[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin.]
(Direktor: Geh. Ober-Med.-Rat Prof. Dr. Gaffky.)
(Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lentz.)

Über die „Cholera-rotreaktion“.

Von

Regierungstierarzt Dr. Wölfel
(Deutsch-Ost-Afrika).

Während am Ende der achtziger und zu Anfang der neunziger Jahre die Nitrosoindolreaktion als Differentialdiagnosticum der Cholera-bazillen eine große Rolle spielte (9), trat sie nach der Einführung der serologischen Untersuchungsmethoden und durch die Feststellung, daß sie nicht für Cholera-vibrien spezifisch ist, sondern auch bei anderen Vibrien vorkommt, mehr in den Hintergrund. Dazu kam, daß die Reaktion bei Verwendung der Peptonlösung in der bisher üblichen Zusammensetzung mit einem Nitratzusatz von 1 Promille¹ in ihrer Intensität erheblich schwankte und häufig nur sehr undeutlich auftrat. Da die Ursache dieser Unregelmäßigkeiten unklar war, veranlaßte mich Hr. Prof. Dr. Lentz, die Bedingungen zu ermitteln, unter denen die Nitrosoindolreaktion am deutlichsten ist.

Die „Cholera-rotreaktion“ wurde zuerst von Poehl (11) im Jahre 1886 beobachtet. Bei der Prüfung von in Gelatinestichkulturen gezüchteten Cholera-vibrien auf ihr Reduktionsvermögen mittels Eisenchlorid und Blutlaugensalz sah er neben dem Berliner Blau einen roten Farbstoff auftreten. Kurze Zeit darauf fanden Bujwid (4) und Dunham (7) unabhängig voneinander die Reaktion bei Kulturen in flüssigen Nährböden und verwandten sie zu diagnostischen Zwecken. Später stellte sie Günther (8) auch an Strichkulturen an.

¹ Vgl. die Anweisung des Bundesrats zur Bekämpfung der Cholera. S. 54.

Brieger (3) und Salkowsky (12) wiesen nach, daß der auftretende Farbstoff ein Indolderivat ist, das durch die Verbindung von in den Kulturen sich bildendem Indol mit durch den Zusatz von Säuren aus Nitriten freiwerdender salpetriger Säure entsteht. Der letztgenannte Autor nahm an, daß die Nitrite durch Oxydation aus abgespaltenem Ammoniak entstehen. Petri (10) dagegen stellte fest, daß die Choleravibrionen die in den Nährböden vorhandenen Nitrate zu Nitriten reduzieren und diese nicht durch Oxydation anderer stickstoffhaltiger Bestandteile der Substrate gebildet werden.

Schon Bujwid (6) und Dunham (7) geben an, daß die Reaktion durch die Art der Zusammensetzung des Nährbodens beeinflusst wird. Ebenso Beyerink (1), nach ihm soll sie bei 2prozentiger Peptonlösung und bei zu großen Zusätzen von Kaliumnitrat verschwinden.

Bleisch (2) befaßte sich eingehend mit der Ermittlung der Ursachen, welche die Rotreaktion verhindern oder vortäuschen können. Zur Vermeidung aller Fehlerquellen empfiehlt er, den Nährboden nach folgendem Rezept herzustellen:

Pepton. sicc. (Witte)	2.0
Natr. chlorat. puriss.	0.5
Aqu. dest.	100.0
Sol. Kal. nitric. puriss. (0.08:100) 30 bis 50 Tropfen.	

Stutzer und Burri (13) prüften die Wirkung, welche verschiedene äußere Einflüsse auf die Nitrosoindolreaktion ausüben. Nach ihnen ist es gleichgültig, ob die Kulturen bei Tageslicht oder in der Dunkelheit gehalten werden. Dagegen gaben die Kulturen bessere Reaktionen, wenn sie bei 37° gezüchtet wurden, als wenn dies bei Zimmertemperatur geschah. Vor allem aber fanden die beiden Autoren, wie Dahmen (6) schon vor ihnen, daß die Choleravibrionen am besten auf alkalischen Nährböden gedeihen und eine bessere Rotreaktion geben, als in neutralen Lösungen. Sie empfehlen für Reaktionen nach 6 stündigem Bebrüten $\frac{1}{2}$ prozentige Peptonlösungen, 1 bis 2 prozentige dagegen für Reaktionen bei 24 Stunden alten Kulturen.

Da nach Bleisch (2) die Bouillon wegen ihres inkonstanten Gehalts an Nitraten und Nitriten für die Cholerarotreaktion ungeeignet ist, benutzte ich bei meinen Untersuchungen ausschließlich Peptonwasser. Bei der Herstellung desselben legte ich die vom preußischen Kultusministerium herausgegebene „Anleitung für die bakteriologische Feststellung der Cholera“ zugrunde und variierte den Nitrat- und Peptongehalt.

Die Lösungen wurden vor dem Zusatz der Nitrate stets auf das Vorhandensein von solchen und von Nitriten mittels Diphenylaminschwefel-

säure geprüft. Dieses empfindliche Reagens konnte jedoch minimalste Spuren von Nitraten bzw. Nitriten nicht nachweisen. Diese wurden mit Hilfe der Nitrosoindolreaktion in den bei jedem Versuch mit angesetzten Kontrollröhrchen ermittelt, waren aber stets so gering, daß sie auf den Ausfall der Reaktion in den übrigen Röhrchen keinen störenden Einfluß hatten.

Das Kaliumnitrat wurde in der Weise zugesetzt, daß von verschiedenen starken Stammlösungen entsprechende Mengen in je 100 ccm Peptonlösung gebracht wurden. Die Stammlösung wurde dabei stets so gewählt, daß die zugesetzte Menge 1 ccm nicht überschritt. War der Zusatz kleiner als 1 ccm, so wurde die an diesem Volumen fehlende Menge durch destilliertes Wasser ergänzt. Nach dem Zusatz des Nitrats wurden die Peptonlösungen in Reagensgläser so verteilt, daß jedes Röhrchen 5 ccm enthielt, und hierauf in der üblichen Weise sterilisiert.

Zwecks Beimpfung der Röhrchen wurde von einer 24stündigen Agarkultur eine Öse in $\frac{1}{2}$ ccm physiologischer Kochsalzlösung zu einer gleichmäßigen Emulsion aufgeschwemmt und jedes Röhrchen mit einer Öse der Aufschwemmung besät.

Die Nitrosoindolreaktion wurde in der Weise angestellt, daß zu jeder Kultur 2 bis 3 ccm 10prozentiger Schwefelsäure gegossen, und die Röhrchen dann 5' in ein Wasserbad von 80° C gestellt wurden.

Zunächst suchte ich den Einfluß zu ermitteln, den der Nitratgehalt des Peptonwassers auf die Nitrosoindolreaktion ausübt, und dabei das Optimum des Nitratgehalts der Nährflüssigkeit für die Reaktion bei Verwendung verschiedener Vibrien festzustellen. Zu diesem Zwecke wurden 4 echte Cholerastämme, 4 eingeißlige und 1 mehrgeißliger *Vibrio* geprüft.

Es wurden 1prozentige Peptonlösungen mit 0.5 Prozent Kochsalz, 0.2 Prozent Natriumkarbonat und abgestufte Mengen von Kaliumnitrat in der oben beschriebenen Weise beimpft und 24 Stunden bei 37 C gehalten. Die Resultate sind aus folgender Tabelle I ersichtlich.

Es gaben also die Kulturen von 2 Cholerastämmen und 3 eingeißligen Vibrien die beste Reaktion bei einem Nitratzusatz von $\frac{1}{200000}$, ein Cholerastamm bei einem solchen von $\frac{1}{100000}$, ein eingeißliger *Vibrio* gleicherweise bei $\frac{1}{100000}$ und $\frac{1}{200000}$ und ein Cholerastamm gleichmäßig bei $\frac{1}{33000}$, $\frac{1}{100000}$ und $\frac{1}{200000}$.

Der mehrgeißlige *Vibrio* zeigte überhaupt keine Nitrosoindolreaktion. In einigen Röhrchen trat eine schwache Rosafärbung auf. Da sich diese jedoch nicht mit Amylalkohol ausschütteln ließ, war sie anscheinend nicht durch Nitrosoindol hervorgerufen worden. Nach Brieger (3) kann eine schwache Rosafärbung auch durch die Einwirkung der Schwefelsäure auf das Pepton entstehen.

Tabelle I.
Bebrütungszeit: 24 Stunden.

Name des Stammes	Kontrolle ohne KNO ₃ - Zusatz	KNO ₃ 1/5000 000	KNO ₃ 1/1 000 000	KNO ₃ 1/500 000	KNO ₃ 1/200 000	KNO ₃ 1/100 000	KNO ₃ 1/53 300	KNO ₃ 1/50 000	KNO ₃ 1/53 300
Ruhleben I . .	Spur von Rosafärbg.	Spur von Rosafärbg.	ganz schwach rosaviolett	rosaviolett	rosaviolett ¹ (etwas stärker)	rosa, Stich ins Violette	nicht beimpft	rosa	blafrosa
H. Jungelaus . .	"	"	"	"	violettrosa	rosa, Stich ins Violette	rosa, Stich ins Violette	"	"
Gami 7. . . .	"	"	"	"	violettrosa	rosa, Stich ins Violette	rosa, Stich ins Violette	rosa, Stich ins Gelbe	"
Gami 8. . . .	"	ganz schwach rosaviolett	"	"	violettrosa	rosa, Stich ins Violette	"	rosa	rosa, etwas blasser
Vibrio 1595 . .	"	Spur von Rosafärbg.	Spur von Rosafärbg.	"	rosaviolett (etwas stärker)	rosa, Stich ins Violette	"	"	blafrosa
" 2243 . .	schwach rosa	"	schwach rosaviolett	"	violettrosa	rosa, Stich ins Violette	"	"	"
" 2234 . .	"	nicht beimpft	"	"	violettrosa	violettrosa (etwas blasser)	"	"	rosa
" Stade . .	Spur von Rosafärbg.	"	"	"	violettrosa	rosa, Stich ins Violette	"	"	rosa, Stich ins Hell- braune
" Z. II . .	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	ganz schwach blafrosa	schwach blafrosa ²

¹ Die fettgedruckten Reaktionen sind die kräftigsten jeder Reihe.

² Farbe war mit Amylalkohol nicht auszuschlütten.

Tabelle II. Bebrütungszeit: 24 Stunden.

Name des Stammes	Pepton	Kontrolle ohne KNO ₃ -Zusatz	KNO ₃ 1/1000000	KNO ₃ 1/500000	KNO ₃ 1/200000	KNO ₃ 1/100000
Ruhleben I.	1/2 Prozent	bläßrosa	rosaviolett	rosaviolett	violettrosa	rosa, Stich ins Gelbe
	1 "	"	bläßrosa, Stich ins Violette	rosaviolett	violettrosa	rosa, Stich ins Hell- braune
	2 "	Spur von Rosafärbung	rosa	"	violettrosa	violettrosa (kräftiger)
	3 "	"	Spur von Rosafärbg.	rosa	"	violettrosa (kräftiger)
	4 "	"	"	hellrot	rosa, Stich ins Violette	violettrot
H. Jungclaus.	1/2 Prozent	Spur von Rosafärbung	bläßrosa, Stich ins Violette	bläßrosa, Stich ins Violette	bläßrosa	bläßrosa, Stich ins Gelbe
	1 "	bläßrosa	rosaviolett	bläßrosa?	violettrosa	violettrosa
	2 "	"	"	rosaviolett (etwas stärker)	violettrot	violettrot
	3 "	"	"	desgl.	violettrot	violettrot
	4 "	"	"	"	violettrot	violettrot (stärker)
Vibrio 1595.	1/2 Prozent	bläßrosa	rosaviolett	rosaviolett	rosa	rosa, Stich ins Gelbe
	1 "	"	rosa, Stich ins Violette	rosaviolett	rosaviolett	rosa
	2 "	Spur von Rosafärbung	desgl.	rosa, Stich ins Violette	violettrosa	violettrosa
	3 "	"	bläßrosa	rosa	violettrot	violettrot
	4 "	"	"	"	violettrot	violettrot (stärker)
Vibrio 2234.	1/2 Prozent	bläßrosa	bläßrosa, Stich ins Violette	bläßrosa, Stich ins Violette	bläßrosa	bläßrosa, Stich ins Gelbe
	1 "	Spur von Rosafärbung	rosaviolett	violettrosa	violettrosa (Spur blässer)	rosa, Stich ins Hell- braune
	2 "	"	rosa	rosaviolett	violettrosa	violettrosa (etwas schwächer)
	3 "	"	"	"	violettrosa	violettrosa (etwas stärker)
	4 "	"	"	"	rosaviolett	violettrosa

Nach 5tägiger Bebrütung zeigten bei allen 8 Stämmen diejenigen die beste Reaktion, welche Kaliumnitrat im Verhältnis von $\frac{1}{200000}$ enthielten.

Es bestand sonach bei den verschiedenen Stämmen eine ziemlich ausgesprochene Übereinstimmung, was auch durch weitere gleichartige Versuche bestätigt wurde. Ich konnte mich daher darauf beschränken, die Versuche mit 2 Cholerastämmen und 2 eingeißligen Vibrionen fortzusetzen.

Durch diese sollte zunächst der Einfluß des Peptongehaltes auf die Reaktion geprüft werden. Zu dem Zwecke wurden $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 und 4prozentige Peptonlösungen hergestellt, welche 0.5 Prozent Kochsalz, 0.2 Prozent Natriumkarbonat und abgestufte Mengen von Kaliumnitrat enthielten. Sie wurden in der oben beschriebenen Weise in Reagenzgläser verteilt und beimpft. Die Resultate sind aus Tabelle II ersichtlich.

Die Reaktionen der Kulturen waren in den 2, 3 und 4prozentigen Peptonlösungen erheblich kräftiger als in den $\frac{1}{2}$ und 1 prozentigen. Sie wurden jedoch bei den 3 und 4prozentigen Lösungen durch die von Haus aus dunkelgelbe Farbe der Nährflüssigkeit beeinträchtigt, was bei dem 2prozentigen Peptonwasser nicht der Fall war. Das letztere scheint daher für die Anstellung der Nitrosoindolreaktion am geeignetsten zu sein. Ferner ergibt sich aus der Tabelle, daß für den guten Ausfall der Reaktion nach 24stündigem Bebrüten mit steigendem Peptongehalt auch der Zusatz von größeren Mengen Kaliumnitrat nötig ist.

Schon die ersten Versuche hatten gezeigt, daß das Optimum der Reaktion bei verschieden langer Bebrütung mit der Länge der Zeit von den Röhrchen mit schwächerem Nitratzusatz zu denen mit stärkerem hinübereückt und an Intensität zunimmt. Diese Beobachtung wurde durch den in Tabelle III wiedergegebenen Versuch bestätigt. Bei diesem wurde eine 2prozentige Peptonlösung mit 0.5 Prozent Kochsalz, 0.2 Prozent Natriumkarbonat und abgestuften Mengen Kaliumnitrat verwandt.

Das Hinübereücken des Optimums der Nitrosoindolreaktion nach den Röhrchen mit höherem Nitratzusatz dürfte auf die Vermehrung der Vibrionen und die dadurch bedingte stärkere Umsetzung des Peptons in Indol zurückzuführen sein. Aus dem gleichen Grunde liegen die besten Reaktionen bei den 2 bis 4prozentigen Peptonlösungen, in denen ein kräftigeres Wachstum erfolgt als in den $\frac{1}{2}$ und 1 prozentigen, bei den Röhrchen mit höherem Nitratgehalt. (Tabelle II.)

Wie die Versuche ergeben, muß für das Zustandekommen der kräftigsten Reaktion ein bestimmtes Verhältnis zwischen den gebildeten Nitriten und dem entstandenen Indol bestehen. Mit zunehmender Indolbildung wächst also der Bedarf an Nitriten. Es muß daher, damit die Vibrionen die Nitrite in genügender Menge bilden können, sowohl dem Pepton-

Tabelle III.

Name des Stammes	Be- brütungs- zeit	Kontrolle	KNO ₃ 1/ 200 000	KNO ₃ 1/ 400 000	KNO ₃ 1/ 32 000	KNO ₃ 1/ 20 000	KNO ₃ 1/ 12 500	KNO ₃ 1/ 10 000	KNO ₃ 1/ 6000	KNO ₃ 1/ 3300
Ruh- leben I.	24 Stdn.	Spur von Rosafärbung	rosaviolett	violettrot	rosa, Stieh ins Violette	rosa	rosa, Stieh ins Gelbe	rosa, kräfti- gerer Stieh ins Gelbe	rosa, kräfti- gerer Stieh ins Gelbe	rosa, Stieh ins Gelbe
	3 Tage	"	rosa	rosaviolett	violett	weinrot	dunkelrot	rot	orange (etw. heller)	orange (etw. heller)
	5 "	"	"	rosa, Stieh ins Violette	violett	violett	violett (etw. dunkler)	weinrot	rot	rot
	7 "	"	Spur von Rosafärbg.	rosa	"	violettrot	dunkel- weinrot	dunkel- weinrot	"	rot (etw. orange)
Jung- claus	24 Stdn.	Spur von Rosafärbg.	rosaviolett	rosaviolett	rosa	rosa	rosa	rosa, Stieh ins Gelbe	rosa, Stieh ins Gelbe	rosa, Stieh ins Gelbe
	3 Tage	"	rosaviolett	violettrosa	violettrot	nicht an- gegangen	rot, Stieh ins Gelbe	rot, Stieh ins Gelbe	orange	orange
	5 "	"	Spur von Rosafärbg.	rosaviolett	violett	violettrot	weinrot	weinrot	"	"
	7 "	"	"	rosa	"	violettrot	dunkel- weinrot	dunkel- weinrot	rot-orange	"
Vibrio 1595.	24 Stdn.	Spur von Rosafärbg.	violettrosa	violettrosa (etw. stärker)	rosa	rosa, Stieh ins Gelbe	rosa, Stieh ins Gelbe	rosa, Stieh ins Gelbe	hellbraun	hellbraun
	3 Tage	"	rosa, Stieh ins Violette	rosaviolett	violettrot	weinrot, Stieh ins Violette	rot, Stieh ins Gelbe	orange	orange	orange
	5 "	"	rosa	rosa, Stieh ins Violette	violett	violettrot	weinrot	hellrot	weinrot (etw. heller)	"
	7 "	"	"	desgl.	"	violettrot	weinrot	weinrot (etw. dunkler)	rot-orange	"
Vibrio 2243.	24 Stdn.	Spur von Rosafärbg.	violettrosa	violettrosa	rosa	rosa, Stieh ins Hellbraune	rosa, Stieh ins Hellbraune	nicht beimpft	blaß, hell- braun	nicht beimpft
	3 Tage	"	blaßrosa	violettrosa	violett	violettrot	hellrot	orange	orange	orange
	5 "	"	blaß rosa- violett	rosaviolett	violett	violettrot	weinrot	rot-orange	"	"
	7 "	"	Spur von Rosafärbg.	rosa	violett	violettrot	weinrot	weinrot (etw. heller)	rot-orange	"

gehalt der Kulturflüssigkeit als auch der Länge der Bebrütungszeit entsprechend der Nitratzusatz zum Nährboden gesteigert werden. Für die Prüfung der Reaktion nach 24 Stunden, welche Bebrütungszeit wohl dem praktischen Bedürfnis am meisten entsprechen dürfte, hat sich mir eine 2prozentige Peptonlösung mit 0.0075 Nitratzusatz am besten bewährt.

Kurz erwähnen möchte ich noch, daß die Indolreaktion bei zu hohem Nitrat- bzw. Nitritgehalt der Kulturflüssigkeit negativ ausfällt, weil dann durch den Zusatz von Schwefelsäure ein so starker Überschuß von salpetriger Säure aus den Nitriten freigemacht wird, daß dadurch in der Kulturflüssigkeit die Xanthinreaktion ausgelöst wird.

Zusammenfassung.

1. Die von mir untersuchten Vibrionen gaben unter gleichen Bedingungen bei etwa dem gleichen Nitratgehalt des Peptonwassers die beste Nitrosoindolreaktion.

2. Der Nitratgehalt muß in älteren Kulturen höher sein, als in nach kürzerer Bebrütung zur Reaktion verwandten.

3. Zu starke Nitratzusätze stören die Reaktion.

4. 2prozentige Peptonlösungen sind für die Reaktion am geeignetsten.

Für die Vornahme der Reaktion nach 24stündiger Bebrütung empfiehlt sich eine Peptonlösung von folgender Zusammensetzung:

Pepton. sicc.	2.0
Natr. chlorat.	0.5
Kal. nitr.	0.0075
Natr. carbonat	0.2
Aq. dest.	ad 100.0.

Literatur.

1. Beyerink, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1. Abt. Bd. XII.
2. Bleisch, *Diese Zeitschrift*. Bd. XIII u. XIV.
3. Brieger, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1887. Nr. 15 u. 22.
4. Bujwid, *Diese Zeitschrift*. Bd. II.
5. Derselbe, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1. Abt. Bd. IV.
6. Dahmen, *Ebenda*. Bd. XII.
7. Dunham, *Diese Zeitschrift*. Bd. II.
8. Günther, *Einführung in das Studium der Bakteriologie*. 1902.
9. Kolle, Kolle-Wassermann, *Handb. d. pathog. Mikroorganismen*. 1903.
10. Petri, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1. Abt. Bd. V.
11. Poehl, *Berichte der deutschen chem. Gesellschaft*. 1886.
12. Salkowski, *Virchows Archiv*. Bd. CX.
13. Stutzer u. Burri, *Diese Zeitschrift*. Bd. XIV.