

II. Aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.
(Direktor: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. Koch.)

**Ueber lösliche, durch aseptische Autolyse
erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Typhus-
bazillen.**

Von Dr. **H. Conradi** in Metz,

Leiter der bakteriologischen Anstalt für Lothringen.

Die Veröffentlichung von Levy und Pfersdorff in No. 49 (1902) dieser Wochenschrift veranlasst mich zur Mittheilung von Versuchen, die vor 1½ Jahren im Institut von mir angestellt und vor der Zeit abgebrochen wurden, da meine Thätigkeit innerhalb der staatlichen Commission zur Bekämpfung des Typhus im Regierungsbezirk Trier mich vor andere Aufgaben stellte.

In einer früheren Arbeit³⁾ wies ich nach, dass bei Autolyse thierischer Organe durch Einwirkung eines oder mehrerer in den Körperzellen enthaltener Fermente Stoffe entstehen, die in vitro die Blutgerinnung verzögern oder aufheben. Wie weiter dargethan werden konnte, spielen sich auch in der Pflanzenzelle dieselben, durch autolytische Fermente ausgelösten Vorgänge ab, indem z. B. die Hefezelle bei der Selbstverdauung die Blutgerinnung hemmende Abbauprodukte entstehen lässt. Ich konnte ferner zeigen,⁴⁾ dass aus der Autolyse thierischer Organe Substanzen hervorgehen, welche ansehnliche bakterientödtende Eigenschaften besitzen. Und wieder konnte der Nachweis geführt werden, dass auch die pflanzliche Zelle, die Hefezelle, bei der autolytischen Zersetzung baktericide Stoffe produziert. Sonach bestand hier wie dort eine weitgehende Uebereinstimmung im Chemismus von Thier- und Pflanzenzelle. Da nun die Bakterienzelle auf Grund

¹⁾ Dieselben zeigen einen hohen Grad von Säurefestigkeit und behalten bei der Behandlung mit Anilinwasserfuchsin, salzsaurem Alkohol und Methylenblau eine rosa bis leuchtend rothe Farbe, sodass man sie für basophil halten müsste. In dem neutralen Farbgemisch von May & Grünwald (Methylenblau-Eosin) tingiren sie sich jedoch in der violetten Mischfarbe, verhalten sich also wie neutrophile Granulationen.

²⁾ Näheres siehe in der ausführlichen Publikation.

³⁾ Hofmeister's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1901, Heft 3 u. 4, S. 135—182.

⁴⁾ Hofmeister's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1901, Heft 5 u. 6, S. 193—228.

ihres morphologischen und biologischen Verhaltens den pflanzlichen Zellen nahe steht, so war man versucht, auch jene Zersetzungen, die in den Bakterienkulturen Platz greifen, der Wirkung autolytischer Bakterienfermente zuzuschreiben. Die schönen Versuche von Emmerich und Löw hatten ja bereits gezeigt, dass der *Bacillus pyocyaneus* in alten Kulturen Stoffwechselprodukte bildet, die baktericide Eigenschaften entfalten. Man konnte daher bereits eine ähnliche Entstehung dieser baktericiden Substanzen und der von mir aufgefundenen bakterientödtenden Stoffe der Tier- und Pflanzenzelle vermuthen. Und in der That verschafften mir im Hofmeister'schen und Forster'schen Institut in Strassburg bereits vor zwei Jahren angestellte Versuche die Gewissheit, dass in jeder Bakterienzelle autolytische Fermente präformirt sind und demnach in jeder üppig wachsenden Bakterienkultur aus den durch Autolyse zerfallenden Bakterienleibern baktericide, autolytische Zersetzungsprodukte entstehen, welche die schwächlichen Individuen der Bakterienzucht abtöden. Diese Thatsache bringt auch für die bisher unerklärten interessanten Versuche von Gotschlich und Weigang eine zureichende Erklärung. Die Autoren fanden nämlich, dass die Kultur von Choleraabazillen das Maximum der Entwicklung bei 37° zwischen 12 und 20 Stunden erreicht „und dann das Wachstum nicht etwa bloss sistirt wird, sondern ein rapides Absterben erfolgt, sodass im Mittel nach zwei Tagen nur noch 7,43%, nach drei Tagen gar nur 0,8% der in der 20stündigen Kultur vorhandenen lebenden Individuen übrig geblieben sind; in einem Falle starben in einer Kultur bei 37° zwischen der 16. und 20. Stunde 10 000 Millionen Individuen ab. Wurde dagegen die auf dem Höhepunkt der Entwicklung stehende Kultur fernerhin bei Eisschranktemperatur¹⁾ verwahrt, so blieb die gesammte Individuenzahl erhalten.“²⁾

Die Deutung, welche diese Autoren und alle späteren jener merkwürdigen Erscheinung gaben, vermag ich nicht anzuerkennen. Die Ursache dieses Absterbens massenhafter Individuen bei Brutwärme liegt nicht etwa in der Erschöpfung des Nährbodens, wie man annahm, sondern in der Entstehung baktericider, wasserlöslicher, autolytischer Zerfallsprodukte innerhalb jeder Bakterienkultur. Wenn ich nämlich bereits „erschöpfte“ ältere Choleraabazillenkulturen in sterile bakteriendichte Schilfsäckchen einfüllte und durch Dialyse die autolytischen, baktericiden Substanzen entfernte, so konnte ohne Zusatz von frischem Nährmaterial erneutes Wachstum in bereits „erschöpften“ Schilfsack-Bouillonkulturen beobachtet werden.

Diese Wasserlöslichkeit der autolytischen Stoffwechselprodukte brachte mich nun auf den Gedanken, auch diejenigen giftigen Zellsubstanzen der Bakterien in Lösung überzuführen, die bisher auf keine Weise ohne erhebliche Herabsetzung ihrer Giftigkeit vom Bakterienleib losgetrennt werden konnten. Bei der Labilität der bakteriellen Giftstoffe kam es vor allem darauf an, ihre Extraktion in möglichst schonender Weise vorzunehmen. Nun hatten mich frühere systematische Untersuchungen³⁾ dahin geführt, die Nachteile der antiseptischen und die Vortheile der aseptischen Autolyse von Tier- und Pflanzenzellen kennen zu lernen. Ein Vergleich lehrte nämlich, dass die von mir zuerst angewandte aseptische Autolyse, die also auf Zusätze von Chloroform, Toluol, Eucalyptusöl, Senföl u. s. w. Verzicht leistet, ungleich stärkere fermentative Wirkungen innerhalb der kürzesten Zeit erzielt. Alle antiseptischen Zusätze hemmen den enzymatischen Vorgang der Autolyse, indem sie ihn abschwächen oder hinausschieben. Fassen wir nun die Bakteriengifte als intermediäre bakterielle Stoffwechselprodukte auf und führen wir ferner die Entstehung der wasserlöslichen Bakteriengifte auf fermentative, autolytische Prozesse des Bakterienlebens zurück, so kommen wir zu der Vorstellung, dass die Darstellung der gelösten giftigen Bakterienprodukte am besten gelingen wird, wenn wir die autolytischen Vorgänge innerhalb der Bakterienzelle am wenigsten beeinflussen. Auf Grund dieser Erwägungen verzichtete ich prinzipiell auf die antiseptische Toluol-Autolyse, wie sie nach dem Vorgange von Ehrlich und Wassermann zur Darstellung des Diphtheriegiftes und der übrigen bislang gewonnenen Bakteriengifte angewandt wurde. Meine Methode der Darstellung wasserlöslicher

Toxine beruht auf kurzdauernder aseptischer Autolyse der Bakterien. Dieses Prinzip gewährt die Aussicht, die Darstellung der Bakteriengifte zu vereinfachen und die rationelle Gewinnung antitoxischer Sera anzubahnen. Im folgenden gebe ich eine kurze Beschreibung des in Rede stehenden Verfahrens.

Der Nährboden besteht aus schwach alkalischem, 3% Fleischwasseragar mit einem Zusatz von 1% Tropon. Man giesst den Agar in grosse, ca. 20 cm Durchmesser fassende Doppelschalen aus, wie sie von v. Drigalski und vom Verfasser zum Zwecke der Typhusuntersuchung angegeben wurden. Die betreffende Bakterienart wird nun auf der Oberfläche des feuchten Nähragars mit dem v. Drigalski'schen Glasspatel gleichmässig ausgestrichen. Dann wird eine schmale periphere Zone längs der Innenseite des Deckels mit sterilem Paraffin rings ausgegossen und so die untere Schale luftdicht abgeschlossen. Etwa zehn beschickte Doppelschalen stellt man für 20 Stunden in den Brutschrank bei 37° und öffnet sie nach dieser Zeit durch behutsames Erwärmen des Paraffins. Mit Hülfe eines sterilen Nickelspatels wird nun der Bakterienrasen sämtlicher Schalen vorsichtig abgekratzt und mittels steriler Pravaz'scher Spritze mit weiter Oeffnung aufgesogen. Danach wird das ganze zähflüssige Bakterienmaterial auf mehrere enge, sterile Centrifugirröhrchen vertheilt. Man fügt jetzt jedem Röhrchen soviel 0,85% sterile Kochsalzlösung hinzu, dass diese $\frac{2}{3}$ der Gesammtmenge des Bakterienmaterials ausmacht. Dann werden die Centrifugirröhrchen für 24, höchstens 48 Stunden in den auf 37,5° eingestellten Brutschrank verbracht. Nach dieser Zeit wird die überstehende, gelblich gefärbte, meist klare Flüssigkeit sorgfältig abpipettirt. Die vereinigten Flüssigkeitsmengen versetzt man nun mit der fünffachen Menge 0,85% Kochsalzlösung und filtrirt sie durch Berkefeld'sche Thonkerzen.¹⁾ Das Filtrat verbleibt solange im Eisschrank, bis seine Keimfreiheit durch Uebertragung kleiner Mengen in Bouillonkölbchen festgestellt worden ist. Dann erst wird das Filtrat im Vacuumapparat je nach Ausbeute auf $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{50}$ seines Volumens bei 35° eingedampft. Dieses eingedampfte Filtrat stellt das wasserlösliche Bakteriengift dar.

Ich möchte noch hervorheben, dass eine länger als 48 Stunden fortgesetzte aseptische Autolyse mir stets schlechte Resultate geliefert hat, und zwar werden die Giftlösungen um so schwächer, je länger die Einwirkung der Brutwärme währt. Diese Thatsache lässt nur den Schluss zu, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen der Abbau der eben erst gebildeten Bakteriengifte sich in kürzester Zeit vollzieht. Eine deutliche Abnahme der Toxizität stellte sich auch ein, wenn das Bakterienmaterial vor der Autolyse durch vorsichtige Einwirkung von Chloroformdämpfen abgetödtet worden war, und nicht minder dann, wenn innerhalb der verschiedensten Zeiträume eine antiseptische Autolyse durch Zusatz von Chloroform, Toluol, Eucalyptusöl, Senföl u. s. w. herbeigeführt wurde. Daraus folgt, dass die antiseptischen Zusätze diejenigen Stoffwechselvorgänge hemmen, die zur Bildung der Bakteriengifte führen.

Das Verfahren der kurzdauernden aseptischen Autolyse hat bisher die Darstellung von wasserlöslichen Ruhr- und Typhusbazillengiften ermöglicht. Zuerst fand sich Gelegenheit, die Brauchbarkeit dieser neuen Methode bei Untersuchung der Ruhrgifte zu erproben. Gelegentlich der Ruhr-epidemie auf dem Truppenübungsplatz Döberitz im Jahre 1901 konnten v. Drigalski²⁾ und Verfasser in 34 verschiedenen Fällen Ruhrbazillen züchten. Auf Veranlassung von Herrn Geh. Rath Koch habe ich 24 verschiedene Stämme einer vergleichenden Betrachtung ihrer Toxizität unterworfen. Zunächst tödtete ich nach dem Vorgange von Pfeiffer die Ruhrbazillen durch behutsame Einwirkung von Chloroformdämpfen ab. Im Durchschnitt bewirkte dann $\frac{1}{2}$ —1 Oese (1 Oese = 2 mg) einer 24 stündigen, abgetödteten Agarkultur bei intravenöser Injektion die tödtliche Vergiftung eines Kaninchens von 2—3 Kilo innerhalb drei Tagen. Bei Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht

¹⁾ Abgesehen von der Filtration durch Thonkerzen kann man auch eine — allerdings nicht unbedingt sichere — Keimfreiheit der Giftlösung durch lange fortgesetztes Centrifugiren erzielen. Es ist jedoch erforderlich, die centrifugirte Flüssigkeit stets der Einwirkung von Chloroformdämpfen auszusetzen, um etwa vorhandene Keime abzutöden.

²⁾ Veröffentlichungen der Medizinalabtheilung des Königlich-Preussischen Kriegsministeriums. Berlin 1902, Heft 2.

¹⁾ Citirt nach Gotschlich in Flüggé's Mikroorganismen 1896, S. 123.

²⁾ Bei dieser Temperatur hört nämlich die schädigende Wirkung der autolytischen Fermente auf.

³⁾ a. a. O.

war meist 1 Oese abgetödteter Kultur erforderlich, um bei intraperitonealer Einspritzung den Tod des Versuchsthiers herbeizuführen. Die mit den gebräuchlichen Verfahren (Chamberlandkerze, Kitasato-, Berkefeld-Filter) hergestellten bakterienfreien Kulturflüssigkeiten dagegen erwiesen sich völlig unwirksam. Selbst grössere Filtratmengen (bis zu 15 ccm) von 8, 14 Tagen oder vier Wochen alten Bouillonkulturen zogen weder bei intravenöser, intraperitonealer noch subkutaner Einspritzung den Tod von Kaninchen oder Meerschweinchen nach sich. Hingegen gelang es mir, durch 18stündige aseptische Autolyse von Ruhrkulturen (Stämme Stratmann, Schwester und Borgmann) wasserlösliche, bakterienfreie Giftlösungen herzustellen, welche bei intravenöser Injektion von $\frac{1}{10}$ ccm steriler Giftlösung stets Kaninchen von $2\frac{1}{2}$ —3 Kilo innerhalb 48 Stunden tödteten. Die gleiche Giftdosis bewirkte immer bei intraperitonealer Einverleibung den Tod eines Meerschweinchens von 200 g. Die Flüssigkeitsmenge wurde vor jeder Einspritzung durch entsprechenden Zusatz von steriler, 0,85 % iger Kochsalzlösung auf 1 ccm gebracht. Bei den mit bakterienfreier Giftlösung behandelten Versuchsthiern kam häufig unmittelbar nach der Injektion eine stürmische Darmperistaltik zur Beobachtung, die anhaltenden Durchfall hervorrief. Nach mehreren Stunden stellte sich bereits Collaps ein, und es traten Lähmungen der hinteren Extremitäten hinzu, die allmählich auch die vorderen Extremitäten ergriffen. Bei Meerschweinchen rief die Einspritzung rapiden Temperaturfall und Collaps hervor, oft beobachteten wir einen Temperaturabsturz um 10° und gleichfalls anhaltenden Durchfall. Das Sektionsbild bot bei Kaninchen und Meerschweinchen ungefähr die gleichen Züge: Stets bestand eine sehr lebhaft injizierte Darmgefäße, insbesondere des schwappend gefüllten Dünndarms. Sehr häufig waren Darmschleimhaut und seröse Häute allenthalben mit linsgrossen und noch umfangreicheren Hämorrhagieen durchsetzt, und der Schleimhaut haftete glasiger, mit Blut untermischter Schleim an. Aber zur Vervollständigung des pathologisch-anatomischen Bildes der Ruhr musste man noch womöglich Geschwürsbildung im Darmtraktus der Versuchsthiere hervorrufen. Auch dieser Forderung konnte ich einwandfrei genügen durch Herstellung folgender Versuchsbedingungen. Ich ging von der Vorstellung aus, dass es zum Zustandekommen von Nekrose und geschwürigem Zerfall der Darmschleimhaut einer mehr chronischen Gifteinwirkung bedurfte. Es musste deshalb von vornherein die Anwendung solcher Gift Dosen unterbleiben, die innerhalb kürzerer Frist den Tod des Versuchsthiere herbeiführen. Deshalb spritzte ich nicht $\frac{1}{10}$ ccm, sondern $\frac{1}{15}$ ccm der wirksamsten Giftlösung Kaninchen von zwei Kilo intravenös ein. (Die Dosis certe letalis betrug $\frac{1}{10}$ ccm.) Ein Theil dieser Thiere überstand die Einspritzung, und bei der nach Tödtung innerhalb verschiedener Zeiträume vorgenommenen Obduktion war keine Geschwürsbildung nachweisbar. Der kleinere Theil, im ganzen vier Kaninchen, gingen jedoch 4—6 Tage nach erfolgter Injektion zu Grunde. Bei diesen vier Kaninchen wies der Darm und insbesondere der Dickdarm hochgradige anatomische Läsionen auf. Erstens zeigte sich eine sehr starke Gefässinjektion. Zweitens waren zahlreiche Hämorrhagieen im Dick- und Dünndarm vorhanden, und die Schleimhaut war fast durchgehends mit blutigem Schleim bedeckt. Und drittens war die Dickdarmschleimhaut, besonders im letzten Drittel geschwollen, in toto schwärzlich gefärbt und an mehreren Stellen durch Geschwüre zerstört. Diese Ulzerationen waren meist rundlich, von regelmässiger Gestalt, und ihre Ränder waren scharf gegen den Geschwürsgrund abgegrenzt. Die Ausdehnung der Geschwüre erreichte Bohnengrösse.

Somit war es gelungen, durch Einspritzung ganz geringer Mengen bakterienfreier Giftlösung Geschwürsbildung im Darmtraktus der Versuchsthiere zu erzeugen und damit eine charakteristische Giftwirkung der Ruhrbazillen überzeugend darzuthun. Eine vorläufige Mittheilung dieser Ergebnisse hat bereits v. Drigalski¹⁾ vor einem halben Jahre veröffentlicht.

Ueber die durch aseptische Autolyse gewonnenen löslichen Giftstoffe der Typhusbazillen sind meine Untersuchungen noch keineswegs abgeschlossen. Dennoch dürften die bisherigen Resultate einer kurzen Mittheilung werth sein. Nach den

Untersuchungen von Pfeiffer und Kolle sind selbst 5—6 ccm keimfreien Filtrats mehrtägiger Typhusbouillonkulturen ausser Stande, Meerschweinchen von 300 g zu tödten. Mittels 24 stündiger aseptischer Autolyse von Typhusbazillen gelang es mir jedoch, bakterienfreie, wasserlösliche Typhusgiftlösungen herzustellen, von denen 0,2 ccm ausreichten, um bei intraperitonealer Einspritzung jedesmal Meerschweinchen von 300 g binnen 24 Stunden zu tödten. Der Typhusstamm, mit dem seiner Zeit die Versuche angestellt wurden, besass nur eine Virulenz von $\frac{1}{10}$ Oese. Ich hoffe daher, mit virulenteren Stämmen demnächst noch stärkere Lösungen von Typhusgift herstellen zu können.

Vergleichen wir mit diesen Befunden die „Gift“-werthe, welche neuerdings Levy und Pfersdorff¹⁾ durch Einspritzung von einem Monat lang autolysirten Bakterienleibern des Milzbrandbacillus erhalten haben. Die Autoren benöthigen für die sicher tödtliche Wirkung des vorbehandelten Bakterienmaterials eine Dosis, welche $\frac{1}{13}$ des Körpergewichts ihrer Versuchsthiere ausmacht. Bei einer Maus von 26 g würden also 2 g „Gift“ erforderlich sein, bei einem erwachsenen Menschen, der an Milzbrand zu Grunde geht, nahezu zehn Pfund Milzbrandbazillenleiber! Angesichts dieser Ergebnisse muss ich die Schlussfolgerung meiner früheren Arbeit²⁾ aufrecht halten, dass nämlich bis jetzt mit Hilfe der gegenwärtigen Methoden keine Toxinbildung des Milzbrandbacillus nachgewiesen wurde. Vielleicht werden die Autoren bei anderen Bakterienarten zu günstigeren Resultaten gelangen, wenn sie sich entschliessen werden (nicht mehr abgetödtete Bakterienleiber zu verarbeiten, sondern wasserlösliche Bakteriengifte darzustellen), an Stelle ihrer langwierigen, antiseptischen Autolyse meine kurzdauernde aseptische Autolyse bei Gewinnung der Bakteriengifte anzuwenden. Auf Grund des bereits vorliegenden Thatsachenmaterials, zu dessen frühzeitiger Veröffentlichung ich mich veranlasst sah, glaube ich bereits aussprechen zu dürfen, dass die hier beschriebene aseptische Autolyse der Bakterien zur Erschliessung der Bakteriengifte beitragen wird.

¹⁾ a. a. O. S. 107.