Aus dem Pathologisch - anatomischen Laboratorium des
Krankenhauses in Palermo.

Zur Technik der bakteriologischen Schnell- diagnose der Cholera asiatica.

Von Prof. G. Pollaci, Vorstand des Laboratoriums.

In der Nacht zum 16. September 1910 stellte sich im hiesigen Krankenhause die 47jährige Prostituierte R. R. mit choleraverdächtigen Symptomen ein. Die von mir in meinem Laboratorium rasch durchgeführte bakteriologische Untersuchung der Faeces ergab positives Resultat in bezug auf die Anwesenheit des Cholera vibrio. Die Frau, die sofort in das Lazarett übergeführt worden war, kam am Abend darauf zum Exitus.

An den Faeces dieses Falles, der eben der erste der kürzlichen Epidemie zu Palermo war, und an denjenigen einer anderen, am 12. Oktober 1910 ebenfalls in das Lazarett aufgenommenen Patientin M. A., die mir von Prof. Di Blasi, Direktor des städtischen mikrographischen Laboratoriums, freundlichst zur Verfügung gestellt wurden, habe ich die neuen Methoden für die Schnelldiagnose der Cholera prüfen wollen: die von Bandi (1910) und die von Dunbar (1905).

Zur Kontrolle benutzte ich die zwei von mir aus den Exkrementen dieser beiden Patientinnen isolierten Vibrionestämme und einen Stamm Kommabazillen, der zu Neapel ebenfalls in der letzten Epidemie von 1910 isoliert wurde.

Zur größeren Glaubwürdigkeit der Resultate habe ich

mich auch diarrhoischer Faeces verschiedener Kranker mit gewöhnlicher Enteritis aus unserem Krankenhause bedient.

Die direkte bakterioskopische Untersuchung der Dejektionen der beiden Cholerakranken R. und A., die an Ausstrichpräparaten mit der gewöhnlichen verdünnten Färbung nach Ziehl gemacht wurde, zeigte eine ziemliche Anzahl Vibrien, die bei der zweiten bedeutend zahlreicher waren, von differenter Krümmung, verschiedener Länge und Breite, im Verein mit einer großen Menge Bakterien von verschiedenartiger Form und Größe, wie sie der intestinalen Mikroflora eigen sind.

In den Faeces der R. fanden sich außerdem zahlreiche Formen feiner Spirochäten, von denen einige sehr lang waren, mit weiten Windungen, zugespitzten Enden, welche sich blaß färbten und sich nicht in den gewöhnlichen Nährböden züchten ließen.

Diese Spirillenformen¹⁾ werden nicht selten in den Exkrementen der Cholerakranken beobachtet; sie sind bei der Cholera in Neapel im Jahre 1884 und nach der Mitteilung Bandis auch jetzt wahrgenommen worden. Ich habe sie in den schleimigen Dejektionen gewöhnlicher Enteritiskranker aufgefunden, Escherich hat sie bei der Enterocolitis der Katzen gefunden, Mya bei der Enterocolitis der Kinder etc.

Die von mir aus diesen zwei Cholerafällen isolierten Kulturen zeigten die gewöhnlichen Merkmale der Kulturen der Cholera-vibrien — nur war die Entwicklung eines Häutchens in den flüssigen Medien nicht immer konstant und prompt —, erzeugten reichlich und rasch Nitrosoindol und gaben die charakteristischen Kolonienformen in Gelatine, sowohl in den Strich- wie Stichkulturen.

Die Vibrien hatten äußerst lebhaft Bewegungen, nahmen Gram nicht an; einige besaßen eine einzige Geißel an einem Ende, die mit Burris Tuscheverfahren deutlich sichtbar war, andere entbehrten dieser, hatten schwache Virulenz gegen Meerschweinchen, waren gegen die Pfeiffersche bakteriolytische Probe und die Agglutinine äußerst empfindlich. Der zu Neapel isolierte Stamm zeigte fast dieselben morphologischen und biologischen Charaktere wie die beiden von Palermo.

Bei beiden Faecesproben dieser Cholerakranken habe ich die neuen Untersuchungsmethoden für die Choleradiagnose verwendet, und zwar die von Bandi und die von Dunbar.

Die Bandische Technik stützt sich auf die Eigenschaft des agglutinierten Wachstums, welche die in flüssigen Medien mit Zusatz spezifischer Agglutinine kultivierten Bakterien besitzen. Diese Eigenschaft ist für verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen worden: für die Pneumokokken, den Eberth'schen Bacillus, von Bandi für den Bacillus icteroides, von mir für den *Micrococcus melitensis*²⁾ etc.

Ihre Ausführung ist höchst einfach: In besondere, unten konisch zugespitzte, Dunham-Kochsche Bouillon enthaltende Röhrchen wird eine Oese der verdächtigen Faeces eingesät, die Menge Anticholeraserum zugesetzt, welche in dem Nährboden einen über die Hälfte des absoluten paralytischen Wertes des Serums betragenden Agglutinationstiter herstellt und dies, um sicher die Gruppenagglutinationen auszuschalten, die neuerdings von Bandi selbst bei einem Vibrienstamm von Finkler und Prior angetroffen wurden. Die Reagenzgläser werden bei 36°–37° in den Brutschrank gestellt und zwei bis sieben Stunden darin belassen. Wenn in dem Untersuchungsmaterial Cholera-vibrien vorhanden sind, so wird man in dem vorgenannten Zeitraum in der Kulturflüssigkeit die Anwesenheit einer großen Menge kleiner Klümpchen bemerken, bestehend aus im Statu nascendi agglutinierten Bazillen, welche sich allmählich in dem geneigten Stück des Reagenzglases absetzen, bis sie den zugespitzten Endteil erreichen.

Das antibakterielle Vermögen der agglutinierenden Anticholerasera, die durch Einspritzung abgetöteter Vibrienkulturen hergestellt werden, ist, wenn diese dealexiniert sind, äußerst gering und beeinträchtigt nicht den Ausfall der Probe, da sie die Mikrobenentwicklung nicht inhibieren, ja nach den Untersuchungen von Bandi deren Wachstum anregen.

¹⁾ Spirillum Hachizae nach Kowalski.

²⁾ G. Pollaci, Zentralblatt für Bakteriologie 1909.

Die Dunbarsche Technik stützt sich ebenfalls auf die Agglutination, doch werden zur rascheren Durchführung der Probe die Faeces direkt auf die Vibrien untersucht und nicht deren Entwicklung in den Kulturböden abgewartet.

Dabei wird in folgender Weise verfahren: Auf ein Gläschen wird ein Tropfen gewöhnlicher Salzpeptonlösung und normalen Kaninchen-serums im Titer von 1 : 50, auf ein anderes Gläschen ein Tropfen im Verhältnis von 1 : 500 mit Kochsalz-Peptonlösung verdünnten agglutinierenden Serums gebracht. In beiden Tropfen läßt man etwas von den verdächtigen Faeces oder ein Schleimflockchen zergehen und stellt damit zwei hängende Tropfen her. Sie werden sofort unter dem Mikroskop beobachtet und dann nach einer halben und höchstens einer Stunde, die die Präparate bei 37° C geblieben sind.

Das diagnostische Urteil wird unter Anwendung derselben Kriterien abgegeben, welche bei der Bewertung der mikroskopischen Agglutination an in Reinkultur isolierten Bazillen eingehalten werden.

Ich habe mehrmals die beiden Untersuchungsmethoden sowohl direkt mit den Vibrien der Faeces der beiden Kranken, wie mit den bereits aus diesen isolierten und anderen diarrhoischen, nichtcholerösen Faeces zugesetzten geprüft. Bei letzteren Untersuchungen habe ich auch die zu Neapel isolierten Kommabazillen verwendet. Ich bemerke sogleich, daß die Bandische Probe mir konstant gut gelungen ist, sowohl mit den natürlichen cholerösen Dejektionen als mit den künstlich infizierten, und zwar bei beiden Vibrienstämmen.

Die Agglutination und Sedimentation der Bakterien erfolgt stets bei sämtlichen Proben, war immer rasch durchzuführen (im Durchschnitt in sechs Stunden) und konstant für die Cholera-bazillen spezifisch; die anderen Bakterien blieben stets in der Kulturflüssigkeit suspendiert.

Da mir die besonderen Bandischen Röhren nicht zur Verfügung standen, verwendete ich die gewöhnlichen Reagenzgläser, wobei ich diejenigen von kleinerem Kaliber auswählte; das Sediment bildete sich ziemlich deutlich auch in diesen gewöhnlichen Reagenzgläsern. Mit einer sterilen Pipette konnte ich es zur weiteren mikroskopischen Kontrolluntersuchung und zu neuen Verimpfungen leicht aspirieren.

Ich habe die Ueberzeugung gewonnen, daß die Bandische Probe für die bakteriologische Diagnose der Cholera wirklich von Nutzen ist, da sie keine Irrtümer erzeugt und ein Urteil in ganz kurzer Zeit gestattet.

Jedoch hat mir diese Technik bei der Isolierung der Cholera-erreger keine befriedigenden Resultate gegeben, und zwar deshalb, weil die Klümpchen der agglutinierten Bakterien bei der Sedimentation stets einige andere Mikroben aus der großen Anzahl der in der Bouillon entwickelten mit sich niederreißen und bei der Einsaat in neue Böden zur Entwicklung konstant verunreinigter Kulturen führen; es ist deshalb notwendig, stets Isolierplatten herzustellen. Vielleicht dürfte die Benutzung der geeigneten Röhrchen besser diesem Zweck entsprechen und so die Bandische Technik auch bei der Isolierung der Vibrien von Nutzen sein.

Das Untersuchungsverfahren von Dunbar bietet durch die zu seiner Durchführung nötige Zeit Vorzüge gegen das erstere, doch hat es mir bei der praktischen Anwendung stets negative Resultate ergeben. Ich habe keine Agglutination erhalten, weder direkt mit den Kommabazillen der Faeces selbst, noch bei Zusatz der aus den beiden Kranken isolierten Vibrien zu den diarrhoischen Exkrementen sonstiger gewöhnlicher Enteritiskranker. Der negative Ausfall der Untersuchung hängt meiner Ansicht nach von der Anwesenheit uns unbekannter Substanzen ab, welche zuweilen in den Faeces enthalten sind und das physikalische Phänomen inhibieren.

Uebrigens ist, die Möglichkeit des Eintrittes desselben angenommen, der Vibriengehalt einer Oese diarrhoischen Materials so gering, daß, auch wenn die Agglutination erfolgt, die Zahl der die einzelnen agglutinierten Gruppen bildenden Bazillen so klein sein wird, daß man auch bei Anwendung der Kontrolluntersuchungen in dem Urteil sehr in Zweifel bleiben wird.

Zwecks Erzielung einer schnellen Diagnose der Cholera habe ich es für interessant gehalten, unter Verwertung der höchst spezifischen Eigenschaften der Choleraagglutinine das Vermögen dieser auf die — zusammen mit anderen Mikroben —

bei den ersten Einimpfungen in Dunham-Kochscher Bouillon kaum entwickelten Kommabazillen zu prüfen, ohne die weitere Anreicherung und Reinigung der Kultur durch neue Passagen abzuwarten, so wie von Berger (Hamburg) vorgeschlagen und jetzt von Zirolia im Hygienischen Institut zu Genua ausgeführt worden ist.

Bei meinen zahlreichen Versuchen mit den beiden Proben choleröser Faeces wie mit den künstlich infizierten Dejektionen habe ich konstant positive Resultate erhalten. Die mikroskopische Agglutination ist nie ausgeblieben, sondern war stets deutlich wahrnehmbar, ausschließlich durch Vibrionenhaufen gebildet ohne Beteiligung der anderen Bakterien, welche sich bei den ersten Aussaaten des Kotmaterials zuweilen in nicht unbeträchtlicher Anzahl entwickeln.

Die höchst einfache von mir benutzte Technik ist folgende:

In je 100 cem Dunham Kochsche Bouillon enthaltende Erlenmeyerkölbchen wird 1 cem Faeces eingesät, nach sechs Stunden Brutschrank bei 37° werden zehn Tropfen der infizierten Bouillon von der Oberfläche abgehoben, in einem Uhrglas aufs sorgfältigste mit weiteren 10 oder 20 Tropfen Kochsalz-Peptonlösung unter Zusatz von agglutinierendem Anticholeraserum im Verhältnis von 1 : 1000 (wenn das vorher analysierte Serum einen Wert von über 1 : 2000 besitzt) vermischt und in einem niedrigeren Prozentsatz, wenn es einen geringeren Wert besitzt; doch wird am besten stark agglutinierenden Sera der Vorzug gegeben.

Es werden so Lösungen mit einem Titer von 1 : 2000 resp. 1 : 3000 hergestellt.

Darauf Herstellung mehrerer hängender Tropfen und in Zwischenräumen wiederholte mikroskopische Beobachtung für einen Zeitraum von ½—1 Stunde, wobei man darauf zu achten hat, daß die Präparate in den Zwischenräumen im Brutschrank bei 37° gehalten werden, oder ein Mikroskop mit erwärmbarem Tischchen verwendet wird.

Das Phänomen der Agglutination entsteht so unter unseren Augen, und wir können seinen Fortschritt in dem Maße, wie es eintritt, verfolgen.

Natürlich ist es von Nutzen, zur Kontrolle hängende Tropfen aus Normalserum derselben Tierspezies, aus der das agglutinierende Serum gewonnen worden ist, in zehnfacher Konzentration und mit einer einfachen Kochsalz-Peptonlösung hergestellte Präparate zu haben.

Mit dieser Technik läßt sich in sechs oder sieben Stunden ein sicherer Bescheid für die bakteriologische Diagnose der Cholera erhalten, ohne die ganze Zeit abwarten zu müssen, die notwendig ist, um eine Reinkultur zu erhalten, mit der dann die Agglutinationsprobe vorzunehmen wäre.

Auch an den bei den ersten Einsaaten erhaltenen unreinigten Kulturen habe ich die Pfeiffersche bakteriolytische Probe in vitro vorgenommen. Sie ist ebenso scharf und positiv ausgefallen, als wenn sie an isolierten Bakterien und in der Bauchhöhle des Meerschweinchens gemacht worden wäre.

Das rasche Wachstum des Cholera vibrio, der hohe Agglutinationswert und die absolute Spezifität der Agglutinine dispensiert uns von dem Gebrauch der Reinkulturen für die Untersuchung auf das diagnostische Zeichen. Gruppenagglutinationen, wie sie z. B. beim Typhusbacillus und den verwandten Bakterien angetroffen werden, finden in der Familie der Vibrionen nicht statt, ja für sie gilt eine fast absolute Spezifität der Paralysine von Pfeiffer und Kolle.

Die Agglutination eines Stammes des *Vibrio proteus* Finkler und Prior bei einer Verdünnung des Anticholeraserums von 1 : 1000, die neuerdings von Bandi angetroffen wurde, hebt die Spezifität der Erscheinung nicht auf, da weit entfernt von dem Titer 1 : 2000, bei dem im allgemeinen das Anticholeraserum verwendet zu werden pflegt.

Bei zahllosen Proben habe ich die in einem hängenden Tropfen zusammen mit vielen anderen Bakterien in Suspension enthaltenen Cholera vibrien sich bei Zusatz spezifischen Serums rasch agglutinieren und die gewöhnlichen charakteristischen Inselchen bilden sehen, ohne daß in ihren Gruppen fremde Mikroben eingeschlossen gewesen wären, gerade als ob sie sich in Reinkultur befunden hätten.

Bei der Identifizierung des Cholera bacillus mit Hilfe der Paralysine verwerten wir noch eine andere spezielle Eigenschaft dieser Parasiten, welche den Wert der Untersuchung noch mehr erhöht; nämlich: Der Cholera vibrio erfährt keine An-

passungen oder Vakzinationen gegen die eigenen agglutinierenden Antikörper, wie es manchmal bei dem Bacillus von Eberth-Gaffky und dem *Pyocyaneus* vorkommen kann und wie ich für den Brucseschen *Micrococcus* nachgewiesen habe.¹⁾

Diese Tatsache, die glänzend von Bandi bewiesen und neuerdings im Gegensatz zu den Behauptungen einiger von Haendel und Woithe bestätigt worden ist, macht die Reaktion immer glaubwürdig, auch wenn soeben aus dem infizierten Organismus isolierte Vibrionenstämme verwendet werden.

Der Irrtum sodann, den bei einer Cholera diagnose das Vorhandensein einer Pseudoagglutination hervorrufen kann, welche nach einigen Bakteriologen (Lehmann und Neumann) manchmal bei Verwendung der seit wenigen Stunden entwickelten Kommabazillen eintritt und die ich bei meinen zahlreichen Untersuchungen nie zu beklagen gehabt habe, kann leicht durch die Kontrollpräparate abgestellt werden.

Die Agglutinationsprobe mit Entwicklungsmaterial der ersten Kulturen kann lediglich in denjenigen Fällen scheitern, in denen ganz spärliche oder gar keine Entwicklung von Vibrionen während der ersten sechs Stunden eintritt. In diesen Fällen, welche äußerst selten in der Praxis vorkommen, braucht man nur eine üppigere Entwicklung abzuwarten, deren Auftreten nicht über 12—16 Stunden auf sich warten lassen wird, oder aber man macht Ueberimpfungen in Metschnikoffsche Peptongelatine, welche für das rasche und reichliche Wachstum der Vibrionen sehr geeignet ist.

Ueber die Nützlichkeit der neuen Kulturböden mit dem Blutalkaliagar von Dieudonné für die Diagnose der Cholera behalte ich mir die Veröffentlichung meiner Resultate vor, wenn einige im Gang befindliche Untersuchungen abgeschlossen sein werden. Das Argument ist durchaus umstritten, Tuschinsky, Stockvis, Esch, Pergola, Neufeld, Woithe, Bandi u. a. sind zu abweichenden Resultaten gelangt, und es ist deshalb notwendig, diese Studien wieder aufzunehmen und sie durch zahlreiche vergleichende Untersuchungen zu unterstützen.

Schluß. In der Technik der bakteriologischen Schnell-diagnose der Cholera asiatica hat Verfasser zunächst das Bandische und Dunbarsche Verfahren geprüft und empfiehlt dann die Vornahme der Agglutinationsprobe an den Bakterien der ersten Einsaat in Dunham-Kochsche Bouillon, ohne die weitere Anreicherung und Reinigung der Kulturen abzuwarten. Diese Technik hat ihm bei der Diagnose einiger in Palermo vorgekommener Cholerafälle glänzende Resultate gegeben.