K. Kisskalt und M. Hartmann

Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie

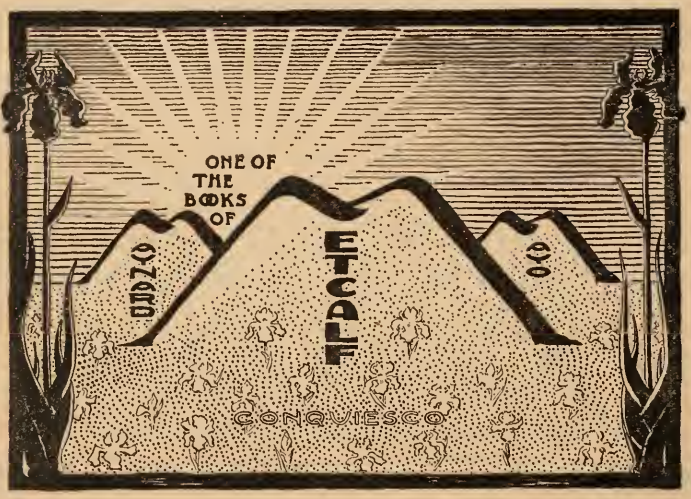
Dritte Auflage

Erster Teil:

K. Kisskalt Bakteriologie

Jena, Verlag von Gustav Fischer

QR
41
K 65


ONE OF
THE
BOOKS
OF
ETCAPE
CONQUESCO

MBL/WHOI
0 0301 0021101 7

Kißkalt und Hartmann

Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie

Erster Teil

Kißkalt und Hartmann

Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie

Erster Teil

Bakteriologie

Von

Dr. Karl Kißkalt
o. ö. Professor der Hygiene an der Universität Königsberg

Dritte Auflage

Mit 40 Abbildungen im Text

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1914

Copyright 1914
by Gustav Fischer, Publisher, Jena

Alle Rechte vorbehalten

MAYNARD M. METCALF

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY
WOODS HOLE
LIBRARY
MASS.

Vorwort zur dritten Auflage.

Daß trotz der großen Zahl bakteriologischer Werke wieder eine Neuauflage des Praktikums erscheinen konnte, beweist, daß die Prinzipien, durch die es sich von den anderen unterscheidet, Anerkennung gefunden und sich bewährt haben. Diese Prinzipien sind: erstens nur eine oder zwei Methoden zu bringen, aber solche, die dem Anfänger leicht fallen, und dabei jeden Handgriff und die möglichen Fehler anzugeben; ferner einen geordneten Arbeitsplan zu bieten, bei dem für jeden Tag ein bestimmtes Pensum vorgeschrieben war; wer die Übungen anders anordnen wollte, konnte sich leicht an der Hand des Inhaltsverzeichnisses zurechtfinden. — Die vorliegende Neuauflage ist nach Erfahrungen in Kursen und entsprechend den Fortschritten der Wissenschaft einer ziemlich weitgehenden Umarbeitung unterzogen worden; fast keine Seite ist unverändert geblieben. Außerdem sind einige Übungen, speziell auf dem Gebiete der Immunitätslehre neu hinzugekommen. —

Königsberg i. Pr., Februar 1914.

Prof. Dr. **Kisskalt.**

Aus dem Vorwort zur ersten Auflage.

Das vorliegende Praktikum ist zur Ausbildung des Mediziners in der Bakteriologie bestimmt.

Der Medizin haben die letzten Jahrzehnte eine derartige Vermehrung des Stoffes gebracht, daß es dem Studierenden unmöglich ist, in alle Fächer tief genug einzudringen. Einem leicht begreiflichen Drange folgend pflegt er vor allem für seine Ausbildung in den klinischen Fächern zu arbeiten, da ihm das konkreter und nützlicher erscheint; erst spät merkt er, daß dabei sein ätiologisches Bedürfnis nicht voll befriedigt wird, da dies nur durch eigene praktische Erfahrung in der Lehre von der Pathogenese geschehen kann. Zum Nachholen des Versäumten können sich viele deshalb nicht entschließen, weil sie die dazu nötige Zeit und die Schwierigkeiten überschätzen. Bei einem systematischen Vorgehen läßt sich aber beides bedeutend

einschränken, und wie die Arbeit dabei zu gestalten ist, soll das vorliegende Werk zeigen. Es ist also nicht bestimmt, unsere Lehrbücher zu ersetzen, sondern es soll sie nur für den Gebrauch in der Praxis ergänzen.

Der erste Teil soll den Lernenden befähigen, sich auf dem Gebiete der Bakteriologie die grundlegenden Kenntnisse anzueignen. — Die Anforderungen der Praxis haben dazu geführt, daß heutzutage die Auffindung schwer isolierbarer Mikroorganismen in den Vordergrund getreten ist und manchmal von Anfängern eher geübt wird, als sie sich eine wissenschaftliche Betrachtungsweise der Bakterien angeeignet haben. Treten dann neue Anforderungen an sie heran, so sind sie nicht imstande, ihnen zu genügen, da ihren Kenntnissen eine breitere Basis fehlt. Es ist daher in dem vorliegenden Werke darauf gesehen, daß erst diese erlangt wird; die Vervollkommnung in den einzelnen Methoden folgt erst in der zweiten Hälfte. Dagegen wurde, wo es angängig war, auf die pathologisch-anatomischen Vorgänge aufmerksam gemacht, um dem Lernenden immer wieder zum Bewußtsein zu bringen, daß nicht der Mikroorganismus die Krankheit ist, sondern die auf sein Eindringen erfolgende Reaktion des Organismus.

Der zweite Teil bezweckt, den Mediziner praktisch und theoretisch mit den wichtigsten Protozoen bekannt zu machen. Die Protozoen besitzen zwar noch nicht die große praktische Bedeutung für die Medizin wie die Bakterien, doch mehrt sich täglich die Zahl der bekannten pathogenen Arten. In den Tropen spielen sogar die Protozoenkrankheiten direkt die Hauptrolle. Auch bei manchen ätiologisch noch nicht aufgeklärten Krankheiten kommen vermutlich Protozoen in Frage, und es dürfte daher vor allem auch für die weitere ätiologische Forschung eine Ausbildung in der Protozoenkunde erwünscht sein.

Auf die Ausführlichkeit des Registers wurde in beiden Teilen besonderer Wert gelegt, so daß das Werk auch zum Nachschlagen Dienste leisten kann.

Das Buch ist aus der Praxis hervorgegangen; schon längere Zeit, bevor an die Drucklegung nur gedacht wurde, wurde von Praktikanten nach dem Manuskript gearbeitet. Trotzdem sind sich die Verfasser bewußt, daß sich anderwärts beim Gebrauch noch Mängel zeigen mögen und sind für Ratschläge zur Verbesserung stets dankbar.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 1

I. Hälfte des Kurses.

Herstellen der Lösungen 8

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien 10, 15, 17, 21, 26

II. Übung: Untersuchung eines pathogenen Mikroorganismus. Milzbrand 14, 17, 18, 21, 23, 26, 28, 29, 32

III. Übung: Methoden zur Differentialdiagnose zwischen zwei nahe verwandten Bakteriearten: Typhus und Coli . . 23, 24, 26, 27, 30, 36

IV. Übung: Untersuchung einiger anderer pathogenen Mikroorganismen. Geflügelcholera- und Schweinerotlaufbazillen 27, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 44

V. Übung: Keime in Luft und Erde 33, 34, 35, 37, 38

VI. Übung: Nährbödenbereitung 35, 37, 38, 39

VII. Übung: Tuberkulose 38, 66, 70, 71, 84

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken . 38, 39, 41, 44, 46, 48, 50

IX. Übung: Diphtherie 40, 43, 45, 46, 47, 48, 50

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen 47, 48, 50, 51

XI. Übung: Kapselbazillen 50, 52, 53, 55

XII. Übung: Desinfektion 51, 52, 53, 55, 56, 58, 60, 62

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum 54, 67, 80, 82, 85

XIV. Übung: Wasseruntersuchung 59, 61, 62, 64

XV. Übung: Pneumokokken 60, 61, 62, 64

XVI. Übung: Schimmel und Hefen 61

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe 62, 63, 64

XVIII. Übung: 64

II. Hälfte des Kurses.

XIX. Übung: Prodigiosus, Pyocyaneus 67, 68

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung . . 67, 68, 70, 71, 72, 74, 75

XXI. Übung: Präzipitine 67, 76, 85, 93

XXII. Übung: Bakteriolyse 70, 82, 95

XXIII. Übung: Involutionsformen 71, 72

XXIV. Übung: Malignes Ödem 72, 74, 76, 77, 78, 82

XXV. Übung: Geißelfärbung 73

XXVI. Übung: Tetanus 75, 76, 78, 80, 82, 87, 90, 92, 94, 99

XXVII. Übung: Influenza 76, 78, 79

XXVIII. Übung: Bac. botulinus 79, 87

39809

Flaschen mit eingeschliffenem Glasstopfen: 7 zu 1000, 7 zu 300, 5 zu 200, 3 zu 100 ccm.

Weithalsige Flaschen mit eingeschliffenem Glasstopfen (Pulvergläser): 3 zu 300, 3 zu 200 ccm.

5 Tropffläschchen zu etwa 30 ccm.

1 Trichter von 20, 3 von 10 cm Durchmesser.

1 Meßzylinder zu 1 l; 1 Meßzylinder mit eingeschliffenem Glasstopfen (Schüttelzylinder) zu 100 ccm.

6 kurze Pipetten zu 1 ccm mit $^1/_{10}$ Teilung in einer Blechbüchse.

1 Porzellanschale von etwa 100 ccm Fassungsvermögen.

Glasrohre von verschiedener Weite.

Etiketten.

Platindraht: 2 Stücke von 6, 2 von 11 cm Länge werden in Glasstäbe von 20 cm Länge eingeschmolzen und je einer an der Spitze zu

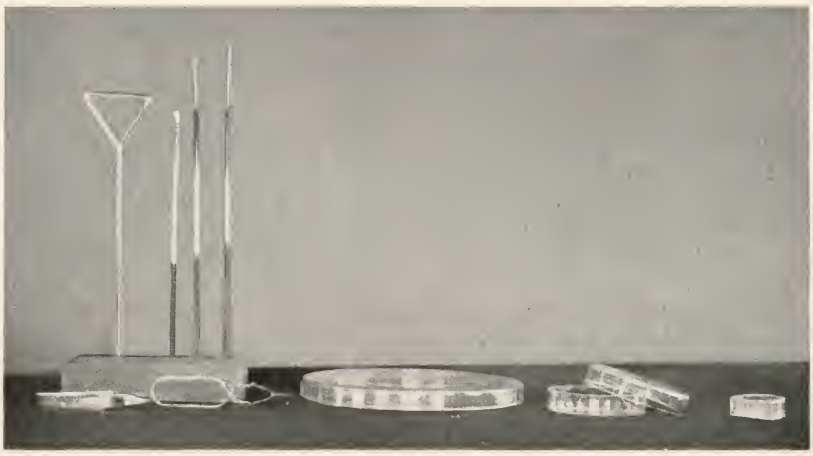


Fig. 1. Von links nach rechts: dreieckig gebogener Glasstab zum Ausstreichen auf Nährböden; Platinpinsel, Platinöse und Platinnadel. Cornetsche Pinzetten von oben und von der Seite. Doppelschale nach v. Drigalski-Conradi. Petrischale (mit abgenommenem Deckel). Kleine Glasdoppelschale.

einer Oese umgebogen. Die langen dienen nur zur Anaërobenzüchtung (Fig. 1).

Cornetsche Pinzetten zum Festhalten der Deckgläser, mindestens 2 (Fig. 1).

5 Scheren von etwa 13 cm Länge.

5 Skalpelle.

1 Pravazsche Spritze, am besten Rekordspritzen zu 1 ccm, 1 zu 5 ccm, jede mit 2 spitzen und 2 abgestumpften Kanülen.

5 Pinzetten.

1 Chamberlandfilterkerze.

1 Thermometer.

2 Dreifüße.

1 Wasserbad (emaillierter eiserner Topf mit Ring zum Einhängen in einen Dreifuß).

2 emaillierte eiserne Töpfe von 25 cm Durchmesser mit Deckel zum Auskochen alter Kulturen.

Asbestdrahtnetz zum Kochen über der Flamme.

2 Kessel aus Eisenblech zum Einstellen von Reagenzgläsern mit Nährboden, etwa 18 cm hoch und so breit, daß sie eben in den Dampftopf gesetzt werden können; Boden mit Löchern.

1 Bunsenbrenner mit Sparflamme auf den Tisch des Laboratoriums [1]).

1 dreiflammiger Bunsenbrenner.

Gummischläuche von verschiedener Dicke, je 1 m.

1 Trockensterilisationsschrank (doppelwandiger Kasten aus Eisenblech, darunter ein Bunsenbrenner), Größe etwa 35 : 25 : 25 cm.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLL MASS.

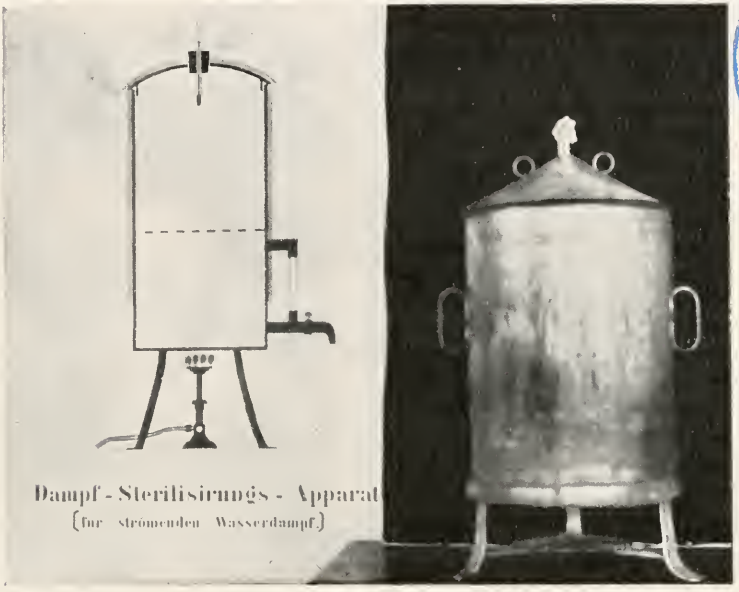


Fig. 2. Dampftopf.

1 Dampftopf (Dampfkochtopf). Am besten bewähren sich zur Nährbodenbereitung diejenigen, bei denen der Dampf von unten eintritt, z. B. der alte Kochsche Dampftopf, ein Zylinder mit abnehmbarem durchlochten Deckel, auf dessen Boden Wasser geschüttet und verdampft wird (Fig. 2).

1 Autoklav (wünschenswert, aber teuer).

1 Wassertrockenschrank: Schränkchen von etwa 30 cm Breite, 20 cm Höhe, 15 cm Tiefe, dessen doppelte Wand mit Wasser gefüllt ist. — Durch verschieden große Einstellung der Flamme läßt es sich bei einigermaßen konstanter Temperatur des Zimmers meist leicht auf einer bestimmten Temperatur erhalten.

Brutschrank, auf 37° einzustellen. Die doppelte Wandung ist mit Wasser gefüllt; ein darin befindlicher Quecksilberregulator bewirkt, daß

1) Ist keine Gasleitung im Orte, so läßt es sich, wenn auch mangelhaft, durch Spiritus oder Petroleum ersetzen.

der Flamme um so weniger Gas zuströmt, je mehr sich die Temperatur der von 37° nähert.

Brutschrank von 23°. Tadellos funktionierende (elektrisch regulierte) sind sehr teuer; andere versagen bei hoher Sommertemperatur, am besten stellt man sie im Winter ins Laboratorium, im Sommer in den Keller. Zu anderer Jahreszeit wird man, wenn die Temperatur des Zimmers einigermaßen konstant ist, in der Nähe des Brutschrankes einen Platz finden, an dem die gewünschte Temperatur etwa vorhanden ist.

1 chemische Wage, auf Bruchteile eines Milligramms genau (steht eventuell in einer Apotheke zur Verfügung).

1 Exsikkator; der untere Teil wird mit wasserfreiem (geglühtem) Chlorcalcium gefüllt. (Exsikkatorfett s. S. 9).

2 Büretten zu 50 ccm mit $^1/_{10}$ ccm Teilung.

1 Kippscher Apparat zur Entwicklung von Wasserstoff (s. S. 69 u. Fig. 26). (Entbehrlich.)

1 Botkinscher Apparat, bestehend aus einer Glasschale von 25 cm Durchmesser und 6 cm Höhe, einer Glasglocke und einem Drahtgestell zum Einsetzen der Petrischalen (s. S. 69 u. Fig. 26). (Entbehrlich.)

1 Blockschälchen zur Färbung von Deckgläsern.

1 Zählapparat nach Wolffhügel.

1 Apparat zur Formalindesinfektion nebst Ammoniakentwickler.

1 Kontaktklingelthermometer (s. S. 54).

1 Sticherscher Kontrolleur zur Desinfektion, mit Phenanthren gefüllt; zu beziehen von A Schmidt, Breslau, Schuhbrücke 44.

Entfettete und (wenig) nicht entfettete Watte.

Weiße Nähseide.

Filtrierpapier.

1 Lupe mit 6-facher Vergrößerung.

1 Mikroskop. Für die im folgenden angegebenen bakteriologischen Untersuchungen hat man ein Mikroskop von Leitz oder Zeiss[1]) nötig mit Abbéschem Apparat, Irisblende, verschiebbarem Objekttisch, Okular I und III und Objektiv 3, 6 (womöglich) und Immersion $^1/_{12}$. Die Vergrößerungen sind für ersteres: $I + 3 = 60\times$, $III + 3 = 80\times$; $I + 6 = 255\times$; $III + 6 = 350\times$; $I + ^1/_{12} = 555\times$; $III + ^1/_{12} = 800\times$. Durch Abschrauben der Frontlinse des Objektiv 3 erhält man mit Okular I 30-fache, mit Okular III 41-fache Vergrößerung. Sehr zu empfehlen zum Demonstrieren sind die Zeigerokulare.

1 Mikrotom z. B. von Schanze-Leipzig, Becker-Göttingen etc. Beschreibungen und Gebrauchsanweisungen sind von den betr. Firmen zu erhalten.

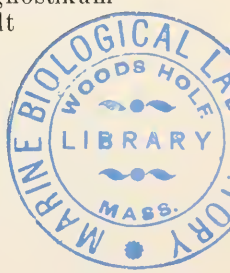
Ueber dem Arbeitsplatz im Laboratorium ist eine große Flasche anzubringen, von der das Wasser mit Gummischläuchen und Glasrohr zur Spülung der Präparate auf den Arbeitsplatz geleitet werden kann; darunter eine Glasschale oder ein Teller.

---

1) Diese seien hier nur erwähnt, weil sie im Laboratorium die gebräuchlichsten sind; selbstverständlich soll damit über andere kein Urteil gefällt werden.

Farbstoffe und Chemikalien[1]).

100 g Fuchsin
50 g Methylenblau medicinale
50 g Methylviolett
10 g Bismarckbraun
10 g Karmin
Eosin
Pikrinsäure
(Folgende 8 Farbstoffe von Dr. Grübblers Zentralstelle für mikroskop.-chem Bedarf, Leipzig)
10 g Safranin O
Methylgrün 00
Pyronin
Orceïn D
10 g Neutralrot
20 ccm Hämatoxylinlösung nach Delafield
20 ccm polychromes Methylenblau
20 ccm Glyzerinäthergemisch nach Unna
5 g Jod
10 g Jodkalium
10 g Lithion carbonicum
10 g Lithionchlorid
Natriumnitrit
Kaliumnitrat
Oxalsäure
Kaliumpermanganat
Ammoniak
Natriumhydrat
Natrium aceticum fusum
Kochsalz
Argentum sulfuricum
50 g Sublimat
10 g Chromsäure
Salzsäure
25 % Schwefelsäure
Off. Salpetersäure
0,2 g Osmiumsäure
Tartarus stibiatus
Aethylamin
Neutr. weinsaures Kali
Ferrisulfat
Antiformin
Ferrosulfat
10 ccm Liquor ferri sesquichlorati
10 ccm Liquor ferri oxychlorati
Zink (zur Wasserstoffentwicklung)
50 g Cuprum sulfuricum
Chlorcalcium zum Trocknen
250 g Pyrogallusäure
Acidum tannicum (Tannin)
Acidum gallicum
50 ccm Anilin
Ac. aceticum glaciale, Eisessig: muß so frei von Wasser sein, daß er brennt, wenn man einen Glasstab hineintaucht und in die Flamme hält
20 ccm Ac. carbolicum liquefactum
Kresolseifenlösung (besteht aus Kresolen und Seife zu gleichen Teilen)
Formalin (= 40 % Formaldehydlösung) 300 ccm: dunkel aufbewahren!
Paraffin, Schmelzpunkt 48°
„ „ 58°
Paraffinum liquidum 2 l
Plastilin (Knetmasse) aus einer Spielwarenhandlung oder Grübler
Alkohol, 5 l 96 %
„ 1 l „absoluter“
Phenolphthaleïn, 2 % in 96 % Alkohol
Lackmuspapier, blaues und rotes
150 ccm Lackmuslösung nach Kubel u. Tiemann (von C. A. F. Kahlbaum, chem. Fabrik, Adlershof bei Berlin)
Malachitgrün krist., chem. rein (Höchster Farbwerke)
Fickersches Typhus-Diagnostikum von E. Merck-Darmstadt
Chloroform
Toluol
Collodium
1 l Xylol
Kanadabalsam
Zedernöl
Vaseline
Destilliertes Wasser
Speisegelatine
Stangenagar
Pepton (siccum, von Witte, Rostock)
10 g Nutrose
Traubenzucker
Milchzucker
Mannit
Glyzerin



1) Wo keine Zahl angegeben ist, ist meist nur eine sehr geringe Menge nötig; im Register ist zu finden, wo die Stoffe verwendet werden.

Nährböden (Fig. 3): Der Anfänger mache sich erst mit dem Zweck der Nährböden vertraut, bevor er die Bereitung beginnt; es hat dies auch den Vorteil, daß er sich leichter an den selbst bereiteten Nährböden vergewissern kann, ob sie richtig ausgefallen sind. Im Laboratorium ist dies leicht durchzuführen; wer allein arbeitet, muß allerdings mit der VI. Uebung beginnen. Doch sind Nährböden auch fertig zu beziehen (aber teuer), z. B. von Grübler, ferner auch in trockenem Zustande. Nötig sind bis zur VI. Uebung:

50 Röhrchen mit Gelatine, 20 mit Bouillon, 50 mit Agar, 6 mit Zuckeragar.

Ferner sucht man jederzeit die Gelegenheit zur Erlangung von Ascitesflüsssigkeit oder menschlichem Serum auszunützen. Ascitesflüssigkeit wird in ein steriles Gefäß abgelassen, zu je etwa 10 ccm in möglichst viele sterile Reagenzgläser übergeschüttet und diese in den Brutschrank gestellt. Konnte die Entnahme nicht ganz steril geschehen, so sind sie zuerst $^1/_2$ Stunde lang bei 56° zu halten. Diejenigen, in denen nach 3 Tagen Trübung oder Bodensatz aufgetreten ist, sind unbrauchbar. Weitere Aufbewahrung bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank. — Menschliches Serum erhält man, indem man Blut einer Placenta aus der Nabelschnur in einen sauberen, trockenen, sterilisierten Glaszylinder exprimiert, nach einigen Stunden mit einem mehrere Male durch die Flamme gezogenen und wieder abgekühlten Glasstab den Blutkuchen von der Wand ablöst, am nächsten Tag das abgeschiedene Serum in Reagenzgläser füllt und wie vorher vorgeht. — Der zur Entnahme bestimmte Glaszylinder wird vorher mit Watteverschluß versehen und $^1/_2$ Stunde bei 150° sterilisiert.

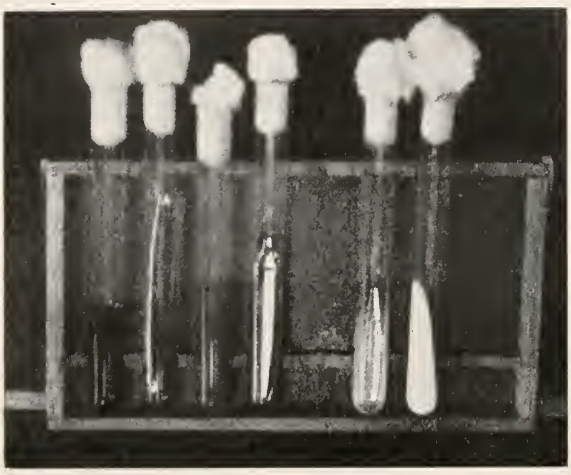


Fig. 3. Nährböden, in Reagenzgläser abgefüllt. Von links nach rechts: gerade und schräg erstarrte Gelatine, gerade und schräg erstarrter Agar, schräg erstarrtes Serum.

Reinkulturen sind von Prof. Kräls bakteriologischem Laboratorium, Wien IX/2, Zimmermannsgasse 3, zu erhalten.

Versuchstiere: Nötig sind: graue (oder weiße) Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben. — Graue Mäuse werden in einem 1 m hohen Blechkasten mit Glasfenster aufbewahrt; auf den Boden kommt Torfstreu. Will man sie herausholen, so faßt man sie mit einer 60—70 cm langen Zange am Schwanz. — Infizierte Mäuse kommen in etwa 20 cm hohe und 10—20 cm breite Gläser mit etwas Torfstreu und einem Deckel aus Drahtgeflecht, der noch mit einem Bleigewicht beschwert werden kann. Außerdem ist eine kleinere, etwa 30 cm lange Mäusezange (vom Aussehen einer langen, stumpfen Schere) nötig, ferner ein Deckel mit einem Loch, das nach Bedürfnis durch ein um einen

Nagel horizontal drehbares Holz größer und kleiner gestaltet werden kann, damit sowohl die Maus ganz als auch der Schwanz allein herausgeholt werden kann. — Sucht die Maus herauszuspringen, während man die Deckel wechselt, so bläst man etwas Rauch hinein, worauf sie sich stets unter die Streu verkriecht. — Mäuse werden mit in Wasser gründlich eingeweichtem Brot ohne Rinde oder Hundekuchen etc. gefüttert, ferner mit Hanf, Gerste, Weizen.

Kaninchen und Meerschweinchen werden in einem offenen Stall vorrätig gehalten; infizierte Kaninchen werden in Käfige, am billigsten aus Holz mit Drahtgitter, infizierte Meerschweinchen in große irdene, glasierte Töpfe mit Deckel aus Draht gebracht. Nie setze man mehrere mit verschiedenen Mikroorganismen infizierte Tiere zusammen. Um gleichfarbige Tiere, z. B. Mäuse, zu unterscheiden, bezeichnet man sie mit Fuchsin, Pikrinsäure etc. oder klemmt eine Nummer aus Metall ins Ohr.

Zur Zucht setzt man ein Männchen mit mehreren Weibchen zusammen. Für Meerschweinchen sind Hütten aus Holz zu empfehlen, die an der einen Seite abgeschrägt sind und auf dieser Hälfte einen Boden haben (Fig. 4). Die Tiere müssen reinlich gehalten werden; sie werden im Sommer mit Grünfutter, im Winter mit Hafer, Heu, Futterrüben gefüttert; ist die Nahrung sehr wasserreich, so dürfen sie kein Wasser besonders erhalten, da sonst Durchfall erfolgt. Tauben erhalten Erbsen und Gerste.

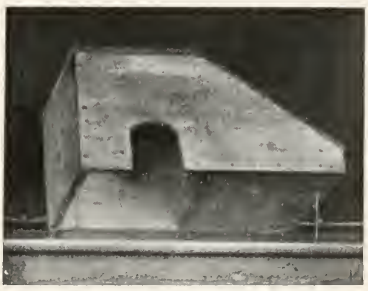


Fig. 4. Hütte zur Meerschweinchenzucht (halb von unten gesehen).

Oft treten Epidemien ein, die die ganze Zucht vernichten können. Man isoliert dann die Gesunden und Krankheitsverdächtigen in möglichst kleinen Gruppen, tötet die Kranken und desinfiziert den Stall.

Zu Versuchen an Mäusen und Meerschweinchen ist, wenn man einen Gehilfen hat, für die im folgenden angegebenen Versuche kein besonderes Operationsbrett nötig; dagegen für solche an Kaninchen. Das Tier wird dadurch am Kopfe gehalten, die Extremitäten festgebunden (vergl. die Kataloge der betr. Firmen).

Zu Sektionen sind mindestens 2 Bretter, eines für Meerschweinchen und Kaninchen, eines für Mäuse nötig. Ersteres hat einen erhöhten Rand, damit Blut und andere Flüssigkeiten nicht abfließen. Sie müssen so groß sein, daß die Tiere mit ausgebreiteten Extremitäten darauf liegen können. Kaninchen und Meerschweinchen werden mit ausgebreiteten Extremitäten darauf festgebunden oder festgenagelt, Mäuse mit langen Nadeln festgesteckt. Die Kadaver kommen, soweit kein Verbrennungsofen vorhanden ist, nachdem ihnen alles Brauchbare entnommen ist, in ein großes Glas mit roher konzentrierter Schwefelsäure, worin sie sich in kurzem auflösen, so daß ein solches für den ganzen Kurs ausreicht.

I. Hälfte des Kurses.

1. Tag.

Herstellen der Lösungen.

1. Konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung.
2. „ „ Methylviolettlösung.
3. „ „ Methylenblaulösung. Man übergießt von dem ersten Farbstoffe 30, von den beiden anderen je 20 g mit je 300 ccm 96% Alkohol und schüttelt mehrmals des Tages um.
4. Bismarckbraun, 0,4 g in 200 ccm kochendem Wasser gelöst und filtriert.
5. Safranin, 6 g in 200 ccm kochendem Wasser gelöst und nach dem Erkalten filtriert.
6. Lösungen zur Neißerschen Körnchenfärbung:
   a) Methylenblau 0,2; 96% Alkohol 4,0; Aq. dest. 200: Aq. acet. glacial. 10,0 (= essigsaures Methylenblau).
   b) Kristallviolett 0,5; Alkohol 5,0; Aq. dest. 150,0.

   Die beiden Lösungen sind getrennt aufzubewahren.
   c) Chrysoidin 1:300, kochen und filtrieren.
7. Lithionkarmin zur Schnittfärbung: 3 g Lithion carbonicum werden in 300 ccm kochendem destillierten Wasser gelöst. Beim Erkalten scheidet sich ein Teil wieder aus. Einige Stunden nach dem Erkalten filtrieren und 7,5 g Karmin zusetzen. Nach einiger Zeit filtrieren.
8. Konzentrierte wäßrige Neutralrotlösung, etwa 1 g in 100 ccm kochendem Wasser lösen und in einem Tropffläschchen im Dampftopf sterilisieren.
9. 2 l 60% Alkohol, aus 96% herzustellen. Davon
10. 500 ccm 1%,
11. 500 ccm 3% Salzsäure zusetzen,
12. Absoluter Alkohol. Der käufliche „absolute Alkohol“ enthält noch $^1/_2$—1% Wasser; um ihm dieses zu entziehen, schützt man Kupfersulfat in einer Porzellanschale, bis es weiß wird, bringt gleich nach dem Erkalten in ein Pulverglas so viel, daß es den Boden bedeckt und übergießt es mit „absolutem Alkohol“; über das Kupfersulfat kommt noch eine dünne Schicht Watte, damit Organe, die hinein gelegt werden, nicht in direkte Berührung damit kommen.
13. Jodlösung. Jod löst sich kaum in Wasser, dagegen gut in konzentrierter Jodkaliumlösung. Man bringt daher in eine Flasche 1 g

Jod, 2 g Jodkalium und 5 ccm destilliertes Wasser und setzt, wenn sich alles gelöst hat, noch 300 ccm Wasser zu.

14. Physiologische Kochsalzlösung. 8.5 g in 1 l destilliertem Wasser.

15. Sublimatlösung, konzentriert wäßrig. 21 g werden in 300 ccm kochendem destillierten Wasser gelöst; ein kleiner Teil scheidet sich beim Erkalten wieder aus.

16. 1 l 2‰ Sublimatlösung zum Desinfizieren.

17. Kresolseifenlösung. 5% in einem großen Gefäß, in das gebrauchte Deckgläser und Objektträger geworfen werden.

18. Exsikkatorfett: Erwärmen und Mischen von 1 Teil Vaseline und 4 Teilen Hammeltalg.

Sterilisieren der Glasgefäße.

Die Petrischalen und die Reagenzgläser werden gereinigt, die Reagenzgläser mit Stopfen aus nicht entfetteter Watte versehen und alles im Trockenschrank bei 150° eine halbe Stunde lang sterilisiert. Nach Vollendung der Sterilisation läßt man im Schrank bei geschlossener Türe langsam abkühlen.

Künstliche Beleuchtung.

Hat man mikroskopische Präparate, so übt man sich im Einstellen künstlichen Lichtes. Gasglühlicht und Flammen sind leicht einzustellen, schwerer elektrisches Glühlicht. — Man sucht zunächst durch Drehen des Planspiegels möglichste Helligkeit zu erlangen, stellt dann das Präparat bei starker Vergrößerung (Ölimmersion) ein und dreht den Spiegel hin und her und den Abbe abwärts, bis man ein genaues Bild des leuchtenden Gegenstandes (z. B. des Kohlenfadens des elektrischen Glühlichtes) hat. Dann dreht man den Abbe ganz wenig in die Höhe, wodurch man über das ganze Präparat größte Helligkeit erhält.

Für den nächsten Tag ist Material mit vielen verschiedenen Bakterien zu beschaffen: z. B. Jauche, besonders Stalljauche; ferner legt man in Gläser mit Wasser etwas Heu, Stücke von rohen Kartoffeln, Erbsen etc. und stellt letztere (nicht die Jauche) an einen warmen Ort.

2. Tag.

Herstellung der Lösungen (Fortsetzung).

Aus den alkoholischen Stammlösungen werden folgende Lösungen hergestellt:

1. Karbolfuchsin (Ziehlsche Lösung): 100 ccm 5% Karbollösung (aus Acidum carbolicum liquefactum, das 100 Teile Karbol und 10 Teile Wasser enthält, herzustellen) + 10 ccm konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung. Hält sich einige Monate unverändert.

2. Verdünntes Karbolfuchsin = „Fuchsin“: die vorige Lösung 10-fach verdünnt. Ebenfalls gut haltbar.

3. Löfflersches Methylenblau: 1 l 0,1‰ Kalilauge + 300 ccm konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung. Man macht sich eine

größere Menge, da die Lösung beim Aufbewahren immer besser färbt. Schließlich muß sie zum Färben verdünnt werden und färbt dann besonders elektiv. Von Lösung 1—3 wird ein Teil in Tropffläschchen gefüllt.

4. Anilinviolett (Anilinwassermethylviolett). 4 ccm Anilin werden mit 100 ccm destilliertem Wasser mehrere Minuten kräftig geschüttelt; dann durch ein vorher angefeuchtetes Filter filtriert (Filter wegnehmen, wenn nur noch eine kleine Menge Flüssigkeit darinnen ist, da sonst Anilin durchgeht). Zu diesem „Anilinwasser" werden 11 ccm konzentrierte alkoholische Methylviolettlösung zugesetzt. Ueber die Flasche mit der Lösung setzt man einen Trichter mit Filter, durch das man sie jedesmal auf das Präparat tropfen läßt. Die Lösung ist nicht lange haltbar; sie ist noch brauchbar, solange die aus ihr kommenden Präparate tief dunkelviolett aussehen. In dubio lieber neue machen.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien a.

Material: Jauche, Infus von Heu, Kartoffeln, Erbsen.

1. Untersuchung im lebenden Zustand: Man umgibt die Delle eines hohlgeschliffenen Objektträgers dünn mit Vaseline. Dann glüht man eine Platinöse aus, um daran befindliche Keime zu vernichten. Der Platindraht glüht am schnellsten, wenn man ihn fast senkrecht in die Flamme hält. Nach einer Minute, während man ihn frei in der Luft hält, ist er wieder kalt geworden. Man taucht nun die Öse in die Jauche ein und bringt davon ein Tröpfchen auf das Deckglas, das man vorher gereinigt und in eine Cornetsche Pinzette festgeklemmt hat. Die Öse wird sofort wieder ausgeglüht. Stets soll dabei an der Cornetschen Pinzette das Erkennungszeichen, das Loch oder der Buckel am Griff, oben sein. Das Tröpfchen soll einen Durchmesser von 2—3 mm haben und dünn sein, damit auch die untersten Partien im Mikroskop gesehen werden können. Nun legt man das Deckglas mit dem Tropfen nach unten in die Delle des hohlgeschliffenen Objektträgers („hängender" Tropfen!) und drückt leicht auf, so daß der innere Raum durch die Vaseline vollständig luftdicht abgeschlossen ist. Auf die Oberseite des Deckglases, gerade über dem Tropfen, wird etwas Zedernöl gebracht. Dann schließt man die Blende je nach dem Lichte etwa $^3/_4$ (2—4 mm Durchmesser), legt den Objektträger unters Mikroskop (Immersionslinse), stellt den Tubus auf die richtige Länge (meist 16 cm) und dreht, bis die Linse in das Zedernöl eingetaucht ist, dann unter ständigem leichten Hin- und Herschieben des Objektträgers vorsichtig weiter bis man fühlt, daß das Objektiv auf dem Deckglas aufstößt. Nun sieht man in das Okular und dreht dabei mit der Mikrometerschraube nach oben (entgegengesetzt der Richtung des Uhrzeigers). Nach kurzer Zeit kommen, wenn man den Tropfen genau unter dem Objektiv hat, Bakterien zum Vorschein. Ist man daneben, so erscheint eine feine Zeichnung, die durch Tautropfen bedingt ist, welche sich an den Wänden des wasserdampfgesättigten Raumes niedergeschlagen haben. Hat man diese scharf eingestellt, so braucht man nur nach der Seite zu verschieben, um den Rand des Tropfens zu finden. Oft ist es leichter, die Tautröpfchen einzustellen und dann nach der Seite zu gehen. Wird beim Versuch,

einzustellen, das Deckglas zerbrochen, so reinigt man das Objektiv zunächst durch trockenes Abreiben mit Watte oder Leinwand vom Zedernöl, dann desinfiziert man, wenn es sich um pathogene Mikroorganismen handelt, durch leichtes Reiben mit einem in Kresolseifenlösung getauchten Tuche.

Im hängenden Tropfen sieht man: a) stäbchenförmige Mikroorganismen — Bazillen — von verschiedenster Größe, meist einzeln, oft auch zu zweien oder in Haufen, selten in Ketten; manchmal auch lange Fäden. Sie sind teils unbeweglich, teils in mehr oder minder schneller Bewegung. Man achtet darauf, ob die Bewegung konsequent nach einer Richtung geht oder ob sie nur tänzelnd ist und sich die Bakterien nach einiger Zeit wieder an dem alten Ort befinden. Letztere (Brownsche Molekularbewegung) findet sich auch bei unbeweglichen Mikroorganismen sowie bei unbelebten Körperchen.

b) Kugelförmige Bakterien — Kokken — von verschiedener Größe, fast stets ohne Eigenbewegung. Sie liegen teils einzeln, teils zu zweien (Diplokokken), teils in Ketten (Streptokokken), teils quadratisch angeordnet (Tetraden, Merista), teils kubisch (Sarcina), teils in unregelmäßigen Haufen.

c) Gekrümmte Bakterien, sehr selten klein, meist auffallend groß, oft mit so schneller Eigenbewegung, daß sie nur am Rande des Tropfens deutlich sichtbar sind, wo sie einen Augenblick Halt machen.

d) Protozoen (manchmal), eventuell erst nach mehrtägigem Stehenlassen.

e) Detritus.

Versuchsweise kann man die Blende öffnen, wodurch das ganze Bild verschwindet. Nach genügender Betrachtung wird der Tropfen vom Mikroskop entfernt und bis zum Schluß der Stunde zum Vergleich mit dem gefärbten Präparate aufbewahrt. Will man ihn dann vernichten, so faßt man zwei Kanten des Deckglases mit der Hand und dreht es so, daß eine Ecke über den Rand des Objektträgers übersteht. Der Tropfen darf am Rande der Höhlung nicht anstreifen. Dann hebt man es an der Ecke auf und wirft es in die Kresolseifenlösung. Der Objektträger wird mit einem Tuche abgewischt.

Mögliche Fehler: a) Beim Hin- und Herschieben folgt nur der Objektträger, nicht das Deckglas; beim Heben des Tubus bleibt das Deckglas daran hängen. Ursache: das Zedernöl ist zu sehr eingedickt oder die Vaselineschicht zu dünn.

b) Beim Abwärtsdrehen des Mikroskopes erscheinen nur noch undeutliche Bakterien. Ursache: der Tropfen ist zu dick.

c) Die Bakterien erscheinen unscharf, das Gesichtsfeld ist ziemlich dunkel. Ursache: das Objektiv ist nicht völlig eingeklappt und bildet infolgedessen nicht die Fortsetzung des Tubus; oder: man hat ein falsches Objektiv in das Zedernöl eingetaucht.

d) Die Bakterien kommen nur matt zum Vorschein und haben einen hellen Saum. Ursache: der Tropfen ist eingetrocknet, da er nicht genügend durch die Vaseline abgeschlossen war.

e) Es kommen helle, große, kristallähnliche Figuren zum Vorschein. Ursache: weder Tropfen noch Tautröpfchen, sondern Vaseline ist eingestellt.

f) Matte Punkte oder Streifen sind meist Schmutzflecken am Okular. Man erkennt sie als solche, wenn man während des Hineinsehens das Okular allein dreht.

BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY

g) Meist ist das Gesichtsfeld zu hell (Blende weiter schließen) oder zu dunkel (Blende öffnen).

2. Untersuchung im gefärbten Deckglaspräparat. Ein Tröpfchen Jauche wird wie vorher mit der Öse entnommen und auf das von der Cornetschen Pinzette gehaltene Deckglas gebracht, dann durch Verreiben auf den größten Teil des Deckglases verteilt. Das Verreiben geschieht mit möglichst wenig Strichen, damit Wuchsverbände nicht zerrissen werden, am besten mit dem leicht gebogenen Draht. Ausglühen der Nadel. Man läßt das Präparat lufttrocken werden, zieht es (mit der Präparatseite nach oben) dreimal durch die Flamme, mit einer solchen Geschwindigkeit, daß man einen Weg von 30 cm, in dessen Mitte die Flamme steht, in 2 Sekunden einmal zurücklegt. Dadurch werden die Bakterien fixiert (festgeklebt durch Koagulation der Eiweißstoffe) und gleichzeitig, soweit es sich nicht um Sporen handelt, abgetötet. Ist das Präparat wieder abgekühlt, so tropft man Farblösung auf.

Die Färbung soll geschehen mit 10-fach verdünntem Karbolfuchsin, unverdünntem Karbolfuchsin oder Löfflerschem Methylenblau. Man tropft die Farblösung auf, sodaß das Deckglas bis zum Rande damit bedeckt ist und läßt die beiden ersten Lösungen 30 Sekunden, die letzten 2 Minuten darauf (manche Bakterien, z. B. Milzbrandbazillen und Kokken, werden kürzer gefärbt). Dann spült man unter dem Wasserstrahl oder in einem Glas mit Wasser ab, nimmt das Deckglas aus der Pinzette und trocknet es zwischen Filtrierpapier. Letzteres darf niemals zum zweiten Male benutzt werden. Hierauf bringt man auf die Mitte eines Objektträgers ein Tröpfchen Zedernöl (oder Kanadabalsam, worin allerdings die Präparate nicht so lange haltbar sind), legt das Präparat mit der gefärbten Seite nach unten darauf, drückt es mit dem Finger leicht an und bringt oben darauf ebenfalls Zedernöl. Die Einstellung geschieht wie beim ungefärbten Tropfen, nur mit ganz offener Blende und bei bestem Lichte.

Man sieht: 1. in dem mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbten Präparat: Bazillen, Kokken, Spirillen, Detritus wie vorher. Protozoen sind kaum mehr erkennbar, da sie durch die Fixierung in der Flamme zerstört worden sind. Die Bakterien haben meist einen intensiv roten Farbton angenommen; doch finden sich auch schlecht gefärbte darunter; diese sind schon länger abgestorben; ihr Chromatin ist ausgelaugt. Selbstverständlich sind alle unbeweglich; doch kann es bei schlechter Fixierung vorkommen, daß sich einzelne vom Deckglase ablösen und quer durch das Gesichtsfeld ziehen.

2. In dem mit Methylenblau gefärbten Präparate sieht man dasselbe; nur treten die Bakterien vor dem Detritus und den koagulierten Stoffen aus der Jauche noch deutlicher hervor. Methylenblaufärbung empfiehlt sich deshalb besonders, wenn derartige Substanzen, Gewebsstoffe, Serum etc. vorhanden sind; dagegen sind die Präparate nicht so lange haltbar.

3. In dem mit unverdünntem Karbolfuchsin gefärbten sind fast nur diese störenden Stoffe zu sehen; sie verdecken die Bakterien größtenteils; das Präparat ist „überfärbt“, die Färbungsmethode für diesen Fall also unbrauchbar.

Mögliche Fehler: a) Auf der Präparatseite ist überhaupt nichts sichtbar. Ursache: das Präparat war schlecht fixiert und wurde durch das Wasser weggespült, oder man hatte die Präparatseite für die reine Seite gehalten und abgewischt oder auf der falschen Seite gefärbt.

b) Die Bakterien kommen nur undeutlich zum Vorschein. Ursachen: die Beleuchtung ist schlecht oder das Objektiv ist nicht eingeklappt, oder: wenn gleichzeitig Tröpfchen zu sehen sind: das Präparat wurde noch feucht in das Zedernöl eingelegt, dadurch hatte sich eine Emulsion desselben in Wasser gebildet.

c) Die Bakterien sind sehr matt gefärbt; die Farbe des Präparates spielt etwas ins Bräunliche. Ursache: das Präparat wurde beim Fixieren zu stark erhitzt, z. B. mit der Präparatseite nach unten durch die Flamme gezogen.

d) Es zeigt sich ein schmieriges Rot oder Kugeln von ungleicher Größe: Die Oberseite des Deckglases war nicht gründlich abgespült und der darauf befindliche Farbstoff ist eingestellt. Man drehe um die Dicke des Deckglases tiefer.

e) Beim Färben auf dem Objektträger begegnet es Anfängern öfters, daß sie diesen mit der Präparatseite nach unten unters Mikroskop legen und dann überhaupt kein Bild erhalten.

Die Präparate sind aufzuheben — mindestens bis zum Schluß des Kurses — und späterhin öfters zum Vergleiche der Größe der Bakterien mit anderen anzusehen. — Präparate, die sich entfärbt haben, legt man in Xyel, bis man das Deckglas abziehen kann, dann in absoluten Alkohol, dann in Wasser und färbt mit einem beliebigen Farbstoff nach.

Trennung und Züchtung der Bakterien. In den Präparaten waren noch sehr viele Arten von Bakterien durcheinander zu sehen; will man eine einzelne Art studieren, so ist es nötig, sie von allen anderen und von den sonstigen anhaftenden Stoffen getrennt zur Vermehrung zu bringen. Hierzu ist der erste Schritt die Isolierung, am einfachsten durch Plattengießen.

Technik: Man bringt drei Gelatineröhrchen in heißes Wasser, bis die Gelatine flüssig ist. Sollten sie dann so heiß sein, daß man sie nicht bequem in der Hand halten kann, so wartet man, bis dies der Fall ist, da andernfalls eingebrachte Bakterien durch die Hitze getötet werden. Da die Gelatine erst bei 23—27 ° erstarrt, braucht man sich nicht zu beeilen.

Ist die richtige Temperatur erreicht, so glüht man die Platinöse aus und nimmt den Wattestopfen von dem Röhrchen, behält ihn aber in der Hand und achtet darauf, daß er nirgends anstreift, damit nicht andere Bakterien daran hängen bleiben. Infektion durch die Luft ist viel weniger zu befürchten. Hängt noch Watte an dem Röhrchen, so brennt man sie ab. Dann bringt man mit der Öse ein Tröpfchen Jauche in die Gelatine in der Art, daß man das Röhrchen schräg hält und das Tröpfchen an der Stelle, die eben noch von der Flüssigkeit bedeckt war, verreibt. Hierauf legt man die Öse beiseite (erst ausglühen!) und verteilt das Tröpfchen durch Drehen und Neigen in der Gelatine. Nun sind die Bakterien in der Flüssigkeit gleichmäßig verteilt; würde man sie jetzt in eine Petrischale ausgießen, so würde die Flüssigkeit erstarren, dadurch die Bakterien an dem Orte, an dem sie sich befinden, fixiert werden und sich zu isolierten Kolonien entwickeln. Doch würden diese wegen des großen Bakterienreichtums des Ausgangsmaterials zu nahe aneinander stehen, so daß eine Isolierung unmöglich wäre. Deshalb legt man Verdünnungen an, in der Weise, daß man aus dem ersten Röhrchen (Original) 3 Ösen in das zweite und von da, nachdem man die Öse ausgeglüht hat, 3 Ösen in das dritte bringt (1. und 2. Ver-

dünnung). Dann gießt man die Gelatine in die Petrischalen (der Boden muß ganz bedeckt sein, wenn nötig, bewirkt man das durch Neigen, doch so, daß der Deckel nicht benetzt wird) und etikettiert diese mit Bezeichnung des Ausgangsmaterials, Datum, Nährboden und Ziffern der Röhrchen (Original = I; 1. Verdünnung = II; 2. Verdünnung = III). Beim Ausgießen ist darauf zu achten, daß die Platten horizontal stehen.

In gleicher Weise gießt man dann 2 Serien Agarplatten, ebenfalls von je 3 Röhrchen. — Der Agar schmilzt erst bei 98° und erstarrt schon bei 37°. Es ist daher genau der Zeitpunkt abzupassen, an dem er so weit abgekühlt ist, daß einerseits die Bakterien eingebracht werden können, ohne daß ihnen die Wärme schadet, andererseits der Nährboden noch nicht erstarrt ist. Man kann sich die Arbeit anfangs dadurch erleichtern, daß man die Röhrchen im Wasserbad läßt, bis das Thermometer 43° zeigt und dann sofort die Platten gießt. — Eine höckrige Oberfläche der gegossenen Platten zeigt an, daß man zu lange gewartet hat.

Die Gelatineplatten und eine Serie der Agarplatten (Bezeichnung auf der Etikette!) werden bei 23°, die andere Serie bei 37° aufbewahrt; und zwar werden die Agarplatten stets umgekehrt in den Brutschrank gestellt.

II. Übung: Untersuchung eines pathogenen Mikroorganismus. Milzbrand. a.

Infektion einer Maus mit Milzbrandbazillen: Eine Maus wird von einem Gehilfen mit der Mäusezange am Schwanz gefaßt und durch den durchlochten Deckel so weit in ein Mäuseglas hineingehängt, daß nur noch der Schwanz und die Partie über der Schwanzwurzel außen sind. Weiße Mäuse werden mit der Hand herausgenommen und an Nacken und Schwanz gehalten. Nun schneidet der Untersucher die Haare an der Schwanzwurzel ab, hebt mit einer Pinzette die Haut in die Höhe, macht mit der Schere einen Schnitt so groß, daß die Öse eben hineingeht, und lockert mit der spitzen Branche der Schere die Haut von dem Unterhautzellgewebe. Dann nimmt er mit der Platinöse (vorher ausglühen!) von einer Milzbrandkultur (ganz oberflächlich streichen!) so viel, daß die Öse halb ausgefüllt ist und bringt dies in die Wunde. — Öse ausglühen! Die Maus wird losgelassen und vorsichtig ein anderer Deckel aufgesetzt. — Dann bringt man, um die den Milzbrandbazillen ähnlichen Heubazillen zu züchten, etwas Heu in ein dünnwandiges Becherglas, überschüttet mit Wasser, kocht einmal auf und läßt bei 22° stehen.

Sterilisieren von Kartoffeln und Milch. — Kartoffeln werden geschält und die „Augen“ ausgeschnitten, dann in 1 cm hohe Scheiben zerlegt und in sterile kleine Glasschalen oder auch, in der Form wie das erstarrte Serum auf Fig. 3, nur mit einem Glasstäbchen am Boden, damit die Kuppe nicht berührt wird, in Reagenzgläser gebracht. Sterilisieren in einem Kessel im Dampfkochtopf 1 Stunde. — Ferner wird frische Milch in Reagenzgläser gebracht (in jedes etwa 10 ccm) und mitsterilisiert.

3. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung der Bakterien. b.

1. Makroskopische Betrachtung der Platten.

Zunächst werden je 6—10 Gelatine- und Agarröhrchen verflüssigt und schräg gelegt, so daß der Nährboden nach dem Erstarren $^2/_3$ der einen Wand des Röhrchens bedeckt.

Auf den bei 37° gehaltenen Agarplatten haben sich zahlreiche Kolonien entwickelt; ist kein Wachstum erfolgt, so ist meist der Grund, daß man die Platinöse noch heiß in die Jauche getaucht und dadurch die Bakterien getötet hatte oder daß der Agar zu heiß war. Beim schrägen Draufsehen findet man, daß sie teils auf dem Agar, teils in der Tiefe sitzen. Erstere sind mit wenigen Ausnahmen größer. Sie sind meist rund, die Oberfläche teils glatt, teils rauh, grau, graugelb, gelb, vielfach mit einem tieferliegenden Punkt in der Mitte, da die meisten oberflächlichen Kolonien erst in der Tiefe gewachsen und dann nach oben durchgebrochen sind. Sind die oberflächlichen Kolonien auffallend groß und dünn mit verwaschenen Rändern oder strichförmig, so kann die Ursache sein, daß sich Kondenswasser auf dem Agar niedergeschlagen hat. Auch zwischen Agar und Glas liegen breite, sehr dünne Kolonien. — Die tiefliegenden sind rund, wetzsteinförmig, baumförmig verästelt etc. Auf der zweiten und dritten Platte sind entsprechend weniger Kolonien; zur weiteren Untersuchung verwendet man eine Platte, auf der sich die meisten Kolonien nicht berühren.

Auf den bei 23° gehaltenen Agar- und Gelatineplatten sind höchstens sehr kleine Kolonien zu erkennen, da die Temperatur einer schnellen Entwicklung weniger günstig war.

2. Betrachtung bei 60-facher Vergrößerung. Der Deckel einer Platte wird abgenommen und diese offen unter das Mikroskop gesetzt. Blende bei gutem Tageslicht 1—2 mm. Das Aussehen der Kolonien ist nach Farbe und Form sehr verschieden. Sie sind farblos bis dunkelbraun; fein granuliert, grob granuliert, mit Auflagerungen. Besonders ist auf den Rand zu achten, der glatt, granuliert, zerfetzt, mit Ausläufern sein kann. Erscheinen die Kolonien unscharf, so ist meist die Ursache, daß sich das Objektiv mit Wassertropfen beschlagen hat.

Auf den bei 22° gehaltenen Platten sind unter dem Mikroskop viele kleine Kolonien sichtbar (zuerst die Platte I betrachten!). Man verwechsle die Kolonien nicht mit den Kratzern, die in dem Glase oft benutzter Platten sind.

3. Betrachtung bei starker Vergrößerung. Man untersucht die Bakterien zunächst im lebenden Zustande im hängenden Tropfen von Leitungswasser oder Bouillon. Der Tropfen wird wie am 2. Tage angefertigt und mit der Platinnadel (vorher ausglühen!) eine Spur einer Bakterienkolonie hineingebracht, so daß er sich eben trübt. In dieser Weise werden mehrere verschieden aussehende Kolonien untersucht: die einzelnen Kolonien werden auf der Rückseite der Platte mit Tinte numeriert. Besonders ist auf den Rand des Tropfens zu achten. Man sieht in jedem Tropfen nur eine einzige Bakterienart (Zweck des Plattengießens). Teils sind es Kokken, teils Bazillen, teils Spirillen (sehr kleine Kolonien). Bei den Kokken achtet man auf die

Größe und die Lagerung, bei den Bazillen außerdem noch auf die Bewegung. Diese kann fehlen (vgl. das oben über Molekularbewegung Gesagte) oder vorhanden sein und ist dann langsam oder schnell, schlängelnd, wackelnd etc. Manche Bazillen hängen zu zweien aneinander, andere sind zu Fäden ausgewachsen. Vereinzelte Stäbchen, die aufrecht stehen, haben den Anschein von Kokken.

Hierauf färbt man dieselben Kolonien mit 10-fach verdünntem Karbolfuchsin, doch muß man die Kolonien, da sie eine zähe Masse bilden, in einem Tröpfchen Wasser auf dem Deckglas verreiben. Die richtige Größe des Tröpfchens erhält man, wenn man die Spitze der Platinnadel unter einen starken Wasserstrahl hält. Man achtet wieder auf Gestalt, Größe und Lagerung, bei den Bazillen u. a. darauf, ob sie direkt aneinander liegen oder zwischen allen sich ein Zwischenraum befindet, da letzterer auf das Vorhandenseiu einer Hülle schließen läßt. Letztere kann auch die Bazillen als schwach gefärbter Saum umgeben. Im übrigen soll der Untergrund ganz klar sein; hat er sich mitgefärbt, so ist dies ein Zeichen, daß man zu tief in den Agar gekommen ist.

4. Fortzüchten der Bakterien. Von 3 oder 4 der bezeichneten Kolonien wird je auf schrägen Agar und auf schräge Gelatine abgeimpft, indem man mit der ausgeglühten und wieder abgekühlten Platinöse die Kolonie leicht berührt und nach Öffnung des Röhrchens (Wattestopfen in der Hand behalten; Röhrchen schräg halten!) einen oberflächlichen Längsstrich macht. Ferner werden Agar- und Gelatinestichkulturen in der Weise angelegt, daß man die Kolonie mit der ausgeglühten und abgekühlten Platinnadel leicht berührt und in das betreffende Röhrchen einen Stich in die Mitte genau nach unten führt. Der Stich soll nicht ganz bis auf den Boden gehen. Beim Herausziehen der Nadel achtet man darauf, ob in der Gelatine ein kleines oberflächliches Loch geblieben ist, das eventuell zur Verwechslung mit Verflüssigung Anlaß geben könnte. Ferner sieht man nach kurzer Zeit nach, ob die Gelatine längs des Stiches in ganzer Breite einen Sprung bekommen hat; dies kommt dann vor, wenn die Gelatine schon etwas eingetrocknet war; das Röhrchen ist zu verwerfen und dafür in ein anderes ein neuer Strich anzulegen, doch muß dieses zuerst verflüssigt werden und wieder erstarren. Die Kulturen sind mit der Nummer der Kolonie, Datum, Nährboden zu bezeichnen, die Agarkulturen bei 37 °, die Gelatinekulturen bei 22 ° aufzubewahren.

Die Befunde der verschiedenen Bakterienarten werden in eine Tabelle etwa nach folgendem Muster eingetragen:

No.	Gestalt	Eigenbewegung	Färbbarkeit nach Gram	Sporenbildung	Gelatineplatte			Agarplatte	Gelatinestich	Agarstich	Bouillon
					Gestalt	Farbe	Verflüssigung				
1	kleiner Coccus, unregelmäßige Lagerung	—	+	—	zackig 2 mm ø	gelb	+	grob granulierter Rand, 2 mm ø	oberfl. Verflüss. Stichkanal: gelbe Klümpchen	gelber Belag. Stichkanal: gelbe Klümpchen	wenig getrübt, krümelig. Bodensatz
2											
3											

5. Übung des Abimpfens dichtstehender Kolonien („Fischen"). Man stellt unter dem Mikroskop eine Kolonie ein, die nahe bei anderen liegt und kann in zweierlei Weise vorgehen.

a) Entweder man hebt den Tubus und sucht mit der Platinnadel die Kolonie zu berühren. Die Kolonie liegt meist etwas näher bei dem Untersucher, als dieser anfänglich anzunehmen pflegt. Glaubt man sie getroffen zu haben, so senkt man den Tubus wieder und sieht nach. Wurde die Kolonie getroffen, so ist ihre Form zerstört. Ist außer der gewünschten noch eine andere berührt, so ist das Resultat unbrauchbar.

b) Oder man sucht, während man ins Mikroskop sieht, mit der Nadel unter das Objektiv zu gehen und die Kolonie zu treffen. Zu beachten ist, daß sich das Bild hierbei umkehrt, daß also z. B. die Nadel statt von rechts von links kommt. Weder eine andere Kolonie noch der Tubus darf berührt werden; andernfalls ist das Resultat unbrauchbar.

Die erste Abimpfung ist auf schrägen Agar zu bringen, erst die zweite zu färben, damit, im Falle die zweite mißlingt, wenigstens einwandfreies Material zur weiteren Untersuchung vorhanden ist (Stammkultur). Die Platten werden wieder in die entsprechenden Brutschränke zurückgestellt.

II. Übung: Milzbrand. b.

Die Maus zeigt noch keine Krankheitserscheinungen; höchstens ist geringes Ödem an der Infektionsstelle vorhanden. Andere Symptome pflegen erst kurz vor dem Tode einzutreten, wenn die Bazillen den ganzen Körper überschwemmen. Sollte sie schon tot sein, so ist sie, wie in der II. Übung angegeben, zu obduzieren und zu untersuchen, oder, falls keine Zeit dazu ist, mit einer Öse Blut eine neue zu infizieren.

Nochmaliges Sterilisieren der Kartoffeln und der Milch wie vorher.

4. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung der Bakterien. c.

1. Auf den bei 37° gehaltenen Agarplatten haben sich die Kolonien vergrößert; außerdem sind neue zum Vorschein gekommen. Auch kann es sein, daß eine Kolonie die ganze Platte überwuchert hat und sie als grauer Schleier bedeckt.

Auf den bei 23° gehaltenen Agarplatten ist das Wachstum heute besser, doch erreicht es nicht das der ersteren. Treten farbige Kolonien auf, so ist darauf zu achten, ob die Kolonie selbst gefärbt ist oder ob von ihr aus ein Farbstoff in die Umgebung diffundiert.

Auch auf den Gelatineplatten ist reichlicheres Wachstum erfolgt. Viele Kolonien haben die Gelatine in mehr oder minder großer Ausdehnung verflüssigt. Von einer solchen Kolonie darf man nur dann abimpfen, wenn man sich überzeugt hat, daß nicht noch andere Kolonien in der Verflüssigungszone liegen. — Auch sonst haben die Kolonien

ein anderes Aussehen als auf Agar. Untersuchungen bei 60-facher Vergrößerung, im hängenden Tropfen und gefärbt!

Auf den Agarstrichkulturen ist durchweg Wachstum erfolgt, teilweise nur auf dem gemachten Strich, teilweise die ganze Oberfläche bedeckend, eventuell mit kleinen Kolonien am Rande. Farbe, Aussehen etc. wie auf der Platte. Unten befindet sich Kondenswasser (keine Verflüssigung! Agar wird niemals verflüssigt!); man halte das Röhrchen nicht schräg, damit es nicht über die Kolonien läuft.

Bei den Stichkulturen ist Wachstum an der Oberfläche und im Stichkanal zu unterscheiden. Bei den Agarstichkulturen entspricht das Aussehen der Oberfläche dem der Plattenkolonie; der Stichkanal ist fadenförmig, perlschnurartig, mit Höckern, mit Ausläufern. Nach unten ist das Wachstum schwächer, da weniger Material dorthin gekommen und außerdem weniger Sauerstoff vorhanden ist. Manchmal sind im Agar Gasblasen zu sehen.

Bei dem Gelatinestich ist der Belag ähnlich dem des Agarstiches, oder die Gelatine ist verflüssigt (vgl. aber das oben bei dem Anlegen des Stiches Erwähnte über Sprung und Loch!). Die Verflüssigung kann sich auf den Stichkanal fortsetzen und trichter-, schalen- und sackförmig sein.

Ist die ganze Gelatine mit Kolonien durchsetzt, so kommt dies meist daher, daß der Stich gemacht wurde, bevor die Gelatine völlig erstarrt war; die Kultur ist dann unbrauchbar.

Die Befunde sind in die Tabelle einzutragen.

II. Übung: Milzbrand. c.

Die Milzbrandmaus ist eingegangen; sollte sie moribund sein, so tötet man sie, indem man ihr mit einer Pinzette die Halswirbelsäule zerquetscht.

Sie wird mit einer Pinzette aus dem Glase geholt, auf eine Holzplatte auf den Rücken gelegt und mit starken Nadeln an den möglichst weit abgezogenen Extremitäten festgesteckt. Die Instrumente werden ausgekocht — je mehr es sind, desto besser. Bei der Sektion sollen die Instrumente möglichst oft gewechselt werden; mindestens muß die Durchtrennung der Haut, die Öffnung des Leibes und die Herausnahme der Organe mit verschiedenen Scheren und Pinzetten vorgenommen werden. Niemals dürfen die Instrumente auf den Tisch gelegt werden, da sonst der Tisch infiziert und die Instrumente mit fremden Keimen verunreinigt werden, auch dürfen die Instrumente nicht so naß sein, daß Wasser, das mit den Händen in Berührung war, daran herunterläuft. — Die Maus wird mit 60% Alkohol übergossen, damit keine Haare davonfliegen, dann die Haut über der Symphyse mit der Pinzette emporgehoben, eingeschnitten und nun bis zum Kehlkopf ein Längsschnitt gemacht, an den sich je ein Entspannungsschnitt zur Ansatzstelle der vorderen Extremitäten anschließt. Die Haut wird von Brustkorb und Bauchmuskulatur zurückpräpariert, die Instrumente gewechselt. Die Bauchmuskulatur wird in gleicher Weise bis zum Proc. xiphoideus durchtrennt und zwei Entspannungsschnitte nach den Seiten hin gemacht; von deren Ende bis zum oberen Ende des Hautschnittes die Rippen rechts und links durchschnitten, das Zwerchfell abgelöst und der vordere Teil des Brustkorbes nach oben geklappt. – Außer der Vergrößerung der Milz und einer allgemeinen Hyperämie werden anatomische Veränderungen nicht gefunden. Weiße

Mäuse haben schon normalerweise große Milzen. Herde in der Leber sind meist durch Coccidien oder Tänien verursacht. Will man zunächst Herzblut ganz steril entnehmen, so macht man ein altes Messer in der Flamme sehr heiß, berührt damit das Herz, um es zu desinfizieren und sticht mit einer sterilen Glaskapillare an dieser Stelle ein. Dann faßt man Trachea und Ösophagus ganz oben, durchschneidet sie, löst die Brustorgane heraus und legt sie in eine sterile Petrischale. Die Leber wird ebenfalls an den Bändern hinten oben gefaßt und in toto herausgenommen, ebenso Milz und Nieren. Dann werden die Instrumente ausgekocht, die Nadeln abgeglüht, die Leiche vernichtet (z. B. in ein Gefäß mit roher konzentrierter Schwefelsäure geworfen), das Holzbrettchen abgebrannt. (Übergießen mit Spiritus und Abbrennen desselben ist nicht genügend.)

Vor der weiteren Untersuchung legt man die Hälfte der Lunge, Leber, Milz und eine Niere zur Anfertigung von Schnittpräparaten zur Seite.

Untersuchung des Blutes und der Organe. a) Im hängenden Tropfen bei starker Vergrößerung. Man bringt mit der Nadel etwas Herzblut in ein Tröpfchen physiologischer Kochsalzlösung. Man sieht: besonders am Rand des Tropfens zwischen zahlreichen, schon stechapfelförmig gewordenen Blutkörperchen längere oder kürzere Bazillenfäden, meist nicht völlig wagerecht liegend, so daß man sie erst durch Drehen mit der Mikrometerschraube ganz verfolgen kann. Eigenbewegung fehlt. — Dann wischt man das Zedernöl ab und untersucht bei 60-facher Vergrößerung, bei der die Bazillen noch eben sichtbar sind.

Fig. 5. Milzbrandbazillen. Ausstrich aus der Leber. 800 : 1.

b) Im gefärbten Deckglaspräparat. Eine Öse Blut wird auf ein Deckglas gebracht und mit der leicht gebogenen Nadel mit möglichst wenigen Strichen ausgebreitet. — Organe faßt man mit der Pinzette, schneidet sie mit der Schere durch und streicht mit der abgeschnittenen Stelle einmal über ein Deckglas. Trocken werden lassen, in der Flamme fixieren, mit verdünntem Karbolfuchsin färben.

Man sieht (Fig. 5): Ziemlich große Bazillen, meist in kurzen Ketten liegend; die Ecken sind rechtwinklig abgestumpft. Die Ketten sind von einem ungefärbten Hofe umgeben. Fäden sind nicht mehr zu sehen; sie werden durch die Färbung in ihre einzelnen Glieder aufgelöst. Nur wenn man die Präparate stark überfärbt, sieht man sie noch, da sich dann die Kapsel mitfärbt. Die Enden sind dann vielfach bambusförmig aufgetrieben. Auch die Kapsel kann noch von einem hellen Hofe umgeben sein, der beim Fixieren durch Schrumpfung der umgebenden Eiweißstoffe entstanden ist (Retraktionshof). Vereinzelte Bazillen färben sich nicht mehr; diese waren bereits abge-

storben. — Sporen sind nicht zu sehen, da sie im Tierkörper nicht gebildet werden. — Außer den Bakterien sind die Zellkerne stark, die roten Blutkörperchen schwach gefärbt; beim Ausstreichen werden manchmal Zellkerne zu Fäden ausgezogen und können zu Verwechslungen Anlaß geben. Kleine intensiv gefärbte Kugeln sind meist Farbstoffniederschläge; sie sind von Kokken durch ihre ungleichmäßige Größe zu unterscheiden.

Gramsche Färbung (ist dazu keine Zeit mehr, so können Deckglasausstriche fixiert aufbewahrt werden). Färben mit Anilinviolett 3 Minuten. Abspülen mit Wasser; Jodlösung 1 Minute; ablaufen lassen. tropfenweise 96 % Alkohol übergießen; oder entfärben in einem Schälchen mit 96 % Alkohol, bis keine Farbstoffwolken mehr weggehen. Trocknen. Zedernöl. — Ein anderes Präparat wird nach der Entfärbung in Alkohol mit 3 % Safraninlösung oder auch verdünntem Karbolfuchsin ½ Minute nachgefärbt. Abspülen in Wasser, trocknen. Zedernöl. Man sieht: die Bazillen sind intensiv violett gefärbt; die Enden sind jetzt mehr rund. In dem nachgefärbten Präparate haben die Zellen die Gegenfarbe angenommen. Die Bazillen müssen gleichmäßig gefärbt sein, nicht nur gefärbte Körnchen zeigen, sonst war die Entfärbung zu lange oder die Farblösung zersetzt.

Kapselfärbung. Die Färbung geschieht entweder mit 2 % wäßriger Methylviolettlösung bis zur Dampfbildung, Abspülen mit Wasser, dann mit 1—2 % Essigsäure 6—10 Sekunden, oder mit 3 % wäßriger Safraninlösung bei Zimmertemperatur 3 Minuten; abspülen mit Wasser, untersuchen in Wasser, d. h.: nicht trocknen, sondern sofort auf den Objektträger legen. Oberseite abtrocknen, Zedernöl darauf. Bazillen rot, Kapseln gelb. — An der Reinkultur können keine Kapseln gefärbt werden. Ist keine Zeit, so bewahrt man die Ausstriche fixiert auf und färbt am nächsten Tage.

c) Kulturelle Untersuchung. Würde man aus den Organen sofort Stichkulturen anlegen, so würde man vielleicht verunreinigte Kulturen erhalten, da fremde Bazillen bei der mikroskopischen Betrachtung übersehen sein könnten. Man gießt daher wieder Platten, und zwar Agar- und Gelatineplatten wie vorher beschrieben. Zur Einsaat nimmt man für den Agar eine Öse Herzblut, für die Gelatine ein ebenso großes Organstückchen (an der Wand des Röhrchens gut verreiben!). Außerdem legt man eine Kultur im hängenden Tropfen an, indem man ein Bouillontröpfchen mit einer Spur (Nadelspitze) Herzblut infiziert. (Gut mit Vaseline abschließen!) Dieses und die Agarplatten werden bei 37°, die Gelatineplatten bei 23° aufbewahrt.

d) Anfertigung von Schnittpräparaten. Die dafür reservierten Organe werden in 10 % Formalinlösung (= 4 % Formaldehydlösung) gelegt. (Im Dunkeln aufbewahren, da sich das Formalin im Lichte zersetzt!)

e) Ferner wird ein Agarröhrchen verflüssigt, in eine Petrischale ausgegossen und in den Brutschrank gestellt (vgl. II. Übung d 5).

f) Heubazillen: Das vor zwei Tagen angelegte Glas mit Heuinfus zeigt ein Häutchen, das im hängenden Tropfen und gefärbt untersucht wird. Man findet darin Bazillen von derselben Größe wie die Milzbrandbazillen, doch sind sie an den Enden abgerundet. Meist sind reichliche Sporen zu sehen. Gießen von Gelatine- und Agarplatten.

Nochmaliges Sterilisieren der Kartoffeln und der Milch wie vorher.

5. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. d.

Die Kolonien auf den Platten haben sich vermehrt und vergrößert; oft ist jetzt die erste Gelatineplatte vollständig verflüssigt.

Auch in den Stich- und Strichkulturen hat das Wachstum zugenommen, bei manchen Stichen ist Bildung von Ausläufern etc. dazugetreten. Man färbt sie ebenfalls nach Gram und trägt das Resultat in die Tabelle (S. 16) ein.

Die Platten und die Reagenzglaskulturen werden in die Brutschränke zurückgestellt.

II. Übung: Milzbrand. d.

1. Auf den Agarplatten sind viele gleichartige Kolonien sichtbar: die oberflächlichen sind pelzig rauh mit unscharfem Rand, bei den tiefliegenden sind die Ausläufer stärker ausgebildet als die eigentliche Kolonie. Eventuelle vereinzelte oberflächliche runde Kolonien sind Verunreinigungen durch Luftkeime.

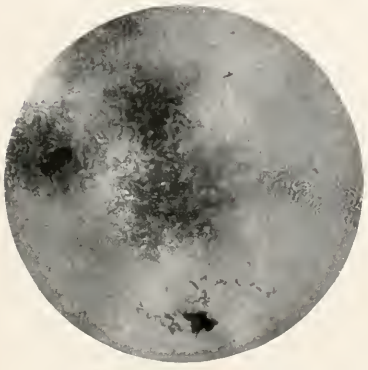


Fig. 6. Milzbrandkolonien auf der Agarplatte. 40 : 1.

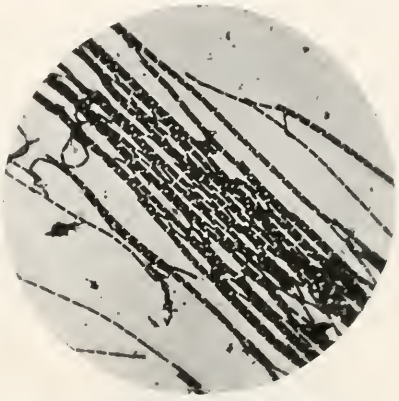


Fig. 7. Milzbrandbazillen. Ausstrich aus einer 24-stündigen Agarkultur. 800 : 1.

Bei 60-facher Vergrößerung (Fig. 6) sieht man die einzelnen Fäden, die der Kolonie ein wellig gerundetes Aussehen geben; die wellige Zeichnung ist auch im Innern zu sehen. Die Fäden liegen nicht durcheinander, sondern parallel. Vom Rande gehen zahlreiche Ausläufer aus, die aber sämtlich wieder zur Kolonie zurückkehren. Oft erscheinen die Fäden nicht homogen, sondern zeigen dunkle Punkte (Sporen). Die tiefliegenden Kolonien erscheinen dunkler und bestehen fast ganz aus wurstförmigen, zopfförmigen etc. Figuren mit zahlreichen auslaufenden Fäden.

Waren die Organe schon in beginnender Fäulnis oder wurde bei der Sektion der Darm verletzt, so findet man zahlreiche verunreinigende Keime, nur höchstens vereinzelte Milzbrandbazillen.

2. Untersuchung bei starker Vergrößerung. Im hängenden Tropfen (Bouillon oder Wasser) sind zahlreiche Fäden zu sehen, die entweder homogen sind oder zahlreiche stark lichtbrechende Punkte tragen. Diese sind entweder klein (Vorstadien von Sporen) oder

nehmen die ganze Breite des Fadens ein (reife Sporen). Manchmal sind sie auch aus diesem schon herausgefallen. Eigenbewegung der Fäden fehlt; die Sporen können lebhafte Molekularbewegung zeigen.

Färbung von Ausstrichpräparaten mit Fuchsin. Eine Spur einer Kolonie wird mit etwas Wasser nicht zu stark auf dem Deckglas verrieben und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt (Fig. 7). Die Bazillen erscheinen zu langen Ketten angeordnet; sie sind entweder gleichmäßig gefärbt oder es sind ungefärbte Lücken vorhanden (Sporen).

Färbung nach Gram. Das in gleicher Weise angefertigte Ausstrichpräparat zeigt ein analoges Bild.

Anfertigung eines Klatschpräparates. Ein gereinigtes Deckglas wird einmal durch die Flamme gezogen und auf die Platte gelegt, sodaß eine Oberflächenkolonie in der Mitte liegt. Ganz leichtes Andrücken mit der Pinzette. Nach 1 Minute wird es wieder mit der Pinzette aufgehoben, während man es auf der anderen Seite mit einer Nadel stützt, damit es sich nicht verschiebt. Nun klebt die Kolonie am Deckglas. Man läßt sie lange antrocknen ($^1/_2$ Stunde), fixiert in der Flamme und färbt vorsichtig, da sie leicht vom Deckglas abgeschwemmt wird. Betrachten bei schwacher und starker Vergrößerung. Die Bazillen sind in der Lage erhalten, die sie in der Kolonie hatten. Ganz tadellose Klatschpräparate von Milzbrandbazillen erhält man nur, wenn der Agar sehr trocken war.

3. Betrachtung der Kultur im hängenden Tropfen. Zunächst überzeuge man sich, ob die Vaseline noch abschließt und der Tropfen nicht eingetrocknet ist. Bei schwacher Vergrößerung Aussehen wie eine tiefliegende Plattenkolonie. Bei starker Vergrößerung sieht man zwischen vereinzelten degenerierten Blutkörperchen Fäden mit meist sehr schöner Sporenbildung. Manchmal sind auch zahlreiche kurze Stäbchen oder Kokken sichtbar, die zufällig hineingekommen sind und die Kultur verunreinigt haben.

4. Gelatineplatten. Mit dem bloßen Auge ist fast nichts zu sehen. — Man nimmt Platte I und stellt Organstückchen u. ä. ein, an deren Rand man Fäden findet. Geht man weiter nach der Seite, so findet man kleine Kolonien, die aus Konvoluten von Fäden bestehen.

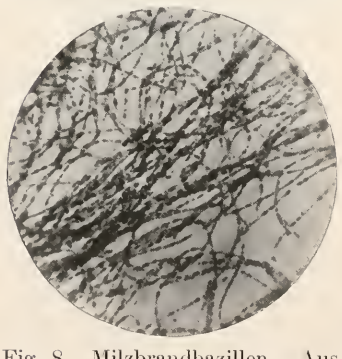


Fig. 8. Milzbrandbazillen. Ausstrich einer 24-stündigen Agarkultur. Sporenfärbung 800 : 1.

5. Sporenfärbung. Wurden im hängenden Tropfen viele große Sporen gesehen, so macht man die Sporenfärbung; andernfalls impft man auf die seit gestern im Brutschrank gestandene Agarplatte, da auf diesem unterdessen trockener gewordenen Nährboden stets gute Sporenbildung stattfindet, und färbt nach 24 Stunden, nicht später, da sonst die meisten Sporen schon aus den Fäden herausgefallen sind. — Wie sich vorhin gezeigt hat, färben sich die Sporen nicht mit den gewöhnlichen Farbstoffen. Sie nehmen Farbstoffe schwerer an als andere Bakterien, geben sie aber auch schwerer ab. Man färbt sie mit Anilinwasserfuchsin (Herstellung analog wie Anilinwassermethylviolett), indem man damit ein Porzellanschälchen füllt, das Präparat, das man hierbei

zum Fixieren 10—15mal durch die Flamme ziehen muß, hineinbringt, auf einem Drahtnetz zum Kochen erhitzt, die Flamme für 1 Minute wegnimmt und dies dreimal wiederholt. Entfärbung mit 1 % Salzsäurealkohol ganz kurz, dann mit 60 % Alkohol ½ Minute; nachfärben wie oben. Die Sporen erscheinen bei beiden Methoden rot in den blauen Fäden (Fig. 8).

Anlegen von Kulturen aus den oberflächlichen Plattenkolonien: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Einimpfen in Bouillon, Ausstreichen auf Kartoffel (1 oberflächlicher Strich). Die Gelatinekultur wird bei 23°, die übrigen bei 37° aufbewahrt.

Die in Formalin fixierten Organe werden 24 Stunden in fließendem oder oft gewechseltem Wasser ausgewaschen: damit die Lunge nicht davonschwimmt, bindet man sämtliche Organe in Gaze ein.

Die Heubazillen sind auf den Gelatineplatten ähnlich wie die Milzbrandbazillen unter starker Verflüssigung gewachsen, doch sind die Ausläufer unregelmäßiger. Dasselbe tritt auf der Agarplatte noch mehr hervor, indem die Fäden am Rande statt der gleichmäßigen Lagerung ein unregelmäßiges Gewirre bilden. Anlegen von Kulturen wie bei Milzbrand.

III. Übung: Methoden zur Differentialdiagnose zwischen zwei nahe verwandten Bakterienarten: Typhus und Coli. a.

Steht von einer Sektion ein Stück Typhusmilz zur Verfügung, so wird sie im gefärbten Deckglaspräparat und im hängenden Tropfen untersucht. Man findet darin mittelgroße Stäbchen, einzeln oder zu zweien, nach Gram unfärbbar. Außerdem findet man, wenn die Milz nach dem Tode längere Zeit gelegen hat, verunreinigende Bakterien, Kokken, große Stäbchen etc. darin. Dann gießt man 3 oder 4 Gelatineplatten mit einigen Ösen davon. — Steht keine Typhusmilz zur Verfügung (Typhusstuhl ist hier nicht brauchbar), so gießt man die Gelatineplatten aus einer Reinkultur. Man nimmt davon mit der Öse nur ganz wenig ab: an der Öse darf kaum etwas zu sehen sein. — Ferner werden aus normalem Stuhl Gelatineplatten gegossen (3 Ösen Stuhl in das erste Röhrchen). Auch der Stuhl wird vorher im gefärbten Ausstrichpräparate untersucht; er besteht zum großen Teil aus Bakterien, meist Stäbchen.

6. Tag.

II. Übung: Milzbrand. e.

Die Kolonien auf den Agarplatten sind größer (man verwechsle nicht damit Verunreinigungen, die vielleicht beim Anfertigen des Klatschpräparats darauf gekommen sind); bei schwacher Vergrößerung Aussehen wie gestern.

Auf den Gelatineplatten (nicht schräg halten!) sind sehr viele graue Kolonien zu sehen, die verflüssigt haben. Unter dem Mikroskop sieht man, daß sie aus vielen durcheinander liegenden Fäden bestehen, die, soweit sie nicht in die Verflüssigungszone einbezogen sind, ähnlich regelmäßig wachsen wie auf Agar.

Der Gelatinestich zeigt an der Oberfläche Verflüssigung; der Belag ist in das dadurch entstandene Loch eingesunken. Der Stichkanal ist noch ziemlich schwach entwickelt und zeigt kleine Höcker.

Der Agarstich zeigt einen grauen pelzigen Belag mit unscharfen Rändern; der Stichkanal kleine Höcker und Perlen.

Der Agarstrich hat das Aussehen des Belages des Stiches.

Die Bouillonkultur hat das Aussehen von in Flüssigkeit schwimmender Watte; meistens liegen die Bazillen auf dem Boden, und es wachsen einige Fäden in die Höhe; niemals ist Häutchenbildung zu bemerken. Auf der Kartoffel hat sich an der Stelle, über die der Strich geführt ist, ein matter Belag entwickelt.

Untersuchung der Schrägagar-, Bouillon- und Kartoffelkultur im hängenden Tropfen oder gefärbten Deckglaspräparat.

Sporenfärbung, wenn nicht schon gestern vorgenommen (vorher im hängenden Tropfen auf Sporen untersuchen).

Die Schrägagarkultur wird in die Sammlung aufgenommen; damit sie sich besser konserviert, wird sie zugeschmolzen. Man schneidet den Wattepfropfen kurz ab, brennt ihn oben ab, schiebt ihn etwas in das Röhrchen und übergießt ihn mit verflüssigtem Paraffin, das der Erstarrungstemperatur nahe ist oder Siegellack. Die Kulturen halten sich zugeschmolzen sehr lange; doch darf man alte Kulturen nicht direkt abimpfen, sondern muß sie erst mit Bouillon übergießen und 24 Stunden in den Brutschrank stellen.

Die in Wasser ausgewaschenen Organe kommen in 60% Alkohol.

III. Übung: Typhus und Coli. b.

Auf der ersten Typhusgelatineplatte sind sehr zahlreiche kleine graue Punkte zu sehen. Bei 60-facher Vergrößerung erscheinen die oberflächlichen Kolonien zart, durchsichtig mit gewelltem glatten Rande; aus der Mitte ziehen Linien gegen den Rand zu (Weinblattzeichnung, Fig. 9). Die tiefliegenden Kolonien sind etwas gelblich, rund, im Innern grob granuliert. Öfters kommt es vor, daß die Kolonien sehr zahlreiche Ausläufer zeigen, oder daß sie ganz aus derartigen Schwänzchen bestehen. Die Ursache ist entweder, daß die Platten bei zu hoher Temperatur aufbewahrt wurden, oder daß die Gelatine zu stark alkalisch war. Die Übung ist dann zu wiederholen.

Man sucht die Platte aus, von der man am leichtesten isolierte Kolonien abimpfen kann, und untersucht eine davon im hängenden Tropfen resp. im gefärbten Deckglaspräparat (mit einem Tropfen Wasser) oder, wenn die Kolonien zu klein sind, im gefärbten Klatschpräparate. Man sieht: Stäbchen und Fäden in lebhafter Eigenbewegung; auch im gefärbten Präparate erscheinen die Fäden (im Gegensatze zu den Milzbrandbazillen) nicht als Ketten. Das gefärbte Präparat ist aufzubewahren. Ferner impft man einige Oberflächenkolonien unter Benutzung des Mikroskops auf schrägen Agar.

Dann sucht man auf den aus dem Stuhl gegossenen Platten Kolonien, die den Typhuskolonien sehr ähnlich sehen (eventuell etwas größer sind) und impft einige davon nach mikroskopischer Untersuchung auf schrägen Agar. Aufbewahrung im Brutschrank.

Anfertigung von Schnittpräparaten aus einer Typhusmilz. Die Typhusbazillen bilden in der Milz (auch Leber, Niere) kleine Häufchen;

damit diese deutlicher sichtbar werden, wird ein Stück des Organes in sublimatgetränkte Tücher eingeschlagen und 24 Stunden bei Zimmertemperatur liegen gelassen (Anreicherung), dann Stücke davon fixiert und eingebettet. Für das Folgende müssen derartige Blöcke schon vorhanden sein.

Das Schneiden soll mit dem Mikrotom geschehen. Mit dem Rasiermesser Schnitte anzufertigen, die dünn und dabei groß genug sind, ist sehr schwierig; doch kann es im Notfalle ebenfalls versucht werden. Die Blöcke werden mit verflüssigtem Paraffin auf einen Holzblock aufgeklebt und fest in der Klammer des Mikrotoms fixiert. Die Schnittdicke soll etwa 15 μ betragen. Splittert das Paraffin, so ist es vor jedem Schnitt anzuhauchen; auch kann man das Messer erst einige Zeit in den Brutschrank legen; außerdem sind die Schnitte während des Schneidens mit einem Pinsel zu stützen, damit sie sich nicht zu stark

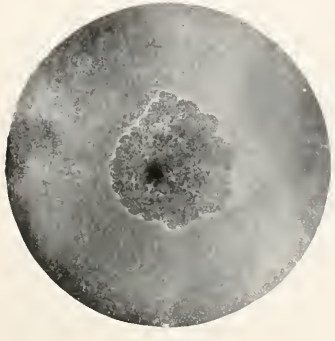


Fig. 9. Typhuskolonie auf Gelatine. 40 : 1.

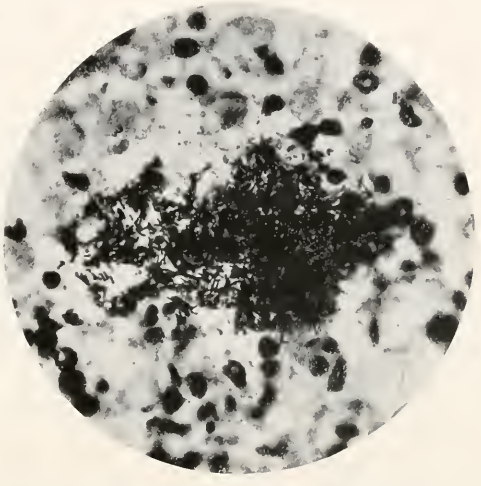


Fig. 10. Häufchen von Typhusbazillen in der Milz. Schnittpräparat 800 : 1.

rollen. Dann werden sie in Xylol übertragen. Zerfasern sie sich darin, so klebt man sie lieber auf Deckgläser durch Kapillarattraktion auf, indem man sie auf warmes Wasser (etwa 40°) legt, wo sie sich glätten, dann mit einem Deckglas von unten aufhebt und auf Filtrierpapier für mindestens 4 Stunden (besser über Nacht) in den Brutschrank legt. Die weitere Behandlung geschieht wie bei den anderen Schnitten (Xylol, abs. Alkohol etc).

Mehrere Schnitte werden mit der Platinnadel (nicht Öse) vom Xylol in absoluten Alkohol (2 Min.), 96 und 60 % Alkohol gebracht und dann 15—30 Minuten in unverdünntes Karbolfuchsin (vorher filtrieren) gelegt; hierauf in Wasser abgespült und in 96 % Alkohol, dem auf 10 Teile ein Teil 2 % Essigsäure zugesetzt sind, so lange differenziert, bis sie einen weinroten Farbton angenommen haben. Der Anfänger wird am besten nach verschieden langer Zeit je einen Schnitt herausnehmen. Dann kommen sie in 96 % Alkohol 1 Min., absoluten Alkohol 1 Min., Xylol 2 Min. Um sie aus diesem herauszunehmen, schiebt man ein Stückchen glattes Klosettpapier darunter, legt sie darauf glatt, überträgt sie

Agar- und Gelatinekulturen zum Färben erst im Wasser verreiben!

auf den Objektträger, drückt leicht an und hebt das Papier ab. Bedecken mit Kanadabalsam oder Zedernöl und Deckglas.

Man sieht: bei schwacher Vergrößerung zwischen den stark gefärbten Zellkerzen einzelne rote Flecken, größer als jene, aber nicht so scharf, sondern mehr verwaschen gefärbt. Diese stellt man bei starker Vergrößerung ein (die Blende weit öffnen). Sie bestehen aus Typhusbazillen, die besonders am Rande des Häufchens stark hervortreten (Fig. 10).

Der häufigste Fehler, der gemacht wird, ist der, daß die Schnitte zu stark entfärbt werden. In einem guten Präparate ist das Protoplasma fast farblos, die Zellkerne sind intensiv gefärbt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Geflügelcholerabazillen angelegt.

7. Tag.

Vakat.

8. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. e.

Auf den Platten sind kaum mehr neue Kolonien aufgetreten. Dagegen sieht man in der Tiefe ähnlich gestaltete Gebilde, die bei 60-facher Vergrößerung vieleckig, sargdeckelförmig, sternförmig oder baumförmig verästelt aussehen. Es sind dies Kristalle, die sich beim Trockenwerden des Agars ausgeschieden haben. Sie lösen sich, wenn man eine Öse voll Salzsäure dazufügt. — Man betrachte sich die Kristalle genau, damit man sie nicht späterhin mit tiefliegenden Kolonien verwechselt.

Die Platten können dann beseitigt werden, ebenso die anderen Kulturen, nachdem man sie nochmals betrachtet hat. Man legt sie zu diesem Zweck in einen emaillierten Topf, bringt, wenn er zu dreiviertel voll ist, ebensohoch Wasser dazu (Vorsicht! Nichts verspritzen!) und kocht ihn aus.

II. Milzbrand. f.

Die Organe kommen in 96 % Alkohol.

III. Ubung: Typhus und Coli. c.

1. Die Kolonien auf den Gelatineplatten haben sich vergrößert: die Colikolonien sind deutlich größer als die Typhuskolonien. Die Zeichnung im Innern der Oberflächenkolonien ist vielfach verschwunden. — Von den Oberflächenkolonien werden Klatschpräparate angefertigt und gefärbt. Man sieht im Zentrum S- und schlingenförmige Zeichnungen; der Rand wird aus langen Stäbchen und Fäden gebildet (Fig. 11), die zum Zentrum zurückkehren, wodurch die Kolonie einen lappigen Bau hat.

2. Auf den Agarstrichen hat sich ein hellgrauer, durchsichtiger Belag gebildet, der bei Coli etwas dicker als bei Typhus ist. — Im hängenden Tropfen sieht man kleine Stäbchen mit lebhafter Eigenbewegung. Im gefärbten Deckglaspräparate (verdünntes Karbolfuchsin) erscheinen sie etwas kleiner als die auf Gelatine gewachsenen (Fig. 12). Bei der Färbung nach Gram und Nachfärbung mit Safranin oder Fuchsin nehmen sie die rote Farbe an, sind also nach Gram unfärbbar.

3. Man gießt aus einer Typhus- und einer Colikultur je 3 Agarplatten (ganz wenig Material nehmen); ferner legt man aus je einer Typhus- und je drei Colikulturen folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Gelatinestrich, Kartoffel und Milch. Außerdem fertigt man Schüttelkulturen in Zuckeragar an, indem man in die

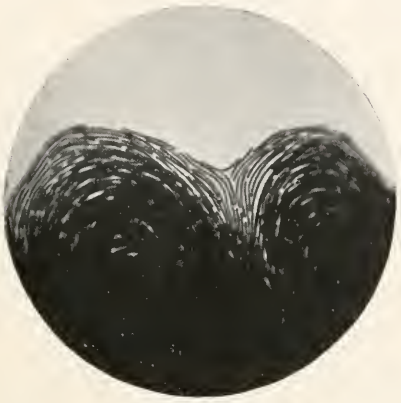


Fig. 11. Typhuskolonie auf Gelatine. Klatschpräparat. 800:1.

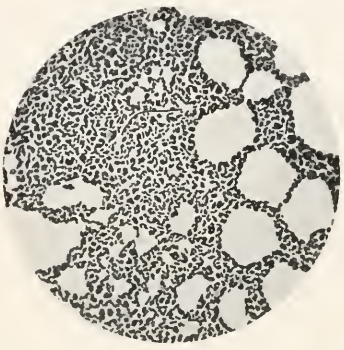


Fig. 12. Typhusbazillen aus einer Agarkolonie. 800:1.

verflüssigten und wieder abgekühlten Röhrchen eine Öse Kultur einbringt, dann aber nicht ausgießt, sondern den Nährboden im Reagenzglase erstarren läßt. Gleichzeitig verflüssigt man weitere vier Röhrchen mit Zuckeragar, bringt in jedes einen Tropfen Neutralrot (konz. wäss. Lösung), kocht noch kurze Zeit, läßt abkühlen und verfährt ebenso. — Außerdem impft man von der Typhuskultur und den drei Colikulturen in je zwei Bouillonröhrchen. — Sämtliche Kulturen außer den Gelatinekulturen kommen in den Brutschrank.

IV. Übung: Untersuchung einiger anderer pathogener Mikroorganismen: Geflügelcholera- und Schweinerotlaufbazillen. a.

Mit einer Öse der Geflügelcholerakultur wird eine Maus subkutan oder eine Taube in den Brustmuskel (nach Abrupfen der Federn an der betreffenden Stelle) geimpft.

Ferner ist eine Schrägagarkultur von Schweinerotlaufbazillen anzulegen. Außerdem sucht man für den 11. Tag ein Stück eines an Schweinerotlauf eingegangen Tieres aus dem Schlachthof zu erhalten. (IV d S. 33).

9. Tag.

II. Übung: Milzbrand. g.

Die Organe kommen in absoluten Alkohol.

III. Übung: Typhus und Coli. d.

Die Kolonien auf den Gelatineplatten haben sich nicht wesentlich verändert; die Platten können beseitigt werden.

Auf den Agarplatten sind oberflächlich breite, graue, in der Tiefe wetzsteinförmige Kolonien gewachsen; die Colikolonien sind wenig üppiger als die Typhuskolonien. Bei 60-facher Vergrößerung bietet das Wachstum im Gegensatz zu den Gelatineplatten nichts Charakteristisches. In einem gefärbten Klatschpräparat sieht man, daß die Bazillen regellos durcheinanderliegen. Im hängenden Tropfen zeigen sie lebhafte Eigenbewegung. — Die Bouillonkulturen sind gleichmäßig getrübt. — Der Gelatinestich und der Gelatinestrich zeigen einen irisierenden Belag; der Nährboden ist nicht verflüssigt. Im Stichkanal ist das Wachstum gering und nimmt nach unten ab. — Der Agarstich zeigt nichts Charakteristisches; er hat einen Belag und einen Stichkanal mit Höckern, in gleicher Weise, wie man dies bei vielen anderen Bakterienarten sieht.

Die Milch hat der Typhusbazillus unverändert gelassen (höchstens hat sich spontan oben eine Rahmschicht gebildet), der Colibazillus hat sie zum Gerinnen gebracht. — Auf der Kartoffelkultur von B. coli wächst längs des Impfstriches ein gelbbrauner Belag: auf der von B. typhi scheint beim ersten Anblick kein Wachstum erfolgt zu sein, Impft man jedoch mit einer Nadel ganz oberflächlich von dem Impfstrich oder seiner Umgebung ab, so bemerkt man, daß auch hier ein fast unsichtbares Wachstum stattgefunden hat. Im gefärbten Deckglaspräparate von der Kartoffelkultur zeigen die Typhusbazillen oft ungefärbte Stellen, die aber nicht mit Sporen identisch, sondern durch Plasmolyse entstanden sind, d. h. das Protoplasma hat sich nach den Rändern zurückgezogen, so daß diese allein den Farbstoff annehmen.

Im Zuckerager hat der Typhusbazillus nur eine Trübung hervorgerufen, der Colibazillus hat große Gasblasen gebildet, die den Agar zerrissen haben; letzterer hat ferner in dem Neutralrotagar den Farbstoff zersetzt (reduziert), so daß die Kultur im auffallenden Lichte grün, im durchfallenden hellrot aussieht. — Sollte diese Farbe nicht deutlich hervortreten, wartet man noch einen Tag, verflüssigt dann den Agar durch Kochen und fügt etwas Alkali dazu. Unzersetztes Neutralrot wird dann orange, zersetztes grün fluoreszierend.

Hat man Typhusserum oder kann man Blut von einem Typhuskranken oder -rekonvaleszenten erhalten, so legt man je eine Schrägagarkultur von Typhus und Coli an und entnimmt im letzteren Falle dem Patienten durch Einstich in das Ohrläppchen etwas Blut, das man in einem schmalen, sterilen Gläschen zum Gerinnen bringt.

Beim Mikroskopieren auf gutes Licht achten!

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. b.

Die mit Geflügelcholerabazillen geimpfte Maus oder Taube ist eingegangen; man geht bei der Sektion und der weiteren Untersuchung vor wie bei der Milzbrandmaus. Von den Deckglasausstrichen wird einer in der bisher geübten Weise nach dem Trockenwerden in der Flamme fixiert und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt: einige andere werden nach dem Trockenwerden mit Ätheralkohol (Äther und absoluter Alkohol zu gleichen Teilen) übergossen und damit 5 Minuten stehen gelassen, getrocknet und kurz gefärbt. Man sieht: in dem in der Flamme fixierten Präparate viele sehr kleine Stäbchen, oft zu zweien zusammen; in dem mit Ätheralkohol fixierten Präparaten sind sie nur an den beiden Enden gefärbt (bipolar). (Fig. 13). Hierdurch haben sie Ähnlichkeit mit dem (etwas größeren) Pestbazillus, mit dem der Bazillus der Geflügelcholera nahe verwandt ist. Die Blutkörperchen der Vögel sind kernhaltig.

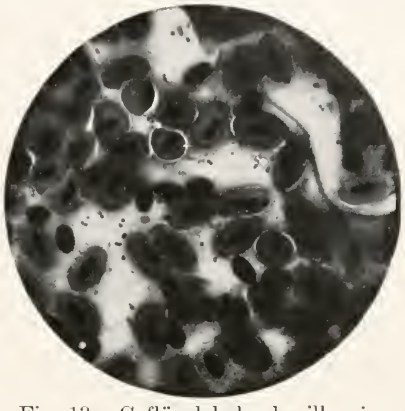


Fig. 13. Geflügelcholerabazillen im Blute einer Taube. 800 : 1.

Bei der Färbung nach Gram und Nachfärbung mit Safranin nehmen die Bazillen die letztere Farbe an, sind also nach Gram unfärbbar.

Aus dem Herzblut oder den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen: ein Teil der Organe wird in 10 % Formalinlösung eingelegt.

Mit einer Öse der gestern angelegten Schweinerotlaufkultur wird eine Maus subkutan infiziert.

10. Tag.

II. Übung: Milzbrand. h.

Die Milzbrandorgane werden in Paraffin oder Celloidin [1]) eingebettet, steht kein Mikrotom zur Verfügung, so fällt dieser Teil der Übung aus. Das Einbetten geschieht in folgender Weise: Die Organe bis zur Größe

1) Celloidineinbettung ist für bakteriologische Zwecke weniger zu empfehlen: das Anfertigen dünner Schnitte ist schwerer und manche Farbstoffe färben das Celloidin mit. — Man schneidet das Celloidin in kleine Würfel und macht sich 2 Lösungen in Äther-Alkohol (Äther + abs. Alkohol zu gleichen Teilen): die eine von der Konsistenz eines dicken Syrups, die andere, indem man erstere auf die Hälfte verdünnt. — Die Organe kommen vom abs. Alkohol auf 24 Stunden in Ätheralkohol, ebensolange in die dünne und einige Tage in die dicke Celloidinlösung. Dann werden sie auf einen Kork gesetzt, Celloidin darüber gegossen und langsam (einige Stunden) unter einer Glasglocke trocknen gelassen. Aufbewahrung in 80 % Alkohol. Empfehlenswert ist, sie einige Tage in einer Mischung von 80 % Alkohol 1 Teil, Glyzerin 6 Teile zu härten. — Beim Schneiden muß das Messer in einem möglichst spitzen Winkel stehen und stark mit 80 % Alkohol angefeuchtet werden.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY

einer Mäuseleber kommen für 2 Stunden in das „1. Xylol“ (100 ccm), dann für 2 Stunden in das „2. Xylol“ (100 ccm); das Xylol kann lange Zeit benutzt werden. Unterdessen stellt man das Paraffinschränkchen auf 53—55° ein, was ohne besondere Vorrichtung leicht zu erreichen ist, wenn die Temperatur des Zimmers nicht zu stark schwankt, und bringt 2 Schälchen mit Paraffin hinein, das aus hartem und weichem Paraffin (von 48 resp. 58° Schmelzpunkt) je nach der Jahreszeit im Verhältnis von 2 : 1 bis 1 : 1 gemischt wird. In jedem bleiben die Organe 2 Stunden. Dann bestreicht man ein nicht zu flaches Uhrschälchen sehr dünn mit Glyzerin, legt die Organe hinein, übergießt sie mit Paraffin und läßt sie zur schnellen Abkühlung auf kaltem Wasser schwimmen, bis die Oberfläche erstarrt ist, worauf man sie untertaucht. Nach 2 Stunden nimmt man sie heraus und kann durch Fingerdruck leicht den Block aus dem Uhrschälchen entfernen.

III. Übung: Typhus und Coli. e.

Die Besichtigung der am 8. Tage angelegten Typhus- und Colikulturen ergibt eine Vergrößerung der meisten, sonst keine wesentliche Veränderung. Die Hälfte der 8 am 8. Tage angelegten Bouillonkulturen wird auf Indolbildung untersucht: Coli bildet Indol, Typhus nicht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß sich aus Indol und salpetriger Säure ein roter Farbstoff bildet. Man macht sich eine ganz schwache Nitritlösung, d. h. 0,5 Natriumnitrit in 1000 Wasser (nimmt man zu viel Nitrit, so entsteht ein braungelber Farbstoff, der durch die Eigenfarbe der Bouillon verdeckt wird), und bringt davon einige Tropfen, sowie 1 ccm 25% Schwefelsäure in jede Bouillonkultur. Tritt dann noch keine Rotfärbung auf, so kocht man die Flüssigkeit (nur dünnwandige Reagenzgläser dürfen über der Flamme erhitzt werden) und beobachtet dann bis nach dem Erkalten. Ist sie auch dann noch nicht vorhanden, so macht man die Probe 5 Tage später mit den übrigen Kulturen.

Ist Typhusserum vorhanden, oder hat man Blut von einem Typhuskranken oder -rekonvaleszenten erhalten, so macht man die Agglutinationsprobe; andernfalls wird sie erst am 48. Tage der Übungen mit selbst hergestelltem Serum vorgenommen. — Man fertigt sich Verdünnungen des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000 und 1 : 2000 an, und zwar, wenn viel Serum zur Verfügung steht, mit der Pipette, wenn wenig, indem man das Serum mit einer abgewogenen Öse in die Kochsalzlösung bringt. Die Öse wird auf Bruchteile von Milligrammen genau gewogen und dann mit Wasser gefüllt, indem man das Gefäß schräg hält, die Öse eintaucht und sie in der Weise heraushebt, daß sie dabei wagerecht steht. Dadurch werden stets gleichgroße Tropfen erhalten. Nun wiegt man sie nochmals; die Gewichtszunahme soll etwa 2 mg betragen; beträgt sie mehr als 2,5 mg, so muß die Öse verkleinert und nochmals gewogen werden. — Die Verdünnung geschieht in Reagenzgläsern; man macht sie, wenn der Inhalt der Öse z. B. 2,0 mg wiegt, indem man 10 Ösen Serum in 1,0, 5 Ösen in 1,0, 1 Öse in 1,0 ccm etc. physiologische Kochsalzlösung bringt; jede Verdünnung wird zweimal gemacht. Dann verreibt man Typhus- resp. Colikultur von der Agaroberfläche hinein; soviel Ösen voll, als

man Kubikzentimeter der Serumverdünnung genommen hat; jede Öse soll dick voll Kultur sein, doch darf von dem Nährboden nichts mitgenommen werden. Außerdem verreibt man die Kulturen in je 1 ccm Kochsalzlösung ohne Serum (zur Kontrolle). Die Flüssigkeit muß gleichmäßig getrübt sein; nur bei sehr starkem Serum gelingt eine gleichmäßige Verreibung nicht, da dann sofort starke Agglutination eintritt. (Umgekehrt kommt es auch vor, daß ein hochwertiges Serum bei schwacher Verdünnung nicht agglutiniert.) Von jeder Aufschwemmung wird ein hängender Tropfen angelegt (im ganzen 12). — Man sieht nun mit dem bloßen Auge oder mit der Lupe, wenn man die Reagenzgläser gegen das Fensterkreuz hält, daß sofort oder nach einigen Minuten sehr kleine Flöckchen auftreten, die sich vergrößern und schließlich zu Boden sinken, so daß die überstehende Flüssigkeit klar ist. Die Röhrchen mit Coli dagegen und eventuell auch die mit den stärksten Verdünnungen des Typhusserums bleiben gleichmäßig getrübt (falls man gut verrieben und nichts von dem Nährboden mit hereingebracht hat). Besonders bei leichtem Umschütteln ist der Unterschied deutlich. Unter dem Mikroskop sieht man, wie einzelne Bazillen sich zu kleinen Häufchen zusammenballen; andere, die vorbeischwimmen wollen, bleiben daran hängen und suchen sich zunächst noch loszureißen; die Haufen vergrößern sich immer mehr, bis schließlich einzelne Bazillen nur noch spärlich vorhanden sind. Bei stärkeren Verdünnungen desselben Serums sieht man nur kleine Häufchen; die meisten Bazillen sind frei. — Die Colibazillen dagegen werden von dem Typhusserum nicht agglutiniert. Hierauf wischt man den Zedernöltropfen vom Deckglas und betrachtet das Präparat bei schwacher Vergrößerung. Man sieht da, wo keine Agglutination vorhanden ist, den Tropfen fein granuliert (Einstellung zunächst nur auf den Rand des Tropfens); die agglutinierten Häufchen erscheinen als kleinere oder größere braungelbe Brocken. Auf diese Agglutination bei schwacher Vergrößerung ist besonders großer Wert zu legen. Statt im Reagenzglase kann man die Agglutination auch in Blockschälchen vornehmen und das Bild bei schwacher Vergrößerung betrachten.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. c.

Auf den Agarplatten haben sich zahlreiche kleine Kolonien entwickelt; die oberflächlichen sind rund und graugelb, gegen das Licht gehalten bläulich opalisierend; die tiefliegenden gelbgrau, wetzsteinförmig oder rund. Große Kolonien sind durch Kondenswassertropfen entstanden oder Verunreinigungen. — Bei 60-facher Vergrößerung sind die oberflächlichen gelblich, durchscheinend und fein granuliert. Auf den Gelatineplatten sind die Kolonien mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen; unter dem Mikroskop sind sie ähnlich den Agarkolonien, aber scharfrandig.

Anfertigung eines hängenden Tropfens aus einer Agarkolonie. Die Bazillen sind sehr klein und unbeweglich. Anfertigung eines gefärbten Klatschpräparats. Die Bazillen erscheinen wie in den Organen; bipolare Färbung ist sehr selten zu sehen. Sporen werden nicht gebildet. Anlegen folgender Kulturen: Gelatinestich, Gelatinestrich, Agarstich, Agarstrich, Bouillonkultur, Schüttelkultur in Zuckeragar.

Auswaschen der in Formalin fixierten Organe in fließendem Wasser. Die mit Schweinerotlauf infizierte Maus ist krank; ihre Augen sind verklebt.

11. Tag.

II. Übung: Milzbrand. i.

Die Organe werden in der früher beschriebenen Weise geschnitten, die Schnitte aufgeklebt oder unaufgeklebt weiter behandelt. Die Färbung geschieht teils wieder mit Karbolfuchsin, teils nach Gram. Im letzteren Falle kommen die Schnitte von 60% Alkohol in Wasser, dann in Anilinviolett 3 Min., Wasser, Jodlösung 1 Min., 96% Alkohol, bis keine Farbwolken mehr abgehen, absoluten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Zum Zwecke der Gegenfärbung wird nicht nach-, sondern vorgefärbt. Man bringt sie vom Wasser in Lithionkarmin 5—8 Min., dann ohne Zwischenspülung mit Wasser sofort in 1% Salzsäurealkohol (60% Alkohol mit 1% Salzsäure) 5 Min., Leitungswasser (mehrmals wechseln) und färbt dann wie oben angegeben nach Gram. Man sieht (Fig. 14) nur in den Gefäßen sehr zahlreiche Milzbrandbazillen liegen. Anatomische Veränderungen sind nicht vorhanden, speziell keine Milzbrandpneumonie. — In den nur nach Gram gefärbten Präparaten sind die Bazillen dunkelviolett, das Gewebe ungefärbt; in denen mit Gegenfärbung die Bazillen dunkelviolett, die Kerne rot, das Protoplasma höchstens schwach rosa.

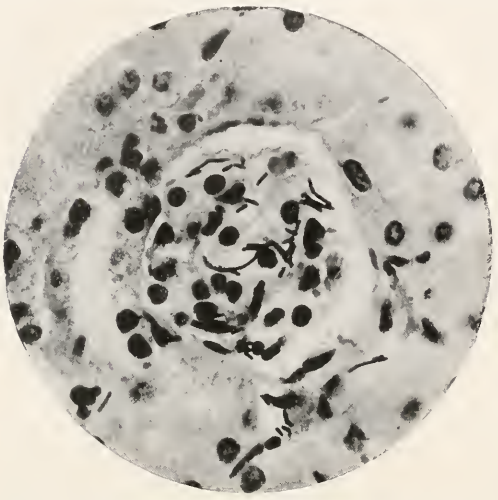


Fig. 14. Milzbrandbazillen in einem Glomerulus. Schnittpräparat. 800 : 1.

In schlecht entfärbten Grampräparaten sieht man außerdem dunkelviolette Farbstoffkristalle.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. d.

Geflügelcholera; Die Kolonien auf den Platten sind wenig vergrößert; ebenso die in den Agarstich- und Strichkulturen. In den Gelatinekulturen ist das Wachstum sehr gering geblieben, etwas besser ist es in der Bouillonkultur. In Zuckeragar wurde kein Gas gebildet.

Die Kulturen können sämtlich beseitigt werden; vorher legt man noch eine Agarstich- und Agarstrichkultur an, die man am nächsten Tage zuschmilzt und der Sammlung einverleibt.

Schweinerotlauf: Die vorgestern infizierte Maus ist eingegangen und wird in derselben Weise wie die früheren obduziert, oder es wird das Organstück vom Schwein in der gleichen Weise untersucht. Anatomischer Befund der Maus: Vergrößerung der Milz. Man fertigt Deckglaspräparate an und fixiert und färbt mit verdünntem Karbolfuchsin.

Man sieht ziemlich viele sehr kleine und besonders sehr dünne Stäbchen, so lang, aber bedeutend schlanker als die Geflügelcholerabazillen. Sie liegen einzeln oder zu zweien; außerdem finden sie sich in großen Haufen in den Leukocyten (Phagocytose) (Fig. 15). Vorbedingung für letzteres Bild ist, daß die Zellen nicht zu sehr beim Ausstreichen geschädigt wurden. Anfertigung eines Grampräparates mit Safraningegenfärbung: die Bazillen erscheinen dunkelviolett.

Aus den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen, man sorgt dafür, daß auch ein kleines Organstückchen mit auf die Platte kommt; der Rest wird in 10% Formalin eingelegt.

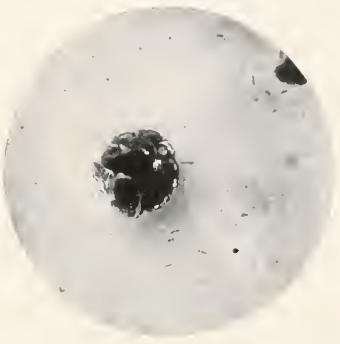


Fig. 15. Schweinerotlaufbazillen. Ausstrich aus dem Blute einer Maus. In der Mitte ein damit vollgestopfter Leukocyt. 800 : 1.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. a.

Um die häufigsten vorkommenden Verunreinigungen kennen zu lernen, legt man Luft- und Erdplatten an. Man gießt 3 Agar- und 3 Gelatineröhrchen in Petrischalen aus und läßt sie erstarren. Dann nimmt man den Deckel ab und läßt je eine an einem Ort mit reiner Luft, je eine andere an einem Ort mit staubiger (z. B. Stall der Versuchstiere) etwa eine Stunde lang offen stehen. Die beiden anderen werden mit wenig fein zerriebener Erde bestreut, und zwar ganz dünn, so daß die Partikelchen einen Abstand von mindestens 1 cm haben. Ferner schneidet man eine Kartoffel in Scheiben (vorheriges Sterilisieren nicht nötig) und bestreut sie mit etwas Heustaub. Dann legt man sie in einen Suppenteller, bringt auf den Boden vorher etwas mit Sublimatlösung befeuchtetes Filtrierpapier, damit sie nicht austrocknen, und deckt mit einem anderen Teller zu. Die Agarplatten und ein Teil der Kartoffelscheiben werden im Brutschrank, die Gelatineplatten und der andere Teil bei 23° aufbewahrt.

12. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. e.

Die gestern angelegten Kulturen von Geflügelcholera werden eingeschmolzen und bei niederer Temperatur aufbewahrt.

Auf den Agarplatten von Schweinerotlauf haben sich zahlreiche kleine Kolonien entwickelt. Bei Betrachtung mit dem bloßen Auge erscheinen die oberflächlichen etwas trüber als die Geflügelcholerakolonien. Bei 60-facher Vergrößerung sind sie durchscheinend gelblich und fein granuliert. Die tiefliegenden sind uncharakteristisch: meist wetzsteinförmig und braungelb. Im hängenden Tropfen sehen die Bazillen sehr klein und unbeweglich aus; im gefärbten Deckglaspräparat sind sie klein und schlank, nach Gram sind sie färbbar.

Aus oberflächlichen Kolonien werden angelegt: Agarstich, Agarstrich, Bouillon (sämtlich in den Brutschrank), Gelatinestich.

Auf den Gelatineplatten ist mit dem bloßen Auge noch nichts zu sehen. Bei 60-facher Vergrößerung (Platte I nehmen!) sieht man besonders um das Organstückchen ganz kleine, meist drei- oder vieleckige Kolonien, oft mit feinen Ausläufern, was dem ganzen Bilde eine Ähnlichkeit mit Knochenhöhlen (Knochenkörperchen) gibt.

Die Gelatineplatten werden bei der gleichen Temperatur weiter aufbewahrt.

Die in Formalin fixierten Organe kommen für 24 Stunden in fließendes Wasser.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. b.

Auf sämtlichen Platten und Kartoffeln haben sich Kolonien entwickelt; auf den bei 23° aufbewahrten sind sie kleiner. Man untersucht nun etwa 6 Kolonien, die sich durch ihre auffallende Beschaffenheit oder durch ihre Häufigkeit auszeichnen. Dabei geht man bei jeder einzelnen in folgender Weise vor: Betrachtung mit dem bloßen Auge; bei 60-facher Vergrößerung. Untersuchung im gefärbten Deckglaspräparat; im hängenden Tropfen; Färbung nach Gram. Ausstreichen auf schrägen Agar (ist die Kolonie klein, so macht man dies zuerst, damit man eine zuverlässige Stammkultur hat); Agarplatten, Gelatineplatten gießen oder wenigstens Ausstreichen darauf, Agarstich, Gelatinestich, Bouillon, Kartoffel; ferner kann man einige der in Übung III angeführten differentialdiagnostischen Nährböden heranziehen. Man fertigt sich wie vorher eine Tabelle an. — Sorgfältig ist darauf zu achten, daß man nicht zwei nahe aneinander stehende Kolonien auf einmal abimpft. — Unter anderem suche man folgende Bakterien: Mikrokokken (unregelmäßige Wuchsverbände); Sarcinen (Teilung nach 3 Dimensionen, Wuchsverband also würfel- oder paketförmig), Kolonien meist gelb; kurze Stäbchen; Kolonien von wurzelförmigem Aussehen: mikroskopisch lange Stäbchen (Bac. mycoides); Kolonien mit Wülsten und Falten, besonders auf Kartoffeln: mikroskopisch sporentragende Stäbchen (Bac. mesentericus); Schimmelpilzkolonien, deren dicke Ausläufer sich strahlenförmig nach allen Seiten erstrecken, makroskopisch meist erst nach einigen Tagen sichtbar.

13. Tag.

(Am besten wird mit Übung VI begonnen.)

IV. Ubung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. g.

Auf den Gelatineplatten von Schweinerotlauf haben sich die Kolonien etwas vergrößert; die Gestalt ist noch ungefähr dieselbe.

Auf der Agarstichkultur ist ein Belag nur angedeutet; der Stichkanal zeigt Höcker, die Entwicklung ist in der Tiefe ebensogut wie oben. — Im Gelatinestich ist nur ein feiner Faden zu sehen. Die Agarstrichkultur zeigt einen zarten Belag; die Bouillon ist gleichmäßig getrübt.

Die Organe werden in 60% Alkohol gebracht.

Beim Mikroskopieren auf gutes Licht achten!

V. Übung: Keime in Luft und Erde. c.

Die gestern angelegten Kulturen werden genau betrachtet; bei den Schrägagarkulturen achtet man auf Geruch, auf Farbe, Glanz, Dicke des Belages (flach, erhaben; — glatt, rauh, wulstig, netzartig; — kreisrund, gezackt, mit Ausläufern, gelappt; glänzend, matt, irisierend, kreidig), auf Trübung des Kondenswassers und Häutchenbildung darauf. Dann werden die Kulturen mit der Lupe im durchfallenden Licht (gegen das Fenster zu) betrachtet: die rechte Hand, die die Lupe hält, kann man mit dem kleinen Finger an dem Reagenzglas stützen. Die Kolonien können klar, durchscheinend, getrübt, undurchsichtig etc. sein. Bei den Stichkulturen achtet man auf Belag (wie oben) und Stichkanal (siehe auch I. Übung c): bei den Gelatinekulturen besonders auf Verflüssigung. Die Bouillon kann sein: gleichmäßig getrübt, flockig getrübt, nur oben getrübt, mit einem oberflächlichen Häutchen, mit schleimigem oder bröckeligem Bodensatz, von dem aus manchmal die Bakterien an den Wänden emporwachsen. Die Milch ist unverändert oder geronnen; man sieht im hängenden Tropfen zahlreiche Bakterien zwischen den Milchkörperchen herumschwimmen. Nach längerer Zeit wird die Milch von manchen Bakterien durchsichtig gemacht, indem das Caseïn gelöst wird und das Fett sich tropfenförmig an der Oberfläche abscheidet (Peptonisierung). Der Belag auf der Kartoffel wird ähnlich charakterisiert wie der auf Agar. Die Kulturen werden weiter bei derselben Temperatur aufbewahrt wie bisher.

VI. Ubung: Nährbödenbereitung. a.

Der Ausgangspunkt für die meisten Nährböden ist das Fleischwasser. — Man übergießt 2 Kilo gehacktes Rindfleisch (auch Pferdefleisch) in einem Kochtopf mit der doppelten Menge Wasser und kocht, indem man anfangs mit einem Glasstab gleichmäßig verrührt, 2 Stunden lang. — Das käufliche Hackfleisch ist in Großstädten manchmal mit Konservierungsmitteln versetzt, die entwicklungshemmend wirken würden. Auffallend hellrote Farbe auch bei längerer Aufbewahrung ist auf Sulfit verdächtig: man übergießt eine Portion mit 25 % Schwefelsäure und achtet auf Geruch nach schwefliger Säure. — Zur Prüfung auf Borsäure kocht man etwas Fleisch mit schwacher Salzsäure und betupft mit dem Auszug Curcumapapier: Rotfärbung, die nach dem Trocknen bestehen bleibt, zeigt Borsäure an. — Derartiges Fleisch ist unbrauchbar.

Pferdefleisch gibt trübe Nährböden. — Am billigsten ist die Bouillon aus den Sterilisatoren für minderwertiges (Freibank-)Fleisch aus dem Schlachthof; doch darf kein Schweinefleisch mitsterilisiert worden sein. Man verdünnt sie mit etwa der Hälfte bis 2 Teilen Wasser.

Das erhaltene Fleischwasser wird in einen Kolben oder Kochtopf gegossen einschließlich dessen, was sich aus dem Bodensatz in einem Tuche auspressen läßt, und mit Wasser auf 2 Liter ergänzt. Dann verteilt man es, indem man in ein Kölbchen 500, in zwei je 300, in vier je 200, in drei je 100 ccm bringt und sie mit Watteverschluß versieht.

1. Bouillon: zu einem Kölbchen mit 300 ccm setzt man 1 % Pepton und ½ % Kochsalz.

2. Zuckerbouillon: 100 ccm ebenso mit 1 % Traubenzucker.

3. Gelatine: zu einem Kölbchen mit 200 ccm setzt man 1 % Pepton, ½ % Kochsalz und 10 % (im Sommer 15 %) Speisegelatine.

4. Agar: zu dem Kölbchen mit 500 ccm setzt man 1 % Pepton, ½ % Kochsalz und 2—3 % Stangenagar.

5. Glyzerinagar: 100 ccm ebenso mit 4 % Glyzerin.

6. Zuckeragar: 300 ccm wie Agar mit 2 % Traubenzucker.

7. Alkalische Gelatine: 200 ccm, einstweilen wie Gelatine.

8. Alkalischer Agar: 100 ccm wie Agar und

9. Dreiprozentiger Choleraagar: 100 ccm mit 1 % Pepton, ½ % Kochsalz und 3 % Stangenagar.

10. Peptonstammlösung: 5 Kölbchen mit je 100 ccm destilliertem Wasser, 10 g Pepton, 10 g Kochsalz, 0,1 g Kaliumnitrat und 0,2 g Soda.

Bouillon, Gelatine und Peptonstammlösung werden im Dampftopf eine Stunde, der Agar am besten im Autoklaven bei 120° 30 Minuten sterilisiert, wobei sich die festen Bestandteile lösen. Steht kein Autoklav zur Verfügung, so stellt man den Agar erst ½ Stunde in den Dampftopf und kocht dann über der Flamme auf Asbestdrahtnetz bis zur Lösung mehrere Stunden.

Zur Gewinnung von Blutserum wird von einem Hammel oder Kalbe bei der Schlachtung das Blut in einem großen, sterilen Glaszylinder (mit sterilem Wattestopfen) aufgefangen, nach 2 Stunden der Blutkuchen mit einem sterilen Glasstab (in der Flamme absengen) von der Wand abgelöst und das Gefäß an einem kühlen Ort aufbewahrt.

Blutalkaliagar nach Dieudonné: Zur Gewinnung von defibriniertem Blut (100 ccm) wird ein Glaszylinder mit Glasperlen und Wattestopfen sterilisiert, das Blut aufgefangen und ½ Stunde kräftig geschüttelt. Dann macht man sich 100 ccm Normalkalilauge (5,6 g KOH in 100 ccm Wasser), gießt das Blut dazu und sterilisiert im Dampftopf.

Für den übernächsten Tag sind 50 ccm frische Milch zu besorgen; ferner für denselben Tag tuberkulöses Sputum, für den 16. Tag Eiter aus Panaritium u. ä., nicht aus einem offenen Herd.

14. Tag.

Vakat.

15. Tag.

(Am besten wird mit Übung VI begonnen.)

III. Übung: Typhus und Coli. f.

Wenn die Indolreaktion am 10. Tage negativ war, wird heute nochmals in gleicher Weise (III. Übung. e) untersucht.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. g.

Schweinerotlauf: Auf den Gelatineplatten sind die Kolonien jetzt deutlich als kleine graue Pünktchen zu sehen, die die Gelatine mehr aufgezehrt als verflüssigt haben. Bei 60-facher Vergrößerung sieht man von einem verfilzten Zentrum zahlreiche Fäden radiär ausgehen.

Die Gelatinestichkultur zeigt sehr geringes Oberflächenwachstum; vom Stichkanal gehen zahlreiche Fäden aus, besonders von einzelnen Punkten, so daß sich das Bild einer „Gläserbürste“ darbietet.

Die Organe kommen in 96 % Alkohol.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. d.

Die Untersuchung der Keime wird fortgesetzt. Die am 12. Tage angelegten Kulturen werden betrachtet. Steht eine Bestimmungstabelle zur Verfügung, so kann man die einzelnen Arten zu bestimmen suchen. Ferner werden einige neue Kolonien, die unterdessen auf den Platten zum Vorschein gekommen sind, in der früher angegebenen Weise mikroskopisch und kulturell untersucht. Auf einigen Platten sind Schimmelpilze gewachsen: man macht daraus ebenfalls mikroskopische Präparate und vergleicht die Größe der Fäden mit der von Bazillen, die Größe der Sporen mit der von Kokken.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. b.

Neutralisieren der Nährböden. Zu den Nährböden 1—6 wird aus einer Bürette 10 %ige Sodalösung so lange hinzugefügt, bis ein Tropfen rotes Lackmuspapier bläut und blaues rötet. (Den ganzen Streifen zur Kontrolle mit Wasser anfeuchten!) Bei den Nährböden 7—9 verfährt man ebenso und setzt dann noch auf 100 ccm 3 ccm der Sodalösung zu. Aus einem Kölbchen der Peptonstammlösung werden 30 ccm zu 270 ccm destillierten Wassers gebracht (Peptonwasser). Dem Agar wird zur Klärung etwas rohes Hühnereiweiß zugesetzt und kräftig umgeschüttelt und die sämtlichen Nährböden im Dampftopf ½ Stunde gekocht (in der Zwischenzeit werden die Übungen III, IV, V und VII vorgenommen) und filtriert. Letzteres ist bei den Peptonlösungen unnötig; bei Bouillon und Gelatine gelingt es leicht; sollte die Gelatine nach dem Filtrieren noch trüb aussehen, so setzt man ebenfalls etwas rohes Hühnereiweiß hinzu, kocht und filtriert nochmals. Das Filtrieren des Agars geschieht im Dampftopf bei 100° durch ein einfaches weißes Faltenfilter; nur die obenstehende Masse wird in den Trichter gegossen, der Bodensatz weggeschüttet. Das Filtrieren dauert mehrere Stunden. Dann werden die Nährböden 1—9 auf ihre Reaktion geprüft, eventuell, wenn diese sauer geworden ist, nochmals neutralisiert und nochmals ½ Stunde im Dampftopf gekocht. Gleichzeitig sterilisiert man einen Trichter zum Abfüllen mit, den man mit einem Gummischlauch und Quetschhahn und spitz auslaufenden Glasröhrchen versehen hat.

Dann füllt man mit Hilfe dieses Trichters die Nährböden in sterile Reagenzgläser ab, in jedes etwa 10 ccm. Einen Teil der Nährböden bewahrt man in den Kolben oder in Bierflaschen auf, die man durch trockene Hitze sterilisiert hat; die Peptonstammlösung muß in den Kölbchen bleiben. Die Nährböden werden darauf nochmals ½ Stunde im Dampftopf gekocht.

Löfflersches Serum. Von dem Hammelserum kommen in eine größere Anzahl Reagenzgläser je 4 ccm, dazu je 1 ccm der Zuckerbouillon; dies läßt man schräg bei 90—95° erstarren und stellt es 2 Tage in den Brutschrank. Die Röhrchen, auf denen Kolonien wachsen, werden ausrangiert.

VII. Übung: Tuberkulose. a.

Das Sputum wird in eine Petrischale geschüttet und zur Untersuchung die gelblichen Klümpchen herausgesucht. Eines wird zwischen zwei Objektträgern zerquetscht, dann ein Deckglas darauf gedrückt und abgezogen. Nach dem Fixieren bedeckt man das Deckglas mit viel unverdünntem Karbolfuchsin, läßt es einmal aufkochen und 2 Minuten stehen. Dann spült man es mit Wasser ab und legt es in ein Glas mit 3 % Salzsäurealkohol (S. 8), bis es nur noch einen ganz leichten rosa Ton hat, spült wieder mit Wasser ab und färbt kurz mit Methylenblau nach. — Die Tuberkelbazillen erscheinen als rotgefärbte, schlanke, manchmal leicht gekrümmte Stäbchen, etwa wie Schweinerotlaufbazillen; die übrigen Bakterien (man achte auf Diplo- und Streptokokken) und das Gewebe sind blau gefärbt. Nun bringt man etwa 10 ccm Sputum in ein Zentrifugenglas, fügt 20 ccm 50 %ige Antiforminlösung hinzu und schüttelt um. Nach 20 Minuten ist das Sputum homogen. Dann fügt man noch 30 ccm Brennspiritus hinzu, schüttelt um, zentrifugiert und gießt ab. Der Rückstand wird gefärbt. Alle anderen Bakterien sind aufgelöst worden, nur die Tuberkelbazillen übrig geblieben.

Mit einem Teile des Sputums wird ein Meerschweinchen intraperitoneal infiziert. Das Tier wird gewogen und das Gewicht notiert. Dann kocht man eine Spritze mit abgestumpfter Spitze aus, füllt sie, schneidet ihm, während es von einem Gehilfen gehalten wird, die Haare an einer Stelle des Bauches ab, macht einen Schnitt, der nur die Haut durchdringt und so klein ist, daß die Kanüle eben hineingeht, führt sie 1 cm tief zwischen Haut und Muskulatur ein, richtet sie dann senkrecht auf und geht mit leichtem Drehen und Drücken in die Bauchhöhle ein. An einem Ruck merkt man, daß man darin angelangt ist, injiziert 1 ccm und verklebt die Wunde mit Collodium. — Auskochen der Spritze. Forts. S. 66.

Wurden mikroskopisch viele Streptokokken gesehen, so hebt man das Sputum an einem kühlen Orte für den nächsten Tag auf (für die VIII. Übung).

16. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. h.

Die Organe kommen in absoluten Alkohol.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. e.

Untersuchung und Fortzüchtung der Bakterien in der angegebenen Weise.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. c.

Die Nährböden 1—11 werden nochmals im Dampftopf $^1/_2$ Stunde sterilisiert.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. a.

Staphylokokken: Der Eiter wird zunächst mit verdünntem Karbolfuchsin, Methylenblau und nach Gram gefärbt; ist er sehr zäh, so wird

erst eine Öse Wasser auf das Deckglas gebracht. Man sieht, wenn man Staphylokokkeneiter vor sich hat, zwischen den Leukocyten zahlreiche, unregelmäßig gestaltete Häufchen von Kokken (Fig. 16); öfters sind zwei Individuen nur durch eine feine Linie voneinander getrennt, doch findet man niemals Bildung von Ketten. Dagegen können manchmal Staphylokokken im Eiter als Diplokokken erscheinen. Im Grampräparate erscheint die Zahl der Kokken noch bedeutend größer. — Dann untersucht man den Eiter im hängenden Tropfen; die Kokken sind hier schwer von Fetttröpfchen, Granulationen im Inneren der Leukocyten etc. zu unterscheiden. Das Bild präge man sich ein, um den bei Anfängern so häufigen Verwechselungen von Gewebsbestandteilen mit Protozoen etc. in Zukunft zu entgehen. — Dann werden mit je einer Öse Agar- und Gelatineplatten gegossen.

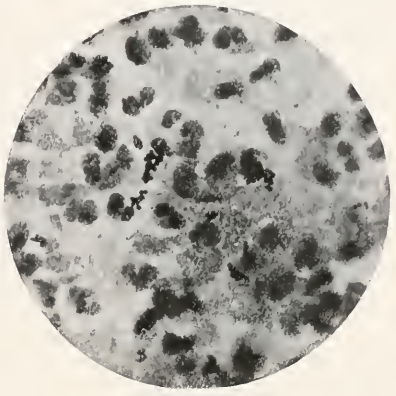


Fig. 16. Staphylokokken im Eiter. 800 : 1.

Streptokokken erhält man aus Eiter, Erysipel, tuberkulösem Sputum oder von den Tonsillen auch vieler gesunder Personen. Auch sie erscheinen im mikroskopischen Präparate öfters als Diplokokken. Zur kulturellen Untersuchung gießt man einige Röhrchen Glyzerinagar in Petrischalen und bestreicht sie längere Zeit nach dem Erstarren oberflächlich mit dem Material.

Ferner sind Tupfer zur Entnahme von diphtherieverdächtigem Material anzufertigen. Man schneidet einen kräftigen Draht in Stücke, die länger als ein Reagenzglas sind, umwickelt das eine Ende mit Watte, steckt dieses tief in ein Reagenzglas, verschließt es mit einem Wattestopfen oder Kork und sterilisiert im Trockenschrank.

17. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. i.

Die Organe werden eingebettet.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. d.

Ein Teil des Agars wird verflüssigt, und zu 70 ccm 30 ccm der Blutkalilauge (VI. Übung. a) gegeben. Dann wird dies sowie die Nährböden 1—11 nochmals im Dampftopf $^1/_2$ Stunde sterilisiert und sind dann gebrauchsfertig. Der eben gemachte Blutalkaliagar wird nun in Drigalskiplatten (Fig. 1) ausgegossen und, um etwas einzutrocknen, einige Tage in den Brutschrank oder eine Stunde bei 60° aufgestellt.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. b.

Auf den aus dem Eiter gegossenen Agarplatten haben sich zahlreiche hellgelbe Kolonien entwickelt. Die oberflächlichen sind rund, die

tiefliegenden wetzsteinförmig. Bei 60-facher Vergrößerung erscheint der Rand grobgranuliert. — Im hängenden Tropfen sieht man viele Kokken ohne bestimmte Lagerung zueinander, meist einzeln und ohne Eigenbewegung, höchstens lebhafte Molekularbewegung ist zu bemerken. Im gefärbten Deckglaspräparate (Färbung mit Fuchsin und nach Gram) liegen sie ebenfalls regungslos durcheinander (Fig. 17); oft bemerkt man eine eben vollzogene Teilung, was sich dadurch kundgibt, daß zwei Kokken besonders nahe aneinander liegen und an der betreffenden Seite etwas abgeplattet sind.

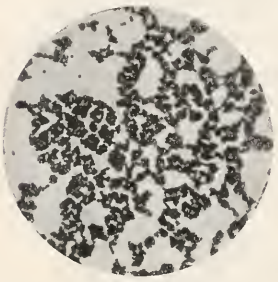


Fig. 17. Staphylokokken. Reinkultur auf Agar. 800 : 1.

Auf den Gelatineplatten ist das Wachstum noch sehr gering: man sieht, oft erst bei 60-facher Vergrößerung, kleine runde Kolonien, die manchmal in die Gelatine wenig eingesunken sind (beginnende Verflüssigung).

Aus oberflächlichen Agarkolonien werden folgende Kulturen angelegt: Agarstich, Agarstrich, Bouillon (37 °), 2 Kartoffeln (22 und 37 °), Gelatinestich (22 °). Die Agarplatten werden weiter bei 37 ° aufbewahrt.

Auf den Streptokokkenplatten sind außer den gewünschten Bakterien, wenn man von unreinem Material ausgegangen ist, selbstverständlich noch andere gewachsen. Die Streptokokkenkolonien sind sehr zart und können bei 60-facher Vergrößerung zweierlei Aussehen haben: entweder sie sind rund und in der Mitte und am Rande fein granuliert, oder sie haben eine Zeichnung, die aus gewundenen Linien besteht, ähnlich der Milzbrandkolonie auf Agar, und radiär ausgesendete Ausläufer. Im hängenden Tropfen sieht man perlschnurähnliche unbewegliche Ketten von Kokken. Im gefärbten Deckglaspräparat (Fuchsin und Gram) hat man dasselbe Bild. Oft sieht man, daß in der Kette je zwei Kokken sich einander näher liegen. — Sie werden auf folgende Nährböden übergeimpft: Agar — Stich und Strich; Bouillon; Kartoffel (37 °); Gelatinestich (22 °).

IX. Übung: Diphtherie. a.

Ist es möglich, Diphtheriemateriel von einem Kranken zu erhalten, so wird dieses untersucht. Man streicht mit dem Wattetupfer über die erkrankte Stelle und fertigt zunächst Deckglaspräparate an, die man mit Methylenblau und nach Gram färbt. — Die Diphtheriebazillen erscheinen als Stäbchen, größer als Typhusbazillen, in der Mitte oder an einem Ende verdickt oder zugespitzt, oft gekrümmt, manchmal etwas verzweigt; meist sind einzelne Stellen in ihnen ungefärbt (Fig. 18). Die Färbung nach Gram ist positiv, wenn nicht zu lange entfärbt wird. — Außerdem sind in den Präparaten noch andere Bakterien zu sehen, gegen die die Diphtheriebazillen an Zahl oft bedeutend zurücktreten.

Kulturen werden nur auf Löfflerschem Serum angelegt, indem man mit dem Tupfer erstens über 3 Platten (α, β, γ) wegstreicht, zweitens ein Röhrchen in der Art infiziert, daß man den Draht mit dem Tupfer vom Kork loslöst, im Kondenswasser hin und her bewegt, und dann die Nährbodenfläche gründlich bestreicht. Draht und Watte bleiben im Röhrchen

und nach 6 Stunden wird das Kondenswasser noch einmal über die Nährbodenfläche durch Neigen des Röhrchens verteilt (Schmierröhrchen). Aufbewahrung im Brutschrank. — Steht kein Material von Kranken zur Verfügung, so legt man eine Kultur auf Löfflerschem Serum aus einer Reinkultur an.

Um Pseudodiphtheriebazillen zu erhalten, streicht man mit dem Tupfer über die Conjunctiva und streicht ebenfalls auf Löfflerserum aus.

Die Diphtheriekulturen werden am besten schon nach 6 Stunden untersucht: sie sind dann zwar noch ganz klein, aber andere Bakterien sind meist überhaupt noch nicht gewachsen. Beschreibung des Befundes s. IX. Übung. b.

Außerdem ist für den nächsten Tag etwas defibriniertes Rinder- oder Kaninchenblut zu besorgen.

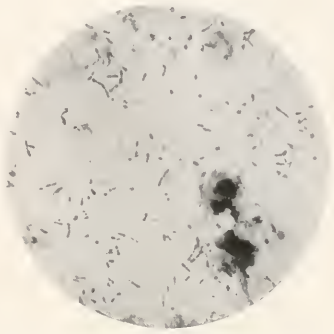


Fig. 18. Diphtheriebazillen. Ausstrich von einer Membran. 800:1.

18. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. c.

Die Staphylokokkenkolonien auf den Agarplatten haben eine dunklere, orangegelbe Farbe angenommen und sich vergrößert. Auf den Gelatineplatten sind sie schon mit dem bloßen Auge gut zu erkennen; sie zeigen gelbe Färbung und einen Verflüssigungshof. Bei dichter Besäung ist die erste Platte vollständig verflüssigt. Bei 60-facher Vergrößerung erscheinen sie rundlich und grobkörnig. — Die Agarstichkultur hat einen geringen dunkelgelben Belag; der Stichkanal ist uncharakteristisch. Auf dem Agarstrich ist starkes Wachstum erfolgt; am Rande sind viele einzelne Kolonien zu sehen. Die Bouillon ist gleichmäßig getrübt. Im Gelatinestich ist das Wachstum noch gering, die Oberfläche läßt Verflüssigung erkennen. Auf der Kartoffel hat sich ein orangegelber Belag gebildet.

Das Wachstum der Streptokokken ist bedeutend kümmerlicher, bei der Agarstichkultur im Stichkanal besser als an der Oberfläche, im Gelatinestich in einzelnen kleinen Knötchen im Stichkanal ohne Verflüssigung, in der Bouillon am Boden und von da an der Wand hinauf. — Besser ist das Wachstum, falls man mit Strept. pyog. brevis arbeitet, den man aber aus obigem Ausgangsmaterial selten erhält: das Wachstum ist dann üppig, die Gelatine wird verflüssigt, die Bouillon ist gleichmäßig getrübt, doch findet man bei mikroskopischer Betrachtung nur kurze Ketten von 3—4 Gliedern.

Zur weiteren Diagnosestellung impft man auch auf Blutagar: Man verflüssigt einige Röhrchen mit je 5 ccm Agar, läßt auf 42° abkühlen, bringt in jedes 2 ccm des defibrinierten Blutes, vermischt gut und schüttet in eine Petrischale aus. Nach dem Erstarren impft man oberflächlich mit einigen Strichen Streptokokken auf. Brutschrank. Ferner impft man in Blutbouillon von derselben Zusammensetzung.

Die Staphylokokken- und die Streptokokkenbouillon werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Präparate aus Bouillonkulturen sind nicht über der Flamme,

sondern in absolutem Alkohol 2 Minuten lang zu fixieren, da die durch Hitze koagulierbaren Stoffe bereits bei der Sterilisation ausgefällt wurden und die Bakterien infolgedessen schlecht festkleben würden. (Man kann sich davon leicht überzeugen, indem man Bouillon einerseits kocht, andererseits etwas absoluten Alkohol hineinbringt: nur in letzterem Falle entsteht Trübung.) In der Staphylokokkenbouillon findet man, wenigstens solange sie jung ist, keine dichten Haufen, sondern meist einzelne oder zu zweien liegende Kokken. In der Streptokokkenbouillon haben sich Ketten gebildet, die die von der Agarkultur stammenden an Länge bedeutend übertreffen (Fig. 19).

Fig. 19. Streptokokken. Bouillonkultur. 800 : 1.

Mit den Staphylokokken wird ein Kaninchen intravenös, ein anderes auf die Cornea infiziert. — Zur intravenösen Injektion nimmt man am besten die Kartoffelkultur: ist der Belag noch zu dünn, so wartet man noch einen oder einige Tage. — Man kratzt 3 Ösen voll davon ab, wobei man darauf sieht, daß man auch ganz wenig von der Oberfläche der Kartoffel mitnimmt, da die Kokken dann im Tierkörper besser haften. Diese werden in 3 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung sehr fein verrieben, dann 1 ccm herausgenommen und mit 9 ccm Kochsalzlösung verdünnt. — Dann wird eine Spritze zu 1 oder 5 ccm ausgekocht und zunächst mit der letzteren Verdünnung gefüllt. — Außerdem ist zum Versuche eine Schere zum Abschneiden der Haare und eine Pinzette notwendig.

Ein links von dem Untersucher stehender Gehilfe faßt das Tier mit beiden Händen am Kopfe und fixiert diesen, indem er gleichzeitig die Augen zuhält; zwischen seinem linken Unterarm und seinem Körper hält er den Rumpf des Tieres, ohne fest zu drücken. Der Untersucher schneidet zunächst die Haare über dem Rande der Seite des Ohres ab, und führt durch Druck an der Wurzel des Ohres eine Stauung herbei. Gelingt es bei kleinen Tieren nicht, die Blutgefäße durch Druck genügend zu erweitern, so reibt er das Ohr mit etwas Xylol ein, oder hält es an eine elektrische Lampe, worauf sofort eine starke Hyperämie erfolgt. (Will man noch öfters intravenös injizieren, so darf man Xylol nicht anwenden.) Dann sticht er in eine Randvene fast parallel mit dieser ein. In diesem Moment muß der Gehilfe darauf gefaßt sein, daß das Tier den Kopf zurückzieht. — Glaubt der Untersucher in der Vene zu sein, so dringt er durch leichtes Drehen vor, bis wenigstens 1 cm der Kanüle eingedrungen ist. Dann wird das Ohr senkrecht gestellt und durch leichten Druck 1 ccm injiziert. Hält man das Ohr gegen das Licht, so sieht man, wie die farblose Flüssigkeit in der Vene hinunterfließt; beim Aufhören des Druckes kehrt das Blut sofort zurück. — Luftembolie ist sorgfältig zu vermeiden. Eine Schwellung darf nicht entstehen; sie beweist, daß die Injektion in das umgebende Bindegewebe stattgefunden hat. Auch dann wird die Vene blutleer, doch nur an der Stelle, wo die Kompression durch die Flüssigkeit stattfindet. — Ist die Flüssigkeit injiziert, so komprimiert man die Vene unterhalb der Einstichstelle und zieht die Kanüle heraus. — Dann wird ein anderes Kaninchen mit der unverdünnten Aufschwemmung in gleicher Weise infiziert.

Agar- und Gelatinekulturen beim Färben erst in Wasser verreiben!

Zur cornealen Infektion kokainisiert man zunächst das Auge eines dritten Kaninchens, macht sich eine dritte Aufschwemmung (5 Ösen der Agarstrichkultur in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung) in einem sterilen Reagenzglas, nimmt die Kanüle von der Spritze, taucht sie in die Flüssigkeit, faßt die Bindehaut des Auges, sobald die Cornea unempfindlich geworden ist, mit einer feinen Pinzette am Cornealrand und sticht ganz schräg in die Cornea ein, indem man die Ausflußöffnung der Kanüle nach dem Auge zu wendet. Von der Spitze soll 1 mm eindringen. Durchbohren der Cornea ist sorgfältig zu vermeiden. — In derselben Weise wird das andere Auge infiziert.

Die Spritze zu 1 ccm wird dann mit einer abgestumpften Kanüle versehen und ausgekocht und einer Maus 0,2 ccm der vorher kräftig umgeschüttelten Streptokokkenbouillon intraperitoneal injiziert. Ein Gehilfe hält das Tier mit der linken Hand an der Haut des Nackens, mit der rechten über der Schwanzwurzel. Der Untersucher schneidet zuerst die Haare an einer Stelle ½—1 cm oberhalb der Symphyse ab und macht dann mit der Schere einen ganz kleinen, kaum sichtbaren Schnitt, der eben die oberen Schichten der Haut durchdringt. Dann führt er die Spitze durch Drehen und leichtes Drücken ein, bis er an einem kleinen Ruck merkt, daß er in der Bauchhöhle angelangt ist, und injiziert. Beim Herausziehen darf keine Flüssigkeit zurücktreten.

IX. Übung: Diphtherie. b.

Die erste Platte wird als „Schmierplatte", die folgenden als „Isolierplatten" behandelt, das Röhrchen als „Schmierröhrchen". Zuerst wird die Isolierplatte untersucht. Auf ihr sind verschiedenartige Kolonien gewachsen. Die Diphtheriebazillenkolonien sind groß, mattglänzend, doch nicht porzellanartig weiß. Auch wenn die Kolonien sehr dicht stehen, fallen die Diphtheriebazillen besonders auf. Man impft mit einer Nadel ab und fertigt ein mit Löfflerschem Methylenblau gefärbtes Ausstrichpräparat und einen hängenden Tropfen an. In ersterem (Fig. 20) erscheinen die Diphtheriebazillen wieder als große, keulenförmig verdickte (Corynebacterium) Stäbchen; sie nehmen stellenweise den Farbstoff nicht an. Besonders charakteristisch ist ihre Lage: sie bilden meist einen Winkel miteinander, mehrere zusammen liegen wie gespreizte Finger. — Im hängenden Tropfen sieht man, daß sie unbeweglich sind. Ein weiteres Präparat wird nach Neisser gefärbt: nach der Fixierung mit einer Mischung der essigsauren Methylenblaulösung (2 Teile) mit der Kristallviolettlösung (1 Teil) 1 Sekunde (s. S. 8); abspülen mit Wasser; Chrysoidinlösung 3 Sekunden; Wasser. Man sieht (Anfänger nehmen am besten die stärkste Vergrößerung) in den braungefärbten Bazillen zahlreiche dunkelblaue Körnchen liegen.

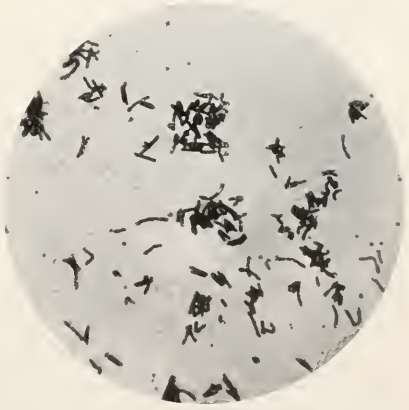


Fig. 20. Diphtheriebazillen. Ausstrich von Löfflerschem Serum. 800:1.

Da man selbst bei isoliert liegenden Kolonien nicht mit absoluter Sicherheit sagen kann, daß man eine Reinkultur vor sich hat, gießt man aus einer Kolonie, die man mikroskopisch als Diphtheriekolonie erkannt hat, Glyzerinagarplatten und streicht auf andere ausgegossene Glyzerinagarplatten oberflächlich aus.

Die Kolonien der Pseudodiphtheriebazillen sind meist bedeutend kleiner. Färbt man mit Fuchsin, so sieht man, daß sie ebenfalls ungleichmäßig dick, aber meist an den Enden zugespitzt sind. Besonders charakteristisch ist ihre Lage: sie liegen nicht wie die Diphtheriebazillen, sondern „palissadenförmig", parallel nebeneinander. Bei der Neisserschen Färbung lassen sich keine Körnchen darstellen.

Sehr spärliche Diphtheriebazillen unter zahlreichen anderen findet man mikroskopisch leichter mit Hilfe der Schmierkultur. Die Bakterienmasse wird mit einem starken Draht abgewischt und auf dem Objektträger in einem nicht zu kleinen Tropfen so verrieben, daß zahlreiche Ecken und Zipfel entstehen, in denen am meisten zu sehen ist. Hierin sind nach Färbung mit Methylenblau resp. nach Neisser die Bazillen zu suchen.

19. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. k.

Die Organe werden in der früher besprochenen Weise geschnitten und mit Fuchsin, die Schweinerotlaufschnitte auch nach Gram mit Gegenfärbung gefärbt; eventuell vorher wieder aufgeklebt. (Gleichzeitig wird das Diphtheriematerial geschnitten, s. IX. Übung. c). Man sieht in den Gefäßen sehr zahlreiche kleine Bazillen liegen. Beim Schweinerotlauf ist auch sehr lebhafte Phagocytose zu bemerken.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. d.

In den Kulturen ist das Wachstum, in den Gelatinekulturen auch die Verflüssigung fortgeschritten. Die Blutplatten bieten je nach der Art des untersuchten Streptococcus einen verschiedenen Befund. Hat sich um den grauen Impfstrich ein breiter, glasheller Hof gebildet, so ist starke Hämolyse eingetreten und man spricht von Str. pathogenes seu erysipelatos. Dagegen nennt man den Streptococcus „mitior seu viridans", wenn sehr feine, schwarzgrüne Kolonien gewachsen sind, die den Nährboden nicht oder nur sehr selten und in sehr geringem Umfang aufhellen. Strept. mucosus ist an seinem üppigen, feuchtschleimigen Wachstum und der graugrünen Farbe leicht zu erkennen. — Die Blutbouillon ist bei ersterem fast durchsichtig und burgunderrot, mit unbedeutenden Flocken am Boden, bei den anderen ist sie getrübt und braun resp. grünlich verfärbt.

Die intravenös injizierten Kaninchen machen öfters schon an diesem Tage einen kranken Eindruck; manchmal lassen sich ophthalmoskopisch Blutungen nachweisen. Ist eins davon eingegangen, so sind die pyämischen Herde höchstens ganz klein. Man obduziert dann das Tier wie vorher die Maus und sucht mikroskopisch und kulturell nach Staphylokokken.

Auf der Cornea des anderen Tieres ist ein Ulcus entstanden; gleichzeitig ist mehr oder minder starke eitrige Conjunctivitis zu be-

obachten. Der Eiter wird mikroskopisch auf Staphylokokken untersucht. Dann tötet man das Tier durch Chloroform oder Nackenschlag. In letzterem Falle hebt man es mit der linken Hand an den Hinterbeinen auf und versetzt ihm mit der Kleinfingerseite der rechten Hand einen kräftigen Schlag in den Nacken. Ein Knacken zeigt an, daß die Wirbelsäule luxiert ist. Der vordere Teil des Tieres ist sofort bewegungslos, die Hinterbeine machen noch kurze Zeit schnellende Bewegungen. Vermutet man, daß das Tier nur betäubt ist, so öffnet man beiderseits die Pleura mit der Schere. Dann werden beide Augen enukleïert und in 10% Formalinlösung gelegt.

IX. Übung: Diphtherie. c.

Auf den Glyzerinagarplatten sind Diphtheriebazillen allein oder mit anderen Bakterien vermischt gewachsen. Die Diphtheriebazillenkolonien sind durchscheinend, hell, mit netzförmiger Zeichnung und sehr grob granuliertem Rande (Fig. 21). Die tiefliegenden sind rund oder wetzsteinförmig, dunkler, grob granuliert. Einige der Kolonien, die man für Diphtherie hält, werden unter dem Mikroskope abgeimpft (I. Übung. b), gefärbt und untersucht. Findet man Diphtheriebazillen, so legt man folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Löfflersches Serum.

Sollte die Reinzüchtung Schwierigkeiten machen, so impft man von einer Diphtheriekolonie des ersten Serumröhrchens auf ein anderes Serumröhrchen und gießt am nächsten Tage von da aus nochmals Platten.

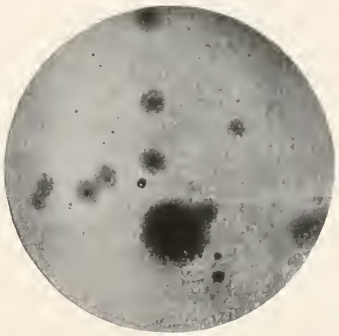


Fig. 21.
Diphtheriekolonien auf Glyzerinagar. 24 Stunden alt. 40:1.

Die Diphtherieschnitte werden teils mit Fuchsin, teils nach Gram unter Vorfärbung mit Lithionkarmin gefärbt. Am besten klebt man sie auf und nimmt die Färbung erst am nächsten Tage vor. Man sieht: Vom normalen Epithel sind nur noch Reste vorhanden. An seiner Stelle liegen Pseudomembranen, aus Netzen von (ungefärbtem) Fibrin, das bis in die Mucosa reicht, und zahlreichen Leukocyten bestehend: in und auf den Pseudomembranen finden sich zahlreiche Gruppen der großen, kolbig angeschwollenen Diphtheriebazillen. Auch andere Bakterien, speziell Kokken, liegen darauf. Die Schleimhaut unter der Membran ist kernreich, zellig infiltriert, die Gefäße sind strotzend mit Blut gefüllt. Weitere Einzelheiten sind an der Hand eines Lehrbuchs der pathologischen Histologie zu studieren. Will man das Fibrin färben, so nimmt man die Weigertsche Färbung vor: man spült den Schnitt nach der Jodbehandlung mit Wasser ab, trocknet zwischen mehrfachen Lagen von glattem Filtrierpapier, das man fest aufdrückt und entfärbt in Anilinxylol (2 Teile Anilin, 1 Teil Xylol), das man mehrmals erneuert, bis keine Farbstoffwolken mehr weggehen. Dann legt man ihn noch einige Minuten in mehrfach gewechseltes Xylol, um den letzten Rest Anilin zu entfernen, der sonst noch nachträglich entfärben würde.

20. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. e.

Die Kulturen können nach nochmaliger Betrachtung beseitigt werden, bis auf je eine, die zugeschmolzen und aufbewahrt wird. — Da sich die Zeit des Todes des intravenös injizierten Kaninchens nicht genau angeben läßt, sei hier folgendes bemerkt: Wird es tot gefunden, so geschieht die Obduktion in der seinerzeit für Mäuse beschriebenen Weise. Man findet in den Organen, oft erst mit der Lupe, pyämische Herde, die mikroskopisch und kulturell zu untersuchen sind. Am meisten Herde finden sich in der Niere, dann im Herzen, bei jungen Tieren besonders auch an den Rippen; bei anscheinend negativem Befund ist besonders die Marksubstanz der Niere zu untersuchen, in der auch dann noch öfters „Ausscheidungsherde" vorkommen. — Einige der Herde werden herausgeschnitten und in Formalin fixiert.

Die fixierten Bulbi werden in Wasser 24 Stunden ausgewaschen.

IX. Übung: Diphtherie. d.

Die Oberflächenkulturen auf den Glyzerinagarplatten zeigen einen stark zerrissenen Rand; mikroskopisch findet man jetzt (und noch häufiger an den folgenden Tagen) verzweigte Formen. Das Wachstum in der Agarstich- und Agarstrichkultur ist gering, noch kümmerlicher das in der Gelatinestichkultur. Dagegen ist auf Löfflerschem Serum üppiges Wachstum erfolgt. Aus einer der Kulturen werden 3 Bouillonkulturen angelegt: man hält das zu infizierende Röhrchen ziemlich senkrecht und impft an den Rand der Oberfläche, um womöglich die Bildung eines oberflächlichen Häutchens zu erzielen. Zu letzterem Zwecke kann man auch eine Öse voll Öl auf die Bouillon bringen, das man vorher durch Erhitzen auf 150° und mehr in einem Becherglas sterilisiert hat.

Steht ein choleraähnlicher Vibrio zur Verfügung, so wird davon eine Agarstrichkultur angelegt; andernfalls ist Wasser zur Isolierung zu besorgen (siehe 22. Tag).

Die gestern begonnene Schnittfärbung wird zu Ende geführt.

Der Blutalkaliagar wird aus dem Brutschrank genommen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

21. Tag.

Vakat.

22. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. f.

Die Bulbi kommen in 60% Alkohol, die pyämischen Herde in fließendes Wasser.

IX. Übung: Diphtherie. e.

Der Belag auf der Agarstrichkultur ist dünn, grau; der Belag der Stichkultur ist ähnlich, klein; das Wachstum im Stichkanal bietet keine Besonderheiten. Auf den Agarplatten sieht der Rand der Kolonien noch zerrissener als gestern aus; man fertigt Klatschpräparate an. Die Bazillen erscheinen stark kolbig aufgetrieben, öfters sind Verzweigungen zu sehen. Im Gelatinestich ist das Wachstum perlschnurförmig, kümmerlich, ohne Verflüssigung. In der Bouillon dagegen ist es üppig und erfolgt in Form von krümeligen Konglomeraten, die einen Bodensatz bilden und sich an den Wänden des Röhrchens hinaufziehen. Oft ist ein oberflächliches Häutchen entstanden; solche Kulturen sind meist virulenter, da durch den reichlich zutretenden Sauerstoff die Bildung von Gift begünstigt wird. Bei starker Vergrößerung findet man, daß die Bazillen mehr spitz, weniger kolbig aussehen als auf Löfflerschem Serum; auch liegen sie meist in kleinen Häufchen zusammen.

Die Bouillonkulturen des Diphtheriebazillus zeichnen sich vor denen des Pseudodiphtheriebazillus durch Säurebildung und durch Giftbildung aus. Erstere wird mit $^1/_{40}$-Normalnatronlauge titriert. — Da sich Natriumhydrat nicht genau abwiegen läßt, so löst man zunächst 1,575 g Oxalsäure in 1 l ausgekochten destillierten Wassers, wodurch man $^1/_{40}$-Normalsäure erhält; dann löst man etwas mehr als 1 g Natriumhydrat in 1 l destillierten Wassers, bringt beide Lösungen in Büretten und sieht, ob 50 ccm der Säure 50 ccm der Natronlauge genau entsprechen (Indikator: Phenolphthaleïn). Ist die Natronlösung zu stark, so setzt man Wasser, ist sie zu schwach, Natriumhydrat zu. — Stimmen dann die Lösungen genau überein, so titriert man die Bouillonkulturen, indem man zunächst 5 ccm noch nicht infizierter Bouillon in ein Erlenmeyerkölbchen bringt und angibt, wieviel Kubikzentimeter der $^1/_{40}$-Normalsäure zur Neutralisierung nötig sind, dann 5 ccm der Diphtheriebouillon in derselben Weise mit der $^1/_{40}$-Normalnatronlauge titriert. — Man findet, daß die Diphtheriebazillen viel Säure gebildet haben, und zwar pflegt diese etwa 1—1,5 ccm $^1/_{40}$-Normalnatronlauge zu betragen.

Die Prüfung auf Virulenz geschieht in der Weise, daß man einem Meerschweinchen 0,2, einem anderen 1,0 unter die Bauchhaut injiziert, nicht genau in die Mittellinie, sondern etwas näher an einer Seite.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. a.

Stand eine Kultur eines choleraähnlichen Vibrio zur Verfügung, so werden daraus neue Kulturen angelegt (1); andernfalls sucht man sie aus Wasser zu isolieren (2).

1. Aus der Agarkultur werden folgende Kulturen angelegt: Gelatineplatten, Gelatinestich, und zwar von der stärker alkalischen Gelatine (das Wachstum erfolgt mit größerer Sicherheit auf den stärker alkalischen Nährböden; doch ist es öfters auf dem gewöhnlich benutzten charakteristischer. Man legt daher die Kulturen am besten auf beiden an); Agarplatten, Agarstich, Bouillon, Peptonwasser (2 Kulturen).

2. Man sucht die Vibrionen aus verschiedenen Wässern zu isolieren: Flußwasser, Wasser mehrerer Brunnen. — Je 1 l des zu untersuchenden Wassers wird mit 100 ccm der (zehnprozentigen) Peptonstamm-

lösung versetzt und gründlich durchgeschüttelt: dann in Kölbchen zu 100 ccm verteilt und in den Brutschrank gestellt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Friedländerschen Pneumoniebazillen angelegt.

23. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken und Streptokokken. g.

Die Ulcera werden mit einer feinen Schere aus den Bulbis ausgeschnitten, so daß nur kleine Stücke normalen Gewebes daran bleiben. Bei dem einen, das senkrecht zur Oberfläche geschnitten werden soll, macht man zwei parallele Schnitte hart am Rande des Geschwüres vorbei, an den anderen Seiten läßt man noch so viel normales Gewebe daran, wie die Breite des Geschwüres beträgt; das andere, das parallel zur Oberfläche geschnitten werden soll, umschneidet man an allen Seiten in einer Entfernung von 2 mm. — Die Stücke kommen in 96 % Alkohol.

Die pyämischen Herde werden entsprechend weiter behandelt.

IX. Übung: Diphtherie. f.

Ist eines der infizierten Meerschweinchen eingegangen, so obduziert man es; Befund siehe 24. Tag. — Meist wird man eines oder beide krank finden: der Zustand ist apathisch, die Körpertemperatur, wie man schon mit der Hand fühlen kann, subnormal. An der Impfstelle ist meist ein weiches Ödem zu fühlen, das sich zu der entsprechenden Inguinaldrüse hinunterzieht, besonders wenn man die beiden Seiten miteinander vergleicht. Beim Nachfühlen muß das Tier von einem Gehilfen am Kopf und an den Hinterbeinen gehalten werden.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. b.

1. Wurde mit einer vorhandenen Reinkultur angefangen, so sind zunächst die Kulturen zu betrachten. Die Kulturen müssen vorsichtig aus dem Brutschrank herausgenommen werden, damit Häutchen, die sich auf den flüssigen Nährboden gebildet haben, nicht hinabsinken. — Die folgenden Beschreibungen gelten für Choleravibrionen, die frisch gezüchtet sind; alte Laboratoriumkulturen oder Kulturen von choleraähnlichen Vibrionen pflegen in einem oder einigen Punkten Abweichungen zu zeigen.

Auf den Gelatineplatten sind mit dem bloßen Auge sehr kleine Kolonien zu sehen; bei 60-facher Vergrößerung sind sie hell und ungefärbt; verschiedene Teile einer Kolonie haben verschiedenes Lichtbrechungsvermögen, so daß sie wie mit Glassplittern bestreut erscheinen.

Auf den Agarplatten sind namentlich die Oberflächenkolonien charakteristisch; sie sind, gegen das Licht gehalten, durchsichtig mit einem bläulich irisierenden Schimmer.

Im Gelatinestich ist das Wachstum noch gering; nur wenn man ihn mit einer großen Menge Kultur gemacht hat, bemerkt man an der Oberfläche Verflüssigung. — Auf dem Agarstich hat sich ein dünner Belag entwickelt; das Wachstum im Stichkanal ist schwach. — In

Bouillon ist das Wachstum üppig; auf der Oberfläche hat sich ein Häutchen gebildet, die Flüssigkeit ist getrübt. Dasselbe ist bei dem Peptonwasser der Fall. Dieses wird auf Vorhandensein von Indol und Nitrit untersucht. — Da, wie früher erwähnt, salpetrige Säure und Indol die Rotreaktion ergeben und Choleravibrionen Indol bilden und Nitrat zu Nitrit reduzieren, so ist es nur nötig, durch Zusatz von 1 ccm 25% Schwefelsäure das Peptonwasser anzusäuern, worauf Rotfärbung eintritt. Sollte dies nicht der Fall sein, so setzt man etwas 0,5‰ Natriumnitritlösung zu.

Aus dem anderen Peptonwasserröhrchen wird ein hängender Tropfen, aus oberflächlichen Agarkolonien werden gefärbte Deckglaspräparate angefertigt. Man sieht kleine gekrümmte Stäbchen (Fig. 22), in ersterem Falle in lebhafter Eigenbewegung. Die Gramsche Färbung ist negativ.

Während man so die wichtigsten Eigenschaften des Choleravibrio kennen gelernt hat, liegt dem folgenden Teile der Gedanke zugrunde, daß die Choleravibrionen aus verdächtigem Stuhle oder Wasser zu züchten wären. Ersteren stellt man sich in der Weise her, daß man in eine Öse der Peptonwasserkultur mit etwa 1 g Stuhl — den man vorher in Wasser aufschwemmen kann — gut vermischt. Das Wasser wird verunreinigt, indem man 1 Öse Peptonwasserkultur und etwas Stuhl zu 1 l zusetzt und umschüttelt. Im mikroskopischen Präparate sieht man im Stuhl höchstens ganz vereinzelte Vibrionen neben vielen anderen Bazillen, im Wasser überhaupt keine Vibrionen. Der Stuhl wird in der Weise weiter untersucht (bei choleraverdächtigem Stuhl sucht man Schleimflöckchen heraus), daß man in 6 Peptonwasserröhrchen, die vorher im Brutschrank angewärmt wurden, je 1 Öse einbringt, ebenso etwa 1 ccm in ein Kölbchen mit 50 ccm Peptonwasser und mit einer Öse Gelatineplatten gießt. Ferner gießt man 6 Röhrchen mit dreiprozentigem Choleraagar in Petrischalen aus und stellt diese, nachdem er erstarrt ist, umgekehrt offen in den Brutschrank, damit das Kondenswasser verdunstet. Dann bringt man eine Öse voll auf eine der Platten und verstreicht sie zuerst auf dieser, dann (ohne abzuglühen) auf einer zweiten und dritten. — Mit den anderen 3 Platten verfährt man ebenso. Außerdem bringt man auf die Platten mit Blutalkaliagar etwas Stuhl und verstreicht mit dem Glasspatel oder Platinpinsel (Fig. 1 Mitte) auf der ersten, dann, ohne abzuglühen, auf der zweiten und dritten. Zu dem Wasser (1 l) werden 100 ccm der zehnprozentigen Peptonstammlösung zugesetzt, gut umgeschüttelt und in Kölbchen zu je 100 ccm verteilt. Brutschrank. Die weitere Untersuchung soll nach 6, 12 und 24 Stunden vorgenommen werden. Die Agarplatten können beseitigt werden, ebenso die älteren Bouillon- und Peptonwasserkulturen.

Fig. 22. Choleravibrionen. Bouillonkultur. 800:1.

2. Suchte man von Anfang an Vibrionen aus dem Wasser zu isolieren, so fertigt man von der Oberfläche der gestern angelegten Kölbchen mit Peptonwasser hängende Tropfen und gefärbte Deckglaspräparate an. Das Kölbchen, das die meisten gekrümmten Stäbchen

mit Eigenbewegung zeigt, wird weiter untersucht. Man impft von der Oberfläche in ein Röhrchen mit Peptonwasser und gießt Gelatineplatten; ferner gießt man in 3 Platten dreiprozentigen Agar, stellt diese, nachdem er erstarrt ist, offen mit dem Agar nach unten eine halbe Stunde in den Brutschrank, damit das Kondenswasser verdunstet, und bestreicht dann mit einer Öse nacheinander die Oberflächen, ohne dazwischen abzuglühen.

XI. Übung: Kapselbazillen. a.

Eine Maus wird mit einer Öse der Kultur von Friedländerschen Pneumoniebazillen subkutan injiziert.

Außerdem sind von jetzt an Platten, auf denen Schimmel gefunden wurde, für eine spätere Übung aufzubewahren. (S. 61.)

24. Tag.

Zu beginnen ist mit der X. Übung.

VI. Übung: Staphylokokken. h.

Die Organe werden in entsprechender Weise weiterbehandelt.

VII. Übung: Diphtherie. g.

Wenigstens eines der infizierten Meerschweinchen ist eingegangen. Man obduziert es, indem man zunächst die Infektionsstelle freilegt und dann in der früher beschriebenen Weise vorgeht. Befund: An der Impfstelle starkes hämorrhagisches Ödem; starkes Pleura-, geringes Peritonealexsudat; Schwellung und Rötung der Nebennieren; geringe Hyperämie der übrigen Organe und der oberen Darmpartien.

Mikroskopisch sind an der Infektionsstelle nur wenige, in den inneren Organen und dem Pleuraexsudat keine oder höchst spärliche Bazillen nachzuweisen.

Geht das mit der geringeren Dosis infizierte Tier nicht sofort ein, so beobachtet man an der Infektionstelle noch einige Tage teigige Schwellung; dann stößt sich die Partie ab. Die Tiere können infolge der Infektion noch nach Wochen und Monaten zugrunde gehen.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. c.

1. Auf den Gelatineplatten ist schon mit dem bloßen Auge Verflüssigung zu erkennen. Bei 60-facher Vergrößerung sieht man, daß die Kolonien zerfallen, indem in der Mitte der verflüssigten Stelle ein gelbbrauner Klumpen liegt, der sich in Bröckchen auflöst. Die Randpartie ist bedeutend heller; in ihr liegen höchstens vereinzelte kleine Massen. Auch in dem Gelatinestich ist Verflüssigung zu bemerken; dieselbe ist trichterförmig, doch liegt der größte Durchmesser nicht an, sondern etwas unterhalb der Oberfläche („scheidetrichterförmig“). Der verflüssigte Tell ist schon größtenteils verdunstet, so daß die Verflüssigungszone den Eindruck einer Luftblase macht.

Fortsetzung der Züchtung aus Stuhl und Wasser. Auf den Agarplatten sucht man nach Vibrionenkolonien, die durch ihren

bläulich irisierenden Schimmer leicht erkennbar sind. Man impft einige ab und untersucht sie weiter. Auf dem Blutalkaliagar sind die Cholerakolonien groß, kreisrund, mit glattem Rand, im durchfallenden Lichte glashell. Vor dem Weiterimpfen überzeuge man sich bei 60-facher Vergrößerung, ob wirklich auch nur eine Kolonie vorliegt. Bei der Stellung einer Choleradiagnose untersucht man noch, ob die Vibrionen durch Choleraserum in hoher Verdünnung agglutiniert werden; ferner impft man auf schrägen Agar ab und sieht, ob die Pfeiffersche Reaktion am nächsten Tage positiv ausfällt: darauf soll in diesen Übungen erst später eingegangen werden. Auf den Gelatineplatten sind neben vielen anderen nur vereinzelte Vibrionenkolonien zu sehen. Dagegen zeigen die Peptonwasserkulturen oberflächliche Häutchen, die, wie man bei Untersuchung im hängenden Tropfen findet, nur aus Vibrionen bestehen. Das Peptonwasser hat also diesen wesentlich bessere Lebensbedingungen geboten als den anderen Bakterien, es hat eine „Anreicherung" der Vibrionen stattgefunden. — Hat man auf Agar oder Blutalkaliagar keine Reinkulturen erhalten, so streicht man von dem Röhrchen, das am meisten Vibrionen enthält, wie gestern auf dreiprozentigen Choleraagar und Blutalkaliagar. — Außerdem infiziert man aus den Peptonwasserröhrchen einige neue.

Ein analoger Befund wie bei Kulturen aus dem Stuhl ergibt sich bei dem mit Peptonlösung versetzten Wasser. Auch hier untersucht man im hängenden Tropfen und legt Gelatine-, Agar- und Peptonwasserkulturen an.

2. Ging man von Anfang an vom Wasser aus, so durchsucht man die Gelatine- und die Agarplatten nach Kolonien, die den oben beschriebenen (X. Übung. b. 1) Cholerakolonien ähnlich sehen. Diese werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckelplaspräparat untersucht. Zeigen sie eine, wenn auch nur geringe Krümmung und Bewegung, so werden die oben angegebenen Kulturen angelegt.

XII. Übung: Desinfektion. a.

Seidenfäden werden in 1 cm lange Stücke geschnitten, in Petrischalen gelegt und bei 150° ½ Stunde lang desinfiziert. Statt der Seidenfäden können auch Granaten von etwa 1 mm Durchmesser verwendet werden, die vor dem Sterilisieren durch Kochen in Wasser und Behandeln mit Salzsäure gereinigt werden müssen. Im ganzen sind etwa 120 Seidenfäden resp. Granaten nötig.

Ferner werden in 3 Petrischalen Uhrschälchen und in anderen 10 große (15 × 10 cm) und 50 kleine (2 × 2 cm) Stücke Filtrierpapier sterilisiert.

Außerdem legt man je 2 Schrägagarkulturen von Milzbrandbazillen, Staphylokokken und Vibrionen an.

25. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken. i.

Die Organe werden in entsprechender Weise weiter behandelt.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. d.

1. Auf den Gelatineplatten ist die Verflüssigung und — bei 60-facher Vergrößerung betrachtet — die Auflösung der Kolonien fortgeschritten.

Der Gelatinestich zeigt das Aussehen wie gestern, nur noch charakteristischer. Man legt noch zwei Agarkulturen an, um sie am nächsten Tage zu schmelzen und aufbewahren zu können; die anderen Kulturen können beseitigt werden.

Fortsetzung der Züchtung aus Stuhl und Wasser. Die Agar- und Blutalkaliagarplatten aus dem Peptonwasser werden wie gestern untersucht. Auch auf den Gelatineplatten sieht man bedeutend mehr Vibrionenkolonien als auf den direkt aus dem Stuhl angelegten. Die Kulturen können beseitigt werden.

2. Ging man von Anfang an vom Wasser aus, so beobachtet man, ob die Kulturen die unter 1. erwähnten Eigenschaften zeigen.

XI. Übung: Kapselbazillen. b.

Ist die Maus eingegangen, so wird sie in der gewohnten Weise obduziert; die Organe werden teils in Formalin eingelegt, teils mikroskopisch und kulturell untersucht. Man sieht in den mit Fuchsin gefärbten Präparaten kurze, plumpe, oft sogar ovale Stäbchen, vielfach zu zweien, mit einer Kapsel. War die Kultur avirulent, so daß sich der Tod des Tieres lange verzögert hat, so sieht man manchmal merkwürdige Involutionsformen wie Kugeln, feine Stäbchen etc. Ferner färbt man nach Gram; diese Färbung ist nur dann positiv, wenn man schwach entfärbt, z. B. bei der Weigertschen Modifikation (s. S. 45). Sind viele Stäbchen vorhanden, so untersucht man auch im hängenden Tropfen; man sieht dann, daß die Stäbchen unbeweglich sind. Aus den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen.

XII. Übung: Desinfektion. b.

Um die Bakterien in einer handlichen Form zur Prüfung ihrer Widerstandsfähigkeit untersuchen zu können, trocknet man sie an die Seidenfäden oder Granaten an. Man bringt in jedes der sterilisierten Uhrschälchen 2—3 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung und schwemmt in jedem eine der Bakterienarten auf, indem man eine Öse nach der anderen etwas über dem Rande der Flüssigkeit fein verreibt, bis diese stark getrübt ist. Besonders die Milzbrandkulturen müssen gut verteilt und dann auf Sporenbildung untersucht werden. Dann legt man die Seidenfäden (oder die Granaten) hinein, und zwar zu den Vibrionen 10, zu den Staphylokoken und Milzbrandbazillen je 30. Wenn sie sich vollgesogen haben, nimmt man sie heraus, läßt an dem sterilen Filtrierpapier die überschüssige Flüssigkeit ablaufen und legt zunächst von jeder Art einen Seidenfaden auf eine Agarplatte (Kontrolle).

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Neun Fäden von jeder Art werden in Petrischalen gelegt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Die Bakterien müssen zunächst an die Seidenfäden scharf angetrocknet werden. Man nimmt die übrigen Seidenfäden heraus, trocknet sie oberflächlich an dem Filtrierpapier, legt sie in Petrischalen, doch so, daß sie einander nicht berühren, und stellt diese, nachdem man sie etikettiert hat, offen in einen Exsikkator, den man über Nacht an einem kühlen Ort aufbewahrt, damit die Sporen nicht auskeimen.

Außerdem werden in einem sterilen Erlenmeyerkölbchen 50 bis 100 ccm Wasser im Dampftopf sterilisiert und drei Schrägagarkulturen von Typhus angelegt.

26. Tag.

VIII. Übung: Staphylokokken. k.

Die Organe werden in Paraffin oder Celloidin eingebettet.

XI. Übung: Kapselbazillen. c.

Auf den Agarplatten sind große, runde, weiße Kolonien gewachsen, von denen sich bei der Berührung mit der Nadel kurze Fäden ausziehen lassen. Bei 60-facher Vergrößerung erscheinen sie gelbbraun mit glattem Rande.

Auch auf Gelatine ist das Wachstum üppig; die Kolonien ragen über die Oberfläche der Gelatine empor. Keine Verflüssigung. — Im hängenden Tropfen sieht man plumpe, unbewegliche Stäbchen. Im gefärbten Deckglaspräparate ist außerdem noch auf ihre Lagerung zu achten: sie berühren sich fast niemals, sondern liegen in geringer Entfernung voneinander, da sie auch auf künstlichem Nährboden eine Kapsel bilden. — Aus oberflächlichen Kolonien werden folgende Kulturen angelegt: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Bouillon, Schüttelkultur in Traubenzuckeragar, Kartoffel, Milch.

XII. Übung: Desinfektion. c.

Man lese zunächst diesen ganzen Abschnitt durch, da gleichzeitig mehrere Untersuchungen gemacht werden können. — Die Seidenfäden müssen über Nacht trocken geworden sein. — Auf den zur Kontrolle auf Agarplatten gelegten ist reichliches Wachstum erfolgt.

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Nachdem die dazu bestimmten Seidenfäden nunmehr einen Tag getrocknet sind, wird von jeder Art einer herausgenommen und alle drei in möglichst großem Abstand voneinander auf eine Petrischale mit Agar gelegt.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Mit dieser Übung verbindet man zweckmäßig Übung XIII. a. Zunächst soll die Widerstandsfähigkeit gegen eine Temperatur von 60° untersucht werden. — Man gießt 4 Agarröhrchen in Petrischalen aus, füllt 3 dünnwandige Bechergläser halb voll Wasser, stellt ein Thermometer hinein, kocht einmal auf und läßt auf 60° abkühlen. Auf dieser Temperatur sucht man sie zu erhalten. Dann legt man in jedes 6 Seidenfäden einer Bakterienart, nimmt mit einer Pinzette nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 Minuten und 2 Stunden einen Seidenfaden heraus und legt ihn auf Agar. Damit nicht ein hinüberlaufender Wassertropfen den nächstgelegenen Seidenfaden infiziert, tupft man leicht auf einem Stückchen sterilem Filtrierpapier ab (jedesmal ein anderes nehmen!). Die Pinzetten müssen jedesmal abgeglüht werden. Auf der Rückseite der Petrischale vermerkt man mit Tinte die Dauer der Einwirkung.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Kochen wird in der gleichen Weise geprüft. Entnahme nach $^1/_4$, $^1/_2$, 1, 2, 5, 7, 10, 15 Minuten.

Größere Gegenstände, wie Kleidungsstücke, können nicht ausgekocht, sondern müssen im Dampf sterilisiert werden. Man schlägt zur Übung infizierte Seidenfäden in Filtrierpapier ein, macht aus alten Kleidungsstücken, Teppichen etc. ein Paket, in das man die Testobjekte und, wenn vorhanden, ein Maximumthermometer hineinsteckt und bringt das Ganze in den Dampfkochtopf. Einige Seidenfäden und ein mit Tinte beschriebenes Papier werden in ein Buch gelegt (das bei der Desinfektion zugrunde gehen darf) und dieses mit Bindfaden umschnürt. Außerdem wird ein alter Schuh oder ein Stück Leder dazugelegt. Aus dem Dampftopf ragt ein Thermometer hervor, das aber nur angibt, wann in dem die Kleider umgebenden Raume die Temperatur von 100° erreicht ist. Will man dies auch für das Innere derselben wissen, so muß man ein Kontaktklingelthermometer zu Hilfe nehmen. Dieses besteht aus einer elektrischen Klingel, die durch Drähte mit einer Hülse in Verbindung steht. In dieser befindet sich eine Metallegierung, die bei 100° schmilzt, oder es ist in den Strom ein Thermometer eingeschaltet, das durch Ansteigen auf 100° den Strom schließt, wodurch die Klingel in Bewegung gesetzt wird. Die Hülse wird in die tiefsten Schichten der Kleider eingewickelt. Ein weiteres Erkennungsmittel sind die Sticherschen Kontrolleure. Es sind doppelte Röhrchen, deren Inneres mit Phenanthren halb gefüllt ist, das bei 98° schmilzt. Bis die Temperatur durch die Luftschicht zwischen den beiden Röhrchen dringt, vergehen etwa 10 Minuten. — Man wickelt also in das Innere der Kleidungsstücke einen Kontrolleur, so daß dieser senkrecht steht und die Masse in der oberen Hälfte ist, und notiert sich, ob dies das rote oder farblose Ende ist. Nach Beendigung der Desinfektion hat man nur zu prüfen, ob das Phenanthren durch die Hitze flüssig geworden und in die andere Hälfte hinuntergelaufen ist. Ist dies der Fall, so hat eine Temperatur von mindestens 98° mindestens 10 Minuten eingewirkt. — Hierauf wird der Dampfapparat in Tätigkeit gesetzt. Hat die Temperatur von 100° im Innern 20 Minuten eingewirkt, so dreht man die Flamme ab und nimmt die Gegenstände heraus. Das Buch ist aus dem Leim gegangen, dagegen die Tinte nicht verwischt; das Leder ist hart und unbrauchbar geworden; die Kleidungsstücke haben nicht gelitten. Die Seidenfäden werden auf Agarplatten gelegt. — Wesentlich schlechter als feuchte wirkt trockene Hitze. Man untersucht in der Weise, daß man Seidenfäden in Kleidungsstücke oder Watte dicht einschlägt, diese im Trockensterilisierungsschrank auf 100° erhitzt, nach 5, 10, 20, 30, 60 Minuten je einen herausnimmt und auf Agarplatten legt.

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. a.

Man übergießt die Typhusagarröhrchen mit etwas physiologischer Kochsalzlösung, reibt den Belag hinein, schüttet alles in ein steriles Reagenzglas und erwärmt ½ Stunde auf 60° im Wasserbad. Eine Öse streicht man auf Agar aus, um zu sehen, ob Abtötung erfolgt ist. Dann injiziert man den zehnten Teil einem Kaninchen intravenös. Das Tier muß vorher gewogen werden; in den nächsten Tagen verliert es etwas an Gewicht.

Ferner sind je zwei Kulturen von Staphylokokken und Milzbrandbazillen auf schrägem Agar anzulegen und von jeder Art Oberflächenausstriche auf ausgegossene Agarplatten zu machen (für Übung XII d).

27. Tag.

XI. Übung: Kapselbazillen. d.

Auf allen Nährböden ist üppiges Wachstum erfolgt. Der Belag des Agarstiches und -striches ist kräftig, schleimig, der des Gelatinestiches halbkugelförmig (Nagelkopfform). Die Bouillon ist gleichmäßig getrübt mit starkem Bodensatz, der Zucker vergoren, die Milch nicht geronnen; die Kartoffel zeigt einen bräunlichen Belag. — Die Agarkulturen werden eingeschmolzen und aufbewahrt, die übrigen Kulturen können beseitigt werden außer der Gelatinekultur, die noch einige Tage beobachtet wird.

XII. Übung: Desinfektion. d.

(Zu beginnen ist mit der Formalindesinfektion.)

1. Prüfung auf Widerstansfähigkeit gegen Eintrocknen. Die gestern auf Agar gelegten Seidenfäden werden betrachtet und notiert, ob üppiges, spärliches oder überhaupt kein Wachstum erfolgt ist. Man verwechsle nicht zufällige Verunreinigungen mit den zu untersuchenden Bazillen. Ist kein Wachstum erfolgt, so stellt man die Platten in den Brutschrank zurück, da es noch nach einigen Tagen eintreten kann. — Dann nimmt man von jeder Art einen weiteren Faden heraus und legt sie auf eine Agarplatte.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. An den auf 60° erhitzten Seidenfäden sind die Bakterien bei kurzer Einwirkung noch nicht geschädigt. Bei längerer Einwirkung ist bei den Staphylokokken eine Verminderung an Zahl und eine Hemmung des Wachstums, später völlige Abtötung zu konstatieren. Die Milzbrandsporen dagegen bleiben völlig ungeschädigt. — Durch das Kochen werden die Staphylokokken sehr schnell, die Milzbrandsporen etwas langsamer abgetötet. Ebenso wurde durch die Desinfektion im strömenden Dampf völlige Abtötung erzielt. Viel langsamer, wenn überhaupt, hat die trockene Erhitzung eingewirkt. — Sämtliche Platten kommen in den Brutschrank zurück, da sich bei längerem Aufbewahren vielfach noch Keime entwickeln.

3. Prüfung auf Widerstandsfähgkeit gegen chemische Desinfektionsmittel. a) Benutzt wird 5% Kresolseifenlösung. Die abtötende Wirkung wird in folgender Weise geprüft: Zunächst werden die Nährböden (12 Agar- und 12 Gelatineröhrchen) verflüssigt und in Wasser von 40° gehalten, außerdem 12 Bouillonröhrchen bereitgestellt. Dann macht man die Lösung des Desinfektionsmittels doppelt so stark, als man sie anwenden will (d. h. man mischt einen Teil der käuflichen Kresolseifenlösung mit 9 Teilen Wasser; diese Mischung ist gleich der Aqua cresolica des Arzneibuchs), verreibt einige Ösen der Staphylokokkenkultur in einem Reagenzglas mit 2 ccm sterilen Wassers, so daß eine sichtbare Trübung entsteht, und mischt beides zu gleichen Teilen gut durch. Hiervon gießt man sofort mit einer Öse eine Agarplatte, mit einer anderen eine Gelatineplatte, eine dritte bringt man in Bouillon. Dasselbe wiederholt man nach 2, 5, 10, 15, 30 Minuten. In gleicher Weise wird die Milzbrandkultur untersucht.

b) Zur Prüfung der entwicklungshemmenden Wirkung macht man sich eine 1% Sublimatlösung, die man mit sterilem Wasser 10-fach, 100-fach und 1000-fach verdünnt. Von jeder der 4 Lösungen bringt man 1 ccm zu 9 ccm Bouillon. Man hat so Lösungen 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 und 1 : 1000000. Jede Lösung macht man viermal, infiziert sie mit einer großen Öse voll Staphylokokken resp. Milzbrandbazillen und stellt von jeder Art eine in den Brutschrank, eine in Zimmertemperatur.

c) Gasförmige chemische Desinfektionsmittel. α) Chloroform. Die gestern angelegten Platten werden umgekehrt und auf den jetzigen Boden ein mit Chloroform getränktes Wattebäuschchen gebracht. Nach 1 Stunde impft man von der Kultur in Bouillon ab.

β) Formalin: Steht ein Zimmer zu den Versuchen zur Verfügung, so geht man in folgender Weise vor: Die darin befindlichen Gegenstände stellt man so, daß sie dem Gase leicht zugänglich werden (Kleider ausgebreitet aufhängen; Schubladen öffnen etc.). Alle Öffnungen, durch die das Gas ausströmen kann (Ventilationsöffnungen, Fensterritzen, Schlüssellöcher, Ofentüren etc.) werden mit sublimatgetränkter Watte gedichtet. Das Zimmer wird ausgemessen und in den Apparat so viel Formalin gebracht, daß auf den Kubikmeter 15 ccm kommen; ferner die doppelte Menge Wasser. Dann werden an einige entlegene Stellen des Zimmers einige Staphylokokkenseidenfäden gelegt, ferner auch (zur Übung) einige in eine verschlossene Schublade. Darauf wird der Apparat in Gang gesetzt. 4 Stunden später wird zur Bindung des Formalins Ammoniak eingeleitet. Näheres über die Bedienung der einzelnen Apparate ist auf der ihnen beigefügten Gebrauchsanweisung zu sehen. Die Seidenfäden werden in stark verdünnter Ammoniaklösung und dann in sterilem Wasser abgewaschen und auf Agarplatten resp. in Bouillon gebracht.

Für den übernächsten Tag ist je eine Kultur von Typhusbazillen auf schrägem Agar anzulegen.

Ferner ist die Blechbüchse mit den Pipetten bei 150° eine halbe Stunde lang zu sterilisieren; in das obere Ende der Pipetten ist vorher etwas Watte zu stecken, damit ein Übertreten der Kultur in den Mund verhindert wird. — Gleichzeitig werden 12 kleine Hölzchen von 2 cm Länge und ½—1 cm Breite messerklingenähnlich zugeschnitten und in einer Petrischale mitsterilisiert.

Schließlich ist für Schwefelammonium zu sorgen (Darstellung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in Ammoniak; auch in den Apotheken erhältlich).

28. Tag.

Vakat.

29. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. e.

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Wie am 27. Tag.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Es ist zu untersuchen, ob an einzelnen Seidenfäden verspätetes Wachstum eingetreten ist.

3. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen chemische Desinfektionsmittel.

a) Die abtötende Wirkung der Kresolseifenlösung ist zunächst an den Agarplatten zu untersuchen. Auf der sofort gegossenen Agarplatte ist sehr dichtes Wachstum zu bemerken. Schon nach 1 Minute ist es bedeutend spärlicher und hört schnell ganz auf. Die auf jeder Platte gewachsenen Kolonien werden gezählt und in eine Tabelle eingetragen, wann noch Keime gewachsen sind, wieviel, auf welchem Nährboden und am wievielten Tage. Die Zählung geschieht, wenn die Kolonien weit auseinanderstehen, in der Weise, daß man bei jeder gezählten Kolonie auf der Rückseite der Platte einen Punkt mit Tinte macht. Sind die Kolonien so nahe beisammen, daß das nicht möglich ist, so nimmt man das Zählbrett zu Hilfe. Dieses ist in Quadrate von 1 cm Seite eingeteilt. Man stellt die Platte darauf, zählt 10 Quadrate durch und berechnet daraus die Gesamtzahl, indem man die Größe der Platte aus ihrem Radius nach der Formel $r^2 \pi$ berechnet, oder dreht sie um, legt die Zählplatte darauf und zählt mit einer Lupe. Ist auch dies nicht möglich, so zählt man unter dem Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung eine Anzahl von Gesichtsfeldern durch. Die Größe eines Gesichtsfeldes bestimmt man, indem man unter dem Mikroskop an seinem rechten Rand auf der Platte mit Tinte ein Zeichen macht, dann verschiebt, bis das Zeichen am linken Rande steht, wieder rechts ein Zeichen macht und so fortfährt, bis eine punktierte Linie entstanden ist. An dieser läßt sich leicht der Radius eines Gesichtsfeldes messen und daraus sein Flächeninhalt bestimmen. — In gleicher Weise betrachtet und zählt man die Gelatineplatten durch. Dabei wird man oft finden, daß auf den Agarplatten noch zu einer Zeit Wachstum erfolgt, wo es auf den Gelatineplatten schon fehlt; ferner, daß die Keimzahl auf den Agarplatten größer ist. Wendet man also die Gelatineplattenmethode an, so erhält man anscheinend schon Abtötung, wenn noch lebende Keime vorhanden sind. Die Agarplattenmethode ist also genauer und allein verwendbar. — Umgekehrt findet man manchmal in der Bouillon noch Wachstum, wenn die Agarplatten schon steril sind. Die damit erhaltenen Resultate sind also noch genauer; doch leiden sie unter dem Fehler, daß eine quantitative Bestimmung unmöglich ist. Außerdem ist bei der Bouillon in derartigen Fällen stets näher zu untersuchen, ob Verunreinigung durch Luftkeime vorliegt, während dies bei den Agarplatten meist schon bei der bloßen Betrachtung entschieden werden kann. In Wirklichkeit wird man stets auf Agar und in Bouillon prüfen. — Die Kulturen kommen in die Schränke zurück.

b) Das Sublimat hat je nach der Konzentration mehr oder weniger entwicklungshemmend gewirkt. In den ersten Bouillonröhrchen ist kein Wachstum erfolgt (Eiweißniederschläge nicht damit verwechseln!), später ist es schwach; bei der stärksten Verdünnung erfolgt das Wachstum ungehemmt. Die Wirkung pflegt bei 23° stärker hervorzutreten als bei 37°. Doch könnte das Ausbleiben des Wachstums auch auf Abtötung der Bakterien beruhen. Man nimmt daher vom Bodensatz der steril gebliebenen Röhrchen etwas weg und impft es in Bouillon über. Erfolgt nun Wachstum, so waren die Bakterien zwar am Leben, wurden aber durch das Sublimat an der Vermehrung gehindert.

c) Das Chloroform hat schnelle Abtötung der Staphylokokken bewirkt. Ebenso sind die von der Formalindesinfektion stammenden Seidenfäden

steril, wenigstens soweit sie frei gelegen waren. Dagegen ist an denen, die in der Schublade gelegen waren, Wachstum erfolgt. Das Formalin ist also ein gutes Oberflächendesinfiziens, vermag aber nicht in die Tiefe zu dringen.

Fortsetzung der chemischen Desinfektion. d) Untersucht man an Seidenfäden angetrocknete Bakterien auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen ein chemisches Desinfektionsmittel, so muß man dafür sorgen, daß dieses nicht noch auf den Nährböden entwicklungshemmende Eigenschaften entfalten kann. Auswaschen in Wasser ist vielfach ungenügend, am besten wird das Desinfektionsmittel chemisch gebunden (z. B. oben Formaldehyd durch Ammoniak). Man legt 12 Milzbrandseidenfäden in 1 ‰ Sublimatlösung, nimmt nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 Minuten je zwei heraus, spült den einen nur in sterilem Wasser, den anderen in sterilem Wasser, verdünnter Schwefelammoniumlösung und wieder sterilem Wasser ab. Durch das Schwefelammonium wird das Sublimat ausgefällt (schwarzer Niederschlag). Die Seidenfäden kommen dann auf Agarplatten.

Zur Desinfektion grober Massen, Stuhl etc., wird Kalkmilch verwendet. Diese soll in unseren Versuchen in einem dünnwandigen Becherglas in der Weise bereitet werden, daß man den Kalk, wenn man größere Stücke hat, etwa mit der Hälfte Wasser gleichmäßig besprengt, wobei er zu Kalkpulver zerfällt; dann fügt man unter stetem Rühren noch die dreifache Menge Wasser dazu. Auch kann man gelöschten Kalk aus der Tiefe einer Kalkgrube entnehmen und mit der dreifachen Menge Wasser anrühren. Nun bringt man in ein anderes Becherglas eine Portion Stuhl; dazu fügt man die erhaltene Kalkmilch mindestens in gleicher Menge und mischt gut durch. Nach 2 Stunden gießt man aus dem Gemisch mit einigen Ösen eine Agarplatte, einige Ösen bringt man in Bouillon.

Außerdem ist ein Erlenmeyerkölbchen mit 99 und ein Reagenzglas mit 9 ccm Wasser im Dampftopf zu sterilisieren.

4. Bakterizide Wirkung des Sonnenlichtes. Mit einer kleinen Öse Typhuskultur wird eine Agarplatte gegossen und zum Zwecke des oberflächlichen Austrocknens $^1/_4$ Stunde lang offen in den Brutschrank gestellt. Dann nimmt man sie heraus, setzt den Deckel auf, schneidet ein breites Kreuz aus schwarzem Papier und klebt dieses auf die Unterseite. Hierauf wird die Platte im Sommer eine, im Winter zwei Stunden lang umgekehrt in die Sonne gestellt, so daß der betreffende Teil von dem Kreuz bedeckt ist; die Sonnenstrahlen müssen senkrecht auffallen. Dann wird sie in den Brutschrank gestellt.

Ferner sind 300 ccm Rinderblut zu besorgen und zur Abscheidung von Serum kühl zu stellen, oder noch besser nach der Gerinnung sofort zu zentrifugieren und in der S. 60 angegebenen Weise weiter zu behandeln. (Für Tuberkelbazillenzüchtuug.)

30. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. f.

1. und 2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen und gegen Hitze. Wie am 29. Tag.

3. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen chemische Desinfektionsmittel.

a) Abtötende Wirkung der Kresolseifenlösung. b) Entwicklungshemmende Wirkung des Sublimats. c) Abtötende Wirkung des Chloroforms und des Formalins. — Die Kulturen werden betrachtet und an der Hand der gestern gemachten Notizen untersucht, ob sich das Wachstum vermehrt hat.

d) An den Seidenfäden, die in Sublimat gelegen waren und nur in Wasser ausgewaschen wurden, ist schon nach kurzer Zeit kein Wachstum mehr eingetreten, so daß Abtötung erfolgt zu sein scheint. An denjenigen dagegen, die nachher mit Schwefelammonium ausgewaschen wurden, hat überall Wachstum stattgefunden. Im ersteren Falle wurde also Abtötung nur dadurch vorgetäuscht, daß anhaftende Spuren von Sublimat noch auf dem Agar entwicklungshemmende Wirkungen entfalteten.

4. Bakterizide Wirkung des Sonnenlichtes. Nach Ablösen des Kreuzes findet man, daß überall in seinem Bereich Wachstum kleiner Kolonien stattgefunden hat, während der besonnte Teil der Platte steril geblieben ist. Höchstens am Rande greift, besonders wenn Kondenswasser auf der Platte war, das Wachstum auf die belichtete Seite über.

5. Händedesinfektion. Man feuchtet eine Hand mit sterilem Wasser leicht an und schabt eine Hälfte mit einigen der sterilisierten Hölzchen, die man mit einer ausgeglühten Pinzette faßt, kräftig ab, u. a. auch den Unternagelraum. Diese werden einige Male über Agarplatten weggestrichen und dann daraufgelegt. Dann desinfiziert man sich die Hände nach einer der üblichen Methoden, spült das Desinfektionsmittel mit sterilem Wasser weg und schabt nun die andere Hälfte mit den Hölzchen ab. Um entwicklungshemmende Nachwirkung des Sublimats auf den Nährböden zu verhindern, müssen sie zunächst in schwache Schwefelammoniumlösung und dann in steriles Wasser getaucht werden, dann bestreicht man die Nährböden wie vorher. — Die Platten kommen in den Brutschrank.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. a.

Untersucht wird reines Leitungswasser und verunreinigtes Brunnen-, Fluß- oder Bachwasser. Das Leitungswasser wird in der Weise entnommen, daß man zuerst das vorderste Wasser — einige Kubikzentimeter — abläßt, dann mit einem Spiritus- oder Bunsenbrenner den Hahn erhitzt, bis das Wasser durch den Dampf herausgedrückt wird. Dann läßt man 20 Minuten laufen. Nach dieser Zeit sengt man den Rand eines sterilen Reagenzglases ab und füllt es zur Hälfte. Die weitere Untersuchung soll nicht später als $^1/_2$ Stunde nach Entnahme erfolgen. Man entnimmt mit einer sterilen Pipette 1,0, 0,5, 0,1 ccm und bringt es in Petrischalen. Dazu schüttet man ein verflüssigtes Gelatineröhrchen, mischt durch Drehen gut durch und läßt erstarren. (Noch besser ist Agargelatine, die aus gleichen Teilen dieser Nährböden besteht.)

Die Entnahme aus einem Kesselbrunnen oder Fluß geschieht in der Weise, daß man ein steriles Reagenzglas mit der Hand schnell untertaucht resp. an einem Bindfaden hinabläßt. — Zur Entnahme aus der Tiefe sind kompliziertere Methoden nötig. — Man gießt zunächst mit 1,0 und 0,1 ccm in der angegebenen Weise Platten; da aber derartiges Wasser sehr viele Keime zu enthalten pflegt, muß es auch

verdünnt untersucht werden. Man bringt also in das vorher (29. Tag) sterilisierte Wasser je 1 ccm, wodurch man 10-fache resp. 100-fache Verdünnung erhält und gießt, indem man andere Pipetten verwendet, wieder mit 1,0 und 0,1 ccm Platten. Die Platten werden bei 23° aufbewahrt.

XV. Übung: Pneumokokken. a.

Steht pneumonisches Sputum oder pneumonische Lunge von einer Sektion zur Verfügung, so untersucht man es im gefärbten Deckglaspräparat (10-fach verdünntes Karbolfuchsin; Gram) und im hängenden Tropfen. Man sieht Kokken, meist zu zweien, seltener zu vieren, von einer Kapsel umgeben. Sie sind meist an dem voneinander abgewendeten Ende zugespitzt und gleichen 2 Flammen, die sich mit der Basis berühren; doch sind auch runde Pneumokokken häufig. Intracelluläre Lagerung kommt erst nach der Krisis häufig vor. Die Färbung nach Gram ist positiv. Man legt nur Oberflächenkulturen an, und zwar auf Löfflerschem Serum (3 Röhrchen mit derselben Öse, ohne dazwischen auszuglühen), schrägem Glyzerinagar, Glyzerinagarplatten und Blutplatten (wie bei Streptokokken); ferner infiziert man mit einer Öse eine Maus subkutan.

Ist kein pneumonisches Sputum zu erhalten, so sucht man die Pneumokokken aus dem Speichel Gesunder zu züchten. Der Nachweis auf Nährböden ist in diesem Falle sehr schwierig, da die sehr kleinen Pneumokokkenkolonien schnell von anderen Bakterien überwuchert werden. Dagegen steht uns im Körper einer Maus ein Mittel zur Reingewinnung zur Verfügung, da diese für Pneumokokken sehr, für andere Mundbakterien weniger empfänglich ist. Man schabt etwas Mundschleimhaut- und Zungenbelag ab und injiziert es 4—5 Mäusen subkutan.

Ferner wird etwas rohes Fleisch mit der Hand in ein nicht steriles Reagenzglas gebracht und etwas Wasser dazugegeben, doch so, daß das Fleisch nicht ganz davon bedeckt ist. Aufbewahrung offen bei 23°. (XVII. Übung S. 62.)

Für den nächsten Tag ist aus einer Brauerei oder Bäckerei Hefe zu besorgen (XVI. Übung).

Das Rinderserum ist in Reagenzgläser zu verteilen und zur Sterilisierung 2 Stunden lang zwischen 56 und 58° zu halten; die Temperatur von 60° darf nicht erreicht werden. Diese Erhitzung ist auch an den folgenden Tagen vorzunehmen; man bezweckt damit, die Sporen zum Auskeimen zu bringen und dann die vegetativen Formen abzutöten (fraktionierte Sterilisierung).

31. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. g.

1. 2. 3. 4. Wie an den vorhergehenden Tagen.

5. Händedesinfektion. Auf den Platten von der Desinfektion sind mehr oder minder zahlreiche (Hände, die täglich desinfiziert werden, sind oft steril) Keime gewachsen; nach der Desinfektion sind sie steril geblieben. Sind doch Kolonien vorhanden, so sieht man, ob sie sich in den mit den Hölzchen gezogenen Strichlinien befinden, da es sich auch um darauf gefallene Luftkeime handeln könnte. Kolonien von besonderer Art werden mikroskopisch und kulturell weiter untersucht.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. b.

Die Platten werden nur untersucht und gezählt, wenn sich so viele Kolonien darauf befinden, daß man fürchtet, sie könnten bis zum nächsten Tag verflüssigt werden.

XV. Übung: Pneumokokken. b.

Wurde von pneumonischem Sputum ausgegangen, so werden die Kulturen weiter untersucht. Auf dem Löfflerschen Serum sind die Pneumokokkenkolonien zahlreich vorhanden, aber sehr klein; daneben sind noch andere Kolonien aufgegangen. Auf dem Glyzerinagar erfolgt manchmal überhaupt kein Wachstum; ist es vorhanden, so sind die Kolonien noch kleiner als auf dem Serum. Die Kolonien auf den Blutplatten haben ein bräunliches Aussehen. Die Schrägagarkulturen werden mit der Lupe betrachtet, indem man sie gegen das Fenster hält; sie erscheinen schwach getrübt. — Auf den Platten sieht man bei 60-facher Vergrößerung sehr zarte durchscheinende Kolonien mit fein granuliertem Rand. — Im hängenden Tropfen sieht man unbewegliche Kokken, meist zu zweien, manchmal in kurzen Ketten. Aus dem Löfflerschen Serum fertigt man Ausstrichpräparate, von den Platten Klatschpräparate an; man findet im ersteren Falle neben gut erhaltenen zahlreiche verquollene, im letzteren fast nur normal aussehende Pneumokokken. Hat man dann sicher die Pneumokokkenkolonien kennen gelernt, so legt man Gelatinestich, Agarstrich, Agarplatten und Bouillonkulturen an.

Ist eine der gestern infizierten Mäuse eingegangen, so wird sie in der am 32. Tage besprochenen Weise untersucht.

XVI. Übung: Schimmel und Hefen.

Die seit einiger Zeit aufbewahrten Schimmelpilze werden zunächst bei 60-facher, dann bei starker Vergrößerung ungefärbt untersucht. Wasser haftet an ihnen schlecht; sie werden daher, nachdem man sie mit einem Messer abgekratzt hat, in 60% Alkohol mit einigen Tropfen Ammoniak auf einem Objektträger zerzupft und mit einem Deckglas bedeckt. Am häufigsten findet man Mucor, Aspergillus und Penicillium. Bei Mucor befinden sich die Sporen am Ende des Fruchtträgers in einer kugelförmigen Hülle; bei den beiden anderen stehen sie an seinem Ende frei und werden kettenförmig abgeschnürt, und zwar ist bei Aspergillus der Fruchtträger halbkugelig oder keulenförmig und einfach, bei Penicillium mehrfach verzweigt. Von dem Mycel und den Sporen fertigt man auch gefärbte Deckglaspräparate an und betrachtet sie genau, um sie nicht später mit anderen Gebilden zu verwechseln. Die Kulturen können dann beseitigt werden.

Die Hefe wird im hängenden Wassertropfen und im gefärbten Deckglaspräparat (Fuchsin und Gram) untersucht. Man sieht unbewegliche, elliptische Gebilde, die sich schon durch ihre Größe leicht von Bakterien unterscheiden. An vielen kann man die Vermehrung durch Sprossung — Herauswachsen einer kleinen Form aus einer großen — bemerken. Die Färbung nach Gram ist positiv.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE LIBRARY

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe. a.

Das Wasser, in das gestern das rohe Fleisch gelegt wurde, wird im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Man sieht Bakterien von allen Formen darin. Dann werden 4 Gelatine- und 4 Agarplatten daraus gegossen.

Das Rinderserum wird wie gestern sterilisiert.

32. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. h.

Wie am 31. Tag. — Man vollendet die Zusammenstellung der Resultate (Tabelle), dann können die Platten, die 7 Tage im Brutschrank gestanden waren, beseitigt werden.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. c.

Die Platten werden, wie bei der Desinfektion angegeben, gezählt und die ermittelten Zahlen in eine Tabelle eingetragen. Einige auffallende Kolonien, z. B. verflüssigende grüne, werden abgeimpft und mikroskopisch und kulturell weiteruntersucht (Agar, Gelatine, Kartoffel). — Man achte darauf, daß in der abzuimpfenden Kolonie nicht eine andere liegt. Damit die verflüssigenden Kolonien sich nicht weiter ausbreiten, werden sie abgetötet, indem man in jede mit der Pinzette einige Kaliumpermanganatkristalle legt, die sich sehr schnell darin lösen; doch reicht ihre desinfizierende Wirkung etwas über die Kolonie hinaus. Dann werden die Platten in den 23°-Schrank zurückgestellt.

XV. Übung: Pneumokokken. c.

Hat man gestern Reinkulturen angelegt, so sieht man auf Gelatine überhaupt kein Wachstum; auf Agar zeigen sich sehr zarte graue Kolonien (Fig. 23), doch gibt es Pneumokokken, die darauf überhaupt nicht wachsen. In der Bouillon zeigt sich geringe Trübung. Man nimmt mit einer sterilen Pipette etwas vom Bodensatz heraus und untersucht im hängenden Tropfen. Die Pneumokokken liegen in kurzen Ketten zusammen.

Ist eine der Mäuse eingegangen, so wird sie mit großer Sorgfalt steril obduziert. Der makroskopische Befund ist wiederum negativ; speziell findet sich keine Pneumonie, sondern der Tod ist an Allgemeininfektion erfolgt. Nur an der Infektionsstelle ist Ödem bemerkbar. — Mikroskopisch zeigt sich derselbe Befund, der oben für das pneumonische Sputum beschrieben wurde (Fig. 24).

Aus den Organen gießt man Agarplatten und streicht auf mehrere Röhrchen schrägen Agar und Löfflersches Serum oder Blutplatten aus; ferner bringt man eine Öse Blut in ein Bouillonröhrchen, ein Stückchen Milz in ein anderes.

Außerdem werden einige sterile Seidenfäden mit Blut getränkt und kommen in ein steriles Reagenzglas, in dem sich ganz unten etwas

Chlorcalcium, darüber etwas Watte befindet. Das Reagenzglas wird zugeschmolzen und der Sammlung einverleibt: Pneumokokken halten sich auf diese Weise angetrocknet lange Zeit, während sie auf künstlichen Nährböden rasch zugrunde gehen.

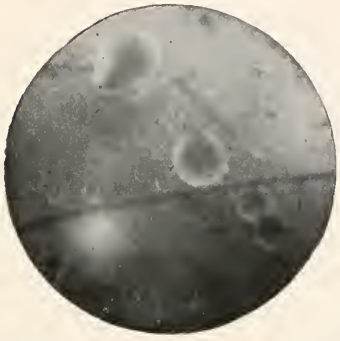


Fig. 23. Pneumokokkenkolonien auf Agar. 40 : 1.

Fig. 24. Pneumokokken aus dem Blute einer Maus. Färbung nach Gram. 800 : 1.

Manchmal kommt es vor, daß die mit Speichel infizierte Maus an anderen Bakterien als an Pneumokokken zugrunde gegangen ist. Findet man nur eine Art (z. B. nur dicke, plumpe Stäbchen) im Blut, so werden diese ebenfalls weiter untersucht, außerdem der Versuch mit anderem Speichel wiederholt. Findet man dagegen im Ausstrichpräparat neben anderen Bakterien auch Diplokokken, so ist es wahrscheinlich, daß diese den Tod verursacht, daß sich aber die anderen bei der Injektion in alle Organe gelangten Bakterien in dem durch die Pneumokokken geschwächten Tierkörper vermehrt haben. Um die Pneumokokken rein zu erhalten, impft man mit einem Organstückchen eine andere Maus, doch subkutan mit der Öse, damit den Saprophyten diesmal ungünstigere Vermehrungsbedingungen geboten werden.

Ferner wird pneumonische Lunge von einer Sektion geschnitten und die Schnitte auf Deckgläser aufgeklebt.

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe. b.

Auf den Gelatineplatten sind sehr viele und verschiedenartige Kolonien gewachsen. Bei 60-facher Vergrößerung fallen besonders solche mit langen Ausläufern auf, die sich durch mehrere Gesichtsfelder erstrecken und knäuel- oder zopfförmig gestaltet sind. Bei starker Vergrößerung findet man, daß es Stäbchen sind. Man legt von einer Stelle, wo sicher keine andere Kolonie liegt, Gelatinestich- und strich, Agarstich- und strich, Kartoffel-, Milch- und Bouillonkultur an. — Auf den Agarplatten sind keine derartigen Kolonien zu sehen; die Bakterien sind auch darauf gewachsen, doch sind ihre Kolonien, wie die der meisten Mikroorganismen, auf Agar viel weniger charakteristisch als auf Gelatine, manchmal bilden sie einen feinen Schleier über die ganze Platte.

Das Rinderserum wird wie gestern sterilisiert.

33. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. i.

Wie am 32. Tag.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. d.

Auf neugewachsene verflüssigende Kolonien werden Kaliumpermanganatkristalle gelegt.

XV. Übung: Pneumokokken. d.

Auf den aus der Maus angelegten Kulturen ist das früher beschriebene Wachstum erfolgt. Die Kolonien werden weiter untersucht. Besonders ist bei der Bouillon darauf zu achten, ob nur Pneumokokken darin gewachsen sind.

Die gestern angefertigten Schnitte werden von Paraffin befreit und in der früher geübten Weise teils mit Fuchsin, teils nach Gram unter Vorfärbung mit Lithionkarmin, teils nach Weigert (IX. Übung, c. S. 45) ebenfalls unter Vorfärbung mit Lithionkarmin gefärbt und zuerst bei schwacher, dann bei starker Vergrößerung betrachtet. Die Alveolen sind von einem an Epithelien, roten und weißen Blutkörperchen mehr oder minder reichen Exsudat ausgefüllt; das Fibrin, das bei der Weigertschen Färbung in der gleichen dunkelvioletten Farbe wie die Kokken gefärbt ist, bildet in ihnen dichte Netze, die miteinander durch Fäden, die die Alveolarwand durchsetzen, in Verbindung stehen. In dem Exsudate sind zahlreiche Pneumokokken sichtbar, besonders da, wo es zellreich ist, da die Leukocyten von den Kokken angelockt werden. Im Stadium der grauen Hepatisation ist ausgebreitete Phagocytose zu sehen. In den Fuchsinpräparaten sind manchmal die Kapseln der Kokken mitgefärbt.

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe. c.

Die Gelatine wird von manchen Bakterien dieser Gruppe verflüssigt, von anderen nicht. Stets gehen aber von dem Stich zahlreiche Äste in den Nährboden. Die Agar- und Kartoffelkulturen sind uncharakteristisch; die Bouillon ist gleichmäßig getrübt, die Milch geronnen.

XVIII. Übung.

Zum Schlusse des ersten Teiles wird dem Praktikanten eine Maus übergeben, die an einer Infektionskrankheit gestorben ist, deren Erreger ihm noch unbekannt ist. Seine Aufgabe ist es, den betreffenden Mikroorganismus herauszuzüchten und seine ätiologische Bedeutung nachzuweisen.

Ferner ist das Rinderserum wie vorher zu sterilisieren.

In den nächsten Tagen sind die von der Desinfektion stammenden Kulturen bis zum 7., die Bouillon bis zum 21. Tage zu beobachten,

ferner sind die Wasserplatten am 7. Tage nochmals zu zählen. (Um die mit Permanganat bedeckten Kolonien scheiden sich manchmal Kristalle ab.) Beide können dann beseitigt werden.

34. Tag.

Fortsetzung der Übung XVIII.

Das Rinderserum wird ohne weiteren Zusatz in sterile Reagenzgläser verteilt, bei 70° schräg erstarren gelassen und in den Brutschrank gestellt; sollten sich Keime entwickeln, so wird das Röhrchen ausgeschaltet.

Anfertigen von Beize zur Geißelfärbung. 1) Nach Peppler: 20 g Tannin wird in 80 ccm dest. Wasser im Wasserbad unter gelindem Erwärmen gelöst, dann auf etwa 20° abgekühlt; hierauf fügt man langsam in kleinen Portionen 15 ccm einer 2,5 % Chromsäure (frei von Schwefelsäure) zu und läßt nicht unter 18° stehen. 2) Nach Zettnow: a) Antimonbeize: Man löst 2 g Tartarus stibiatus in 40 ccm Wasser und 10 g Tannin in 200 ccm Wasser, erwärmt letzteres auf 50—60°, setzt 36—37 ccm von ersterem zu und erhitzt, bis sich der entstehende Niederschlag vollkommen klar gelöst hat. Dann entnimmt man eine kleine Probe in ein Reagenzglas und stellt es in kaltes Wasser. Die Probe muß 5—8 Minuten nach dem Erkalten trübe werden, doch nicht zu stark; bleibt sie klar, so setzt man noch 1 ccm der Brechweinsteinlösung, wird sie milchweiß, etwas festes Tannin zu der Hauptmasse. Dann muß sich die Beize beim Erwärmen auf 75—80° völlig klären, und nach dem Erkalten keinen sich absetzenden Niederschlag geben. — b) Äthylaminsilber: Man macht sich gesättigte wässerige Silbersulfatlösung (2—3 g mit 200 ccm dest. Wasser übergießen und einige Zeit umschütteln), gießt davon etwas in ein Reagenzglas, fügt das gleiche Volumen Wasser dazu und gibt tropfenweise von einer 33 % Äthylaminlösung so viel dazu, bis der zuerst entstehende Niederschlag sich wieder klar gelöst hat. — c) 2 % Osmiumsäure (ganz wenig, weil teuer). — Alle diese Lösungen sind lange haltbar. Anfertigen von Karbolgentianaviolett (analog wie Karbolfuchsin).

Für den übernächsten Tag ist $^1/_2$ l Milch zu besorgen; ferner ist je eine Kultur von Typhus, Pyocyaneus und Prodigiosus auf schrägem Agar anzulegen und die beiden ersten bei 37°, die letzte bei 22° aufzubewahren. Außerdem ist etwas Pferdeserum zu besorgen (XXI a).

II. Hälfte des Kurses.

36. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. b.

Das vor etwa 3 Wochen infizierte Meerschweinchen wird gewogen, um den Gewichtsverlust festzustellen, und mit Chloroform getötet. Die Sektion muß mit sterilen Instrumenten besonders sorgfältig vorgenommen werden, da die Tuberkelbazillen sehr langsam wachsen und infolgedessen leicht überwuchert werden. Die Infektionsstelle ist, wenn Material unter die Haut gelangt ist, aufgebrochen. Die vergrößerten Inguinaldrüsen sind dann auch von außen gut zu fühlen. Nach der Eröffnung findet man die Infektionsstelle stark verkäst, die Inguinaldrüsen von verkästen Knötchen durchsetzt. Ist kein Material unter die Haut gelangt, so fehlen diese Veränderungen. Die Bauchorgane, besonders Leber und Milz, sind stark vergrößert und mit Tuberkeln durchsetzt; die großen Herde in diesen Organen haben Ähnlichkeit mit anämischen Infarkten. Das Netz hat sich zusammengerollt und ist im Innern zu einer käsigen Masse umgewandelt, außen mit Knötchen besetzt. Das Peritoneum und seine Lymphdrüsen sind ebenfalls stark erkrankt. Auch in der Lunge sind graue Tuberkel sichtbar. Die Organe werden herausgenommen und mikroskopisch (Ausstrich und Schnitt) und kulturell untersucht. Die Färbung im Ausstrichpräparate geschieht nach Ziehl (s. VII. Übung. a). Man sieht zwischen den blau gefärbten Zellen viele Tuberkelbazillen. Zur kulturellen Untersuchung schneidet man einen etwa linsengroßen Herd mit einer sterilen Schere in viele sehr kleine Stücke und verreibt sie mit der Öse auf einem der bei 70° erstarrten Serumröhrchen. In dieser Weise legt man 5 bis 6 Kulturen an. Die Röhrchen werden mit Paraffin zugeschmolzen und in den Brutschrank gestellt. Außerdem verreibt man Organstückchen auf ausgegossene Glyzerinagarplatten. Damit diese nicht austrocknen, stellt man sie umgekehrt in eine große Schale, auf deren Boden man einen mit Sublimatlösung getränkten Wattebausch bringt. Täglich muß kontrolliert werden, ob noch genügend Flüssigkeit vorhanden ist. Brutschrank.

Der Rest der Organe wird in Sublimat fixiert: die Stücke, die nicht breiter als $^1/_2$ cm sein dürfen, kommen für 5 Stunden in konzentrierte Sublimatlösung, dann in 60 % Alkohol, dem Jod bis zu madeiraähnlicher Farbe zugesetzt worden ist, so lange, bis er sich nicht mehr entfärbt (mindestens 48 Stunden), dann wie früher in 60 %, 96 %, abs. Alkohol und werden in Paraffin eingebettet.

In der gleichen Weise kann man den Typus bovinus (Perlsuchtbazillen) untersuchen. Die Kultur gelingt am besten nach Meerschweinchenpassage. Die Bazillen wachsen jedoch bedeutend zarter; mikroskopisch sehen sie in der Reinkultur etwas kürzer und plumper aus.

XIII. Übung: Herstellung von Typhusserum. b.

Es wird $^2/_{10}$ abgetötete Kultur intravenös injiziert.

XIX. Übung: Prodigiosus. Pyocyaneus. a.

Die Kenntnis des Bac. prodigiosus ist notwendig, da dieser Mikroorganismus wegen seines charakteristischen Wachstums und seiner Unschädlichkeit vielfach zu Versuchen verwendet wird. — Man gießt aus einer Reinkultur Agar- und Gelatineplatten und legt Agarstich und -strich, Gelatinestich, Bouillon- und Kartoffelkultur an; Aufbewahrung bei 23°.

Der Bac. pyocyaneus ist als Erreger des grünen Eiters wichtig. Er steht dem früher (XIII. Übung) aus Wasser gezüchteten Bac. fluorescens sehr nahe. — Dieselben Kulturen wie bei Bac. prodigiosus. Aufbewahrung bei 37°, Gelatine bei 23°.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. a.

Die Züchtung der menschenpathogenen Anaëroben macht dem Anfänger oft Schwierigkeiten; infolgedessen sollen die Methoden zunächst an einer leichter züchtbaren Art geübt werden. Wir nehmen Buttersäurebazillen, die in Milch und Erde sehr verbreitet sind. Um ihre Züchtung zu erleichtern, werden sie zunächst angereichert. — Man füllt eine Flasche mit Milch, bringt etwa 1 g Erde hinein, kocht 30 Min. im Wasserbad (vom ersten Aufkochen an gerechnet), und verschließt während des Erkaltens mit einem Kork. Dadurch werden die sporenfreien Arten getötet, während die Sporen der Buttersäurebazillen (und der Heubazillen) am Leben bleiben. Die Flasche kommt in den Brutschrank und wird in einen Untersatz gestellt, da sie meist infolge der gebildeten Gase überläuft. Ferner wird ein Papiertrichter darüber gestülpt, um ein Verspritzen der Flüssigkeit zu verhüten. — Der Kork darf nicht allzufest sitzen, da er sonst herausgeschleudert wird.

XXI. Übung: Präzipitine. a.

Einem Kaninchen wird 1 ccm Pferdeserum intravenös injiziert (Hyperämisieren nur durch Reiben oder Wärme [s. S. 42]). (Besser nimmt man mehrere Tiere, da die Antikörperbildung ungleich ausfällt und manche die späteren Injektionen schlecht vertragen.)

Für die nächsten Tage ist Zuckeragar und Gelatinezucker ($1^1/_2$ % Traubenzucker), sowohl in Röhrchen mit 15 ccm („in hoher Schicht" für den 38. Tag), als auch in solchen in gewöhnlicher Menge nötig; außerdem Zuckerbouillon.

Ferner werden 3 Kulturen des Vibrio auf schrägem Agar angelegt.

37. Tag.

XIX. Übung: Prodigiosus. Pyocyaneus. b.

Auf sämtlichen Prodigiosuskulturen ist Wachstum roter Kolonien erfolgt; die Plattenkolonien sind klein, die Gelatine wird verflüssigt, die Bouillon gleichmäßig getrübt. Im hängenden Tropfen sind sehr kleine, fast kugelförmige Bazillen zu sehen, zwischen denen minimale Partikelchen des roten Farbstoffes liegen. Dieser ist in Wasser unlöslich, weshalb nur die Kolonien, nicht ihre Umgegend rot gefärbt sind. — Eigenbewegung ist nur bei ganz jungen Kolonien wahrzunehmen. In Fuchsinpräparaten sieht man sehr kurze Bazillen: nach Gram sind sie unfärbbar.

Die Pyocyaneusbazillen bilden einen grünblauen Farbstoff, der in die Umgebung diffundiert. Die Gelatine wird verflüssigt, die Kartoffel braun gefärbt, die Bouillon gleichmäßig getrübt und ein Häutchen darauf gebildet. In hängenden Tropfen sieht man schlanke kurze Stäbchen mit lebhafter Eigenbewegung. Dasselbe Aussehen zeigen sie im Fuchsinpräparat. Die Färbung nach Gram fällt negativ aus.

Die Kulturen werden noch einige Tage beobachtet und dann beseitigt bis auf die, die, neu abgeimpft, in die Sammlung kommen.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. b.

Im Brutschrank verrät ein lebhafter Gestank das Wachstum der Buttersäurebazillen. Die Milch hat sich in Käse und Molke getrennt; aus letzterer steigen Gasblasen auf. Man nimmt mit einer sterilisierten Pipette etwas von der Molke heraus und untersucht im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat. Man sieht zahlreiche bewegliche (doch hie und da auch unbewegliche) große plumpe Stäbchen (Fig. 25). manchmal mit Sporen.

Fig. 25. Buttersäurebazillen. Ausstrich aus Milch. 800 : 1.

Aus dem Material werden Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten gegossen.

Bei der Züchtung von Anaëroben mache man sich zweierlei zur Regel: Erstens arbeite man möglichst rasch, um die Bazillen dem Luftsauerstoff nicht zu lange auszusetzen. Zweitens gehe man stets von großen Mengen Material aus: viele Anaëroben sind anfangs schwer zu züchten; ist einmal die Kultur gelungen, so ist das Weiterzüchten leicht. Die Entfernung des Sauerstoffes geschieht am zweckmäßigsten entweder durch Absorption vermittels alkalischer Pyrogallussäure oder durch Verdrängen mit Wasserstoff. Der Anfänger übe beides. Zum Anlegen von Kulturen unter Pyrogallussäure rollt man zunächst Plastillin zu Stangen von der Länge des Umfanges der unteren Hälfte einer Petrischale aus, legt sie ringförmig auf eine Glasscheibe, stellt in die Mitte ein Glasschälchen mit so niederem Rande, daß dieser nicht eine darüber gestülpte Petrischale berührt, und legt etwas Watte

hinein. Dann macht man sich eine Lösung von 7—8 g Ätzkali in 30 ccm dest. Wasser und eine von 5 g Pyrogallussäure in 10 ccm heißem dest. Wasser und gießt von letzterer je 2 ccm in die Schälchen. Nun gießt man die Platten; in das erste Röhrchen bringt man mit der Pipette einen Tropfen und legt daraus wie gewöhnlich 3 Verdünnungen an. Sobald der Agar fest ist, gießt man je 5 ccm Kalilauge zur Pyrogallussäure, stülpt die gegossenen Platten (ohne Deckel) darüber auf den Ring und drückt das Plastillin fest. — Hat man keine passenden kleinen Schälchen, so kann man auch einen Wattebausch direkt auf die Glasscheibe legen und mit den Flüssigkeiten übergießen.

Fig. 26. Apparat zur Züchtung unter Wasserstoff. Rechts Kippscher Apparat, links Botkinscher Apparat; in letzterem das Drahtgestell zum Einsetzen der Platten. Zwischen beiden Flasche zur Absorption von Sauerstoff.

Die Züchtung unter Wasserstoff ist teurer und für viele Zwecke unbequemer. Es ist dazu nötig (Fig. 26): der Kippsche Apparat, eine Glasglocke, die in einer Schale auf einigen Blöcken sitzt (Botkinscher Apparat) und unter ihr ein Drahtgestell mit mehreren Etagen, auf deren jede man eine Petrischale setzen kann. Der Kippsche Apparat besteht aus einer oberen großen Kugel, die mittels eines langen Fortsatzes durch eine untere große Kugel in eine Halbkugel eintaucht. In die untere Kugel kommen Zinkstückchen (Fig. 26). Dann wird die obere aufgesetzt und 25% Schwefelsäure eingegossen. Wird der Hahn geöffnet, so steigt diese zum Zink auf und es strömt Wasserstoff aus. Durch eine dazwischen gesetzte Flasche mit alkalischer Pyrogallussäure

kann dieser von Spuren von Sauerstoff befreit werden. Der Aufsatz auf den Kippschen Apparat dient zum Schutz gegen Verspritzen von Säure. Dann wird die Schale des Botkinschen Apparates mit Paraffinum liquidum so weit ausgegossen, daß der Innenraum der Glocke von der Luft abgeschlossen ist. Die Verbindung stellen nur zwei Kautschukschläuche her, von denen der eine in den oberen, der andere in den unteren Teil der Glocke einmündet. Mit dem äußeren Ende des ersteren wird der Kippsche Apparat verbunden, an den letzten Schlauch ein Glasrohr angesteckt. Die Kautschukschläuche sollen weich sein, damit sie von außen herausgezogen werden können; um sie zu stützen, führt man einen dünnen Draht durch jeden. Dann gießt man wie vorher die Platten, setzt sie offen auf das Drahtgestell, deckt die Glocke (vorsichtig, damit die Schläuche nicht umfallen) darüber und leitet Wasserstoff ein. Dieser verdrängt die atmosphärische Luft. Nach 20 Minuten prüft man, ob diese vollständig entwichen ist: Man stülpt ein Reagenzglas über das ableitende Glasrohr, zieht es ab, hält sofort den Daumen darauf und zündet das ausströmende Gas in einiger Entfernung vom Apparate an. Gibt es einen kleinen Knall, so ist es noch mit Sauerstoff gemischt; brennt es ruhig, so ist alle Luft verdrängt. Dann schließt man den Hahn des Kippschen Apparates und zieht die Schläuche vorsichtig aus der Glocke. Da auch Paraffinum liquidum etwas Sauerstoff durchläßt, so kann man eine schwache Lösung von frisch bereitetem pyrogallussauren Kali in die Schale gießen, bis diese den unteren Rand der Glocke erreicht und außen und innen das Paraffinum liquidum darauf schwimmt.

Die Zuckergelatineplatten werden bei 23°, die Zuckeragarplatten im Brutschrank aufbewahrt.

XXII. Übung: Bakteriolyse. a.

Zur Gewinnung bakteriolytisch wirkenden Vibrionenserums wird eine Agarkultur abgeschwemmt, durch Erhitzen auf 60° abgetötet und einem Kaninchen, das man zuvor gewogen hat, intravenös injiziert.

Für den nächsten Tag sind Schrägagarkulturen von Typhus, Milzbrand, Geflügelcholera, Prodigiosus, Pyocyaneus, Vibrio anzulegen; die Sammlungskulturen, von denen abgeimpft wurde, sind noch aufzubewahren.

38. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. c.

Aus Blöcken von menschlicher Lungentuberkulose werden Schnitte angefertigt und auf Deckgläser aufgeklebt.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. c.

Von außen kann man sehen, daß auf den Agarplatten üppiges, auf den Gelatineplatten fast kein Wachstum stattgefunden hat. Man öffnet die Pyrogalluskulturen resp. die Glasglocke durch vorsichtiges Abheben. Die Platten werden herausgenommen und bedeckt. Man sieht auf ihnen und den Pyrogallolplatten sehr zahlreiche graue Kolonien, die Gas gebildet haben. Auf der dritten und vierten Platte, wo sie mehr einzeln

stehen, haben sie einen Durchmesser von 1 bis 2 mm. Bei 60-facher Vergrößerung erscheint die Kolonie granuliert, der Rand fein granuliert bis stark gezackt. Einzelne Bazillen sind eben noch sichtbar. Die tiefliegenden Kolonien sind wetzsteinförmig. Im gefärbten Deckglaspräparat sieht man lange plumpe Stäbchen. Von mehreren derartigen Kolonien legt man mit einer langen Platinnadel Stichkulturen in Zuckeragar und Zuckergelatine in hoher Schicht an. Von dem oben geschilderten Wachstum und Aussehen der Buttersäurebazillen findet man oft Abweichungen; die Bazillen variieren sehr stark, weshalb sie zu Studien über Variabilität ein dankbares Material bieten.

XXIII. Übung: Involutionsformen. a.

Während im allgemeinen die Bakterien derselben Art das gleiche Aussehen haben, wachsen sie unter bestimmten Bedingungen zu merkwürdigen gequollenen und verzerrten Formen aus. Derartige „Involutionsformen" kann man leicht durch Zusatz von Lithiumchlorid zum Nährboden darstellen. Man setzt also zu je 7 Röhrchen mit 10 ccm Agar so viel einer 10 % LiCl-Lösung, daß der Nährboden 1, 2 und 3 % LiCl enthält, und sterilisiert im Dampftopf $^1/_2$ Stunde. Dann legt man schräg und beimpft mit jeder der gestern angelegten Kulturen drei Röhrchen. Außerdem legt man eine Kultur von Prodigiosus auf Agar an und stellt sie in den Brutschrank (37 °).

39. Tag.

XII. Übung: Tuberkulose. d.

Wenn auf den Nährboden üppiges Wachstum erfolgt ist, kann es sich nur um Verunreinigungen handeln; derartige Kulturen sind mikroskopisch zu untersuchen und zu beseitigen.

Die aufgeklebten Schnitte kommen in Xylol, abs., 96 %, 60 % Alkohol, Wasser und werden dann folgendermaßen gefärbt: Delafieldsches Hämatoxylin 20 Minuten; Auswaschen in Wasser $^1/_2$ Stunde; Färben in Ziehlschem Karbolfuchsin im Brutschrank 1 Stunde. Salzsäurealkohol (1 % Salzsäure in 70 % Alkohol) 1 Minute; 70 % Alkohol 2—3 Minuten; Auswaschen in fließendem Leitungswasser 10 Minuten; dest. Wasser, 70 %, 96 %, abs. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Die Bazillen sind rot, die Zellkerne blau gefärbt die Einzelheiten sind an der Hand eines Lehrbuchs der pathologischen Histologie zu studieren.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. d.

In den gestern angelegten Kulturen ist längs des Impfstichs fadenförmiges Wachstum mit Perlen erfolgt, das aber nicht bis zu der Oberfläche reicht. Auch Gasbildung ist eingetreten. Zur Anlegung von Zuckerbouillon- und Milchkulturen kocht man zunächst einige Röhrchen aus, um den Sauerstoff zu vertreiben, impft sie nach dem Abkühlen mit einer Öse einer Agarstichkultur und stellt sie unter Sauerstoffabschluß entweder unter die Wasserstoffglocke oder in ein Glasgefäß, auf dessen mit Filtrierpapier bedeckten Boden man genau wie neulich eine Lösung von pyrogallussaurem Kali gießt. Der Wattestopfen der Röhrchen darf nicht zu fest sitzen. Auch kann man die Zucker-

bouillon mit Paraffinum liquidum oder Schweineschmalz einige Zentimeter hoch übergießen, damit zusammen sterilisieren und dann beimpfen. Derartige Kulturen brauchen nicht besonders anaërob gestellt zu werden; doch eignet sich die Methode nicht für sehr empfindliche Anaëroben. Brutschrank.

XXIII. Übung: Involutionsformen. b.

Die gestern angelegten Kulturen werden im fuchsingefärbten Deckglaspräparat untersucht. Zum Vergleich sind aufbewahrte Präparate der normalen Bazillen zu betrachten. Die auf dem Lithiumchloridagar gewachsenen Bazillen haben Fäden von unregelmäßiger Dicke gebildet, andere sind zu kugel-, hantel-, hefen-, flaschen- oder wurstartigen Formen umgewandelt (Fig. 27 und 28). Treten solche Gebilde noch wenig hervor, so sind die Kulturen in den Brutschrank zu stellen und an den nächsten Tagen (bis zu 14 Tagen) nochmals zu untersuchen.

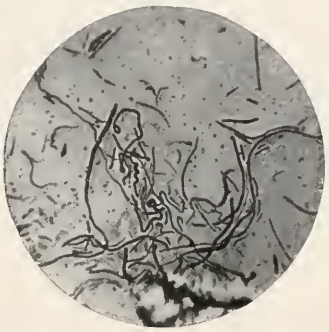


Fig. 27. Involutionsformen von Choleravibrionen. 800 : 1.

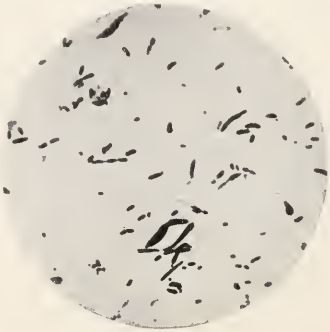


Fig. 28. Involutionsformen von Bac. prodigiosus. 800 : 1.

Schöne Involutionsformen findet man auch in alten Kulturen. Man untersucht daher die Kulturen, von denen am 37. Tage abgeimpft wurde, besonders die Milzbrand- und die Vibrionenkultur mikroskopisch.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. a.

Die Bazillen des malignen Ödems sind in gedüngter Gartenerde verbreitet. Sie besitzen besonders in schweren Wunden hohe pathogene Eigenschaften. Man legt einem Meerschweinchen an einer Seite des Bauches eine größere Hauttasche an, die bis in die Muskulatur dringt, und bringt etwa $^1/_2$ g fein verriebene Gartenerde hinein; sicherer ist, diese erst zu sterilisieren und mit Reinkultur zn vermischen.

Ferner sind für den nächsten Tag zum Zwecke der Geißelfärbung Schrägagarkulturen von Typhusbazillen und Vibrionen anzulegen und Jauche mit großen Spirillen zu besorgen.

40. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. e.

In der Bouillon sieht man kleinflockige Trübung und Gasbläschen. Die Milch ist in derselben Weise zersetzt wie die, die als Ausgangs-

material gedient hatte. Die Gläser werden geöffnet, wobei man wieder den starken Geruch nach Buttersäure wahrnimmt, und die Kulturen mikroskopisch untersucht.

In den Gelatinestichkulturen ist längs des Stiches Wachstum kleiner Perlen oder Verflüssigung zu erkennen; das Wachstum ist noch stärker anaërob als in den Agarstichkulturen.

XXV. Übung: Geißelfärbung.

Zum Gelingen der Geißelfärbung sind vor allem reine Deckgläser nötig. Dieselben dürfen noch nicht benutzt gewesen sein. Vor dem Gebrauch sind sie mit Benzin und feiner Leinwand zu reinigen; während und nach dem Reinigen dürfen sie nicht mehr mit den Fingern angefaßt werden, sondern nur noch mit sehr sauberen Pinzetten, die ebenso gereinigt wurden.

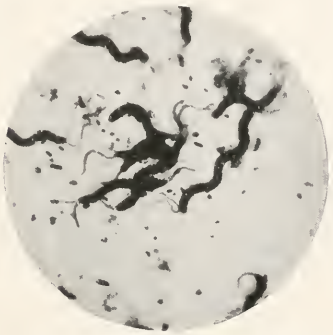


Fig. 29. Spirillen mit Geißeln. 800 : 1.

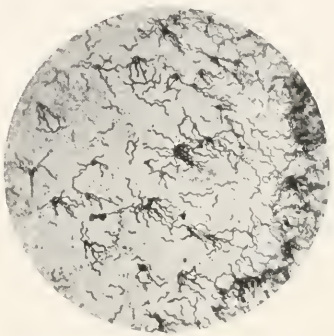


Fig. 30. Typhusbazillen mit Geißeln. 800 : 1.

Die für den Anfänger einfachste Methode der Geißelfärbung ist die nach Peppler. Die Spirillen in Jauche können ohne weiteres gefärbt werden; von den Reinkulturen macht man zunächst dünne Aufschwemmungen in destilliertem Wasser. Diese müssen gut verteilt werden. Man bringt je eine Öse Wasser auf 3 Deckgläser, bringt eine Spur Kultur (ohne den Nährboden zu berühren und nicht aus dem Kondenswasser) in den ersten, von hier mit der Nadel eine Spur in den zweiten und von hier in den dritten Tropfen. Dann läßt man alle drei lufttrocken werden, läßt die Beize durch ein doppeltes Faltenfilter darauf tropfen und 3—5 Minuten ohne Erwärmen einwirken, spült ab und färbt 2 Minuten mit Karbolgentiana nach. Abspülen mit Wasser, Trocknen, Zedernöl. Zunächst färbt man die Spirillen in Jauche, da sich deren Geißeln am leichtesten darstellen lassen, dann die Typhusbazillen und Vibrionen. Man sieht an den Spirillen (Fig. 29) dichte Büschel von Geißeln, und zwar an beiden Enden (lophothrich); die Typhusbazillen (Fig. 30) sind allseitig von vielen wellenförmig geschlängelten Geißeln umgeben (perithrich), die Vibrionen haben meist (Choleravibrionen stets) nur eine endständige Geißel (monothrich). Die Bazillen erscheinen größer als bei dem gewöhnlichen Färbeverfahren. Außerdem sieht man im Gesichtsfeld mehr oder minder zahlreiche abgerissene Geißeln und auch Farbstoffniederschläge. Meist sind nicht

alle Stellen des Präparates gleich gut gefärbt. Ist die Färbung mißlungen, so achte man zunächst darauf, ob man die Vorschrift genau befolgt hat. Meist liegt die Ursache an ungenügend gereinigten Deckgläsern. Außerdem kann die Beize zu jung oder zu alt oder die Bakterienaufschwemmung zu dicht sein.

Ist diese Geißelfärbung gut gelungen, so ist die nach Zettnow zu machen, und zwar gleich an den Vibrionen. Man erwärmt zunächst etwas Antimonbeize in einem mit einer Glasplatte bedeckten Blockschälchen bis zur Klärung, z. B. auf einer 100° heißen dicken Eisenplatte oder einem bedeckten kochenden Wasserbad. Währenddessen macht man Verdünnungen, indem man auf ein Deckglas einen kleinen, auf ein anderes einen großen Wassertropfen macht, zu dem kleinen so viel Agarbelag überträgt, daß er deutlich getrübt ist, und dann in den größeren 1—2 Ösen der Osmiumlösung und 1 Öse der Flüssigkeit aus dem kleinen Tropfen bringt. Nun bringt man aus dem großen Tropfen eine Öse auf ein drittes Deckglas und breitet es mit zwei Strichen der gebogenen Nadel aus. Dann zieht man zweimal durch die Flamme, legt es mit der Schichtseite nach unten in die nunmehr durch Erwärmen klar gewordene Beize und läßt es noch 5—7 Minuten bei derselben Temperatur stehen. Dann nimmt man sie weg, läßt erkalten, bis die Flüssigkeit eben trübe wird, und spült das Deckglas sorgfältig mit Wasser ab, besonders da, wo man mit der Pinzette anfaßt. Hierauf gibt man 3—4 Tropfen der Athylaminsilberlösung darauf und erhitzt, bis die Flüssigkeit stark raucht und die Ränder des Ausstriches nicht nur gelb, sondern schwarz erscheinen, spült ab, trocknet und untersucht in Zedernöl oder Kanadabalsam. Die Bakterien und Geißeln erscheinen schwarz auf klarem Untergrund. Mißlingt die Färbung, so liegt die Schuld meist an ungenügender Reinigung der Deckgläser: oder es wurde nicht sorgfältig genug abgespült oder (falls gelbbraun) ungenügend erhitzt.

41. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. f.

In den Zuckergelatinestichkulturen ist das Wachstum und die Verflüssigung fortgeschritten. Das Glas mit den Zuckergelatineplatten wird geöffnet. Auch in ihnen hat sich Gas gebildet. Die Kolonien der Buttersäurebazillen bestehen bei 60-facher Vergrößerung aus verfilzten Fäden; sie verflüssigen die Gelatine. Einige von ihnen werden mikroskopisch untersucht und auf Zuckeragar und Zuckergelatine in hoher Schicht abgestochen. Außer ihnen können auf der Platte noch andere sporentragende Stäbchen gewachsen sein.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. b.

Die mit malignem Ödem infizierten Meerschweinchen pflegen nach 1—2 Tagen einzugehen. An der Infektionsstelle hat sich eine weit ausgebreitete Schwellung gebildet; Knistern ist selten wahrnehmbar. Da die Verbreitung der Bazillen nicht auf dem Blutwege, sondern auf dem Lymphwege geschieht, so sind in den inneren Organen höchstens vereinzelte Bazillen zu erwarten und das Hauptgewicht auf die Unter-

suchung des Ödems zu legen. An der Infektionsstelle selbst sind sehr viele Arten von Bakterien vorhanden: je weiter weg, desto reiner treten die Ödembazillen hervor. Um daher das Material nicht zu verunreinigen, führt man bei der Sektion (nach Übergießen des Felles mit Alkohol) den Schnitt so, daß er von dem entferntesten Punkt des Ödems zur Infektionsstelle geht und nur die Haut spaltet; dann nimmt man ein neues Messer und präpariert in derselben Weise die Haut ab. Das Unterhautzellgewebe und die Muskulatur sind blutig-serös infiltriert. Einen Teil davon nimmt man heraus; die übrige Leiche läßt man zugedeckt liegen, da die Bazillen auch noch nach dem Tode weiterwuchern. Die Untersuchung im hängenden Tropfen ergibt lebhaft bewegliche große Bazillen von der Größe des Milzbrandbazillus, die meist in Ketten liegen oder lange Fäden bilden. Auch Sporen werden (im Gegensatz zum Milzbrandbazillus) im Tierkörper gebildet. Außerdem finden sich als Verunreinigung mehr oder weniger zahlreiche kleinere Stäbchen und Kokken. Dann werden Deckglasausstrichpräparate mit Fuchsin und nach Gram gefärbt. Die Gramsche Färbung ist nur bei kurzer Entfärbung positiv. Von Kulturen werden Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten mit nicht zu wenig (einige Ösen) Material gegossen und anaërob (d. h. unter Wasserstoff oder in Pyrogallussäuredosen) gestellt. Ferner werden Schüttelkulturen in hoher Schicht angelegt, d. h. es werden 5—6 Röhrchen mit Zuckeragar in hoher Schicht verflüssigt, in das erste einige Ösen Ödem gebracht und wie beim Plattengießen von hier aus das zweite, von diesem aus das dritte infiziert, nun aber nicht ausgegossen, sondern in den Röhrchen erstarren gelassen. Der Rest des Materials wird in Formalin eingelegt und in gewohnter Weise zu Schnittpräparaten weiterbehandelt (s. 48. Tag).

XXVI. Übung: Tetanus. a.

Auch die Tetanusbazillen sind in gedüngter Gartenerde meist vorhanden. Bringt man daher einem Tiere so wenig davon unter die Haut, daß es nicht mehr an malignem Ödem stirbt, so geht es nach etwas längerer Zeit an Tetanus ein. Man impft zu diesem Zweck eine Maus mit einer Öse voll Gartenerde subkutan, über der Schwanzwurzel, doch nicht genau in der Mitte, damit man den beim Menschen seltenen lokalen Tetanus bobachten kann.

Für den nächsten Tag ist wieder etwas Pferdeserum zu besorgen (XXI b).

42. Tag.

Vakat.

43. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. g.

Die aus den Gelatineplatten abgeimpften Kulturen werden betrachtet, ob sie mit den früher gewonnenen übereinstimmen. Ist dies der Fall, so können sämtliche Buttersäurebazillenkulturen (außer den zum Aufbewahren bestimmten) beseitigt werden.

XXI. Übung: Präcipitine. b.

Dem Kaninchen wird wieder 1 ccm Pferdeserum intravenös injiziert.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. c.

Ebenso wie die Buttersäurebazillen können die Ödembazillen stark variieren, weshalb von der folgenden Beschreibung auch Abweichungen vorkommen können.

Die Kolonien auf Zuckeragar sind 1—2 mm groß, die oberflächlichen rund, die tiefliegenden wetzsteinförmig. Bei 60-facher Vergrößerung ist der Rand fein granuliert oder zeigt zahlreiche, dicht verfilzte Ausläufer. Einzelne Bazillen sind eben sichtbar. — Außerdem sind noch andere kleine Bazillen und Kokken gewachsen. Findet man keine Ödembazillen, so untersucht man die nächsten Muskeln des Tieres, wo sie nun in größerer Zahl und reiner vorhanden sind, und gießt nochmals Platten daraus.

Die Ödembazillenkulturen werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. — Aus einigen Kolonien werden Stichkulturen in Zuckeragar und Zuckergelatine (hohe Schicht) gemacht. Ferner werden Bouillonkulturen und Strichkulturen auf erstarrtem Serum (auch Löfflersches Serum kann genommen werden) angelegt und anaërob gestellt.

In den Schüttelkulturen in hoher Schicht haben sich zunächst zahlreiche, weiterhin spärlichere Kolonien in der Tiefe entwickelt und reichlich Gas gebildet. Will man diese abimpfen, so muß man die ganze Agarstange herausholen. Zu diesem Zweck kann man das Reagenzglas nach äußerlicher Desinfektion in einer sterilen Schale mit einem sterilen Instrumente zerschlagen; oder man erhitzt das Reagenzglas erst oben, dann nach unten gehend, bis der Agar direkt am Glase flüssig ist, worauf man ihn in eine sterile Schale austreten läßt. Dann sucht man einzelne Kolonien mit der Nadel abzuimpfen.

Von dem liegengelassenen Tier werden die der Infektionsstelle benachbarten Organe mikroskopisch auf Ödembazillen untersucht. Findet man solche, so legt man die Organe ein, da man das Eindringen der Bazillen auf dem Lymphwege im Schnitt sehr gut verfolgen kann.

XXVI. Übung: Tetanus. b.

Bei der Maus läßt sich bald ein lokaler Tetanus beobachten, der die der Infektionsstelle nächstgelegene Extremität betrifft. In den nächsten Tagen schreitet die Erkrankung auf die übrigen Muskeln fort.

XXVII. Übung: Influenza. a.

Das zähe, glasig aussehende Sputum wird in eine Petrischale ausgegossen; zur Untersuchung werden die eitrigen Partikelchen darin genommen. Die mikroskopischen Präparate färbt man am besten mit stark (etwa 40-fach) verdünntem Karbolfuchsin 5—10 Minuten. Die Influenzabazillen erscheinen dann als sehr kleine Stäbchen, so lang, wie ein Milzbrandbazillus breit ist, welche in typischen Fällen in großen

Mengen in (Fig. 31) oder, zu Zügen angeordnet, zwischen den Leukocyten liegen. Außerdem sieht man, besonders wenn das Sputum aus dem Nasenrachenraum stammt, noch andere Bakterien, Pneumokokken, Streptokokken etc., die aber sämtlich länger oder dicker als die Influenzabazillen sind. — Zur Züchtung wird blutbestrichener Agar verwendet. Man stellt sich diesen her, indem man Agarröhrchen schräg erstarren läßt (ausgegossene Platten werden zu schnell trocken) und sie mit einigen Ösen Blut bestreicht. Das Blut gewinnt man aus der eigenen Fingerkuppe: nach gründlichem Abreiben mit 60 % Alkohol macht man einen schnellen Stich mit einer vorher ganz kurz abgeglühten Stecknadel und vergrößert den heraustretenden Blutstropfen durch Pressen oder Umwickeln des Fingers oder Schlenkern des Armes. — Auch Kaninchenblut oder Taubenblut (Entnahme des ersteren aus einer Ohrvene, des letzteren aus der Flügelvene nach Rupfen und Desinfizieren der Entnahmestelle) ist gut zu verwerten. — Das Blut wird mit der Öse auf den Nährboden übertragen und verrieben. Dann wird eines der eitrigen Partikelchen aus dem Sputum auf mehreren solchen Röhrchen verrieben, indem man mit derselben Öse ohne abzuglühen darüberstreicht. — Ein Kontrollröhrchen mit Blutagar wird mit Streptokokken infiziert; ferner wird etwas Influenzasputum auf einige Röhrchen mit gewöhnlichem Agar verstrichen.

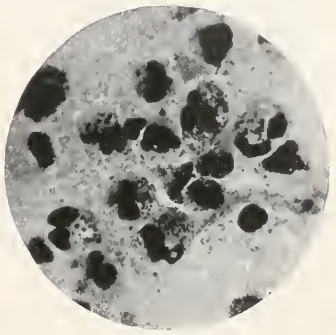


Fig. 31. Influenzabazillen. Ausstrich aus Sputum. 800 : 1.

44. Tag.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. d.

In der Zuckeragarstichkultur hat üppiges Wachstum stattgefunden, das sich vom Stichkanal aus in den Nährboden erstreckt, aber niemals die Oberfläche erreicht. Die Gasbildung ist stark. In der Zuckergelatine ist das Wachstum noch gering. Ferner werden die jetzt drei Tage alten Gelatineplatten untersucht. Die Kolonien sind grau und haben einen Durchmesser von $^1/_2$—1 mm; bei schwacher Vergrößerung sehen sie wie die Gelatinekulturen der Buttersäurebazillen aus. Außerdem sind noch mehr oder weniger zahlreiche verunreinigende Keime gewachsen. Anlegen einiger Stichkulturen.

Aus einer der Agarstichkulturen wird die Agarstange in der vorher (43. Tag) angegebenen Weise entfernt, mit einem sterilen Messer der Länge nach aufgeschnitten und mikroskopisch untersucht. Speziell soll die Kultur auf Geißeln gefärbt werden, was in der früher angegebenen Weise zu geschehen hat. Die Geißeln sind sehr zahlreich und stehen perithrich. Auch Sporen können wie beim Milzbrandbazillus gefärbt werden, wenn man solche im hängenden Tropfen gesehen hat. Will man mit der Reinkultur einen Tierversuch machen, so bringt man sie nicht allein, sondern mit sterilisiertem Quarzsand, durch Ausglühen in einer Porzellanschale sterilisierter Erde u. ä. vermischt ein.

XXVII. Übung: Influenza. b.

Die Influenzakolonien erscheinen auf dem Blutagar als sehr kleine, ganz durchsichtige Pünktchen; auf dem gewöhnlichen Agar fehlen sie; nur selten ist ihnen hier ein kümmerliches Wachstum durch den Schleim und die Symbiose mit anderen Bakterien ermöglicht. Man betrachtet sie am besten mit der Lupe in der früher (V. Übung. c) angegebenen Weise, wobei sie ganz durchsichtig erscheinen. Zum Vergleiche nimmt man das gestern ebenfalls angelegte Röhrchen mit Streptokokken, deren Kolonien etwas getrübt aussehen. Außer den Influenzabazillen sind aus dem Sputum noch einige andere Mikroorganismen gewachsen. Die Influenzabazillen werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Sie erscheinen wieder als sehr kleine Stäbchen, die allerdings öfters zu Fäden auswachsen, und besitzen keine Eigenbewegung. Nach Gram sind sie unfärbbar. Man impft von einigen Kolonien auf gewöhnlichen Agar und auf Blutagar ab.

Ferner ist für den übernächsten Tag Eiter von einer frischen, noch unbehandelten Gonorrhöe und, wenn möglich, von einer Sektion von epidemischer Cerebrospinalmeningitis stammender Eiter oder durch Lumbalpunktion gewonnene Cerebrospinalflüssigkeit zu besorgen; außerdem einige Kubikzentimeter Hammelserum (XXIX, S. 79).

45. Tag.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. e.

Das Gefäß mit der Bouillon- und der Serumkultur wird geöffnet, wobei der intensive Anaërobengeruch auffällt. Die Bouillon ist stark getrübt mit dickem Bodensatz; das Serum ist da, wo die Bazillen wachsen, verflüssigt, wodurch tiefe Löcher entstanden sind.

XXVI. Übung: Tetanus. c.

Die mit tetanusbazillenhaltiger Erde geimpften Mäuse pflegen nach 4 Tagen einzugehen. Wie erwähnt, tritt der Tetanus zunächst lokal auf und verbreitet sich dann auf die übrigen Muskeln. Schließlich tritt die charakteristische Robbenstellung ein: die Vorderbeine sind adduziert, die Hinterbeine gestreckt. Die Bazillen bilden an der Infektionsstelle ein intensives Gift, breiten sich aber nicht über den Körper aus; Untersuchung der inneren Organe ist daher nicht nötig. Nach Abpräparieren der Haut von der Infektionsstelle fertigt man von dieser ein mikroskopisches Präparat an. Man findet darin die Tetanusbazillen als Stäbchen von der Länge eines Milzbrandbazillus, aber dünner, mit an einem Ende stehender Spore (Köpfchenspore oder Trommelschlägelform). Färbung nach Gram ist nur bei der Minderzahl positiv. Außer diesen finden sich noch viele andere Bakterien aller Art darin; andere Stäbchen von größerer Dicke mit Köpfchenformen sind nicht Tetanusbazillen (Fig. 32).

Die Isolierung der Tetanusbazillen ist wegen der Anwesenheit der anderen Bakterien ziemlich schwierig, besonders wenn erstere in geringer Zahl vorhanden sind. Um wenigstens einen Teil der verun-

reinigenden Bakterien, nämlich die nichtsporentragenden, zu entfernen, schabt man möglichst viel von der Infektionsstelle ab, bringt es in ein Reagenzglas, dessen Kuppe man mit sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung gefüllt hat, und hält dies 1 Stunde lang in einem Wasserbade von 65°. Daraus gießt man anaërobe Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten und legt Kulturen in hoher Schicht (wie in Übung XXIV b S. 75) an. Ferner entnimmt man einem Kaninchen einige Kubikzentimeter Blut aus der Ohrvene (nach vorherigem Hyperämisieren zentralwärts aufschneiden), läßt im Reagenzglas bei hoher Temperatur erstarren und legt mit dem Material eine Stichkultur an. Die Zuckergelatineplatten werden mit den aus Bac. botulinus (s. unten Übung XXVIII a) gegossenen Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten zusammen unter Sauerstoffabschluß bei 23°, die Agarplatten im Brutschrank aufbewahrt.

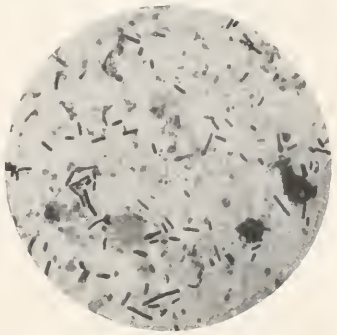


Fig. 32. Ausstrich von der Infektionsstelle einer an Tetanus gestorbenen Maus. Links und etwas rechts von der Mitte schlanke Tetanusbazillen mit Köpfchensporen, unten dicke Erdbazillen, ebenfalls mit Köpfchensporen.

XXVII. Übung: Influenza. c.

Auf den Blutagarröhrchen ist wieder dasselbe Wachstum erfolgt, wie oben beschrieben. Auf dem Agar ohne Blut dagegen ist das Wachstum ausgeblieben. Ist es doch erfolgt, so überzeuge man sich zunächst, ob die Kultur wirklich aus kleinsten Stäbchen besteht: ist dies der Fall, so impft man nochmals auf gewöhnlichen Agar ab, da immerhin Spuren von Blut von der Ausgangskolonie überimpft worden sein und das Wachstum ermöglicht haben können.

XXVIII. Übung: Bac. botulinus. a.

Auch der Bac. botulinus, der Erreger der nervösen Form der Fleischvergiftung, ist ein Anaërobier. Am besten geht man von der Reinkultur aus; doch kann man auch versuchen, ihn aus Schweinekot zu züchten, in dem er schon einmal gefunden worden ist. Man gießt aus der Reinkultur (Entfernen des Agars aus dem Röhrchen ist natürlich nicht nötig; Hineinlangen mit einer Öse genügt) Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten, die man (mit den Tetanusgelatineplatten zusammen) unter Sauerstoffabschluß bei 23° aufbewahrt; ferner legt man eine Zuckerbouillonkultur ebenfalls anaërob (Nährboden erst auskochen und rasch abkühlen), Zuckeragarstich und Zuckergelatinestich an, die bei 37 und 22° aufbewahrt werden, da manche Stämme des Bac. botulinus im Brutschrank nicht wachsen.

XXIX. Übung: Anaphylaxie. a.

Einem oder zwei Meerschweinchen werden 3 ccm Hammelserum intraperitoneal injiziert.

Ferner wird je eine Schrägagarkultur von Rotzbazillen und Milzbrandbazillen angelegt; außerdem ein Glaszylinder, etwa von der Größe eines Meßzylinders zu 100 ccm, mit Watteverschluß versehen und sterilisiert, ebenso einige Seidenfäden zum Unterbinden von Gefäßen.

46. Tag.

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. c.

Etwa 10 Tage nach der letzten Injektion, wenn das Gewicht des Kaninchens wieder ebenso hoch ist wie anfangs, wird das Blut entnommen. Nötig sind dazu sterile Instrumente, der gestern sterilisierte Meßzylinder und die Seidenfäden. Das Tier wird vorsichtig narkotisiert und auf das Gestell mit dem Rücken nach unten aufgebunden. Dann schneidet man die Haare über der Trachea vom Kehlkopf bis zum oberen Ende des Sternums kurz ab, rasiert und desinfiziert. Hierauf werden Schnitte in der ganzen Länge des Operationsfeldes genau in der Mittellinie geführt, bis man die Trachea freigelegt hat. Blutungen werden mit Liq. ferri sesquichlorati gestillt. Gleich neben ihr, nur wenig weiter hinten, findet man die Carotis, die man an der hellroten Farbe und dem Pulsieren erkennt: ihre Dicke beträgt 1—2 mm. Sie wird in möglichster Länge, etwa 3 cm, freipräpariert, dann am oberen Ende doppelt unterbunden; den oberen Faden schneidet man kurz ab, den unteren läßt man lang und schneidet das Gefäß zwischen den Unterbindungen durch. Nun faßt man den langen Faden mit der Pinzette, legt mit seiner Hilfe das zentrale Ende der Carotis in den sterilisierten Glaszylinder und schneidet es mit einer feinen Schere nahe an dem Faden halb durch, worauf das Blut in starkem Strahl in das Glas spritzt. Das Tier wird vollständig entblutet: am Schluß kann man durch Herzmassage der sinkenden Herzkraft nachhelfen. Nach 2 Stunden wird das Blut mit einem sterilen Glasstab von der Wand des Gefäßes abgelöst und über Nacht an einem kühlen Orte aufbewahrt.

XXVI. Übung: Tetanus. d.

Das Blut zeigt den charakteristischen „Anaërobengeruch“. Man erwärmt es 1 Stunde auf 65° und gießt dann Platten daraus, die man ebenfalls anaërob stellt.

XXX. Übung: Meningokokken. a.

Außer dem Micrococcus meningitidis sind noch andere, in früheren Übungen behandelte Mikroorganismen, besonders Pneumokokken, imstande, Meningitis zu erregen. Doch sei im folgenden angenommen, daß das zu untersuchende Material von einer durch erstgenannten hervorgerufenen Erkrankung stammt. Man sieht im Ausstriche aus dem Eiter Kokken, die entweder zu zweien oder zu vieren zusammenliegen; letztere Lagerung ist stets tetraden-, niemals kettenförmig. Auch bei den Diplokokken achte man darauf, ob nicht jedes einzelne Individuum noch eine feine Trennungslinie zeigt, die senkrecht zu der Trennungslinie der beiden Kokken steht. Die einzelnen Individuen sind gegen-

einander abgeplattet, wodurch bei Paaren die Semmel- oder Kaffeebohnenform entsteht. Sehr viele liegen in Leukocyten (Fig. 33). Ferner sieht man oft gequollene, etwas schlechter färbbare Formen. Die Färbung nach Gram ist negativ, eine Eigenschaft, die von den wichtigen bei uns vorkommenden Kokken nur noch der Gonococcus mit ihnen gemeinsam hat. Findet man nichts, so läßt man zunächst im Brutschrank einige Stunden stehen und zentrifugiert. Zum Anlegen von Kulturen bestreicht man mit je einer Öse Agarplatten, Blutagarplatten, Löfflersches Serum. Der beste Nährboden ist eine Mischung von Agar und menschlichem Serum oder Ascitesflüssigkeit zu gleichen Teilen. Diesen macht man sich, indem man mehrere Röhrchen mit etwa 5 ccm Agar auf etwa 43° abkühlen läßt, die andere Flüssigkeit währenddem auf dieselbe Temperatur erwärmt, beides mischt und in Platten ausgießt. Man bestreicht eine derartige Platte mit einer Öse Eiter.

Steht kein von Meningitis cerebrospinalis epidemica stammendes Material zur Verfügung, so legt man dieselben Kulturen aus einer Sammlungskultur an.

Ferner streicht man vom Rachen gesunder Personen mit einem Tupfer ab und bringt es ebenfalls auf Ascitesagarplatten, um meningokokkenähnliche Mikroorganismen zu erhalten.

XXXI. Übung: Gonokokken. a.

Aus dem Trippereiter fertigt man mit Fuchsin, Methylenblau und nach Gram mit Gegenfärbung von Safranin oder Fuchsin gefärbte Deckglaspräparate an; ist er sehr zäh, so bringt man zuerst eine Öse Wasser auf das Deckglas. Das Bild ist genau dasselbe wie bei den Meningokokken (Fig. 34), die Färbung nach Gram ist ebenfalls negativ.

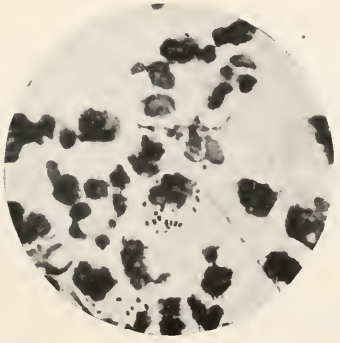


Fig. 33. Meningokokken aus durch Lumbalpunktion gewonnenem Eiter. 800 : 1.

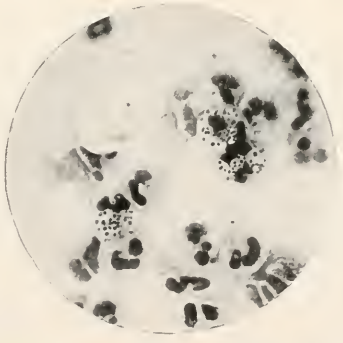


Fig. 34. Gonokokken aus Trippereiter. 800 : 1.

Ferner färbt man mit folgender Lösung: Methylgrün (00 cryst.) 0,15; Pyronin 0,25; 96 % Alkohol 2,5, Glyzerin 20,0, 0,5 % Karbolwasser ad 100; filtra. 2 Minuten. Abspülen mit Wasser. Die Züchtung soll der Anfänger nur mit Eiter einer frischen Gonorrhöe versuchen, bei der er mikroskopisch Gonokokken leicht nachweisen kann; sie geschieht durch oberflächliches Ausstreichen auf Röhrchen mit Ascitesagar.

XXXII. Übung: Rotz. a.

Da das Arbeiten mit Rotzbazillen mit besonderen Gefahren verbunden ist, so kann es nur solchen Praktikanten gestattet werden, deren Zuverlässigkeit erprobt ist.

Von der gestern angelegten Rotzkultur werden 2 Ösen in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und 1 ccm davon einem männlichen Meerschweinchen (die Hoden sind von außen deutlich zu fühlen) intraperitoneal injiziert (vgl. VII. Übung a S. 38). Die Injektion geschieht wieder mit abgestumpfter Kanüle; damit kein Hautgeschwür entsteht, ist die Spitze vor der Injektion mit etwas mit der Pinzette gehaltener Watte abzuwischen. Die Injektionsstelle ist mit Collodium zu verkleben; ein Verstreuen der Streu aus dem Käfig ist zu verhindern. Die erste Krankheitserscheinung ist die Hodenschwellung; da sie diagnostisch sehr wichtig ist, sind die Hoden täglich abzutasten.

Ferner ist eine weiße Maus mit einer kleinen Öse Milzbrand subkutan an einer Stelle zu infizieren, unter der nicht direkt Knochen liegt, da die Infektionsstelle zu Schnittpräparaten verwendet werden soll (XXXV S. 87).

Außerdem sind für den nächsten Tag 15—20 ccm steriles defibriniertes Rinderblut zu besorgen (XXXIII a S. 83), ferner Pferdeserum (XXX b S. 83).

Für den 50. Tag sucht man aktinomykotischen Eiter zu erhalten, am leichtesten aus dem Schlachthof.

47. Tag.

XIII. Übung: Herstellung von Typhusserum. d.

Das ausgeschiedene Serum wird in sterile Reagenzgläser verteilt.

XXII. Übung: Bakteriolyse. b.

Wenn das Kaninchen sein erstes Gewicht wieder erreicht hat, wird ihm eine ganze Öse Vibrionenkultur intravenös injiziert.

XXIV. Übung: Malignes Ödem. f.

Die Gelatinestichkulturen haben sich in der Tiefe verflüssigt und bilden unten in der verflüssigten Zone einen Bodensatz. — Die sämtlichen Kulturen können beseitigt werden.

XXVI. Übung: Tetanus. e.

Auf den Agarplatten sind infolge der Erhitzung nur sporentragende Stäbchen gewachsen. Die Tetanuskolonien sind, je nach dem Befund im mikroskopischen Präparate, mehr oder minder spärlich. Bei 60-facher Vergrößerung sieht man von einem dichten Zentrum dünne Fäden radiär ausgehen. Verdächtige Kolonien werden im gefärbten Präparate untersucht und, wenn sie aus Stäbchen mit Köpfchensporen bestehen, auf Mäuse übergeimpft. Da auf diese Weise Gift mitübertragen wird, pflegen die Tiere wesentlich schneller zu erkranken und einzugehen als bei Impfung mit Erde.

Die Gelatineplatten werden erst später untersucht.

XXX. Übung. Meningokokken. b.

Auf den Ascites- und Blutagarplatten erscheinen die Meningokokkenkolonien etwa 2 mm groß und sehr hell grau, nicht gelblich oder weiß: gegen das Licht gehalten und mit der Lupe untersucht, sind sie fast so durchsichtig wie Influenzakolonien. Bei 60-facher Vergrößerung erscheinen sie fein granuliert. Auf dem Löfflerschen Serum haben sie dasselbe Aussehen. Dagegen ist das Wachstum auf den Agarplatten in der ersten Generation meist spärlich. — Bei der Anfertigung des gefärbten Deckglaspräparates lassen sie sich leicht verreiben; man sieht wieder Diplokokken von der charakteristischen Gestalt, aber ungleicher Größe, oft noch mit einer feinen, senkrecht zur ersten stehenden Trennungslinie, Tetraden und Verbände solcher. Die Färbung nach Gram ist negativ. — Man legt Gelatinestich, Agarstich und Agarstrich an. — Herstellung von Zuckernährboden: Man löst 10 % Maltose resp. Dextrose resp. Lävulose und eventuell noch andere Zuckerarten in Lackmuslösung, erhitzt 2 Minuten auf 100° und fügt nach dem Abkühlen zu je 10 ccm 0,2 ccm Normalsodalösung hinzu. Dann macht man sich in der angeführten Weise Ascitesagar, jedoch mischt man diesmal 3,5 ccm Ascitesflüssigkeit und 10 ccm Agar und sofort 1,5 ccm der Zuckerlösung. Ausgießen in eine Petrischale. Beimpfen oberflächlich mit 1 Öse der Kultur.

Außerdem untersucht man mit Meningokokkenserum auf die Agglutinabilität, wobei man den Versuch zur Kontrolle auch mit normalem Pferdeserum vorzunehmen hat.

Auf den Platten vom Rachenabstrich sucht man nach gramnegativen Kokken (kleine Kolonien, meist grau und trübe) (vor der Färbung zwecks Wiederfinden auf der Rückseite mit Tinte umranden!). Hat man eine solche gefunden, so impft man sie sofort auf ein Röhrchen mit Ascitesagar und untersucht, wenn man genügend Material hat, auf den anderen Nährböden weiter.

XXXI. Übung: Gonokokken. b.

Die Kolonien haben einen Durchmesser von $^1/_2$—1 mm, sind rund und grau. Bei 60-facher Vergrößerung erscheinen die Kolonien durchsichtig tautröpfchenförmig, der Rand sehr fein granuliert; auch Kulturen auf schrägem Serumagar sind bei dieser Vergrößerung zu betrachten, indem man das Röhrchen mit der Agarseite nach oben unter das Mikroskop legt. Im gefärbten Deckglaspräparate sieht man wieder semmelförmige Diplokokken oder Tetraden. Abimpfen auf Ascitesbouillon (Ascitesflüssigkeit und Bouillon zu gleichen Teilen). — Um sich zu überzeugen, ob es wirklich Gonokokken sind, impft man außerdem einige Kolonien auf Agar über, auf dem kein Wachstum erfolgen darf.

XXXIII. Übung: Hämolyse. a.

Zur Darstellung hämolytischen Serums werden einem Kaninchen 15—20 ccm defibriniertes Rinderblut intraperitoneal injiziert.

XXXIV. Übung: Züchten von Typhusbazillen aus Stuhl und Wasser. a.

Herstellung des Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragars nach v. Drigalski-Conradi: 0,75 kg gehacktes Pferdefleisch

werden mit 2 l Wasser übergossen und über Nacht stehen gelassen; oder: Herstellung des Fuchsinsulfitagars nach Endo: a) Herstellen von 1000 ccm neutralisierten 3 % Agars mit 1 % Pepton und ½ % Kochsalz; b) Übergießen von 10 g Fuchsin mit 100 ccm 96 % Alkohol, umschütteln, 20 Stunden stehen lassen; oder: Herstellen des Löfflerschen Malachitgrünagars: Herstellen von 1 l Bouillon mit ½ Pfund Fleisch wie früher, aber ohne Pepton und Kochsalz; dazu kommen nach dem Sterilisieren 30 g Agar. Löst sich dieser beim Kochen schlecht, so gibt man 7 ccm Normalsalzsäure zu, die gleich nach dem Auflösen durch 7 ccm Normalkalilauge neutralisiert werden. Darauf wird mit Natriumkarbonat für Lackmus neutralisiert, 25 ccm Normalsodalösung zugesetzt und aufgekocht. Zu der kochend heißen Masse setzt man 100 ccm einer 10 % Nutroselösung und sterilisiert nach 2 Stunden im Dampftopf. — Für den nächsten Tag ist Rindergalle aus dem Schlachthof zu besorgen.

Herstellung von 2½ % Glyzerinbouillon zur Tuberkelbazillenzüchtung; die Reaktion muß so sein, daß rotes Lackmuspapier (Postpapier) gebläut, blaues gerötet wird. Je 50 ccm kommen in ein Erlenmeyerkölbchen zu 100 ccm Inhalt.

Für den nächsten Tag ist je eine Schrägagarkultur von Typhus, Coli (XXXIV) und Staphylokokken (XXXV) anzulegen; ferner ist etwas Pferdeserum zu besorgen.

48. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. e.

Auf den Serumkulturen hat sich, wenn keine Verunreinigung eingetreten ist (vgl. VII. Übung d. 39. Tag, S. 71), ein feiner matter Belag gebildet. (Ist kein Wachstum erfolgt, so impft man von den Stellen ab, wo man die Organstücke ausgestrichen hat; in der zweiten Generation

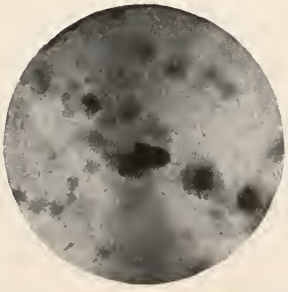


Fig. 35. Tuberkelbazillen, Plattenkultur aus Sputum. Die Tuberkelbazillenkolonien sind als kleine Häkchen zwischen den viel größeren Streptokokkenkolonien zu sehen. 40 : 1.

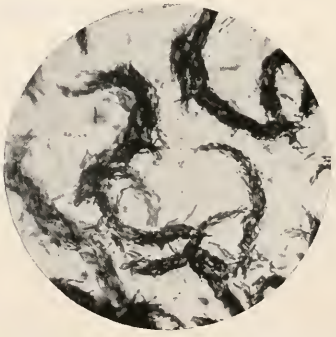


Fig. 36. Tuberkelbazillen, Reinkultur. Klatschpräparat. 800 : 1.

pflegen die Bazillen dann meist anzugehen.) Aus dem Belag fertigt man mikroskopische Präparate an, die man mit Karbolfuchsin färbt und in denen man die Tuberkelbazillen in Reinkultur findet. Doch wird ein derartiger Belag manchmal durch Kristalle vorgetäuscht, die selbst mit der Lupe

von jungen Kolonien schwer zu unterscheiden sind. Ferner impft man auf schrägen Glyzerinagar über: auch diese Röhrchen müssen mit Paraffin verschlossen werden. Bei der Impfung der Glyzerinbouillon muß das Material auf der Oberfläche schwimmen. Die Serumröhrchen werden weiter aufbewahrt. — Auf den Glyzerinagarplatten findet man, wenn sie nicht verunreinigt oder ausgetrocknet sind, bei 60-facher Vergrößerung sehr kleine haken- oder S-förmige Kolonien (Fig. 35). Man fertigt daraus Klatschpräparate an, die man ebenfalls nach Ziehl färbt (Fig. 36).

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. e.

Das Serum wird auf seine agglutinierende Kraft gegen Typhus- und Colibazillen geprüft, wie früher beschrieben ist (III. Übung e S. 30).

Fickersches Typhusdiagnostikum. Das Diagnostikum erweist sich vor allem sehr wertvoll da, wo nicht sofort eine Typhuskultur zur Verfügung steht. Nötig sind außerdem 0,2 ccm blutkörperchenfreies Serum. Man bringt dieses in eines der beigegebenen Spitzgläschen, setzt 0,8 ccm Kochsalzlösung zu, schüttelt gut um, bringt davon 0,5 ccm mit 0,5 ccm Kochsalzlösung in ein zweites Spitzgläschen und nun in ein drittes und viertes je 0,1 ccm vom ersten resp. zweiten. Zum dritten und vierten setzt man 0,9 ccm des Diagnostikums und hat nun im dritten eine Serumverdünnung von 1 : 50, im vierten von 1 : 100. Zum Vergleich bringt man in ein fünftes Glas 1 ccm des Diagnostikums. Aufbewahren bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Nach 10—12 Stunden tritt, falls positiv, Ausfällung von Flöckchen aus der fast klaren Flüssigkeit ein: Präzipitinwirkung. Länger als 20 Stunden darf nicht gewartet werden.

XXVIII. Übung: Meningokokken. c.

Auf dem Agar hat sich ein hellgrauer, fast durchsichtiger Belag entwickelt; auf der Gelatine ist wegen der für die Meningokokken zu niedrigen Temperatur kein Wachstum erfolgt, ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber einigen anderen selteneren gramnegativen Kokkenarten.

Auf dem Dextrose- und Maltose-Lackmusnährboden ist Rotfärbung eingetreten, auf den übrigen nicht. Nur selten zeigen sich Ausnahmen. Eventuell aus dem Rachen gezüchtete werden auf den Zuckernährböden, sowie quantitativ auf Agglutinabilität weiter untersucht.

XXI. Übung: Präzipitine. c.

Dem Kaninchen wird nochmals 1 ccm Pferdeserum injiziert.

XXXI. Übung: Gonokokken. c.

Die Kolonien auf dem Serumagar haben sich etwas vergrößert; in der Ascitesbouillon ist krümeliges Wachstum erfolgt (wenn nicht, noch einige Tage beobachten); dagegen ist der gewöhnliche Agar steril geblieben.

XXXIV. Übung: Züchten von Typhusbazillen aus Stuhl und Wasser. b.

Herstellen des Drigalskischen Nährbodens: Der Auszug aus dem Pferdefleisch wird 1 Stunde gekocht, filtriert, mit 10 g Pepton, 10 g Nutrose, 5 g Kochsalz gekocht, nochmals filtriert, dann 30 g Stangenagar zugesetzt, dieser, wie früher angegeben (VI. Übung. b), im Autoklaven oder über der Flamme gelöst, mit 10% Sodalösung bis zu schwach alkalischer Reaktion versetzt und nochmals im Dampftopf gekocht. Gleichzeitig kocht man 130 ccm Lackmuslösung 1 Minute lang, setzt 15 g Milchzucker zu und kocht noch 15 Minuten. Diese Lösung und den Agar läßt man auf 50° abkühlen, vermischt beides und stellt die vorige Reaktion, falls sie sauer geworden ist (Zersetzung des Milchzuckers durch zu langes Kochen) wieder her. Dazu setzt man 2 ccm heißer steriler 10% Sodalösung, ferner 10 ccm einer frisch bereiteten 0,1% Lösung von Kristallviolett B der Höchster Farbwerke in heißem Wasser. Der nun fertige Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar wird in sterile Kölbchen zu 100 ccm gefüllt und, ohne nochmals zu sterilisieren, aufbewahrt. — Außerdem macht man sich einige Röhrchen Lackmus-Mannitagar, indem man zu fertigem Agar 10% Lackmuslösung und 2% Mannit zusetzt.

Herstellen des Endoschen Nährbodens: Zu den 1000 ccm des 3% Agars kommen: 5 ccm der Fuchsinlösung, 10 g Milchzucker, 25 ccm einer frisch hergestellten 10% Natriumsulfitlösung, 10 ccm 10% Sodalösung. Der Nährboden zeigt nach dem Erstarren eine ganz leichte Rosafärbung. Er ist dunkel aufzubewahren.

Herstellen des Löfflerschen Malachitgrünagars: Der Nährboden wird nochmals 2 Stunden im Dampftopf sterilisiert und (ohne den Bodensatz) in sterile Kölbchen zu 100 ccm abgezogen. Gleichzeitig wird die Rindergalle sterilisiert, durch Watte filtriert und nochmals sterilisiert.

Polytroper Nährboden nach Lange: I. 1300 g Wasser, 2 g Fleischextrakt (Liebig), 5 g Kochsalz, etwa $1^1/_2$ g Nutrose, 3 g Pepton (Witte) in Emailletopf auf offener Flamme unter Umrühren kochen. Nach dem ersten Aufwallen 2—3 ccm 10% Sodalösung zusetzen (rosa Lackmuspapier muß deutliche alkalische Reaktion anzeigen). Bei verminderter Flamme 30 Minuten lang in ruhigem Kochen erhalten, dann 10 g Milchzucker zusetzen und noch 10 Minuten kochen. —Die Mischung ist inzwischen auf etwa 6—800 ccm eingedickt und wird mit Aqua dest. auf genau 1 l aufgefüllt und heiß filtriert. (Das Filtrat darf im Literkolben leicht opaleszieren, muß aber im Reagenzglas ganz klar erscheinen.) II. In 200 ccm Lackmuslösung (Kahlbaum) werden 2 g Mannit gelöst und 15 Minuten im Wasserbad gekocht. III. Neutralrotlösung 1 : 1000 (30 Minuten im Dampf sterilisiert) (II und III sind vorrätig zu halten). Zu 500 ccm Filtrat von I werden 20 ccm II zugesetzt (wenn hiernach die Mischung in dünner Schicht nicht deutlich blau ist, noch einige Tropfen Normalkalilauge zusetzen), darauf Zusatz von 10 ccm III.

20 Minuten im Kolben und nach Einfüllen in sterilisierte Gärröhrchen nochmals 20 Minuten sterilisieren.

Die Galle wird mit 1% Pepton versetzt, in sterile Reagenzgläser verteilt und sterilisiert.

Außerdem füllt man eine Literflasche mit Leitungswasser, damit sich einstweilen die Bakterien darin vermehren, und legt eine Bouillonkultur von Typhus an. Ferner macht man sich etwas 10% Sodalösung, 10% Ferrisulfatlösung und 25% Lösung von neutralem weinsaurem Kali oder besorgt aus der Apotheke etwas Eisenoxydchloridlösung (XXIV c).

XXXV. Übung: Phagocytose. a.

Einer weißen Maus werden an der Seite die Haare ganz kurz abgeschnitten. Dann werden in die Haut mehrere verschieden tiefe Schnitte von $^1/_2$ cm Länge in einer Entfernung von $^1/_2$ cm voneinander gemacht, von denen aber keiner in die Muskulatur einzudringen braucht, und Staphylokokken hinein verrieben.

Ist die mit Milzbrand infizierte Maus eingegangen, so wird die Infektionsstelle herausgeschnitten, soweit das Ödem reicht, in Sublimat fixiert und weiter zu Schnittpräparaten verarbeitet.

49. Tag.

Vakat.

50. Tag.

XXVI. Übung: Tetanus. f.

Ist eine der mit tetanusverdächtigen Kolonien geimpften Mäuse unter typischen Erscheinungen eingegangen, so wird die Infektionsstelle untersucht und daraus Agar- und Gelatineplatten gegossen. Ferner werden die am 45. Tage gegossenen Gelatineplatten untersucht. Die Tetanuskolonien sind 1—2 mm groß; sie haben die Gelatine verflüssigt; bei 60-facher Vergrößerung sieht man ein kompakteres Zentrum und von da nach allen Seiten Fäden ausstrahlend. Sie werden wie die Agarkolonien weiter untersucht.

XXVIII. Übung: Bac. botulinus. b.

Das Aussehen der Botulinuskulturen auf der Agarplatte ist wie das der Tetanuskolonien. Die Kolonien auf der Gelatineplatte haben verflüssigt; in der verflüssigten Zone sieht man bei 60-facher Vergrößerung zahlreiche grobe Granulationen herumtanzen oder es zeigen sich auch hier radiäre, von einem strahligen Zentrum ausgehende, teilweise miteinander verfilzte Fäden. Im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparate sieht man große plumpe Stäbchen mit Eigenbewegung, vielfach mit einer endständigen Spore. Im Zuckeragar- und im Zuckergelatinestich ist starke Gasbildung erfolgt; das Wachstum ist wie das der anderen Anaëroben. Die Bouillon ist getrübt mit starkem Bodensatz; auch hier sind Gasbläschen sichtbar. Der Geruch ist wie bei den anderen Anaëroben. Von der Bouillon injiziert man eine sehr geringe Menge (Bruchteile eines Milligramms genügen) einer Maus in einen Oberschenkel. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 Stunden ist die betreffende Extremität gelähmt; die Lähmung schreitet rasch

auf das andere Bein fort, so daß beide Hinterbeine bei Fluchtversuchen nachgeschleift werden. Dann wird die Muskulatur der Vorderbeine und des Nackens von der Lähmung ergriffen und nach einigen weiteren Stunden tritt der Tod ein. — Auch Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Tauben etc. sind zu Versuchen sehr geeignet; bei ihnen fällt außer der Lähmung noch die Pupillenerweiterung auf.

XXXIV. Übung: Züchten von Typhusbazillen aus Stuhl und Wasser. c.

Falls kein Stuhl eines Typhuskranken zur Verfügung steht, verreibt man normalen Stuhl mit Wasser, bis er breiige Konsistenz hat, und vermischt mit etwa 10 ccm davon 1 Öse Typhusbouillon, die man vorher mit 2 ccm Wasser vermischt. Dann gießt man den Drigalskischen, den Endoschen Nährboden und den Malachitgrünagar, letzteren nachdem man auf 100 ccm 3 ccm Rindergalle und 1,9 ccm einer 0,2 % Malachitgrünlösung (Malachitgrün cryst. chem. rein Höchst) zugesetzt hat, in 4 große Platten etwa 2 mm hoch aus, läßt sie $^1/_2$ Stunde lang umgekehrt offen stehen, damit sich kein Kondenswasser ansammelt, und verreibt mit einem oben rechtwinklig oder dreieckig (Fig. 1) gebogenen Glasstab etwas Stuhl auf der Oberfläche erst der ersten, dann der zweiten etc. Platte, ohne dazwischen abzuglühen. Die Platten kommen mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank.

Der Nachweis der Typhusbazillen im Wasser geschieht durch Ausfällung. Man bringt in die Flasche mit 1 Liter Leitungswasser, das 48 Stunden lang gestanden hat, eine Öse Typhusbazillen und schüttelt gut um (Vorsicht vor Infektion!), schüttet es in einen hohen sterilen Glaszylinder, bringt dazu 4 ccm 10 % Sodalösung und 3,5 ccm 10 % Ferrisulfatlösung, rührt mit einem Glasstab um und läßt den entstehenden Niederschlag im Eisschrank 2 Stunden lang absetzen. Dann hebert man ab (Vorsicht vor Infektion!), bringt den Niederschlag in sterile Reagensgläser, fügt $^1/_2$ des Volumens weinsaure Kalilösung dazu, schüttelt gut um, bis sich der größte Teil gelöst hat, fügt zu einem Teile 2 Teile sterile Bouillon und streicht je 1 ccm davon auf 4 Drigalskiplatten aus. — Ist das Wasser nicht zu weich, so kann man auch einfach zu 1 Liter 3,3 ccm Eisenoxychloridlösung zusetzen, wodurch ebenfalls ein Niederschlag entsteht. Man läßt diesen sich absetzen, filtriert und verreibt den Filterrückstand auf drei große Platten mit Drigalskischem oder Endoschem Nährboden. Filtrat, Filter, Trichter und Flasche sind zu desinfizieren.

Hat man Blut von einem Typhuskranken, so läßt man absetzen, benutzt das Serum zur Agglutination und bringt den Blutkuchen in Galle. Brutschrank.

Ferner legt man je eine Schrägagarkultur von Dysenterie, Paratyphus A und B und Bac. enteritidis an.

XXXVI. Übung: Aktinomykose.

Auf einem Objektträger wird etwas Eiter aus dem aktinomykotischen Herde (S. 82) in einer Öse Glyzerin verrieben, dann ein Deckglas

aufgelegt, leicht angedrückt und das Ganze, wenn man sich im Mikroskop überzeugt hat, daß das Präparat gut ist, mit Asphaltlack umrandet, was am nächsten Tage zu wiederholen ist. Man sieht schon mit dem bloßen Auge kleine blasse Punkte, die bei schwacher Vergrößerung als die Drusen erscheinen; bei starker Vergrößerung sind die großen kolbenförmigen Auftreibungen sichtbar. Die Fäden sind meist kaum zu erkennen, manchmal beherrschen sie das ganze Bild. Solche Präparate färbt man auch mit Fuchsin. — Ausstreichen des Materials auf einige Platten und Schrägagarröhrchen von Glyzerinagar: Brutschrank.

51. Tag.

XXXV. Übung: Züchten von Typhusbazillen aus Stuhl und Wasser. d.

Auf den Drigalskiplatten haben sich zahlreiche Kolonien entwickelt, die aber leicht voneinander zu unterscheiden sind. Die Colibazillen greifen aus dem Nährboden besonders den Milchzucker an, bilden daraus Säure und rufen dadurch rote Färbung hervor. Die Typhusbazillen zersetzen die Nutrose und bilden alkalische Produkte, wodurch eine blaue Färbung entsteht. Die gleichfalls blau wachsenden Streptokokken werden durch das Kristallviolett zurückgehalten; von anderen blau wachsenden Bakterien unterscheiden sich die Kolonien der Typhusbazillen durch die tautropfenähnliche durchsichtige Beschaffenheit; auch besitzen sie niemals doppelte Kontur oder ins Bläuliche spielende Färbung. Man erkennt sie am besten, wenn man die Platte gegen das Fenster hält und die Schmalseite der Hand dahinter langsam hin und her bewegt. Ihre Größe beträgt 1—3 mm. Doch genügen diese Eigenschaften noch nicht zur Unterscheidung, weshalb man noch die Agglutination heranzieht. Man vermischt das kürzlich hergestellte Serum mit physiologischer Kochsalzlösung bis zu den letzten Verdünnungen, in der es bei der neulich vorgenommenen Prüfung Typhusbazillen gut agglutiniert hat. Davon bringt man eine Öse auf ein Deckglas, bringt mit einer feinen Nadel eine Spur der verdächtigen Kolonie hinein, verreibt und untersucht bei 60-facher Vergrößerung, ob Agglutination eintritt. Ist dies der Fall, so impft man den Rest der Kolonie auf schrägen Agar, um am nächsten Tage weiter zu untersuchen. — Manche Typhusstämme werden in der ersten Generation noch nicht agglutiniert, dagegen nach mehrmaliger Passage über Agar.

Ein Gärröhrchen mit Langeschem Nährboden wird mit Typhus, eines mit Coli geimpft.

In gleicher Weise sind die aus dem Wasser angelegten Platten zu untersuchen. Hier kommt allerdings die Schwierigkeit dazu, daß die Kolonien vieler anderer Wasserbakterien fast genau wie Typhuskolonien aussehen. Gelingt die Isolierung aus diesem Grunde nicht, so läßt man die Platten noch einige Tage bei Zimmertemperatur stehen; dann färben sich die ersteren braun, grün etc., während die Typhuskolonien ihre blaue Farbe beibehalten. Mit den auf den Gelatineplatten gewachsenen typhusverdächtigen Kolonien darf der Agglutinationsversuch nicht gleich angestellt werden, sondern sie müssen zunächst auf

Agar übergeimpft und in den Brutschrank gestellt werden, da bei 22° gewachsene Bakterien oft nicht agglutiniert werden.

Auf den Endoplatten ist das Wachstum ein analoges. Durch die gebildete Säure haben die Colibazillen die lockere Verbindung zwischen Fuchsin und Sulfit getrennt und sind nun intensiv rot gefärbt mit glänzender, oft gebirgsartiger Oberfläche und einem grünlichen Schimmer, den trockenes Fuchsin hat. Ihr Durchmesser beträgt oft $^1/_2$ cm und darüber. Die Typhuskolonien sind farblos oder nur ganz leicht rosa, glänzend und nicht mehr als 2 mm groß. Andere Bakterien wachsen nur spärlich darauf.

Auf dem Malachitgrünagar werden, wenn er richtig gelungen ist, die Colibazillen im Wachstum gehemmt, andernfalls erscheinen sie als weißliche Gebilde, mikroskopisch bräunlich ohne Furchen; die Typhuskolonien sind zart, durchsichtig, und unter dem Mikroskop farblos, gekörnt, mit Furchen und gekerbtem Rande.

Die Galle wird auf denselben Nährböden ausgestrichen.

XXXVI. Übung: Dysenterie, Paratyphus. a.

In den Dysenterie- und Paratyphuskulturen einschließlich Bac. enteritidis findet man bei starker Vergrößerung Stäbchen von der Größe und Gestalt von Typhusbazillen, die Dysenteriebazillen ohne, die Paratyphusbazillen mit Eigenbewegung. Von allen dreien werden folgende Kulturen angelegt: Gelatineplatten, Agarplatten, Gelatinestich, Agarstich, Schüttelkultur in Zuckeragar, desgleichen mit Neutralrot, Bouillon, Milch, Kartoffel, Langescher Nährboden, Ausstreichen auf Platten mit Drigalskischem Nährboden. Ferner verflüssigt man je ein Röhrchen des Lackmus-Mannitagars, impft Ruhr- resp. Typhus-, Paratyphus- und Colibazillen ein und läßt im Röhrchen erstarren.

52. Tag.

XXVI. Übung: Tetanus. g.

Sind auf den Zuckeragarplatten wieder charakteristische Kolonien gewachsen, so werden sie mikroskopisch untersucht und dann Zuckergelatinestich, Zuckeragarstich in hoher Schicht und anaërobe Zuckerbouillonkultur angelegt.

XXXIV. Übung: Züchten von Typhusbazillen aus Stuhl und Wasser. e und

XXXVII. Übung: Dysenterie, Paratyphus. b.

Die auf schrägen Agar abgeimpften Kolonien werden in der früher geübten Weise weiter auf ihre Identität mit Typhusbazillen untersucht. Die Galle wird in entsprechender Weise weiteruntersucht.

Die biologischen Eigenschaften der Dysenteriebazillen sind fast die gleichen wie die der Typhusbazillen. Das Aussehen der Gelatine-,

Agar-, Bouillon- und Kartoffelkulturen ist identisch, Traubenzucker wird nicht vergoren, Milch nicht koaguliert, Neutralrot nicht reduziert. Auf dem Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar sind die Kolonien klein, blau, doch etwas weniger durchsichtig als Typhuskolonien. Dagegen lassen die Dysenteriebazillen des Typus Shiga-Kruse den Lackmus-Mannitagar unverändert oder entfärben nur die tieferen Schichten, während die übrigen Bakterien ihn rot gefärbt und Gas gebildet haben.

Auf dem Langeschen Nährboden ist viel, wenig oder kein Gas gebildet worden; die Zusetzung der Zuckerarten unter Säurebildung hat eventuell eine Rotfärbung hervorgerufen, die Reduktion besonders im anaëroben Schenkel äußert sich durch Entfärbung (vgl. Tabelle).

Tabelle.

	Eigenbewegung	Traubenzucker	Traubenz. mit Lackmus und Nutrose	Milchzucker	Milchz. mit Lackmus und Nutrose	also Milch	Mannit	Mannit mit Lackmus und Nutrose	Neutralrot	also Lange	Wachstum auf Malachitgrün
Coli	±	Gas	rot	Gas	rot	koag.	Gas	rot	fluoresz.	viel Gas rot resp. farblos	schlecht
Paratyphus	+	Gas	rot	0	blau	0	Gas	rot	fluoresz.	wenig Gas rot resp. blaurot (aërob) resp. farblos (anaërob)	gut
Typhus	+	0	rot	0	blau	0	0	rot	0	kein Gas (blau)rot	gut
Ruhr Shiga-Kruse	—	0	rot	0	blau	0	0	blau	0	kein Gas blau	gut

Auch der Paratyphusbazillus A wächst auf Gelatine, Agar, Kartoffeln, Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar, in Bouillon, Milch und Lackmusmolke wie der Typhusbazillus; dagegen vergärt er Traubenzucker und zersetzt Neutralrot.

Der häufigere Paratyphusbazillus B steht dem B. coli kulturell näher: sein Wachstum auf Gelatine, Agar und Kartoffeln ist üppig, die Lackmusmolke hellrot gefärbt und getrübt, Traubenzucker vergoren, Neutralrot zersetzt, die Milch dagegen nicht koaguliert. Die Kolonien auf Drigalkischem Nährboden sind blau, doch etwas größer und undurchsichtiger als die des Typhusbazillus.

Nunmehr nimmt man die Agglutination vor und findet, daß sich mit ihrer Hilfe die Dysenterie- und Paratyphusbazillen von den Typhusbazillen leicht unterscheiden lassen, indem sie höchstens bei sehr starker Konzentration des Serums agglutiniert werden. Mit Dysenterie-, Paratyphus-, und Enteritidisserum macht man dieselbe Probe und erhält analoge Resultate.

Die Kulturen werden zur weiteren Beobachtung aufbewahrt.

Eine Schrägagarkultur von Enteritidis wird abgeschwemmt, auf ein Stückchen Brot geschüttet damit getränkt und eine Maus damit gefüttert. Die Tiere sterben, falls die Kultur genügend virulent war, nach einigen Tagen; bei der Obduktion findet man die oberen Darmpartien mit Flüssigkeit gefüllt, die Serosa gerötet, die Peyerschen Plaques sehr

stark geschwollen, in Leber und Milz nekrotische Herde. Die Organe einschließlich Darminhalt werden mikroskopisch, kulturell und in Schnittpräparaten untersucht.

53. Tag.

XXVI. Übung: Tetanus. h.

In den Zuckergelatinestichkulturen ist das Wachstum noch sehr gering; üppiger in den Zuckeragarstichkulturen, von deren Stichkanal zahlreiche Fäden ausgehen. Auch Gas wird gebildet. — Die Bouillonkultur ist getrübt und zeigt ebenfalls kleine Gasbläschen.

XXXII. Übung: Rotz. b.

Bei den mit Rotzbazillen intraperitoneal geimpften Meerschweinchen tritt nach 2—4 Tagen von außen fühlbare Hodenschwellung ein; wenige Tage später geht das Tier zugrunde. Die Obduktion hat mit großer Vorsicht zu geschehen. Man findet einen mehr oder minder starken eitrigen Belag am Peritoneum, besonders in der Gegend der Hoden, deren Tunica vaginalis geschwollen ist. In allen Organen sind kleine Knötchen, teils einzeln, teils konfluierend und von verschiedener Größe, zu sehen. Die Milz ist vergrößert. Ausstrichpräparate werden von dem Peritoneum und von einem Knötchen angefertigt und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt. Man sieht feine Stäbchen von verschiedener Länge: teils ganz kurz, teils so lang wie Diphtheriebazillen, mit denen sie auch die kolbige Anschwellung und die septierte Färbung gemeinsam haben; doch sind sie schlanker. Viele liegen in Leukocyten (Fig. 37). Aus einem der Knötchen werden mit nicht zu wenig Material Glyzerinagarplatten gegossen, der Rest der Organe zu Schnittpräparaten mit Sublimat fixiert.

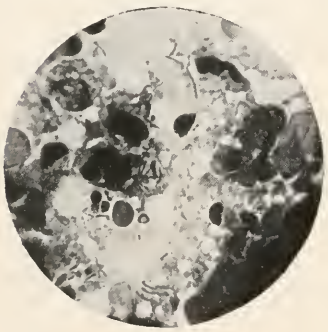


Fig. 37. Rotzbazillen im Ausstrich aus peritonealem Eiter eines Meerschweinchens. 800 : 1.

Der Käfig, in dem das Tier gesessen hatte, ist sorgfältig zu desinfizieren.

XXXVI. Übung: Aktinomykose. b.

Auf den Nährböden haben sich kleine bräunliche Kolonien gebildet, die besonders dadurch charakterisiert sind, daß sie sich mit der Öse nur schwer zerteilen lassen. Meist muß man sie als Ganzes herausnehmen und auf dem Objektträger zerzupfen. Fuchsinfärbung. Man sieht keine Kolben, sondern zahlreiche sehr lang verzweigte Fäden. Sind die Kolonien zu klein, so wartet man noch einige Tage. Falls die Gefahr des Überwucherns anderer Keime oder der Eintrocknung vorliegt, Abimpfen auf andere Röhrchen.

XXXVII. Übung: Dysenterie, Paratyphus. c.

Die Kulturen haben sich weiter entwickelt; die Oberflächenkulturen der Dysenteriebazillen auf Gelatine zeigen feine Linien und Sprünge wie Typhuskolonien, die der Paratyphusbazillen vom Typus A und besonders vom Typus B lassen sie vermissen.

54. Tag.

XXXII. Übung: Rotz. c.

Auf den Glyzerinagarplatten sind zahlreiche graugelbliche Kolonien gewachsen, die den Agarkolonien von B. coli äußerst ähnlich sehen. Bei starker Vergrößerung sieht man kleine, unbewegliche Bazillen (Fig. 38), die nicht ganz regelmäßig gestaltet sind, sondern dickere und dünnere Stellen zeigen und auch ungleich lang sind, ähnlich wie die Diphtheriebazillen. Färbung nach Gram ist negativ. Man legt folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Bouillon, Gelatinestich, Kartoffel; die beiden letzteren werden bei 23° aufbewahrt.

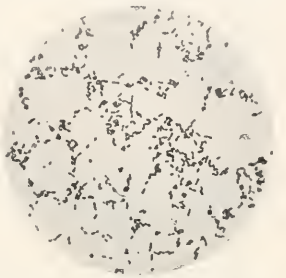


Fig. 38. Rotzbazillen. Ausstrich aus Agarkultur. 800 : 1.

XXXVII. Übung: Dysenterie, Paratyphus. d.

Die Bouillonkulturen von Dysenterie und Paratyphus werden auf Indolbildung untersucht: die Reaktion fällt negativ aus. Die Kulturen werden nach nochmaliger Betrachtung beseitigt, außer den Milch- und den Lackmusmolkekulturen.

XXI. Übung: Präzipitine. c.

Man entnimmt dem Kaninchen einige Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, da sonst das Serum leicht opalisiert, aus der Ohrvene nach Hyperämisieren durch Wärme 3 ccm Blut und läßt das Serum abscheiden. Dann verdünnt man Pferdeserum 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, etc. mit physiologischer Kochsalzlösung, bringt je 1 ccm in ein kleines Reagenzglas und fügt je 0,1 ccm des Kaninchenserums hinzu. Außerdem macht man eine Kontrolle von 1 ccm Kochsalzlösung und eine solche mit dem Serum anderer Tierarten (1 : 200 und 1 : 1000) + je 0,1 ccm Antiserum. Statt zu mischen kann man auch unterschichten.

Als positiv bezeichnet man die Reaktion, wenn Trübungen und Flocken auftreten, resp. in den unterschichteten Röhrchen Ringbildung.

Die Kontrollen müssen klar bleiben; in dem Pferdeserum muß bei 1 : 1000 nach spätestens 2 Minuten Trübung auftreten, nach 3—5 Minuten bei 1 : 10 000 und 1 : 20 000. Dann ist das Serum für die Praxis brauchbar, und das Tier kann entblutet werden. Andernfalls kann man die Röhrchen, um das Resultat besser zu erkennen, 2 Stunden lang in den Brutschrank stellen. — Die Kaninchen geben sehr verschieden gute Sera.

XXXVIII. Übung: Bakterizide Wirkung des Blutserums. a.

Ein Kaninchen wird in der früher geübten Weise entblutet und das Blut zur Gewinnung von Serum über Nacht kühl aufbewahrt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Typhusbazillen und eine Kultur auf Löfflerschem Serum von Pneumokokken angelegt.

55. Tag.

XXVI. Übung: Tetanus. h.

In den Zuckeragarstichkulturen ist der Stichkanal von Ausläufern besetzt und von einer wolkigen Trübung umgeben; auch Gas ist gebildet. Ebenso zeigen die Gelatinestichkulturen zahlreiche Härchen um den Stichkanal und Gasbildung. Das Wachstum beginnt bei beiden erst etwa 1 cm unter der Oberfläche.

XXXI. Übung: Rotz. d.

Das Wachstum auf Agar und in Bouillon bietet nichts Charakteristisches. Auf der Gelatine und der Kartoffel ist es noch sehr schwach.

XXXVIII. Übung: Bakterizide Wirkung des Blutserums. b.

Frisches Blutserum der meisten Tiere hat deutliche bakterientötende Eigenschaften. Bringt man Bakterien aus einer Reinkultur hinein und gießt sofort und einige Zeit später Platten, so kann man Abnahme, und wenn die Einsaat nicht zu groß war, vollständiges Verschwinden konstatieren. Doch hat das Serum diese Eigenschaft mit vielen Flüssigkeiten gemeinsam; beim Wechsel des Nährmediums geht nämlich stets ein großer Teil der Bakterien zugrunde. Charakteristisch für das Serum ist aber, daß die bakterizide Wirkung durch halbstündiges Erwärmen auf 55° aufgehoben wird. Man bringt also in 2 sterile Reagenzgläser je 5 ccm Serum und erwärmt das eine im Wasserbad eine halbe Stunde lang auf 55°. Dann bringt man nach dem Abkühlen in beide ganz wenig Typhusreinkultur (die Spitze einer Nadel), verreibt gut und gießt je eine Agarplatte mit einer Öse sofort, ebenso nach 2, 6 und 24 Stunden. In der Zwischenzeit ist das Serum im Brutschrank aufzubewahren.

Ferner ist die Pneumokokkenkultur mit wenig physiol. Kochsalzlösung aufzuschwemmen und davon ein Tropfen einem Kaninchen unter die behaarte Haut des Ohres zu injizieren.

Dem mit Vibrionen immunisierten Kaninchen sind, wenn es sein früheres Gewicht wieder erreicht hat, einige Kubikzentimeter Blut aus einer Ohrvene steril zu entnehmen, indem man, eventuell nach Hyperämisierung des Ohres mit Xylol oder Äther, die Randvene zentralwärts aufschneidet, und zur Gewinnung von Serum kühl aufzubewahren.

Ferner sind aus den eingebetteten Infektionsstellen der mit Milzbrand resp. Staphylokkoken infizierten Mäuse (48. Tag) Schnittpräparate anzufertigen, und zwar ist das Milzbrandpräparat längs, das Staphylo-

kokkenpräparat quer zur Richtung der infizierenden Wunde zu schneiden. Um einen Überblick über die ganze Infektionsstelle zu bekommen, nimmt man etwa jeden zehnten erhaltenen Paraffinschnitt zur weiteren Untersuchung und klebt sie zusammen auf ein Deckglas auf.

56. Tag.

Für den nächsten Tag ist eine Schrägagarkultur des zur Immunisierung benutzten Vibrio anzulegen.

57. Tag.

XXXII. Übung: Rotz. e.

Die Entwicklung in der Gelatine ist gering; das Wachstum im Stichkanal ist fadenförmig, schwach gekörnt, auf der Oberfläche zart, grau. — Auf der Kartoffel hat sich ein hell-braungelber Belag gebildet.

XXII. Übung: Bakteriolyse. d.

Pfeifferscher Versuch. Zunächst zieht man kurze Glasrohre zu Kapillaren von etwa 5 cm Länge aus. Da die Wertigkeit des erhaltenen Serums noch unbekannt ist, ist der Pfeiffersche Versuch mit verschieden großen Serummengen anzustellen. Man bringt zunächst 1 Öse (zu 2 mg) des Serums in 1 ccm physiologische Kochsalzlösung und verreibt 1 Öse der Vibrionenagarkultur hinein. Die ganze Menge wird einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Nach 10 Minuten macht man an der Injektionsstelle einen kleinen Schnitt, der die Muskulatur bloßlegt, und geht mit einer Kapillare durch diese unter leichtem Drücken und Drehen in die Bauchhöhle ein. Die Kapillare füllt sich besonders beim Herausziehen. Der erhaltene Tropfen wird sofort auf Deckgläser verteilt und untersucht. Ebenso entnimmt man 20, 30 und 60 Minuten nach der Injektion. Außerdem fertigt man ein Kontrollpräparat aus der Kultur im hängenden Tropfen an. Man sieht (Anfertigung von hängenden Tropfen und gefärbten Deckglaspräparaten), wie die zuerst lebhaft beweglichen Vibrionen unbeweglich werden, aufquellen, sich zu Kugeln umwandeln (Fig. 39) und verschwinden, oder auch sich in der Flüssigkeit auflösen. Der Prozeß geht im hängenden Tropfen nicht weiter, sondern nur im Tierkörper. Nach spätestens einer Stunde sind alle Vibrionen aus dem Peritoneum verschwunden und das Tier bleibt am Leben. Einem anderen Meerschweinchen injiziert man 1 Öse Vibrionenkultur in 1 ccm physiol. Kochsalzlösung ohne Zusatz von

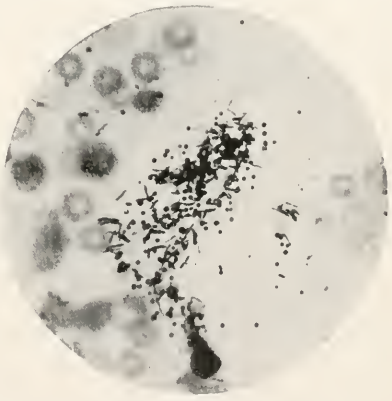


Fig. 39. Bakteriolyse. Vibrio. 800 : 1.

Serum. Hier tritt keine Auflösung ein, sondern die Vibrionen vermehren sich, das Tier stirbt nach einigen Stunden. Sollte auch bei Zusatz von Serum keine Auflösung eingetreten sein, so war dieses zu schwach und der Versuch muß mit einer größeren Menge (0,05 ccm) wiederholt werden.

Die Wirkung ist streng spezifisch. Steht noch ein Vibrio von einer anderen Art zur Verfügung, so wiederholt man den Versuch mit diesem und findet, daß er auch bei Zugabe von Serum nicht aufgelöst wird.

Das mit Pneumokokken infizierte Ohr des Kaninchens ist stark gerötet und geschwollen und fühlt sich heiß an. Man macht einen kleinen Schnitt hinein und untersucht die heraustretende Flüssigkeit im gefärbten Deckglaspräparat (Färbung 1 Stunde mit 30-fach verdünntem Karbolfuchsin, sowie nach Gram unter Gegenfärbung mit Bismarckbraun). Auch hier sieht man Auflösung der Pneumokokken in allen Stadien. Ein Teil hat normales Aussehen und ist von einer Kapsel umgeben; bei anderen liegen in der Kapsel nur noch zerbröckelte, aber gut färbbare Teile des Mikroorganismus; und schließlich findet man zahlreiche leere Kapseln, die bei der Gramschen Färbung die Gegenfarbe annehmen.

Die von der Infektionsstelle mit Milzbrand angefertigten Schnittpräparate werden nach Gram unter Vorfärbung mit Bismarckbraun gefärbt. Man sieht an der Infektionsstelle selbst und an dem sie umgebenden entzündlichen Ödem teils wohlerhaltene Bazillen (gleichmäßig dunkelviolett gefärbt mit brauner Kapsel), teils degenerierte. Diese sind manchmal gequollen, wurstförmig, manchmal von normaler Gestalt aber schlechter Färbbarkeit, oft ist nur noch die Kapsel erhalten.

Für den nächsten Tag sind dem mit Rinderblut injizierten Kaninchen einige Kubikzentimeter Blut zu entnehmen und zur Gewinnung von Serum kühl aufzubewahren; ebenso von einem normalen Kaninchen; ferner ist steriles defibriniertes Rinderblut zu besorgen. Außerdem ist ein Frosch zu beschaffen.

58. Tag.

XXXIII. Übung: Hämolyse. b.

Von dem defibrinierten Rinderblut macht man eine 5 % Lösung in physiologischer Kochsalzlösung, zentrifugiert, gießt die über den Blutkörperchen stehende Flüssigkeit ab, füllt mit Kochsalzlösung auf, zentrifugiert wieder, füllt wieder auf und bringt davon in 12 Reagenzgläser je 2 ccm. Dazu setzt man 0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 des Serums des vorbehandelten resp. des nicht vorbehandelten Kaninchens. Brutschrank. Bei Zusatz des hämolytischen Serums sieht man Hämolyse, d. h. das Blut wird lackfarben und im hängenden Tropfen findet man keine roten Blutkörperchen mehr. Nur wo die zugesetzte Menge zu gering war, tritt die Erscheinung nicht ein. Dagegen fehlt sie nach Zusatz des normalen Serums auch da, wo große Mengen zugesetzt wurden.

Darauf inaktiviert man den Rest des hämolytischen Serums, indem man ihn im Wasserbade ½ Stunde auf 55° erhitzt, und setzt wieder zu je 2 ccm Blutlösung dieselben Mengen Serum wie oben. Nun tritt das Lackfarbenwerden nicht mehr ein. Nachdem man sich davon

überzeugt hat, setzt man zu jeder Probe noch 0,01 ccm des nicht erhitzten Serums des normalen Kaninchens, das an sich nicht hämolytisch wirkte. Sofort bemerkt man Hämolyse in denselben Konzentrationen wie beim ersten Versuch.

Zur Hämolyse ist also das Zusammenwirken zweier Stoffe nötig: der eine ist schon im normalen Serum vorhanden (Komplement), der andere bildet sich erst bei der Immunisierung (Ambozeptor). Im frischen Immunserum sind beide vorhanden; durch halbstündige Erhitzung auf 55° wird das Komplement zerstört, so daß keine Hämolyse mehr auftritt; doch bleibt der Ambozeptor erhalten, so daß Zusatz des komplementhaltigen, an sich nicht hämolytischen, weil ambozeptorfreien Normalserums wieder Hämolyse hervorruft.

Dem Frosche wird mit einem Seidenfaden ein Oberschenkel ganz oben fest unterbunden.

Ferner wird je eine Milzbrand- und Staphylokokkenkultur auf schrägem Agar angelegt.

Für den nächsten Tag sind einige Kubikzentimeter Hammelserum zu besorgen.

59. Tag.

XXXV. Übung: Phagocytose. b.

Eine Öse Staphylokokkenkultur wird in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon zwei Mäusen je 0,2 ccm intraperitoneal injiziert. Eine Maus wird nach einer halben, die andere nach 2 Stunden getötet und das peritoneale Exsudat im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglasausstrich untersucht. Der Ausstrich muß sehr sorgfältig geschehen, damit die Leukocyten nicht zerrissen werden. — Man sieht zahlreiche Leukocyten, die anfangs nur einen Teil, später alle Kokken in sich aufgenommen haben.

Um die Phagocytose auch unter dem Mikroskop beobachten zu können, entnimmt man aus dem angeschwollenen Lymphsack des Oberschenkels des Frosches mit einer Spritze die Lymphe, die viele Leukocyten enthält. Die Unterbindung kann dann gelöst werden. Dann macht man eine Aufschwemmung von Milzbrandkultur in physiologischer Kochsalzlösung (gut verreiben) und bringt eine Öse davon mit einer Öse Lymphe im hängenden Tropfen zusammen. Man sieht, wie die Leukocyten Milzbrandbazillen in sich aufnehmen: an lange Fäden pflegen sich mehrere Leukocyten zu heften und sie zu umgeben, indem sie sich dabei ganz lang ausziehen.

Die Schnittpräparate von der Haut der mit Staphylokokken infizierten Maus werden nach Gram unter Vorfärbung von Karmin gefärbt. Man sieht, wie die Kokken in das Unterhautzellgewebe eingedrungen und von Leukocyten aufgenommen worden sind, die einen dichten Wall um die Infektionsstelle bilden. Da alle Staphylokokken an der Infektionsstelle phagocytiert und vernichtet werden, ist die Maus gegen sie immun.

XXIX. Übung: Anaphylaxie. b.

(S. 79.) Dem Meerschweinchen werden 3—4 ccm Hammelserum intravenös injiziert: man macht einen $1^1/_2$ cm langen Schnitt neben

der Trachea, sucht die Halsvene auf und injiziert mit einer abgestumpften Kanüle. Dann wird das Tier losgebunden. Nach kurzer Zeit wird es unruhig, schnuppert, reibt sich die Nase; das Fell sträubt sich; es wird Harn und Kot entleert. Dann treten einzelne Krämpfe auf; die Tiere legen sich auf die Seite und bleiben schwach atmend liegen. Dauert der Anfall länger, so ist die Temperatur zu messen; der Abfall kann bis 13 Grade betragen. Geht das Tier ein, so zeigt sich bei der Sektion als Hauptbefund eine enorme Blähung der Lunge, die beim Aufschneiden des Brustkorbes nicht zurücksinkt, sowie Blutungen. Das Herz schlägt noch ca. $^1/_4$ Stunde fort. Nach dem Tode ist das Herzblut ungeronnen.

60. Tag.

XXXII. Übung: Rotz. f.

(S. 95.) Der Belag auf der Kartoffel hat eine dunkelbraune Farbe angenommen.

Die in Paraffin eingebetteten Organe werden geschnitten und gefärbt. Die Färbung bietet etwas größere Schwierigkeiten als die anderer Bakterien, da die Rotzbazillen sehr klein sind und das sie enthaltende Gewebe sehr reich an Chromatin ist. Doch kann man sich die Färbung wesentlich erleichtern, wenn man die Schnitte dünn macht (etwa 5 μ). Vorteilhaft ist es ferner, „in Paraffin“ zu färben, da sie dann nicht mit Alkohol in Berührung kommen, der gerade den Bazillen den Farbstoff leicht entzieht. Man legt also etwa 6 Schnitte, ohne sie in Xylol zu entparaffinieren, in 10-fach verdünntes Karbolfuchsin, nimmt alle halbe Stunde einen heraus, läßt ihn gründlich trocken werden, entparaffiniert ihn in Xylol und bringt ihn in Kanadabalsam. Auch aufgeklebte Schnitte lassen sich so gut färben. Außerdem ist folgende Färbung sehr zu empfehlen: 1. Entparaffinieren in Xylol; absoluter Alkohol etc.: Wasser. 2. Färbung über Nacht in folgender Lösung: Orceïn D (Grübler) 0,1; offizin. (= 25 %) Salpetersäure 2,0; 70 % Alkohol 100,0. 3. Kurzes Abspülen in 70 % Alkohol. 4. Wasser. 5. Färben in Unnas polychromem Methylenblau (Grübler) 1—2 Stunden. 6. Destilliertes Wasser. 7. Differenzieren in „Glyzerinäthergemisch“ nach Unna (Grübler) 1 : 2 Wasser, bis die Schnitte hellblau erscheinen. 8. Gründliches Auswaschen in destilliertem Wasser. 9. 70 % Alkohol, absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Diese Methode gibt auch bei der Färbung anderer Bakterien vorzügliche Resultate; die Vorbeizung in Orceïn kann hier weggelassen werden.

In den Rotzschnitten sieht man Knötchen, die aus Leukocyten und zum kleineren Teil aus epitheloiden Zellen bestehen; ein Teil der Zellen ist zugrunde gegangen, die Reste der Kerne nehmen den Farbstoff noch intensiv an. Dazwischen sieht man die sehr kleinen Bazillen, teils einzeln, teils in Häufchen liegen.

Weiter ist noch folgendes zu beobachten:

Auf der Serumkultur der Tuberkelbazillen ist der Belag etwas dichter geworden. Auf den Glyzerinagarröhrchen sind kleine Schüppchen

gewachsen, die in den nächsten Wochen an Größe zunehmen, bis die ganze Kultur einen „gebirgsartigen“ Eindruck macht. Auf der Glyzerinbouillon hat sich ein ziemlich dickes Häutchen gebildet.

In der Zuckergelatinestichkultur der Tetanusbazillen haben sich die Ausläufer vergrößert; außerdem ist Verflüssigung eingetreten. Die Milchkultur des Paratyphus B beginnt sich nach etwa 10 Tagen aufzuhellen, während die von Paratyphus A und Dysenterie unverändert bleibt.

XXXIX. Übung: Diphtheriegift und -Antitoxin.

1. In der IX. Übung wurde nur eine ungefähre Virulenzbestimmung der Kultur vorgenommen; zur Herstellung von Diphtheriegift verfährt man in folgender Weise: Von einer Bouillon, die in gewöhnlicher Weise, aber mit 2 % Pepton hergestellt wird und rotes Lackmuspapier bläut, blaues nicht rötet, kommen in 4 Erlenmeyerkölbchen zu 100 ccm je 20 ccm. Die Beimpfung mit Diphtheriekultur geschieht nur ganz oberflächlich, damit sich ein Häutchen bildet. Dadurch wird erreicht, daß die Bazillen sehr viel Sauerstoff zur Verfügung haben und somit sehr viel Gift bilden. Am besten ist es, wenn die Bouillon unter dem Häutchen überhaupt nicht getrübt wird. Die Kölbchen bleiben 14 Tage im Brutschrank stehen. Nach dieser Zeit wird ihr Inhalt zusammengegossen und die Bazillen entweder abgetötet oder abfiltriert. Die Abtötung geschieht durch Überschichten mit Toluol; von diesem Desinfektionsmittel löst sich gerade so viel, daß nach etwa 3 Tagen die Flüssigkeit keimfrei ist, ohne daß eine Schädigung des Giftes eintritt; außerdem verhindert es die Verdunstung. — Zieht man vor, zu filtrieren (bei sporenhaltigen Bakterien, wie Tetanus, ist dies unbedingt nötig), so sterilisiert man die Tonkerze (Chamberlandfilter) in dem Gefäß, in das filtriert werden soll, im Dampftopf, verbindet das offene Ende des Gefäßes mit einer Wasserstrahlluftpumpe, verschließt den Rand mit einer durchlochten Gummikappe, filtriert die Kultur durch ein Papierfilter (um Klümpchen zu entfernen) in die Tonkerze und dann unter Druck durch diese. Das Filtrat bringt man in ein steriles Gefäß und überschichtet es, wenn man es aufbewahren will, ebenfalls mit Toluol.

2. Prüfung der Giftigkeit. Von dem Filtrat injiziert man Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005 ccm (Verdünnung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung). Wie früher erfolgt teils schnell der Tod, teils Nekrosenbildung an der Injektionsstelle, teils fehlt auch diese. Von Wichtigkeit ist hier nur die tödliche Dosis, und zwar die, die nach spätestens 5 Tagen zu töten imstande ist. Ist z. B. nach dieser Zeit das mit 0,05 ccm injizierte Meerschweinchen eingegangen, das mit 0,005 ccm injizierte noch am Leben, so wird zwischen diesen beiden Dosen weiter untersucht. — Ein Gift, von dem 0,01 ccm eben genügt, heißt Normalgift (DTN ^{1}), genügt 0,001 ccm eben, so heißt es 10-fach Normal (DTN ^{10}) etc.

3. Zum Studium der Antitoxinwirkung verwendet man aus der Apotheke bezogenes Heilserum. Ein Serum, von dem 0,1 ccm

die Wirkung von 1 ccm Normalgift am Meerschweinchen aufhebt, heißt Normalserum (DAN[1]); 1 ccm dieses Serums enthält eine Immunisierungseinheit. Genügt schon 0,001 ccm, so heißt das Serum 100-fach Normal (DAN[100]) etc. Man mischt nun im Reagenzglas die eben tödliche Menge des Giftes mit der Serummenge, die nach dieser Berechnung zu ihrer Neutralisation genügt, füllt zu 4 ccm auf und injiziert die Menge einem Meerschweinchen von 250—300 g. Das Tier bleibt gesund. — Vier anderen Tieren wird dieselbe Giftdosis injiziert, dieselbe Antitoxinmenge aber erst 1, 2, 3 resp. 4 Tage später. Die Tiere erliegen der Infektion oder bekommen wenigstens Nekrosen. Der Versuch kann noch in der Weise modifiziert werden, daß bei Versuchen, die Giftwirkung erst am Tage nach der Injektion aufzuheben, verschieden große Antitoxindosen injiziert werden (bis zum 10-fachen): zur glatten Heilung sind dann viel größere Mengen nötig als bei sofortiger Antitoxininjektion. Daraus folgt, daß bei Krankheitsfällen stets eine möglichst frühzeitige Injektion und, da wir die Menge des zirkulierenden Giftes nicht kennen, eine hohe Antitoxindosis indiziert ist.

XL. Übung: Untersuchung von Tonsillen, Conjunctiva, Rachen, Harn, Faeces, Smegma etc.

Wer selbständig arbeiten will, muß unbedingt die häufigeren Bakterienarten kennen lernen, die ihm vorkommen können. Nachdem die Luftkeime bereits früher studiert worden sind, ist es jetzt vor allem wichtig, die Bakterien des vom Menschen stammenden Materials zu untersuchen.

Tonsillen, Conjunctiva, Rachen. Man entnimmt von sich und anderen Personen mit einem Tupfer (s. IX. Übung) Abstriche von Tonsillen, Conjunctiva und Rachen, fertigt daraus Ausstrichpräparate an und streicht auf Agarplatten, Löfflersches Serum und blutbestrichenen Agar aus. Auf den Tonsillen findet man besonders Staphylokokken, Streptokokken und kurze Stäbchen, auf der Conjunctiva Pneumokokken und Pseudodiphtheriebazillen.

Ferner untersucht man Smegma mikroskopisch und kulturell: bei Färbung nach der Tuberkelbazillenmethode wird man, wenn man nur kurz entfärbt, öfters Stäbchen finden, die den Farbstoff behalten, aber meist etwas dicker als Tuberkelbazillen, sehr schwer züchtbar und nicht pathogen sind (Smegmabazillen, Pseudotuberkelbazillen).

Zu den Materialien, die öfter zur Untersuchung kommen, gehört der Urin. Oft wird man ihn nicht frisch erhalten. Um die Bakterien kennen zu lernen, die in einem solchen Falle besonders häufige Verunreinigungen sind, läßt man mehrmals Urin in einer Petrischale kürzere oder längere Zeit offen stehen und untersucht mikroskopisch und kulturell.

In derselben Weise werden die Bakterien des Stuhles aërob und anaërob untersucht.

XLI. Übung: Züchten von Tuberkelbazillen aus Sputum.

Die Züchtung der Tuberkelbazillen gelingt leicht mittels Tierpassage (VII. Übung), schwerer direkt aus tuberkulösem Sputum; doch

sollte sie jeder Praktikant ausgeführt haben. Bei der Auswahl eines geeigneten Sputums kommt es weniger auf eine große Zahl von Tuberkelbazillen, als auf eine geringe Zahl von Begleitbakterien an. Da auch dann die Tuberkelbazillen auf Serum oder Glyzerinagar überwuchert werden, stellt man sich folgenden Nährboden her: 10 g Stangenagar, 5 g Kochsalz, 1,43 g Kristallsoda, 100 Wasser. Auf diesem Nährboden wachsen die Tuberkelbazillen nur auf Kosten des mitausgestrichenen Schleimes, andere Bakterien bleiben relativ zurück. Er wird in Petrischalen ausgegossen, dann ein Sputumballen in mehreren Gefäßen mit sterilem Wasser abgespült, zerzupft und auf eine Anzahl Platten ausgestrichen. Aufbewahrung in feuchter Kammer wie früher (VII. Übung). Nach 10 Tagen sind die Tuberkelbazillenkolonien zwischen den bedeutend größeren Streptokokken- etc. Kolonien als kleine Häkchen und S-Formen sichtbar (Fig. 35); sie werden auf bei 70° erstarrtes Serum abgeimpft, mit Paraffin zugeschmolzen und im Brutschrank weitergezüchtet.

XLII. Übung: Pathogene Schimmelpilze.

Erkrankungen durch Schimmelpilze (fast stets Aspergillus fumigatus) kommen beim Menschen auf der Cornea und in den Atmungsorganen vor; bei Versuchstieren kann man außer diesen durch intravenöse Injektion interessante Krankheitsprozesse hervorrufen.

Das Einfangen des Asp. fumigatus geschieht sehr leicht auf Brot. Man bringt in 6 Petrischalen einige Millimeter hoch Schwarzbrotkrumen, feuchtet stark an, sterilisiert im Dampftopf und läßt 3 davon verschieden lange Zeit (bis zu einigen Stunden) offen stehen. Dann Aufbewahrung im Brutschrank. Nach 1—2 Tagen sind die Schimmelpilze deutlich zu unterscheiden. Asp. fumigatus (über das Aussehen der Aspergillen siehe Übung XVI) bildet einen erst olivengrünen, dann braungrünen Rasen; die Fruchtträger sind unverzweigt, ebenso die an ihren Enden sitzenden kleinen, die Sporen abschnürenden Sterigmen. Die Sporen (Konidien) sind kugelig, olivbraun und haben 2,5—3 μ im Durchmesser. Außerdem kann man noch finden: Asp. flavus s. flavescens: Rasen gelblichgrün, Sporen 5—7 μ im Durchmesser, weniger pathogen, daher für bestimmte Versuchszwecke (intraven. Injektion) besser zu gebrauchen. Asp. niger und Asp. nidulans, Sterigmen bei beiden verzweigt; Rasen bei ersterem dunkelbraun bis schwarz, bei letzterem grün.

Die gesuchte Art wird auf die 3 übrigen Platten mit Brot übergeimpft und so lange im Brutschrank gelassen, bis diese dicht überwuchert sind. Ferner werden 2 Agarröhrchen angesäuert, so daß der Agar blaues Lackmuspapier rötet, rotes nicht mehr bläut (nicht zu stark ansäuern, da er sonst nicht mehr erstarrt); dann schräg gelegt und beimpft.

1. Zur Erzeugung einer Keratomykosis aspergillina bringt man einen Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung in ein Agarröhrchen, verreibt die Sporen darin und schwemmt dann mit 1 ccm Kochsalzlösung ab. Damit infiziert man ein Kaninchen beiderseits auf die Cornea, indem man nach Kokainisierung die Spitze der Kanüle etwa 2 mm tief tangential einführt und durch leichten Druck injiziert. Dabei muß ein Quellungshof von etwa 2 mm Durchmesser entstehen. Im Verlauf der nächsten Tage sieht man eine Trübung: der Stichkanal ist durch die injizierten Sporen braun gefärbt, von ihm sieht man.

besonders bei Lupenbetrachtung, feinste Ausläufer ausgehen. Die Trübung nimmt in den nächsten Tagen zu; gleichzeitig tritt zwischen ihr und dem Hornhautrand ein sichel- oder ringförmiger Streifen auf, der an Breite und Ausdehnung zunimmt, bis er sich in wenigen Tagen zu einem geschlossenen Ring eitriger Infiltration ausgebildet hat. Nur bei geringer Virulenz bildet sich die Infiltration in der allernächsten Nähe des Stichkanals. Ferner entsteht ein Hypopyon. Das Tier wird etwa am 4. Tage getötet, die Augen in Sublimat fixiert, nach Härtung in Alkohol die Hornhaut herausgeschnitten und in Paraffin eingebettet. Das Schneiden (Schnittdicke 15—20 μ) geschieht bei einer parallel, bei der anderen senkrecht zur Oberfläche. Gefärbt wird mit Hämatoxylin-Eosin (Hämatoxylin Delafield 5—10 Minuten; Auswaschen in Wasser; kurzes Differenzieren in 1 % Salzsäure-Alkohol; gründliches Auswaschen in Leitungswasser, dem, wenn es zu weich ist (unter 5 Härtegrade) einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von Lithion carbonicum zugesetzt werden; Eosinlösung (1 ‰ in 96 % Alkohol ½—1 Minute; längeres Auswaschen in 96 % Alkohol; abs. Alkohol; Xylol; Kanadabalsam) — oder mit der Weigertschen Modifikation der Gramschen Färbung (s. S. 45).

Man sieht: Von dem Stichkanal breiten sich die Pilzfäden nach allen Richtungen, auch nach unten und oben unter reichlicher Verästelung aus. In einiger Entfernung von ihnen liegt der Infiltrationsring, der aus dichtgedrängten, an der Seite gegen die Schimmelpilze zu zerfallenen Leukocyten besteht und sich unten weiter nach der Mitte des Herdes hin erstreckt als oben. Die Pilzfäden wachsen sehr selten in den Leukocytenring hinein, niemals darüber hinaus; meist befindet sich eine freie Zone zwischen beiden. Nur bei sehr langsamem Wachstum der Pilze sind die einzelnen Fäden mit Eiterkörperchen umgeben.

2. Die Erzeugung einer Pneumonomykosis aspergillina gelingt mit Sicherheit nur an Tauben, am bequemsten durch Inhalation. Man setzt eine Taube 2 Stunden lang unter eine Glasglocke oder in eine Kiste und stellt die drei Petrischalen mit Reinkultur auf Brot dazu; durch den Flügelschlag wird oft genügend Material verstäubt, andernfalls muß man durch Blasen mittels eines Glasrohres nachhelfen. Am nächsten Tage erscheint die Taube krank, am zweiten oder dritten stirbt sie. Man findet die Lungen teilweise hepatisiert und mit grauen oder gelben Herden durchsetzt. Mikroskopisch untersucht man sofort im Zupfpräparate, indem man etwas 3 % Kalilauge zusetzt. Die Schimmelpilzfäden und die nicht ausgekeimten Sporen treten dann deutlich hervor. Fixieren in Formol oder Sublimat. Färben der Schnittpräparate wie vorher. Das Parenchym der Lunge ist an den gelb gefärbten Partien nekrotisch; zwischen stark zerfallenen Leukocytenkernen liegt ein dichtes Mycel von Aspergillusfäden, die noch weiter in die Umgebung eindringen. Manchmal findet man auch die ganzen Schimmelvegetationen in Riesenzellen liegen, die kolossale Dimensionen annehmen können.

3. Der Befund nach intravenöser Injektion ist verschieden, je nachdem man viel oder wenig Sporen nimmt. Man macht sich eine dichte Aufschwemmung in Kochsalzlösung; einen Teil davon verdünnt man, bis mit bloßem Auge kaum noch eine Spur von Trübung zu erkennen ist. Arbeitet man mit Asp. flavus, so injiziert man von diesem ½ ccm in die Ohrvene; von Asp. fumigatus verdünnt man erst noch-

mals 5—10-fach und injiziert ebensoviel. Einem anderen Kaninchen injiziert man ½ ccm der dichten Aufschwemmung ebenfalls intravenös. Dieses Kaninchen pflegt vor Ablauf von 24 Stunden einzugehen. Man findet mikroskopisch (ungefärbt, ohne und mit Zusatz von Kalilauge) eine Verschimmelung des ganzen Tieres; die sämtlichen Blutgefäße sind von dem Mycel durchwachsen. Schnittpräparate geben ebenfalls gute Bilder. Das andere Kaninchen wird nach 24 Stunden getötet. Man findet, besonders in Lunge und Niere, mehr oder weniger zahlreiche kleine graue Knötchen, die wieder im Zupfpräparate und im Schnittpräparate untersucht werden. Man sieht, besonders in letzterem, die Pilzfäden nach allen Seiten von einem Punkte aus strahlenförmig auseinandergehen. Die zentralen Partien des Rasens sind von einem Leukocytenmantel umgeben, während peripher längere Fäden in die Umgebung verlaufen und hier ohne zellige Infiltration das Gewebe nach allen Seiten durchsetzen. In der Lunge findet das Auskeimen teils in den Gefäßen, teils in den Alveolen statt. Infiziert man mehrere Tiere und tötet sie nach verschieden langer Zeit, so kann man den Verlauf des Prozesses in Schnittpräparaten sehr schön verfolgen.

XLIII. Übung: Bestimmung des Colititers.

Das typische Bact. coli findet sich in größerer Menge überall, wohin menschliche Abgänge gelangt sind; aus seiner Menge können gewisse Schlüsse auf derartige Verunreinigungen gezogen werden. Vor allem bei der Untersuchung des Wassers ist es von Bedeutung. Da es auf Platten leicht unter der großen Zahl anderer Bakterien übersehen werden kann, legt man eine Vorkultur in Bouillon an. Zur Übung nimmt man Wasser aus einem schlecht angelegten Brunnen oder einem Flusse.

Kann angenommen werden, daß das Wasser rein ist, so bringt man 100, 50, 3 × 5, 5 × 1, 5 × 0,1 ccm in Bouillon, die ersteren in gleiche Mengen, letztere in je 10 ccm. Ist es stark verunreinigt, so wird es in der Weise verdünnt, daß man 0,5 ccm mit 50 ccm sterilen Wassers, davon 0,5 ccm wieder mit 50 ccm und davon 0,5 ccm ebenso verdünnt. Von jedem Kölbchen bringt man 1,0 und 0,1 in je 10 ccm Bouillon. Aufbewahrung im Brutschrank. Nach 24 Stunden sind ein Teil der Proben gleichmäßig, ein Teil nur oben oder unten, ein Teil nicht getrübt. Nur die ersteren brauchen weiter untersucht zu werden. Man streicht davon auf Drigalskiagar aus und untersucht am nächsten Tage die rot gewachsenen Kolonien durch Ausstreichen auf gegossene Gelatineplatten und in Zuckeragar. Wird die Gelatine nicht verflüssigt und der Zucker vergoren, so handelt es sich um ein typisches B. coli. Die Berechnung geschieht in folgender Weise: es seien z. B. Coli gefunden in 100, 50, 2 × 10, 1 × 1 ccm; nicht in 2 × 10, 5, 4 × 1 ccm. Man faßt nun die Röhrchen zusammen: Coli zeigt sich stets in 100 und 50 ccm; nicht stets in 10 ccm, sondern nur 3 × (5 und 5 × 1 ccm ergänzen sich auf 10 ccm), also sind in 50 ccm (4 × 10, 1 × 5, 5 × 1) 3 Colibazillen, also in 16,67 ccm ein Colibacillus.

Eine andere (Breslauer) Methode ist folgende: Man löst in 100 ccm Wasser 5 g Milchzucker und 2,5 g Pepton und fügt 0,11 g Azolithmin dazu, die man vorher in 3 ccm Wasser gelöst hat. Sterilisieren im Dampftopf je 20 Minuten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen. Dies

bringt man zu 1 l des zu untersuchenden Wassers und gibt mit sterilen Pipetten in sterile Gläser wie oben mehrmals 0,1, 1,0, 5, 10, 100 ccm. Die Röhrchen zu 1,0 und 0,1 ccm sind mit einigen Kubikzentimetern der steril 10-fach verdünnten Stammlösung aufzufüllen. Die am folgenden Tage rotgefärbten sind weiter zu untersuchen.

Hat man einen auf 46° eingestellten Brutschrank zur Verfügung, so untersucht man nach Eijkman. Man versetzt das Wasser zu ungefähr $^1/_5$ seines Volums mit einer sterilen wässerigen Lösung von 10% Traubenzucker, 10% Pepton und 5% Kochsalz und verteilt es in Gärungsröhrchen. Coli aus Warmblüterfaeces wachsen bei 46° darin üppig und bilden Gas, solche aus Kaltblüterfaeces nicht.

XLIV. Übung: Leuchtbakterien.

Zur Züchtung von Leuchtbakterien läßt man einen Seefisch bei Zimmertemperatur liegen, bis er leuchtet. Dann bereitet man sich Agar mit 3% Kochsalz, gießt ihn in Platten und streicht von den Stellen, die am stärksten leuchten, auf eine Anzahl Platten aus. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Nach 1—3 Tagen untersucht man im dunklen Zimmer (warten, bis sich das Auge an die Dunkelheit gewöhnt hat). Oft kann man jetzt schon Reinkulturen abimpfen; andernfalls streicht man von der Stelle, die am stärksten leuchtet, nochmals auf Salzagarplatten aus. Das Leuchten tritt sehr schön hervor auf schrägem Salzagar und in Salzbouillon, besonders beim Schütteln; auf Salzagar kann man mit den Reinkulturen Figuren zeichnen.

XLV. Übung: Komplementfixierung. Wassermannsche Reaktion.

In Übung XXXIII wurde gezeigt, daß eine Hämolyse durch Serum nur eintritt, wenn das Komplement mit Hilfe des Ambozeptors an die Blutkörperchen gebunden wird. Diese Hämolyse bleibt aus, wenn das Komplement, bevor diese Bindung eintritt, an andere Stoffe gebunden wird. Die Bindung des Komplementes an andere Stoffe tritt jedoch nur dann ein, wenn auch hierfür ein geeigneter Ambozeptor vorhanden ist. Diese Bindung an den anderen Stoff — Antigen — ist nicht sichtbar; sie wird erst dadurch deutlich gemacht, daß die Hämolyse bei nachfolgendem Zusatz von Blutkörperchen und ihrem Ambozeptor ausbleibt. — Die Methode kommt besonders zur Anwendung bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. — Die Blutkörperchen werden in der Weise gewonnen, daß man sich eine 5% Aufschwemmung von defibriniertem Hammelblut in physiologischer Kochsalzlösung macht, zentrifugiert, die klare Flüssigkeit abgießt, durch die gleiche Menge einer Kochsalzlösung ersetzt und diese Prozedur dreimal wiederholt („die Blutkörperchen wäscht"). Als Ambozeptor nimmt man ein inaktiviertes Hammelimmunserum, wie in Kapitel XXXIII S. 83 gewonnen, jedoch sehr hochwertig (0,001—0,0005 ccm muß mit 0,1 ccm Komplement 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung bei 37° in 1 Stunde auflösen). Das Komplement befindet sich in dem am selben Tage gewonnenen Serum eines nicht vorbehandelten Meerschweinchens. Das Antigen bilden Substanzen in der Leber eines syphilitischen Fötus; diese wird mit etwas Quarzsand gründlich verrieben unter Zusatz von 5 Teilen physiologischer Kochsalzlösung und $^1/_2$ Teil 5% Karbollösung, mehrere Stunden im

Schüttelapparat behandelt und mindestens 4 Tage in den Eisschrank gestellt. Vor dem Gebrauch wird ein Teil davon durch scharfes Zentrifugieren geklärt, so daß er nur noch opalisiert, aber frei von allen Trübungen ist. 0,2 ccm davon muß (auf 1,0 aufgefüllt) mit 0,1 ccm sicher luetischen Serums komplette Hemmung der Hämolyse geben; 0,2 ccm darf nicht mit 0,2 ccm normalen menschlichen Serums die Hämolyse hemmen; 0,5 ccm darf allein nicht hemmen, widrigenfalls es verdünnt werden muß. — An dieses Antigen wird das Komplement durch Antiserum gebunden, falls sich solches in dem zu untersuchenden Serum befindet, d. h. falls das Serum von einem Syphilitiker stammt. Man mischt nun 0,2 ccm des zu untersuchenden Serums mit 0,2 ccm des Extraktes und 0,1 ccm Komplement (jedes auf 1,0 oder die halben Dosen auf 0,5 aufgefüllt), und stellt es 1 Stunde in den Brutschrank. Dann fügt man 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung und etwas mehr Blutkörperchenimmunserum zu, als eben mit dem Komplement zusammen Lösung ergeben würde (letzteres auf 1,0 resp. 0,5 mit Kochsalzlösung aufgefüllt) (vorher quantitativ untersuchen), und stellt noch 2 Stunden in den Brutschrank. Stammte nun das Serum von einem Syphilitiker, so wurde das Komplement schon bei dem ersten Aufenthalt im Brutschrank an das Antigen gebunden und konnte die später zugefügten Blutkörperchen nicht mehr lösen:

Leberextrakt—Antikörper im Patientenserum—Komplement
Blutkörperchen—Ambozeptor

Stammte es dagegen von einem Gesunden, so fehlten die Antikörper, und es trat Hämolyse ein.

Leberextrakt Komplement
Blutkörperchen—Ambozeptor

Kontrollen sind zu machen mit sicher syphilitischem und normalem Serum, ferner ohne Serum, und ohne Serum und Extrakt; in den drei letzten Fällen muß Lösung erfolgen, dagegen nicht im ersten Fall. Die Reaktion ist mit großer Vorsicht vorzunehmen, und nur Geübte dürfen Schlüsse daraus ziehen.

XLVI. Übung: Opsonine.

Außer den bisher behandelten Stoffen enhält das Serum thermolabile Substanzen, welche die Bakterien so zubereiten, daß sie von den Leukocyten leichter aufgenommen werden. Um sie nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, zieht man zunächst einige kurze Glasrohre zu Kapillaren von 15 cm Länge aus und versieht sie mit einer Gummisaugkappe. Einige andere werden an beiden Enden zu nicht zu engen, 4—5 cm langen Kapillaren ausgezogen, das eine Ende umgebogen (Fig. 40, verkleinert). — Die Untersuchung wird mit dem Serum des Patienten und mindestens dreier gesunder Personen vorgenommen. Man sticht in den Finger und saugt mit dem umgebogenen Ende der Kapillare Blut an, schmilzt zu und zentrifugiert, um die Abscheidung zu beschleunigen, indem man das umgebogene Ende an den Rand des Zentrifugengläschens hängt. — Die Leukocyten gewinnt man, wenn man zur Übung die Opsonine im Kaninchenserum untersuchen will, indem man etwas Aleuronat in Wasser zu einem dünnen Brei aufschwemmt, sterilisiert und 5—10 ccm einem Kaninchen mit stumpfer Kanüle in die Pleurahöhle injiziert. Nach 20 Stunden wird das Exsudat mit Hilfe einer Spritze (oder nach Tötung des Tieres) entnommen. —

Statt Menschenleukocyten nimmt man bequemer Menschenblut: einige Blutstropfen werden in etwas 1,5 % Natrium-citricum-Lösung gebracht, gemischt, zentrifugiert, die klare Flüssigkeit abgesaugt, durch physiol. Kochsalzlösung ersetzt, wieder zentrifugiert und abgesaugt. Von den Bakterien wird eine Öse einer 24-stündigen Agarkultur in 0,8 % (bei gramnegativen in 1,5 %) Kochsalzlösung aufgeschwemmt, so daß die Individuen im Gesichtsfeld einzeln gelagert und leicht zählbar erscheinen. Für Tuberkulose nimmt man abgetötete getrocknete Bazillen (von den Höchster Farbwerken), zerreibt sie in einem Achatmörser (der Anfänger kann es zur Übung auch in einem hohlgeschliffenen Objektträger mit einem Glasstabe vornehmen), indem man zunächst tropfenweise (resp. ösenweise) 1,5 % Kochsalzlösung zugibt, bis man eine Paste und dann eine Emulsion hat, bringt dann mehr dazu, zentrifugiert leicht und sterilisiert 1 Stunde bei 80 °; sie hält sich mehrere Monate lang.

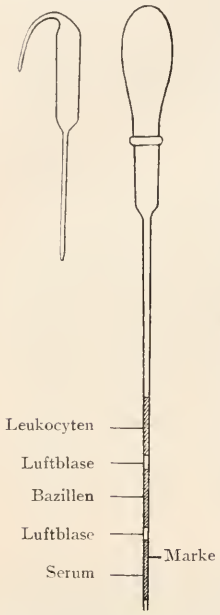


Fig. 40. Kapillaren zur Opsoninbestimmung (verkleinert).

Von den Leukocyten resp. den gewaschenen Menschenblutkörperchen, dem Serum des Patienten resp. zum Vergleich von normalem Serum und den Bakterien wird je ein Teil bis zu einer beliebig weit unten befindlichen Marke in die lange Glaskapillare aufgesogen, so daß zwischen den einzelnen Bestandteilen eine Luftblase bleibt (Fig. 40), dann auf einen Objektträger ausgeblasen, gründlich gemischt, wieder aufgesogen, zugeschmolzen und für 20 Minuten in den Brutschrank gelegt. Dann reibt man einen vorher stark erwärmten Objektträger mit Schmirgelpapier leicht ab, bringt den Tropfen aus der Kapillare darauf und verteilt ihn durch Streichen mit einem schräg gehaltenen Deckgläschen, so daß die Leukocyten in möglichst gleicher Schicht an ein Ende des Ausstriches zu liegen kommen, fixiert 2—3 Minuten lang in konzentrierter wässeriger Sublimatlösung, spült gut ab und färbt mit Methylenblau. Nun zählt man, wieviel Bakterien 100 Leukocyten mit Hilfe des normalen Serums aufgenommen haben, und findet z. B. 350 Bakterien, also im Durchschnitt 3.5 (= phagocytischer Index). Dann macht man dasselbe mit dem Serum des Patienten und findet z. B. im Durchschnitt 2,0. Das Verhältnis des phagocytischen Index des zu untersuchenden Serums zu dem des normalen Serums, 2.0 : 3,5. ist der opsonische Index des Patienten, also hier 0,6; demnach liegt er unter dem normalen.

XLVII. Untersuchung eines unbekannten Mikroorganismus.

Erhält man Material zur Untersuchung zugesandt, so ist zunächst die Frage, ob nur das Vorkommen eines bestimmten Mikroorganismus darin Interesse hat — z. B. tuberkulöses Sputum, Diphtherieabstrich, Cholerastuhl — oder ob die Marschroute nicht gegeben ist. Im ersteren Falle geht man nach bestimmten Regeln vor; im letzteren Falle gibt es kein bestimmtes Schema: die Untersuchung ist nicht mehr eine Technik, sondern eine Kunst, und der Blick des Geübten wird manche Möglichkeiten sehen, die dem Anfänger verborgen sind, und er wird

manche Methode beiseite lassen, die dem anderen nötig erscheint. Immerhin aber wird es dem Anfänger nützlich sein, den Weg kennen zu lernen, der in den meisten Fällen gangbar ist.

Das erste ist die makroskopische Prüfung des Materials auf Konsistenz, Farbe, Geruch. Dann wird zunächst ein mikroskopisches Präparat gefärbt und ungefärbt untersucht. Dies muß zuerst geschehen, da sich das ganze weitere Verhalten nach dem Befunde zu richten hat; sonst kann es vorkommen, daß man z. B. zunächst Agar- und Gelatineplatten gießt und dann mikroskopisch Influenzabazillen findet. Hierauf färbt man nach Gram, wobei unter Umständen erst vereinzelte Mikroorganismen sichtbar werden, und, falls nur der geringste Verdacht vorliegt, mit der Tuberkelbazillenmethode. Besonders hat man darauf zu achten, ob neben einer häufig vorkommenden Art andere Mikroorganismen in spärlicher Zahl vorhanden sind. Eine Untersuchung mit der Giemsa-Färbung könnte — neben der Untersuchung im ungefärbten Präparate — etwa vorhandene Protozoen aufdecken. Sämtliche Präparate sind sofort genau zu etikettieren und aufzuheben.

Nun erst nimmt man die kulturelle Untersuchung vor. — Hat man einen wohlbekannten Mikroorganismus gefunden, so geht man in derselben Weise vor, in der man bisher gearbeitet hat: für Staphylokokken bevorzugt man Agar- und Gelatineplatten, für diphtherieähnliche Löfflerserum, für sehr kleine Stäbchen blutbestrichenen Agar, für Vibrionen Peptonwasser etc. Ist dagegen die Art sehr zweifelhaft, so untersucht man mit möglichst vielen Methoden. — Von Agar und Glyzerinagar gießt man Platten und streicht außerdem auf gegossene oberflächlich aus. Ersteres hat den Vorteil der besseren Trennung, doch werden manche Mikroorganismen dadurch geschädigt. Rechnet man mit langsamerem Wachstum, so streicht man auch auf schrägen Agarröhrchen aus, um das Eintrocknen zu verhindern; jedoch ist dann die Betrachtung der Kolonien mit 60-facher Vergrößerung schwierig. Nach dem Ausstreichen sehe sich der Anfänger die auf der Platte und dem Röhrchen liegenden Gewebspartikelchen mit 60-facher Vergrößerung resp. der Lupe genau an, damit er sie oder Risse im Agar, die beim Ausstreichen entstanden sind, nicht am nächsten Tage für Kolonien hält. Auch in Bouillon wird von dem Material eingeimpft; zwar tritt hier sehr häufig eine Überwucherung durch verunreinigende Bakterien ein, doch ist dies manchmal die einzige Methode, um abgeschwächte Keime, z. B. aus Eiter, zur Entwicklung zu bringen. Selbstverständlich müssen stets auch die Nährböden für anspruchsvolle Bakterien (Löfflerserum, blutbestrichener Agar, Ascitesagar) verwendet werden. In passenden Fällen nimmt man auch Spezialnährböden, z. B. Drigalskiagar. — Ist infolge des Aussehens der Bakterien und des Geruches des Eiters Verdacht auf Anaërobe vorhanden, so legt man auch hiefür Kulturen an; jedenfalls soll man nie versäumen, wenigstens ein Röhrchen mit Zuckeragar in hoher Schicht zu impfen. Man beachte dabei die Regel, bei Anaërobenzüchtung stets viel von dem Ausgangsmaterial zu nehmen; haben sich die Bakterien erst einmal entwickelt, so genügen geringe Mengen zur Fortzüchtung.

Außerdem macht man den primären Tierversuch; d. h. man impft Versuchstiere, gleich mit dem Ausgangsmaterial subkutan, intravenös oder intraperitoneal. Stammt das Material von einem Tiere, so wählt man womöglich dieselbe Art; anderenfalls Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse etc.

Der Rest des Materials ist im Eisschrank aufzubewahren.

Am folgenden Tage und auch an den nächsten Tagen werden die Kulturen makroskopisch, mit der Lupe und bei 60-facher Vergrößerung untersucht. Man achtet darauf, ob die verdächtigen Punkte wirklich Kolonien sind (erstarrtes Serum wird auch durch sterilen Eiter verflüssigt) und wie viele Arten Kolonien vorhanden sind, bezeichnet sich einzelne davon und untersucht sie wie vorher mit den verschiedenen Färbungsmethoden. Die Größe und auch die Eigenbewegung ist je nach der Temperatur der Züchtung manchmal verschieden. Auch sind geringe Unterschiede vorhanden, je nachdem man aus dem obersten Teile eines schrägen Agarröhrchens, wo der Nährboden etwas trocken ist, oder aus dem Kondenswasser entnimmt. Findet man, daß sich die Bakterien in mancher Beziehung, z. B. in bezug auf die Färbbarkeit nach Gram, wesentlich anders verhalten als die im Ausgangsmaterial, so sei man dem Befunde gegenüber zunächst sehr mißtrauisch: derartige Abweichungen kommen zwar vor, sind aber sehr selten und beruhen bei Anfängern meist auf Versehen. Ist Eigenbewegung vorhanden, so färbt man die Geißeln; ferner sucht man Sporen nachzuweisen, und zwar im hängenden Tropfen, durch Sporenfärbung und durch Prüfung der Widerstandsfähigkeit gegen Hitze, indem man einige Minuten auf 80° erwärmt und abimpft. Die Sporenbildung erfolgt meist am besten auf Kartoffeln; ist der Befund zunächst negativ, so untersucht man auch nach längerer Zeit. Zu differentialdiagnostischen Zwecken impft man auf verschiedene Nährböden, wie auf schräge Gelatine (die Verflüssigung tritt manchmal erst nach einer Woche ein), Neutralrotagar, Malachitgrünagar, Agar mit verschiedenen Zuckerarten etc. Dann prüfe man, ob der betreffende Mikroorganismus mit dem Blute des Kranken oder immunisierter Tiere Serumreaktionen gibt.

Mit der Reinkultur sind ferner Tiere zu impfen: wenn die Impfung mit geringen Mengen negativ ist, auch mit großen Mengen, und zwar nach den verschiedenen erwähnten Methoden, unter Umständen auch in die vordere Kammer und durch Einreiben auf die rasierte Bauchhaut. Erkranken die Tiere, so sieht man zu, ob man ein Gift aus den lebenden Bazillen gewinnen kann (analog dem Diphtherietoxin) oder ob die durch Erwärmen oder Chloroform abgetöteten Bakterien giftig sind.

Die gefundenen Mikroorganismen werden identifiziert mit Hilfe eines Hand- oder Lehrbuches. Finden sie sich darin nicht, so ist in referierenden Zeitschriften, wie Baumgartens Jahresbericht, Hygienische Rundschau, Centralblatt für Bakteriologie nachzusehen.

Register.

Die mit römischen Ziffern bezeichneten Stichworte sind im Inhaltsverzeichnis aufzusuchen.

Abbescher Beleuchtungsapparat 9.
Abfüllen der Nährböden 37.
Abgeblaßte Präparate, Nachfärben 13.
Abimpfen unter dem Mikroskop 17.
Absoluter Alkohol 8.
Ac. carbolicum 9.
— tannicum 65.
Aetheralkohol 29.
Aethylamin 65.
Agar 14, 36.
— alkalischer 36.
— blutbestrichener 77.
— Blutagar 41.
— dreiprozentiger 36.
Agarplatten, Gießen von 14.
Agglutination 30, 85.
Aktinomykose 82, XXVI.
Aleuronat 104.
Alexine, s. bakterizide Wirkung des Blutserums.
Alkohol 8.
— salzsaurer 8.
Alkoholische Lösungen 8.
Ambozeptor 97, 104.
Anaërobenzüchtung XX.
Anaphylaxie XXIX.
Anilin 9.
Anilinviolett 10, 20.
Anilinwasser 10.
Anilinxylol 45.
Anreicherung von Choleravibrionen 51.
— von Tuberkelbazillen 38.
— von Typhusbazillen für Schnittpräparate 25.
Antiformin 38.
Antigen 104.
Antimonbeize 65.
Antitoxin XXXIX.
Antrocknen 52.
Aqua cresolica 55.
Argentum sulfuricum 65.
Ascitesflüssigkeit 6.
Aspergillus 61.
— flavus 101.
— fumigatus 101.
— nidulans 101.
— niger 101.
Aufbewahren der Kulturen 24, 63.
Aufhellen der Milch 35, 99.
Aufkleben der Schnitte 25.
Ausstrichpräparate 12.

Bac. anthracis II, XXIII.
— botulinus XXVIII.
— cholerae gallinarum IV.
— coli III, XLIII.
— dysenteriae XXXVII.
— enteritidis XXXVII.
— erysipelatos suum IV.
— influenzae XXVII.
— mallei XXXII.
— mesentericus 34.
— mycoides 34.
— oedematis maligni XXIV.
— paratyphi XXXVII.
— phosphorescens XLIV.
— prodigiosus XIX, XXIII.
— proteus XVII.
— pyocyaneus XIX, XXIII.
— subtilis 20.
— tetani XXVI.
— tuberculosis VII.
— typhi III, XXXIV.
Bakteriolyse XXII.
Bakterizide Wirkung des Blutserums XXXVIII.
Beize 65.
Belag, Aussehen des 35.
Beleuchtung 9.
Beseitigen der Kadaver 7.
— der Kulturen 26.
Blockschälchen, Agglutination in 31.
Blutentnahme 80.
Blutagar 41.
Blutalkaliagar, Herstellung 36, 39.
— Verwendung 49, 51.
Blutserum, Gewinnung v. Schlachttieren 36.
— Löfflersches 37.
— menschliches 6.
— bakterizide Wirkung XXXVIII.
Boden, Keime im V.
Borsäure, Nachweis 34.
Botulinus XXVIII.
Bouillon 35.
Brot als Nährboden 101.
Buttersäurebazillen XX.

Carbol s. Karbol.
Celloidin 29.
Chamberlandfilter 99.
Chemische Desinfektion 55 ff.
Chlorcalcium 4, 63.
Chloroform 56.
Choleradiagnose 49 ff.
Choleraähnliche Vibrionen X. XXIII.
Chromsäure 65.
Chrysoidin 8, 43.
Colibazillen II.
Colititer XLIII.
Complement s. Komplement.
Conjunctiva 41, 100.
Conidien s. Konidien.
Corneale Infektion 43.
Corynebacterium 43.
Cuprum sulfuricum 8.

Dampfdesinfektion 54.
Dampftopf 3.
Deckglaspräparate 11, 15.
Delafields Hämatoxylin 71, 102.
Desinfektion, chemische 55 ff.
— der Hände 59.
— des Mikroskops 11.
— durch Sonnenlicht 59.
Diagnostikum, Fickersches 85.
Dieudonnéscher Blutalkaliagar, Herstellung 36, 39.
— Verwendung 49, 51.
Diphtheriebazillen IX.
Diphtheriegift XXXIX.
Diplococcus lanceolatus XV.
Diplokokken 39, 60.
v. Drigalski-Conradischer Nährboden 85 ff.
Dysenteriebazillen XXXVII.

Eigenbewegung 10, 16, 108.
Einbetten 29.
Einschmelzen von Kulturen 24.
Eintrocknen, Prüfung der Widerstandsfähigkeit gegen 52 ff.
Eisenoxychlorid 88.
Endoscher Nährboden 84 ff.
Entwicklungshemmende Wirkung 56, 57.
Eosin 102.
Epizootien unter den Versuchstieren 7.
Erdbazillen V.
Essigsaures Methylenblau 8, 43.
Exsikkator 4.
Exsikkatorfett 9.

Farbstoffe 9.
Farbstoffbildende Bakterien 17, 62, 67.
Farbstoffniederschläge. 20.
Färbung, Allgemeines 11, 15.
— von Fibrin 45.
— von Geißeln XXIV.
— nach Gram 20, 32.
— von Kapseln 20.
— mit Karmin 32.
— in Paraffin 98.
— mit Pyronin-Methylgrün 81.
— von Schnittpräparaten 24, 32, 71, 98, 102.
— von Sporen 22.
Färbung von Tuberkelbazillen im Ausstrich 38.
— — — im Schnitt 71.
— nach Weigert (Gram) 45, 52, 102.
Ferrisulfat 88.
Fibrinfärbung 45.
Fickersches Diagnostikum 85.
Filtrieren durch Tonkerzen 99.
Fischen 17.
Fixieren von Ausstrichpräparaten 12, 29.
— — — aus Bouillonkultur 41.
— von Organen mit Formalin 20.
— — — mit Sublimat 66.
Fleischvergiftungsbaz. XXVIII, XXXVII.
Fleischwasser 35.
Formalindesinfektion 56.
Formalinfixation 20.
Fraktionierte Sterilisierung 60.
Friedländersche Bazillen XI.
Fuchsin 9, 12.
Fuchsinsulfitagar 84 ff.

Gärtnersche Fleischvergiftungsbazillen XXXVII.
Geflügelcholera IV, XXIII.
Gegenfärbung 20, 32, 71, 102.
Geißeln XXV.
Gelatinebereitung 35.
Gelatine, alkalische 35.
Gelatineplatten 13.
Giftbildung 97 f.
Glaskolben 2.
Glyzerinagar 35.
Glyzerinäthergemisch 99.
Gonokokken XXXI.
Gramsche Färbung 20, 32.
Gram-Weigertsche Färbung 45, 52, 102.
Granaten 51.

Hämatoxylin 71, 102.
Hämolyse XXXIII, 104.
Händedesinfektion 59.
Hängender Tropfen 10, 15.
— — Kultur im 20.
Hefen XVI.
Heilserum 99.
Heubacillus 20.
Hitze, Widerstandsfähigkeit gegen 52 ff.
Hohe Schicht 71, 107.
Hühnercholera IV, XXIII.

Immunisierung XIII, XXI, XXII, XXXIII.
Immunisierungseinheit 99.
Infektion, corneale 43.
— intraperitoneale 38, 43.
— intravenöse 42.
— subkutane 14.
Influenzabazillen XXVII.
Indolbildung 30, 49.
Involutionsformen XXIII.

Jodlösung 8, 19.

Kadaver, Vernichten der 7.
Kalilauge 9, 36, 69.

Kaliumnitrat 36.
Kaliumpermanganat 62.
Kalkmilch 58.
Kaninchen 7.
Kapillarattraktion, Aufkleben mit 25.
Kapselbazillen XI.
Kapselfärbung 20.
Karbolfuchsin 9.
Karmin 8, 32.
Kartoffeln 14.
Keimzählung 57.
Keratomykosis aspergillina 101.
Kippscher Apparat 69.
Klärung mit Eiweiß 37.
Klatschpräparate 22.
Klingelthermometer 54.
Knospung 61.
Kochsalzlösung, physiol. 9.
Koli s. Coli.
Komplement 97, 104.
Komplementfixierung XLV.
Konidien 101.
Kontaktklingelthermometer 54.
Kontrollcure 4, 54.
Körnchenfärbung 8, 43.
Krankheitssymptome an Versuchstieren 17, 31, 78, 82, 87.
Kresolseifenlösung 55.
Kristallviolett 8, 43, 86.
Kultur im hängenden Tropfen 20.
— der Anaëroben XX.
Künstliche Beleuchtung 9.
Kupfersulfat 8.

Lackmuslösung 5, 86.
Lackmus-Mannitagar, Herstellung 86.
— Verwendung 91.
Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar 84 ff.
Lackmuspapier 36, 84.
Langescher Nährboden 86, 91.
Leuchtbakterien XLII.
Lichtwirkung 59.
Liq. ferri oxychlorati 88.
— — sesquichlorati 80.
Lithioncarbonat 8, 101.
Lithionchlorid 71.
Lithionkarmin 8, 32.
Löfflersches Methylenblau 9.
— Malachitgrünagar, Herstellung 83 ff.
— — Verwendung 88, 89.
— Serum 37.
Lokaler Tetanus 78.
Luftkeime V.
Lupe 4, 35.

Malachitgrünagar, Herstellung 83 ff.
— Verwendung 88, 89.
Malignes Ödem XXIV.
Malleus XXXII.
Mannitagar, Herstellung 86.
— Verwendung 91.
Mäuse, Mäusezange 6.
Meerschweinchen 7.
Meningokokken XXX.
Menschliches Serum 6.
Merista 11.
Methylenblau 9.
— essigsaures 8, 43.
— Löfflersches 9.
— polychromes 98.
Methylgrün 81.
Methylviolett 8, 10.
Micr. gonorrhoeae XXXI.
— intracellularis XXX.
— pyog. aureus VIII.
Mikroskop 4.
Milch 14.
— Aufhellung der 35, 99.
— Buttersäuregärung der 67 f.
Milchzucker 86.
Milzbrandbazillen II, XXIII.
Milzvergrößerung 18.
Molekularbewegung 11.
Mucor 61.
Mycobacterium tuberculosis s. Tuberkelbazillen.

Nachfärben abgeblaßter Präparate 13.
Nackenschlag 45.
Nährböden 6, VI.
Natrium citricum 106.
Natriumnitrit 30.
Natriumsulfit 86.
Neissersche Körnchenfärbung 8, 43.
Neutralisation 37, 84.
Neutralrot 8, 27.
Nitrit 30.
Normalgift 99.
Normallöse 30.
Normalserum 99.
Nutrose 86.

Obduktion 7, 18.
Objektträger, hohlgeschliffene 1, 10.
Operationsbrett 7.
Opsonine XLVI.
Orceïn 98.
Organe, Fixation der 20, 66.
Öse 2, 30.
Osmiumsäure 65.
Oxalsäure 47.

Paraffin, Einbetten in 29.
— Färben in 98.
— Schneiden von 25.
Paratyphusbazillen XXXVII.
Penicillium 61.
Pepton 35.
Peptonisierung 35.
Peptonstammlösung 36.
Peptonwasser 36.
Permanganat 62.
Petrischalen 1.
Pfeifferscher Versuch 95.
Phagocytischer Index 106.
Phagocytose 33, 64, 81, XLV.
Phenanthrenröhrchen 4, 54.
Phenolphthaleïn 47.
Physiologische Kochsalzlösung 9.
Pikrinsäure 7.
Plasmolyse 28, XXIII.
Plastilin 68.

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLE MASS.

Platindraht 2.
Platten 1.
Plattengießen 13.
Pneumokokken XV.
Pneumonomykosis aspergillina 102.
Pneumoniebazillen, Friedländersche XI.
Polfärbung 29.
Polychromes Methylenblau 98.
Polytroper Nährboden 86.
Präzipitine 85, XXI.
Primärer Tierversuch 107.
Prodigiosus XIX, XXIII.
Proteus XVII.
Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Chemikalien 55 ff.
— — Eintrocknen 52 ff.
— — Hitze 52 ff.
Pseudodiphtheriebazillen 41, 44.
Pyocyaneus XIX, XXIII.
Pyrogallussäure 69.
Pyronin 81.

Rachen, Untersuchung 100.
Reaktion der Nährböden 37, 84.
Reduktion 28.
Reinkultur 13, 15.
Resistenz, s. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit.
Rotzbazillen XXXII.
Ruhrbazillen XXXVII.

Safranin 8, 20, 22.
Salzsäurealkohol 8.
Sammlung von Bakterienkulturen 24, 63.
Säurebildung der Diphtheriebazillen 47.
Schimmel XVI, XVII.
Schmierplatte 43.
Schnittfärbung 24, 32, 71, 98, 102.
Schnittpräparate, Schneiden der 24.
— Behandlung vor dem Schneiden 20, 23, 24, 26, 28, 29.
Schüttelkultur 27.
Schweinerotlauf IV.
Seidenfäden 51.
Sektion 7, 18.
Serum, Löfflersches 37.
— menschliches 6.
Serumagar 81.
Smegma 100.
Soda 36.
Sonnenlicht, desinfizierende Wirkung 59.
Speisegelatine 36.
Sporen 20, 21.
Sporenfärbung 22.
Sprossung 61.
Stammkultur 16.
Stangenagar 36.
Staphylokokken VIII.
Sterigmen 61.
Sterilisation der Gefäße 9.
— der Nährböden 36 ff.
— fraktionierte 60.
Stichersche Kontrolleure 4, 54.
Streptococcus lanceolatus XV.
— longus, brevis 41.
— pathogenes, mitior, mucosus 44.
Streptokokken VIII, 78.
Stuhl, Desinfektion 58.
— Züchtung von Typhus und Cholera X, XXXIV.
Subkutane Infektion 14.
Sublimat, Fixation mit 66.
— Prüfung der Wirkung auf Bakterien 56, 57.
Sublimatlösung 9.
Sulfit, Nachweis von 34.
Sulfitfuchsinagar 84 ff.

Tannin 65.
Tartarus stibiatus 65.
Tetanusbazillen XXVI.
Tierzucht 7.
Titrieren 47.
Toluol 99.
Tonkerze 99.
Tonsillen, Untersuchung 100.
Töten der Tiere 18, 45.
Toxin XXXIX.
Traubenzucker 36.
Tropfen, hängender 10, 15.
— — Kultur darin 20.
Tuberkelbazillen VII, XLI.
— Nährböden 60, 84, 100.
Typhusbazillen VII, XIII, XXXIV.
Typhusdiagnostikum 85.
Typhusserum XIII.

Unnas polychromes Methylenblau 98.
Untersuchen im Wasser 20.

Vernichten der Kadaver 7.
— der Kulturen 26.
Versuchstiere 6.
Vibrionen X, XXIII.

Waschen der Blutkörperchen 96, 104.
Wasser, Untersuchen im 20.
Wasserbakterien 59, 89.
Wassermannsche Reaktion XLV.
Wasserstoff 69.
Wassertrockenschrank 3.
Wasseruntersuchung XIV.
— auf Choleravibrionen 49 ff.
— auf Typhusbazillen 88 f.
Weigertsche Färbung (Gram) 45, 52, 102.
Weinsaures Kali 88.
Widerstandsfähigkeit s. Prüfung.
Wurzelbazillus s. Bac. mycoides.

Zählapparat 57.
Zettnowsche Geißelfärbung 65, 74.
Zielsche Lösung 9.
Züchten s. Kultur.
Zuckeragar 27, 36, 83.
Zuckerbouillon 36.
Zuckervergärung 28, 91.
Zuschmelzen der Kulturen 24.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4421

POESTE, LUDDECKE & CO.
BUCHBINDEREI LEIPZIG