesses.

Wenn man dann außerdem die jeweils gebildete Säure durch Titrieren bestimmt, so läßt sich daraus gleichzeitig ein zahlenmäßiger Ausdruck für die Intensität der fermentativen Tätigkeit der Bakterien in der betreffenden Zeitperiode gewinnen.

Es kam für mich nun in 1. Linie darauf an, eine Zählmethodik zu finden, die den hier an sie in bezug auf Genauigkeit zu stellenden Anforderungen genügt.

Bevor ich jedoch hierauf näher eingehe, scheint es mir angebracht, zunächst einmal das Notwendige über die Herkunft und biologischen Eigenschaften der zu meinen Hauptversuchen herangezogenen Bakterienstämme, sowie über die Zusammensetzung der von mir verwandten Nährlösung zu sagen.

Beschreibung der Stämme und der Nährlösung.

Das von mir untersuchte *Bact. paratyphi A*, Stamm Stolaszyk, im folgenden abgekürzt mit „Stol.“ bezeichnet, wurde in der bakteriologischen Untersuchungsstelle der Marinestation der Ostsee (damaliger Chef G. Wagner) aus dem Blute eines unter leichten Symptomen erkrankten Marineangehörigen gezüchtet.

Das *Bact. paratyphi B* Stamm „514“ wurde in dem hiesigen Untersuchungsamt, bei typhusartigem Verlauf der Krankheit, aus dem Blute des betreffenden Kranken isoliert.

Der von mir zur Gewinnung weiterer Vergleichsmöglichkeiten hinzugezogene Stamm des *Bact. coli commune* entstammt einer Stuhlaussaat des hiesigen Untersuchungsamtes.

Die biologischen Eigenschaften der erwähnten Bakterien erwiesen sich als völlig normal.

Bei der Zusammensetzung des zu meinen Gärversuchen verwandten Nährbodens habe ich von vornherein darauf verzichtet, als Stickstoffquelle eine chemisch genau definierte Verbindung zu wählen. Die mit dafür in Betracht kommenden, chemisch als einheitlich bekannten Stoffen angestellten Ernährungsversuche Mendels und Friebers haben zu durchaus unbefriedigenden Ergebnissen geführt. Ich habe daher ebenfalls, unter Verwerfung der in keiner Weise einwandfreien Fleischbrühe, das Pepton „Witte“ als Stickstoffquelle gewählt, obgleich bei der Geheimhaltung des Herstellungsverfahrens auch hier unerwünschte Beimengungen nicht ausgeschlossen sind. Ich werde später Gelegenheit haben, hierauf etwas näher einzugehen.

Bei der Wahl der Kohlenstoffquelle waren ebenfalls mehrere Gesichtspunkte zu berücksichtigen. 1) mußte die dargebotene Substanz erwiesenermaßen durch die in Frage kommenden Bakterienarten gut angreifbar sein; 2) war die Möglichkeit der exakten Bestimmung der nicht verbrauchten Menge in Betracht zu ziehen, und 3) spielte bei der Ausdehnung meiner Versuche die Preisfrage eine erhebliche Rolle.

Die zweifellos am häufigsten zu Gärversuchen herangezogene und infolgedessen in bezug auf ihre Gärfähigkeit am eingehendsten studierte Zuckerart ist die Glukose. Wie die Ergebnisse der Arbeiten von Pottvin (10), Harden (11), Segin (12), Lehmann (13), Mendel, Frieber, Wagner und anderer zeigen, wird die erste gestellte Bedingung von diesem Zucker sicher erfüllt. Segin bezeichnet unter den von ihm herangezogenen Zuckerarten den Traubenzucker sogar als besonders leicht angreifbar. Wie ferner die zahlreichen, in dieser Hinsicht aus-

geführten Untersuchungen beweisen, ist bei der hierfür gut ausgebildeten Methodik, im Gegensatz zu der Ansicht Friebers, eine zuverlässige Bestimmung der Restkohlenstoffquelle bei der Glukose wohl möglich. Da außerdem die Preisfrage sich bei der Dextrose im Vergleich zu anderen in Frage kommenden Zuckerarten verhältnismäßig günstig gestaltete, habe ich den Traubenzucker als Kohlenstoffquelle für meine Versuche gewählt. Es wurde als: „Traubenzucker, puriss. wasserfrei“ von Merck bezogen.

Was die Menge der in meiner Gärlösung enthaltenen Nährstoffe anbetrifft, so wählte ich für das Pepton die meist angewandte Konzentration von 1 Proz.

Für die Kohlenstoffquelle sind die Angaben über die für das Entwicklungsvermögen der Bakterien günstigste Konzentration sehr verschieden. Während nach Mendel das Optimum der Konzentration der zu fermentierenden Zuckerlösung bei ungefähr 6—10 Proz. liegt, halten Hellström und Smith übereinstimmend eine Konzentration von über 0,5 Proz. für schädlich. Ich habe daher aus Zweckmäßigkeitsgründen für meine Versuche eine Glukosekonzentration von 0,5 Proz. gewählt. Außer den genannten Bestandteilen wurde den Gärlösungen 0,5 Proz. Kochsalz zugesetzt.

Um eine mögliche Zersetzung zu vermeiden, wurde der Traubenzucker in der 0,5 Proz. entsprechenden Menge der sterilen Pepton-Kochsalzlösung zugesetzt, und die Lösung darauf nochmals 15 Min. sterilisiert. Ich habe versucht, das Sterilisieren der zuckerhaltigen Lösung dadurch gänzlich zu vermeiden, daß ich mir eine sterile, ca. 50-proz. Glukoselösung herstellte, und von dieser „Stammlösung“ mittels einer sterilen Pipette die entsprechende Anzahl Kubikzentimeter der Pepton-Kochsalzlösung zufließen ließ. Ich habe jedoch die Methode als unzweckmäßig aufgegeben, da es aus den schon von Mendel angeführten Gründen sich als unmöglich erwies, den Zuckergehalt der „Stammlösung“ mit der nötigen Genauigkeit zu ermitteln.

Ich komme nun auf die Ermittlung der von mir angewandten Zählmethodik zurück.

Zählmethodik.

Das bei weitem gebräuchlichste Verfahren zur Ermittlung der Anzahl der lebenden Keime einer Bakterienaufschwemmung ist das alte Kochsche Plattenverfahren, daß im Laufe der Zeit von verschiedener Seite zahlreiche technische Verbesserungen erfahren hat. Wie aus der umfangreichen, hierüber erschienenen Literatur hervorgeht, wird trotz aller ihm anhaftenden, und wiederholt hervorgehobenen Mängel das Plattengußverfahren ganz allgemein angewandt. Eine Anwendung der Oberflächenaussaat findet sich bedeutend seltener. Ich verweise hier auf die von Bürri (14), Engberding (15), Viehoveer (16) und anderen hierüber veröffentlichten Arbeiten.

Ich habe nun durch geeignete Versuche, auf deren Wiedergabe im einzelnen ich aus Gründen der Raumersparnis verzichte, erneut festgestellt, daß die Anwendung der Oberflächenaussaat in versuchstechnischer Beziehung bedeutende Vorteile gegenüber dem Plattengußverfahren gewährleistet, und zwar lassen sich die Ergebnisse dieser Versuche wohl so deuten, daß trotz der relativ geringen Dicke der in der Petri-Schale vorhandenen Nährbodenschicht in derselben immerhin derartig anaerobe

Verhältnisse herrschen, daß fakultativ aërobe Bakterienarten, nach Verbrauch des eventuell im Agar- oder Gelatinenährboden eingeschlossenen Sauerstoffes, dadurch in ihrer Entwicklung bedeutende Schädigungen erleiden. Möglich ist allerdings auch, daß Druckverhältnisse und anderes eine Rolle spielt. Es beeinträchtigt dies natürlich in erheblicher Weise die Zuverlässigkeit der Zählung beim Plattengußverfahren. Erwähnen möchte ich noch, daß bei allen Versuchen die Verteilung der keimhaltigen Flüssigkeit auf der Platte nach dem Vorgange von Droßbach (17) durch Neigen der geschlossenen Petri-Schale geschah, um eine Infektion durch in der Luft schwebende Keime während des Ausstreichens mit der Nadel oder dem Glasspatel zu vermeiden. Die Platten wurden im Faust-Heimschen Apparat getrocknet.

Die bei dem Umfang meiner Arbeit gebotene Einschränkung macht eine weitere kritische Besprechung des Plattenzählverfahrens unmöglich. Ich begnüge mich daher mit dem Hinweis auf die von mir angeführte Literatur und die Ergebnisse meiner eigenen Untersuchungen. Ich bin jedenfalls der Ansicht, daß die meisten, von verschiedener Seite gegen das Plattenzählverfahren geltend gemachten Bedenken das Plattengußverfahren betreffen, und bei der von mir bei allen Versuchen in Anwendung gebrachten Form der Oberflächenaussaat fortfallen. Die Sauerstoffbedingungen, die, wie ich gezeigt habe, zweifellos bei allen fakultativ aëroben Bakterienarten eine sehr große Rolle spielen, sind hierbei berücksichtigt. Ich habe bei meinen späteren Versuchen ebenfalls niemals bei den nach 2-tägiger Bebrütung ausgezählten Platten eine nachträgliche Zunahme der Zahl der gewachsenen Kolonien beobachtet.

Immerhin war das Plattenzählverfahren bei den von mir in Aussicht genommenen Versuchen für sich allein nicht als ausreichend zu betrachten, da es doch nur eine indirekte Zählung der vorhandenen Keime ermöglicht. Man darf sich dabei dem Bedenken nicht verschließen, daß besonders in den späteren Phasen des Gärprozesses, wenn bereits eine mehr oder minder große Schädigung der Zellen durch die gebildeten Stoffwechselprodukte eingetreten ist, zweifellos die davon betroffenen Keime nicht immer die verschiedenen, mit der Aussaat verbundenen Manipulationen überdauern werden; sie werden also auf der Agarplatte nicht zu Kolonien auswachsen, sondern zugrunde gehen. Dabei können sie sich in der Gärlösung immer noch, wenn auch äußerst langsam, teilen, und werden am fermentativen Umsatz zweifellos noch beteiligt sein, so daß die Plattenzählung jedenfalls zur Beurteilung der fermentativen Tätigkeit der in den Gärlösungen enthaltenen Bakterien in den betreffenden Zeitperioden zu kleine Werte ergeben wird. Ich verweise hier auf die von Nawiasky zitierte Ansicht Rubners, daß der Verlust der Wachstumsfähigkeit auf künstlichen Nährböden kein Beweis für das Abgestorbensein und die stoffliche Inaktivität der betreffenden Keime ist.

Die durch das Plattenzählverfahren erhaltenen Werte sind also nicht für alle Zwecke gleichmäßig brauchbar und bedürfen der Kontrolle und Ergänzung durch Zahlen, die durch direkte Zählung der Bakterien gewonnen sind. Ich möchte an dieser Stelle auf eine Arbeit Rahns (19) verweisen, der bei seinen Untersuchungen ähnliche Zwecke verfolgt wie ich. Ich habe bei meinen Ueberlegungen naturgemäß seine Ausführungen berücksichtigt, bin aber im allgemeinen der Ansicht, daß auch diese Arbeit in verschiedenen Punkten in bezug auf die Versuchstechnik als unzulänglich anzusehen ist.

Die einwandfreiste Methode der direkten Bakterienzählung ist sicher die von Winterberg (20), A mann (21) und Viehoveer empfohlenen Zählung in der Thoma-Zeißschen Zählkammer. Die von A mann geäußerte Ansicht, daß eine Aufhebung der Eigenbewegung der zu zählenden Bakterien nicht notwendig sei, ist allerdings als unzulässig zu bezeichnen. Auf jeden Fall ist das Verfahren, besonders bei dem ihm von Viehoveer verliehenen Grad der Vollkommenheit, den auf Zählung der Bakterien im gefärbten Ausstrich beruhenden Methoden weit überlegen. Die hierfür von Klein (22) und Skar (23) angegebenen Arten der Ausführung schließen trotz aller Verbesserungen große, schon von Viehoveer erwähnte Fehlerquellen ein.

Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß auch die durch Kammerzählung erhaltenen Zahlen sich nicht ohne weiteres zur Beurteilung aller bei meinen Versuchen zu berücksichtigenden Momente eignen.

Wie aus zahlreichen vorliegenden Versuchsergebnissen hervorgeht, ist die Zahl der direkt gezählten Bakterien stets größer gefunden worden, als die Zahl der durch Plattenzählung ermittelten. Dies hat seinen Grund einmal in der schon erwähnten verminderten Uebertragungsfähigkeit der durch Stoffwechselprodukte geschwächten Keime, zum anderen in der schon von A mann hervorgehobenen Tatsache, daß bei der direkten Zählung die abgestorbenen Zellen mitgezählt werden. Die durch Kammerzählung erhaltenen Zahlen sind demnach zur Ermittlung der Teilungszahl, also zur Beurteilung der Lebensenergie der in einer Gärlösung enthaltenen Bakterien nicht geeignet, da sie die mitgezählten toten Zellen enthalten, und dadurch zu hohe Werte darstellen.

Hierfür sind dagegen die durch Plattenzählung erhaltenen Werte wohl zu benutzen, da man bei den voll übertragungsfähigen Keimen die Gewißheit hat, daß sie sich auch in der Gärlösung noch gut vermehren werden. Die schon erwähnten nicht mehr übertragungsfähigen Keime werden dabei allerdings nicht berücksichtigt, doch ist dieser Fehler nicht so hoch zu veranschlagen, da diese geschwächten Zellen auch in der Gärlösung ein verringertes Teilungsvermögen besitzen werden.

Nun ist aber auf Grund der oben erwähnten Ansicht Rubners diesen, in bezug auf ihre Uebertragungsfähigkeit geschwächten Keimen ihre Beteiligung an dem fermentativen Abbau der gebotenen Nährstoffe nicht ohne weiteres abzusprechen.

Man wird daher zweckmäßigerweise die durch Kammerzählung ermittelten Zahlen zur Beurteilung der fermentativen Tätigkeit der Bakterien verwerten. Gegen Ende des Gärprozesses werden diese Zahlen durch die darin enthaltenen toten Zellen allerdings zu hoch gegriffen sein.

Nach diesen notwendigen Erörterungen komme ich zur weiteren Beschreibung der bei meinen Zählversuchen angewandten Methodik. Zur Ermittlung der zweckmäßigsten Bedingungen, wie Grad der beim Zählen günstigsten Verdünnung, Art des für die Zählplatten zu verwendenden Nährbodens, sowie zur Erwerbung der bei derartigen Versuchen erforderlichen, nicht geringen versuchstechnischen Fertigkeiten, stellte ich mit Reinkulturen des von mir untersuchten Coli-Stammes umfangreiche vergleichende Zählversuche nach beiden eben erwähnten Methoden an. Da der größte Teil dieser Versuche kein allgemeines Interesse für sich in Anspruch nehmen kann, habe ich aus Gründen der Raumersparnis hier auf ihre Wiedergabe verzichtet, und zeichne nur kurz ihre Ergebnisse auf:

Als günstigste Verdünnung erwies sich bei Aussaat von 0,5 ccm keimhaltiger Flüssigkeit eine solche von 1 : 100 000. Da die Anwendung

der zum Vergleich mit 3-proz. Peptonagar herangezogenen „Endo“- und „Bn“-Nährböden keinerlei Vorteil bei Vornahme der Plattenzählung versprach, wurde der billigere Peptonagar zur Herstellung der Zählplatten verwandt.

Betreffs der Zusammensetzung und Eigenschaften der von mir zur Prüfung meiner Kulturen auf Reinheit benutzten „Bn“- und „Ba“-Nährböden verweise ich auf die von ihrem Erfinder, Herrn Prof. Bitter (24), hierüber gemachten Angaben. Wie unter anderen die Ergebnisse der Arbeiten von Bongartz (25) und Gelhaar (26) zeigen, haben sich die genannten Nährböden für differentialdiagnostische Zwecke sehr gut bewährt.

Zur Herstellung der genannten Verdünnung verfuhr ich folgendermaßen:

Der gut durchgeschüttelten Originallösung wurde 1 ccm mit einer in $\frac{1}{10}$ ccm geteilten sterilen Pipette entnommen, und in einem sterilen, mit eingeschlifftem Glasstopfen verschließbaren 100 ccm haltenden Meßkolben durch Auffüllen mit 0,5-proz. Kochsalzlösung bis zur Marke im Verhältnis 1:100 verdünnt. Aus der gut durchmischten Lösung wurde durch Entnahme von 0,1 ccm und Wiederholen derselben Manipulation in einem zweiten 100 ccm haltenden Meßkolben die gewünschte Verdünnung hergestellt. Von dieser Aufschwemmung wurden je 0,5 ccm auf 3 Peptonagarplatten in der schon beschriebenen Weise ausgesät. Um eine bessere Verteilung der Flüssigkeit auf der Agaroberfläche durch Neigen zu ermöglichen, wurden noch je 0,5 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung hinzugegeben. Die Platten wurden dann im Faust-Heimschen Apparat getrocknet und nach 2-tägiger Bebrütung ausgezählt. Wo wegen zu großer Keimzahl eine direkte Zählung nicht mehr möglich war, wurden auf einer Zählplatte 20 Quadrate ausgezählt und die 1 qcm entsprechende Keimzahl mit 67,5, entsprechend dem im Durchschnitt ermittelten Platteninhalt, multipliziert. Die so erhaltenen Zahlen wurden dann auf 1 ccm Originallösung umgerechnet, und die ermittelte Durchschnittszahl unter „Platten“ in die Tabellen eingetragen.

Bei der gleichzeitig vorgenommenen direkten Keimzählung mittels der Thoma-Zeißschen Zählkammer habe ich mich in allen wesentlichen Punkten streng an die von Winterberg und Viehoveer gegebenen Vorschriften gehalten. Wie ich aus eigener Erfahrung bestätigen kann, ist hierbei die peinlichste Sorgfalt erforderlich, wenn man brauchbare Resultate erhalten will. Die Umrechnung der durch Auszählen in der Zählkammer erhaltenen Zahlen auf 1 ccm Kulturflüssigkeit erfolgt nach Berücksichtigung der bei der Herstellung der Zählflüssigkeit an-

gewandten Verdünnung nach der Formel: $x = \frac{n}{y \cdot 250\,000}$; hierbei ist:

x = Keimzahl pro Kubikzentimeter,

y = Summe der ausgezählten großen Quadrate,

n = Zahl der gezählten Keime.

Die so erhaltenen Werte sind in den Tabellen unter „Kammer“ eingetragen. Zu erwähnen wäre noch, daß ich mich bei Ausführung der Kammerzählung des Okulars 4 und des Achromaten 3 mm (n. A. 0,95) mit Korrektrionsfassung von Zeiß bediente. Als Lichtquelle habe ich, wenn angängig, direktes Sonnenlicht, im andern Falle eine „Reform“-Mikroskopierlampe benutzt. Die Zählung der Bakterien erfolgte bei den Hauptversuchen in 6-stündigen Intervallen, da die Schwierigkeit der Versuchstechnik eine häufigere Untersuchung nicht zuließ.

Bei meinen obenerwähnten Vorversuchen habe ich nun einige Beobachtungen gemacht, die sich bei meinen späteren Versuchen wiederholten, und die ich wegen ihrer Bedeutung für den Verlauf meiner Hauptversuche hier wiedergeben muß.

Bei den erwähnten Versuchen benutzte ich anfangs als Nährlösung Fleischbrühe und 1-proz. Peptonwasser, zog jedoch später die zu meinen Hauptversuchen verwandte traubenzuckerhaltige Nährlösung hinzu, um mir einen orientierenden Einblick in die Wachstumsverhältnisse in diesem Medium zu verschaffen. Während ich nun, nach Erlangung der nötigen Fertigkeit, bei Verwendung der erstgenannten Lösung recht gut vergleichbare Werte erhielt, versagte bei der zuckerhaltigen Lösung die Kammerzählmethode regelmäßig nach kurzer Zeit völlig. Nach Verlauf von etwa 30 Stunden trat nämlich in diesem Medium eine spontane Verklumpung der Bakterien ein, die durch Verkittung der einzelnen Individuen zu mehr oder minder großen Häufchen das Zählen in der Kammer unmöglich machte. Die große Masse der Bakterien setzte sich dabei unter Klärung der Gärflüssigkeit am Boden des Gärgefäßes ab.

Eine derartige Klärung der Gärflösungen unter gleichzeitigem Absetzen der Bakterien hat unter anderen schon Mendel in einigen Fällen beobachtet, ohne jedoch der Ursache dieser Erscheinung nachzugehen.

Da ich mich bei der Ausführung dieser Zählversuche an die Vorschriften Winterbergs gehalten hatte, und mir die Arbeit Viehoeffers damals noch unbekannt war, wußte ich dieser Schwierigkeit, auf die ich in der von mir nach einem Aushilfsmittel durchsuchten Literatur verschiedene Hinweise fand, nicht gleich Herr zu werden. Jedenfalls konnte ich mich nicht dazu entschließen, in der von Winterberg geübten Weise diese Schwierigkeiten einfach dadurch zu umgehen, daß ich derartige Bakterienverbände gleich 1 setzte.

Von mir angestellte Versuche, die Ausflockung durch Zusatz kleiner Gelatinemengen als Schutzkolloid zu verhindern, hatten nicht den gewünschten Erfolg.

Schließlich fand ich das Gewünschte in der schon mehrfach herangezogenen Arbeit Viehoeffers, der ebenfalls auf die schon erwähnten Mängel der Winterbergschen Methode hinweist. Ich habe mich der von Viehoeffers gegebenen Vorschriften bei Ausführung der folgenden Versuche mit gutem Erfolge bedient und zur Kammerzählung folgende Mischung gewählt:

Vor Eintritt der Verklumpung wurde die Eigenbewegung der Bakterien durch Zusatz von 10 cmm 1-proz. Schwefelsäure zu 1 ccm der Gärflüssigkeit aufgehoben, worauf zur besseren Sichtbarmachung der Bakterien 1 ccm einer 1:20 verdünnten Methylenblaulösung hinzu gegeben wurde. Dies entspricht einer Verdünnung 1:12.

Nach Eintritt der Verklumpung kam hierzu 1 ccm Kupriammoniak zur Auflösung derselben, entsprechend einer Verdünnung 1:13.

Wenn nun aber Viehoeffers angibt, daß das zugesetzte Kupriammoniak in keiner Weise die Zählung beeinträchtigt, so bedarf dies, wie sich im Verlauf meiner Untersuchungen herausstellte, und wie ich hier gleich im voraus bemerken möchte, doch einer gewissen Einschränkung. Ich habe nämlich die Beobachtung gemacht, daß nach Zusatz von Kupriammoniak zu der zur Zählung entnommenen Kulturflüssigkeit ein mehr oder minder starkes Sinken der durch Kammerzählung erhaltenen Zahlen eintrat. Meine leider zu spät gehegte Vermutung, daß dies seinen Grund in einer durch das Kupriammoniak bewirkten Auf-

lösung der abgestorbenen, bisher mitgezählten Zellen habe, konnte ich durch angestellte Versuche bestätigen. Ich benutzte zu diesem Zweck Bouillonkulturen der von mir untersuchten Bakterienarten, die ich durch Sterilisieren im Dampftopf abtötete, und nach Zusatz von Kupriammoniak im hängenden Tropfen untersuchte. Nach einiger Zeit waren fast alle Zellen aufgelöst. Dadurch ist der Zusatz von Kupriammoniak natürlich von Einfluß auf die Ergebnisse der Zählversuche, indem durch Zusatz dieses Reagenzes ein plötzlicher Sprung in der Reihe der Kammerzahlen hervorgerufen wird, der sich bei Verwertung dieser Zahlen zur Beurteilung der fermentativen Tätigkeit der Bakterien geltend macht.

Ich möchte daher vorschlagen, bei künftigen Versuchen dieser Art das Kupriammoniak von Anfang an der Zählflüssigkeit zuzusetzen. Man wird dadurch den durch das Mitzählen der toten Bakterien verursachten Fehler ausschalten können.

Etwa zur selben Zeit wie das Eintreten der Verklumpung änderte sich auch häufig das Aussehen der Platten: 1) trat durchweg ein mehr oder minder starkes Sinken der Zahl der gewachsenen Kolonien ein, wodurch die Verwertung der Plattenzahlen für meine Zwecke von diesem Zeitpunkt ab unmöglich wurde, und 2) änderte sich das Aussehen der Kolonien selbst. An Stelle des bisher normalen Wachstums traten häufig stark vergrößerte Kolonien mit zerklüftetem Rand und von schleimigem Aussehen. Sie zeigten im Aussehen fast völlige Uebereinstimmung mit der von Wagner beschriebenen und auf S. 47 seiner letztgenannten Arbeit abgebildeten sogenannten Q-form des *Bact. paratyphi A*. Ich habe die biologischen Eigenschaften dieser auf „Endo“- sowie „Ba“- und „Bn“-Platten von mir in Reinkultur gezüchteten schleimigen Abarten eingehend geprüft, in der Hoffnung, echte Mutationsformen vor mir zu haben. Die biologischen Eigenschaften waren jedoch, abgesehen von dem stark schleimigen Wachstum, unverändert normal. Erwähnenswert scheint mir die Tatsache, daß sich das veränderte Wachstum nach mehrmaliger Passage von zuckerfreien Nährböden wieder verlor. — Welcher Art die beobachtete Verklumpung war, werde ich im weiteren Verlauf meiner Arbeit erörtern. Ich möchte nur gleich die Tatsache erwähnen, daß während der Dauer meiner Zählversuche beim *Bact. paratyphi A* eine solche Verklumpung nicht eintrat.

Was die Vorbereitung der zur Aussaat verwandten Bakterien betrifft, die, wie auch Mendel betont, von großer Bedeutung für den Verlauf des Gärprozesses ist, so verfuhr ich dabei in Anlehnung an die Versuche Mendels und Friebers folgendermaßen:

Vor jedem Versuch wurde von den alle 6—8 Wochen frisch abgestochenen Stammkulturen eine 24-stündige Schrägagar-Rasenkultur angelegt. Von dieser wurde durch Abimpfen einer jedesmal möglichst gleichen Menge eine 24-stündige Bouillonkultur hergestellt, und mit dieser, durch Entnahme von 0,3 ccm aus der gut geschüttelten Kultur mittels steriler Meßpipette, die Gärflüssigkeit, die, wie schon erwähnt, jedesmal 300 ccm betrug, in einer Verdünnung 1 : 1000 beimpft.

Um eine bessere Kontrolle zu ermöglichen, wurden jedesmal zwei Parallelversuche gleichzeitig ausgeführt.

Mit jedem Stamm der hier untersuchten Bakterienarten wurden zwei Zählversuche mit je zwei Parallelversuchen durchgeführt, doch habe ich mit Rücksicht auf die hohen Druckkosten nur eine der sich auf diese Weise ergebenden 6 Tabellen zur Erläuterung angeführt (Tabelle I). Da

diese Arbeit gleichzeitig als Dissertation erschienen ist (Kiel), so können die hier fehlenden Tabellen dort eingesehen werden.

Die Kulturflüssigkeit wurde vor der Beimpfung durch 12-stdg. Verweilen im Brutschrank auf die entsprechende Temperatur vorgewärmt und bei Ausführung der Versuche nach Möglichkeit vor Abkühlung geschützt.

Es bedarf wohl kaum der Erwähnung, daß sich die verwandten Meßgerätschaften stets in tadellos gesäubertem und gut getrocknetem Zustande befinden müssen. Bei der Pathogenität der von mir untersuchten *Bact. paratyphi* A und B war es notwendig, die Geräte auch vor der Säuberung zu sterilisieren. Es bedarf nun noch der Erwähnung, daß es bei den herrschenden bedauerlichen Gasverhältnissen nicht möglich war, den provisorisch elektrisch geheizten Brutschrank dauernd auf konstanter Temperatur zu halten. Ich habe bei jeder Zählung die Brutschranktemperatur abgelesen und in der Rubrik „Bemerkungen“ in die Tabellen eingetragen.

Gleichzeitig mit den auf die beschriebene Art ermittelten Keimzahlen wurde die jeweils gebildete Säure bestimmt. Dies geschah auf folgende Weise:

Bestimmung der Säure.

Der Gärlösung wurden 20 ccm mit steriler Pipette entnommen und nach Vertreibung des gelösten Kohlendioxyds durch 15 Min. langes lebhaftes Kochen im Erlenmeyer-Kolben am Rückflußkühler, mit n/10-Kalilauge titriert. Die Bestimmung des Endpunktes geschah nach dem Vorgange Mendels durch Tüpfeln auf Azolithminpapier. Die in den Tabellen unter „Säure“ aufgezeichneten Werte beziehen sich auf 1000 ccm Lösung.

Bei Bewertung der durch Titrieren ermittelten Säuremenge ist indessen wohl zu berücksichtigen, daß die so erhaltenen Zahlen nur die nach Abzug der, gleichzeitig aus den Eiweißstoffen gebildeten, unbekannt Alkalimenge von der absolut gebildeten Säuremenge sich ergebenden Werte darstellen.

Erläuterung der Tabelle I.

Aus den auf die im vorhergehenden beschriebene Weise erhaltenen Tab. Ia und Ib, die die Ergebnisse von zwei gleichzeitig ausgeführten Versuchen darstellen, ist die Tab. Ic gewonnen.

In die mit „Kammer“, „Platten“ und „Säure“ bezeichneten Spalten sind jeweils die Durchschnittswerte von Ia und Ib eingetragen worden. Es bedeuten die Spalten folgendes:

a) erhält man, indem man von der folgenden Kammerzahl die vorhergehende abzieht (Zuwachs);

b) indem man die in a) gewonnene Differenz zu der vorangehenden Plattenzahl addiert;

c) enthält die Anzahl der erfolgten Teilungen in den betreffenden 6 Std.;

d) enthält den Zeitraum, der zwischen 2 aufeinanderfolgenden Teilungen während des betreffenden 6-stdg. Zeitraumes liegt, ausgedrückt in Stunden und Minuten;

e) die in noch zu erläuternder Weise gewonnenen Durchschnittszahlen der während des 6-stdg. Zeitraumes an der Säurebildung beteiligten Bakterien;

f) erhält man durch Abziehen der folgenden „Säurezahl“ von der vorhergehenden.

g) enthält die von 10 Millionen Keimen in den entsprechenden 6-stdg. Zeiträumen des Prozesses erzeugte Säuremenge.

Zu den hier berechneten Teilungszahlen führte mich folgende Ueberlegung:

Als voll entwicklungsfähig sind zweifellos diejenigen Keime zu betrachten, die nach Aussat auf den Agarplatten zu Kolonien ausgewachsen und als solche gezählt sind. Hierbei ist der schon erwähnte Einwand zu machen, daß ein Teil schon etwas geschwächter Zellen durch die Uebertragung abstirbt und also nicht mehr gezählt wird. Die durch Auszählung der Platten gewonnenen Zahlen werden also etwas zu niedrig gegriffen sein, worauf im vorhergehenden schon hingewiesen wurde. Jedoch ist anzunehmen, daß bei der Wahl des Impfmateri- als und bei der Art der Einsaat dieser Fehler nicht bedeutend sein wird. Demgegenüber werden aber die durch Kammerzählung erhaltenen Zahlen aus den schon erläuterten Gründen durchweg zu hoch sein. Ich habe daher, wie schon erwähnt, die durch Plattenzählung gewonnenen Zahlen als Grundlage für die Berechnung der Teilungszahl gewählt, da die Anbringung einer Korrektur sehr zweifelhaft ist.

Alle Berechnungen beziehen sich auf Tab. I c. Es haben sich 235 000 keimfähige Zellen in 6 Std. um 317 Millionen vermehrt (Spalte a = Zuwachs), also auf 317 Millionen (Spalte b), wobei die geringe Einsaatmenge, als innerhalb der Fehlergrenzen liegend, nicht berücksichtigt ist.

$$235\ 0\ 0 \text{ mal } 2^n = 317\ 000\ 000, \text{ wobei } n = \text{Teilungszahl.}$$

Es ergibt sich für n:

$$n = \frac{\log 317\ 000 - \log 235}{\log 2} = 10,4 \text{ (Spalte c)}$$

d. h. während der ersten 6 Std. teilen sich die Zellen, eine gleichmäßige Teilung vorausgesetzt, 10,4 mal, also alle 35 Min. (Spalte d); ebenso: von der 6. bis zur 12. Std. haben sich 159 000 000 (Platten) um 122 000 000 (Spalte a) auf 281 000 000 (Spalte b) vermehrt;

$$\text{also: } n = \frac{\log 281 - \log 159}{\log 2} = 0,8215$$

d. h. im Verlauf der 2. 6-stdg. Phase verläuft die Teilung alle 7 Std. 18 Min. (6 Std. durch 0,8215 usw.

Wie schon erwähnt, ist der Zweck vorliegender Untersuchungen, die Wachstums- und Gärungsenergie der behandelten Bakterienarten einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen. Für die Wachstumsenergie finden wir ein Kriterium in den ermittelten Teilungszahlen. Andererseits stellen die bei den Gärungsprozessen erzeugten Säuren einen quantitativ leicht greifbaren Ausdruck für die Intensität und den Ablauf dieses Vorganges dar.

Aus den oben angeführten Gründen sind für die folgenden Berechnungen die in der Kammer gezählten Zellen zugrunde gelegt.

Die Ermittlung der jeweils erzeugten Säure bezogen auf eine in der Zeiteinheit von 6 Std. am Umsatz beteiligte Bakterienmenge von z. B. 10 Mill. bietet uns einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Stärke des Umsatzes. Zur Berechnung dieses Wertes gelangt man auf die folgende Weise: Nach Verlauf der ersten 6 Std. ist die gebildete Säure äquivalent 5,65 ccm n/10 Kalilauge. 317 000 000 Zellen waren vorhanden. Bei Beginn des Prozesses war die Reaktion neutral und 624 000 Zellen waren vorhanden. Anfangs sind also nur wenig, und dann immer mehr Zellen an der Säureentwicklung beteiligt. Um aussagen zu können,

Tabelle I.
Bacterium coli commune.

Stunden	III a			III b			Bemerkungen	III c									
	Kammer	Platten	Säure	Kammer	Platten	Säure		Kammer	Platten	a	b	c	d	Säure	e	f	g
0	624 000	225 000	0	624 000	235 000	0	34°	624 000	235 000	.	.	10,40	35'	0	44	.	1,28
6	298 M.	136 M.	4,6	336 M.	182 M.	6,7	34°. Mäßige gleichmäßige Trübung. Wenig Gas	317 M.	169 M.	317	317	0,8215	7 ^h 18'	5,65	372	5,65	0,45
12	475 "	296 "	24,6	403 "	231 "	20,1	34°. Starke Trübung. Starke Gasentwicklung	439 "	264 "	122	281	0,6561	9 ^h 9'	22,35	510	16,70	0,35
18	562 "	228 "	40,3	600 "	260 "	40,3	34°. Wie oben. Geringe Gasentwicklung	581 "	244 "	152	416	0,4441	13 ^h 30'	40,30	625	17,95	0,45
24	614 "	161 "	69,4	724 "	359 "	67,2	34°. Wie oben. Sehr wenig Gas	669 "	260 "	88	332	0,4245	14 ^h 8'	68,30	714	28,00	0,01
30	734 "	419 "	69,4	782 "	401 "	69,4	34°. Keine Gasentwicklung. Geringer Bodensatz	758 "	410 "	89	349	—	—	69,40	575	1,10	0,15
36	405 "	374 "	80,6	379 "	389 "	76,1	34°. Eintritt der Agglutination. Stärkerer Bodensatz	392 "	382 "	—	366	—	—	78,35	447	8,95	0,27
42	504 "	328 "	83,0	499 "	365 "	76,1	34°. Bodensatz verstärkt. Flockige Trübung	502 "	347 "	—	—	—	—	79,55	—	1,20	—
48	—	—	—	—	—	—	34°. Die Lösungen haben sich fast völlig geklärt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

wieviel Säure in dieser Zeit von z. B. 10 000 000 Zellen erzeugt worden ist, muß ich einen mittleren Wert finden für die Zahl der während dieser Zeit an dem Prozeß beteiligten Zellen. Diesen Mittelwert finde

ich, da das Wachstum der Zellen eine exponentielle Funktion der Teilung ist, nach der Formel:

$$m = \frac{a \cdot \int_0^n 2^n \cdot dn}{n} = \frac{a \cdot \int_0^n e^{n \ln 2} \cdot dn}{n}$$

(m = Mittelwert, a = Anfangswert der vorhandenen Zellen, n = Teilungszahl). Es ergibt sich also:

$$m = \frac{a}{n} \left\{ \frac{e^{n \ln 2}}{\ln 2} - \frac{e^{0 \ln 2}}{\ln 2} \right\} = \frac{a}{n} \cdot \frac{e^{n \ln 2} - 1}{\ln 2} = \frac{a \cdot e^{n \ln 2} - a}{n \cdot \ln 2} = \frac{\text{Endwert} - \text{Anfangswert}}{n \cdot \ln 2}$$

Das gibt für m, da: n = 10,4; a = 235 000; a · e^{n · ln2} = 317 000 000; ln2 = 0,6931
m = 44 000 000 (Tafel e).

Die Mittelwerte für die weiteren 6-stündigen Phasen lassen sich einfach als arithmetisches Mittel berechnen, ohne daß man über die Fehlergrenze hinausgeht. Der Grund hierfür ist die erheblich kleinere Teilungszahl n, die für die zweite, dritte . . . Phase in Betracht kommt.

Ich habe die ermittelten Teilungszahlen und die von der Bakterien-einheit erzeugten Säuremengen, also die Spalten c und g der hier erläuterten Tabellen, in der Tab. II zusammengestellt. Die hier einge-

Tabelle II.

Stunden	Coli		Para A		Para B	
	c	g	c	g	c	g
0-6	10,70	2,67	10,21	2,9	13,0	Spur
6-12	1,54	0,58	2,82	0,41	4,11	"
12-18	0,51	0,43	0,45	0,70	0,41	0,43
18-24	0,44	0,48	—	0,35	0,48	0,22
24-30	0,42	0,17	—	0,14	—	0,15
30-36	—	0,15	—	0,10	—	0,17
36-42	—	0,27	—	—	—	0,42

tragenen Zahlen stellen die Durchschnittswerte aus je zwei zusammengehörenden Tabellen dar. Die Werte der Spalten „Kammer“ und „Platten“ sind, mit Ausnahme der Einsaatmenge, in Millionen ausgedrückt.

Ergebnis der Zählversuche.

Nach den in den nachfolgend aufgezeichneten Tabellen niedergelegten Versuchsergebnissen wird man dem Bact. paratyphi A im Vergleich mit Bact. paratyphi B und Bact. coli commune kaum eine schwächere vitale Energie in dem gegebenen Nährmedium zuschreiben können. In den ersten Stadien des Gärprozesses könnte man dies in bezug auf die fermentativen Leistungen eher von Bact. paratyphi B behaupten, da die Säurebildung sehr gering ist und eine Gasbildung in den ersten 6 Std. überhaupt nicht stattfindet. Doch muß man bei Bewertung der Säurebildung stets den schon erwähnten Einwand berücksichtigen, daß nämlich die titrierte Säuremenge nur einen relativen Wert darstellt. Bindende Schlüsse lassen sich jedenfalls hieraus nicht ziehen, wie denn auch diese Versuchsergebnisse allein keine positive Antwort auf die Frage nach der Ursache der „enzymatischen

Minderwertigkeit“ des *Bact. paratyphi A* geben könne. In einer geringeren Wachstums- und Lebensenergie liegt sie jedenfalls nicht begründet.

Aufklärung der Agglutination.

Ich komme nun auf die erwähnte spontane Verklumpung zurück, deren Ursache festzustellen mir durch die folgenden Untersuchungen gelungen ist:

Bei Durchsicht der Literatur nach einem Mittel, die Kammerzählversuche trotz der Verklumpung durchzuführen, fand ich, wie schon erwähnt, verschiedentlich Hinweise auf das Auftreten ähnlicher Erscheinungen. Dabei fiel mir auf, daß in diesen Fällen das Nährmedium, in dem sich die von der Verklumpung betroffenen Bakterien befanden, durchweg saure Reaktion besessen hatte. Da nun das Auftreten der Verklumpung stets von einer mehr oder minder starken Schädigung der Bakterien begleitet war, die sich in dem Aufhören der Gasbildung und Verringerung oder Stillstand der Vermehrung äußerte, so neigte ich dazu, diese Erscheinungen miteinander in Zusammenhang zu bringen, und einer Einwirkung der gebildeten Säure zuzuschreiben. Schädigungen der Bakterien durch die von ihnen gebildete Säure sind häufig beobachtet. So werden nach Smith Coli-Bakterien in einigen Tagen in 1-proz. Glukosebouillon abgetötet. Da nun eine 1-proz. Zuckerlösung unmöglich bakterizid wirken kann, kommen nur die gebildeten Stoffwechselprodukte, die in derartigen Nährmedien hauptsächlich saurer Natur sind, in Frage. In seiner schon erwähnten Arbeit bestätigt Hellström die Beobachtung Petruschkys, „daß das Maximum der durch die Bakterien hervorgerufenen Azidität . . . in der Regel zugleich den Punkt bezeichnet, bei welchem die Entwicklungshemmung des betreffenden Organismus eintritt“. Das heißt nichts anderes, als daß die gebildete Säure diese Entwicklungshemmung verursacht. Mendel gibt ebenfalls an, daß die von ihm untersuchten Bakterien in den Gärlösungen absterben, ist allerdings der von ihm nicht weiter begründeten Ansicht, daß die Säuremenge im allgemeinen zu gering ist, um bakterizid zu wirken. Ein vollständiges Absterben der Bakterien habe ich bei meinen Versuchen nur in einem Falle bei dem *Bact. coli commune* beobachtet, wo nach 48 Std. die Zählplatten steril geblieben waren, und Ueberimpfungen der Originallösungen auf optimale Nährböden (Blutagar, Zuckeragar) ebenfalls erfolglos blieben.

Wenn aber meine Vermutung, daß die Verklumpung durch die gebildete Säure hervorgerufen würde, zu Recht bestand, so konnte dieser Vorgang bei Betrachtung seiner Erscheinungsform nur als echte „Säureagglutination“ nach Michaelis (27) gedeutet werden. Eine Bestätigung dieser Auffassung schien zunächst eine vergleichende mikroskopische Betrachtung der ausgeflockten Bakterienklümpchen mit einer Serumagglutination zu geben. Ich fertigte nämlich von der abgesetzten Bakterienmasse mehrerer „Coli“- und Para-B“-Kolben einige Geißelpräparate nach Peppeler an, und verglich diese mit entsprechenden Geißelpräparaten echter Serumagglutinationen von Paratyphus B und Typhusbakterien. Das sich ergebende mikroskopische Bild war in allen Fällen das gleiche. Ebenso stellte ich entsprechende vergleichende Untersuchungen im hängenden Tropfen an, wobei die sich ergebenden Bilder ebenfalls keinen Unterschied erkennen ließen.

Der Deutung der beobachteten spontanen Verklumpung als Säureagglutination war nun aber das Bedenken entgegenzusetzen, daß, wie schon erwähnt, bei dem von mir untersuchten Paratyphus A-Stamm im Zeitbereich meiner Versuche diese Erscheinung nicht eintrat, während doch dem *Bact. paratyphi A* die Eigenschaft, durch Säuren bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration (im folgenden mit $H^{(+)}$ bezeichnet) agglutinierbar zu sein, ebenfalls zuzuschreiben ist.

Hierzu wäre zu bemerken, daß die Angaben Michaelis', der in der Säureagglutination der Bakterien einen zur Differentialdiagnose brauchbaren Anhaltspunkt gefunden zu haben glaubte, durch seine eigenen späteren Untersuchungen, sowie durch die Arbeiten Eisenbergs (28) bedeutende Einschränkungen erfahren haben. So war auch in meinem Falle an die Möglichkeit zu denken, daß der von mir untersuchte Paratyphus A-Stamm zufällig ein inagglutinabler sei.

Es war nun zunächst diese Frage zu prüfen und festzustellen, bei welcher $H^{(+)}$ das Maximum der Säureagglutination bei den von mir untersuchten Stämmen lag.

Zu den folgenden Versuchen zog ich zur Gewinnung einer größeren Uebersicht folgende weitere Paratyphus A- und B-Stämme hinzu:

- 1) Paratyphus A „L.“ (Laboratoriums Stamm der bakteriologischen Untersuchungsstelle der Marinstation der Ostsee).
- 2) Paratyphus A „Mews“ (der daselbst isolierte, von Wagner in dem Nachtrag seiner letztgenannten Arbeit erwähnte Stamm).
- 3) Paratyphus A „Hensing“ (der von Wagner in letztgenannter Arbeit beschrieben, aus der „Mischinfektion“ gezüchtete Stamm).
- 4) Paratyphus B „1059“.
- 5) Paratyphus B „8092“ (beide im hiesigen Untersuchungsamt isoliert).

Alle Stämme erwiesen sich bei Prüfung ihrer biologischen Eigenschaften als völlig normal.

Zur Feststellung des Ausflockungsoptimums bediente ich mich der Azetatgemische nach Michaelis. Zur Herstellung der Azetatgemische verwandte ich frisch beschaffte, von mir nachgeprüfte Kahlbaum'sche Normallösungen.

Bei Ausführung dieses und der folgenden Versuche verfuhr ich nach den von Michaelis (29) und Sörensen (30) gemachten Vorschriften. Der Eintritt der Agglutination wurde mittels eines Agglutinoskops nach Kuhn und Woithe festgestellt. Wie aus meinen Versuchen hervorging, lag das Fällungsoptimum der von mir untersuchten Stämme bei fast der gleichen $H^{(+)}$. Die Ausflockungszone erstreckte sich bei allen Stämmen, mit Ausnahme des Coli-Stammes, der erst bei $P^H = 3,79$ eine Ausflockung zeigte, über die $H^{(+)}$: $P^H = 4,39$ bis $P^H = 3,49$.

Der wesentlichste Punkt bei dieser Untersuchung war nun die Feststellung der Tatsache, daß der Paratyphus A-Stamm „Stol.“ durch Säure agglutinierbar ist, und zwar bei derselben $H^{(+)}$ wie die übrigen untersuchten Paratyphusstämme. Meine Vermutung über die Ursache der von mir beobachteten spontanen Verklumpung schien also hinfällig zu sein. Es blieb nur noch die Möglichkeit, daß der Eintritt der Verklumpung beim Paratyphus A in den Gärlösungen bedeutend später erfolgte als bei Paratyphus B und Coli. Diese Möglichkeit prüfte ich dadurch, daß ich die erwähnten Paratyphus A-Stämme in der bei meinen Zählversuchen erläuterten Weise in je 300 ccm der von mir benutzten Nährlösung ansetzte und bei einer durchschnittlichen Temperatur von 35° vergären ließ.

In 1-tägigen Zwischenräumen wurden den Gärlösungen nach kräftigem Umschütteln 10 ccm mit steriler Pipette entnommen und im Reagenzglas im Agglutinoskop untersucht. Der Versuch ergab, daß bei allen untersuchten Paratyphus A-Stämmen die Agglutination erst nach 96 Std. begann und zum Teil erst nach 120 Std. vollständig war.

Wenn auch keine völlige Uebereinstimmung herrschte, so wurde doch durch den Versuch die letzterwähnte Möglichkeit bestätigt, daß nämlich der Unterschied zwischen *Bact. paratyphi* A einerseits und *Bact. paratyphi* B und *Bact. coli* andererseits in bezug auf den Eintritt der Verklumpung nur ein gradueller ist. Damit fiel eines der größten Bedenken gegen meine Auffassung der Verklumpung als Säureagglutination fort; indessen waren noch weitere Beweise notwendig.

Zunächst einmal durfte, falls meine Auffassung zu Recht bestand, die Agglutination in künstlich neutral erhaltenen Gärlösungen nicht eintreten.

Ich beschickte nun 8 Kolben mit je 300 ccm der Nährlösung, wozu das 5-fache der auf Grund der bisher beobachteten Säurebildung berechneten Menge an gepulvertem kohlen-sauren Kalk gegeben wurde. Die gebildete Säure war dabei als Essigsäure gerechnet. Der Kalk wurde vor der Verwendung für sich sterilisiert, und die fertige Lösung nochmals 15 Min. in den Dampftopf gestellt. Diese Lösungen beimpfte ich in der beschriebenen Weise mit den erwähnten Stämmen und stellte die Kolben wieder in den Brutschrank, dessen Temperatur bei diesem Versuch zwischen 35 und 37° schwankte. Die Untersuchungen im Agglutinoskop fanden wie beim vorigen Versuch in eintägigen Zwischenräumen statt. Hierbei war wegen des Kalkzusatzes ein Umschütteln der Lösungen nicht möglich, doch war dies nicht von Belang, da im Gegensatz zu den sauer vergorenen Lösungen bei diesem Versuch ein Absetzen der Bakterien nicht eintrat, die Flüssigkeit vielmehr in allen Kolben während der 12-tägigen Versuchsdauer stets gleichmäßig getrübt blieb. Das Ergebnis dieses Versuches war, daß bei keinem der untersuchten Bakterienstämme eine Agglutination eintrat. Der Sicherheit halber habe ich diesen Versuch noch einmal wiederholt, wobei das Ergebnis das gleiche blieb. Die Reaktion der Nährlösungen war stets neutral.

Hiermit war der indirekte Beweis für die Richtigkeit meiner Ansicht erbracht, den direkten führte ich durch Bestimmung der $H^{(1)}$ der Gärlösungen nach eintretender Verklumpung.

Da für meine Zwecke die kolorimetrische Bestimmung mittels der dafür von Sørensen zusammengestellten Indikatorenreihe hinreichend genau war, habe ich diese Methode der zwar exakteren, aber umständlicheren elektrochemischen Messung vorgezogen.

Die bisher untersuchten Stämme wurden in der üblichen Gärlösung angesetzt und die Messung nach eingetretener Agglutination vorgenommen.

Eine Annäherungsbestimmung der $H^{(1)}$ mittels Methylrot und Methylorange zeigte mir, daß dieselbe etwa in dem Bereich $P^H = 3,6 - 4,2$ lag. Ich benutzte daher für die genauen Messungen Methylorange als Indikator.

Als Standardlösung diente mir die Zitratmischung nach Sørensen. Die zur Herstellung dieser Lösungen erforderliche kristallisierte Zitronensäure erhielt ich durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Meyerhoff aus den Beständen des Physiologischen Instituts. Die Zitratlösung

wird hergestellt durch Auflösen von 2,1008 g der kristallisierten Zitronensäure in 20 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH; die Lösung wird mit dest. H₂O auf 100 ccm aufgefüllt.

Die Versuche ergaben, daß die H^(c) der Gärlösungen in den kritischen Zeitpunkten zwar nicht ganz das Fällungsoptimum der untersuchten Bakterienstämme erreicht, wohl aber in die beobachtete Ausflockungszone fällt.

Auf Grund der Ergebnisse der angestellten Versuche ist nun meines Erachtens als bewiesen anzusehen, daß die von mir beobachtete spontane Verklumpung eine typische Säureagglutination darstellt. Wenn dies aber der Fall ist, so ist die von mir beobachtete Tatsache, daß die Agglutination beim Paratyphus A bedeutend später, und bei sogar noch etwas geringerer H^(c) eintritt als bei Paratyphus B und Coli, das A-Bakterium sich im Verlauf des Gärungsprozesses also als „widerstandsfähiger“ erweist als die letzteren, von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der „enzymatischen Minderwertigkeit“, des Bact. paratyphi A.

Wenn nämlich, wie hieraus hervorgeht, das Bact. paratyphi A dieselbe H^(c) später erreicht als Bact. paratyphi B und Coli, so kann dies im Zusammenhang mit den Ergebnissen meiner vorhergehenden Versuche nur dahin gedeutet werden, daß das Bact. paratyphi A durch stärkere Inanspruchnahme der gebotenen Stickstoffnahrung relativ mehr Alkali erzeugt als paratyphi B und Coli unter den gleichen Bedingungen, und dadurch die H^(c) längere Zeit herabsetzt.

Wenn, wie Tab. II zeigt, das Bact. paratyphi B bei relativ geringerer Säureproduktion trotzdem die gleiche H^(c) bedeutend früher erreicht als Bact. paratyphi A, so hat das umgekehrt seinen Grund darin, daß es durch geringere Zersetzung der gebotenen Eiweißstoffe gleichzeitig weniger Alkali bildet.

Die von mir aufgestellte Hypothese, daß die von Wagner beobachtete „enzymatische Minderwertigkeit“ des A-Bakteriums ihren Grund in dem mehr proteinophilen Charakter dieses Mikroben hat, dürfte also meines Erachtens einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit besitzen.

Analytische Untersuchungen.

Eine weitere Stütze erhält diese Ansicht durch die Ergebnisse der im 2. Teil meiner Arbeit ausgeführten Versuche.

Das von Wagner beobachtete geringere Gärungsvermögen des Bact. paratyphi A kann, wie eingangs erwähnt, außer in einer geringeren Wachstums- und Lebensenergie seinen Grund in dem Fehlen einiger Enzyme haben. Das erstere ist offenbar nicht der Fall. Es war nun der Zweck der folgenden Untersuchungen, festzustellen, ob der 2. Grund zutreffend sei.

Das Fehlen von Enzymen beim Bact. paratyphi A muß sich, wie schon Wagner bemerkt, in dem Auftreten qualitativ verschiedener Zersetzungsprodukte gegenüber paratyphi B und Coli äußern. Ich habe daher die durch die von mir untersuchten Bakterien vergorene, im 1. Teil meiner Arbeit beschriebene Gärlösung einer qualitativen Analyse unterworfen. Von einer eingehenden quantitativen Analyse sollte aus den schon erwähnten Gründen abgesehen werden. Ich habe daher, wie das auch Mendel getan hat, nur die Gesamtsäure, die flüchtige und

die nichtflüchtige Säure, sowie den Restzucker quantitativ bestimmt. Aus naheliegenden Gründen konnte ich diese Analysen nicht mit den zu meinen Zählversuchen verwandten Lösungen ausführen. Ich war daher genötigt, die biologischen und chemischen Untersuchungen getrennt auszuführen, bin aber bestrebt gewesen, die Versuchsbedingungen während des Verlaufs der Gärung, soweit es in meiner Macht lag, möglichst gleichförmig zu gestalten. Ueber die Dauer des Gärungsprozesses hatten mir schon meine Zählversuche einige Anhaltspunkte geliefert. Das Aufhören der Gasbildung als Zeichen für das Ende des Prozesses anzusehen, schien mir nach meinen Erfahrungen nicht zulässig. Eher kann man schon die erfolgte Klärung der Lösungen hierfür benutzen. Ich habe unter Berücksichtigung aller hierfür geeignet erscheinenden, mir im Verlauf meiner erstgenannten Untersuchungen bekannt gewordenen Momente, sowie unter Verwertung der einschlägigen Literatur, den Gärprozeß bei *Coli* und *paratyphi B* nach 5 Tagen, bei *paratyphi A* nach 7 Tagen als beendet angesehen. Der Kontrolle wegen wurden von jedem Bakterium 2 Gärlösungen gleichzeitig angesetzt und analysiert. Mit Rücksicht auf etwa vorhandene leicht flüchtige Zersetzungsprodukte und auf die vorzunehmende Bestimmung des Restzuckers, der beim Erhitzen der Gärlösung eventuell eine weitere Zersetzung erleiden konnte, habe ich von einem Sterilisieren der vorgorenen Kultur abgesehen. Nach beendeter Gärung wurden die Kulturen jedesmal in der üblichen Weise auf Reinheit geprüft.

Bevor ich nun aber an die Versuche heranging, mußte ich mir darüber klar werden, welche der eventl. zu erwartenden Gärungsprodukte ich in den Bereich meiner Untersuchungen einbeziehen wollte. Die Zahl der möglichen und schon gefundenen Zersetzungsprodukte ist bei Gärprozessen eine sehr große und mehr oder minder von der Art der Bakterien und den Versuchsbedingungen abhängig. Zweifellos sind aber noch gar nicht alle tatsächlich entstehenden Stoffe bekannt. Man wird daher gut tun, sich bei Vergleichsversuchen wie den meinigen auf eine bestimmte Auswahl zu beschränken, diese aber dafür auch nach wirklich einwandfreien Methoden zu bestimmen suchen. Ich suchte mir nun zunächst einen Ueberblick über die durch die von mir untersuchten Bakterien in entsprechenden Nährmedien erzeugten Stoffwechselprodukte zu verschaffen. Hierbei stieß ich auf die schon im Anfang meiner Arbeit erwähnte Tatsache, daß nur wenige einwandfreie Bestimmungen der durch die beiden *Paratyphus*arten in sauren Gärlösungen erzeugten Gärprodukte bisher gemacht sind. Besonders gilt dies für den *Paratyphus A*. Beim *Coli* liegen die Verhältnisse bedeutend günstiger. Auf Grund der Ergebnisse der mir zugänglichen Arbeiten sind bei dem *Bact. paratyphi B* in glukosehaltigen Nährmedien folgende Zersetzungsprodukte isoliert worden:

An Gasen: H_2 : CO_2 : H_2S .

An Säuren: Essigsäure und einige ihrer Homologen, Milchsäure, Bernsteinsäure und in einigen Fällen geringe Mengen Ameisensäure. Außerdem Alkohol und in einigen Fällen in sauren Lösungen geringe Mengen Aldehyd.

Was das *Bact. paratyphi A* anbetrifft, so habe ich zuverlässige Bestimmungen der Gärungsprodukte in der mir zugänglichen Literatur nicht gefunden. Dem *Bact. coli* wird unter gleichen Bedingungen allgemein die Bildung derselben Stoffe zugeschrieben, doch ist noch außerdem die Bildung von Aceton und besonders Indol festgestellt

worden. Bezüglich der Indolbildung gehen allerdings, wie schon Mendel in der von ihm gegebenen kurzen Uebersicht darlegt, die Meinungen weit auseinander. Ich selbst habe daher bei meinen Versuchen der Indolbildung besondere Aufmerksamkeit zugewandt.

Mit Ausnahme des H_2 und des CO_2 habe ich alle soeben genannten Gärprodukte in meine analytischen Untersuchungen einbezogen.

Dann kam noch die Prüfung auf Skatol hinzu, das zuweilen bei Zersetzung eiweißhaltiger Stoffe auftritt. Der Begriff „Gärprodukte“ ist hier im weitesten Sinne zu nehmen. Denn streng genommen, stellen der Schwefelwasserstoff, das Indol und Skatol als Eiweißabbaustoffe Fäulnisprodukte dar. Auch die Stellung der Bernsteinsäure ist in dieser Beziehung nicht restlos geklärt.

Für den Nachweis der genannten Stoffe boten sich nun verschiedene Methoden, die auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen zunächst meine Aufgabe sein mußte. Auch bei der qualitativen Bestimmung von Gärprodukten muß auf der von Frieber für die quantitative Analyse gestellten Forderung bestanden werden, daß die zu bestimmenden Stoffe nach Möglichkeit so weit isoliert oder derart nachgewiesen werden, daß Täuschungen durch andere anwesende Stoffe, die ähnliche Reaktionen geben, ausgeschlossen sind.

Ich habe mir nun die genannten Stoffe, zunächst mit Ausnahme des Indols und Skatols, verschafft und zuerst einzeln, dann im Gemisch nachgewiesen. Recht einfach ist der Nachweis des Schwefelwasserstoffs. Bezeichnend für seine Anwesenheit ist neben dem häufig deutlich wahrnehmbaren Geruch die Bräunung von Bleiazetapapier, welche Reaktion ich bei meinen Analysen stets benutzt habe. Die von Mendel angegebene vorübergehende Blaufärbung mit Natriumnitroprussid in alkalischer Lösung habe ich nicht beobachten können. Ich kann dagegen auf Grund meiner Beobachtungen die diesbezüglichen Angaben Zipfels (31) bestätigen. Danach färbt sich ein derartiges Gemisch je nach Konzentration rubinrot bis bräunlich-gelb, doch kann ich diese Reaktion wegen der durch die Farbe der Nährlösung und andere Gärprodukte häufig verursachten Mißfarbigkeit der auftretenden Farbtöne nicht besonders empfehlen. Allerdings wird die Reaktion nach dem Uebersättigen des Gemisches mit Eisessig eindeutiger, kann aber trotzdem nicht als spezifisch für Schwefelwasserstoff gelten.

Für den Nachweis von Azeton kommen die Gunningsche (32) Jodoformreaktion und die Nitroprussidprobe nach le Nobel (33) in Frage. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Alkohol wird die erstere unbrauchbar, da Alkohol dieselbe Reaktion gibt. Für die zweite ist das Vorhandensein von Schwefelwasserstoff häufig recht störend, da die auftretende Rotfärbung dann nicht immer eindeutig ist. Ich habe diese Schwierigkeiten dadurch beseitigt, daß ich, wenn Schwefelwasserstoff nachgewiesen war, denselben aus der zum Nachweise von Azeton verwandten Lösung durch Kochen am Rückflußkühler entfernte. Wie ich mich durch entsprechende Versuche mit einem künstlich hergestellten Gemisch überzeugte, gelingt dann der Nachweis von Azeton ohne weiteres.

Zum Nachweis von Azetaldehyd verfuhr ich nach der von Windisch (34) gegebenen Vorschrift. Mit Rücksicht auf die mir zur Verfügung stehenden 300 ccm Gärlösung beschränkte ich mich bei meinen Versuchen auf ein Destillat von 200 resp. 100 ccm. Außer mit Metaphenyldiamin prüfte ich die betreffende Lösung mit fuchsinschweflig-saurem Natron.

Den Nachweis von Alkohol führte ich nach Baumann (35) durch Versetzen der zu prüfenden Lösung mit Benzoylchlorid und Schütteln mit NaOH bis zur bleibenden alkalischen Reaktion. Die Reaktion ist selbst bei starker Verdünnung noch scharf, muß aber im Destillat angesetzt werden, da Benzoylchlorid ebenfalls mit Kohlehydraten Ester bildet. Zum Nachweis der gebildeten Säuren ist es notwendig, dieselben zunächst einmal, soweit angängig, voneinander zu trennen. Ein Mittel hierzu bietet die Eigenschaft einiger derselben, nämlich der Ameisensäure, Essigsäure und ihrer Homologen, sich im Gegensatz zur Milch- und Bernsteinsäure mit Wasserdämpfen zu verflüchtigen. Die Flüchtigkeit dieser Säuren ist aber eine sehr verschiedene, und zwar ist von den hier in Betracht kommenden Säuren die Buttersäure am leichtesten, die Ameisensäure am schwersten flüchtig. Wie die durch eine geringe Flüchtigkeit der Milchsäure möglichen Fehler zu vermeiden sind, werde ich später erörtern.

Unter diesen Umständen ist natürlich, wenn man eine vollständige Trennung von flüchtiger und nichtflüchtiger Säure erreichen will, je nach Art der anwesenden flüchtigen Säuren eine verschieden große Menge Wasserdampfdestillat erforderlich. Die Angaben hierfür schwanken zwischen 200 und 1500 ccm Destillat. Ich habe nun, um mir hierüber Klarheit zu verschaffen, wässrige Lösungen einiger flüchtiger Säuren, und zwar von Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure, zunächst für sich, dann aus Gemischen, die außerdem Milch- und Bernsteinsäure enthielten, mit Wasserdampf abdestilliert. Zum Destillieren benutzte ich gut ausgekochtes Leitungswasser. Die Menge der vorhandenen Säure wurde vorher und nachher durch Titrieren mit $n/10$ KOH und Tüpfeln auf Azolithminpapier bestimmt. Ich konnte bei diesen Versuchen die Angabe Friebers bestätigen, daß nämlich die Konzentration der Essigsäure von erheblichem Einfluß auf die Schnelligkeit der Destillation ist. Bei der Destillation von 300 ccm zu destillierender Flüssigkeit, die eine 15,56 ccm $n/10$ KOH entsprechende Menge Essigsäure enthielt, und einem Destillat von 800 ccm fand ich darin nur eine 10,41 ccm $n/10$ KOH entsprechende Menge der Säure wieder. Als ich aber dieselbe Lösung vor dem Einleiten von Wasserdampf auf ca. 70 ccm einengte, war die Essigsäure bei einem Wasserdampfdestillat von 500 ccm vollständig überdestilliert. Auf Grund der Ergebnisse meiner Vorversuche habe ich bei Ausführung meiner Analysen die zur Trennung der flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren verwandten 100 ccm Gärlösung, zunächst auf 50 ccm eingedampft, und dann mit Wasserdampf destilliert, bis das Destillat 500 ccm betrug. Die von Mendel gewählte Menge von 200 ccm halte ich, besonders mit Rücksicht auf die Ameisensäure, nicht für ausreichend.

Nun muß man aber bei der durch Destillation bewirkten Trennung von flüchtiger und nichtflüchtiger Säure noch eins berücksichtigen, und das ist die, wenn auch geringe, Flüchtigkeit der Milchsäure. Diese Eigenschaft der Milchsäure war im Verein mit dem anfangs von mir nicht berücksichtigten Laktidgehalt der zu meinen Vorversuchen verwandten hochprozentigen Säure (spez. Gew. = 1,21) schuld an den zuerst sehr schlechten Resultaten dieser Versuche. Ich habe dann den Laktidgehalt der von mir benutzten Milchsäure mit 10,1 Proz. bestimmt und bei meinen Versuchen berücksichtigt, fand aber noch immer zuviel flüchtige und entsprechend zu wenig nicht flüchtige Säure. Ich ließ mir

nun den von Frieber gerühmten Kunzschen (36) Glasperlendestillationsaufsatz anfertigen und setzte mit diesem meine Versuche fort.

Ich habe die von Frieber erzielten, von ihm selbst mit Recht als sehr günstig bezeichneten Ergebnisse bei meinen Versuchen nicht erreicht. Immerhin führten meine Versuche die Vorteile, die die Verwendung des Destillationsaufsatzes mit sich bringt, klar vor Augen. Ich habe daher den Kunzschen Destillationsaufsatz bei meinen Untersuchungen stets angewandt.

Wie nun Friebers Versuchsergebnisse zeigen, und wie ich durch meine Versuche bestätigen konnte, ist die Menge der übergehenden Milchsäure abhängig von der Konzentration derselben und der Destillationsdauer. Ich habe daher bei Ausführung meiner Analysen dafür Sorge getragen, daß die Destillation nicht zu schnell verlief, und daß sich die Menge der im Destillationskolben befindlichen Flüssigkeit nach dem Einleiten von Wasserdampf nicht merklich verminderte.

Ich möchte ferner noch auf folgendes aufmerksam machen: Bei Bestimmung der Gesamtsäure, sowie der flüchtigen und nichtflüchtigen Säure, verfuhr ich bei Ausführung meiner Analysen derart, daß zunächst in 50 ccm Gärlösung, aus der die Gärungskohlensäure durch 15 Min. langes, lebhaftes Kochen am Rückflußkühler entfernt war, die Gesamtsäure durch Titrieren mit $n/10$ Kalilauge und Tüpfeln auf Azolithminpapier bestimmt wurde. Die flüchtige und nichtflüchtige Säure wurde nach erfolgter Destillation von 100 ccm Gärflüssigkeit durch Austitrieren des Destillates und des Destillationsrückstandes bestimmt. Nach Beseitigung der erwähnten Fehlerquellen erhielt ich auf diese Weise bei meinen mit künstlich hergestellten Säuregemischen angestellten Versuchen recht gut vergleichbare Resultate.

Als ich nun aber diese Bestimmungen bei 2 gleichzeitig vergorenen Colikulturen vornahm, ergab sich beim Addieren der flüchtigen und nichtflüchtigen Säure gegenüber der Gesamtsäure ein Mehrverbrauch von 3,55 resp. 3,40 ccm $n/10$ Kalilauge. Ich neigte zunächst dazu, dieses nach der Destillation ermittelte Säureplus dadurch zu erklären, daß durch die längere Behandlung der vergorenen sauren Lösung mit Wasserdampf eine nachträgliche Abspaltung von Säure aus irgendeinem Bestandteil derselben stattgefunden habe. Ich prüfte diese Möglichkeit dadurch, daß ich eine sterile Nährlösung mit einer bestimmten Menge Essigsäure und Schwefelsäure versetzte und derselben Behandlung unterwarf. Dabei wurden die hinzugegebenen Säuremengen genau wiedergefunden. Dieses Ergebnis wurde durch einen zweiten Versuch bestätigt. Nun kam als Fehlerquelle nur noch die in der zu destillierenden Gärlösung enthaltene Kohlensäure in Betracht. Daß diese letzte Vermutung zu Recht bestand, erwies sich dadurch, daß die erwähnten Unstimmigkeiten sich nicht wieder zeigten, nachdem ich die zur Trennung der flüchtigen und nichtflüchtigen Säure verwandten 100 ccm Gärlösung vor der Destillation durch 15 Min. langes Kochen am Rückflußkühler von der darin gelösten Kohlensäure befreit hatte.

Nach der auf die beschriebene Weise erfolgten Trennung der flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren kann der weitere Nachweis der einzelnen Säuren erfolgen.

Zum Nachweis der Ameisensäure benutzte ich die Eigenschaft derselben, Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür zu reduzieren. Die Anwesenheit der Ameisensäure macht sich dabei durch Abscheiden des schwerlöslichen Chlorürs bemerkbar.

Zur Ausführung dieser Reaktion versetzt man die zu prüfende neutralisierte Lösung mit einem Ueberschuß einer Lösung, die 5 Proz. Quecksilberchlorid und 2,75 Proz. Natriumazetat enthält, und erwärmt längere Zeit auf dem Wasserbade.

Falls Ameisensäure vorhanden ist, muß dieselbe vor dem Nachweis der übrigen flüchtigen Säuren zerstört werden. Hierzu bediente ich mich des von Macnair (38) angegebenen Verfahrens. Hiernach werden die freien Säuren 10 Min. lang am Rückflußkühler mit dem gleichen Volumen einer Chromsäurelösung gekocht.

Die Chromsäurelösung wird hergestellt durch Lösen von 12 g Kaliumbichromat in einem Gemisch von 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 100 ccm Wasser.

Durch dieses Verfahren wird die Ameisensäure völlig zerstört, während die übrigen Säuren nicht angegriffen werden. Diese werden nach erfolgter Zerstörung der Ameisensäure durch Wasserdampfdestillation von der Chromsäure getrennt.

Für die qualitative Bestimmung der Essigsäure empfiehlt Frieber deren Ueberführung in den Aethylester oder die Kakodylprobe, während Mendel diese Säure durch die Bildung von basischem Ferriazetat nachweist. Von diesen Reaktionen möchte ich an und für sich der letzten den Vorzug geben, alle aber haben den Nachteil, eben nur die Essigsäure zu berücksichtigen und die etwa vorhandenen Homologen derselben außer acht zu lassen. Ich wählte daher zum Nachweis der übrigen flüchtigen Säuren die von Jensen (39) empfohlene Methode. Diese beruht auf der fraktionierten Fällung der betreffenden Silbersalze und quantitativen Bestimmung des Silbergehaltes der einzelnen Fraktionen.

Bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens verweise ich auf die angegebene Literatur. Es ist mir indessen bei der Methode ein Umstand aufgefallen, der geeignet ist, die sonst vorzüglichen Ergebnisse derselben zu beeinträchtigen.

Ich erhielt nämlich bei der zunächst vorgenommenen Bestimmung der einzelnen Säuren verschiedentlich für den Silbergehalt der Salze viel höhere Werte, als dem berechneten Silbergehalt entsprach. Dabei fiel mir auf, daß in diesen Fällen die im Vakuumexsikkator getrockneten Salze eine mehr oder minder starke Schwärzung aufwiesen. Ich führte diese auf eine durch Lichteinwirkung bewirkte teilweise Zersetzung derselben zurück, die eine Abscheidung von metallischem Silber zur Folge hatte und dadurch naturgemäß zu hohe Silberwerte bedingte. Dieser Zersetzung beugte ich nun dadurch vor, daß ich sowohl die zur fraktionierten Fällung der Salze benutzten kleinen Bechergläser, als auch den Exsikkator mit Asphaltlack bestrich. Diese Maßnahme hatte durchaus den gewünschten Erfolg, indem ich von nun an stets einwandfreie Resultate erhielt. Hinzufügen möchte ich noch, daß ich mich zum Abfiltrieren der ausgefallten Salze mit Vorteil einer kleinen Nutsche bedient habe.

Der nach Bestimmung der flüchtigen Säuren noch vorzunehmende Nachweis der Milch- und Bernsteinsäure vollzieht sich folgendermaßen:

Zum Nachweis der Milchsäure wird allgemein deren Ueberführung in das Zinksalz empfohlen. Es erweist sich nun als notwendig, dieselbe, wie auch die Bernsteinsäure, zunächst aus der wässerigen Lösung mit Aether zu extrahieren. Hierfür sind verschiedene Apparate angegeben, deren unter anderem Mendel und Frieber in ihren Arbeiten er-

wähnen. Diese Extraktion erfordert nun selbst mit dem von Frieber modifizierten Schacherl'schen Apparat einen beträchtlichen Zeitaufwand. Frieber hält zur quantitativen Bestimmung der Bernsteinsäure eine Extraktionszeit von 16—20 Std. für erforderlich. Selbstverständlich muß man auch bei qualitativen Bestimmungen, besonders wenn die Menge des nachzuweisenden Stoffes voraussichtlich sehr gering sein wird, bestrebt sein, denselben nach Möglichkeit quantitativ aus dem zu analysierenden Gemisch zu isolieren. Nun schien es mir aber in Anbetracht der heutigen Gasverhältnisse ratsam, die Extraktionszeit so kurz wie möglich zu gestalten. Ich beschloß nun, es zunächst einmal mit der von Fischer und Eismeyer (39) angewandten Methode zu versuchen, und möchte gleich hinzufügen, daß ich dieselbe mit geringen Abänderungen mit gutem Erfolg bei meinen Untersuchungen angewandt habe. Die Bernsteinsäure wird hierbei als Bariumsalz nachgewiesen. Der Gang ist kurz gefaßt folgender: Der nach Entfernung der flüchtigen Säuren verbleibende Rückstand wird mit festem Natriumkarbonat neutralisiert und auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft. Nach dem Ansäuern mit festem Kaliumbisulfat wird der kalte Sirup mit dem 1—2-fachen Gewichte entwässerten Natriumsulfats gut verrieben und im Vakuumexsikkator über Kalziumchlorid getrocknet. Nach erfolgtem Trocknen wird der Kuchen zerrieben und im Soxhlet'schen Extraktionsapparat auf dem Wasserbad mit absolutem Aether extrahiert. Nach Zusatz von ca. 30 ccm Wasser zur angereicherten ätherischen Lösung wird der Aether verjagt, die wässrige Lösung der Säuren mit kohlensäurefreier Barytlauge und Phenolphthalein heiß neutralisiert, filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ccm heißem Wasser aufgenommen und die Lösung nach dem Erkalten mit 25 ccm kaltem absoluten Alkohol versetzt, wodurch vorhandenes Bariumsukzinat ausgefällt wird. Nach einigen Stunden wird vom Niederschlag abfiltriert, das Filtrat eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit Zinksulfat versetzt. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Bariumsulfats darf das Filtrat kein Barium und keine Schwefelsäure mehr enthalten. Das Filtrat wird zum Sirup eingedampft, worauf das Zinklaktat auskristallisiert.

Der wesentlichste Punkt bei Nachprüfung dieses Verfahrens war nun die Feststellung der bei Anwendung des Soxhlet'schen Extraktionsapparates erforderlichen Extraktionszeit. Zu diesem Zweck behandelte ich eine 1-proz. Peptonlösung von bekanntem Milchsäuregehalt in der beschriebenen Weise und stellte durch mehrere Versuche fest, daß nach 6 Std. die Extraktion eine vollständige ist. Dasselbe ergab sich bei entsprechenden mit Bernsteinsäure angestellten Versuchen. Diese Resultate sind im Vergleich mit den oben angeführten als sehr günstig zu betrachten. Die 6-stdg. Extraktionszeit wurde für alle Untersuchungen beibehalten.

Ueber Indolbildung.

Es bleibt nun noch der Nachweis der beiden Eiweißspaltprodukte Indol und Skatol zu erörtern. Der Indolnachweis kommt hier natürlich nur für das Bact. coli in Frage, da die beiden Paratyphusarten als sicher nicht indolbildend anzusehen sind. Der Abbau des Eiweißmoleküls erfolgt bei diesen Bakterien wahrscheinlich in anderer Richtung. Nun ist aber das Indol durchaus nicht immer in Coli-Kulturen nachweisbar, und die Gründe, die hierfür geltend gemacht werden, sind so

verschiedener Art, daß ich einige hier kurz anführen möchte. Als unerläßliche Bedingung für das Zustandekommen der Indolbildung bezeichnet Zipfel das Vorhandensein der Tryptophangruppe in den der Nährlösung zugesetzten Eiweißstoffen, da nur aus diesem, in der Hemigruppe enthaltenen Körper, durch Abspalten des Alanins Indol freigemacht werden kann. Aus anderen Eiweißstoffen ist also eine Indolbildung nicht möglich. Die Mehrzahl der Forscher macht ferner die aus zugesetztem Zucker gebildete Säure für das Ausbleiben der Indolreaktion verantwortlich. Ich möchte hier nur Smith und Kruse (40) erwähnen, während Zipfel auf Grund seiner Versuchsergebnisse diese Begründung nur mit der Einschränkung gelten lassen will, daß zwar bei Verabfolgung von Pepton als Stickstoffquelle die durch die gebildete Säure bewirkte Schädigung ausreicht, um einen Abbau des Eiweißmoleküls bis zum Indol zu verhindern, während dies bei Verwendung von Tryptophan nicht der Fall ist. Von anderer Seite wird der zugesetzte Zucker an und für sich als hemmend für die Indolbildung bezeichnet; ich verweise hier auf Selter (41) und Fischer (42), doch ist diese Ansicht wohl besser dahin zu berichtigen, daß, wie Zipfel (43) ausführt, durch die Anwesenheit von Zuckern oder Nitraten im Nährmittel der Nachweis des gebildeten Indols durch Zerstörung der für die Reaktion charakteristischen Farbstoffe unmöglich gemacht werden kann. Ueberhaupt wird man wohl mit Zipfel in vielen Fällen nicht einwandfreies Arbeiten für die so sehr verschiedenen Ergebnisse verantwortlich machen können.

Andere Forscher, wie Mendel und Auerbach (siehe Fischer), wollen wieder die schädliche Wirkung der gebildeten Säure nicht gelten lassen, während Frieber den von ihm beobachteten negativen Ausfall der Indolreaktion bei typisch Indol bildenden Bakterien dem völligen Luftabschluß zuschreibt.

Es konnte nun im Rahmen dieser Arbeit unmöglich meine Aufgabe sein, über die Berechtigung dieser Anschauungen eingehende Untersuchungen anzustellen. Ich beschränke mich daher auf die Angabe der von mir bei meinen Versuchen bezüglich der Indolbildung festgestellten Tatsachen. Da die Wahl und richtige Ausführung des Indolnachweises sicher eine erhebliche Rolle spielt, gebe ich hier kurz die von mir benutzten Reaktionen an.

Zipfel gibt in seinen erwähnten Arbeiten eine kritische Uebersicht über die verschiedenen zum Indolnachweis benutzten Reaktionen. Ich habe von diesen die Reaktion nach Böhme, Legal-Weyl und Morelli zu meinen Versuchen herangezogen. Ich bin der Ansicht, daß diese Reaktionen bei richtiger Ausführung nahezu gleichwertig sind, und möchte hier gleich erwähnen, daß sich ihr Ausfall bei meinen Untersuchungen in jedem Fall deckte. Meiner Ansicht nach ist es entschieden ratsam, besonders in zweifelhaften Fällen, die Reaktion im Destillat der Nährlösung anzustellen, da hierdurch verschiedene störende Momente ausgeschaltet werden, auch möchte ich im Zweifelsfalle den Ausfall der Morellischen Reaktion als beweisend ansehen, da diese keinen störenden Einflüssen ausgesetzt und durchaus zuverlässig ist. Allerdings wird die hierbei auftretende Rotfärbung des Oxalsäurepapiere häufig erst am 3. Tage lebhaft. Betreffs der Böhmischen Reaktion pflichte ich der Ansicht Zipfels bei, daß die getrennte Anwendung von p-Diaminobenzaldehyd und Salzsäure der Anwendung eines auf Vorrat hergestellten Gemisches überlegen ist. Bezüglich der bei der Legal-Weilschen Reaktion auftretenden Färbungen kann ich, soweit dies meine Versuche

ermöglichen, die Angaben Zipfels bestätigen. Zur Nachprüfung der genannten Reaktionen habe ich, da reines Indol wegen zu hohen Preises nicht zu beschaffen war, 1-proz. Peptonwasserkulturen mehrerer Coli-Stämme benutzt. Ich habe dann diese Reaktionen bei jeder sich bei meinen Versuchen bietenden Gelegenheit angewandt, und bin dabei zu folgenden Ergebnissen gelangt:

In Peptonwasserkulturen ohne Traubenzuckerzusatz, sowie in den unter Kalkzusatz neutral vorgorenen Kulturen war die Indolreaktion stark positiv. In allen sauer vergorenen Lösungen war sie negativ. Leider konnte ich, da reines Tryptophan nicht zu beschaffen war, die diesbezüglichen Angaben Zipfels nicht nachprüfen. Jedenfalls bin ich der Ansicht, daß bei Verwendung von Pepton als Stickstoffquelle die Indolbildung durch die aus dem vergorenen Zucker gebildete Säure beim *Bact. coli* verhindert wird.

Für den Nachweis des Skatols, das sich, wie schon erwähnt, zuweilen als bakterielles Eiweißspaltprodukt findet, kommen ähnliche Reaktionen wie für den Indolnachweis in Betracht.

Ueber die Skatolreaktion.

Man kann dafür die auch zum Indolnachweis verwandte Legal-Weylsche und Böhmische Reaktion benutzen.

Die Angaben über die bei Anwendung der letzteren bei Anwesenheit von Skatol auftretenden Färbungen sind verschieden. Im allgemeinen wird das Auftreten einer der Indolreaktion sehr ähnlichen Rosafärbung angegeben, die sich von der durch Indol hervorgerufenen dadurch unterscheidet, daß die rote Farbe beim Ausschütteln mit Chloroform anstatt mit violetter mit blauer Farbe in Lösung geht. Von anderer Seite wird dagegen das Auftreten einer vorübergehenden intensiven Blaufärbung beschrieben. Bei Anwendung der Legal-Weylschen Reaktion wird das Skatol, wie Zipfel gezeigt hat, je nach Konzentration, durch eine goldgelbe bis gelbe Farbe der Lösung kenntlich. Die Farbe verschwindet beim Uebersättigen mit Eisessig, wodurch eine Verwechslung der Farbtöne mit den durch Indol bei großer Verdünnung hervorgerufenen vermieden werden kann. Es schien mir nun besonders in bezug auf die Böhmische Reaktion empfehlenswert, eine Nachprüfung der gemachten Angaben vorzunehmen, und zugleich beide Reaktionen in bezug auf ihre Brauchbarkeit miteinander zu vergleichen. Ich stellte mir nun wässrige Skatollösungen mit chemisch reinem Skatol (Kahlbaum) her, und zwar in folgenden Verdünnungen: I. 1:1000, II. 1:1 000 000 und III. 1:500 000. Diese Lösungen prüfte ich nach beiden Methoden. Dabei hatte ich folgende Ergebnisse: Lösung I färbte sich nach Böhme zunächst intensiv rosa. Bei gelindem Erwärmen ging die Farbe in ein tiefes Blau über, das nach kurzer Zeit einem schwachen mißfarbigen Gelb Platz machte. Bei den übrigen Lösungen erhielt ich nach Böhme überhaupt keine Reaktion mehr. Da ich bisher auf Vorrat hergestelltes Böhmisches Reagens benutzt hatte, versuchte ich es nun mit einer bei Ausführung jeder Reaktion frisch hergestellten Mischung von konzentrierter alkoholischer Aldehydlösung, konzentrierter Salzsäure und Alkohol in den von Böhme angegebenen Mengenverhältnissen. Hiermit erhielt ich bei Lösung I dieselben Färbungen. Lösung II zeigte eine geringe Rosafärbung, die schnell in blau und grünblau umschlug und dann völlig verschwand. Bei Lösung III waren die auftretenden Fär-

bungen so flüchtig und so gering, daß sie nicht mehr einwandfrei zu deuten waren. Danach ist also die Böhmische Reaktion, selbst bei Anwendung frisch hergestellter Lösungen, nur bis zu einem Skatolgehalt im Verhältnis 1:100 000 brauchbar.

Für die Legal-Weylschen Lösungen konnte ich die von Zipfel für wässrige Lösungen gemachten Angaben bestätigen, wobei ich jedoch auf folgendes aufmerksam machen möchte: Versetzt man die alkalische gelbe Lösung sofort mit überschüssigem Eisessig, so tritt, falls nur Skatol zugegen ist, glatte Entfärbung ein. Läßt man aber die Lösung einige Zeit stehen, so färbt sich dieselbe mit Eisessig bläulich- bis smaragdgrün, gibt also die Indolreaktion. Man muß also, um Irrtümer zu vermeiden, das Uebersättigen mit Eisessig sofort vernehmen.

Ich hatte ferner die Absicht, dieselben Untersuchungen auch in 1-proz. Peptonwasser anzustellen. Nun gibt aber Reichl (44) an, daß aromatische Aldehyde, z. B. Benzaldehyd, unter Zusatz von Ferrisulfat als Oxydationskörper, mit der Skatolgruppe des Eiweißmoleküls ähnliche Färbungen wie die hier beschriebenen liefern. Ich prüfte also zunächst einmal eine reine 1-proz. Peptonlösung nach beiden Methoden, und erhielt dabei Färbungen, die, abgesehen von der nur sehr geringen Rosa-färbung nach Böhme, genau denen einer Skatollösung von der Verdünnung 1:1000 glichen. Da dadurch unter Umständen die Möglichkeit des Skatolnachweises in meinen Gärlösungen in Frage gestellt wurde, unterwarf ich 100 ccm derselben Peptonlösung der Wasserdampfdestillation und prüfte das 300 ccm betragende Destillat in derselben Weise. Leider erwies sich dabei meine Hoffnung, daß sich bei Untersuchung der Gärlösung der Nachweis des eventuell gebildeten Skatols im Destillat der Gärlösung würde ermöglichen lassen, als trügerisch. Das Destillat der Peptonlösung gab nämlich nach beiden Methoden eine so ausgesprochene Skatolreaktion, daß an einen Nachweis des durch Bakterien gebildeten Skatols nicht zu denken war. Ich habe diese Versuche mehrfach und stets mit demselben Erfolge wiederholt. Eine Nachprüfung der verwandten Reagentien ergab deren einwandfreie Beschaffenheit. Ob nun in dem von mir verwandten Pepton „Witte“ tatsächlich freies Skatol vorhanden war, oder ob dasselbe durch die Wasserdampfdestillation daraus frei gemacht wurde, bleibt hierbei unentschieden. Der Nachweis des Indols wird, wie aus meinen Ausführungen hervorgehen dürfte, hierdurch nicht beeinträchtigt. Jedenfalls habe ich auf Grund dieser Versuchsergebnisse auf die Prüfung der vergorenen Kulturen auf Skatol verzichtet.

Zur quantitativen Bestimmung der nicht vergorenen Glukose bieten sich, wie schon erwähnt, zahlreiche und gut erprobte Methoden. Eine ausführliche Darstellung der gebräuchlichsten derselben findet sich unter anderem bei Tollens (45) und Abderhalden (46). Welche von diesen den Vorzug verdient, wird viel umstritten, und ist meines Erachtens von den jeweiligen Umständen, unter denen die Bestimmungen ausgeführt werden sollen, abhängig zu machen. So befürwortet z. B. Neuberg (47), im Gegensatz zu der Mehrzahl der französischen Forscher, besonders für die medizinische Praxis die polarimetrische Bestimmung, die er in bezug auf Genauigkeit der Reduktionsmethode für gleichwertig hält. Er weist unter anderem darauf hin, daß die Anwesenheit größerer Mengen von Eiweißbauprodukten die reduktionsanalytische Bestimmung beeinträchtigen kann. Bei den bei meinen Untersuchungen obwaltenden Bedingungen schien mir nun eine reduktions-

analytische Bestimmung vorzuziehen, und zwar entschloß ich mich zur Anwendung der Allihnschen (48) Methode, die auf der gravimetrischen Bestimmung des aus Fehlingscher Lösung unter bestimmten Bedingungen ausgeschiedenen Kupferoxyduls beruht. Auf Grund der von Tollens gemachten Angaben habe ich es vorgezogen, das ausgefällte Kupferoxydul im Wasserstoffstrom zu Kupfer zu reduzieren und so zur Wägung zu bringen. Zum Abfiltrieren des Niederschlages habe ich mit Vorteil sogenannte Antimonröhren mit Glaswolle- und Asbestfüllung benutzt.

Die von mir benutzte Fehlingsche Lösung nach Allihn hatte folgende Zusammensetzung:

173 g Seignettesalz und 125 g Kaliumhydroxyd wurden in Wasser gelöst und die Lösung auf 500 ccm aufgefüllt. Ebenso wurde eine entsprechende Lösung von 34,6 g Kupfersulfat hergestellt. Beide Lösungen wurden getrennt aufbewahrt.

Ich habe das Allihnsche Verfahren nachgeprüft, indem ich zunächst wässrige Dextroselösungen von bekanntem Gehalt, dann solche in 1-proz. Peptonwasser untersuchte. Bei diesen Versuchen stellte sich nun sehr bald die Notwendigkeit heraus, das Pepton der Lösung vollständig zu entfernen, indem ich im Gegensatz zu den mit wässrigen Lösungen erzielten guten Ergebnissen bei Untersuchung der Peptonlösungen schlechte, und zwar durchweg zu hohe, Resultate erzielte. Bei der Untersuchung der Peptonlösung auf reduzierende Substanzen war Glykogen nach der Methode von Pflüger (49) nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Nach Frieber kann man zur Entfernung des Peptons seine Schwerlöslichkeit in starkem Alkohol benutzen. Ich überzeugte mich aber bald davon, daß die Entfernung des Peptons hierbei nicht annähernd quantitativ ist. Dagegen erzielte ich mit dem von Abeles (50) angegebenen Verfahren gute Resultate. Ich habe mich daher bei Ausführung der Restzuckerbestimmungen dieser Methode in der ihr von Bang (51) gegebenen Form bedient. Meiner Ansicht nach gewährleistet diese Methode bei Versuchsbedingungen wie den meinigen und bei sorgfältiger Ausführung durchaus zuverlässige Resultate. Es wurden stets zwei Bestimmungen gleichzeitig ausgeführt.

Hiermit wäre die Beschreibung der von mir angewandten analytischen Methoden beendet, und es ist nur noch das Notwendige über die Ausführung der Analysen selbst zu sagen.

Gang der Analysen.

Ich habe, da mir die Kulturen durch meine Untersuchungen über die Säureagglutination zur Verfügung standen, auch einige der neutral vergorenen Lösungen einer rein qualitativen Untersuchung unterworfen, da es immerhin von Interesse war, festzustellen, ob hier weitgehende Unterschiede in der Art der gebildeten Gärprodukte gegenüber den sauer vergorenen Lösungen vorlagen. Hierbei verfuhr ich folgendermaßen:

Zunächst wurden von 200 ccm der neutralen Lösung etwa 150 ccm in vorgelegten Alkohol abdestilliert (Destillat I). Das stets neutral reagierende Destillat wurde auf Azeton, Azetaldehyd, Schwefelwasserstoff und, bei den Coli-Kulturen, auf Indol geprüft. Die restlichen 100 ccm der Gärlösung wurden abdestilliert und das Destillat auf Alkohol geprüft. Der Rückstand von Destillat I wurde mit 5-proz. Schwefel-

säure angesäuert, die nach Jensen, sowie nach den Ergebnissen meiner eigenen Untersuchungen von keinerlei schädlichem Einfluß ist, und mit Wasserdampf in der beschriebenen Weise destilliert (Destillat II). Ein Teil des Destillates wurde auf Ameisensäure geprüft. Falls diese vorhanden war, wurde die Hauptmenge des Destillates II nach dem Neutralisieren mit Natronlauge auf 50 ccm eingedampft und die Ameisensäure zerstört. Nach erfolgter Wasserdampfdestillation wurde das 500 ccm betragende Destillat mit n/10 kohlenstofffreier Barytlauge neutralisiert und in der beschriebenen Weise auf Essigsäure und ihre Homologen untersucht. Der Rückstand von Destillat II diente zum Nachweis der Milch- und Bernsteinsäure.

Diese Versuche hatten folgendes Ergebnis:

Bei Untersuchung der durch die *Bact. paratyphi* „L“ und „Stol“ vergorenen Lösungen wurden folgende Gärprodukte nachgewiesen: Schwefelwasserstoff, Alkohol, Ameisensäure, Essigsäure, sowie Milch- und Bernsteinsäure. In der Kultur des *Paratyphus* A „Stol“ war außerdem eine sehr geringe Menge Azeton nachweisbar.

In den Kulturen des *Bact. paratyphi* B „8092“ und „514“ wurden nachgewiesen:

Schwefelwasserstoff, Alkohol, Ameisensäure, Essigsäure, sowie geringe Mengen Buttersäure. Außerdem Milch- und Bernsteinsäure.

In 2 untersuchten *Coli*-Kulturen fanden sich:

Schwefelwasserstoff, Indol, Alkohol, Ameisensäure, Essigsäure nebst geringen Mengen Propionsäure, sowie Milch- und Bernsteinsäure.

Die Untersuchung der sauer vergorenen Lösungen vollzog sich folgendermaßen:

Wie schon erwähnt, wurden jedesmal 2 Parallelversuche gleichzeitig ausgeführt. Ich möchte hier gleich bemerken, daß die qualitativen Ergebnisse dabei stets übereinstimmten. Der 300 ccm betragenden Gärlösung wurden zunächst 2mal 25 ccm entnommen und zur Restzuckerbestimmung verwandt.

Die Gesamtsäure wurde in 50 ccm Gärlösung bestimmt, und die Lösung nach vorgenommener Titrierung zur weiteren Verwendung beiseite gestellt.

Darauf wurden 100 ccm Kulturflüssigkeit mit Wasserdampf in der beschriebenen Weise destilliert und im Destillat (I) und Rückstand die flüchtige und nichtflüchtige Säure bestimmt. Das Destillat I diente gleichzeitig zur Prüfung auf Alkohol und Ameisensäure, die indessen, wie ich gleich vorwegnehmen möchte, bei keiner Analyse nachweisbar war. Die nach Entnahme der zu den angegebenen qualitativen Untersuchungen dienenden Anteile verbleibende Hauptmenge des Destillates I wurde auf dem Wasserbade stark eingengt und beiseite gestellt.

Die restlichen 100 ccm der Gärlösung wurden mit n/10 Barytlauge neutralisiert und in vorgelegten Alkohol abdestilliert. Das Destillat (II) diente zum Nachweis des Azetaldehyds, Azetons und Schwefelwasserstoffs.

Darauf wurden der Rückstand von Destillat II und der zur Bestimmung der Gesamtsäure verwandte Teil der Gärlösung mit 5-proz. Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert, bis das Destillat (III) 500 ccm betrug. Das Destillat III wurde mit n/10 Barytlauge neutralisiert, mit dem eingengten Destillat I vereinigt und auf dem Wasserbade zur weiteren Untersuchung auf die flüchtigen Säuren eingengt.

Die Rückstände von Destillat I und III wurden vereinigt und auf Milch- und Bernsteinsäure geprüft.

Ergebnis der Analysen.

Bei der nun folgenden Wiedergabe der Analysenbefunde habe ich die Mittelwerte der quantitativen Ergebnisse, die stets eine befriedigende Uebereinstimmung zeigten, der besseren Uebersicht halber in der Tab. III zusammengestellt.

Tabelle III.

Stamm	Kubikzenti- meter Ge- samtensäure	Kubikzenti- meter flüch- tiger Säure	Kubikzenti- meter nicht- flüchtiger Säure	Zucker- verbrauch
Coli	13,9	8,82	5,15	66,45 Proz.
P. B „514“	11,5	6,65	5,0	48,04 „
P. A „Stol“	7,22	3,55	3,65	27,25 „

Die Säureangaben sind ausgedrückt in den zur Neutralisation verbrauchten Kubikzentimeter n/10 Kalilauge und beziehen sich auf 100 ccm Gärlösung. Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung lasse ich nunmehr im einzelnen folgen.

Die Analyse der Coli-Kulturen ergab die Anwesenheit von:

Schwefelwasserstoff, Alkohol, Essigsäure, Milchsäure, sowie sehr geringer Mengen Bernsteinsäure.

In den Kulturen des Bact. paratyphi B „514“ fanden sich: Schwefelwasserstoff, Alkohol, Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure und sehr geringe Mengen Bernsteinsäure.

Durch das Bact. paratyphi A „Stol“ waren in beiden Kulturen folgende Gärprodukte gebildet:

Schwefelwasserstoff, Alkohol, geringe Mengen Essigsäure, sowie Milch- und Bernsteinsäure.

Wie die Ergebnisse der qualitativen Analyse zeigen, kann bei der fast völligen Uebereinstimmung in der Art der gebildeten Gärungsprodukte bei allen untersuchten Bakterienarten von dem Fehlen einiger Enzyme beim Bact. paratyphi A nicht die Rede sein. Auch bei den unter Kalkzusatz vergorenen Lösungen zeigten sich innerhalb dieser Versuche keine wesentlichen Unterschiede. Bezeichnend für den Gärverlauf in den neutral erhaltenen Lösungen ist das jedesmal reichliche Auftreten von Ameisensäure. Die in der einen Paratyphus A-Kultur aufgefundene Menge Azeton war so gering, daß sie nur schwer nachweisbar war. Im übrigen habe ich die Bildung von Azeton sowie von Azetaldehyd in keinem Falle nachweisen können.

In dem Fehlen von Enzymen liegt das beobachtete geringere Gärvermögen des Bact. paratyphi A also ebenfalls nicht begründet. Dagegen stellen meines Erachtens die quantitativen Analysenergebnisse eine weitere Stütze der von mir aufgestellten Theorie dar. Wie Tab. III zeigt, sinkt die Säureproduktion vom Bact. coli über Bact. paratyphi B bis Bact. paratyphi A. Dieser Befund, der gleich der von Wagner beobachteten geringeren Gasbildung im Vergleich mit Paratyphus B und Coli schwächere Gärungserscheinungen des A-Bakteriums darstellt, entspricht, wie schon eingangs erwähnt, dem bei einem Bakterium mit geringerer glykosophiler Tendenz zu erwartenden. Wie außerdem Tab. II zeigt, ist die Säureproduktion der Einzelzelle beim A-Bakterium in den ersten Phasen des Gärprozesses auf keinen Fall geringer als beim Bact. paratyphi B und coli, die „Gärungsinten-

sität“ ist also die gleiche. Außerdem hatte ich bei den Analysen der sauer vergorenen Lösungen den Eindruck, daß die Menge der gebildeten Bernsteinsäure beim A-Bakterium größer war als bei den beiden anderen untersuchten Bakterienarten, was auch seinen Ausdruck in den Mengenverhältnissen der gebildeten flüchtigen und nichtflüchtigen Säure findet. Dabei ist zu bedenken, daß, wie schon angedeutet, die Herkunft der Bernsteinsäure bei Gärprozessen durchaus nicht sichergestellt ist, dieselbe also sehr wohl ein saures Eiweißabbauprodukt sein kann.

Weitere eingehende qualitative und quantitative Untersuchungen wären hier also sehr erwünscht. Besonders müßte neben der verbrauchten Zuckermenge auch die Menge der verbrauchten Eiweißstoffe bestimmt werden.

Vorläufig bleibt jedenfalls die Verwertung der durch Titrieren ermittelten Säuremenge für sich allein zweifelhaft. Wenn nun aber auch über die verbrauchte Peptonmenge und die Menge des daraus gebildeten Alkalis auf Grund der vorliegenden Versuche keine direkten Angaben gemacht werden können — die bei der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration erzielten Ergebnisse sprechen allerdings für eine stärkere Alkaliproduktion beim *Bact. paratyphi A* — so zeigt doch eine vergleichsweise Betrachtung des Zuckerverbrauchs durch die untersuchten Bakterienarten deutlich, daß die *Bact. paratyphi B* und *coli* mehr glykosophil sind als *Bact. paratyphi A*. Wenn also auch der direkte Beweis für den mehr proteinophilen Charakter des A-Bakteriums nicht erbracht worden ist, so können doch die Ergebnisse meiner Untersuchungen meines Erachtens in ihrer Gesamtheit den Anspruch erheben, einen indirekten Beweis für die Richtigkeit meiner Ansicht darzustellen. Jedenfalls geht aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen hervor, daß von den durch Wagner für die „enzymatische Minderwertigkeit“ des A-Bakteriums zur Diskussion gestellten Gründen keiner als zutreffend zu bezeichnen ist.

Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Kisskalt für sein stets bewiesenes weitgehendes Entgegenkommen, sowie für das meiner Arbeit gegenüber gezeigte rege Interesse meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

- 1) Robin, A., Ein Versuch zur Erzielung gleichmäßig zusammengesetzter Nährstoffe für Medien. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. S. 228.) — 2) Frieber, W., Ueber Bakteriengärungen. [Inaug.-Dissert.] Tübingen 1913. — 3) Wagner, G., Paratyphusbakterien ohne Gasbildungsvermögen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71. H. 1.) — 4) Ders., Beiträge zur Epidemiol. und Bakteriol. des Paratyphus A sowie Untersuchungen über das Gärvermögen der Typhoideen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 90. S. 37.) — 5) Rubner, Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung. (Arch. f. Phys. 1912. Supplementbd.) — 6) Nawiasky, Ueber die Ernährung einiger Spaltpilze in peptonhaltigen Nährböden. (Arch. f. Hyg. Bd. 64. S. 33.) — 7) Smith, Th., Ueber die Bedeutung des Zuckers in Kulturmedien für Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 18. S. 1.) — 8) Hellström, E., Zur Kenntnis der Einwirkung kleiner Glukosemengen auf die Vitalität der Bakterien. (Ebenda. Abt. I. Bd. 25. S. 170.) — 9) Mendel, J., Ueber Umsetzungen verschiedener Zuckerarten durch Bakterien. (Ebenda. Abt. II. Bd. 29. S. 290.) — 10) Pottevin, H., Contribution à Bactériologie des gastro-entérites infectieuses. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 19. p. 426.) — 11) Harden, A., Fermentation of sugars by *Bact. coli commune* and allied organisms. (Transact. Jenner Instit. Vol. 9. 1899.); The chemical action on glucose of the lactose fermenting organisms of faeces. (Journ. of Hyg. 1905. p. 488.) — 12) Segin, A., Ueber die Einwirkung der Bakterien auf verschiedene Zuckerarten.

- Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. S. 202; ebenda. Abt. II. Bd. 12. S. 397.) — 13) Lehmann, E., Zur Biologie von Paratyphus A. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 81. S. 275.) — 14) Burri, R., Das Kochsche Plattenverfahren und seine Abarten. (Lafar. I. § 128.) — 15) Engberding, D., Vergleichende Untersuchungen über die Bakterienzahl im Ackerboden in ihrer Abhängigkeit von äußeren Einflüssen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. S. 569.) — 16) Viehoveer, Botanische Untersuchungen harnstoffspaltender Bakterien usw. (Ebenda. Abt. II. Bd. 39. S. 288.) — 17) Drossbach, P., Aus der bakteriologischen Praxis. (Ebenda. Bd. 12. S. 653.) — 18) Rahn, O., Die Stundenleistung der Einzelzelle von *Bact. lactis acidi*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. S. 375.) — 19) Winterberg, H., Zur Methodik der Bakterienzählung. (Zeitschrift f. Hyg. Bd. 29. S. 75.) — 20) Amann, A., Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskopes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. S. 381.) — 21) Klein, A., Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. (Arch. f. Hyg. Bd. 45. S. 117); Eine neue mikroskopische Zählmethode der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 27. S. 834.) — 22) Skar, O., Eine schnelle und genaue Methode für Zählung von Bakterien und Leukozyten. (Milchwirtschaftl. Zentralbl. 1912. S. 23.) — 23) Bitter, L., Zur Methodik des Typhusbakteriennachweises im Stuhl und Urin. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 59. S. 469.) — 24) Bongartz, Th., Ueber L. Bitters Chinablaunährböden zur Typhusdiagnose. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 71. S. 228.) — 25) Gelhaar, Vergleichende Untersuchungen über den Wert der Kongorotnährböden von Liebermann, Arcél und Schmitz für die Züchtung von Typhusbakterien im Stuhl und Urin. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 78. S. 317.) — 26) Michaelis, L., Die Säureagglutination der Bakterien, insbesondere der Typhusbazillen. (Deutsch. med. Wochenschr. 1911. S. 969; 1915. S. 243; 1917. S. 1506.) — 27) Eisenberg, P., Ueber Säureagglutination von Bakterien und über chemische Agglutinationen im allgemeinen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 83. S. 70 ff.) — 28) Michaelis, L., Methoden zur Herstellung bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen. (Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. v. Abderhalden. Bd. 3. S. 1339.) — 29) Sörensen, H., Ueber die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei biologischen Prozessen. (Ergebnisse der Physiol. Bd. 12. S. 393.) — 30) Zipfel, H., Zur Kenntnis der Indolreaktion. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 64. S. 65.) — 31) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 24. S. 148.) — 32) Abderhalden, Bd. 3. S. 908. — 33) Ders., Bd. 2. S. 17. — 34) Baumann, E., Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 19. S. 3219. — 35) Kunz, R., Ueber Vorkommen und Bestimmung der Milchsäure im Weine. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs-Genußmitt. Bd. 4. S. 673.) — 36) Macnair, Zit. aus Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 27. S. 398. — 37) Jensen, O., Studien über die flüchtigen Fettsäuren in Käse, nebst Beiträgen zur Biologie der Käsefermente. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. S. 161 ff.) — 38) Fischer, H., u. Eismeyer, K., Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. Bd. 47. S. 2036. — 39) Kruse, W., Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. S. 511. — 40) Selter, Ueber Indolbildung durch Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 51. S. 465.) — 41) Fischer, A., Hemmung der Indolbildung bei *Bact. coli* durch Zuckerzusatz. (Biochem. Zeitschr. Bd. 70. S. 105.) — 42) Zipfel, H., Weitere Beiträge zur Kenntnis der Indolreaktion. (Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Bd. 67. S. 572.) — 43) Reichl, Neue Reaktionen des Eiweiß mit aromatischen Aldehyden. (Monatsh. f. Chem. Bd. 11. S. 156.) — 44) Tollens, B., Handb. d. Kohlehydrate. Leipzig 1914. S. 249. — 45) Abderhalden, Bd. 2. S. 185. — 46) Neuberg, C., Polarimetrische oder reduktionsanalytische Bestimmung von Zucker? (Biochem. Zeitschr. Bd. 43. S. 501.) — 47) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 22. S. 451. — 48) Abderhalden, Bd. 2. S. 161. — 49) Abeles, M., Ueber ein Verfahren zum Enteiweißen des Blutes für die Zuckerbestimmung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15. S. 495.) — 50) Bang, J., Ueber die Verwendung der Zentrifuge in der quantitativen Analyse. (Festschr. f. O. Hammarsten. II. S. 1.)

Nachdruck verboten.

Virulenzsteigerung der Typhusbazillen bei einem periodischen Ausscheider.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen (Vorstand: Prof. Dr. K. Wolf).]

Von Dr. med. Georg Lutz, Assistenzarzt für Bakteriologie u. Hygiene.

Man wird bei der energetischen Fassung des Begriffes der Infektion durch Krankheitserreger immer auf die 3 Komponenten kommen: 1) Summe der Eigenschaften des Organismus, 2) Eigenschaften des Erregers, 3) äußere Bedingungen.

Von diesen 3 Größen ist nur die 3. unabhängig, während die Eigenschaften des infizierten Organismus und die Eigenschaften des Erregers jede für sich und in ihrem Wechselspiel von äußeren Bedingungen abhängen und somit diesen entsprechend in ihrem Werte sinken oder steigen.

Daraus ergibt sich als Minimum, daß die Infektion im Körper gar nicht haften kann (natürliche Immunität), und als Maximum, daß dem Organismus durch die Infektion die Möglichkeit des Weiterlebens genommen wird (Tod des Individuums). Dazwischen liegen die Werte für die verschiedenen Erscheinungsformen einer „Krankheit“ als vorübergehende Störung der Lebensvorgänge im infizierten Körper.

Die Eigenschaften der Erreger sind im wesentlichen in ihrer Virulenz vereinigt. Dies kann bei den einzelnen Rassen derselben Art große Schwankungen aufweisen, und auch die einzelne Rasse kann durch Einflüsse der äußeren Umgebung recht erheblich in ihrer Virulenz verändert werden.

Während die experimentelle Virulenzbestimmung sich nur auf Tierversuche erstrecken kann, hatte ich anlässlich der Typhusepidemie im Wilhelmsstift in Tübingen Gelegenheit, ein Beispiel der Virulenzsteigerung durch Menschenpassage zu sehen.

Im Wilhelmsstift in Tübingen brach im Februar 1917 zum ersten Male der Typhus aus, der bei der damals geringen Belegzahl von 15 Menschen zu 10 Erkrankungen führte. (Näheres s. Med. Korresp.-Blatt. 1920.)

In der Zwischenzeit kamen nur einige Erkrankungen vor, die ohne weitere Bedeutung hier übergangen werden können. Im November 1920 erkrankten bei einer Belegstärke von 130 Leuten 35 an Typhus. Wie durch unsere Arbeiten nachgewiesen ist, wurden die sämtlichen Erkrankungen durch eine Bazillenträgerin verursacht, die seit vielen Jahren in der Küche dort beschäftigt war und $\frac{3}{4}$ Jahre vor dem ersten Auftreten des Typhus an einer Lungenentzündung mit Typhus erkrankt war. Seit dieser Zeit ist diese Person periodische Ausscheiderin gewesen und hat so die Infektion der Belegschaft durch die Küche bewirkt.

Was die äußeren Bedingungen der Infektion betrifft, so ist zu bemerken, daß es sich in beiden Fällen um eine Infektion gehandelt hat, die durch das Essen vermittelt wurde, an der also die ganze Belegschaft teilgenommen hatte.

In beiden Fällen handelte es sich ferner um meist jugendliche Leute. 1917 waren es vielfach Leute, die noch nicht zum Militärdienst eingezogen werden konnten. Beim zweiten Auftreten des Typhus stellte der jüngste Jahrgang den Hauptanteil unter den Erkrankten, also diejenigen Studenten, welche erst seit wenigen Wochen im Wilhelmsstift anwesend und nicht im Felde gewesen waren.

Nach den epidemiologischen Erfahrungen und Mitteilungen von Dannemark, Scholler, Fornet und anderen konnte man nach den äußeren Bedingungen der Infektion mit ca. $\frac{1}{3}$ Erkrankungen und 14 Proz. Mortalität rechnen.

Demgegenüber erkrankten beim ersten Auftreten des Typhus 75 Proz. der Belegschaft, aber ohne daß ein Todesfall oder sonstige Komplikationen aufgetreten wären. Klinisch waren es leichte bis mittelschwere Typhusfälle. Das zweite Mal betrug der Prozentsatz zunächst 34. Dabei ist die Zahl aber noch dahin zu korrigieren, daß unter der Belegschaft sich noch eine größere Anzahl befand, die vorher schon Typhus durchgemacht hatte, ferner durch langen Frontdienst, Impfungen u. dgl. eine vermehrte Resistenz gegenüber der Typhusinfektion aufzuweisen hatten, so daß schon mit einer Erkrankung von 40 Proz. nach Abzug der Typhusimmunen gerechnet werden muß.

Schon hier tritt eine ganz auffällige Verschiebung der Verhältnisse auf. Dabei ist nicht anzunehmen, daß die Studenten der 2. Epidemie im Vergleich zu den Erkrankten der 1. Epidemie eine besondere Disposition für die Erkrankung gehabt hätten. Es sind auf jeden Fall dafür keine Anhaltspunkte vorhanden. Aber bei der hohen Erkrankungsziffer von 75 Proz. kann man entschieden annehmen, daß die Quantität der aufgenommenen Erreger beträchtlich war, ihre Qualität für den menschlichen Körper nicht sonderlich gefährlich war, da keine ernsten Erscheinungen bei der ganzen Serie zu verzeichnen sind.

Demgegenüber hat sich die Qualität der Erreger in der 2. Epidemie wesentlich verändert. Wir stehen hier mit einer Erkrankungsziffer von 40 Proz. über dem zu erwartenden Prozentsatz der Erkrankungen. Auch der Verlauf der Krankheit ist im Gegensatz zu 1917 viel gefährlicher geworden. Nach der Zusammenstellung von Herrn Prof. O. Müller (Vorstand d. med. Klinik) starben von den 44 dort untergebrachten Typhusfällen 8, also 18 Proz. Von den verbleibenden 36 Fällen zeigte nur 1 eine typische Typhustemperaturkurve, bei 10 Fällen traten Rezidive auf, bei 29 Fällen stellten sich Komplikationen verschiedenster Art und Schwere ein. Nach dieser Zusammenstellung, die einen generalisierten, außergewöhnlich schweren Verlauf der 2. Epidemie im Verhältnis zur 1. erkennen läßt, ist anzunehmen, daß die Eigenschaften der Erreger sich geändert haben. Diese Änderung muß sich im Körper des Trägers vollzogen haben; die beiden Epidemien sind als Kontrollen der Virulenz zu betrachten. Die 1. verläuft trotz hoher Morbidität harmlos, die 2. auf Grund der gesteigerten Virulenz unter diesen schweren Erscheinungen.

Da die Typhusbazillen bei der Bazillenträgerin mit dem Stuhl ausgeschieden wurden, so liegt die Annahme nahe, diese Virulenzsteigerung auf die Assoziation der Typhusbazillen mit der Bakterienflora des Darmes zurückzuführen.

Es ist durch Tierversuch wiederholt festgestellt worden, daß durch Assoziation eines schwach virulenten Stammes mit anderen Bakterienarten oder pathogenen Keimen die schwache Virulenz erheblich gesteigert

werden kann. Die meisten Versuchsanordnungen sind allerdings nicht einwandfrei, da sie bei Verwendung einer zweiten lebenden Art immerhin die Möglichkeit bestehen lassen, daß durch die zweite Art — gar wenn diese selbst für den Körper auch pathogene Eigenschaften besitzt wie bei Verwendung von Milzbrand oder Streptokokken als zweite Art — die Resistenz des Körpers herabgesetzt wird und somit auch ein weniger stark virulenter Stamm zu Erkrankung oder Tod des infizierten Tieres führen kann, oder aber daß eine Kumulierung der schädigenden Eigenschaften auftritt. Deshalb vertritt Wassermann in seiner Arbeit (Charité-Annalen. Bd. 19) den Standpunkt, daß es sich hier immer um die Kumulierung der beiden Wirkungen handle. Aber neben diesen Arbeiten bestehen andere Versuchsanordnungen, die keinen lebenden Bakterienstamm verwenden und doch die Virulenzsteigerung erzielen. So züchtete Mosny (Centralbl. f. Bakt. Bd. 17. 1895) Pneumokokken erst auf sterilisierten Kulturen von *Staphylococcus aureus* und fand bei Injektion die neuen Pneumokokkenkulturen wesentlich virulenter als die ursprünglichen. Auch Monti (Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1890) erzielte bei Zusatz von Stoffwechselprodukten von Fäulnisbazillen dieselbe Virulenzsteigerung. Ebenso zeigten die Stämme, die Roncali (Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1895) auf Nährböden zusammen mit Tetanus züchtete, wesentliche Virulenzsteigerung. Die neuen Stämme töteten Meerschweinchen, während die ursprünglichen Stämme nicht mehr pathogen gewesen waren. Durch dieselbe Art sollen nun auch Typhus, Cholera und andere Stämme in ihrer Virulenz wieder gehoben werden können.

Nach diesen Arbeiten wäre es nicht von der Hand zu weisen, daß in unserem vorliegenden Falle durch die Einwirkung der Darmbakterien im Laufe der Jahre eine solche Virulenzsteigerung eingetreten wäre, womit der verschiedene Verlauf der Epidemien in Zusammenhang zu bringen wäre.

Dieser Auffassung steht aber die Frage entgegen, ob die Typhusbakterien bei periodischen Ausscheidern überhaupt den Darm als dauernden Siedlungsort haben. Die Befunde bei Operationen und von Sektionen von Typhusbazillenträgern ergaben bei ca. 60 Proz. der Fälle Typhusbazillen im Darm, doch ist durch diesen Befund noch nicht bewiesen, daß der Darm der dauernde Siedlungsort ist. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, daß sie hier von den Gallenwegen her nur angeschwemmt und nicht autochthon sind. Demgegenüber stehen die Befunde in den Gallenwegen einschließlich der Gallenblase mit 91 Proz. positiver Fälle so hoch, daß man die Gallenwege hauptsächlich als Sitz der Typhusbazillen bei Bazillenträgern ansehen muß. Der Weg, auf dem die Gallenwege zum Hauptsitz der Bazillen geworden sind, ist bei der Bakteriämie, die zu Beginn der Erkrankung besteht, nicht verwunderlich. Die spätere azendierende Einwanderung vom Darne her wird heute nicht mehr als wahrscheinlich angesehen, vor allem weil eben die Typhusbazillen in den Gallenwegen meist in Reinkultur vorhanden sind und diese elektive Fähigkeit der Einwanderung den Typhusbazillen doch nicht zugesprochen werden kann. Es ist also nicht zu verwundern, wenn die blutreiche Leber prozentual am meisten mit Typhusbazillen überschwemmt wird, und daß die Bakterien sich hier festsetzen, zumal die Galle die ihr früher zugeschriebenen bakteriziden Eigenschaften nicht besitzt, sondern als günstiges Nährsubstrat für die Entwicklung, speziell der Typhusbazillen, angesehen werden muß.

Damit wird aber die Erklärung der Virulenzsteigerung durch Assoziation mit den übrigen Bakterien des Darmes nicht mehr möglich sein. Die Erklärung muß vielmehr anderswo gesucht werden.

Durch die Infektion mit Typhusbazillen wird der Körper gezwungen, auf die Summe der reaktiven Partialantigene des jeweiligen Stammes Partialantikörper zu bilden. Dadurch werden die Körperzellen instand gesetzt, die Partialantigene des Typhus zu neutralisieren. Es wird als Resultat eine Immunität eintreten, die bei Typhus in der Hauptsache an die Zellen gebunden ist, da sie noch so lange Zeit nach Ueberstehen der Krankheit vorhanden ist, während die Immunitätserscheinungen, die nur kurze Zeit bestehen, im wesentlichen an die Körperflüssigkeiten gebunden sind. Von den Zellen des immunen Körpers findet die Ausschwemmung der Partialantikörper ins Blut statt nach der Art der freien Ambozeptoren, und sie stellen die im Blut nachweisbaren Antikörper dar. — Dies alles schließt aber nicht aus, daß trotz hoher zellulärer und humoraler Immunität doch in der Galle Typhusbazillen sich halten und vermehren können, da der Galle nicht die Eigenschaft zukommt, Trägerin der Immunität zu sein. Andererseits bedeutet das Wachstum in Galle für die Typhusbazillen eine wesentliche Aenderung ihrer äußeren Lebensbedingungen, und es ist als selbstverständlich anzusehen, daß diese Veränderungen ihrer äußeren Lebensbedingungen nicht ohne Einfluß auf die biologischen Funktionen des Stammes bleiben werden.

Somit kommt es zur Ausbildung neuer biologischer Eigenschaften des ursprünglich einfachen Stammes, die bei Uebertragung des Stammes auf nicht immunisierte Menschen als neue reaktive Partialantigene auftreten können.

Von besonderem Interesse war noch eine Erscheinung, die mir während der Impfung der Stiftsinsassen bekannt wurde: Die 1. Impfung erfolgte mit einem Impfstoff aus Militärzeit. Darauf reagierten die meisten Geimpften lokal und allgemein in mittlerer Stärke. Auffallend stark war die Impfreaktion des Herrn G. Die 2. Impfung wurde mit dem epidemieeigenen Impfstoff durchgeführt. Darauf reagierten die meisten Geimpften lokal wie allgemein recht schwer, auch nach der 3. Impfung nicht wesentlich geringer. Dagegen reagierte der Herr G. auf diesen Impfstoff kaum in nennenswerter Weise. Es ergab sich, daß dieser Herr G. im vergangenen Jahr während der Typhuszeit ca. 3 Wochen mit heftigsten Kopfschmerzen, mit Fieber, Benommenheit und 3maliger Darmblutung erkrankt gewesen war. Es ist also die Erklärung der abweichenden Impfreaktion darin zu suchen, daß Herr G. durch Ueberstehen eines leichten Typhus im vergangenen Jahre die diesem Stamme eigenen Partialantikörper bereits gebildet hatte. Die zugehörigen Partialantigene waren in dem Impfstoff der 1. Impfung nicht vorhanden, wohl aber andere, ihm fremde. Daher kam seine starke Reaktion auf die fremden Antigene und die Reaktionslosigkeit auf die der Epidemie eigenen Antigene. Auf der anderen Seite ist es erklärlich, daß die Reaktion auf die Impfung bei den übrigen Fällen nicht dem entsprach, was man im Felde durchschnittlich als Regel finden konnte: daß nämlich die 3. Impfung fast ohne Reaktion vertragen wurde, denn mit der 2. bzw. 3. Impfung kamen ganz frische Antigene in den Körper, gegen die nun auch neue Antikörper gebildet werden mußten. Aus der allgemeinen schweren Impfreaktion kann man auch auf die Wirksamkeit der Antigene schließen, die sich der Stamm im Körper der Trägerin erworben und von dort mitgebracht hatte.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich aber andererseits der Schluß, daß es bei Ausbruch einer Epidemie daran gelegen sein muß, möglichst bald einen Impfstoff zu gewinnen, der sämtliche Partialantigene besitzt, mit denen der Körper infiziert werden konnte, und daß er nun möglichst bald mit einem Impfstoff immunisiert wird, der möglichst sämtliche reaktiven Partialantigene enthält. Solange es uns noch nicht möglich ist, diese Partialantigene in „aufgeschlossener Form“ (M u c h) so zu verwenden, daß es möglich ist, in kürzester Zeit bei Infektionsgefahr eine möglichst große Anzahl von Menschen gut und zuverlässig zu immunisieren, werden wir noch bei dem Immunisierungsverfahren mit „Vollerregern“ verweilen müssen.

Nachdruck verboten.

Ueber die Wachstumsfähigkeit von Paratyphuserregern in Yoghurt.

[Aus dem Institute für Milchhygiene und Lebensmittelkunde und dem Institute für bakteriolog. Hygiene der Tierärztlichen Hochschule in Wien.]

Von Tierarzt **Karl Kaiser**, Wien.

Unter den künstlichen Sauer Milchpräparaten nimmt die Yoghurtmilch insofern eine Sonderstellung ein, als ihr Genuß durch die bekannten Forschungsergebnisse Metschnikoffs auch in den mittel- und westeuropäischen Ländern Verbreitung fand. Ohne näher auf historische Daten einzugehen, sei hier lediglich die heute in der einschlägigen Literatur feststehende Tatsache erwähnt, daß vom bakteriologischen Standpunkte aus, und wie dies von Löhnis in seinem „Handbuche der landwirtschaftlichen Bakteriologie“ besonders übersichtlich dargestellt ist, folgende Mikroorganismen in Yoghurt angetroffen wurden:

Grigoroff, der die erste eingehende bakteriologische Bearbeitung der bulgarischen Sauer Milch anstellte, fand in derselben 2 Langstäbchen und 1 Diplococcus. Mazé identifizierte die von ihm aus Yoghurt isolierten Laktobazillen und Laktokokken mit *Streptobacillus* bzw. *Streptococcus lebenis* Rist et Khoury. Fuhrmann fand außer schlanken Stäbchen Streptobazillen und Hefen. Luersen und Kühn beschrieben einen *Bacillus bulgaricus*, einen Körnchenbazillus, sowie einen *Diplostreptococcus*, die sie neben Hefen in Material verschiedenen Ursprungs antrafen. Klotz nennt die Laktobazillen *Bacillus bulgaricus*. Kuntze fand neben Laktobazillen, die er *Bacterium Yoghurt* nennt und von denen er eine körnchenbildende und eine körnchenfreie Varietät unterschied, Diplokokken, Hefen sowie eine dem *Bacillus Mazun* Weigmann nahestehende, sporenbildende Bazillenform. Severin identifizierte von neuem die Yoghurtbakterien mit *Streptobacillus lebenis*, von dem er auch eine schleimbildende Varietät erhielt.

Aus dem Angeführten geht hervor, daß von den verschiedenen Forschern im Yoghurt nicht immer dieselben Mikroorganismen gefunden wurden, was jedenfalls mit der verschiedenen Herkunft der einzelnen Präparate zusammenhängt. Im allgemeinen sind jedoch, wie auch Gabathuler in seiner Arbeit über die Yoghurtkontrolle anführt, in dieser Sauer Milch 3 Arten von Mikroorganismen vorhanden: Der *Bacillus bulgaricus*, auch *B. bulgarus* genannt, ein kräftiges Stäbchen, ferner ein *Streptococcus*, dessen Glieder in der Längsachse der Kette den größten Durchmesser aufweisen, und ein *Diplococcus* von gleicher Form. Alle diese 3 Arten sind kräftige Milchsäurebildner, d. h. sie sind imstande, den Milchzucker in Milchsäure zu zerlegen. Von diesen Bakterienarten soll der *Bacillus bulgaricus* vorherrschend sein, und zwar in guter, vollkräftiger Form. Ist ein Yoghurt mit Hefen in beträchtlicher Weise infiziert, so ist

in demselben nicht mehr der angenehme Milchsäuregeschmack vorwiegend, sondern es bekommt eine solche Yoghurtmilch durch die alkoholische Gärung einen kratzenden, stechenden Geschmack und der Geruch hat dann viel Aehnlichkeit mit demjenigen, der einer schlecht gereinigten Wein- oder Mostflasche entströmt. In hochgradigen Fällen ist das Produkt auch gebläht, eine Folge der Kohlensäurebildung. Der Codex alimentarius austriacus, Bd. 2, schreibt daher auch vor, daß guter Yoghurt keine Hefen enthalten soll.

Nach Piorkowski gehört der *Bacillus bulgaricus* zur Gruppe der Aërogenes-Arten. Er gleicht dem Subtilis- und Milzbrandbazillus morphologisch fast ganz, sowohl in seiner äußeren Form, wie auch in der Kettenbildung. Die gut vegetierenden, lebenden Arten sind grampositiv; es fehlt ihnen aber die Sporenbildung, und kulturell sind sie wesentlich verschieden von der Subtilis-Gruppe. Milch wird von ihnen bei 22° C in 12—14 Std., bei 37° in 6—8 Std. gesäuert und koaguliert. Auf Agar sieht man grauweißliches, schmieriges Wachstum. Ganz charakteristisch ist das Aussehen der Agarplatte. Dort bilden sich tiefgebuchtete, leicht glänzende Kolonien, und auf den vorspringenden Zungen sieht man kleine, spitze Ausläufer. Klatschpräparate davon zeigen die langen, dicken Stäbchen. Im Gelatinestich verflüssigen sie die Gelatine nicht, was bekanntlich Anthrax-, Subtilis- und Mycoides-Arten tun, und ebenso erzeugen sie in Traubenzuckeragar Gas, wie auch Laktose, Maltulose und Maltose vergoren werden, was ja bei obigen Arten gleichfalls nicht vorkommt. Sie zeigen auch Neigung zur Anaërobiose, wenngleich sie auch aërob gut gedeihen. Der bekömmlichste und zuträglichste Nährboden ist für sie das Milchserum, wie sie auch den thermophilen Arten zuzuzählen sind. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 45° C.

Der *Bacillus bulgaricus* tritt jedoch nicht nur allein in der Yoghurtmilch auf, sondern er ist nach Heinemann und Hefferan weit verbreitet und kommt unter den verschiedensten Verhältnissen vor. Er ist nach diesen Autoren identisch mit dem *Bacillus of Massol*, dem *Bacillus acidophilus*, Boas Opplers *Bacillus panis fermentati*, dem *Streptobacillus lebenis* und dem *Leptothrix buccalis*. Er kann am besten durch Bebrütung in keimfreier Milch und folgende Plattenkultur auf einem Nährboden, der 0,5 Proz. Eisessig und 2 Proz. Traubenzucker enthält, gewonnen werden. Er wird z. B. angetroffen in menschlichen Darmentleerungen, in solchen vom Pferde, dem Rinde und im Speichel, dem Magensaft, im Boden, in gewöhnlicher Marktmilch, dem Futter für Kühe usw. Die Menge der erzeugten Milchsäure kann mehr als 3 Proz. betragen, und zwar werden 6 Proz. flüchtige und 94 Proz. optisch inaktive Milchsäure hervorgebracht. Auch Fett und Kasein werden zum Teile angegriffen und zersetzt. Seine Anwesenheit im gewöhnlichen Speichel wird für die Karies der Zähne verantwortlich gemacht, insofern als er aus Kohlehydraten große Mengen von Säuren hervorzurufen vermag.

Das von mir zur Yoghurtbereitung verwendete Mayaferment stammte aus dem Laboratorium Moser, Wien XIX. Dieses enthält außer den 3 in der Yoghurtmilch gewöhnlich vorhandenen Bakterienarten, also dem *Bacillus bulgaricus*, einem Strepto- und einem Diplococcus, noch eine Sarcine. Es ist unter dem Namen „Yoghurtreinkultur“ im Handel erhältlich und wird sowohl in Milch als auch in Molke geliefert, welche beiden Arten des Fermentes auch von mir bei meinen Versuchen verwendet wurden.

Bei der Bedeutung, welcher der Yoghurtmilch sowohl für Erwachsene, als auch unter bestimmten Umständen für Säuglinge (nach Klotz bei akuten Ernährungsstörungen der heißen Jahreszeit, eventuell auch bei chronischen Magendarmerkrankungen und beim Säuglingsekzem) zuerkannt wird, schien es zweckmäßig, experimentell die Wachstumsfähigkeit von Paratyphuserregern in Yoghurtmilch zu prüfen. Von anderer Seite wurden auf ihr diesbezügliches Verhalten in Yoghurt und ähnlichen Sauermilchpräparaten geprüft:

Bindseil hat unter anderem das Verhalten der Typhusbazillen in der Yoghurtmilch untersucht und gefunden, daß nach 24 Std. bei einer Yoghurtprobe noch einzelne Typhuskeime nachweisbar waren; der Säuregrad betrug nach dieser Zeit, bestimmt nach Soxhlet-Henkel, 11,5. Nach 30 Std., bei einem Säuregrad von 23,5, waren in dieser Probe alle Typhuskeime abgestorben. Bei 2 anderen Proben waren die Typhusbazillen bei einem Säuregrade von 23,6 bzw. 30,1 bereits nach 24 Std. nicht mehr nachweisbar, ja bei einem dieser Versuche waren bereits nach 10 Std. bei einem Säuregrade von 25,4

keine Typhusbazillen mehr vorhanden. Aus diesen Versuchsergebnissen zieht Bindseil den Schluß, daß bei Bereitung von Yoghurtmilch aus roher Milch, ähnlich wie beim Kefir, im allgemeinen eine Gefahr der Typhusübertragung nicht zu befürchten ist.

Kern beschäftigte sich mit der Einwirkung der Yoghurtmilch auf das *Bacterium coli* und fand, daß der Yoghurtbazillus die Entwicklung dieses Bakteriums, wenn auch nicht zu verhindern, so doch immerhin zu hemmen imstande ist. Er führt diese Wirkung auf die durch den *Bacillus bulgaricus* im Darmkanal zur Entwicklung gebrachte Milchsäure zurück.

Berthelot fand, daß der *Bacillus bulgaricus* jede Entwicklung der Meningokokken hemmt, und daß er dieselben zerstört, wahrscheinlich eine Folge der starken Säurebildung durch den *Bacillus bulgaricus*.

Nach S. Cannata und M. Mitra besitzt der *Bacillus bulgaricus* eine ausgesprochen antibakterielle Wirkung gegen den Typhus-, Paratyphus A- und B- und den Diphtheriebazillus. Die Virulenz dieser Bakterien soll nach den genannten Autoren aufgehoben werden; sie sollen, in hohen Dosen eingepflicht, kein pathogenes Verhalten mehr zeigen.

Broers und ten Sande haben die Haltbarkeit der Tuberkel- und Typhusbazillen im Kefir untersucht und gefunden, daß die Typhusbazillen den Prozeß der Kefirbereitung nicht zu überstehen scheinen. Dagegen sollen nach diesen Forschern die Tuberkelbazillen aus der Milch mit unverminderter Virulenz in Kefir übergehen.

Was die Möglichkeit anlangt, daß Paratyphuskeime in die Milch, speziell in die Yoghurtmilch, gelangen, so sind folgende Umstände anzuführen: Es kommt beim Melkvieh eine durch Paratyphusbazillen bedingte Mastitis acuta vor, eine Krankheit, die von Zwick und Weichel eingehender untersucht und beschrieben wurde; nach diesen Autoren tritt hierbei die Funktionsstörung der entzündeten Milchdrüse nicht immer plötzlich ein, vielmehr oft erst innerhalb einiger Tage (3—5), im Gegensatz zur gewöhnlichen Colimastitis, wo sie sich von einem auf den anderen Tag einzustellen pflegt. Bei ungenügender Aufmerksamkeit des Melkpersonals kann es deshalb vorkommen, daß eine auf Paratyphusinfektion beruhende Euterentzündung anfänglich unentdeckt bleibt und die Milch des erkrankten Euterviertels der übrigen beigemolken wird.

Es kommen aber auch, wie Kersten angibt, nach den Untersuchungen von Fischer beim Rindvieh noch Paratyphusbazillozen vor, bei welchen die Ausscheidung der Keime wie beim Menschen durch Kot und Harn stattfindet. Bei erkrankten Milchkühen ist also eine Infektion der Milch wohl denkbar. Ob es sich dabei um Erreger handelt, welche die Milchdrüse passiert haben und welche primär in der Milch ausgeschieden werden, oder um solche, die beim Melkakte vom verschmutzten Euter aus hineingelangten, ist praktisch gleichgültig. Es ist dabei zu bedenken, daß die Milchhändler die Milch von verschiedener Herkunft zu einem größeren Quantum zu mischen pflegen und dadurch, falls Tiere eines Stalles, aus dem Milch bezogen wurde, mit Paratyphusbazillozen behaftet sind, die ganze Milch infizieren.

Außer durch direkte Keimübertragung vom kranken Tiere aus können die Paratyphuserreger auch noch durch sekundäre Infektion von außen her in die Milch gelangen. Dies kann insbesondere durch infiziertes Wasser geschehen, sei es, daß dasselbe entweder in betrügerischer Absicht zur Verfälschung der Milch zugesetzt wurde, oder daß zum Ausspülen der Milchgefäße derart keimhaltiges Wasser zur Verwendung gelangte.

Schließlich kann die Infektion der Milch auch noch durch kranke Personen und durch Bazillenträger erfolgen.

Trotz dieser verschiedenen Infektionsmöglichkeit der Milch mit Paratyphuskeimen und deren langer Haltbarkeit in derselben (nach Kersten bis zu 4½ Mon.) sind bis jetzt, wie dieser Autor angibt, in der Literatur nur 2 Fälle erwähnt, wo Paratyphus B-Bazillozen höchst wahrscheinlich durch infizierte Milch hervorgerufen worden sind.

So handelt es sich in der von Fischer beobachteten Massenerkrankung auf dem Gute Futterkamp im östlichen Holstein um eine durch infektiöse Milch hervorgerufene Epidemie. Es gelang, Paratyphus B-Bazillen aus den Entleerungen der Kranken, wie auch aus dem Kote und Fleische von 2 umgestandenen Kühen zu züchten, deren Milch die erkrankten Personen getrunken hatten. Bei der von Wernicke mitgeteilten kleinen Epidemie gab der Genuß einer Vanilletorte Anlaß zu den Erkrankungen; nachweislich war zu deren Bereitung Sahne aus einer Molkerei verwendet worden, unter deren Personal sich ein Paratyphusbazillenträger befand. Fast unmittelbar nach dem Genuße der betreffenden Torte erkrankten eine ganze Reihe von Personen, in deren Kote Paratyphus B-Bazillen nachgewiesen werden konnten. Im 1. Falle mußte die Milch durch die beiden Kühe, im letzteren durch den Bazillenträger infiziert worden sein; die Bazillen wurden jedoch in beiden Fällen in der Milch nicht nachgewiesen. Trotzdem sehen Fischer und Wernicke die Milch als wahrscheinliche Ueberträgerin an, da

alle ihre Beobachtungen darauf hinwiesen und ein anderes ätiologisches Moment von ihnen nicht gefunden werden konnte.

Eigene Untersuchungen.

Für den Nachweis von Paratyphuskeimen in Milch wurden von mir in erster Linie die bekannten Spezialnährböden verwendet, weiterhin wurde aber auch durch den Tierversuch entschieden, ob die Paratyphusbazillen nach dem Verweilen in Yoghurtmilch eine Aenderung ihrer Virulenz erlitten hatten oder nicht.

Ueber die beobachtete Methodik geben die nachstehenden Ausführungen Aufschluß:

Die von mir zu meinen Versuchen verwendeten Paratyphusstämme waren folgende:

Stamm Nr.	1:	Bacillus paratyphosus	B	Schottmüller-Seemann,
"	"	2:	"	" Westmann-Uhlenhuth,
"	"	3:	"	" vitulorum Lehnsahn Nr. 423,
"	"	4:	"	" Zupnik Wagner,
"	"	5:	"	" Grober Poliklinik,
"	"	6:	"	" Loncope Nr. 5207,
"	"	7:	"	" Hume,
"	"	8:	"	" Achard et Bensande,
"	"	9:	"	" vitulorum Karsten St. 352,
"	"	10:	"	" Coleman et Buxton,
"	"	11:	"	" Stadl Stuttgart 1916 Jaiser,
"	"	12:	"	" Hanselmann Stuttgart 1916,
"	"	13:	"	" Institut Schnürer,
"	"	14:	"	" Rudolfspital Laboratoriumstamm,
"	"	15:	"	A
"	g	16:	"	" Rudolfspital Sektion."

Die Stämme 1—12 stammten aus Králs bakteriologischem Museum in Wien, St. 13 war der Laboratoriumstamm des bakteriologisch-hygienischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule, St. 14—16 wurden mir von der Prosektur der Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ in Wien in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Die Stämme 1—14 stellten, wie aus dem Angeführten ersichtlich ist, Paratyphusstämme vom Typus B dar, St. 15 und 16 waren Paratyphusbazillen Typus A.

Ausgeführt wurden die Untersuchungen über die Wachstumsfähigkeit der einzelnen Paratyphusstämme in Yoghurt dermaßen, daß 150 ccm Milch entrahmt und in einem Erlenmeyer-Kolben gegeben wurden, worauf diese Milch, um sie keimfrei zu machen, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Autoklaven bei 120° C durch je 20 Min. sterilisiert wurde. Dieser Vorgang wurde gewählt, da durch ein bloßes Pasteurisieren der Milch gewisse sporentragende Bakterien nicht zur Abtötung gelangten, weshalb in einer solchen Milch oft schon nach 24 Std. spontan Säuerung und Gerinnung auftrat und dieselbe daher zur Yoghurtbereitung nicht mehr verwendbar war. Auch für die praktische Herstellung der Yoghurtmilch ist das Abkochen der Milch dem Pasteurisieren derselben vorzuziehen, da, wie Hübener angibt, sowohl die Paratyphusbazillen Typus A wie diejenigen des Typus B in der Milch bei einer Temperatur von 60° erst in 1 Std. abgetötet werden. Eine 1/2-stünd. Einwirkung dieser Temperatur genügt nicht zu ihrer völligen Vernichtung. Selbst bei 70° sind bei 10, bzw. 25 Min. lang dauernder Einwirkung dieser Temperatur noch nicht alle Keime abgetötet, ja selbst

nach Temperaturen von 75°, die 5 Min. auf derartigen Kulturen einwirken, sind noch immer einzelne Keime entwicklungsfähig.

Nachdem die Keimfreiheit der Milch durch Ausstriche aus derselben auf Agar nachgeprüft worden war, wurden in den Erlenmeyer-Kolben 3 Normalösen einer 24-stünd. Agarkultur des betreffenden Paratyphusstammes überimpft. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle ein Röhrchen mit sterilisierter Milch und ein Röhrchen mit Bouillon mit je 1 Oese derselben Paratyphuskultur beschickt. Sodann wurden der Erlenmeyer-Kolben und die beiden Kontrollröhrchen auf 48 Std. in den Brutschrank bei 37° C gestellt, nach dieser Zeit das Gedeihen und die Lebensfähigkeit der Kulturen im hängenden Tropfen, sowie durch Ueberimpfung in Bouillon und abermaliges 12-stünd. Bebrüten dieser Kontrollen, nach welchem Zeitraume aus denselben Drigalski-Platten gestrichen wurden, geprüft. Ebenso wurden stets Fuchsin- und Gram-Präparate angefertigt.

Die 48-stünd. Paratyphuskultur in Milch wurde nun in Mengen von je 10 ccm in Röhrchen abgefüllt und zu jedem dieser Röhrchen 1 Proz., d. i. also 0,1 ccm der Yoghurtreinkultur zugesetzt, worauf sämtliche Proben wieder in den Brutschrank kamen. Nach 12 Std. war die Milch bereits koaguliert und wurde nach dieser Zeit die 1. Untersuchung derselben angesetzt. Es wurden aber zum Nachweise der Paratyphusbazillen nicht direkte Ausstriche aus der betreffenden Yoghurtprobe auf die Spezialnährböden gemacht, sondern, entsprechend dem Vorschlage von Schottelius, zunächst eine Ueberimpfung in Bouillon vorgenommen, welche 12 Std. bei Körperwärme gehalten wurde und dann zur Aussaat auf Platten diente. Es ließen sich bei Anwendung dieses Verfahrens noch Keime finden, wo der unmittelbare Ausstrich auf Platten schon versagt hatte.

Bevor ich auf die nähere Untersuchung des Verhaltens der Paratyphusbazillen in der Yoghurtmilch selbst einging, beschäftigte ich mich vorerst mit dem Verhalten dieser Keime gegenüber Milchsäure, um einerseits nachzuweisen, ob die Paratyphusbazillen in Milchsäure überhaupt zu gedeihen vermögen, und ob es andererseits Stämme dieser Bakterien gibt, die eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung dieser Säure besitzen.

Zu diesem Behufe wurden willkürlich 2 Paratyphusstämmen, es waren dies St. Nr. 1 und Nr. 6, herausgegriffen und je 5 Röhrchen Bouillon mit je 1 Oese einer 24-stünd. Agarkultur des betreffenden Stammes infiziert. Nach 48-stünd. Wachstum dieser Kulturen im Brutschrank bei Körpertemperatur wurde den Röhrchen 1—4 Milchsäure zugesetzt, und zwar derart, daß die Milchsäurekonzentration im Röhrchen Nr. 1 1:100 000, im Röhrchen Nr. 2 1:50 000, im Röhrchen Nr. 3 1:25 000, im Röhrchen Nr. 4 1:12 000 ausmachte. Röhrchen Nr. 5 verblieb als Kontrolle ohne Milchsäurezusatz. Es wurden nun sämtliche Röhrchen abermals in den Brutschrank gestellt und aus denselben von 12 zu 12 Std. frische Röhrchen mit Bouillon abgeimpft, von welchen letzteren, die behufs Anreicherung abermals 12 Std. bei 37° C gehalten wurden, Drigalski-Conradi-Platten bestrichen wurden, um auf diese Weise das Vorhandensein der Paratyphusbazillen nachzuweisen. Selbstverständlich war die Anwesenheit lebensfähiger Paratyphuskeime in der Bouillon vor dem Milchsäurezusatz durch Ueberprüfung im hängenden Tropfen, durch Fuchsin- und Gram-Präparate, sowie durch Ausstriche auf Drigalski-Agar festgestellt worden. Diese Versuche wurden durch

72 Std. fortgesetzt, der Zeit, innerhalb welcher die Yoghurtmilch gewöhnlich genossen wird.

Das Resultat dieser Versuche war folgendes: Der Milchsäurezusatz bis zur Konzentration von 1:12 000 hatte auf beide Stämme keinen nachteiligen Einfluß. Dieselben erhielten sich während der Untersuchungszeit in allen Fällen vollkommen lebens- und entwicklungsfähig.

Beim nächsten Versuche, zu welchem abermals die beiden St. Nr. 1 und Nr. 6 verwendet wurden und welcher in der gleichen Weise, wie der 1. durchgeführt wurde, wurden 6 Röhrrchen Bouillon benützt und wurden nach 48-stünd. Bebrütung der in diesen angesetzten Paratyphusbazillen Milchsäure in der Konzentration zugesetzt, daß Röhrrchen Nr. 1 1:5000, Röhrrchen Nr. 2 1:2500, Röhrrchen Nr. 3 1:1200, Röhrrchen Nr. 4 1:500 und Röhrrchen Nr. 5 1:250 Milchsäure enthielt, während Röhrrchen Nr. 6 ohne Milchsäurezusatz als Kontrolle diente.

Bei diesen höheren Milchsäurekonzentrationen zeigten beide Stämme schon ein wesentlich verschiedenes Verhalten bezüglich ihrer Wachstumsfähigkeit. Während Stamm Nr. 1 bis zur Säurestärke von 1:1200 durch 72 Std. keine Wachstumsbehinderung zeigte, bei 1:500 und 1:250 erst nach 60 Std. die ersten Abschwächungserscheinungen aufwies, traten bei St. Nr. 6 bei einer Milchsäurekonzentration von 1:1200 schon nach 48 Std. die ersten Anzeichen einer Wachstumsbehinderung auf und war der fragliche Stamm bei dieser Säurestärke nach 72 Std. abgestorben. Bei 1:500 trat die Abschwächung schon nach 36 Std., das Absterben nach 72 Std. ein. In der Milchsäurelösung 1:250 waren die Keime des St. Nr. 6 aber bereits nach 12 Std. abgestorben.

Da nach diesen Versuchsergebnissen erst eine Milchsäurekonzentration von 1:250, also eine Säurestärke von 4 Prom., eine größere Beeinflussung der Wachstumsfähigkeit von Paratyphusbazillen bewirkt, wurden die übrigen Stämme bloß bei dieser Konzentration geprüft, sonst blieb aber der Vorgang bei den einzelnen Untersuchungen der gleiche wie bei den ersten Versuchen. Stets wurde auch ein Röhrrchen ohne Milchsäurezusatz als Kontrolle verwendet.

Die einzelnen Proben ergaben folgendes Resultat:

St. Nr. 2 zeigte nach 12 Std. während der Einwirkung der Milchsäure eine deutliche Abschwächung. Jedoch schon nach 24 Std. hatte er sich erholt und wuchs in kräftig entwickelten Kolonien. Nach 24 Std. trat jedoch eine neuerliche Abschwächung desselben ein und erfolgte das Absterben dieses Stammes nach 60 Std. St. Nr. 3 verhielt sich ähnlich wie der Nr. 2. Auch er wies nach 12 Std. eine Abschwächung auf, wuchs nach 24 Std. stark und kräftig, von der 36. Std. an war er jedoch bereits wieder geschwächt und ging nach 60 Std. ein. St. Nr. 4 war bereits nach 12-stünd. Einwirkung der Milchsäure abgestorben, was auch durch die noch durch 72 Std. fortgesetzte Untersuchung desselben bestätigt wurde. St. Nr. 5 verhielt sich wie St. Nr. 4, auch er war nach 12 Std. bereits tot. St. Nr. 7 lebte 12 Std., nach 24 Std. war das Absterben desselben eingetreten. Das Wachstum nach der 12. Std. war aber noch ein kräftiges. St. Nr. 8 war bereits nach 12 Std. tot, sowie es auch bei den St. Nr. 4, 5 und 6 der Fall war. St. Nr. 9 war ebenfalls bereits nach 12 Std. abgestorben. St. Nr. 10, der auch in den Kontrollröhrrchen nur ein sehr spärliches Wachstum zeigte, hatte in der Milchsäurebouillon ebenfalls nach 12 Std. sein Ende gefunden. St. Nr. 11 verhielt sich ähnlich wie St. Nr. 10. Auch dieser Stamm wuchs von Haus aus sehr schwächlich und war nach 12 Std. abgestorben. St. Nr. 12 wuchs 24 Std. kräftig, zeigte nach 36 Std. eine Abschwächung und war nach 48 Std. tot. St. Nr. 13 wurde durch die Milchsäure zuerst sehr geschwächt, erholte sich nach 24 Std. aber wieder, welche Erstarkung aber nach 36 Std. bereits wieder geschwunden war, und nach 48 Std. trat sein Absterben ein. St. Nr. 14 war bereits nach 12 Std. abgestorben, während er sich in der Kontrolle als ein kräftig wachsender Stamm erwies. St. Nr. 15, ein Paratyphusstamm von Typus A, wurde anfangs durch die Milchsäure ziemlich stark beeinflusst, hatte erst nach 36 Std. sein normales kräftiges Wachstum wieder erreicht. Nach 60 Std. zeigte er jedoch schon

wieder eine Abschwächung und wuchs nach der 72. Stde. nur noch sehr dürrig. St. Nr. 16, ebenfalls ein Stamm vom Typus A, wuchs infolge Einwirkung der Milchsäure überhaupt nur sehr karg, doch trat der eigentliche Tod desselben erst nach 60 Std. ein.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß das Verhalten der einzelnen Paratyphusstämmen gegen die Einwirkung der Milchsäure ein sehr verschiedenes ist. Während es Stämme gibt, die bei einer Milchsäurekonzentration von 1:250, also in der 4-prom. Milchsäurelösung, schon nach 12 Std. abgestorben sind, gibt es andere Stämme, die diese Säurekonzentration sehr gut längere Zeit überstehen, ja es finden sich Stämme, die nach anfänglicher Abschwächung sich an das Milchsäuremedium gewöhnen können und ihr volles, kräftiges Wachstum wiedererlangen, allerdings bei längerer Einwirkung der Milchsäure nach verschieden langer Zeit abermals abgeschwächt werden und dann endgültig zugrunde gehen. Damit ist auch die Ansicht Heinemanns, daß die Paratyphus B-Stämme durch 0,45-proz. Milchsäure abgetötet werden, daß es aber auch möglich ist, daß es Stämme dieser Bakterien gibt, die einer größeren Menge dieser Säure zu widerstehen vermögen, übereinstimmend.

Zur Kontrolle des Vorhandenseins und der Lebensfähigkeit der Paratyphuskeime in den einzelnen Yoghurtproben wurden, wie bereits erwähnt, die sogenannten Spezialnährböden herangezogen, und zwar wurden hierzu der Lackmusagar nach Drigalski-Conradi, der Malachitgrünagar nach Loeffler und der Fuchsinagar nach Endo in Form von Platten, der Neutralrotagar nach Rothberger-Scheffler in Form der Schüttelkultur angewendet.

Diese elektiv wirkenden Nährböden dienen bekanntlich zum Nachweise der Typhusbazillen und der Erreger der Fleischvergiftungen sowie zur kulturellen Unterscheidung dieser Stäbchen vom *Bacterium coli*. Ohne näher auf bekannte Tatsachen einzugehen, sei hier nur bemerkt, daß die Paratyphusbazillen auf der Drigalski-Platte blaue, glasige Kolonien bilden, die sich nach 3-täg. Stehen bei Zimmertemperatur mit einem dicken, undurchsichtigen, schleimigen Wall umgeben. Auf der Malachitgrünplatte wächst der Paratyphusbazillus in glasig durchscheinenden, leicht milchig getrübbten Kolonien, die den Agar bei dichtem Wachstum bereits innerhalb 24 Std. entfärben oder gelb färben. Auf der Endo-Platte wachsen die Paratyphusbazillen farblos. In Neutralrotagar nach Rothberger-Scheffler tritt beim *Bacillus paratyphosus* Gasbildung (Zerreißen des Nährbodens), Fluoreszenz und gelbliche Verfärbung auf.

Nach der bakteriologischen Verwertung des betreffenden Yoghurt-röhrchens wurde dasselbe zur Bestimmung des Milchsäuregehaltes durch Titration verwendet. Der ganze Inhalt desselben wurde mit 20 ccm destill. Wasser herausgewaschen und nun nach Zusatz einiger Tropfen einer 2-proz. Phenolphthaleinlösung mit Viertelnormalnatronlauge titriert, wobei der ermittelte Säuregrad als Milchsäure berechnet wurde.

Diese bakteriologischen und chemischen Untersuchungen der Yoghurtmilchproben wurden von 12 zu 12 Std. wiederholt, und zwar immer 48 Std. über das Eintreten des Absterbens des betreffenden Stammes hinaus. Stämme, die schon früher abgestorben waren, wurden aber mindestens 72 Std. hindurch untersucht.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe sei im Nachstehenden verzeichnet:

Stamm Nr. 1 wuchs durch 24 Std. stark und kräftig, nach 36 Std. trat Abschwächung ein und nach 48 Std. war derselbe tot. Der berechnete Milchsäuregehalt betrug zu dieser Zeit in der betreffenden Yoghurtmilch 1,87 Proz. St. Nr. 2 war in seinem Wachstum 60 Std. lang stark und kräftig, nach 72 Std. trat Abschwächung und nach 84 Std. Absterben desselben ein. Milchsäuregehalt zu dieser Zeit 2,09 Proz. St. Nr. 3 war bereits nach 12 Std. abgestorben. Zurückzuführen dürfte das rasche Zugrundegehen dieses Stammes wahrscheinlich darauf sein, daß die Säuerung in dieser Yoghurtmilch gleich vom Anfang an sehr stark war und nach 12 Std. bereits 0,82 Proz. erreicht hatte. St. Nr. 4 wies nach 12 Std. Abschwächung auf, erholte sich aber bereits nach 24 Std., nach 48 Std. trat die neuerliche Abschwächung und nach 60 Std. der Tod desselben ein. Der Milchsäuregehalt betrug zu dieser Zeit in der Yoghurtprobe 2,03 Proz. St. Nr. 5 zeigte ebenfalls nach 12 Std. eine Abschwächung, erholte sich aber gleichfalls nach 24 Std. und wuchs bis zu 60 Std. stark und kräftig. Nach 72 Std. war er bei einem Milchsäuregehalt von 2,13 Proz. abgestorben. St. Nr. 6 wuchs schon nach 12 Std. nur mehr sehr dürftig und war nach 24 Std. bei einem Milchsäuregehalt von 1,07 Proz. abgestorben. St. Nr. 7 zeigte sich in der Yoghurtmilch sehr widerstandsfähig. Er gedieh durch 84 Std. sehr gut, nach 96 Std. trat erst Abschwächung und nach 108 Std. der Tod desselben ein. Der Milchsäuregehalt dieser letzten Probe war 1,87 Proz. St. Nr. 8 wuchs 36 Std. hindurch kräftig, nach 48 Std. stellte sich die Abschwächung desselben ein und nach 60 Std. war er abgestorben. Zu dieser Zeit betrug der Milchsäuregehalt 2,14 Proz. St. Nr. 9 wuchs durch 48 Std. stark, nach 60 Std. war er tot. Milchsäuregehalt zu dieser Zeit 1,89 Proz. St. Nr. 10, der, wie schon anlässlich seiner Untersuchung in der Milchsäure erwähnt, ein äußerst zarter und spärlich wachsender Stamm war, war bereits nach 12 Std. bei einem Milchsäuregehalt von 0,29 Proz. abgestorben. St. Nr. 11, ebenfalls, wie bereits erwähnt, ein sehr schwächerer Stamm, war wie St. Nr. 10 schon nach 12 Std. vernichtet. Hierbei war der Milchsäuregehalt 0,34 Proz. St. Nr. 12 war derjenige, der sich in der Yoghurtmilch am widerstandsfähigsten erwies. Nach anfänglicher Abschwächung gewöhnte er sich an diesen Nährboden so, daß er durch 84 Std. hindurch äußerst üppig gedieh, nach 96 Std. die ersten Anzeichen der Abschwächung aufwies und erst nach 120 Std. tot war. Der Milchsäuregehalt dieser letzten Yoghurtprobe war 2,35 Proz. St. Nr. 13 erholte sich nach anfänglicher Abschwächung bereits nach 24 Std. wieder, wuchs bis zu 36 Std. stark und kräftig, dann trat wieder Abschwächung und nach 72 Std. seine Vernichtung bei einem Milchsäuregehalt von 1,57 Proz. ein. St. Nr. 14 gedieh durch 60 Std. sehr gut, starb aber bereits nach 72 Std. ab. Milchsäuregehalt zu dieser Zeit 2,06 Proz.

Die beiden letzten Stämme, welche, wie ja schon mehrmals erwähnt, zum Typus A gehörten, zeigten folgendes Verhalten:

St. Nr. 15 wuchs durch 24 Std. üppig, nach 36 Std. trat Abschwächung und nach 48 Std. Absterben desselben ein. Der Milchsäuregehalt betrug zu dieser Zeit 1,84 Proz. St. Nr. 16 war nach 12 Std. abgeschwächt, wuchs nach 24 Std. kräftig, nach 36 Std. trat neuerliche Abschwächung und nach 60 Std. der Tod desselben bei einem Milchsäuregehalt von 1,90 Proz. auf.

Aus den eben beschriebenen Versuchen geht also hervor, daß sich die meisten Paratyphusstämme, sowohl die vom Typus B als auch jene vom Typus A, abgesehen von einigen, die schon von vornherein ein schwächliches Wachstum aufweisen, in der Yoghurtmilch verschieden lange Zeit halten können. Bei den meisten tritt nach anfänglicher Abschwächung eine Gewöhnung an den Milchsäuregehalt und damit auch vollkräftiges Wachstum auf, es finden sich aber auch Stämme, die ohne anfängliche Abschwächung zu gedeihen vermögen. Die Lebensfähigkeit der verschiedenen Paratyphusstämme in der Yoghurtmilch ist verschieden und wird hauptsächlich durch den Milchsäuregehalt derselben beeinflusst, wenn auch die Widerstandsfähigkeit der einzelnen Stämme gegen die Einwirkung dieser Säure eine Rolle spielt. Das Absterben der Paratyphuskeime in der Yoghurtmilch pflegt gewöhnlich bei einem Milchsäuregehalt von 1,50 bis etwas über 2 Proz. zu geschehen. Die Lebensdauer dieser Bazillen im Yoghurt schwankt meist zwischen 48 und 72 Std., es gibt aber auch Paratyphusstämme, die gegen die Milchsäureeinwirkung eine sehr große Resistenz aufweisen und höhere Milchsäure-

grade bis zur Dauer von 84—120 Std. vertragen können. Zwischen den Paratyphusstämmen des Typus A und B scheinen bezüglich ihrer Wachstumsfähigkeit in Yoghurt keine wesentlichen Unterschiede zu bestehen. Die Haltbarkeit der Paratyphuskeime in der Yoghurtmilch ist auch eine um so größere, je langsamer die Säuerung derselben vor sich geht. Rasch eintretendes Sauerwerden derselben wirkt auf die Paratyphusbazillen sehr nachteilig.

Nachdem also die Paratyphuskeime in der Yoghurtmilch eine gewiß nicht unbeträchtliche Lebensdauer aufwiesen, war nun noch die Frage zu beantworten, ob die in dem Yoghurt noch vorhandenen Paratyphuskeime auch noch vollvirulent waren, oder ob dieselben in ihrer Pathogenität eine Einbuße erlitten hatten. Zu diesem Behufe wurde der Tierversuch angestellt.

Da sich St. Nr. 12 als derjenige erwiesen hatte, der sich in der Yoghurtmilch am längsten halten konnte, wurde derselbe zu dem Versuche verwendet. Es wurden 3 männliche weiße Ratten desselben Wurfes, die auch ungefähr dasselbe Körpergewicht hatten, intraperitoneal geimpft. Es erhielt Ratte Nr. 1 (linkes Ohr blau) 0,5 ccm, der 72-stünd. Yoghurtmilch, in der sich St. Nr. 12 befand. Zur Verhinderung einer allzugroßen Reizung des Peritoneums durch die in der Yoghurtmilch vorhandene Milchsäure wurde dieselbe vor der Injektion mit 5-proz. Sodalösung neutralisiert.

Ratte Nr. 2 (rechtes Ohr blau) bekam 0,5 ccm einer Aufschwemmung von 0,5 ccm einer mit der Yoghurtmilch gleichaltrigen Bouillonkultur des St. Nr. 12 in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal eingespritzt.

Aus der 72-stünd. Yoghurtmilch wurde noch 1 Röhrchen mit Bouillon infiziert, von dieser Kultur nach 12-stünd. Wachstum im Brutschrank 0,1 ccm in 5 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und hiervon der Ratte Nr. 3 (Rücken blau) 0,5 ccm intraperitoneal einverleibt.

Sämtliche 3 Tiere waren am nächsten Tage krank, zeigten mangelnde Freßlust, saßen ganz apathisch mit gekrümmtem Rücken, zwischen die Vorderfüße gestecktem Kopfe und gesträubtem Haare in einem Winkel ihres Käfigs. Gleichzeitig zeigten sie profuse Diarrhöe. Ratte Nr. 1 stand in der Nacht vom 1. auf den 2. Tage nach der Impfung um. Bei der Sektion ergab sich eine starke Injektion der Gefäße im Unterhautbindegewebe, in der Bauchhöhle eine geringe Menge einer serösen Flüssigkeit, das Peritoneum war getrübt. Die Leber sehr blutreich, die Milz etwas vergrößert, in ihrer Farbe jedoch nicht verändert. Der Darminhalt war dünnflüssig, die Darmgefäße stärker injiziert, die Darmschleimhaut gerötet und geschwollen. Die Lungen waren hyperämisch. Aus der Milz, dem Herzblute und der Leber dieser Ratte konnten die Paratyphusbazillen in Reinkulturen herausgezüchtet werden, ebenso waren sie im Darminhalt nachzuweisen.

Ratte Nr. 2 stand in der Nacht vom 7. auf den 8. Tage nach der Injektion um. Entsprechend der längeren Krankheitsdauer waren die Veränderungen an den Organen auch mehr ausgeprägt wie bei dem ersten Versuchstiere. Das Sektionsbild war das einer hämorrhagischen Enteritis. In der Bauchhöhle fand sich eine größere Menge einer blutig gefärbten Flüssigkeit, die Außenfläche des großen und des kleinen Colons und des Mastdarms war schmutzig rot verfärbt, die Schleimhaut zeigte teils ebenfalls diese Farbe, teils fanden sich auf derselben punktförmige Blutungen. Der Darminhalt war dünnflüssig, teilweise ebenfalls mit Blut untermischt. Die Milz war auf das Doppelte vergrößert, sehr mürbe in ihrer Konsistenz und von blauer Farbe. Die übrigen Organe wiesen keine wesentlichen Veränderungen auf. Auch hier gelang es aus Milz, Herzblut und Leber die Paratyphuskeime in Reinkultur zu isolieren und aus dem Darminhalt herauszuzüchten.

Ratte Nr. 3 blieb ca. 5—6 Tage krank, erholte sich jedoch nach dieser Zeit wieder und ist nicht eingegangen. Jedenfalls war die diesem Versuchstiere einverleibte Menge der Paratyphuskeime für eine tödliche Infektion zu gering. Ratte Nr. 1 und Ratte Nr. 2 hatten ja auch bedeutend höhere Dosen injiziert erhalten wie dieses letzte Tier.

Nach dem Ausgange dieses Tierversuches wären also die Paratyphuserreger trotz des 72-stünd. Aufenthaltes derselben im Yoghurt virulent geblieben.

Zusammenfassend wäre also über die Einwirkung der Milchsäure auf die Paratyphusbazillen und deren Wachstumsfähigkeit im Yoghurt folgendes zu sagen:

1) Die einzelnen Paratyphusstämmen verhalten sich auf die Einwirkung der Milchsäure ganz verschieden. Während einzelne derselben bei einer Milchsäurekonzentration von 4 Prom. schon nach 12 Std. abgestorben sind, gibt es andere, die diesen Säuregrad sehr gut längere Zeit — bis über 72 Std. hinaus — zu vertragen vermögen. Es finden sich auch Stämme, die nach anfänglicher Abschwächung sich an die Milchsäure gewöhnen und ihr volles, kräftiges Wachstum wieder erlangen.

2) Auch im Yoghurt ist das Verhalten der einzelnen Paratyphusstämmen ein ähnliches. Bei den meisten tritt nach anfänglicher Abschwächung eine Gewöhnung an den Milchsäuregehalt und damit auch vollkräftiges Wachstum auf. Andere Stämme können aber ohne vorherige Abschwächung in der Yoghurtmilch gedeihen.

3) Das Absterben der Paratyphuskeime im Yoghurt tritt gewöhnlich bei einem Milchsäuregehalt von 1,5 Proz. bis etwas über 2 Proz. ein. Die Lebensdauer derselben schwankt zwischen 48 und 72 Std., es gibt aber auch Stämme, die bei höherem Säuregrade durch 84—120 Std. lebensfähig bleiben können.

4) Zwischen den Paratyphusstämmen des Typus A und des Typus B scheinen bezüglich ihrer Haltbarkeit in der Yoghurtmilch keine wesentlichen Unterschiede zu bestehen.

5) Die Haltbarkeit der Paratyphusstämmen in der Yoghurtmilch ist eine um so längere, je langsamer die Säuerung in derselben vor sich geht. Rasch eintretendes Sauerwerden derselben wirkt auf die Paratyphuserreger sehr nachteilig.

Stark saurer Yoghurt ist daher, was die Möglichkeit einer Paratyphusinfektion durch denselben betrifft, weniger bedenklich als schwächer gesäuerter.

6) Das Abkochen der Milch vor der Yoghurtbereitung ist unbedingt notwendig, da andernfalls eine Paratyphusinfektion durch dieselbe nicht ausgeschlossen ist, indem es Stämme dieser Erreger gibt, die auch nach längerem Verweilen im Yoghurt in ihrer Virulenz keine Schwächung erfahren.

7) Demzufolge wird man auch bei Verwendung der Yoghurtmilch bei Darmerkrankungen des Menschen entsprechend Rücksicht nehmen müssen.

Literatur.

1) Berthelot, A., Antagonisme du bacille bulgare vis-à-vis du méningocoque. (Compt. Rend. Soc. d. Biol. T. 68. 1910. p. 529.) — 2) Bindseil, Ueber die Haltbarkeit der Typhusbazillen an Nahrungs- und Genußmitteln. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 84. 1912. S. 181 ff.) — 3) Broers, C. W., u. ten Sande, A., Tuberkel- und Typhusbazillen im Kefir. (Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1906. I. p. 1854; zit. nach Hyg. Rundsch. Bd. 17. 1907. S. 1276.) — 4) Cannata, S., u. Mitra, M., Einfluß einiger Milchfermente auf Vitalität und Virulenz verschiedener path. Mikroorganismen. (Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. S. 160.) — 5) Codex alimentarius austriacus, Bd. 2. Wien 1912. S. 291 u. 292. — 6) Fuhrmann, F., Ueber Yoghurt.

(Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmitt. Bd. 13. 1907. S. 598 ff.) — 7) Gabathuler, A., Ein Beitrag zur Yoghurtkontrolle. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Jahrg. 23. 1913. S. 368 ff.) — 8) Grigoroff, R v. méd. de la Suisse Rom. T. 25. 1905. p. 174; ref. Jahresber. d. G rungsorganism. Bd. 16. S. 293. — 9) Heinemann, P. G., Die keimtötende Kraft der Milchsäure. (Journ. Infekt. Dis. Vol. 16. 1915. H. 3.) — 10) Heinemann and Hefferan, A study of *Bac. bulgaricus*. (Ibid. Vol. 6 p. 304 ff.) — 11) Hübener, Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen, ihre Entstehung und ihre Verhütung. Jena 1910. S. 39 ff. — 12) v. Kern, T., Beiträge zur Wirkung des Yoghurtbazillus auf *Bact. coli*. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 67. 1909. S. 211 ff.) — 13) Kersten, H. E., Ueber die Haltbarkeit der Diphtherie- und Paratyphus B-Bazillen i. d. Milch. (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 30. 1909. S. 341 ff.) — 14) Klotz, M., Ueber Säuglingsernährung mit Yoghurtmilch. (Zeitschr. f. physik. u. di t. Ther. Bd. 12. 1908. S. 261.) — 15) Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. S. 392 ff. — 16) Kuntze, Ebenda. Abt. II. Bd. 21. 1908. S. 737 ff. — 17) Löhnis, F., Handb. d. landwirtsch. Bakt. Berlin 1910. S. 284 u. 285. — 18) Luerssen u. Kühn, Yoghurt, die bulgarische Sauermilch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. S. 234 ff.) — 19) Mazé, Ann. de l'Inst. Past. T. 19. 1905. p. 293. — 20) Piorowski, Ein neues Schutz- und Heilmittel gegen die Kälberruhr. (Berl. tierärztl. Wochenschr. Jahrg. 23. 1911. S. 699.) — 21) Ders., Demonstrationsvortrag über Yoghurt. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. S. 95.) — 22) Schottelius, M., Deutsch. med. Wochenschr. 1885. S. 213. — 23) Severin, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1908. S. 737 ff. — 24) Zwick u. Weichel, Bakt. Unters.  ber die Mastitis acuta des Rindes, mit besonderer Berücksichtigung der Beteiligung von sog. Fleischvergiftern an der Entstehung der Krankheit. (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 34. S. 391 ff.)

Nachdruck verboten.

Zur Frage des Erregers der Meerschweinchenpseudotuberkulose.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Köln (Direktor: Prof. Dr. Reiner Müller).]

Von Dr. Karl Klein, Assistent am Institut.

Im Frühjahr 1920 brach im Kölner Hygienischen Institut eine Meerschweinchenseuche aus, der etwa $\frac{1}{5}$ des Tierbestandes zum Opfer fiel. Außer dem Verlust der teuren Meerschweinchen war es besonders störend, daß viele Tiere, die im bakteriologischen Untersuchungsamt mit tuberkuloseverd chtigem Material geimpft worden waren, starben, bevor eine Infektion mit Tuberkelbazillen hätte zur Entwicklung kommen können.

Bei allen Tieren ergab die Sektion m ig vergrößerte Leber und stark vergrößerte Milz, beide Organe durchsetzt von zahlreichen, weißen bis gelblichen, scharf umgrenzten, leicht prominierenden, stecknadelkopfgroßen Knötchen, die oft zu größeren Knoten zusammengeflossen waren. Oft war auch das Pankreas in dieser Weise verändert. Meist waren auch die Mesenterialdrüsen verdickt und im Innern zu gelblichem Brei verwandelt. Die Nieren waren vergrößert und hyperämisch; Mark- und Rindenzeichnung war verwaschen. Die Lunge zeigte das Bild einer doppelseitigen, lob ren Pneumonie. Knötchen fanden sich in der Lunge nie. Ausgesprochene Orchitis, wie sie unter anderen Kutscher als zum Bilde der Pseudotuberkulose gehörig beschreibt, wurde nicht beobachtet.

Histologisch hatten die Knötchen, die äußerlich Tuberkeln ähnelten, nicht deren Bau, sondern stellten kleine Abszesse dar. Es fanden sich

vorwiegend gelapptkernige Leukozyten; Riesenzellen wurden nicht nachgewiesen. Auch wurden keine Tuberkelbazillen gefunden, sondern nicht-säurefeste, gramnegative, sehr kurze, oft kokkenartige Stäbchen, die unten des näheren beschrieben werden.

Der Befund glich soweit vollkommen dem bei der von Malassez und Vignal, Eberth, Preisz und Pfeiffer (zitiert nach Poppe) zuerst beschriebenen und von Preisz so genannten Pseudotuberculosis rodentium. Bei unserer Seuche wurden die Stäbchen aus Milz, Leber, Niere, Pankreas, Lymphdrüsen, Lunge und Blut in Reinkultur, aus dem Darm neben gewöhnlichen Darmbakterien gezüchtet. Durch intraperitoneale Einspritzung von Reinkulturen gelang es, seuchenfreie Meerschweinchen, die streng isoliert gehalten wurden, zu töten, wobei die Sektion das typische Bild der Pseudotuberkulose ergab. Aus den eingegangenen Tieren wurde das Stäbchen wieder reingezüchtet und mit ihm wieder das gleiche Krankheitsbild erzeugt. Es war somit bewiesen, daß dieses Bakterium der Erreger der Krankheit und die Todesursache war. Alle diese Impfungen wurden an Tieren angestellt, die aus dem seuchenfreien Bestande einer hiesigen Klinik bezogen waren und im Institut in einem besonderen Raum im Keller gehalten wurden, während die durchseuchten Institutstiere sich in einem anderen Gebäude im Hofe befanden.

Bei näherer Untersuchung unterschied sich aber das gefundene Stäbchen in wesentlichen Punkten von dem im allgemeinen in der Literatur als Erreger angesprochenen *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, aber auch von dem von neueren Forschern für den Erreger gehaltenen echten *Bact. paratyphi B*; es war aber auch keinem der sonst beschriebenen Erreger völlig gleichzustellen. Ich nenne das durchaus wohlcharakterisierte Stäbchen nach seinem Fundort *Bact. pseudotuberculosis var. coloniensis* oder Pseudotuberkulosebakterium Köln (Ps. Tb. K.).

Das von mir isolierte Stäbchen ist sehr kurz, oft fast kokkenartig, gramnegativ und färbt sich gleichmäßig und leicht mit den gebräuchlichen Anilinfarben. Es bildet keine Sporen und besitzt Eigenbewegung. Es wächst gut bei 37° C, jedoch auch gut, wenn auch wesentlich langsamer, bei Zimmertemperatur. Auf Lackmusmilchzuckeragar entwickeln sich bei Züchtung frisch aus der Leiche in 2—3 Tagen durchsichtige, glashelle, kleine Kolonien, wesentlich langsamer als *Paratyphus B*-Kolonien. Nach weiteren 2—3 Tagen werden die einzeln stehenden Kolonien groß, weißlich und schleimig; nahe beieinander stehende fließen zusammen. Nach Uebertragung von Kulturen ist das Wachstum wesentlich rascher, schon nach 24 Std. sind stecknadelkopfgroße Kolonien zu beobachten. Aeltere Kolonierasen bekommen allmählich einen mehr bräunlichen Ton und einen sehr eigenartigen, stechenden, an Heringslake erinnernden Geruch. Auf Lackmus-Raffinoseagar bildet sich nach 1 bis 2 Wochen ein bei der Betrachtung im auffallenden Lichte grauweißliches Zentrum, das umgeben ist von einer blauen Zone und einem weißlichen, schleimigen, stark gezackten Rand. Eine Schleimwallbildung, wie sie bei echten *Paratyphus B*-Bakterien und Gärtnerschen Fleischvergiftungsbakterien beim Weiterwachsen in Zimmerwärme auftritt, fehlt; ebenso Knöpfchenbildung im Zentrum, wie sie bei echten *Paratyphus B*-Bakterien auf Raffinoseagar nach Reiner Müller auftritt. Gelatine wird nicht verflüssigt; bei Gelatinestichkulturen bildet sich dem Stichkanal entlang ein graugelblicher Schleier, ganz langsam entwickelt sich

auch Oberflächenwachstum. In Bouillon entwickelt sich ein krümeliger, weißlicher Bodensatz; die Flüssigkeit wird deutlich getrübt. Kettenbildung wie beim *Bact. pseudotuberculosis rodentium* fehlt, ebenso die für dieses Stäbchen nach vielen Literaturangaben charakteristische Ausscheidung feiner Kristalle. Indolbildung war nicht nachzuweisen. In Lackmusmolke tritt starke Alkalibildung ein, die sich durch ausgesprochene Blaufärbung schon nach 18—24 Std. kundgibt. Milch wird nach längerem Wachstum etwas aufgehellt, die Reaktion ist dabei ausgesprochen alkalisch.

Ein Ektotoxin ließ sich nicht nachweisen, obwohl bis zu 1 ccm sicher sterilen Filtrates von 1, 2 und 6 Tage alter Bouillonkultur Meerschweinchen in die Bauchhöhle eingespritzt wurde. Die so behandelten Tiere zeigten nicht die geringste Reaktion. Ebenso wenig gelang der Nachweis von Endotoxinen durch Injektion selbst großer Mengen durch Kochen abgetöteter Bakterien in die Bauchhöhle¹⁾.

Die Tierpathogenität ist für Meerschweinchen ausgesprochen. Es gingen Meerschweinchen schon nach intraperitonealer Einspritzung von $\frac{1}{50}$ Normalöse ein, und zwar unter dem Bilde allgemeiner Sepsis so rasch, daß es nicht zu Knötchenbildung kam. Durch weitere Meerschweinchenpassage wurde aber die Virulenz des Ps. Tb. K. abgeschwächt. $\frac{1}{50}$ und $\frac{1}{10}$ Normalöse töteten Meerschweinchen dann nicht mehr, sondern erzeugten nur mehrere Tage anhaltendes Fieber. Erst Dosen von $\frac{1}{5}$ Normalöse, intraperitoneal injiziert, töteten nach 6—7 Tagen, wobei dann die Sektion das typische Bild der Pseudotuberkulose ergab. Fütterungsinfektion gelang nicht, selbst bei Dosen von 1 Normalöse. Auch Kruse bezeichnet die Ergebnisse der Versuche, durch Verfütterung Pseudotuberkulose bei Meerschweinchen zu erzielen, als schwankend. Petrie und O'Brien gelang es nicht, Meerschweinchen durch Verfütterung mit Pseudotuberkulosebakterien zu infizieren, so daß sie die Erregernatur dieses Stäbchens negieren.

Für andere Nager scheint das Ps. Tb. K. wenig pathogen zu sein. Weiße und schwarzweiße Ratten wurden durch $\frac{1}{10}$ und $\frac{3}{10}$ Normalöse, subkutan injiziert, nicht getötet, ebenso wenig weiße Mäuse durch Injektion bis zu $\frac{1}{10}$ Normalöse, wie denn auch Cagnetto seinen Erreger der Pseudotuberkulose, der unter allen veröffentlichten Befunden meinem Bakterium am nächsten steht, für Mäuse nur wenig virulent fand.

Serologisches Verhalten: Zunächst wurde die Agglutinierbarkeit durch verschiedene hochwertige, vom Reichsgesundheitsamt bezogene Seren geprüft. Dabei zeigten über 3 Tage alte Kulturen Spontanagglutination, und zwar alle Stämme aus der Kölner Seuche gleichmäßig. 1 und 2 Tage alte Reinkulturen wurden dagegen von Paratyphus B-Serum bis zu dessen Endtiter (1:10 000) agglutiniert, von Enteritis-Gärtner-Serum bis zu einer Verdünnung 1:200. Typhus- oder Paratyphus A-Serum agglutinierte die Ps. Tb. K. nicht.

Es wurde dann versucht, bei einem Kaninchen für das Ps. Tb. K. spezifische Agglutinine zu erzeugen. Zunächst wurden mit Chloroformdämpfen abgetötete Bakterien in steigenden Dosen mit 8-täg. Zwischenräumen in die Ohrvene gespritzt, im ganzen 4mal. Bis zu 3 Wochen nach der letzten Injektion waren noch keine Agglutinine nachweisbar.

1) Es wurden zu diesem Zweck 5 Normalösen in etwa 20 ccm Bouillon aufgeschwemmt, 24 Std. bebrütet, dann einmal ganz kurz aufgekocht, zentrifugiert und das Zentrifugat injiziert.

Dann wurden in 7-täg. Zwischenräumen nacheinander 0,001, 0,003 und 0,005 Normalöse lebender Kultur intravenös injiziert. 8 Tage nach der letzten Einspritzung agglutinierte das Kaninchenserum alle aus der Kölner Seuche gewonnenen Stämme bis zur Verdünnung 1:1200. Paratyphus B-Bakterien wurden aber von diesem Serum nur in Verdünnungen 1:10 und 1:50 (schwach), ferner Bact. enteritidis Gärtner in Verdünnung 1:10, Fleischvergiftungsbakterien vom Typus Käsche-Breslau bis zur Verdünnung 1:100 (schwach) agglutiniert, Typhus- und Paratyphus A-Bakterien nicht. Der Uebersichtlichkeit wegen stelle ich die Agglutinationsverhältnisse nachstehend zusammen:

A. Aufschwemmung von Ps. Tb. K wird agglutiniert:

Serum	in Verdünnungen
Paratyphus B	bis zum Endtiter (1:10 000)
Gärtner	1:50 + 1:100 + 1:200 + 1:400 — usw.
Typhus	keine Agglutination
Paratyphus A	„ „

B. Serum von einem mit Ps. Tb. K. behandelten Kaninchen agglutiniert:

Stämme	in Verdünnungen
Ps. Tb. K.	1:50 + 1:100 + usw. bis 1:1200 + 1:1600 — usw.
Paratyphus B	1:10 + 1:50 ± 1:100 — usw.
Enteritis Gärtner	1:10 ± 1:50 — 1:100 — usw.
Typ. Breslau	1:10 + 1:50 + 1:100 ± 1:200 —

Vergleich des Ps. Tb. K. mit dem Bact. pseudotuberculosis rodentium und Bact. paratyphi B:

In nachstehender Uebersicht sind die Eigenschaften des Bact. pseudotuberculosis rodentium teils nach der Literatur (Poppe u. a.), teils nach eigenen Versuchen mit einem vom Reichsgesundheitsamt überlassenen Stamm beschrieben. Dieser Stamm bildete in Bouillon keine Kristalle, wie es auch Cagnetto beschreibt, doch stehen dem zahlreiche widersprechenden Literaturangaben entgegen. Dieser Stamm zeigte, wenn auch nicht sehr lebhaft, Eigenbewegung. Die Literaturangaben über Beweglichkeit sind widersprechend. Doch wurden die Angaben von E. Klein und Byloff, das Bact. pseudotuberculosis rodentium sei begeißelt, durch Untersuchungen von Plasaj und Příbram kürzlich wiederum bestätigt.

Desgleichen stammt die Beschreibung des bekannten Verhaltens des Bact. paratyphi B teils aus der Literatur (Kolle-Hetsch, Uhlenhuth und Hübener, Reiner Müller), teils aus Versuchen mit aus Stuhl und Blut von Kranken im hiesigen Untersuchungsamt gezüchteten Stämmen.

Daß also das bei der Kölner Epizootie als Erreger der Pseudotuberkulose gefundene Bakterium mit dem Bact. pseudotuberculosis rodentium und mit den Paratyphus B-Bakterien nahe verwandt ist, ist nach dem eben dargestellten anzunehmen, da es mit diesen in wesentlichen morphologischen und biologischen Eigenschaften übereinstimmt. Dennoch ist es mit keinem der beiden identisch, da es in wesentlichen Punkten von beiden abweicht. Vom Bact. pseudotuberculosis rodentium, mit dem es morphologisch und kulturell weitgehend übereinstimmt, trennt es das etwas verschiedene Verhalten in Milch und die raschere und stärkere Alkalibildung und das etwas

Bact. pseudotuberculosis rodentium	Ps. Tb. K.	Bact. paratyphi B
Kurzes, plumpes, oft fast kokkenartiges Stäbchen	Ebenso	Etwas längeres u. schlankeres Stäbchen
Gramnegativ	„	Ebenso
Keine Sporen	„	„
Eigenbewegung	„	„
In Bouillon kurze Ketten	Keine Kettchen	Keine Kettchen
Trübt Bouillon nicht gleichmäßig	Trübt Bouillon gleichmäßig	Ebenso
Scheidet in Bouillon feine Kristalle aus (s. vorhergehenden Absatz!)	Keine Kristalle	Keine Kristalle
Bildet kein Indol	Ebenso	Ebenso
Bildet in Lackmusmolke langsam und wenig Alkali	Bildet rasch und reichlich Alkali	Bildet erst Säure und dann Alkali
Vergärt Milchzucker nicht; Wachstum grauweiß auf Lackmus-Milchzuckeragar	Erst ebenso, in älteren Kulturen Farben mehr bräunlich	Ebenso, Wachstum weißlichblau
Auf Endoagar zuerst durchscheinende, dann weißlich-gelbliche Kolonie	Ebenso	Ebenso
Auf Lackmus-Raffinoseagar weißliches Zentrum mit grauweißer, stark gezackter Randzone	Grauweißl. Zentrum, dann blaue Zone u. grauweißl. stark gezackte Randzone	Blaues Zentrum umgeben v. weißl. Schleimwall. Im Zentrum Knöpfchenbild.
Auf Malachitgrünagar spärliches Wachstum, keine Wallbildung	Ebenso	Ueppiges Wachstum u. ausgesprochene Wallbildung
Vergärt nicht Traubenzucker	„	Vergärt Traubenzucker
Verändert nicht die Farbe von Neutralrotagar	„	Leichte Verfärbung
Gelatine nicht verflüssigend	„	Ebenso
Bildet kein lösliches Toxin	„	„
Wird von Paratyphus B-Serum nicht agglutiniert	Wird von Paratyphus B-Serum agglutiniert	„

anders geartete Wachstum auf Lackmus-Raffinoseagar. Vor allem aber die wichtige Tatsache, daß das Ps. Tb. K. vom Paratyphus B-Serum noch in hoher Verdünnung agglutiniert wird, im Gegensatz zum Bact. pseudotuberculosis rodentium. Vom Bact. paratyphi B trennt das Ps. Tb. K. vor allem seine raschere, stärkere und regelmäßiger Alkalibildung, sein typischer Geruch, sein völlig anderes Verhalten auf Raffinose und Malachitgrünagar und besonders die Tatsache, daß es Traubenzucker nicht vergärt und Neutralrot nicht verändert.

Dazu kommt noch die beiden anderen Bakterien gegenüber verschiedene Tierpathogenität. Während das Ps. Tb. K. nur für Meer-schweinchen eine deutliche Pathogenität besitzt, Ratten und Mäuse aber nicht wesentlich schädigt, sind Bact. pseudotuberculosis rodentium (nach Poppe u. a.) wie auch Paratyphus B-Bakterien hochvirulent für alle Nager, zumal auch für Mäuse und Ratten.

Dennoch scheint das Ps. Tb. K. mit den Paratyphus B-Bakterien nahe verwandt. Ja, die Tatsache, daß es von Paratyphus B-Serum noch in hoher Verdünnung agglutiniert wird, könnte dazu verleiten, es mit

dem Paratyphus B-Bakterium zu identifizieren. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß das Serum, das von dem mit Ps. Tb. K. behandelten Tier stammt, alle Stämme der Kölner Seuche in hoher Verdünnung agglutiniert, Paratyphus B-Bakterien aber nur in so geringer Verdünnung, daß die Agglutination praktisch als negativ bezeichnet werden muß.

Man könnte nun einwenden, daß der von mir gefundene Erreger ein durch Tierpassage an Meerschweinchen angepaßtes Paratyphus B-Bakterium sei. Wenn auch rein theoretisch diese Annahme nicht ganz von der Hand zu weisen ist, so gelang es mir doch nicht, eine solche Umwandlung experimentell zu erzeugen. Trotz mehrfacher, aneinander gereihter Tierpassagen konnte ich mit Kulturen von Paratyphus B-Bakterien, die aus dem kranken Menschen frisch gezüchtet waren, in keinem Falle pseudotuberkulöse Veränderungen beim Meerschweinchen erzeugen. Entweder gingen die Tiere bei größeren Dosen unter dem Bilde einer Sepsis ein, oder sie überstanden nach Injektion sehr kleiner Dosen die Infektion nach kurzem Kranksein. Die Sektion nach Abklingen des Fiebers ergab dann keinerlei sichtbare Veränderung der lebenswichtigen Organe.

Es handelt sich also bei dem gefundenen Erreger einer Pseudotuberkuloseseuche im Meerschweinchenbestand um einen besonderen, wohlcharakterisierten Typ, der wohl am besten als paratyphus-ähnlich angesprochen wird.

Die Literatur über Nagetierpseudotuberkulose zeigt, daß die ersten Forscher, die das eigenartige Krankheitsbild beobachtet haben, Malassez und Vignal, schon 1883 und 1884 feststellten, daß in den echten Tuberkeln so ähnlichen Knötchen der Kochsche Tuberkelbazillus sich nicht nachweisen ließ, wohl aber im Schnittpräparat kurze Ketten bildende Bakterien von oft kokkenartiger Gestalt, die sich reinzüchten ließen und mit denen man wiederum künstlich tuberkuloseähnliche Veränderungen hervorrufen konnte. Während aber Malassez und Vignal glaubten, daß die Pseudotuberkulose infolge Mischinfektion aus tuberkulösem Impfmateriale entstanden sei, hervorgerufen durch Bakterien und Zoogloeamassen, stellte schon kurz darauf Eberth fest, daß die Pseudotuberkulose eine spontane Krankheit der Meerschweinchen sei, hervorgerufen nur durch Stäbchen, aus denen auch die Zoogloeamassen sich zusammensetzten. Etwa 10 Jahre später veröffentlichte Preisz eigene Untersuchungen, wonach die bisher veröffentlichten Fälle von Nagetierpseudotuberkulose als durch einen einheitlichen Erreger hervorgerufen anzusehen sei, und gab diesem Erreger den Namen „Streptobacillus pseudotuberculosis rodentium“. Cagnetto beschrieb 1905 als Erreger einer Pseudotuberkulose ein Stäbchen, das dem Preiszschen, aber auch dem Ps. Tb. K., sehr ähnlich ist. Auch im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann (Ausgabe 1913) finden wir von Poppe als gewöhnliche Ursache der Pseudotuberkulose der Nagetiere das *Bact. pseudotuberculosis rodentium* angegeben als einen besonderen, wohlcharakterisierten Typ, dessen morphologische und kulturelle Eigenschaften sich eng an die Befunde von Preisz anschließen. Das serologische Verhalten des Stäbchens wird nicht beschrieben. Lassen diese Befunde aber schon eine große Ähnlichkeit mit den Bakterien der Paratyphus B-Gruppe hervortreten, so müssen wir aus den Befunden von E. Klein in London aus dem Jahre 1899 schließen, daß er Paratyphus B-Bakterien als Erreger einer Pseudotuberkulose gefunden hatte. Th. Smith, van Ermengem und Durham fanden bei der Meerschweinchenpseudotuberkulose Stäbchen, die sie zur Gruppe der Paratyphus B-Bakterien rechnen (zitiert nach Weber und Händel). Auch Petrie und O'Brien fanden ein Stäbchen, das sich von *Bacterium Aertrycke* und *Bacterium suipestifer* nicht unterscheiden ließ. Sie vermuteten allerdings wegen der fehlgeschlagenen Versuche, durch Verfütterung des Keimes die Krankheit zu erzeugen, daß dieser Keim nur ein Begleitbakterium sei, und daß die Krankheit selbst durch ein filtrierbares Virus übertragen würde, was allerdings jetzt durch die Tatsache, daß die Krankheit sich durch die beschriebenen Stäbchen künstlich erzeugen läßt, widerlegt ist. Daß die Pseudotuberkulose durch Paratyphus B-Bakterien hervorgerufen werden könne, stellten auf Grund eigener Befunde bei Spontanseuchen unter anderen Dieterlen, Eckersdorff, Böhme und Uhlenhuth und Hübener fest. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß im allgemeinen von diesen Forschern auch solche Bakterien, wie

die Fleischvergiftungsbakterien vom Typus Känsche-Breslau (Aertrycke) Mäuse-typhusbakterien usw. als Paratyphus B-Bakterien bezeichnen, die von anderen innerhalb der Paratyphusgruppe auseinandergehalten werden. Daß die Pseudotuberkulose durch paratyphusähnliche Stäbchen hervorgerufen werden kann, geben auch Kruse und Kolle-Hetsch in ihren Lehrbüchern an. Loeffler (zitiert nach Uhlenhuth und Hübener) fand einmal den Gärtnerschen Typ der Fleischvergiftungsbakterien als Erreger bei einem an Pseudotuberkulose verendeten Meerschweinchen. Nach Lehmann und Neumann ist das *Bact. pseudotuberculosis rodentium* den Pestbakterien ähnlich, doch stützt sich diese Angabe neben einigen kulturellen Ähnlichkeiten hauptsächlich auf die Angabe von Zlatogoroff, daß er durch Vorbehandlung mit *Bact. pseudotuberculosis rodentium* Meerschweinchen und Ratten in gewissem Maße gegen Pest immunisiert habe, während sonst doch sehr wesentliche morphologische und biologische Unterschiede bestehen. Durch abgeschwächte Pestbakterien selbst können nach Kruse bei Ratten Krankheitsbilder hervorgerufen werden, die an Pseudotuberkulose erinnern, bei Mäusen auch durch Sproß- und Fadenpilze. Bei Mäusen fand Kutscher diphtheroide Stäbchen, die auch schon Preisz bei einer im Sinne der Pseudotuberkulose veränderten Schafniere festgestellt hatte.

Nehmen wir nun meinen Befund eines serologisch dem Paratyphus B-Bakterium sehr nahestehenden, kulturell aber in einigen Punkten von ihm sich unterscheidenden Stäbchens als Erreger einer Meerschweinchenpseudotuberkulose hinzu, so sehen wir, daß diese Epizootie hervorgerufen wird durch Bakterien, die zur Paratyphusgruppe zu rechnen sind. Zu dieser gehört auch das *Bact. pseudotuberculosis rodentium*; denn der von mir gefundene Stamm, der serologisch dem Paratyphus B-Bakterium nahesteht, morphologisch und kulturell aber dem *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, schlägt die Brücke zwischen dem *Bact. pseudotuberculosis rodentium* und der Paratyphusgruppe. Auch das Wachstum auf Lackmus-Raffinoseagar ist so, daß die Ähnlichkeit einerseits mit dem *Bact. pseudotuberculosis rodentium*, andererseits mit dem Paratyphus B-Bakterium deutlich ist.

Ich möchte nun annehmen, daß manchmal Meerschweinchenseuchen durch paratyphusähnliche Stäbchen hervorgerufen werden, ohne daß man das typische Bild der Pseudotuberkulose findet. Denn die erwähnte langsame Virulenzabnahme des Erregers durch Tierpassage bringt es mit sich, daß bei der anfänglich hohen Virulenz des Erregers die Tiere zunächst an Sepsis zugrunde gehen, ohne daß sich anatomisch etwas anderes als pneumonische Lungenveränderung finden läßt. Erst, wenn durch Abnahme der Virulenz die Krankheit einen mehr protrahierten Verlauf nimmt, entstehen kleine lokalisierte Prozesse und somit erst das typische Bild der Pseudotuberkulose. Durch Paratyphus B-Bakterien, die ganz besonders virulent für Meerschweinchen sind, wurden ja in meinen Versuchen auch nur septische Krankheitsbilder erzeugt, und in unserer spontanen Seuche wurde auch erst die Pseudotuberkulose diagnostiziert, nachdem eine Anzahl von Tieren eingegangen war, deren Sektion als Todesursache nur doppelseitige Pneumonie ergab. Auch das langsame Erlöschen der Seuche erklärt sich vielleicht mit durch die allmähliche Virulenzabnahme des Erregers. So ist vielleicht die Pseudotuberkulose der Nager, nur die chronische Verlaufsform einer im allgemeinen unter dem Bilde der Sepsis verlaufenden Seuche, die durch Bakterien der Paratyphus B-Gruppe hervorgerufen wird. Auch beim Menschen kann ja der Paratyphus unter dem Bilde der allgemeinen Sepsis, sogar unter Vorwiegen von Lungensymptomen verlaufen, wie es noch in letzter Zeit Mactdam für eine Seuche in Mesopotamien mit Paratyphus B-Bakterien beschrieben hat.

Als Uebertragungsweise der Seuche kommt wohl bei den sehr unsicheren Ergebnissen der Fütterungsversuche vor allem, wenn auch vielleicht nicht allein, die Tröpfcheninfektion in Frage, da ja die Lunge stets sehr stark befallen ist und diese den Erreger in meinen Fällen fast stets in Reinkultur enthielt.

Ob es möglich sein wird, durch Immunisierung wenigstens diejenigen Meerschweinchen in Seuchenzeiten zu schützen, die zu diagnostischen Zwecken mit anderem Material geimpft werden sollen, und somit Störungen von Tierversuchen zu vermeiden, behalte ich einer anderen Arbeit zu entscheiden vor.

Zusammenfassung. Bei einer Meerschweinchenseuche, die vom pathologisch-anatomischen Standpunkte aus als Pseudotuberkulose anzusehen war, wurde ein Stäbchen, *Bact. pseudotuberculosis* var. *coloniensis*, isoliert, das serologisch dem Paratyphus B-Bakterium sehr nahe steht, kulturell und morphologisch in der Mitte zwischen dem Preiszschen *Bact. pseudotuberculosis rodentium* und dem Paratyphus B-Bakterium steht. Im Verein mit den in der Literatur veröffentlichten Befunden ergibt dieser Befund, daß die Meerschweinchenpseudotuberkulose durch Erreger hervorgerufen wird, die zur Paratyphus B-Gruppe gehören, wozu auch das Preiszsche *Bact. pseudotuberculosis rodentium* zu rechnen ist.

Abgeschlossen am 4. März 1921.

Literatur.

- 1) Böhme, A., Zeitschr. f. Hyg. Bd. 52. 1906. S. 97. — 2) Cagnetto, Ann. de l'Institut. Pasteur. 1905. p. 449. — 3) Dieterlen, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsa. 1909. S. 429. — 4) Eberth, Virchows Arch. Bd. 100. 1885. S. 15. — 5) Eckersdorff, Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie zu Frankfurt. 1908. S. 61. — 6) Klein, E., Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Bd. 26. 1899. S. 260. — 7) Kolle-Hetsch, Die experim. Bakteriologie u. d. Infektionskrankheiten. Berlin u. Wien 1919. S. 360 u. f. S. 762. — 8) Kruse, W., Einführung i. d. Bakt. Berlin u. Leipzig. 1920. — 9) Kutscher, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 18. 1894. S. 327. — 10) Ders., Ebenda. Bd. 21. 1896. S. 156. — 11) Lehmann u. Neumann, Atlas u. Grundriß d. Bakt. T. 2. München 1920. — 12) Mac Adam, W., Lancet. 1919. p. 189; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 70. 1920. S. 549. — 13) Malassez u. Vignal, Arch. de physiol. norm. et pathol. 1883. T. II. p. 369 u. 1884., T. I. p. 81. — 14) Müller, Max, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 80. 1918. S. 413. — 15) Müller, Reiner, München. med. Wochenschr. 1914. S. 471. — 16) Petrie u. O'Brien, Journ. of Hyg. Vol. 10. 1910. No. 2; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 49. 1911. S. 241. — 17) Plasaj u. Pfißram, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. 1921. Beih. S. 113. — 18) Poppe, Pseudotuberkulose. (Handb. d. pathog. Mikroorganism. von Kolle u. Wassermann. Bd. 3. 1913.) — 19) Preisz, Ergebn. d. allg. Aetiol. usw. von Lubarsch-Ostertag. 1896. S. 733. — 20) Uhlenhuth u. Hübener, Handb. d. pathog. Mikroorganism. von Kolle-Wassermann. Bd. 5. 1913. — 21) Uhlenhuth, Deutsch. med. Wochenschrift. 1920. S. 1407. — 22) Weber u. Haendel, Berlin. klin. Wochenschr. 1912. Nr. 47.

Nachdruck verboten.

Ueber Immunisierung mit Diphtherietoxin-Antitoxin- gemischen.

IV. Mitteilung.

[Aus dem staatlich serotherapeutischen Institut (Vorstand: Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf, serolog.-bakt. Abteilung; Abteilungsvorsteher: Dr. Busson).]

Von B. Busson und E. Löwenstein.

An einer Reihe von Arbeiten hat der eine von uns nach langwierigen Versuchen zunächst beim Tetanustoxin gezeigt, daß es gelingt, die giftige Komponente des Tetanustoxins vollkommen zu beseitigen, ohne daß dabei die Immunisierungskraft eine Einbuße erleidet.

Nach weiteren Versuchen ließ sich der Vorgang dahin vereinfachen, daß mit Formol versetztes Tetanusgift der Wärmestrahlung ausgesetzt wurde, wodurch nach einer gewissen Zeit die Giftwirkung vollkommen beseitigt und doch die Immunisierungskraft vollkommen erhalten wurde.

Es war natürlich naheliegend, diese Versuche auch auf andere Toxine auszudehnen, insbesondere auf das Diphtherietoxin, zu übertragen. Aber sowohl die Versuche, welche Löwenstein allein, als auch gemeinsam mit Eisler in dieser Richtung unternommen hatte, schlugen alle fehl.

Wir haben diese Versuche neuerlich aufgenommen und Diphtherietoxin mit verschiedenen Mengen Formalin versetzt und monatelang der Bruttemperatur ausgesetzt; es verschwand unter der Formolwirkung wohl die Giftigkeit, aber zugleich mit ihr auch die Immunisierungskraft solcher Diphtherietoxine.

Auf einer Beobachtung fußend, daß die Giftigkeit einer Diphtheriebouillon durch Gefrierenlassen sehr zurückgeht, haben wir Diphtherietoxin systematisch gefrieren und wieder auftauen lassen und solche Toxine, die diesen Prozeß etwa 20mal durchgemacht haben, geprüft. Es zeigt sich dabei eine erhebliche Abnahme der Giftigkeit, ohne Erhaltung der immunisierenden Wirkung bei Einverleibung größerer Dosen.

Es blieb demnach für das Diphtheriegift nur eine Art von Entgiftung, bei der neben dieser die immunisierende Kraft erhalten bliebe, zur Untersuchung übrig, nämlich die Entgiftung durch Antitoxin.

Mit solchen Toxin-Antitoxinmischungen hat schon vor uns eine Reihe von Autoren gearbeitet, wie Babes, Roux, Kretz, Dreyer und Madsen, Th. Smith, Koch, Park und Atkinson, Grassberger und Schattenfroh, Südmersen u. a. Vor allem aber Behring, der auf die Verwendung solcher Toxin-Antitoxinmischungen sein neues Diphtheriebekämpfungsverfahren basierte, von der Erkenntnis geleitet, daß die erfolgreiche Seuchenbekämpfung nur durch aktive Immunisierung erzielt werden könne. v. Behring arbeitete mit Mischungen, bei welchen ein ständiger, wenn auch sehr geringer, Giftüberschuß vorhanden war, von der Voraussetzung ausgehend, daß gerade dieser freie Giftüberschuß die Immunität auslösen würde.

Gegen die Verwendung von Impfstoffen mit Giftüberschuß erhob als erster 1914 Löwenstein berechnigte Einwände, von der Befürchtung ausgehend, daß man die Wirkung des freibleibenden Giftüberschusses auf den Organismus in seinen Folgeerscheinungen nicht für alle Fälle im vorhinein abschätzen könne, und weiter, weil die dabei verhältnismäßig sehr spät (zwischen 20—40 Tagen) in Erscheinung tretende Immunität, z. B. bei prophylaktischer Anwendung, den Organismus gerade zur Zeit der Bedrohung nicht mit Antitoxin versorgt, also keinen Impfschutz verleiht. Ueberdies leitete ihn bei diesen Voraussetzungen der Gedanke, daß die Verbindung Diphtherietoxin-Antitoxin im Organismus zerlegt würde¹⁾, so daß allmählich das Toxin quantitativ unter gewissen Bedingungen abgespalten würde, und zwar im Gegensatz zum Standpunkte Behrings, daß nur der Giftüberschuß die Immunität hervorruft. Gegen diese Annahme Behrings sprechen vor allem 2 Gründe: 1) der verzögerte Eintritt der Immunität, 2) die Höhe des erreichten Immunitätsgrades.

Auf Grund dieser Erwägungen prüfte Löwenstein die immunisatorische Wirkung überneutralisierter Gemische und fand, daß schwach überneutralisierte Gemische im Meerschweinchen relativ hohe Immunität erzeugen können.

An dieses Ergebnis haben wir nun unsere gemeinsamen weiteren Versuche in umfangreicherer Weise angeschlossen, und dies führte zunächst zur Bestätigung, daß schwach überneutralisierte Gemische im Meerschweinchen Immunität erzeugen. Wenn wir die Gemische länger stehen ließen, im vorliegenden Falle dauerte die Bindung 2 Mon., dann zeigte sich, daß selbst 2-fach überneutrale Gemische noch immunisierend wirken. Wir haben dann unsere Versuche auch auf das Verhalten von Kaninchen und Ziegen gegenüber solchen Toxin-Antitoxingemischen ausgedehnt und konnten schon damals feststellen, daß sich im Laufe des längeren Lagerens der Diphtherietoxin-Antitoxinmischung eine Aenderung der Toxinneutralisation nachweisen läßt, die sich, zunächst am Meerschweinchenorganismus geprüft, in einer gesteigerten Immunisierungskraft äußerte. Abgelagerte unterneutralisierte Gemische wurden giftiger, neutrale Gemische wurden schwach toxisch und abgelagerte überneutrale Gemische bestimmter Konzentration, welche in frischer Form nicht zu immunisieren vermochten, wirkten nunmehr im abgelagerten Zustande immunisierend.

Wir nahmen diese Arbeiten das 1. Mal wieder 1920 auf, wobei wir wieder mit denselben Gemischen arbeiteten, mit denen wir 1914 unsere Resultate erzielt hatten. Diese Mischungen hatten nahezu 6 Jahre im Eisschrank gelagert. Dadurch waren wir in der Lage, die Brauchbarkeit, resp. Haltbarkeit solcher Toxin-Antitoxinmischungen über einen Zeitraum hinaus zu prüfen, wie er bisher experimentell noch nie geprüft worden war.

Damals gelangten wir auf Grund dieser Arbeit zu folgenden Schlußfolgerungen:

1) Im Tierversuch gelingt es auch mit neutralen und schwach überneutralisierten Diphtherietoxin-Antitoxingemischen, aktive und passive Immunität zu erzeugen; nur durch sehr genaue Untersuchungen läßt sich die Breite der Immunisierungszone bestimmen.

1) Steyskal fand schon 1904, daß neutrale Gemische von Diphtherie-Antitoxin nach bestimmter Vorbehandlung der Versuchstiere (Jodkali, Deuteroalbumosen) im Organismus giftig werden, und nimmt ebenfalls eine Sprengung der Bindung als Ursache an.

2) Beim Lagern der Gemische tritt eine Zunahme der Toxizität ein, unterneutralisierte Mischungen rufen Spättod und Paralyse hervor.

3) Die so erzeugte Immunität tritt verhältnismäßig spät ein, wird nach 20 Tagen nachweisbar und erreicht ihren Höhepunkt erst nach 3—4 Mon.

4) Nicht nur von der Qualität, sondern auch von der Quantität des zur einmaligen Injektion verwendeten Gemisches scheint bis zu einem gewissen Grade auch die darauf eintretende Immunität abhängig zu sein, und sie ist im allgemeinen ausgeprägter, wenn größere Mengen der betreffenden Gemische injiziert werden. Daß aber das Wesentliche dabei nicht, wie Behring annimmt, der freie Giftüberschuß sein kann, geht auch daraus hervor, daß die mit solchen Gemischen erzielte Immunität höher ist, als die durch einmalige Toxininjektion erreichbare. Es scheint vielmehr im Laufe der bis zur entwickelten Immunität verflossenen Zeit zu einer fortgesetzten Giftabspaltung zu kommen.

5) Stark überneutralisierte Gemische erzeugen keine Immunität.

6) Die subkutane Impfung der Diphtherietoxin-Antitoxingemische erweist sich nach unseren Versuchen als völlig ebenbürtig der von Behring empfohlenen intrakutanen Methode.

7) Die für die Praxis zur Ausgabe gelangenden Gemische sind nach unserer Beobachtung bei kühler und dunkler Aufbewahrung sehr lange Zeit haltbar, aber es tritt nach 2 Mon. und nach längerem Lagern des Gemisches noch eine weitere, wenn auch geringe Zunahme der Giftigkeit in Erscheinung, die vielleicht davon abhalten sollte, unterneutralisierte Mischungen lagern zu lassen. Deshalb glauben wir, daß die Verwendung unterneutraler Mischungen von Toxin und Antitoxin zu prophylaktischen Zwecken in der Praxis noch nicht spruchreif ist, sondern daß hierfür noch weitere Versuche notwendig sind, um so mehr, als auch die Wirkung der dabei eventuell freibleibenden Toxine noch nicht genügend studiert ist.

8) Nach unseren Untersuchungen wären schwach überneutralisierte Mischungen, welche auch in der Menge von 4 ccm bei 250 g schweren Meerschweinchen keinerlei Krankheitserscheinungen auslösen, zu verwenden. Mischungen hingegen, die in der Menge von 2 ccm noch Meerschweinchen im Gewicht von 250 g töten, sind vom Gebrauch auszuschließen.

Da uns als Endziel die praktische Anwendung beim Menschen vor-schwebte, mußten wir uns auch die Frage vorlegen, wie sich ein für Diphtheriegift hochempfindlicher Organismus wie das Kaninchen gegenüber diesen Gemischen verhält. Georg Dreyer und Thorwald-Madsen haben in ihrer schönen Arbeit über Immunisierung mit den Toxonen des Diphtheriegiftes (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 37. 1901. S. 250) schon beschrieben, daß die Kaninchen für die Toxine und Toxone des Diphtheriegiftes viel empfindlicher sind als Meerschweinchen. Bei ihren sämtlichen Versuchen, mit Toxonen zu immunisieren, hatten sie nur Fehlschläge zu verzeichnen. „Die Tiere gingen fast immer an Kachexie verloren, oft lange Zeit nach der Toxininjektion“. Bei einem einzigen Kaninchen gelang es ihnen im Laufe einer langwierigen Behandlung, welche sich vom 28. Sept. bis 12. Okt. erstreckte, eine Immunität zu erzielen.

Mit diesen Angaben Dreyers und Madsens stimmen unsere Versuche aus 1914 vollkommen überein. 2 Tiere zeigten damals eine aktive und passive Immunität, und zwar waren es solche Tiere, welche mit einer damals für Meerschweinchen glatten Mischung injiziert worden waren. Die unterneutralisierten Gemische hatten damals weder eine aktive noch eine passive Immunität bei den überlebenden Kaninchen ausgelöst. Durch das lange Lagern der Toxin-Antitoxinmischungen hat sich die Immunisierungszone ersichtlich verbreitert, wie uns eine vergleichende Gegenüberstellung der nachfolgenden Tabellen beweist.

Tabelle I offenbart uns noch eine andere wichtige Erscheinung. Dreyer und Madsen haben schon immer 8 Tage nach der Toxininjektion die Antitoxinprüfung vorgenommen. Schon die ersten Arbeiten Löwensteins zeigten aber, daß der Eintritt der Immunität nach Injektion von Toxin-Antitoxingemischen erst spät und nicht vor 40 Tagen

Tabelle I aus dem Jahre 1914.
 Prüfung auf Antitoxinbildung im Kaninchen nach Injektion von Diphtherietoxin-Antitoxinmischungen, die 60 Tage bei Eisschranktemperatur in Kontakt waren.

Art des Gemisches	Nr. des Versuchstieres	Injiziert am	Gestorben am	Prüfung auf Antitoxinbildung durch passive Serumübertragung auf Meer-schweinchen				Ergebnis der Prüfung durch passive Serumübertragung		60 Tage nach der Injektion Prüfung auf aktive Immunität		Ergebnis der Prüfung auf aktive Immunität
				Nr. des Versuchstieres	Nr. der Übertragenen	Menge des Serums	Menge des Toxins	Nr. des Versuchstieres	Injizierte Toxinmenge	Nr. des Versuchstieres	Injizierte Toxinmenge	
Unterneutrales Gemisch 0,3 Ser. + 57 Tox.	497	2. April	—	497	1724	0,5	0,018	+	nach 2 Tagen	497	2 1/2-fach tödl. Dosis pro kg intra-venös	+ nach 2 Tag.
	1640	2. "	10. April	1798	1798	0,5	0,018	+	" 3 "			
Neutrales Gemisch 0,4 Ser. + 57 Tox.	301	2. "	—	301	1714	0,5	0,018	+	3 "	301	do.	überlebt
	438	2. "	—	438	1716	0,5	0,018	+	überlebt	438	do.	"
Ueberneutrales Gemisch 0,5 Ser. + 57 Tox.	1787	2. "	—	1787	1707	0,5	0,018	+	nach 4 Tagen	1787	do.	+ nach 2 Tag.
	1579	2. "	—	1579	1702	0,5	0,018	+	" 4 "	1579	do.	+ " 2 "
Ueberneutrales Gemisch 1,0 Ser. + 57 Tox.	1046	2. "	—	1046	1758	0,5	0,018	+	3 "	1046	do.	+ " 2 "
	1168	2. "	—	1168	1777	0,5	0,018	+	3 "	1168	do.	+ " 1 "
Ueberneutrales Gemisch 10,0 Ser. + 57 Tox.	145	2. "	—	145	1778	0,5	0,018	+	3 "	145	do.	+ " 1 "
	1093	2. "	13. Mai	1711	1785	0,5	0,018	+	3 "	1093	do.	+ " 1 "

Auswertung verschiedener Diphtherie-Antitoxingemische, die vor 6 Jahren gemischt im Kaninchen. Jedes der Versuchstiere war zu Beginn des Versuches 1500 g schwer und also 130 Tage später, nochmals, dieselbe Menge 0,5 ccm. Die für die passive Auswertung

Art des Serum-Toxingemisches	Nr. der immunisierten Kaninchen	Prüfung des Kaninchenserums auf Antitoxingehalt				
		Menge des Kaninchenserums	Menge des Toxins	38 Tage nach der 1. Injektion auf M.-S. Nr.	Ergebnis	85 Tage nach der 1. Injektion auf M.-S. Nr.
57 ccm Toxin + 0,3 ccm Serum toxisch	396 ¹⁾
	1768
57 ccm Toxin + 0,4 ccm Serum ganz schwach toxisch	646	1 ccm	0,02	281	† 4	249
		dgl.	"	269	† 3	128
	176	"	"	283	† 3	250
		"	"	7	† 4	140
57 ccm Toxin + 0,5 ccm Serum schwach überneu- tral	1960 ¹⁾	"	"	162	† 3	219
		"	"	231	† 3	70
	436	"	"	118	† 4	53
		"	"	113	† 2	52
57 ccm Toxin + 1,0 ccm Serum stark überneutral	305	"	"	276	† 3	176
		"	"	222	† 3	245
57 ccm Toxin + 10,0 ccm Serum sehr hoch überneu- tral	320	"	"	294	† 3	66
		"	"	208	† 3	113

eintritt. Wir konnten in unseren gemeinsamen Arbeiten den Beweis erbringen, daß bis zum 120. Tage noch ein Ansteigen der Immunität zu beobachten ist. Nunmehr zeigt die experimentelle Prüfung der Kaninchen, daß erst 180 Tage nach der 1. Injektion die Höhe der Immunität erreicht zu sein scheint. Die negativen Resultate von Dreyer und Madsen können also sehr wohl darauf zurückzuführen sein, daß sie zu früh prüften, indem sie sich mit der Prüfung des Aderlasses nach 8 Tagen begnügt haben; sie gingen eben von der Voraussetzung aus, daß der freie Giftüberschuß die Immunität bewirkt, im Gegensatz zu unserer Auffassung, daß durch eine Zerlegung der Toxin-Antitoxinverbindung im Organismus das Toxin und möglicherweise sogar die ganze einverleibte Toxinmenge zur Wirkung kommt, eine Auffassung, die um so wahrscheinlicher ist, da bei getrennter Injektion von Toxin und Antitoxin die im Bereiche der Anwendungsmöglichkeit liegenden Toxindosen nicht zur Immunitätserzeugung ausreichen.

Durch diese Untersuchungen ist es also zum mindesten sehr wahr-

1) Kaninchen 1960 stirbt 90 Tage nach der Injektion, wogegen von den beiden höher neutralisierten Gemischen je 1 Tier schon nach 36 Tagen stirbt. Die beiden Kaninchen, Nr. 38 und 1796, die mit unterneutralem Gemisch injiziert wurden, starben 60 Tage nach der Injektion.

belle II.

und im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, auf ihr Antitoxinbildungsvermögen erhielt am 24. Sept. 1920 je 0,5 ccm des jeweiligen Gemisches subkutan und am 31. Jan. 1921, zur Serumübertragung benützten Meerschweinchen sind durchweg 250—260 g schwere Tiere.

durch Serumübertragung auf Meerschweinchen.			Prüfung auf aktive Immunität der Kaninchen 180 Tage nach der ersten und 60 Tage nach der zweiten Injektion		
Ergebnis	180 Tage nach der 1. Injektion 50 " " " 2. " Nr.	Ergebnis	Nr. und Gewicht des Kaninchens	Menge des intravenös einverlebten Toxins	Ergebnis
.
+ 6 + 20	52	+ 14	646 (2500)	0,04	überlebt
+ 3 Paralysen	278	überlebt	176 (2500)	0,04	"
+ 3 + 3	—	—	436 (2500)	0,04	"
+ 3 + 3	193	+ 6			
+ 5 + 3	113	+ 3	305 (2750)	0,04	+ 2
+ 3 + 2	204	+ 3	320 (2000)	0,03	+ 2

scheinlich gemacht, daß das injizierte Gemenge von antitoxischem Pferdeserum und Diphtheriegift sehr lange im Kaninchenorganismus erhalten bleiben muß, und daß daraus das Toxin nur langsam abgespalten wird, denn sonst wäre es nicht zu erklären, warum nach Injektion solcher Gemische die volle Immunität erst nach 120—180 Tagen nachweisbar wird.

Noch eine weitere, sehr wichtige Tatsache geht aus unseren Arbeiten hervor; bisher nahm man an, daß bei Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin eine stabile Verbindung zustande komme. Unsere Auswertung derselben Gemische ist zu 4 verschiedenen Zeiten gemacht: sofort, nach 24 Std., nach 60 Tagen und über 6 Jahren. Bei allen Lösungen, bei denen der Antitoxinüberschuß nicht zu groß war, zeigte sich ein Zurückgehen des Antitoxingehaltes bereits nach 60 Tagen, und nach 5 Jahren war ein weiterer Schwund der Antitoxinwirkung eingetreten, da jetzt Lösungen, welche früher glatt waren, nach dieser Zeit Stränge oder Infiltrate erzeugten, und sogar in großen Dosen, die früher glatt vertragen wurden, nunmehr den Tod des Versuchstieres zur Folge haben konnten.

Hierfür könnte man einen Zerfall des Antitoxinmoleküls verantwortlich machen, oder eine Zerlegung und Neulagerung der ersten statt-

gehabten Bindung. Wir glauben, der Wahrheit mit der Annahme am nächsten zu kommen, daß mit der Dauer des Kontaktes immer noch mehr Antitoxin gebunden wird und glauben dies zu ersehen a) aus der Zunahme der Giftigkeit, b) aus der Zunahme der Breite der Immunisierungszone.

Damit natürlich drängt sich von selbst wieder die alte Streitfrage auf, ob die Bindung von Antitoxin und Toxin wirklich eine so feste ist, daß ein neuer Körper entsteht, oder ob nicht doch mehr ein Aneinanderlagern vorliegt. So wichtig diese Entscheidung auch für das ganze Verständnis der Immunitätsreaktion im Organismus wäre, müssen wir diese Frage doch zunächst unbeantwortet lassen.

Diese beobachtete Zunahme der Giftigkeit beim Lagern der Gemische hat nun natürlicherweise auch eine große praktische Bedeutung: das Ergebnis unserer Tierversuche, nach denen die Injektion neutralisierter gelagerter Mischungen so schwere Folgen für das Versuchstier haben, gibt zu berechtigten Befürchtungen bei Verwendung derartiger Mischungen am Menschen Anlaß, und solche Lösungen dürften überhaupt nur in ganz frischem Zustande verwendet werden, 1 Monat alte Lösungen wären schon vom Gebrauch auszuschließen, wenn sie unterneutralisiert waren.

Wir haben auch mit den von den Behring-Werken abgegebenen Impfstoffen eine kleine Versuchsreihe angestellt, welche die folgende Tabelle wiedergibt.

Tabelle III.
Prüfung des Behringschen Di.-Schutzmittels auf Toxizität

	Nr. des Versuchstieres	Injektionsmenge in Kubikzentimeter	Reaktion unmittelbar auf die Injektion	Reaktion auf die Injektion nach Tagen
Marke T. A. VII für 18 Monate alte Kinder Nr. 64, verwendbar bis 3. Nov. 1920, geprüft am 24. Juli 1920 an Meerschweinchen	124	0,5	Strang	+ 8
	192	0,5	"	+ 28
	208	0,5	"	+ 21 Paralyse
	198	1,0	Infiltrat	+ 7
	166	2,0	"	+ 7
Marke T. A. VI Nr. 64 für Kinder über 18 Monate	170	2,0	großes Infiltrat	+ 4
	92	0,5	Infiltrat	+ 11

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß selbst bei Mengen von 0,5 ccm 300 g schwere Meerschweinchen an der Toxinwirkung zugrunde gehen. Dabei ist zu bemerken, daß die Injektion ungefähr 3 Mon. vor dem auf der Etiketle vermerkten Ablauf der Verwendungsfrist geschehen ist. Demnach scheint, wenn auch über die Giftigkeit des Gemenges keine Angabe vorliegt, doch auch hier eine Zunahme derselben durch das Lagern eingetreten zu sein.

Wir können zusammenfassend aus unseren bisherigen Arbeiten (siehe Löwenstein, Eisler und Löwenstein, Busson und Löwenstein) folgende Schlußfolgerungen aufstellen.

1) Es gelingt mit neutralen und mit schwach überneutralen Toxin-Antitoxingemischen, beim Meerschweinchen und Kaninchen sowohl aktive als passive Immunität zu erzeugen, und die an der Klinik Pirquet mit unserem überneutralen Gemische (0,5 Antitoxin + 57 ccm Toxin)

vorgenommenen Versuche an Kindern scheinen diese Annahme auch für den Menschen vollauf zu bestätigen.

2) Unterneutralisierte Mischungen sind vom praktischen Gebrauch auszuschließen, da bei längerem Liegen unbedingt mit einer weiteren, vielleicht unkontrollierbaren Zunahme der Giftwirkung gerechnet werden muß.

3) Die Neutralisierung des Toxins durch Antitoxin ist nicht, wie bisher allgemein angenommen, durch den Zusammenschluß beider Komponenten zu einem neuen Körper in kurzer Zeit vollendet, sondern kleine Verschiebungen vollziehen sich immer noch, selbst noch nach Jahren, und zwar auf Kosten des Antitoxins.

4) Die Antitoxinbildung auf die Injektion von Toxin-Antitoxingemischen tritt viel langsamer in Erscheinung, als wenn man Toxin allein injiziert, besonders bei Kaninchen verzögert sich die Immunität um Monate.

5) Die Höhe der erzielten Immunität und das späte Eintreten der Immunität sprechen dafür, daß ein großer Teil, vielleicht die ganze Toxinmenge des Toxin-Antitoxingemisches als Antigen wirkt, sicherlich aber beruht dieselbe nicht etwa lediglich auf der Antigenwirkung freien Giftüberschusses, wie es Behring, Dreyer und Madsen, Kretz u. a. A., die in dieser Frage gearbeitet hatten, bisher angenommen haben.

6) Wir sind zur Annahme gekommen, daß die Toxin-Antitoxinverbindungen im Organismus längere Zeit als solche erhalten bleiben, daß sich die vollkommene Zerlegung dieser Verbindungen erst allmählich vollzieht, wobei dann das erst nach und nach freiwerdende Toxin als Antigen wirkt, und zwar in wirksamerer Weise, als eine einmal verabreichte untertödliche Dosis freien Toxins dies vermag.

Weitere Versuche sind im Gange, um die praktische Verwendungsmöglichkeit beim Menschen zu prüfen.

Nachdruck verboten.

Ueber das Vorkommen des *Bacillus bifidus* beim Neugeborenen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Königsberg (Direktor: Prof. Dr. Selter).]

Von Assistent Dr. L. Lauter.

Wenn man die Literatur über den *Bac. bifidus* Tissier, den Hauptvertreter der Flora des Säuglingsstuhles, verfolgt, so fallen ganz besonders die weit voneinander abweichenden Angaben über ihn, sowohl über seine Morphologie, als auch über seine Biologie, auf.

Der eine Autor (Kahn) beschreibt ihn als ein zartes Stäbchen von 2–6 μ Länge, meist leicht gekrümmt, mit zugespitzten oder abgerundeten Enden, andere (Basten, Kling) machen einen Unterschied zwischen frischen Kulturen, in denen der *Bifidus* relativ einfache Formen hat, und älteren Kulturen mit mannigfachen Variationen (baumartige Gebilde mit stärkerer Färbbarkeit an den Verzweigungstellen und keulenförmigen Verdickungen). Die einen Forscher halten den *Bac. bifidus* für einen strengen Anaërobie (Kruse, Rach und Reuß), andere behaupten, er wäre fakultativ aërob (Noguchi, Basten, Küthe).

Die Ursache dieser Differenzen in den Angaben der verschiedenen Forscher beruht sicherlich darauf, daß der *Bac. bifidus* sich durch eine große Polymorphie auszeichnet, ferner, daß dieser Bazillus außerordentlich schwer reinzuzüchten ist. Die Folge der schwierigen Züchtbarkeit war, daß jeder Autor, der sich mit dem *Bac. bifidus* beschäftigte, eine andere Züchtungsmethode wählte.

Kahn stellte z. B. 4 Verdünnungen des Säuglingsstuhles in sterilem Wasser her und überimpfte dann mit steriler Pipette oder langer Oese hoch gefüllte 2-proz. Zuckeragarröhrchen. Basten und Moor arbeiteten mit 10 Verdünnungen in Bouillon und überimpften von jeder Verdünnung 0,1 ccm auf 20 ccm flüssigen 2-proz. Traubenzuckeragar. Blühdorn versuchte es zunächst mit den üblichen Anaërobiervverfahren (nach Wright, Burri, Lentze), kam aber zu keinem Ziel. Er erhitzte dann das frische Material auf ca 70° 15 Min. lang und verarbeitete es in hoher Agarschicht.

Wir prüften zunächst letzteres Verfahren: Bei der zuletzt angegebenen Methode (Blühdorn) fanden wir das, was schon Kahn festgestellt hatte: die Kulturen blieben steril. Mit dem Verdünnungsverfahren gelang es uns, den *Bifidus* reinzuzüchten. Wir konnten dabei die Ansicht von Kruse bestätigen, daß der *Bac. bifidus* ein strenger Anaërobier ist. Aber dieses Verdünnungsverfahren hatte den Nachteil, daß es außerordentlich viel Nährbodenmaterial und Zeit in Anspruch nahm.

Wir machten es uns daher zunächst zur Aufgabe, eine Züchtungsmethode zu suchen, die rascher zum Ziele führte und nicht so viel Material verbrauchte. Davon ausgehend, daß die 1905 von Tarozzi angegebene Bouillon mit einem Zusatz von Parenchymorganen (Leber, Milz, Niere) eine bequeme Züchtung der meisten Anaërobier ermöglicht, brachten wir den *Bifidus* in Tarozzi-Bouillon und fanden ein gutes Wachstum in diesem Nährboden. Um die Ueberwucherung des *Bifidus* durch andere Keime zu verhindern, machten wir von der Tatsache Gebrauch, daß der normale Säuglingsstuhl immer sauer reagiert, daß der *Bifidus* mit dem *Acidophilus* und dem *Streptococcus lacticus* zu den azidophilen Bakterien gehören, d. h. daß durch Zusatz von Säuren sein Wachstum zwar nicht befördert, aber auch nicht gehemmt wird, während das Wachstum der anderen Bakterien des Stuhls durch Säurezusatz in keinem Fall begünstigt, eher gehemmt wird (Blühdorn). Wir setzten deswegen der Tarozzi-Bouillon geringe Mengen Essigsäure (0,5 Proz.) zu und konnten feststellen, daß die gesamte gramnegative Flora ausgeschaltet wurde und nur die grampositive Flora in diesem Nährboden wuchs. Um nun den *Bifidus* von den anderen grampositiven Bakterien des Säuglingsstuhles zu trennen und um ihn reinzuzüchten, wurde nach 3–4-tägiger Bebrütung bei 37° mit einer Oese Bouillon eine Schüttelkultur mit 2-proz. Traubenzuckeragar angelegt. Wir erhielten so sehr gut isolierte Kolonien in der hohen Agarkultur. Nach 4–6 Tagen wurden die Kolonien untersucht.

Wir konnten mit unserem Verfahren die *Bifidus*-Kolonien meistens rein erhalten. Dort, wo im Agar der *Bifidus* mit anderen Bakterien, namentlich mit den nach Kruse ihm verwandten Bakterien, dem *Bac. acidophilus* und dem *Streptococcus lacticus*, Mischkolonien bildete, konnten wir die Erfahrung von Cahn bestätigen, daß die mit dem *Bifidus* zusammenlebenden Mikroorganismen das Abimpfen besser ertragen als der *Bifidus*, daß sie bald die Ueberhand gewinnen, und daß der *Bifidus* verschwindet.

Die günstige Züchtungsweise des *Bac. bifidus* in Essigsäure-

Tarozzi-Bouillon veranlaßte uns, dem Infektionsmodus des Säuglingsdarms mit diesem Bazillus nachzugehen. Wir legten uns die Frage vor:

- 1) Wie gelangt der *Bac. bifidus* in den Darm des Säuglings?
- 2) Nach welcher Zeit erscheint er durchschnittlich im Säuglingsstuhl?

Zur Beantwortung unserer Fragen untersuchten wir systematisch 1) die Flora der Vagina der Mutter vor Geburt des Kindes, 2) das Badewasser, 3) die Mundhöhle des Kindes gleich nach der Geburt, 4) die Umgebung des Afters des Kindes gleich nach der Geburt, 5) das Colostrum und die Brustwarze der Mutter vor dem ersten Anlegen des Kindes und 10 Tage später, 6) die Mundhöhle und die Umgebung des Afters des Kindes in den beiden ersten Tagen, 7) zweimal täglich den Stuhl des Kindes in den ersten 4 Tagen.

Im ganzen haben wir 6 Fälle systematisch untersucht, außerdem eine Anzahl Kinderstühle, Vaginalabstriche aus der Mundhöhle des Kindes vor dem ersten Anlegen¹⁾.

Wir fanden in 2 Fällen den *Bifidus* in der Mundhöhle des Kindes gleich nach der Geburt. In der Umgebung des Afters fanden wir ihn 1mal 61 Std. post partum. Im Stuhl konnten wir ihn in den von uns untersuchten Fällen jedesmal nachweisen, und zwar frühestens 24 Std., spätestens 89 Std. nach der Geburt. Sittler hat den *Bac. bifidus* kulturell frühestens in dem 3 $\frac{1}{2}$ Tage nach der Geburt entleerten Stuhl nachgewiesen. Die Durchschnittszeit betrug bei unseren Untersuchungen 63 Std. In der Vagina sahen wir in 3 Fällen verdächtige Formen, ohne daß es uns gelang, den *Bac. bifidus* reinzuzüchten. Eine Identifizierung der verdächtigen Bakterien mit dem *Bac. bifidus* war nicht möglich. Im Badewasser, in der Milch, auf der Brustwarze der Mutter wurde er von uns nie gefunden.

Der auffälligste Befund bei unseren Untersuchungen war der, daß wir den *Bifidus* 2mal in der Mundhöhle des Kindes gleich nach der Geburt nachweisen konnten. Zwar gibt bereits Mme. Brailowsky-Lounkewitch in einer 1915 veröffentlichten Arbeit an, sie hätte den *Bifidus* in der Mundhöhle des Kindes gefunden, aber erst einige Tage nach der Geburt, unmittelbar nach der Geburt fand sie die kindliche Mundhöhle stets steril. Diese Befunde spielen für die Frage nach dem Infektionsweg keine Rolle. Auch die Angaben von Strasburger, daß der *Bac. bifidus* sich auch in den Brustdrüsenausführungsgängen findet, sind in dieser Hinsicht nicht zu verwerten, da eine Zeitangabe fehlt. Hilgers hat den *Bac. bifidus* in der Frauenmilch 3 Tage nach der Geburt gefunden. Auch hiernach kann man keinen bindenden Schluß auf den Infektionsmodus ziehen. Moro war der Ansicht, daß der *Bac. bifidus* per anum in den Digestionstrakt gelangt. Tissier und Sittler stehen auf dem Standpunkt, daß der Hauptinfektionsweg per os erfolgt. Unsere Befunde sprechen ebenfalls dafür, daß die Erstinfektion des Säuglingsdarms per os zustande kommt. Wie die Infektion der Mundhöhle erfolgt, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis. Da Moro durch seine Fütterungsversuche nachgewiesen hat, daß sich die physiologische Stuhlflora auch bildet, wenn die Frauenmilch von vornherein sterilisiert verabfolgt wird, bleibt für die Infektion der Mundhöhle mit dem *Bifidus* nur ein Weg: der Säugling nimmt die *Bifidus*-Keime beim Durchtritt durch die weibliche Scheide auf.

1) Das Material wurde uns von der Universitäts-Frauenklinik überlassen.

Zusammenfassung.

1) Die Tarozzi-Bouillon mit einem Zusatz von 0,5-proz. Essigsäure bildet einen günstigen Nährboden für den *Bac. bifidus*. 2) Die Infektion des Säuglingsdarms mit dem *Bac. bifidus* erfolgt per os. 3) Der *Bifidus* erscheint durchschnittlich $2\frac{1}{2}$ Tage nach der Geburt im Stuhl des Säuglings.

Literatur.

1) Basten, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 77. — 2) Blühdorn, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 72; Monatschr. f. Kinderheilk. Bd. 13. — 3) Brailowsky-Lounkewitch, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1915. — 4) Kahn, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 31. — 5) Kling, Ann. de l'Int. Pasteur. T. XIX. p. 109. — 6) Kruse, Mikrobiologie. — 7) Kütke, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 76. — 8) Moro, Wien. klin. Wochenschr. 1900. Nr. 5; Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 11. Nr. 5 u. 6; Bd. 61. — 9) Noguchi, Journ. of. exp. Med. (Ref.) 1910. — 10) Rach und Reuß, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 50. H. 2. — 11) Rodella, Ebenda. Abt. I. Bd. 29. H. 18; Bd. 31. H. 2/3; Bd. 47. H. 4; Zeitschr. f. Hyg. Bd. 39. u. 41. — 12) Schmidt und Strasburger, Die Fäzes in normalem und krankhaftem Zustande. — 13) Sittler, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 47; Die wichtigsten Bakterientypen der Darmflora beim Säugling. Nürnberg 1909. — 14) Tissier, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 29. 1905. — 15) Tobler-Bessau, Allgemeine patholog. Physiologie der Ernährung und des Stoffwechsels im Kindesalter.

Nachdruck verboten.

Das Vorkommen des *Bacillus acidophilus* bei Schwangeren und Gebärenden und sein zeitlicher und örtlicher Uebergang auf den Neugeborenen.

[Aus dem Hygien. Institut (Direktor: Prof. Dr. Selter) und der Frauenklinik der Universität in Königsberg Pr. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Winter).]

Von Dr. H. Naujoks, Volontärarzt der Klinik.

Jene bekannte Differenz zwischen dem mikroskopischen Ausstrichpräparat eines Säuglingsstuhles, das fast nur grampositive Bazillen enthält, und den Ergebnissen des Kulturverfahrens, wo in der Hauptsache gramnegative Stäbchen das Bild beherrschen, wurde von Moro, Tissier dadurch aufgeklärt, daß sie im Stuhl Bakterien kulturell nachwiesen, die auf den gewöhnlichen Nährböden nicht erschienen, teils weil sie anaërob sind (*B. bifidus*), teils weil sie durch *Bact. coli comm.*, *Bac. aërogenes* auf den üblichen Nährböden zurückgehalten werden (*B. acidophil.*, *Strept. lact.*). An diese Bakterien (*B. bifid.*, *acidophil.*, *Strept. lact.*) ist in hohem Maße das Gedeihen des Säuglings geknüpft, denn sie spielen, wie besonders Kruse nachwies, die Hauptrolle bei der Milchsäuregärung, bei dem Abbau der von dem Säuglinge in den ersten Monaten allein aufgenommenen Nahrung. Sie stehen alle als Milchbewohner den eigentlichen Milchsäurebakterien recht nahe; so ist z. B. der *Acidophilus* wohl zu der Gruppe der langen Milchsäurebakterien zu rechnen, der neben dem *Streptococc. lacticus* als der Hauptsäurebildner im Darm anzusehen ist. Er ist auch imstande, aus Eiweiß Milchsäure zu bilden (Kruse).

Das Auftreten dieser grampositiven Bazillen im Darm schon in den ersten Lebenstagen ist so zu erklären, daß sie in der vom Säugling auf-

genommenen Milch einen viel günstigeren Nährboden finden als *B. coli commune*.

Moro fand den *B. acidophilus* in der Hauptsache bei künstlicher Ernährung; bei Brustnahrung konstatierte er eine große Mannigfaltigkeit und Unregelmäßigkeit des Bakteriengemisches. Cahn fand auch den *Acidophilus* reichlicher bei künstlich ernährten als bei Brustkindern; Sittler konnte keinen prinzipiellen Unterschied zwischen der Darmflora des Brust- und Flaschenkindes nachweisen. Vereinzelt steht Tissier mit seiner Behauptung da, der *B. acidophilus* sei nur in den Stuhlgängen künstlich ernährter Kinder anzutreffen.

Die Frage nach der Art des Ueberganges dieser Bakterien auf das Neugeborene wird verschieden beantwortet. Das Auftreten des *Strept. lact.* ist leicht zu erklären; er kommt bei Schwangeren in der Vagina, im Munde, auf der Haut reichlich vor, und sein Eindringen in den Verdauungskanal des Säuglings begegnet keiner Schwierigkeit; dagegen ist umstritten die Frage für den *B. bifidus* und *acidophilus*, die nicht ubiquitär verbreitet sind.

Schild, der den zeitlichen Ablauf der Kindsdarminfektionen studierte, fand bei allen von ihm untersuchten Kindern schon vor der ersten Nahrungsaufnahme Bakterien im Rectum, frühestens 4 Std., spätestens 20 Std. post partum; das Eindringen per anum ist also nach ihm der übliche Weg der Bakterieneinwanderung. Eine Differenzierung der einzelnen Arten gibt er nicht.

Den *Bac. acidophilus* konnte nun Moro in den äußeren Ausführungsgängen der Brustdrüsen von Frauen nachweisen, von hier aus infiziert er die Milch und dringt per os in den Digestionstraktus des Säuglings ein. Sittler fand ihn weder in der Mundhöhle des Neugeborenen, noch in den beiden ersten Tagen post partum auf der Brustwarzenhaut oder im Kolostrum, jedoch wies er ihn am 5. Tage stets im Stuhl nach, und er nimmt daher ein Eindringen per anum an.

Eine genaue Differenzierung der einzelnen Darmbewohner nach zeitlichem und örtlichem Eindringen in den Darm des Neugeborenen muß einmal für die Frage der Bakterienflora der weiblichen Scheide von Bedeutung sein, andererseits aber auch zur Klärung der noch umstrittenen Frage über die Einwanderung von Keimen in das sterile Neugeborene beitragen.

Es sollte nun nachgewiesen werden:

1) die Häufigkeit des Vorkommens des *B. acidophilus* bei Schwangeren und Gebärenden, 2) der Zeitpunkt seines Eindringens in den Darmkanal des Neugeborenen, 3) die Art seines Ueberganges auf das Kind.

Als Züchtungsmethode wählten wir, im Anschluß an Basten (1914), nach einer Reihe von Vorversuchen $\frac{1}{2}$ -proz. essigsäure Traubenzuckerbouillon zur Isolierung und angesäuerte Traubenzuckeragarplatten zur Züchtung.

Der *Bac. acidophilus* wuchs auch auf dem gewöhnlichen Traubenzuckeragar, manchmal sogar noch üppiger; allerdings war er hier schwer aus der Menge der noch mitgewachsenen Keime herauszuholen. Die Kolonien hatten — wie schon Basten betont — ein recht differentes Aussehen nach dem Säuregrade, dem Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens und dem Alter der Kolonie. Meist wuchs der *Acidophilus* sehr langsam; erst nach 2—3 Tagen tauchten die kleinen, grobsträhnigen, durchflochtenen, sehr unregelmäßig begrenzten Kolonien zwischen den anderen größeren auf. Anaërob ließ er sich auch gut züchten.

Es wurde bakteriologisch untersucht:

Das Vaginalsekret von 12 Schwangeren in den letzten Wochen der Gravidität.

Von 6 Kreißenden vor dem Partus:

Vaginalsekret, Brustwarzenhaut und Kolostrum.

Nach dem Partus täglich:

Brustwarzenhaut und Milch.

Von den Kindern dieser Kreißenden sofort post partum

Mund, Aftergegend und Meconium,
einige Stunden später (nach dem Bade)
und dann täglich 8—9 Tage lang.

Es ergaben sich folgende Resultate:

In dem Vaginalsekret der 12 Hausschwangeren, das mikroskopisch und kulturell nach dem *B. acidophilus* durchsucht wurde, fand er sich 8mal; er steht somit zwischen dem *Streptococcus lactic.*, der regelmäßig gefunden wird, und dem *B. bifidus*, der sich noch in keinem Falle sicher nachweisen ließ (Lauter).

Bei den 6 Kreißenden wurde der *Acidophilus* nie gefunden, nur in 1 Falle sah man am 7. Tage von der Brustwarze der Frau ein kurzes, schlankes Stäbchen wachsen, jedoch so spärlich, daß weder eine sichere Diagnose, noch eine Reinzüchtung möglich war.

Bei den Kindern dieser Kreißenden fand sich *Acidophilus* in 5 Fällen im Stuhl und auf der Analhaut, in 2 Fällen im Mundsekret (ein Fall konnte nur 6 Tage beobachtet werden), und zwar wurde der *Acidophilus* nachgewiesen in 1 Falle am 4. Tage im Meconium und auf der Analhaut, in 3 Fällen am 5. Tage im Stuhl, in 1 Fall am 7. Tage im Stuhl und auf der Analhaut. Im Mundsekret fand er sich in 1 Falle am 7. Tage, in 1 Falle am 8. Tage.

Auffallend ist zunächst die Tatsache, daß der *Acidophilus* im Vaginalsekret der Schwangeren in $\frac{2}{3}$ aller Fälle gefunden wurde, während ich ihn dort bei Kreißenden nie feststellen konnte. Es wuchsen bei diesen überhaupt nur äußerst spärlich Keime im Vaginalsekret.

Es ist wohl möglich, daß bei Kreißenden, bei denen die Abimpfung nur im unteren Teile der Vagina vorgenommen wurde, wenn der Kopf schon im Becken stand, das Vaginalsekret durch das abgeflossene Fruchtwasser so verdünnt oder ungünstig beeinflußt worden war, daß der *Acidophilus* wie auch die vaginalen Stäbchen keine guten Existenzbedingungen fanden. Vielleicht hat auch das von der Vulva bei der Waschung einfließende Desinfizien einen gewissen Einfluß gehabt.

Zusammenfassung.

Es läßt sich also der *Bac. acidophilus* in $\frac{2}{3}$ aller Fälle im Vaginalsekret Schwangerer nachweisen; er ist wohl identisch mit dem *Bac. vaginalis minor*, wie Manau af Heurlin 1914 eines seiner 8 vaginalen Stäbchen nennt.

Bac. acidophilus erscheint im Rektum des Brustkindes frühestens am 4. Tage, spätestens am 7. Tage, im Munde wurde er nie vor dem 7. Tage nachgewiesen, was die Wahrscheinlichkeit nahe legt, daß eine Infektion des Dickdarmes vom Munde nicht anzunehmen ist. Anus und Mund des Kindes werden wohl gleichzeitig beim Durchtritt durch die Vagina mit Keimen beladen, doch scheinen die Existenzbedingungen im Munde schlechter zu sein, wobei die alkalische Reaktion anscheinend nicht bedeutungslos ist.

Literatur.

- 1) Basten, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 77. 1914. — 2) Blühdorn, Jahrb. f. Kinderheilkunde. Bd. 72. 1910. — 3) Cahn, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 21. Nr. 19. — 4) Finkelstein, Deutsch. med. Wochenschr. Bd. 22. 1900. Nr. 16. — 5) Friedberger-Pfeiffer, Lehrb. d. Mikrobiol. Jena 1919. Darmbakt. im allgem. (Kruse). — 6) Kruse, Allgem. Mikrobiol. Leipzig 1910. — 7) Manau af Heurlin, Bakt. Untersuch. d. Genitalsekrete. Berlin (Karger) 1914. — 8) Moro, Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 52. 1900. — 9) Ders., Morphol. u. biolog. Untersuch. über die Darmb. (Ebenda. Bd. 61. 1905.) — 10) Rodella, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. 1901. — 11) Ders., ebenda. Abt. I. Bd. 31. 1902. — 12) Ders., ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 47. 1908. — 13) Schild, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 19. 1895. — 14) Schmidt-Strasburger, Die Fäzes des Menschen. Berlin 1915. — 15) Sittler, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 47. — 16) Ders., Die wichtigsten Bakterientypen d. Darmflora. Würzburg 1919.

Nachdruck verboten.

Zur Aetiologie der idiopathischen Anämie.

Von Dr. Ph. Rahtjen, Pasadena, California.

In dieser vorläufigen Mitteilung möchte ich auf einige überraschende Tatsachen hinweisen, die sich auf Laboratoriumserfahrungen, Tierversuche und klinische Erscheinungen beziehen, die in innigem Zusammenhang mit einem gewissen Diplobazillus stehen, den ich (mehr zufällig als beabsichtigt) zuerst bei Kaninchen, dann im menschlichen Speichel, im Harn und den Fäzes und später in der Milz, den Lungen und Nieren bei Patienten fand, die klinisch das typische Bild der perniziösen Anämie boten.

Vorausschicken möchte ich, daß manche andere Bazillen diesem, von mir unten näher beschriebenen Diplobazillus in morphologischer, kultureller und chemischer Beziehung gleichen, in vielen wichtigen Punkten jedoch sich wesentlich unterscheiden. Ich verweise besonders auf die Arbeiten von Friedländer, Welch, Nuttall, Fraenkel, Durham, Flexner, Mann, Bloodgood, Groyan, Herter, Zadek u. a.

Im Mai vorigen Jahres wurden mir Leber, Lungen und Milz mehrerer Kaninchen zur Untersuchung auf Kokzidien gebracht. Die Organe waren fast bis zur Unkenntlichkeit zerfallen und zeigten das Bild einer allgemeinen Septikämie.

Ogleich Coccidiosis als Todesursache angegeben wurde, fand ich keine Coccidia; auch Streptokokken waren nicht vorhanden. Dagegen fand ich in der Milz zahlreiche Diplobazillen, deren Morphologie mir nicht bekannt war. Auffallend war bei der Sektion die Blutleere der Tiere. Die Kaninchen waren unter langsamer Gewichtsabnahme, ohne andere sichtlichen Symptome, zugrunde gegangen, bei einigen jedoch konnte hämorrhagische Enteritis nachgewiesen werden.

Im Laufe der nächsten Monate wurden mir von anderer Seite wiederum Organe von Kaninchen zugeschickt, bei denen ich in der Milz denselben Diplobazillus fand; von Kokzidien fand ich auch hier keine Spur. Im Brutschrank wuchs dieser Bazillus auf Blutserum-Agarkultur unter normalen Verhältnissen, veränderte sich jedoch insofern, als er ein wenig runder wurde; seine Tendenz, zu 2 zu wachsen (einer hinter dem anderen) behielt er bei. Eine intravenöse Injektion von aufge-

schwemmer Bazillenkultur zeigte bei Kaninchen eine Reinkultur in der Milz.

Mehreren Meerschweinchen wurde peritoneal eine Aufschwemmung dieser Bazillen gegeben und sämtliche Tiere gingen nach etwa 10 Woch. zugrunde, meistens unter Zeichen einer hämorrhagischen Enteritis. Bei allen konnte der Diplobazillus demonstriert werden, und fast absolute Blutleere war der Hauptbefund; auch Infiltration der Ovarien und des Herzens wurde beobachtet. Bei 1 der Versuchstiere fand ich in der ungeleerten Blase im Harn diesen Bazillus.

Insgesamt fand ich bei 68 Kaninchen, die unter der Diagnose „Coccidiosis“ zugrunde gegangen waren, in der Milz diesen selben Bazillus, niemals aber ein Coccidium, keine Streptokokken und keine Tuberkelbazillen. In den meisten Fällen waren die Organe degeneriert und in weiblichen Tieren die Ovarien fast zur Unkenntlichkeit mit Fett infiltriert. Es handelte sich, nebenbei gesagt, fast ausschließlich um wertvolle Zuchtkaninchen, die sehr sorgfältig in reinen Ställen unter denkbar besten hygienischen Verhältnissen gehalten wurden.

Im Verlaufe meiner Berufsarbeit wurden mir zahlreiche Sputa zur Untersuchung gebracht, wobei ich zu meiner Ueberraschung denselben Bazillus eines Tages im menschlichen Auswurf fand. Auch auf älteren Objektträgern, die aus irgendwelchen Gründen aufbewahrt waren, fand sich dieser Diplobazillus, der bei früheren Untersuchungen von mir unbeachtet geblieben war. Beim Vergleich mit klinischen Berichten der behandelnden Aerzte fand sich übereinstimmend, daß sämtliche Fälle, bei denen ich nachträglich den Bazillus fand, einen Hämoglobingehalt von unter 50 Proz. aufwiesen.

Innerhalb weniger Monate fand ich in 200 Auswürfen von Pat., die einen Hämoglobingehalt von 25—70 Proz. aufwiesen, diesen Bazillus im Harn von etwa 50 Pat., bei denen das spezifische Gewicht des Urins stets niedrig war (1002—1015) und deren Blutdruck 120 nicht überschritt. Die roten Blutkörperchen waren oft, aber nicht immer, an Zahl erheblich vermindert. Es handelt sich demnach sowohl um gewöhnliche Blutarmut wie um echte Chlorose.

Ueber klinische Befunde von seiten der behandelnden Aerzte in Uebereinstimmung mit meinen Laboratoriumsbefunden werde ich an anderer Stelle berichten.

Folgende Eigenschaften weist dieser Diplobazillus auf:

Morphologisch charakteristisch ist seine Doppelform, d. h. er tritt stets zu zweien auf: ein Stäbchen folgt dem anderen (in Tandemform). Er ist schlank und hat die Größe eines Tuberkelbazillus; auf künstlichem Nährboden nimmt er wenig an Breite zu. Er ist von einer kaum sichtbaren Kapsel umgeben, die beide Bazillen umhüllt. Sporen habe ich nicht beobachtet. Er ist nicht beweglich und hat keine Geißeln, nimmt gewöhnliche Anilinfarben leicht an; eine wässrige, alkalische Methylenblaulösung färbt ihn in wenigen Sekunden; verbleibt er länger in der Lösung, so differenziert er sich von anderen Bakterien in der Tiefe der Färbung. Er ist gramnegativ und nicht säurefest, aërob und wächst leicht auf allen alkalischen Nährböden, am besten aber auf Blutserumagar. Kohhydrate werden fermentiert unter Stickstoffbildung.

Der Bazillus ist nur beschränkt pathogen für Meerschweinchen, für Kaninchen fast gar nicht. Größere Tiere, Hunde und Ziegen, wurden injiziert; sie reagierten auf Anfangsdosen mit hohen Temperaturen und gaben unzweifelhaft das Bild kranker Tiere mit Appetitlosigkeit und

allgemeiner Mattigkeit. Die Zahl der roten Blutkörperchen und der Hämoglobingehalt sind erheblich herabgesetzt.

Ueberblickt man die Eigenschaften dieses Doppelbazillus, so könnte man behaupten, daß er nicht allzuvieler Charakteristika besäße, und daß er wenig interessant zu sein schiene; behält man jedoch im Auge, daß eben dieser Bazillus mit überraschender Beständigkeit und ohne Ausnahme bei anämischen und chlorotischen Patienten erscheint, in nicht-anämischen aber niemals, so kann man nicht umhin, ihm mehr Aufmerksamkeit zu schenken. Hält man die Anämie für eine intestinale Intoxikation und beobachtet man die chemische Wirksamkeit dieses Bazillus, das rapide Sinken des Oxyhämoglobins bei starker Vermehrung dieses Bazillus, die sichtliche Verminderung desselben bei stickstoffarmer Kost und bei Verabreichung von Arsenik, so kann man nicht umhin, es für wahrscheinlich zu halten, daß dieser *Diplobacillus capsulatus* in der Aetiologie der Anämie eine gewisse Rolle spielt.

Nachdruck verboten.

Versuche über die bakterizide Kraft eines neuen Desinfektionsmittels „Wredan“ in gasförmiger Anwendung.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Landwirtschaftskammer für die Rheinprovinz in Bonn (Leiter: Dr. Krautstrunk).]

Von Dr. H. Eickmann, und Dr. A. Heinick,

Abteilungsvorsteher.

Assistent.

Von dem chemischen Laboratorium Geesthacht-Hamburg wurde dem bakteriologischen Institut der Landwirtschaftskammer in Bonn ein neues Desinfektionsmittel „Wredan“ mit der Bitte übergeben, die bakterizide Kraft desselben zu prüfen.

Wredan stellt eine gelbliche Flüssigkeit dar, die nach Salzsäure riecht und ätzend wirkt. Ueber seine chemische Zusammensetzung wurden uns nähere Angaben gemacht. Wie die Firma ferner mitteilt, handelt es sich bei der Anwendung des Wredans um eine Vergasung, durch welche sowohl Stall und Tiere, als auch die Atmungs- und Verdauungsorgane, sowie das Futter, weil während des Fütterns die Desinfektion am wirksamsten ist, mitdesinfiziert werden sollen. Das Prinzip der Wredandesinfektion soll darin bestehen, daß an den Oberflächen vorhandene pathogene Keime durch die Begasung mit einer Säureschicht überzogen und dadurch in ihrer Lebensfähigkeit vernichtet oder mindestens in ihrer Entwicklung gehemmt werden.

Nach der beigelegten Gebrauchsanweisung sollen vor der Desinfektion Fenster, Türen und Luftlöcher gut verschlossen werden. Der Rauminhalt des Stalles ist oberflächlich auszumessen. Die Menge des Wredans, die man für die einmalige Desinfektion eines Stalles benötigt, ergibt sich aus der auf der Rückseite der Flasche angebrachten Einteilung; danach benötigt man für 1 cbm Rauminhalt 1 ccm Wredan.

Nachdem Fenster usw. gut verschlossen sind, gießt man die ausgerechnete Menge Wredan in irdene Schüsselchen und setzt diese auf stark erhitzte (im Ofen) Ziegelsteine, wodurch eine Verdampfung des Wredans bewirkt wird. Die zur Verdampfung zu verwendenden Schüssel-

chen werden am besten vorgewärmt, bevor man das Wredan hineingießt, um ein Springen zu vermeiden.

Für unsere Versuche kamen folgende Bakterienarten in Anwendung: Milzbrand, Coli, Staphylokokken und Rotlauf, sämtlich virulente Institutsstämme. Wir benutzten 24-stünd., gut gewachsene Bouillonreinkulturen, die von den entsprechenden, frisch hergestellten Agarkulturen abgeimpft worden waren.

Die mikroskopische Untersuchung der 24-stünd. Milzbrandbouillonkultur zeigte das Vorhandensein zahlreicher mittelständiger Sporen.

Diese Bakterienarten wurden an Fäden aus weißer Nähseide antrocknet. Die sterilisierten Seidenfäden waren $\frac{1}{4}$ mm dick und 14 cm lang.

Da naturgemäß während der Antrocknungsdauer bei den aufgehängten Seidenfäden die Hauptmasse der Bouillonkultur im Seidenfaden nach unten sich senkt und damit die zahlreichsten Bakterien in den unteren Teilen des Fadens sich vorfinden, wurden sowohl bei der Verarbeitung der den Wredandämpfen ausgesetzt gewesenen, als auch der zu den Kontrollen verwendeten Fäden stets nur die untersten 2 cm desselben für alle Versuche benutzt. Auf diesen Teilen der Fäden mußten also die meisten Bakterien zu finden sein. Eine gründliche Durchtränkung der Fäden wurde in der Weise ausgeführt, daß die Fäden mit sterilen Pinzetten durch die in sterile Petri-Schalen geschütteten Bouillonkulturen mehrfach hindurchgezogen und danach noch 5 Min. darin belassen wurden. Dadurch waren die Bedingungen für eine einwandfreie und hinreichende Durchtränkung und Ansaugung der Fäden mit Bakterien erfüllt.

Die Antrocknung geschah im Brutschranke bei $37,5^{\circ}$ C und war nach 1 Std. eine vollständige.

Hiernach wurde von den Kontrollfäden zunächst je 1 cm des unteren Endes mit steriler Schere abgeschnitten, in auf 45° C abgekühlten Agar gebracht, gut durchgeschüttelt und in Petri-Schalen ausgegossen. Das 2. Zentimeter wurde in sterile Bouillonröhrchen gebracht. Alsdann wurden Platten sowohl wie Bouillonröhrchen einer 24- bzw. 48-stünd. Bebrütung im Brutschranke bei $37,5^{\circ}$ C ausgesetzt.

Wie aus den beigefügten Tabellen A 1, 2, 5 und B 1, 2, 3 hervorgeht, zeigten diese Kontrollen sämtlich ein üppiges Wachstum, mit Ausnahme der Agar-Rotlaufkontrolle, die nach 24 Std. nur ein geringes Wachstum kundgab, was jedoch den natürlichen Verhältnissen entspricht, und erst nach 48-stünd. Bebrütung sich gut entwickelt hatte.

Die anderen Seidenfäden wurden nach dem Antrocknen der Bakterien 2 Std. lang in einem gut abgedichteten Raum von 50 cbm Rauminhalt begast. Die Begasung erfolgte genau nach den von der Firma in ihrer Gebrauchsanweisung gegebenen Vorschriften. Das Aftenol wurde in 4 irdene Schüsselchen gegossen, die auf stark erhitzten Ziegelsteinen standen. Nach 15 Min. war die Flüssigkeit vergast. Es hatte sich ein allmählich sich bildender, weißer, dichter Nebel entwickelt, der den ganzen Raum gleichmäßig ausfüllte. Die Gase waren nicht leichtflüchtig; öffnete man z. B. die Tür, so entwichen sie nicht sofort nach außen. Insofern bildete das Gas des Wredan eine ziemlich zusammenhängende Wolke. Diese Feststellung entspricht der Angabe des Herstellers, daß eine vollkommene Abdichtung des Raumes nicht unbedingt erforderlich ist, wie es z. B. bei der Desinfektion mit Formaldehyddämpfen Bedingung ist.

Nach vollendeter Begasung der Fäden wurde je 1 ccm des unteren

Tabelle A.

Bakterienart	1		2		3		4		5		6		Bemerkungen
	Seidenfäden in Agar				Seidenfäden in Bouillon								
	Kontrolle ohne Begasung		2 Std. begast		Kontrolle ohne Begasung		2 Std. begast						
	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 24 Std.	nach 24 Std.	nach 24 Std.	nach 24 Std.	
Milzbrand	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Coli	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Staphylokokken	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Rotlauf	+	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
									üppiges Wachstum dgl.	üppiges Wachstum	—	—	

Tabelle B.

Bakterienart	1		2		3		4		5		6		7		8		9			
	Kontrolle: Seidenfäden in Bouillon und gut durchgeschüttelt				Seidenfäden 2 Std. begast, in Bouillon gebracht und gut durchgeschüttelt				je 1 Oese von B 1 auf Agar*)				je 1 Oese der Bouillon von B 4 auf Agar ausgestrichen*)							
	Wachstum nach 24 Std.		Wachstum nach 24 Std.		Wachstum nach 24 Std.		Wachstum nach 24 Std.		nach 24 Std.		nach 48 Std.		nach 24 Std.		nach 48 Std.		Nach 8 Tagen			
Milzbrand	üppiges Wachstum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Coli	dgl.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Staphylokokken	„	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Rotlauf	„	+	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

Es bedeuten: +++ üppiges Wachstum, ++ starkes Wachstum, + geringes Wachstum, — kein Wachstum.

*) Vor dem Ueberimpfen auf Agarplatten wurden die Bouillonröhrchen nochmals gründlichst durchgeschüttelt und in Ausstrichen die Anwesenheit der betr. Bakterien mikroskop. festgestellt.

Endes abgeschnitten und unter denselben oben erwähnten sterilen Kautelen sowohl in Agar als auch in sterile Bouillon gebracht. Nach 24—48-stünd. Bebrütung bei 37,5° C wurde das Resultat abgelesen und notiert. Weder auf den Platten noch in der Bouillon war eine Spur von Wachstum festzustellen (s. Tab. A 3, 4 u. 6).

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß die an Seidenfäden angetrockneten Bakterien durch eine 2-stündige Wredanbegasung abgetötet werden.

Um dem Einwand zu begegnen, daß die günstigen Ergebnisse der Wredanprüfung nicht auf Abtötung, sondern auf Entwicklungshemmung zurückzuführen seien, wurde noch ein 2. Versuch vorgenommen, in dem die mit den Seidenfäden beimpften Bouillonröhrchen und die dazu gehörenden Kontrollen vor der Bebrütung sowohl als auch vor dem Ueberimpfen auf Agarplatten gründlichst durchgeschüttelt wurden. Ausgehend von der Annahme, daß bei der Begasung die Seidenfäden von einer durch die Wredandämpfe erzeugten Säureschicht überzogen werden, wurde durch das wiederholte gründliche Durchschütteln der beimpften Bouillon versucht, diese Säureschicht zu zerstören, was durch die mikroskopische Feststellung des Vorhandenseins von frei liegenden, in den Nährmedien suspendierten Bakterien nachgewiesen worden ist. An dieser Stelle muß auch hervorgehoben werden, daß bei der mikroskopischen Untersuchung der Milzbrand-Seidenfädenbouillon (begast) neben den Bazillen auch zahlreiche Sporen nachgewiesen wurden.

Die Versuche ergaben das gleiche Resultat, wie wir es bei den zuerst angestellten erhalten haben. Die mit den begasten Seidenfäden beimpften Bouillonröhrchen ließen nach 24-stünd. Bebrütung keine Spur irgendwelchen Wachstums erkennen, während die Kontrollen sich sehr stark entwickelt hatten (Tab. B 1, 2 u. 3). Auch bei dem darauf folgenden Ueberimpfen einer Oese (3 mm Durchm.) voll auf Agarplatten konnte sowohl nach 24 als 48 Std. Bebrütung das gleiche Ergebnis ermittelt werden. Eine weitere Beobachtung der Bouillonröhrchen und Platten nach Ablauf von 8 Tagen bestätigte unseren ersten Befund.

Auch aus diesen Versuchsreihen ergibt sich, daß die Wredangase nach 2-stünd. Einwirkung die an den Seidenfäden angetrockneten Bakterien und deren Sporen (Milzbrand) abgetötet haben. Diese Versuchsreihen wurden doppelt wiederholt und lieferten stets das gleiche Ergebnis.

Um zu prüfen, inwieweit die Wredangase das Befinden der Tiere beeinflussen, wurden 1 Hammel, 1 Kaninchen und 2 Meerschweinchen in dem zu begasenden Raume untergebracht. Die letzten beiden Tierarten wurden nicht am Boden, sondern in 1 m Höhe über demselben plziert. Die Tiere zeigten sämtlich nach wie vor nicht die geringste Veränderung in ihrem Verhalten gegenüber dieser so geschaffenen Lage. Puls und Atmung des Hammels waren bezüglich ihrer Zahl und qualitativen Eigenschaften unverändert geblieben. Sie zeigten weder Husten noch Augenausfluß. Die Körpertemperatur war die gleiche wie vorher geblieben. 2 Std. nach Ablauf der Begasung wurde ein Meerschweinchen getötet. Die Sektion ergab nirgends eine Abweichung vom normalen Befund. Insbesondere waren an den Lungen und der Luftröhre krankhafte Veränderungen nicht festzustellen. Auch die Versuchsansteller haben trotz langen Aufenthaltes im Gasraum eine besondere Einwirkung auf sich nicht verspürt. Die Gase übten zunächst zwar einen husten-

erzeugenden Reiz auf unsere Schleimhäute aus, derselbe verlor sich jedoch allmählich.

Schlufsätze.

1) Wredan stellt eine gelblich gefärbte Flüssigkeit dar, die nach dem Eingießen in irdene Schüsselchen, welche auf erhitzte Ziegelsteine gesetzt sind, rasch in Gasform übergeht und den zu desinfizierenden Raum gleichmäßig und intensiv mit Gasen ausfüllt.

2) Die Wredangase sind wenig flüchtig und stehen dadurch in einem Gegensatz zu den leicht flüchtigen Formaldehydgasen. Darin ist ein wesentlicher Vorzug bei Ausführung der Desinfektion zu sehen.

3) Das Wredan zeigt gegenüber Bakterien, die an Seidenfäden angetrocknet und 2 Std. lang der Begasung ausgesetzt sind, eine hohe bakterientötende Kraft. Milzbrand- und Colikeime, Staphylokokken sowie die Erreger des Schweinerotlaufs werden nach der 2-stünd. Begasung mit Sicherheit abgetötet.

4) Auch die sehr widerstandsfähigen Milzbrandsporen werden nach 2-stünd. Einwirkung der Wredangase in ihrer Lebensfähigkeit vernichtet.

5) Die Wredangase üben auf Menschen und Tiere, die in dem zu desinfizierenden Raume sich aufhalten, in der vorgeschriebenen Menge angewandt, eine schädigende Wirkung nicht aus.

Die genannten Eigenschaften sowie die einfache Anwendungsart machen Wredan zu einem hochwertigen Desinfektionsmittel gegen Krankheitserreger in geschlossenen Räumen.

Nachdruck verboten.

Phlyctainophora¹⁾ lamnae n. g. n. sp., eine neue parasitische Nematodenform aus Lamna cornubica (Heringshai).

Von Privatdozent Dr. G. Steiner, Bern-Bümpliz.

Mit 13 Abbildungen im Text.

Die hier beschriebene neue Nematodenform ist in einem einzigen Stücke von Prof. Dr. G. W. Müller in Greifswald zwischen Hyomandibulare und Schädel eines Heringshais (*Lamna cornubica*) gefunden worden. Prof. Dr. G. W. Müller war so freundlich, mir das Tier zur Untersuchung zu überlassen; ich danke ihm herzlichst dafür.

Es liegt auf der Hand, daß die Beschreibung einer tierischen Form, die sich nur auf ein Stück stützen kann, recht unvollständig bleiben muß. Dies gilt im vorliegenden Falle in gesteigertem Maße; denn die Kenntnis der ganzen Reihe von Gestaltungen, die ein Parasit wie der vorliegende durchläuft, bis er zu einem wesentlich nur mehr mit Embryonen gefüllten Schlauche wird, ist zu seinem Verständnis Grund-

1) *φλύκταινα* = Blase auf der Haut, *φορεῖν* = tragen.

bedingung. Das untersuchte Stück war ein ausgewachsenes, prall mit Embryonen gefülltes Weibchen. Welchen vermutlich recht verwickelten

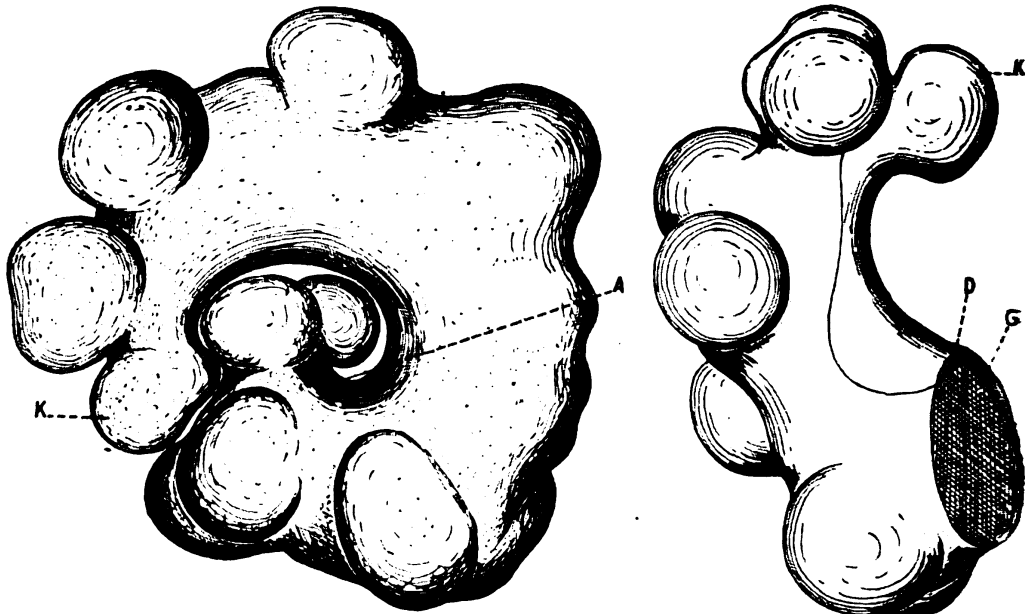


Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 1. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Gesamtansicht des Tieres von der linken Seite. *K* vermutlich Kopfende, *A* Lage des Afters.

Fig. 2. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Vorderende von rechts gesehen. *K* vermutlich Kopfende, *D* Darmrohr, *G* Geschlechtsrohr, prall mit Embryonen gefüllt.

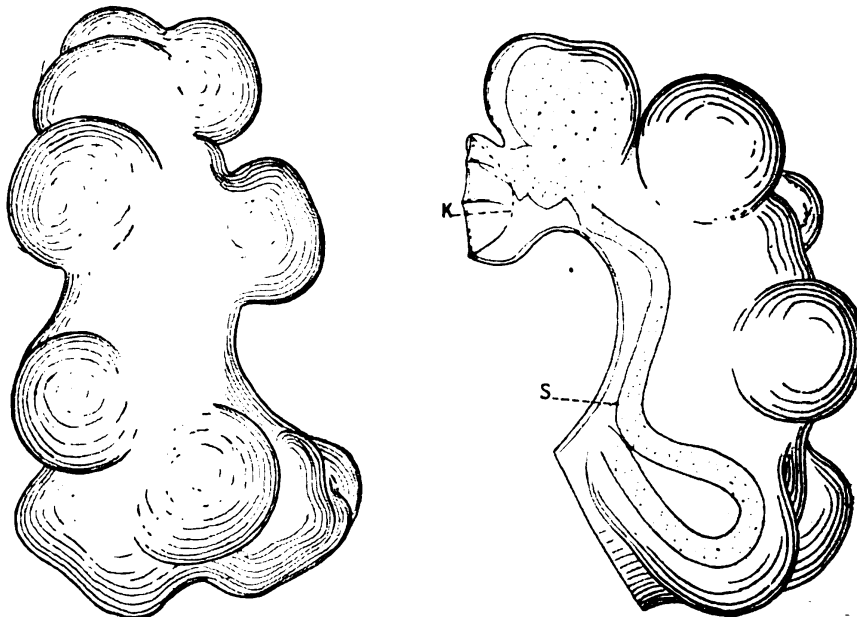


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 3. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Vorderende dorsal gesehen.

Fig. 4. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Vorderende von links gesehen. Man beachte die Einstülpung der Kopfblase bei *K* und die durchscheinende Schlinge bei *S*, vermutlich eine Ovarschlinge.

Entwicklungsgang die Form bis zum Erreichen dieses Zustandes durchgemacht hat, bleibt erst noch festzustellen. Weiter umschließt der Artbegriff auch noch die männliche Gestaltung, die bei der vorliegenden Form vermutlich nicht fehlt. So muß die nachfolgende Darstellung der neuen Art recht unvollständig bleiben.

Größenverhältnisse:

Länge des Weibchens	= 17 mm
" der Embryonen	= 0,330–0,350 mm
Dicke " (Mitte)	= 0,010–0,012 "
Schwanzlänge der Embryonen	= 0,060–0,070 "

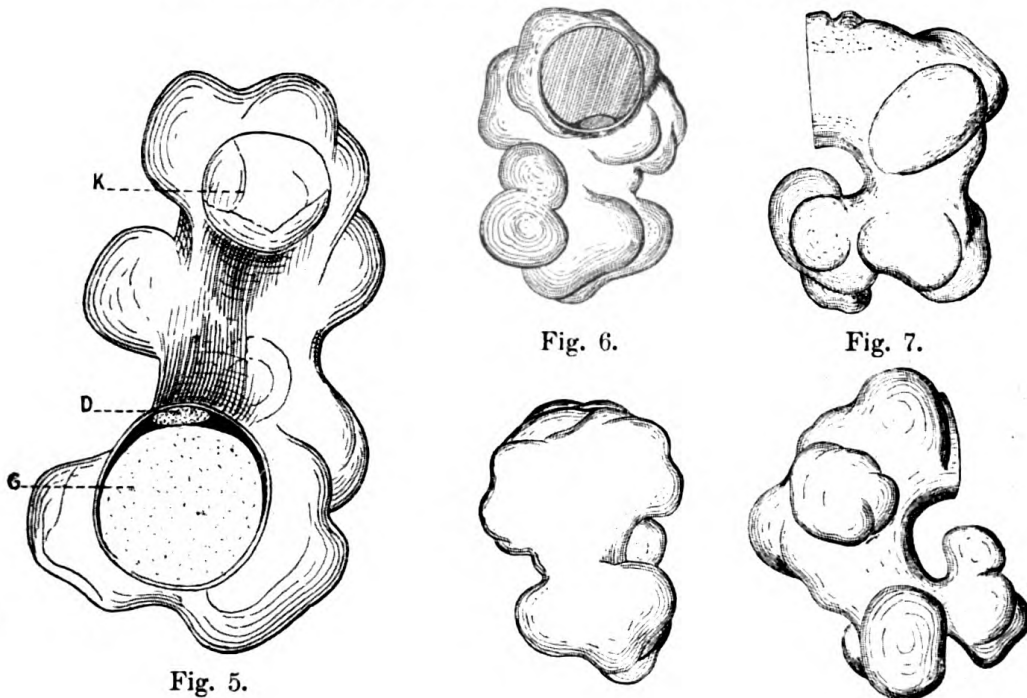


Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 5. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Vorderende ventral gesehen. *K* Eingestülpte Kopfblase, *D* Darmrohr, *G* Geschlechtsrohr.

Fig. 6. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Hintere Körperhälfte ventral gesehen.

Fig. 7. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Hintere Körperhälfte von links gesehen.

Fig. 8. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Hintere Körperhälfte dorsal gesehen.

Fig. 9. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Hintere Körperhälfte von rechts gesehen.

Körpergestalt. Der Körper ist zu einer nahezu runden Scheibe von etwa 9 mm Durchmesser bauchwärts nach Art der Fig. 1 aufgerollt. Er trägt große, schon mit dem unbewaffneten Auge leicht erkennbare, kugelige Blasen, die ungefähr den beiden dorsalen Submediallinien entlang angeordnet sind. Sie stehen nicht genau symmetrisch zur Körperachse, immerhin meist aber so, daß jeweils einer solchen der linken Seite auch eine der rechten entspricht.

Das wohl als Kopf aufzufassende Ende bildet eine unpaare Blase

(Fig. 1 bei *K*); zählen wir diese nicht mit, so ergibt die Gesamtzahl der übrigen noch 15; der Schwanz endet dann mit einem Blasenpaar. Die einzige unpaare Blase liegt etwas vor der Körpermitte. Die Blasen selbst sind nicht immer regelmäßig kugelig; ihre Oberfläche ist vollkommen glatt, sie geben dem Tiere sein Gepräge. Das Einrollen des Tieres nach der Bauchseite wird natürlich durch die Blasen und ihre dorsale Anordnung gefördert. Ich halte die Lage, wie die Fig. 1 sie darstellt, für die Gewohnheitslage, wenigstens des weiblichen erwachsenen Tieres.

Die Färbung ist im auffallenden Lichte milchweiß mit ganz schwachem Okerton (Formolkonservierung). Einzig eine schlingenartige Bildung (vermutlich eine Ovarialschlinge) war auf der einen Seite durch die Haut hindurch zu erkennen (Fig. 4 bei *S*).

Die Haut ist durchweg glatt; nur auf der eingerollten Bauchseite war an einzelnen Stellen eine leichte Ringelung zu sehen. Borsten

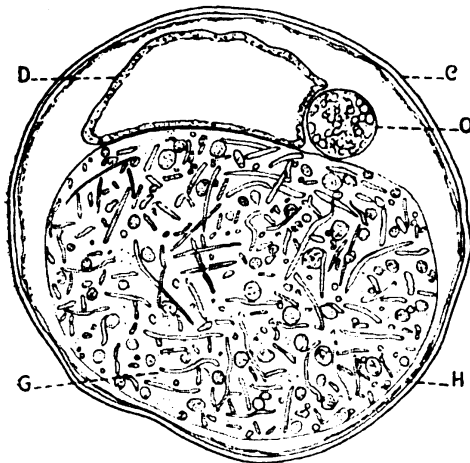


Fig. 10.

Fig. 10. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Körperquerschnitt. *C* Cutikula, *H* Hypodermis, *D* Darmrohr, *O* Ovarium, *G* mit Embryonen gefüllter Uterusast.

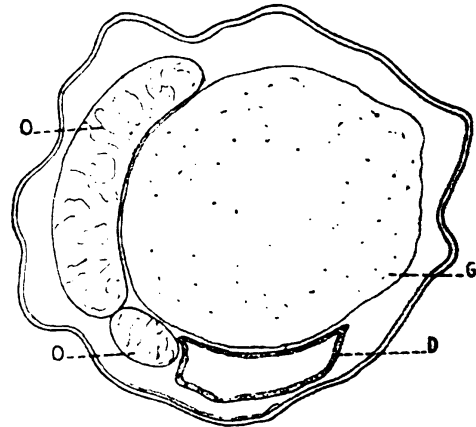


Fig. 11.

Fig. 11. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Körperquerschnitt. *D* Darm, *O* Ovarium, *G* mit Embryonen gefüllter Uterusast.

und Papillen fehlen, desgleichen besondere Kennzeichen der Längswülste; solche sind übrigens auch an Querschnitten nicht aufzufinden, also auf diesem Altersstadium schon völlig geschwunden (Fig. 10).

Als Kopf fasse ich, wie bereits erwähnt, die unpaare Blase des einen Körperendes auf. Diese Blase besitzt vorn eine flache Vertiefung, die als Mundeingang aufzufassen wäre; während der Untersuchung wurde an dieser Stelle durch die Aufbewahrungsmedien die Haut unmittelbar nach innen gestülpt, wie die Fig. 4 und 5 es zeigen. Andere Anhaltspunkte für die Feststellung der Lage des Mundeinganges konnte ich nicht finden, außer der unmittelbaren Bestätigung dadurch, daß am anderen Körperende ventral eine Bildung zu sehen war, die als After deutbar ist (Fig. 1 bei *A*). Dort sieht man, durch die Haut scheinend, deutlich einen festeren, als Rektum zu deutenden Strang an die Körperoberfläche streichen und in einer feinen Oeffnung endigen. Der Schwanz wäre dann durch eine Art Doppelblase gekennzeichnet.

Ueber die innere Organisation kann ich leider nur ganz wenig aussagen. Auf diesem Altersstadium zeigen Querschnittsbilder, daß jede Muskulatur völlig fehlt; das Körperinnere ist gefüllt von riesig angeschwollenen Geschlechtsschläuchen und einem dünnwandigen Darmrohr (Fig. 10 u. 11). Die Uteri (vielleicht auch die Eileiter) scheinen mächtig entfaltet und prall mit Embryonen gefüllt zu sein; sie füllen die Blasen (auch am Kopfe und am Schwanz) und den Hauptraum des Körperinnern aus. Ihre Haut ist an manchen Stellen geborsten, an den anderen zu einem sehr dünnen Häutchen ausgespannt. Die Ovarien scheinen geschlungen und in Windungen gelegt zu sein. Die weibliche Geschlechtsöffnung war nicht auffindbar. Die junge Brut scheint einfach durch Risse in der Körperhaut nach außen zu gelangen. Erwähnenswert ist noch, daß zwischen und neben den Embryonen kleine Körperchen plasmatischer Natur liegen, die wohl als degenerierte Eier aufzufassen wären.

Die Embryonen (sie waren alle von nahezu gleicher Größe und Entwicklungshöhe) haben die auf Fig. 12 dargestellte Form; besonders bemerkenswert ist das Vorhandensein einer zahnartigen Bildung an ihrem Vorderende (Eizahn?, Fig. 13 bei Z).

Das ausgewachsene Weibchen stellt wesentlich nur noch einen mit Embryonen gefüllten Schlauch dar; es ist natürlich keiner Bewegung mehr fähig und wird an Ort und Stelle zugrunde gehen. Wie gelangen nun aber die Embryonen ins Freie? Haben sie dies überhaupt nötig? Können sie nicht das Wirtstier, das ja gewiß nicht kurzlebig ist, von neuem anstecken? Ich halte dies nicht für wahrscheinlich. Nach liebenswürdigen Angaben von Prof. Dr. G. W. Müller war das Gewebe, in welchem das Tier eingebettet lag, entzündet, etwas geschwollen; aber soviel er sich erinnert, nicht vereitert. Von einem Ende ging ein bandartiges Gerinnsel aus, in welchem zahlreiche kleine Nematoden eingebettet lagen (wohl die austretenden Embryonen). Dies läßt vermuten, daß die Brut doch ins Freie gelangt, und zwar an dieser Stelle; vielleicht wäre es schließlich doch zu einer Vereiterung derselben gekommen. Die Annahme liegt nahe, daß die Jungen erst in einen Zwischenwirt gelangen, und daß wir es mit einem Entwicklungsverlauf zu tun haben, ähnlich jenem etwa von *Dracunculus medinensis*.

Die systematische Stellung des neuen Genus ist eine noch völlig unbestimmte.

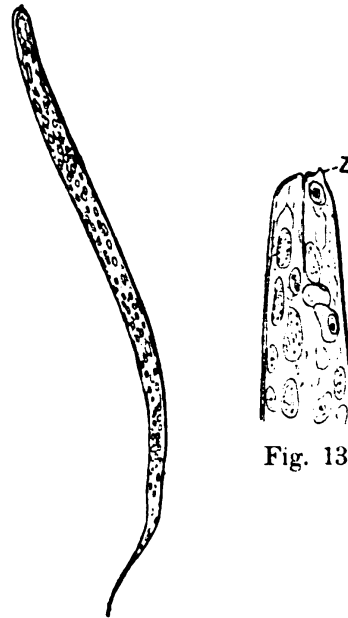


Fig. 12.

Fig. 12. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Embryo.

Fig. 13. *Phlyctainophora lamnae* n. g. n. sp. Vorderende eines Embryo mit dem sogenannten Eizahn Z.

*Nachdruck verboten.***Beiträge zu bakteriologischen Kulturmethoden.**

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Würzburg und der bakt. Untersuchungsanstalt Erlangen.]

Von Dr. med. **Maximilian Knorr.**

Mit 1 Abbildung.

1) Eine Verbesserung der Knorrschen Anaërobenschale (Centralbl.f. Bakt. Abt I. Orig. Bd. 82. S. 225).

Die 1917 vorzüglich für *Bacillus teras* angewandte Methode war auch für Tetanus, malignes Oedem, Botulinus, Putrificus Bienstock, *Bacillus fusiformis* und *Spirillum sputigenum* gut brauchbar. Alle diese Keime gingen sehr üppig an, ja es gelang sogar, bei direkter Aussaat von Mundhöhlenmaterial Einzelkolonien des *Bacillus fusiformis* zu erhalten, von denen dann in nächster Generation R.K. gewonnen werden konnten. In einer späteren Arbeit wird hierüber berichtet.

Das Liebigsche Verfahren der O-Absorption, das sich früher (l. c.) bei *Bacillus teras* bewährte, wurde wegen der raschen Austrocknung des Nährbodens verlassen. Die Methode von Kulka (l. c.) war bei allen oben genannten Keimen bezüglich der O-Absorption ausreichend. Natürlich kann bei besonderen Verhältnissen auch ein Vielfaches der angegebenen Absorptionsmengen (2 g Pyrogallol + 10 ccm 10 Proz. NaOH) genommen werden.

Neuerdings gelang es, die Absorption erst dann einzuleiten, wenn die Platte völlig dicht verschlossen ist.

Man nimmt einen Glasstreifen, dessen Durchmesser etwa um 1 cm kürzer ist als der der Schale und kittet ihn als Scheidewand in die Schale. (Im Photogramm der Darstellung halber eine größere Plastilimasse.) Dann stellt man die Schale auf eine schräge Unterlage, so daß die Scheidewand parallel zum Arbeitenden steht. In die Unterabteilung gibt man Kalilauge, in die obere Pyrogallolpulver. Dann wird die beimpfte Kulturschale übergedeckt und mit Plastilin luftdicht abgeschlossen. Beim Geradestellen fließt dann die Kalilauge ins Pyrogallol.

Zusammenfassend kann man sagen, daß mit diesem Verfahren nur die Absorption des zwischen beiden Schalen eingeschlossenen O der Luft in Frage kommt, so daß die Absorptionsmittel voll ausgenützt sind und man stets auch mit kleinen Mengen dieser Mittel ein völlig O-freies Milieu erzeugen kann. Die früher angegebenen Vorteile der Methode, wie geringster Verbrauch an Plastilin, rasches Arbeiten mit Reihen von Schalen, genaue Berechnung der Absorption und Vermeidung des leidigen Beschlagens, sind gewahrt.

2) Kapillaren zur anaëroben Züchtung.

Züchtungsversuche mit serophilen Anaëroben ließen es bei der schwierigen Beschaffung größerer Mengen von keimfreiem Serum geboten erscheinen, einen sparsameren Weg als wie bei Reagenzglaskulturen einzuschlagen. In dieser Beziehung bewährten sich Kapillaren.

Glasröhrchen von 2–3 mm Durchmesser werden in 12–13 cm lange Stücke geschnitten, das eine Ende ganz, das andere nur so weit zugeschmolzen, daß in der Mitte des Rohres etwa ein Loch von $1\frac{1}{2}$ mm Durchmesser bleibt. Mittels einer sterilen Pravaz-Spritze füllt man die Kulturflüssigkeit ein. Nach $\frac{1}{2}$ -std. Erhitzen erfolgt sofort Ueberschichtung mit sterilem Par. liqu.

Alle eingangs erwähnten Anaeroben wuchsen in diesen Kapillaren ausgezeichnet. Auch bessere Resultate als bei Verwendung des gleichen Nährsubstrats in anaeroben Reagenzglaskulturen waren zu verzeichnen. So gelang es z. B. auch Mühlens (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. S. 523) nicht, das Spir. sput. in Serumbouillon zu züchten. Dies konnte ich bestätigen. Die Züchtung gelang jedoch bei Verwendung von Kapillaren. Aehnliche, von Reagenzglaskulturen abweichende Befunde wurden bei einem zum 1. Male isolierten, streng serophilen Anaerobier erhoben. Es gelang nur in Kapillarkulturen, mehrere serumfreie Generationen abzuzweigen, in Reagenzglaskulturen war nur eine Aussaat in serumfreien Medien erfolgreich. Auch biologische Prozesse, wie Gestankbildung, scheinen in Kapillarkulturen anders zu verlaufen wie in Reagenzglaskulturen.

Die Kapillaren werden zweckmäßig in sterilen Reagenzgläsern aufbewahrt. Die Beimpfung und Entnahme von Kulturmaterial geschieht mit frisch ausgezogenen Kapillaren. Auf die beliebige Handhabung dieser Kulturen, ohne ein Ausfließen befürchten zu müssen, sei ferner hingewiesen.

3) Die Herstellung einer Verdauungsbrühe aus Blutkuchen.

Wohl zum ersten Mal hat A. Szasz (Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 75. S. 489) die Verwendung von Blutkuchen als Ersatz des Fleisches zur Nährmittelherstellung empfohlen, wobei jedoch die Zugabe von Pepton usw., mit Ausnahme des Kochsalzes, zum Nährboden in der gewöhnlichen Weise nötig ist. Der Blutkuchen wurde möglichst wenig gekocht, um die hochmolekularen Eiweißkörper „intakt“ zu erhalten. Y. Teruuchi und O. Hida suchten gerade das Gegenteil durch die tryptische Verdauung von Kasein, im spez. Fall für Choleravibrionen, zu erreichen. Die weniger hochmolekular aufgebauten Eiweißkörper waren für das Wachstum der Keime besser geeignet. (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 65. S. 570.)

R. Hottinger (l. c. Bd. 67. S. 178) verfolgt durch die Herstellung seiner Fleischverdauungsbrühe den gleichen Zweck. H. Langer (Dtsch. med. Wochenschr. 1917. S. 720) bestätigt die gute Brauchbarkeit der Szasz'schen Blutbouillon, kommt aber zu dem Schlusse, daß durch Verdauung mit Pankreon Rhenania sich die im Blute gebotenen Nährstoffe besser ausnützen lassen. Langer verdünnt den ungekochten zerkleinerten Blutkuchen mit der $1\frac{1}{2}$ -fachen Menge einer Verdauungsbrühe, bestehend aus Wasser mit Natriumkarbonat-, Pankreon- und Chloroformzusatz. Die Ausnützung des Blutkuchens ist jedoch hierbei gering, da man mit 1 Kilo desselben nur ca. 3 l Nährmittel herstellen kann.

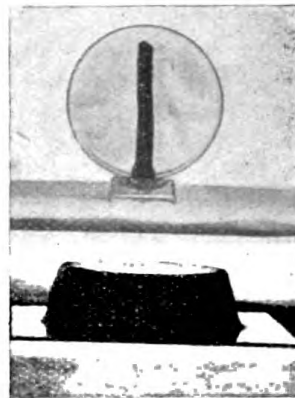


Fig. 1.

Es lag nun nahe, mit Blutkuchen in ähnlicher Weise vorzugehen wie Hottinger mit Fleisch. (cfr. K. B. Lehmann und R. O. Neumann, Bakt. Diagnostik 1920. S. 812) Zwei Gründe waren dafür maßgebend: Erstens erschien es geboten, die in der Untersuchungsanstalt anfallenden großen Mengen der Blutkuchen (Di.-Diagnose) zu verwerten, zweitens erhoffte ich, durch Verwendung der Blutkuchen eine konstantere Zusammensetzung der Stammlösung und damit der Nährmittel zu erreichen. Bei Verwendung des Fleisches muß man ja naturgemäß mit großen Schwankungen rechnen. Ferner ist bei wissenschaftlichen Arbeiten meist der Zuckergehalt der mit der Fleischverdauungsbrühe hergestellten Nährmittel unerwünscht.

Die Bereitung geschieht folgendermaßen: 1 Kilo Blutkuchen wird mit der $1\frac{1}{2}$ -fachen Menge Wasser, wie bei Hottinger, versetzt und 1 Std. auf offener Flamme unter öfterem Umrühren gekocht. Dann preßt man mit Koliertuch die Flüssigkeit ab, treibt den Blutkuchen durch die Fleischmaschine und vereinigt unter Umrühren die beiden Teile wieder. Nach Zusatz von 1–2 g Pankreon und Chlorotorm geschieht die Verdauung 6–7 Tage bei Zimmertemperatur. Oefteres Mischen der allmählich schokoladenbraun werdenden Flüssigkeit ist nötig. Nach Unterbrechung der Verdauung durch Säure wie bei Hottinger wird durch Papierfilter filtriert, der Filterrückstand so lange mit Wasser vermennt und filtriert, bis eine Stammlösung von 4 l hergestellt ist. Nach Zusatz und Lösung von 100 g Viehsalz und 15 g Kaliumphosphat wird nochmals filtriert, dann ist die Stammlösung fertig zum Gebrauche. Sie gibt die Tryptophanreaktion.

Bei Zusatz von 40 Proz. dieser Stammlösung kann man 10 l Nährmittel herstellen. Der Preis dieser großen Nährbodenmenge stellt sich auf kaum 9 M. Die Untersuchungsanstalt Erlangen spart hierdurch im Jahre an Fleisch und Pepton (1 Kilo = 700 M.) über 1200 M.

Hervorgehoben sei, daß die Bakterien, vorzüglich die Typhus-Coli-Gruppe, auf diesen Nährböden ausgezeichnet wachsen. Selbst bei Zusatz von nur 25–30 Proz. Stammlösung ist das Wachstum noch gut. Der Vollständigkeit halber sei angetügt, daß K. Löffl (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 77, S. 108) das Fleisch und Pepton durch tryptische Verdauung des Blutplasma ersetzt. Ersparungen werden hiermit jedoch nicht gemacht.

Meinen hochverehrten Chefs und Lehrern, Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Lehmann und Herrn Prof. Dr. Heim, bitte ich, auch an dieser Stelle für die vielen Ratschläge den ergebensten Dank aussprechen zu dürfen.

Nachdruck verboten.

Bakteriologische und serologische Untersuchungen mit Membranfiltern.

[Aus der bakteriologischen Untersuchungsabteilung (Leiter: Professor Dr. C. Prausnitz) des Hygienischen Instituts der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Pfeiffer).]

Von Dr. Erich Eichhoff.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Vor einiger Zeit wurde durch eine Veröffentlichung von Ficker (Med. Klinik. 1917. S. 1181) unsere Aufmerksamkeit auf ein neues Filter gelenkt, welches bei vollkommener Keimdichtigkeit das in Kulturen von malignem Oedem vorhandene Toxin mit einer Regelmäßigkeit durchließ, wie es bisher bei keinem anderen Filter beobachtet worden war. Das damals als S-Filter bezeichnete Filter befindet sich heute unter dem Namen de Haens Membranfilter im Handel und wird nach den Angaben von B. Zsigmondy und W. Bachmann von der Chemischen Fabrik „List“ G. m. b. H. E. de Haen, Seelze bei Hannover, hergestellt. Den Namen Membranfilter haben die Filter ihrer membranähnlichen Beschaffenheit wegen erhalten. Sie werden durch Eintrocknen von Lösungen gewisser Kolloide gewonnen, haben das Aussehen von weißem Glacéhandschuhleder und sind sehr widerstandsfähig. Man stellt sie in verschiedenen Porengrößen her und bezeichnet sie als 20—90-Sekundenfilter, je nach der Zahl von Sekunden, in welcher sie bei einer kreisrunden Fläche von 100 qmm und negativem Druck von 40 mm, 100 ccm Wasser hindurchlaufen lassen.

Näheres über die Art und Herstellung dieser Filter findet sich in einer Arbeit von R. Zsigmondy und W. Bachmann (Zeitschr. f. anorg. Chem. Bd. 103. S. 121 f.).

Der Anschaulichkeit und des besseren Verständnisses halber entnehme ich einer weiteren Arbeit von R. Zsigmondy (Zeitschr. f. angew. Chem. Jahrg. 26. 1913. Nr. 63. S. 447 f.) eine Skizze und Beschreibung des für die Filtration mit Membranfiltern geeigneten, ebenfalls von der Firma E. de Haen hergestellten Trichterapparates, in welchen die Filter vollkommen flüssigkeitsdicht eingespannt werden können.

Der Trichterapparat (s. Fig. 1) setzt sich aus 3 Teilen zusammen: einem Trichter *A*, einer gewölbten Siebplatte *S* und einem ringförmigen Aufsatz *B*. Die 3 Teilstücke sind gut aufeinander eingeschliffen, so daß sie mit Hilfe von 3—4 Klemmschrauben flüssigkeitsdicht aufeinandergepreßt werden können. Um eine bessere Dichtung zu erhalten, können mit Vorteil zwischen die einzelnen Teilstücke des Trichterapparates Gummiringe gelegt werden. Fettschmierung jedoch ist nicht ratsam, da diese beim Filtrieren heißer Flüssigkeiten leicht erweicht, in das Filtrat gelangen kann und dieses verunreinigt. Um mit Hilfe dieses Apparates

und der vorher beschriebenen Membranfilter eine Filtration durchzuführen, legt man zunächst unter Einschaltung eines Gummiringes die Siebplatte *S* auf den nach der Art des Büchner-Trichters mit einer Saugflasche verbundenen Trichter *A*. Die Siebplatte selbst wird — und zwar nur soweit wie der gelochte mittlere Teil reicht — mit einem angefeuchteten runden Filtrierpapier bedeckt. (Das Bedecken der Siebplatte mit einem Filtrierpapier ist notwendig, um ein schnelleres Filtrieren zu erreichen, anderenfalls filtriert das Membranfilter nur an den Stellen, an welchen sich die Lochungen befinden.) Ueber die Siebplatte breitet man das Membranfilter aus, legt den 2. Gummiring darauf und setzt auf diesen den ringförmigen Aufsatz *B*. Jetzt drückt man *A* und *B* mit Hilfe der Klemmschrauben zunächst ganz schwach und leicht zusammen und stellt langsam durch die vorgelegte Saugpumpe das Vakuum her. Das über die Siebplatte hin gleichsam wie ein Trommel-

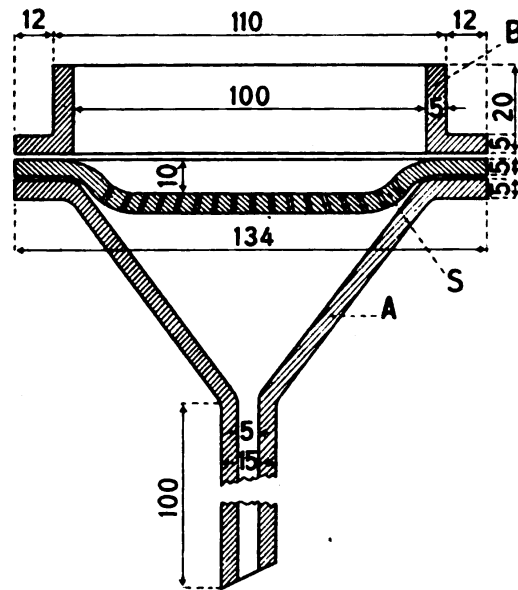


Fig. 1.

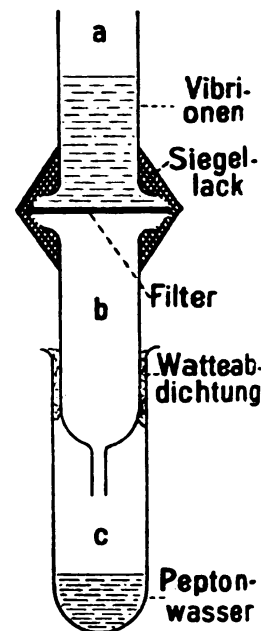


Fig. 2.

fell ausgespannte Membranfilter schmiegt sich allmählich dicht an den Boden und die Wandungen der Siebplatte an. Erst nach dem Anschmiegen des Membranfilters preßt man durch erneutes Nachschrauben der Klemmen den Trichter *A* und den Ring *B* stärker zusammen. Wenn sich ein genügend hohes Vakuum gebildet hat, ist die ganze Apparatur gebrauchsfertig.

Ueber die Verwendung der Membranfilter im Dienste der analytischen Chemie sind bisher verschiedene Angaben gemacht worden, und es hat sich gezeigt, daß sie hier mindestens ebenso genau, aber viel schneller arbeiten als die bisher gebräuchlichen Papierfilter.

Wir haben nun versucht, die Brauchbarkeit der Membranfilter für bakteriologische und serologische Untersuchungen zu erproben und eine Reihe der verschiedensten Versuche damit angestellt.

Als Vorbedingung zu den meisten unserer Versuche war es naturgemäß notwendig, die Filter mitsamt der Trichterapparatur keimfrei zu machen. Zur Sterilisation spannt man die Filter in den oben beschrie-

benen Trichterapparat fest ein. Das ist deshalb erforderlich, weil sich die Membranen bei der Einwirkung des heißen Dampfes kontrahieren, und sich, dem Kontraktionszuge folgend, wellen, wenn sie nicht allseitig fest eingespannt sind. Ist der Apparat fertig montiert, so verstopft man das Trichterrohr, über welches man vorher einen durchlöcherten Gummipfropf zu späterem luftdichten Verschuß der Vakuumflasche gezogen hat, mit einem Wattedropf, hüllt den ganzen Trichter in ein Tuch und bringt ihn dann in den noch kalten Dampfsterilisationsapparat. Hierauf beginnt man mit dem Anheizen und läßt den Dampf nach Eintritt der Kochtemperatur 20 Min. lang einwirken. Darauf stellt man die Heizquelle ab und läßt den Sterilisator langsam erkalten. Nach dem Herausnehmen ist die Porosität der Filter etwas verändert, d. h. sie sind etwas weitporiger geworden. Beim Anfeuchten nehmen sie jedoch ihre ursprüngliche Dichte wieder an, und daher ist es ratsam, die sterilen Filter vor dem Gebrauch $\frac{1}{4}$ Std. lang bei normalem Druck mit keimfreiem Wasser bedeckt zu lassen. Sie haben dann ihren ursprünglichen Quellungszustand wieder erreicht. Werden nicht sterile Filter benutzt, so können dieselben gleich aus ihrer Verpackungstrommel, in der sie feucht und kühl aufbewahrt werden müssen, verwendet werden.

Den gebrauchsfertigen Trichter spannt man am besten in ein kräftiges Metallstativ und setzt ihn über eine sterilisierte tubulierte Saugflasche, in welche man vorher das zum Auffangen des Filtrates bestimmte sterile Reagenzglas hineingebracht hat. Nun wird der Apparat so weit gesenkt, bis die Mündung des Trichterrohres über der Oeffnung des Reagenzglases steht, und der um das Rohr gezogene Gummipfropf die Flasche gegen den Trichter hin luftdicht abschließt. Der so montierte Apparat gewährleistet ein völlig sicheres, keimfreies Arbeiten.

Bevor wir an unsere eigentlichen Untersuchungen herangingen, interessierte uns der feinere Bau der Filter. Die Verarbeitung derselben zu mikroskopischen Präparaten gelang in ziemlich einfacher Weise. Da die Filter sich in absolutem Alkohol auflösen, durfte solcher zur Herstellung der Präparate nicht benutzt werden. Es genügt nach unseren Erfahrungen ein Austrocknen der Filter an der Luft zur vollkommenen Entwässerung. Die getrockneten Filterstückchen werden mit Xylol einige Minuten vorbehandelt, bis sie ein glasiges Aussehen erhalten, hierauf zunächst in Weichparaffin, dann in Hartparaffin gebracht und eingebettet. Sie lassen sich mit dem Mikrotom leicht schneiden.

Zum Färben der Präparate benutzten wir Fuchsin. Das mikroskopische Bild der Filter — querschnitt — zeigte bei 1000-facher Vergrößerung ein außerordentlich feines dichtes Netzwerk von Fäden, so daß von eigentlichen Poren, wie sie bei den Porzellan- und Kieselgurfiltern sich finden, nicht die Rede sein kann. Auffallend war der unregelmäßige Bau der Filter. Inzwischen veröffentlichte Mikrophotogramme von W. Bachmann bestätigten unseren Befund.

Eine Nachprüfung der Durchlaßgeschwindigkeit (Dichtigkeit) verschiedener Filter, welche von uns in der weiter oben beschriebenen Weise regelmäßig vor und nach der Sterilisation vorgenommen wurde, zeigte nur ganz geringe Schwankungen zwischen den Angaben der Fabrik und unseren Resultaten.

Unsere eigentlichen Versuche, unter den verschiedensten Gesichtspunkten aufgefaßt, lassen sich am besten unter folgendem Schema zusammenstellen:

1. Wie verhalten sich die Filter einzelnen Bakterienarten verschiedener Größe gegenüber? a) Sind sie einwandfrei bakteriendicht? (Versuch 1—2), b) können Bakterien durch sie in kürzerer und längerer Zeit hindurchwachsen? (Versuch 3—4). 2. Werden Bakteriengifte durch die Filter zurückgehalten oder bei der Passage verändert? a) Endotoxine (Versuch 5), b) Diphtherietoxin (Versuch 6). 3. Werden spezifische Antikörper des Serums durch die Filter zurückgehalten oder bei der Passage verändert? a) Antitoxine (Versuch 7), b) Agglutinine (Versuch 8), c) Präzipitine (Versuch 9). 4. Sind die Filter zu handlichen bakteriologischen Anreicherungs Zwecken zu benutzen? a) Einfacher Nachweis von Tuberkelbazillen in verdächtigem Urin (Versuch 10), b) Nachweis von Typhusbazillen in größeren Mengen Wassers (Versuch 11).

Zu den Versuchen benutzten wir nur 20—50 Sekundenfilter. Alle weitporigeren Filter werden von der Fabrik als nicht einwandfrei bakteriendicht bezeichnet.

1. Filtration von Bakterien.

Versuch 1 (24 Sekundenfilter).

Eine *Prodigiosus*-Bouillonkultur (1 Kölbchen) wird in 4 verschiedene Reagenzgläser (1, 2, 3, 4) durchfiltriert. Von dem Filtrat wird dann aus jedem Reagenzglas 1 ccm in Bouillon und 1 Oese auf eine Agarplatte gebracht.

Sämtliche Bouillonröhrchen und Agarplatten sind nach 24-stünd. und nach 48-stünd. Bebrütung steril.

Da hiernach das Filter *Prodigiosus* zurückhält, wurde ein weiterer Versuch mit den wesentlich kleineren Schweinerotlaufbazillen angestellt.

Versuch 2 (20 und 50 Sekundenfilter).

Von einer 24-stünd. Schweinerotlauf-Bouillonkultur wird $\frac{1}{2}$, durch ein 50 Sekundenfilter (Filtrat B), ein weiteres Drittel durch ein 20 Sekundenfilter (Filtrat C) filtriert. Beide Filtrate erweisen sich kulturell und im Tierversuch steril. Während von der unfiltrierten Bouillon 0,01 ccm eine Maus in 2 Tag. typisch tötete, blieben die mit je 0,5 ccm von beiden Filtraten B und C geimpften Mäuse gesund.

Der Versuch wurde 2mal mit demselben Resultate wiederholt.

Durch diese Versuche ist bewiesen, daß die Filter keimdicht filtrieren. Trotzdem wäre es möglich gewesen, daß die Bakterien allmählich im Laufe der Zeit durch die Filter hindurchwachsen könnten. Zur Entscheidung dieser Frage dienten die folgenden Versuche.

Versuch 3 (24 Sekundenfilter). (Fortsetzung von Versuch 1.)

Auf das in Versuch 1 benutzte Filter ist ein Kölbchen Bouillon gebracht worden. Die Bouillon ist ohne negativen Druck nach 12 Std. durchgelaufen. Im Filtrat kein *Prodigiosus* kulturell nachweisbar.

Anschließend sogen wir ein weiteres Kölbchen Bouillon durch: Im Filtrat kein *Prodigiosus*.

Derselbe Versuch 3 Tage lang wiederholt.

In keinem Filtrat *Prodigiosus*, nur in dem letzten einige Verunreinigungen (Luftkeime), die daher rühren, daß bei der langen Zeitdauer des Versuches nicht einwandfrei steril gearbeitet werden konnte.

Ein gleicher Versuch mit einem 40 Sekundenfilter zeigte dasselbe Ergebnis.

Versuch 4 (20 Sekundenfilter).

Zwischen 2 kleine Glaszylinder, von denen einer in eine Kapillare ausgezogen ist, wird ein kleines rundes Filterstück mit Siegelack wasserdicht eingekittet (siehe Fig. 2).

Zylinder *a* faßt 10 ccm einer Aufschwemmung sehr beweglicher Wasservibrien. Dieselbe filtriert eigenen Druck durch das Filter und Zylinder *b* in das Reagenzglas *c*, worin zur Anreicherung etwa durchwandernder Vibrien einige Kubikzentimeter 1-proz. Peptonwassers sich befinden. Nach je 12 Std. Auswechseln des Reagenzglases *c* und 24-stünd. Bebrütung desselben. Zylinder *a* wird nach Bedarf mit frischem, zählreiche Vibrien enthaltendem Wasser aufgefüllt.

Nachdem 18 Tage hindurch niemals Vibrien in dem bebrüteten Peptonwasser nachgewiesen worden sind, wird der Versuch abgebrochen.

Versuch 4 wurde 2mal mit demselben Resultat wiederholt.

Durch die Versuche 3 und 4 ist es wohl einwandfrei dargestellt, daß die Filter auch keine Bakterien durchwandern lassen. Die Beobachtungszeit bei Versuch 4 betrug fast 3 Wochen.

2. Filtration von Bakteriengiften.

a) Endotoxine.

Versuch 5 (50 Sekundenfilter).

Sechs 24-stünd. Schrägagarkulturen *Vibrio El Tor* werden in 50 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt, die Aufschwemmung zur Autolyse 2 Tage in den Brutschrank gestellt, darauf 5mal hintereinander zentrifugiert, die so gewonnene klare Flüssigkeit auf das Doppelte mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt und durch ein Berkefeld-Filter filtriert (Filtrat F. B.). Vom Filtrat F. B. wird die Hälfte durch ein 50 Sekundenfilter filtriert (Filtrat F. B. M.). Beide Filtrate sind kulturell steril. Mit Filtrat F. B. und F. B. M. werden Kaninchen immunisiert.

Kaninchen 1 erhält intravenös 0,1 ccm Filtrat F. B. Gewicht 2250 g. Nach 4 Tagen 0,3 ccm Filtrat F. B. Gewicht 2275 g. Nach 10 Tagen 1,0 ccm Filtrat F. B. Gewicht 2205 g. Nach 19 Tagen Blutentnahme.

Das Serum agglutiniert den *El Tor*-Stamm bis zur Verdünnung 1:1600.

Kaninchen 2 erhält intravenös 0,1 ccm Filtrat F. B. M. Gewicht 2190 g. Nach 4 Tagen 0,3 ccm Filtrat F. B. M. Gewicht 2195 g. Nach 10 Tagen 1,0 ccm Filtrat F. B. M. Gewicht 2035 g. Nach 19 Tagen Blutentnahme.

Das Serum agglutiniert den *El Tor*-Stamm bis zur Verdünnung 1:1600.

Beide Filtrate F. B. und F. B. M. besitzen die gleiche antigene Eigenschaft, die Endotoxine haben also, soweit man aus dem Versuch an dieser kleinen Zahl von Tieren schließen kann, unverändert das 50 Sekundenfilter passiert.

Die Anstellung weiterer Tierversuche war wegen Kaninchenknappheit leider nicht durchführbar. Soweit aber aus diesem orientierenden Versuch entnommen werden kann, läßt das Filter jedenfalls gelöste Endotoxine passieren. Die Größe des etwaigen Filterverlustes läßt sich aus diesem Versuch nicht schätzen.

b) Toxinfiltration.

Versuch 6 (20 Sekundenfilter).

Eine Oese einer stark toxinbildenden Diphtheriekultur wird in ein Bouillonkölbchen gebracht, 10 Tage bebrütet und darauf mit Toluol überschichtet.

Ein Tierversuch (intrakutane Injektion von 0,1 ccm beim enthaarten Meerschweinchen) zeigt gute Toxinbildung durch ausgedehnte Hautnekrose.

Die Hälfte der Bouillon wurde durch ein 20 Sekundenfilter filtriert.

Von Filtrat und Originalbouillon wurden nun nebeneinander einem Meerschweinchen intrakutan in Brust- und Bauchhaut je $\frac{1}{10}$ ccm unverdünnt und in fallenden Verdünnungen eingespritzt, und zwar in folgender Anordnung:

Rechts		Links	
Originalbouillon		Filtrat	
Unverd.	0,1 ccm	Unverd.	0,1 ccm
1:3	0,1 "	1:3	0,1 "
1:10	0,1 "	1:10	0,1 "
1:20	0,1 "	1:20	0,1 "
1:60	0,1 "	1:60	0,1 "
1:100	0,1 "	1:100	0,1 "

Nach 4 Tagen zeigten sich gleich große (ca. 2 mm) und gleich tiefe Nekrosen rechts und links an den Injektionsstellen der unverdünnten Originalbouillon und des unverdünnten Filtrates. Die Verdünnungen der Originalbouillon und des Filtrates hatten keine Nekrosen hervorgerufen.

Der Versuch wurde an 2 weiteren Tieren wiederholt und bestätigte das eben beschriebene Ergebnis.

Bei einem weiteren Versuch mit einem sehr starken Toxin (D. G. 7; siehe Versuch 7) entstanden gleich große Hautnekrosen (von 1 ccm bis zu 1 mm) durch das filtrierte sowie das unfiltrierte Toxin bis zu einer Verdünnung von 1:800, während die nächsten Verdünnungen 1:1000 unwirksam blieben.

Demnach werden nach Versuch 6 und den dazu gehörigen Kontrollversuchen durch die gleiche Menge und Konzentration einer diphtherietoxinhaltigen Bouillon einerseits und ihres Filtrates andererseits gleich

große Gewebsschädigungen hervorgerufen. Das Diphtherietoxin ist also in dem Filtrat ungeschwächt vorhanden.

3. Filtration von Antikörpern.

a) Antitoxine.

Versuch 7 (50 Sekundenfilter).

Das zu diesem Versuch benutzte Di-Toxin D. G. 7 wurde uns von den Behring-Werken, Marburg, in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Das 500-fache Antitoxin Nr. VIII D. stammt ebenfalls aus den Behring-Werken.

0,1 ccm einer Verdünnung 1:800, d. i. $\frac{1}{8000}$ ccm des Toxin D. G. 7, intrakutan einem Meerschweinchen eingespritzt, erzeugte noch eine deutliche Nekrose, während $\frac{1}{10000}$ ccm unwirksam war.

Von dem antitoxischen Serum wurden einige Kubikzentimeter durch ein 50 Sekundenfilter filtriert.

Zum Versuch wurden 2 Reihen von Toxin-Antitoxinmischungen hergestellt, die konstante Mengen von Toxin und fallende Mengen von Antitoxin enthielten. In der ersten Reihe war das Antitoxin unfiltriert, in der anderen Reihe wurde das durch ein 50 Sekundenfilter filtrierte Antitoxin verwandt. Von jedem Gemisch wurde je 0,1 ccm in gleicher Weise, wie oben beschrieben, einem Meerschweinchen intrakutan eingespritzt.

Tabelle.

Rechts.						
1)	Tox.	$\frac{1}{800}$	ccm	+	Antitox.	$\frac{1}{2000}$ ccm keine Nekrose
2)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{4000}$ " " "
3)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{8000}$ " " "
4)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{16000}$ " 2 mm große Nekrose
5)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{32000}$ " große tiefe Nekrose.

Links.						
1a)	Tox.	$\frac{1}{800}$	ccm	+	Antitox. filtr.	$\frac{1}{2000}$ ccm keine Nekrose
2a)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{4000}$ " " "
3a)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{8000}$ " " "
4a)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{16000}$ " 2 mm große Nekrose
5a)	"	"	"	+	"	$\frac{1}{32000}$ " große tiefe Nekrose.

An den Injektionsstellen 4 und 5, sowie 4a und 5a beobachteten wir nach 2 Tagen eine Schwellung und Rötung der Haut. Nach 4 Tagen hatte sich bei 4 und 4a eine 2 mm große Nekrose gebildet, bei 5 und 5a große tiefe Nekrosen, die ineinander übergingen.

Bis zu $\frac{1}{8000}$ ccm war das filtrierte antitoxische Serum ebenso wie das unfiltrierte imstande, die nekrotisierende Wirkung eines $\frac{1}{800}$ ccm des Diphtherietoxins D. G. 7 aufzuheben. Geringere Dosen blieben unwirksam.

Demnach ist das Antitoxin ungeschwächt durch das 50 Sekundenfilter hindurchpassiert.

b) Agglutinine.

Versuch 8 (50 Sekundenfilter).

Agglutinationsvergleich zwischen einem Typhusserum und seinem Filtrat.

	Typhusstamm
Orig. Typhusserum	1:25 usf. bis 1:51 200; 1:102 400 —
Typhusserum filtriert	1:25 usf. bis 1:51 200; 1:102 400 —

c) Präzipitine.

Versuch 9 (45 Sekundenfilter).

Herstellung eines Antimenschenserums.

Ein Kaninchen erhält 1 ccm, nach 8 Tag. 2 ccm Menschenserum intravenös und nach 18 Tag. 6 ccm intraperitoneal. Nach weiteren 14 Tag. wird das Tier entblutet. 8 ccm des gewonnenen Kaninchenserums filtriert.

8 „ Normalmenschenserum filtriert.

Präzipitationsvergleich.

	Antimenschenserum unfiltriert	Antimenschenserum filtriert
Normalmenschenserum unfiltriert	1:25 usf. bis 1:12 800 + 1:25 600 —	1:25 usf. bis 1:12 800 + 1:25 600 —
Normalmenschenserum filtriert	1:25 usf. bis 1:12 800 + 1:25 600 —	1:25 usf. bis 1:12 800 + 1:25 600 —

Versuch 9 und 10 zeigen, daß auch die Agglutinine und Präzipitine in ihrer Wirksamkeit durch die Filterpassage nicht beeinträchtigt werden.

4. Anreicherung bakterienhaltiger Flüssigkeiten durch das Filter.

Versuch 10 (30 Sekundenfilter).

Citron gibt folgendes Verfahren zum Nachweis von Tuberkelbazillen im Harn (Deutsche med. Wochenschr. 1919. Nr. 12. S. 322).

50—500 ccm Harn werden nach Erwärmung auf 40° auf ein Filter gegossen und bis auf wenige Kubikzentimeter abgesogen. Der Rückstand wird vom Filter abgegossen und scharf zentrifugiert. Das Sediment wird ausgestrichen und gefärbt.

Wir haben dieses Verfahren mehrmals nachgeprüft. Das Verfahren ist zu empfehlen, nur bereitet die Urinfiltration dann einige Schwierigkeiten, wenn der Urin reich an Schleim, Eiter oder amorphen Bestandteilen ist.

Versuch 11 (20 Sekundenfilter).

In 10 l Leitungswasser wurde $\frac{1}{1000}$ Oese einer Typhusbazillenagarkultur fein verrieben und gut verteilt, dann in ca. $1\frac{1}{2}$ Std. durch ein 20 Sekundenfilter filtriert. Aus dem Filterbodensatz lassen sich Typhusbazillen leicht mikroskopisch und kulturell nachweisen.

In dem unfiltrierten, geringe Spuren von Typhusbazillen enthaltenden Leitungswasser ließen sich dieselben sowohl mikroskopisch als auch kulturell, bei Verarbeitung von 5 ccm, nicht nachweisen.

Obwohl wir bei unseren Untersuchungen sehr mit dem derzeitigen Mangel an Versuchstieren rechnen mußten, und leider daher auch manchen noch geplanten Versuch nicht ausführen konnten, glauben wir doch in der Lage zu sein, ein Urteil über die Verwendbarkeit der de Haenschen Membranfilter zu bakteriologischen und serologischen Arbeiten abgeben zu können.

Durch die Versuche 1—4 ist der Beweis erbracht, daß die Filter einwandfrei bakteriendicht sind und relativ kleine, sehr bewegliche Bakterien, wie Choleravibrionen, die selbst mehrere Wochen auf dem Filter stehen, nicht durchwachsen lassen.

Gerade diese letztere Eigenschaft gewährleistet ihnen einen großen Vorteil gegenüber anderen Filterarten, die wohl einige Stunden bakteriendicht sind, aber bald infolge des Hindurchwucherns der Bakterien unbrauchbar werden, oder erst nach umständlichen und für die Filter gefährlichen Reinigungsverfahren wieder benutzt werden können. Bei den de Haenschen Membranfiltern genügt ein einfaches Abreiben mit einer feuchten, nicht zu harten Bürste zur Reinigung. Da der Anschaffungspreis der Filter verhältnismäßig gering ist, kann man sie nach Versuchen mit infektiösem Material vernichten. Von großer Wichtigkeit ist die schon von Ficker betonte Eigenschaft der Membranfilter, bei völliger Keimdichtigkeit die Gifstoffe der Bakterien ungeschwächt durchzulassen. Unsere Versuche 5—6 bestätigen die von Ficker bei den Toxinen der malignen Oedembazillen erhobenen Befunde auch für andere Bakteriengifte und Antigene. Es läßt sich mit Hilfe der Filter ein keimfreies, vollständig unverändertes Bakteriengift gewinnen. Die

anderen bisher gebräuchlichen Filter wiesen die Uebelstände auf, daß sie entweder nicht sicher keimdicht waren oder infolge ihrer großen Oberfläche eine erhebliche Adsorptionswirkung auf größere Moleküle ausübten und daher einen Teil des Toxins zurückhielten.

Einige spezifische Antikörper des Serums gehen, wie Versuche 8—10 zeigen, völlig ungeschwächt durch die Filter hindurch. Ueber die Frage, ob das Serum selbst Veränderungen erleidet, kann ich heute noch nicht berichten, da die diesbezüglichen Versuche noch nicht abgeschlossen sind. Ein weiterer Vorteil des Filters besteht darin, daß man von der glatten Oberfläche einen sehr großen Teil des Filterrückstandes wiedergewinnen kann.

Bei unseren Versuchen legten wir uns naturgemäß die Frage vor, wie die Filter bei praktischen Arbeiten zu verwerten sind, und wie durch sie mühevoll Untersuchungen vereinfacht werden (Versuch 10—11).

Wir griffen als Beispiele 2 Untersuchungsarten heraus, die in der Praxis der bakteriologischen Untersuchungen eine große Rolle spielen. Es ist bekannt, wie mühevoll und unsicher die Untersuchung des Urins auf Tuberkelbazillen ist, wenn nur spärlich Bazillen ausgeschieden werden und größere Urinmengen zentrifugiert werden müßten. Die praktische Bauart der Filter ermöglicht es ohne weiteres, größere Mengen verdächtigen Urins durchzufiltrieren, den Filtersatz mit einem kleinen Pinsel zusammenzustreichen und unmittelbar zu mikroskopischen Präparaten zu verarbeiten.

Auch der Typhusbazillennachweis im Wasser scheint nach dem mitgeteilten Versuch empfehlenswert zu sein.

Aus den angeführten Versuchen sind die Vorteile der Membranfilter ersichtlich. Sie bestehen in leichter Handhabung, bequemer Sterilisierbarkeit und vollkommener Keimdichtigkeit, sowie der Möglichkeit, den Filterrückstand fast restlos zu erhalten. Diesen Vorteilen stehen gegenüber einige Nachteile, vor allem die bei jedem Filter, besonders den feinporigen, unvermeidlichen, aber ihrer Größe nach wechselnden und schwer zu messenden Absorptionsverluste von Eiweiß und anderen großen Molekülen.

Die Membranfilter bedeuten eine wesentliche Bereicherung der bakteriologischen Methodik.

Nachdruck verboten.

Ein praktisches Reagenzglas.

Von W. Fornet, Saarbrücken.

Mit 1 Abbildung.

Das jetzt allgemein gebräuchliche Reagenzglas mit Wattestopfen oder Papierstopfen hat verschiedene Nachteile. Die Stopfen wirken als Staubfänger und sollten aus jedem nach hygienischen Grundsätzen eingerichteten bakteriologischen Laboratorium verbannt werden. Das Abbrennen der Watte ist unbequem, erzeugt einen unangenehmen Geruch, beschmutzt Hände und Reagenzgläser. Teile der Watte fallen in die Kulturflüssigkeit hinab oder bleiben leicht im Reagenzglas kleben, wo sie beim Einfüllen, Umfüllen und Ueberimpfen erheblich stören. In

feuchter Atmosphäre können (Schimmelpilze den Wattestopfen durchwachsen.

Alle diese Nachteile werden vermieden, wenn man eine Glaskappe über das Reagenzglas stülpt, anstatt einen Stopfen hineinzustecken. Die Glaskappe muß 5—6 cm über das glattrandige, nicht aufgebogene Reagenzglas übergreifen und soll möglichst dicht, wenn auch nicht luftdicht, dem Reagenzglase anliegen. Ganz ähnliche „doppelte Reagenzgläser“ sind bereits vor 30 Jahren von Schill (1) beschrieben worden, die sich aber nicht eingeführt haben, weil Schill besonders starkwandige Reagenzgläser empfahl, die nicht im Handel zu haben waren, und weil die Handhabung derartiger Reagenzgläser eine gewisse, wenn auch minimale, Übung erfordert.

Beim Gebrauch meiner Reagenzgläser hat sich mir ein senkrechtes Stativ bewährt, an dem mehrere hölzerne Reagenzglasalter wagerecht und parallel zueinander angebracht sind. In diese Klammern werden die Reagenzgläser eingespannt. Abimpfungen und Ueberimpfungen lassen sich dann durch leichtes Lüften der Glaskappen so sauber und schnell ausführen, wie das mit den alten Reagenzgläsern gar nicht möglich wäre. Steriles Arbeiten wird hierdurch wesentlich erleichtert (Fig. 1).

Ich würde dieses Reagenzglas nicht zur allgemeinen Benutzung empfehlen, wenn es sich mir nicht bereits praktisch außerordentlich gut bewährt hätte. Ueber 1 Jahr lang habe ich es in der beschriebenen Weise in meinen Laboratorien ausschließlich verwenden lassen. Assistenten und Laborantinnen gewöhnten sich ebenso wie die Diener sehr bald an den Gebrauch dieser Reagenzgläser und bevorzugten sie, wenn sie Gelegenheit hatten, daneben noch alte Reagenzgläser mit Watterverschluß zu benutzen. Fachkollegen, die diese Gläser bei mir sahen, haben sie daraufhin bereits verschiedentlich bei sich eingeführt.

Der Anschaffungspreis der Reagenzgläser mit Kappen ist etwa um ein Viertel höher als der gewöhnlicher Reagenzgläser. Dieser Unterschied gleicht sich jedoch durch die Ersparnis an Watte sehr bald wieder aus.

Theoretische Bedenken gegen die neuen Reagenzgläser wurden durch die Erfahrung widerlegt. Selbst bei monatelanger Aufbewahrung im Laboratorium oder im Brutzimmer blieben die darin befindlichen flüssigen oder festen Nährböden dauernd steril, die Reinkulturen lebensfähig. Die Verdunstung aus diesen Reagenzgläsern ist ganz unerheblich. Bei Kulturen von Tuberkelbazillen usw. auf festen Nährboden empfiehlt es sich, mehrere solche Reagenzgläser in ein gewöhnliches Wasserglas und dieses in ein größeres Glasgefäß zu stellen, dessen Boden mit einer Sublimatlösung bedeckt ist und über dessen Oeffnung man Fließpapier legt.

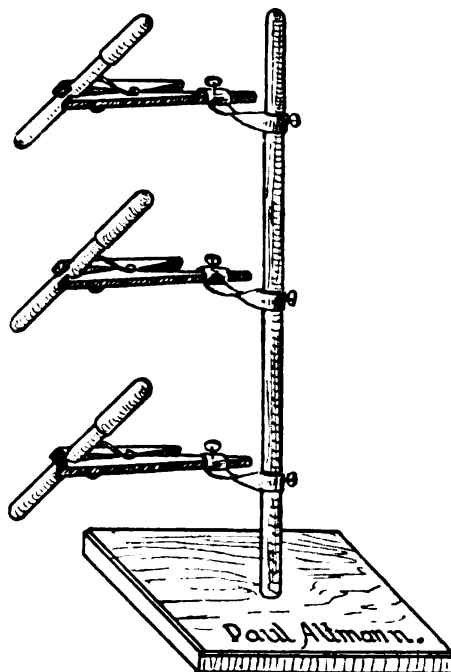


Fig. 1. Gestell mit Fornetschen Reagenzgläsern.

In letzter Zeit hat Kasperek (2) ein ähnliches Reagenzglas angegeben, dieses jedoch durch eine besondere Einkerbung unnötig kompliziert. Die von Löwy (3) beschriebenen Verschlüßhülsen sind von ihm nicht zum Ersatz, sondern zur Vervollständigung der Wattestopfen empfohlen worden.

1) Schill, Beiträge zur bakteriolog. Technik. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 10. 1891. S. 657.) — 2) Kasperek, Th., Ein einfacher Reagenzröhrchenverschluß ohne Wattestopfen. (Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 79. 1917. S. 318.) — 3) Löwy, E., Verschlüßhülsen für Kulturröhrchen und Vorratsgefäße zur Verhinderung der Verdunstung. (Ebenda. Bd. 81. 1918. S. 493.)

Anfertigung und Vertrieb hat die Firma Paul Altmann, Berlin NW 6, Luisenstraße 47, übernommen.

An die Herren Mitarbeiter

Die jetzigen abnormen Verhältnisse zwingen uns leider, mit dem verfügbaren Raum so sparsam wie möglich umzugehen. Wir sehen uns daher genötigt, in Zukunft Arbeiten, welche den Umfang von 2 $\frac{1}{2}$, bis 3 Druckbogen (einschließlich Tafeln, Figuren, Tabellen, Kurven etc.) überschreiten, von der Annahme auszuschließen und bitten daher die Herren Mitarbeiter, in den einzuliefernden Manuskripten sich möglichst kurz fassen zu wollen, Tabellen, Kurven, geschichtliche Einleitungen usw. aber zu vermeiden, oder aber die Herstellungskosten des obengenannte Bogenzahl übersteigenden Textes und die der Tafeln, Figuren, Tabellen, Kurven u. dgl. selber zu tragen. Für Manuskripte, welche zum Zwecke der Kürzung etc. zurückverlangt werden, ist das zur Rücksendung nötige Porto an die Redaktion einzusenden. In der Hoffnung, daß bald wieder normalere Verhältnisse die jetzigen Einschränkungen unnötig machen, zeichnen

Redaktion und Verlag

des Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten.

Inhalt.

- | | |
|--|--|
| Burow, Erich , Vergleichende Untersuchungen über die fermentativen Leistungen der Bakterien <i>Paratyphi A</i> und <i>B</i> , sowie des <i>Bact. coli commune</i> , S. 517. | Meerschweinchenpseudotuberkulose . S. 564. |
| Busson, B. , u. Löwenstein, E. , Ueber Immunisierung mit Diphtherietoxin-Antitoxingemischen. IV. Mitt., S. 572. | Knorr, Maximilian , Beiträge zu bakteriologischen Kulturmethoden. Mit 1 Abbildung im Text, S. 596. |
| Eichhoff, Erich , Bakteriologische und serologische Untersuchungen mit Membranfiltern. Mit 2 Abbild. im Text, S. 599. | Lauter, L. , Ueber das Vorkommen des <i>Bacillus bifidus</i> beim Neugeborenen, S. 579. |
| Eickmann, H. , u. Heinick, A. , Versuche über die bakterizide Kraft eines neuen Desinfektionsmittels „Wredan“ in gasförmiger Anwendung. S. 587. | Lutz, Georg , Virulenzsteigerung der Typhusbazillen bei einem periodischen Ausscheider, S. 550. |
| Fornet, W. , Ein praktisches Reagenzglas. Mit 1 Abbildung im Text, S. 606. | Naujoks, H. , Das Vorkommen des <i>Bacillus acidophilus</i> bei Schwangeren und Gebärenden und sein zeitlicher und örtlicher Uebergang auf den Neugeborenen, S. 582. |
| Gildemeister, E. , Ueber Variabilitätserscheinungen bei säurefesten Bakterien. Mit 3 Abbildungen im Text, S. 513. | Rahtjen, Ph. , Zur Aetiologie der idiopathischen Anämie, S. 585. |
| Kaiser, Karl , Ueber die Wachstumsfähigkeit von <i>Paratyphuserregern</i> in Yoghurt, S. 554. | Steiner, G. , <i>Phlyctainophora lamnae</i> n. g. n. sp., eine neue parasitische Nematodenform aus <i>Lamna cornubica</i> (Heringshai). Mit 13 Abbildungen im Text, S. 591. |
| Klein, Karl , Zur Frage des Erregers der | |

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 86 enthaltenen Arbeiten.

- v. Angerer, Karl**, Versuche mit der Verdauungsbrühe nach Hottinger. 60
- Aoki, K.**, u. **Chigasaki, Y.**, Immunisatorische Studien über die Polyederkörperchen bei Gelbsucht von Seidenraupen (Zelleinschluß). 481
- Aoki, K.**, u. **Konno, T.**, Studien über die Beziehungen zwischen der Haupt- und Mitagglutination. I. Mitteilung. Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen während der Immunisierung des Kaninchens mit Typhusbazillen. 139
- Studien über die Beziehung zwischen der Haupt- und Mitagglutination. II. Mitteilung. Beobachtungen über die Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen in Typhusimmunseris. 330
- Arnoldi, W.** s. **Hilgermann, R.**
- Bachmann, W.**, Echte Diphtherie- und diphtherieähnliche Bazillen im Phagozytoseversuch. 433
- Ein Fall von Soorvarietät. 129
- Battaglio, Mario**, Histologische Veränderungen in den Organen an experimenteller Trypanosomiasis verendeter Tiere. 393
- Beger H.** s. **Manteufel, P.**
- Bender, Willy**, Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbazillen im Sputum. 461
- Bertolini, Giovanni**, Ueber die Immunitätsreaktionen beim Wochenbettfieber, mit Berücksichtigung der üblichen Therapie. 266
- Bieling, R.**, Methoden zur Differenzierung der Streptokokken und Pneumokokken. 257
- Bijlsma, U. G.**, Hat Einspritzung von Adrenalin einen Einfluß auf die Fähigkeit zur Antikörperbildung? 246
- Bramigk, Fritz**, Peptonselbstbereitung. 427
- Braun, H.**, u. **Cahn-Bronner, C. E.**, Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. I. Mitteilung. Die Nahrungsbedürfnisse des Paratyphus B-Bazillus; sein Wachstum und seine Eigenschaften beim Aufbau aus einfachen chemischen Verbindungen. 1
- Braun, H.**, u. **Cahn-Bronner, C. E.**, Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. II. Mitteilung. Die synthetischen Fähigkeiten verschiedener Bakterienarten. 196
- Ueber die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. III. Mitteilung. Die Bedeutung des Stoffwechsels für die Entbehrlichkeit oder Unentbehrlichkeit des Sauerstoffes. 380
- Burow, Erich**, Vergleichende Untersuchungen über die fermentativen Leistungen der Bakterien Paratyphi A und B, sowie des *Bact. coli commune*. 517
- Busson, B.**, Die Erreger der „hämorrhagischen Septikämie“. 101
- u. **Löwenstein, E.**, Ueber Immunisierung mit Diphtherietoxin-Antitoxingemischen. IV. Mitt. 572
- Cahn-Bronner, C. E.** s. **Braun, H.**
- Chigasaki, Y.** s. **Aoki, K.**
- Collier, Cristispira helgolandica nov. spec.** und ihre Fortpflanzung. 132
- Collier, W. A.**, u. **Knoller, E.**, Ueber Stärke- und Massentiter. 505
- Eiehhoff, Erich**, Bakteriologische und serologische Untersuchungen mit Membranfiltern. 599
- Elekmann, H.**, u. **Heinick, A.**, Versuche über die bakterizide Kraft eines neuen Desinfektionsmittels „Wredan“ in gasförmiger Anwendung. 587
- Fischer, Walther**, Einiges über Zysten der *Entamoeba coli*. 491
- Fornet, W.**, Ein praktisches Reagenzglas. 606
- Frieber, Walther**, Chromnickeldraht als Platindrahtersatz bei bakteriologischen Arbeiten. 247
- Ueber Selbstbereitung von bakteriologischer Peptonlösung und über Trypsinbouillon zur Prüfung auf indolbildende Bakterien. 424
- Zum Nachweis von Phenol in Bakterienkulturen. 58
- Fries, K. A.**, Eine einfache Methode zur

- genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. 90
- Fukuhara, Y.**, Die weitere Anwendung unserer neuen Methode zur Wertbestimmung der antiinfektiösen Cholera- sowie Paratyphussera. 450
- Galli-Valerio, B.**, Beobachtungen über Culiciden. 31
- Parasitologische Untersuchungen und Beiträge zur parasitologischen Technik. 346
- Gildemeister, E.**, Ueber Variabilitätserscheinungen bei säurefesten Bakterien. 513
- Grijns, G.**, Die Fähigkeit, Glukose bei 46° C zu vergären, als erworbene Eigenschaft. 173
- Heinck, A. s. Eickmann, H.**
- Herfarth, Heinrich**, Die Entkeimung von Obst und Gemüse durch Chloralkali. 33
- Hieronymi, E.**, u. **Szidat, L.**, Ueber eine neue Hühnerenzootie, bedingt durch *Prosthogonimus intercalandus* n. spec. 236
- Hilgermann, R.**, u. **Arnoldi, W.**, Bemerkung zum Referat betreffend Fleckfieber — **Dörr** (Basel). 481
- Hilgermann, Lauxen**, u. **Shaw, Charlotte**, Bakteriologische und klinische Untersuchungsergebnisse bei Encephalitis lethargica. II. Mitteilung. 415
- Hinterberger, A.**, Geißeln und „Myzele“ unter der Einwirkung von Wärme. 233
- Hofmann, Edmund**, Einige Bemerkungen über die *Leptospira dentium* Hoffmann und andere Mundspirochäten. 134
- Illert, Ernst**, Ueber die Entkeimung der Kälberlymphe mit Trypaflavin. 49
- Kaiser, Karl**, Ueber die Wachstumsfähigkeit von Paratyphuserregern in Yoghurt. 554
- Klarenbeek, A.**, Experimentelle Untersuchung mit einer beim Kaninchen spontan vorkommenden und dem *Treponema pallidum* ähnlichen Spirochäte. 472
- Klein, Karl**, Zur Frage des Erregers der Meerschweinchenpseudotuberkulose. 564
- Knoller, E. s. Collier, W. A.**
- Knorr, Maximilian**, Beiträge zu bakteriologischen Kulturmethoden. 596
- Kodama, H.**, Eine neue, einfache Sero-diagnostik der Syphiliskranken mittels Ausflockungsreaktion. 211
- Konno, T. s. Aoki, K.**
- Küstner, Heinz s. Prausnitz, Carl.**
- Lahm, W.**, Untersuchungen über den Agglutinationstiter nach Typhusschutzimpfung bei Gesunden und Kranken. 21
- Lanken, K.**, u. **Meyer, M.**, Ueber den Pilznährboden nach Much-Pinner. 510
- Lauter, L.**, Ueber das Vorkommen des *Bacillus bifidus* beim Neugeborenen. 579
- Lauxen s. Hilgermann.**
- Löwenstein, E. s. Busson, B.**
- Lutz, Adolpho**, Zur Kenntnis des Entwicklungszyklus der Holostomiden. 124
- Lutz, Georg**, Virulenzsteigerung der Typhusbazillen bei einem periodischen Dauerausscheider. 550
- Machens, Rudolf**, Zur Frage der Schildkrötentuberkulose. 28
- Manteufel, P., Zschucke, H., u. Beger, H.**, Systematische Untersuchungen an Kulturen der Hogcholera-Gruppe unter Berücksichtigung des Voldagsen- und Paratyphus β -Typus. 214
- Martini, E.**, Bemerkungen zu Fritz Eckstein „Die einheimischen Stechmücken“. Eine Schilderung ihrer Lebensweise und Anleitung zu ihrer Bestimmung. 249
- Meyer, M. s. Lanken, H.**
- Michael, Max**, Die Konservierung schwer haltbarer Bakterienkulturen, insbesondere des Gonococcus (Modifikation der Ungermannschen Methode). 507
- Mittelbach, Hildegard**, Ueber die desinfizierende Wirkung der Kupfersalze. 44
- Morihana, Seiji**, Versuche über die Dauer der Abschwächung des Milzbrandbazillus. 405
- Naujoks, H.**, Das Vorkommen des *Bacillus acidophilus* bei Schwangeren und Gebärenden und sein zeitlicher und örtlicher Uebergang auf den Neugeborenen. 582
- Neubauer, Karl**, Studien über das Vorkommen von diphtherieartigen Bazillen in kindlichen Lymphdrüsen. 17
- Oehler, Rud.**, Wirkung von Bakteriengiften auf Ziliaten. 494
- Oelze-Reinboldt, Meta**, Ueber die Zahl der intra- und extraleukozytären Gonokokken. 29
- Onji, Y.**, Das Lungen-Distoma, der Schmärtzer wilder, krabbenfangender und -verzehrender Tiere. I. Mitt. 500
- Pesch, Karl**, Die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen durch die Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe. Ein neuer, das Wachstum von *Bacterium coli* hemmender Nährboden für Paratyphus B. 97
- Plasaj, Stjepan**, Zur Morphologie des *Bact. pseudotuberculosis rodentium* (Preis) L. et N. 468
- Prausnitz, Carl, u. Küstner, Heinz**, Studien über die Ueberempfindlichkeit. 160
- Rahtjen, Ph.**, Zur Aetiologie der idiopathischen Anämie. 585
- van der Reis**, Die Wirkung menschlicher und tierischer Galle auf Bakterien. 337
- van Riemsdijk, M.**, Die Kapseln der Bakterien und eine neue Methode, diese einfach darzustellen. 177
- Rodenwaldt, E., u. Röckemann, W.**, Zur Biologie von *Oxyuris vermicularis*. 421
- Röckemann, W. s. Rodenwaldt, E.**
- Schmitt, Hans**, Das Verhalten der Ruhr-

bazillen und der Typhus-Coli-Bazillen in eiweißfreien Lackmusnährböden. 119	form aus <i>Lamna cornubica</i> (Heringshai). 591
Schneemann, Erich , Vergleichende Untersuchungen über neuere Spirochätenfärbungen. 84	Szidat, L. s. Hieronymi, E.
v. Schueckmann, W. , Ueber die Einwirkung von „205 Bayer“ auf Trypanosomen außerhalb des Tierkörpers. 485	Toennissen, E. , Ueber die Variationsformen der Bakterien und ihre Uebereinstimmung mit den Variationsformen der Metazoen. 353
Shaw, Charlotte s. Hilgermann.	Weil, S. , Zur Gasbrandfrage. 118
Snapper, J. , Die Zersetzung von Blut- und Blutfarbstoff durch Cholera- und Tor-Vibrionen. 396	Wilk, Karl , Original-Wassermann-Reaktion: Kältemethode: Ausflockungsreaktion nach Sachs-Georgi. 169
Spät, Wilhelm , Zur Frage der Koktostabilität gebundener Immunkörper. 241	Wolf, G. , Ueber das wechselnde kulturelle Verhalten von Ruhrstämmen auf den zur Differentialdiagnose angegebenen Zuckernährböden. 476
Spreitzer, Otto , Vergleichende Untersuchungen über neuere Färbemethoden für Tuberkelbazillen. 458	Zschucke, H. s. Mantusfel, P.
Steiner, G. , <i>Phlyctainophora lamnae</i> n. g. n. sp., eine neue parasitische Nematoden-	Zurukzoglu, S. , Zur Methodik der bakteriologischen Diphtheriediagnose. 440

II. Sachverzeichnis.

Adrenalin , Einfluß auf die Antikörperbildung. 246	Desinfektionsmittel Wredan. 587
Agglutination . 139	Desinfizierende Wirkung der Kupfersalze. 44
Agglutinationstiter nach Typhusschutzimpfung. 21	Diphtherieartige Bazillen . 17. 433
Anämie , idiopathische. 585	Diphtheriebazillen , Phagozytose. 433
Anaerobenzüchtung . 596	Diphtherietoxin , Antitoxingemische. 572
Anaphylaxie gegen Fischeiweiß. 160	Distoma . 500
Antikörperbildung , Einfluß von Adrenalin. 246	Encephalitis lethargica , Bakteriologie und Klinik. 415
Alternation . 361	Entamoeba coli . 491
Ausflockungsreaktion . 169. 211	Entkeimung s. Desinfektion.
Bacillus acidophilus . 582	Färbung von Bakterienkapseln. 177
— anthracis , Abschwächung. 405	— von Spirochäten. 84
— bifidus . 579	— von Tuberkelbazillen. 458
Bact. coli . 97. 173	Filter , Membran-. 599
— —, fermentative Leistungen. 517	Fleckfiebertoxin . 481
— —, Nahrungsbedürfnis. 195	Galle , Wirkung auf Bakterien. 337
— diphtheriae , Phagozytose. 433	Gasbrand . 118
— dysenteriae Shiga - Kruse, Nahrungsbedürfnis. 195. 380	Geißeln , Einwirkung von Wärme. 233
— paratyphi B s. Paratyphus B.	Gelbsucht von Seidenraupen. 481
— pseudotuberculosis rodentium (Preisz) L. et N. 468	Gemüse , Desinfektion durch Chlorkalk. 33
— typhi s. Typhusbazillen.	Glukose , Vergärung bei 46. 173
Bakterien , pathogene, unter einfachen Ernährungsbedingungen. 1. 196. 380	Gonokokken , intra- und extrazelluläre. 29
Bakteriengifte , Wirkung auf Ziliaten. 494	—, Konservierung. 507
Bakterienmengen , genaue Bestimmung. 90	Hämorrhagische Septikämie . 101
Chlorkalk zur Desinfektion von Obst und Gemüse. 33	Hauptagglutination . 139
Choleraimmunserum , Wertbestimmung. 450	Hogcholeragruppe , Systematik. 214
Cholera vibrionen s. <i>Vibrio cholerae</i> .	Holostomiden , Entwicklungszyklus. 124
Chromnickeldraht . 247	Hottingers Verdauungsbrühe. 60
Cristispira helgolandica n. sp. 132	Hühnerenzootie . 236
Culiciden . 31. 248	Immunitätsreaktionen beim Wochenbettfieber. 266
Desinfektion der Kälberlymphe. 49	Immunkörper , gebundene, Koktostabilität. 241
— von Obst und Gemüse. 33	Indolbildung . 424

Kälberlymphe, Entkeimung.	49	Reagenzglas.	60
Kapselfärbung.	177	Ruhrbazillen, Differentialdiagnose.	47
Koktostabilität gebundener Immunkörper.	241	— in eiweißfreien Lackmusnährböden.	119
Kulturmethode, bakteriologische.	596	Sachs-Georgi-Reaktion.	169
Kupfersalze, desinfizierende Wirkung.	44	Schildkrötentuberkelbazillus, Variabilitätserscheinungen.	513
<i>Lamna cornubica</i> .	591	Schildkrötentuberkulose.	28
<i>Leptospira dentium</i> Hoffmann.	134	Seidenraupen, Gelbsucht.	481
Lymphdrüsen, Vorkommen von diphtherieartigen Bazillen.	17	Septikämie, hämorrhagische.	101
Meerschweinchenpseudotuberkulose.	564	Serumtiter.	505
Membranfilter.	599	Soorvarietät.	129
Milzbrandbazillen, Abschwächung.	405	Spirochäten beim Kaninchen.	472
Mitagglutination.	139	— des Mundes.	134
Modifikation.	357	Spirochätenfärbungen.	84
Mundspirochäten.	134	Stechmücken, einheimische.	248
Mutation.	366	Streptokokken.	297
Myzele.	233	Syphilis, experimentelle beim Kaninchen.	472
Nährboden, für <i>Paratyphus B</i> .	97	Syphlidiagnose.	169. 211
—, Selbstbereitung von Pepton.	424. 427	Trypaflavin, zur Entkeimung der Kälberlymphe.	49
—, Verdauungsbrühe aus Blutkuchen.	597	Trypanosomen, Einwirkung von „205 Bayer“.	485
—, — nach Hottinger.	60	Trypanosomiasis, histologische Veränderungen.	393
—, Verwendung von Pilzen.	510	Trypsinbouillon.	424
—, zur Konservierung schwer haltbarer Bakterien.	507	Tuberkelbazillen, Färbung.	458
Obst, Desinfektion durch Chlorkalk.	33	—, Nachweis im Sputum.	461
<i>Oxyuris vermicularis</i> .	421	Tuberkulose der Schildkröte.	28
Parasitologie, Untersuchungen und Technik.	346	Typhus-Coli-Gruppe.	97. 119
<i>Paratyphus A</i> , fermentative Leistungen.	517	Typhusbazillen, Agglutination.	139
— —, Nahrungsbedürfnis.	196. 380	—, Nahrungsbedürfnis.	195. 380
— <i>B</i> , Agglutination.	139	—, Virulenzsteigerung.	550
— —, fermentative Leistungen.	517	Typhusschutzimpfung, Agglutinationstiter.	21
— —, Nährboden.	97	Ueberempfindlichkeit gegen Fischeiweiß.	160
— —, Nahrungsbedürfnis.	1. 380	Vakzine, Entkeimung.	49
— —, Systematik.	214	Variabilität bei säurefesten Bakterien.	514
<i>Paratyphusbazillen</i> , Wachstum in Yoghurt.	554	— bei Soor.	129
<i>Paratyphusimmunserum</i> , Wertbestimmung.	450	Variationsformen bei Bakterien und Metazoen.	354
Pepton, Selbstbereitung.	424. 427	<i>Vibrio cholerae</i> , Zersetzung von Blut und Blutfarbstoff.	396
Phagozytose von Diphtheriebazillen.	435	— El Tor, Zersetzung von Blut und Blutfarbstoff.	396
Phenol, Nachweis in Bakterienkulturen.	58	Voldagsenbazillen, Systematik.	214
<i>Phlyctainophara lamnae n. g. n. sp.</i>	591	Wassermannsche Reaktion.	169
Pilznährboden.	510	Wochenbettfieber, Immunitätsreaktionen.	266
Platindrahtersatz.	247	Wredan, Desinfektionsmittel.	587
Pneumokokken, Differenzierung.	257	Yoghurt, Wachstum von <i>Paratyphusbazillen</i> .	554
Pocken, Entkeimung von Kälberlymphe.	49	Ziliaten, Einwirkung von Bakteriengiften.	498
Polyederkörperchen bei Gelbsucht von Seidenraupen.	481		
<i>Prosthogonimus intercalandus n. sp.</i>	236		
Pseudotuberkulose der Meerschweinchen.	564		
Puerperalfieber, Immunitätsreaktionen.	266		

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Anaërobenschale.	597	Pneumoniebazillus Friedländer (Taf. I, II).	379. 380
Encephalitis lethargica, bakteriologische	416	Prosthogonimus intercalandus n. sp.	237.
Beobachtungen (Taf.).	473. 474		238
Kaninchenspirochätose.	196	Reagenzglas nach Fornet mit Gestell.	607
Kapselfärbung (Taf.).	600	Schildkrötentuberkelbazillus, Variations-	formen.
Membranfilter.	13	514—516	
Paratyphus B-Bazillen, Morphologie.	592	Stechmücken.	250. 252—255
Phlyctainophora lamnae n. g. n. sp.	—595	Trypanosomen, Einwirkung von „205 Bayer“	488

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4902

—
Jez. —

DATE DUE SLIP
UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY
THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

DEC 1 1925

NOV 8 1927

JUN 19 1928

OCT 18 1928

7 DAY

AUG 13 1967
RETURNED

AUG 14 1967

7 DAY

JAN 27 1968

RETURNED

JAN 22 1968

7 DAY

MAY 22 1968

RETURNED

MAY 27 1968

1m-7,'25

v.86 Centralblatt für bakter.
1921 iologie. 1. Abt. Orig.
17136

Albery

~~*Rosen*~~

8-10-39

17136

