[Aus dem königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.]

(Direktor: Geh. Med.-Rat Dr. Gaffky.)

(Abteilungs-Vorsteher: Prof. Dr. Frosch.)

Zur Frage der Hämolysin- und Toxinbildung des Cholera-vibrio.

Von

Marinestabsarzt Dr. **P. Mühlens** und Dr. **W. von Raven**.

(Hierzu Taf. IV, Fig. 3 u. 4.)

Die Untersuchungen der 6 sog. El Tor-Stämme haben in letzter Zeit die Frage der Hämolysin- und Toxinbildung bei echten Cholera-vibrionen aufgerollt. Dabei ist es zu lebhaften Meinungsverschiedenheiten gekommen.

Kraus und Pribram (6) berichteten im Jahre 1905, daß es ihnen gelungen sei, in 2- und 5-tägigen Bouillonkulturen der El Tor-Stämme filtrierbare Hämolysine und akut wirkende Toxine nachzuweisen. Diese Stämme waren bekanntlich aus Leichen von Mekkapilgern, die auf der Rückfahrt vom Wallfahrtsorte an Darmkrankheiten (aber ohne Cholera-erscheinungen) gestorben waren, von F. Gottschlich (2) isoliert worden. Sie erwiesen, wie außer Gottschlich u. a. auch Kolle und Meinicke (4) gezeigt haben, sich bei eingehender Prüfung in allen Eigenschaften als identisch mit dem Kochschen Cholera-vibrio.

In einer früheren Publikation (1903) hatte Kraus (5) die Ansicht ausgesprochen, daß echte Cholera-vibrionen im Gegensatz zu cholera-ähnlichen Vibrionen kein lösliches Hämotoxin bilden. Auch in seinen späteren Veröffentlichungen, so noch jüngst in seinem Vortrag gelegentlich der 1. Tagung der Freien Vereinigung für Mikro-

biologie in Berlin anfangs Juni 1906 hielt er im Prinzip an dieser Anschauung fest und glaubte, den El Tor-Stämmen auf Grund der von ihm gefundenen neuen Eigenschaften — trotz ihrer sonstigen Übereinstimmung mit dem *Cholera vibrio* — eine besondere Stellung zuweisen zu müssen. Er teilte aber gleichzeitig mit, daß er auch noch bei einem anderen als echte Cholera angesprochenen Stamm „Berlin“ Hämolysebildung habe feststellen können.

Schon im Jahre 1903 hatte Kraus (5) neben dem biologischen Verfahren die Anwendung der Kaninchenblutagarplatte empfohlen, durch welche „Cholera vibrien in sicherer Weise von artverwandten Vibrionen zu unterscheiden“ seien. — Meinicke (12 u. 13) zeigte demgegenüber durch eingehende Untersuchungen an 65 echten Cholera- und 23 choleraähnlichen Vibrionen-Stämmen, daß dem Kaninchen- und auch Menschenblutagar keine differentialdiagnostische Bedeutung für die Cholera Diagnose zukomme, da auf demselben Cholera vibrien häufig deutliche Aufhellungszonen bildeten, während umgekehrt choleraähnliche Vibrionen denselben oft unverändert ließen. Er war ferner der Ansicht, daß aus der Bildung von Aufhellungszonen auf der Blutplatte noch nicht ohne weiteres auf Hämolysebildung geschlossen werden könne. Ferner sagte auch er: „Echte Cholera kulturen bilden kein Hämolyse, einzelne choleraähnliche Vibrionen bilden Hämolyse, die untereinander nicht identisch sind“.

Prausnitz (14) kam bei seinen Untersuchungen, insbesondere bezüglich der Kalbsblutplatte zu folgender Anschauung: „Es scheint uns hervorzugehen, daß, wenn auch in der blutlösenden Wirkung zwischen Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen vielleicht keine prinzipiellen Unterschiede bestehen, so doch die quantitativen Differenzen in vielen Fällen groß genug sind, um praktisch verwertet zu werden.“

Pribram (15) hielt auch die Kaninchenblutplatte für unzulässig, für besser nach dem Vorschlage von Berestnjew die Pferdeblutplatte.

Kraus und Prantschoff (7) empfahlen später (1906) auch statt Kaninchenblut andere Blutarten: Hammel- und Ziegenblutplatten.

Auch Schumacher (18) hält in einer kürzlich erschienenen Arbeit Kaninchenblutagar zu differentialdiagnostischen Zwecken für ungeeignet, da die meisten der von ihm untersuchten 10 frischen Cholera stämme mehr weniger starke Aufhellungshöfe bildeten. Dagegen empfiehlt er die Kalbsblutagarplatte: „Die Unterschiede zwischen Cholera- und gewöhnlichen Vibrionen auf Kalbsblutagar sind durchaus scharf und so ausgeprägt, daß eine Unterscheidung der beiden Arten eine beinahe absolut sichere ist,“ und weiter: „Im allgemeinen gilt der Satz, daß frische Cholera-

stämme, wie sie in flüssigen Blutlösungen (verschiedenster Blutarten) kein Hämolysin, so auch in festen Blutnährböden von Kalbsblut keine Aufhellung bilden.“ Schumacher hatte allerdings nur 6tägige Bouillon- und Peptonwasserkulturen seiner 10 frischen Stämme auf gelöste Hämolysine untersucht. — Auf der Blutplatte fand er nur bei 3 von 156 untersuchten choleraähnlichen Vibrionenstämmen keine Aufhellung. — In einem Nachtrag sieht sich Schumacher infolge einer Untersuchung an den 6 El Tor- und 2 ihm von unserem Institut übersandten Hämolysin bildenden Cholerastämmen (302 und 322, die von Angenete als solche ermittelt waren) genötigt, seine Ansicht über die sichere Brauchbarkeit der Kalbsblutagarplatte einzuschränken.

Auch Kolle und Meinicke hatten schon vorher die Angaben von Kraus über die Hämolysinbildung der El Tor-Stämme nachgeprüft. Sie kamen zu dem Resultat: die hämolysierende Wirkung der El Tor-Stämme auf der Blutplatte schwankt in ziemlich weiten Grenzen.

Erwähnt sei noch, daß Schottmüller (17) seinerzeit bei Verwendung von Menschenblutplatten zu dem Resultat kam, daß Cholerakolonien auf der Blutagarplatte gerade durch die Bildung von hellen Höfen von anderen Darmbakterien zu unterscheiden seien. — Noch viel früher hatten bereits Koch (3) (1884) und Bitter (1) (1886) festgestellt, daß Cholera-vibrionen auf mit Blut gemischten Gelatineplatten eine deutliche helle Hofbildung um die Kolonien zeigen. Ferner hatte Eijkmann über Hofbildung auf Blutagarplatten durch Cholera-vibrionen berichtet (1901).

So verschieden die genannten Resultate mit Blutplatten sind, so hatte keiner der genannten Autoren filtrierbare Hämolysine nachweisen können, wie sie Kraus bei den El Tor-Stämmen fand, insbesondere auch nicht Kolle und Meinicke, selbst nicht bei diesen Stämmen. Auffallend ist demgegenüber die Mitteilung von Kraus (10), daß er an den ihm von Meinicke übersandten Kulturen dasselbe Verhalten bezüglich der Hämolysinbildung feststellen konnte, wie an seinen Stämmen.

Liefmann und Nieter bestätigen im März 1906 zum ersten Male die Angaben von Kraus: Sie fanden auch filtrierbare Hämolysine bei den 6 El Tor-Stämmen, allerdings nicht in jedem der angestellten Versuche in gleich starker und deutlicher Weise; auch die Stämme verhielten sich bezüglich der Quantität der Hämolysinbildung verschieden. Filtrierbare Toxine fanden Liefmann und Nieter nicht. — Unabhängig von diesen Autoren hatte Angenete im Herbst 1905 im Institut für Infektionskrankheiten die Hämolysinuntersuchungen nochmals aufgenommen außer an den El Tor-Stämmen auch besonders an den wenige Monate vorher aus den Cholerafällen der westpreußischen Epidemie isolierten Kulturen. Die von

Angenete erhielten, nicht veröffentlichten Resultate, die zum großen Teil mit den unseren übereinstimmen, waren: Nicht nur bei den 6 El Tor-Stämmen der Institutssammlung, sondern auch an den von Kraus übersandten 6 El Tor-Kulturen sowie außerdem bei 2 aus der letzten Epidemie stammenden Cholerastämmen (302^a und 322) der Institutssammlung ließen sich filtrierbare Hämolsine nachweisen. Unter den anderen Stämmen der letzten Epidemie fand sich dagegen kein weiterer Hämolsinstamm. In dem zeitlichen Auftreten und der Menge der Hämolsine zeigten sich zum Teil erhebliche Unterschiede, selbst in gleichalterigen Kulturen desselben Stammes (vgl. Liefmann und Nieter). Die El Tor-Stämme unterschieden sich im Wachstum, selbst auf der Kalbsblutagarplatte nicht von dem *Vibrio Metschnikoff*. Sie bildeten sämtlich 2—3 ^{mm} breite Aufhellungshöfe.

Die von Angenete begonnenen Untersuchungen sind von uns wieder aufgenommen worden. Da dieselben gegenwärtig aus äußeren Gründen eine Zeitlang unterbrochen werden müssen, so wollen wir unsere bisher erhaltenen Ergebnisse, namentlich bezüglich des Verhaltens von Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen auf der Blutagarplatte bekannt geben. Unsere Hämolsinversuche *in vitro* und die Toxinversuche bedürfen noch mannigfacher Erweiterungen; das bisherige Resultat soll aber trotzdem auch kurz mitgeteilt werden.

Die von uns untersuchten Cholerastämme waren durch die üblichen Methoden verifiziert worden. Sie wurden außerdem unmittelbar vor dem Beginn der Untersuchungen, einmal während derselben und am Schluß nochmals der Agglutinationsprobe unterzogen, wobei sie das gleiche Verhalten zeigten. Der für die Platten verwendete Agar war 3 prozentig, hergestellt nach der Vorschrift in der Anleitung für die bakteriologische Feststellung der Cholera (Pepton-Witte, Alkaligehalt — ebenso bei Bouillon — 2.2—2.5 ^{ccm} einer 10 prozentigen Sodalösung über den Lakmusneutralpunkt hinaus). Die geprüften Blutarten sind aus der Tabelle I ersichtlich. Der auf 42—45° abgekühlte Agar wurde mit 5 Prozent des kurz vorher entnommenen defibrinierten Blutes gut gemischt und dann in gleichmäßigen Platten zu je 13—15 ^{ccm} schnell ausgegossen. Nach dem Erstarren ließen wir dieselben bei Zimmertemperatur trocknen. Sie wurden stets bald nach der Herstellung benutzt. Die Oberflächenausstriche erfolgten, um möglichst Einzelkolonien zu bekommen, von einer Verdünnung von einer Öse Kultur in Peptonwasser oder Bouillon. Feststellung des Resultates nach 22 Stunden. Zur Beurteilung wurden nur isoliert liegende Kolonien verwertet, da bei dichtem Zusammenliegen von Kolonien ja sehr häufig um dieselben herum die Blutkörperchen zerstört werden.

Das Verhalten der untersuchten Kulturen auf den Blutplatten ist in Tabelle I zusammengestellt. Für diese Tabelle bedeuten die Zeichen:

- = keinerlei Aufhellung um die Kolonie;
- ± = matter durchscheinender bis 3 mm breiter Hof um die Kolonien ohne völlige Aufhellung;
- ± ± = wie vorher, nur noch breiter;
- + = bis 1 mm breite deutliche Aufhellungszone um die Kolonie;
- + + = dasselbe, 1—3 mm breit;
- + + + = dasselbe, 3—5 mm breit;
- + + + + = dasselbe, über 5 mm breit.

Von den El Tor-Stämmen sind 4 verschiedenen Serien angehörende Kulturen vorhanden und untersucht worden, nämlich: a) El Tor I, II, IV, V u. VI, direkt von Gottschlich seinerzeit (1905) übermittelt, in der Sammlung auf Agar weiter gezüchtet; b) El Tor IV virulent und El Tor VI virulent, derselben Herkunft, alle 3—4 Wochen nach Meerschweinchenpassage weitergezüchtet; c) El Tor Wien III, IV, V und VI, im November 1905 freundlichst von Dr. Kraus übersandt und endlich d) El Tor Wien 1, 2, 3, 4, 5 und 6, im Juni 1906 von ebendaher übermittelt.

Weiterhin finden sich in der Tabelle die Cholera-Stämme 70, 74, Saratow III und Baku I doppelt aufgeführt. Die mit „S“ bezeichneten sind in der Sammlung dauernd auf Agar weitergezüchtet, also: 70 S, 74 S, Saratow III S und Baku I S; die Stämme 70 virulent, 74 virulent, Saratow III virulent und Baku I virulent sind ebenso wie El Tor IV und VI virulent durch Tierpassage virulent erhalten worden.

Im ganzen sind untersucht 104 Cholera-, darunter 89 verschiedene und 9 choleraähnliche Vibrionen-Kulturen. In der Tabelle sind 18 Stämme der alten Institutssammlung in 21 Kulturen, die 6 El Tor-Stämme in 17 Kulturen, 39 Stämme der neuen Institutssammlung (letzte Epidemie) in 40 Kulturen sowie endlich 9 Vibrionen-Stämme aufgeführt. Außerdem wurden noch 26 Stämme der 1905er Epidemie auf der Menschenblutplatte geprüft.

Im allgemeinen ist zunächst aus der Tabelle ersichtlich, daß bei unseren Untersuchungen die geprüften, insbesondere die als hämolysinbildend ermittelten Stämme, sich auf Ziegen-, Hammel-, Pferde-, Kalbs- und Meerschweinchenblutplatten ähnlich bzw. gleichmäßig verhielten. Ungleichmäßig waren die Resultate dagegen zum Teil auf Esel-, mehr auf Menschen- und Kaninchenblut- und insbesondere auf Hühnerblutplatten. Differenzen in der Größe der Aufhellungszonen bei den erstgenannten Blutarten — auf die wohl nicht immer allzugroßer Wert zu legen ist — können entweder

Tabelle I. Verhalten von Cholera- und

Lf. Nr.	Stamm	Herkunft	Ziegenblut	Hammel- blut	Pferdeblut	Kalbsblut	
						I	II
A. Alte Institutssammlung.							
1	7		—	—	—	—	—
2	13		—	—	—	—	.
3	17		—	—	—	—	.
4	32		—	—	—	—	.
5	41		—	—	—	—	.
6	48		—	—	—	—	.
7	55		—	—	—	—	.
8	58		—	—	—	—	.
9	74 S		—	—	—	—	.
10	82		—	—	—	—	.
11	Hahn		—	—	—	—	.
12	Pfeiffer a. S.		—	—	—	—	.
13	Baku III		—	—	—	—	—
14	Baku IV		—	—	—	—	—
15	Saratow V		—	—	—	—	—
16	Saratow III S		—	—	—	—	—
17	Baku I S		++	++	+	++	+
18	Saratow III virulent		++	++	++	++	.
19	Baku I virulent		++	++	++	+++	++
20	Messina		++	++	++ ++	+	++
21	74 virulent		++	++	++ +	++	++
B. El Tor-							
22	El Tor I	Leiche	++	++	+	++	++
23	El Tor II	"	+++	+++	++	++	+++
24	El Tor IV	"	++	++	+	++	+
25	El Tor V	"	+++	+++	+++	+++	+++
26	El Tor VI	"	++	++	++	++	+++
27	El Tor IV virulent	"	++	++	++	++	++
28	El Tor VI virulent	"	++	++	+	++	++
29	El Tor-Wien III	"	++	++	+	++	+
30	El Tor-Wien IV	"	++	++	++	++	++
31	El Tor-Wien V	"	+++	+++	++	+++	+++
32	El Tor-Wien VI	"	++	++	+	++	++
33	El Tor-Wien 1	"	++	++	+	+++	.
34	El Tor-Wien 2	"	++	++	++	+++	.
35	El Tor-Wien 3	"	+	+	++	++	.
36	El Tor-Wien 4	"	++	++	++	++	.
37	El Tor-Wien 5	"	+++	++	++	+++	.
38	El Tor-Wien 6	"	++	+	++	+	.
C. Neue Institutssammlung.							
39	70 virulent	Leiche-Kulm.	++	++	++	+++	++
40	302a	Stuhl-Nakel	+	++	++	++	++
41	322	Stuhl-Pickel	++	++	++	++	
42	31	Leiche	—	—	—	—	

choleraähnlichen Vibrionen auf der Blutplatte.

Kaninchenblut		Eselblut		Hühner- blut	Meerschw.- blut	Gänseblut	Menschenblut	
I	II	I	II				I	II
(Choleraulturen.)								
±	.	—		+	—	.	—	.
—	.	—		+		.	—	.
±	.	—		+	—	.	—	.
±	.	—		+	—	.	—	.
±	.	—		+	—	.	—	.
—	.	—		±	—	.	—	.
±	.	—		+	—	.	—	.
±	.	—		+	—	.	—	.
±	±	— —		+	—	.	—	—
±	.	± —		±	—	.	—	.
—	—	—		±	—	.	—	.
±	—	—		—	—	.	—	.
±	.	—		±	—	.	—	.
±	.	—		+	—	.	±	±
±	.	—		+	—	.	—	.
±	±	— ±		+	—	.	—	±
++	+	++		+	++	.	+	.
++	++	++		+	+++	+	+	+
++	++	++		++	+++	+	+	.
++	++	++ ++		+	++	.	+	+
+	++	++		+	++	++	+	.
Stämme.								
++	++	+		+	+++	++	++	.
+++	+++	+++		+	+++	++	++	.
++	++	++		+	++	+	++	.
+++	+++	+++		+	+++	++	++	.
++	+++	++		+	++	++	++	.
+	+++	++		+	++	++	+	++
+	+++	++		++	++	++	++	+
++	++	+		+	+++	+	+	.
++	++	+++		+	+	+	+	.
+++	+++	+++		+	+++	+	++	++
+	++	+		+	+++	+	+	++
++	.	+		++	+++	++	+	.
++	.	+		++	+++	+	++	.
++	.	++		+	+++	+	+	.
+++	.	++		++	+++	+	+	.
++++	.	++		++	++++	++	++	.
++	.	++		+	+++	++	+	+
(Choleraulturen.)								
++	++	++		++	+++	++	++	.
++	++	++		++	+++	+	++	.
+	++	++		—	++	—	+	+
±	.	—		+	—	—	—	.

Tabelle I.

L. Nr.	Stamm	Herkunft	Ziegenblut	Hammel- blut	Pferdeblut	Kalbsblut	
						I	II
43	70 S	Leiche-Kulm.	—	—	—	—	—
44	73	Stuhl	—	—	—	—	—
45	76	Leiche	—	—	—	—	—
46	77	Leiche	—	—	—	—	—
47	83	Leiche	—	—	—	—	—
48	86	Stuhl	—	—	—	—	—
49	87	Stuhl	—	—	—	—	—
50	104	Stuhl	—	—	—	—	—
51	126	Stuhl	—	—	—	—	—
52	187	Leiche	—	—	—	—	—
53	217	Stuhl	—	—	—	—	—
54	218	Leiche	—	—	—	—	—
55	324	Leiche	—	—	—	—	—
56	326	Leiche	—	—	—	—	—
57	341	Stuhl	—	—	—	—	—
58	363	Leiche	—	—	—	—	—
59	376	Stuhl	—	—	—	—	—
60	381	Stuhl	—	—	—	—	—
61	387	Leiche	—	—	—	—	—
62	410	Leiche	—	—	—	—	—
63	438	Leiche	—	—	—	—	—
64	447	Leiche	—	—	—	—	—
65	448	Leiche	—	—	—	—	—
66	449	Stuhl	—	—	—	—	—
67	574	Stuhl	—	—	—	—	—
68	578	Leiche	—	—	—	—	—
69	582	Leiche	—	—	—	—	—
70	903	Stuhl	—	—	—	—	—
71	1039	Leiche	—	—	—	—	—
72	1226	Stuhl	—	—	—	—	—
73	1228	Stuhl	—	—	—	—	—
74	1231	Stuhl	—	—	—	—	—
75	1258	Stuhl	—	—	—	—	—
76	1316	Stuhl	—	—	—	—	—
77	1876	Stuhl	—	—	—	—	—
78	Pfeiffer-Rostock		—	—	—	—	—
D. Choleraähnliche Vibrionenstämme							
79	V. Bonn		++	++	++	++++	.
80	V. Metschnikoff I		++	+	++	++++	.
81	V. Metschnikoff II		++	++	++	++	.
82	V. 437		++	++	+++	+	.
83	V. 1517		±	+	—	+	.
84	V. 53		—	—	—	—	—
85	V. 56		—	—	—	—	—
86	V. 152		—	—	—	—	—
87	V. 1455		—	—	—	—	—

durch stärkeres Hämolysinbildungsvermögen oder — abgesehen von Unterschieden in der subjektiven Beurteilung — bedingt sein durch Unterschiede in der Dicke der Platten, ungleichmäßige Blutverteilung, eventuell durch Blutschädigung bei der Nährbodenbereitung u. dergl., oder endlich sie könnten auch beeinflußt sein durch verschiedene Zusammensetzung des Nährbodens (Fleischwasserart, Wasser- und Alkaligehalt usw.). Auch das Alter der Kulturen kommt vielleicht in Betracht. Meinicke (13) hatte gefunden, daß sich bei verschiedenen Prüfungen derselben Stämme mit derselben Blutart bezüglich der Intensität der Aufhellung nicht immer das gleiche Resultat ergab. Auch wir sahen dies Verhalten bei mit verschiedenen Blutarten angelegten zweiten Versuchsreihen (vergleiche Tabelle I unter II).

Im einzelnen geht nun aus unseren Untersuchungen hervor, daß zunächst die 4 Serien der El Tor-Stämme konstant auf sämtlichen Platten aller benutzten Blutarten deutliche Aufhellungszonen bildeten, also eine Hämolyse und Reduzierung des gelösten Hämoglobins (daher totale Aufhellung) herbeizuführen imstande sind, allerdings, wie gesagt, nicht immer gleichmäßig kräftig sowohl bei denselben wie bei verschiedenen Blutarten. Ferner konnten wir außer bei den bereits von Angenete gefundenen hämolysinbildenden Stämmen 302a und 322 noch bei den folgenden eine analoge ausgesprochene Bildung von Aufhellungszonen feststellen: bei den Cholera-Stämmen „Messina“ und „Baku I S“ und bei den durch Tierpassagen virulent gehaltenen Stämmen „Baku I virulent“, „Saratow III virulent“ und „74 virulent“ der alten Sammlung, endlich noch bei dem Stamm „70 virulent“ der neuen Sammlung. Von den identischen, in der Sammlung auf Agar fortgezüchteten Kulturen zeigten Saratow III S, 74 S und 70 S außer auf Hühnerblut keine ausgesprochenen Aufhellungszonen. Auffallend ist, daß diese Hämolysin-Stämme weder bei den Untersuchungen von Meinicke noch denen von Angenete als solche gefunden worden sind. Angenete hatte allerdings nur den Stamm 70 S, Meinicke diesen nicht untersucht. Meinicke hatte keine Differenz im blutlösenden Verhalten bei virulenten und identischen avirulenten Stämmen auf der Kaninchenblutagarplatte feststellen können. Wir versuchten nun festzustellen, ob die Stämme Saratow III S, 70 S und 74 S nach Tierpassage auch hämolysinbildend wirken würden. In je einem derartigen Versuch konnten auf Pferde- und Kalbsblutplatten bisher keine Aufhellungszonen um die Cholerakolonien festgestellt werden. Bei Anfertigung von Blutplatten mit einem Gemisch der virulenten mit den identischen avirulenten Stämmen waren auf der Platte Kolonien mit und solche ohne jede Aufhellungszonen deutlich zu unterscheiden.

Unter im ganzen 89 von uns untersuchten verschiedenen Cholerastämmen (inkl. den El Tor-Stämmen) fanden sich demnach 13 verschiedene Kulturen, die auf allen Arten von Blutagarplatten ausgesprochene Aufhellungszonen von 1 bis 6 mm Größe bildeten. Bemerkenswert ist, daß einige dieser Stämme (Messina und Baku I S) schon jahrelang, andere (302a und 322) schon 9 bis 10 Monate lang auf Agar gezüchtet waren. Vielleicht hätte man bei sofortiger Untersuchung der im Jahre 1905 frisch aus dem menschlichen Körper isolierten Kulturen oder nach Weiterzüchten durch Tierpassagen noch mehr derartige Stämme gefunden, wenn zwar auch Angenete, der die 1905 er Kulturen 2 bis 4 Monate nach ihrer Isolierung untersuchte, nur die beiden genannten ermittelte. Andererseits wäre es aber auch denkbar, daß die Eigenschaft der Hämolysinbildung bei gewissen Stämmen (Messina, Baku I S) erst nach längerem Weiterzüchten oder nur unter bestimmten Bedingungen auf Agar auftritt (daher die negativen Resultate von Meinicke und vielleicht auch die differenten Angaben anderer).

Immerhin bleibt es noch auffallend, daß abgesehen von den genannten keine anderen Kulturen dieser Sammlung die Ziegen-, Hammel-, Kalbs-, Pferde- und Meerschweinchenblutplatten veränderten, speziell auch nicht die mit den El Tor-Stämmen vergleichbaren Kulturen von Bazillenträgern, während die El Tor-Stämme sämtlich regelmäßig dies bewirkten. Bei späteren Untersuchungen wäre darauf zu achten, ob eventuell Vibrionen, die sich lange (wie die El Tor-Stämme) im Körper aufgehalten haben, vielleicht im gegen Cholera immunen Körper bzw. gleichzeitig mit anderen Krankheitserregern (Dysenterie, Typhus, Paratyphus), besonders die Eigenschaft der Hämolysinbildung zukommt.

Weniger gleichmäßige Resultate gab die Eselblutplatte. Während die 13 genannten Stämme auch hier deutliche Aufhellungszonen (zum Teil allerdings kleiner wie bei den anderen Blutarten, nur +) erkennen ließen, zeigten auch noch andere einen 1 bis 3 mm breiten, matten, nicht durchsichtigen Saum ($\pm$) um die Kolonien: die Stämme 86, 217 und 1231 der neuen, sowie 82 der alten Sammlung. Bei einer zweiten Untersuchung fehlte der Saum bei allen 4 Stämmen, dagegen fand sich alsdann ein solcher im Gegensatz zu früher bei „Saratow III S.“ — Auf Menschenblutagar (Blut frisch aus der Armvene entnommen und sogleich verarbeitet) zeigten noch viel mehr Stämme den matten Saum ($\pm$): außer den in der Tabelle aufgezählten 11 noch 5 von 26 außerdem untersuchten Kulturen der neuen Sammlung. Von den 13 Hämolysinstämmen bildeten viele auf Menschenblutagar nur schmale helle Zonen (+).

Auf Kaninchenblutagar zeigten fast alle Kulturen mindestens den matten Saum ($\pm$) bis zu 4 mm breit ($\pm \pm$), ein nicht zu den genannten

13 gehörender Stamm sogar eine deutliche helle Zone (+), nämlich 1876. Nur wenige Stämme ließen auch die Kaninchenblutplatte gänzlich unverändert, darunter auch 4 choleraähnliche Vibrionenstämme (53, 56, 152 und 1455). Auf Menschen- und Kaninchenblutagarplatten stimmten ebenso wie auf der Eselblutplatte die Resultate einer zweiten Versuchsreihe nicht immer genau mit den früheren überein. (Vgl. I und II.)

Auf Hühner- und Gänseblutplatte zeigten die meisten der 13 Stämme nur geringe, aber deutliche Aufhellungshöfe (+); weiterhin bildeten aber auch die meisten der anderen Cholera- und 3 choleraähnliche Vibrionenstämme verhielten sich völlig negativ. Auf Gänseblut konnten nicht alle Stämme untersucht werden. Bei den geprüften (unter der Hälfte) fand sich nur einer mit + und einer mit $\pm$.

Nach dem Gesagten gaben Kaninchen-, Menschen-, Hühner-, Esel- und Gänseblutplatten ungleichmäßigere Resultate als die früher genannten Blutarten, vielleicht infolge geringerer Resistenz gegenüber den Vibrionen. In diesen Resultaten stimmen wir nicht ganz mit Schumacher überein. Er fand, daß zunächst auf Kaninchenblut die meisten der von ihm untersuchten 10 frischen Cholera- und 3 choleraähnliche Vibrionenstämme mehr oder weniger starke Aufhellungshöfe bildeten; ein gleiches Verhalten zeigte sich ferner bei Tauben-, Menschen-, Pferde-, Meerschweinchen- und Hundeblut. Schumacher hielt am meisten geeignet für die Blutplatte das Kalbsblut.

Schumacher hält ähnlich wie früher Meinicke (13) diese Art der Hofbildung auf Platten der weniger resistenten Blutarten, die auf Kalbsblutplatte fehlte, nicht für einen Ausdruck der Hämolysinbildung der Cholera- und 3 choleraähnliche Vibrionen, sondern für eine Wirkung der ein proteolytisches Ferment ausscheidenden Vibrionen auf die geschädigten oder bereits zerstörten Blutkörperchen, also auf eine bereits eingeleitete Hämolyse in diesem Nährboden (durch mechanische, chemische, thermische oder osmotische Einflüsse). Schumacher konnte bei keiner der Blutarten in Lösung eine hämolysinbildende Eigenschaft der Cholera- und 3 choleraähnliche Vibrionen nachweisen.

Wie schon früher erwähnt, sind unsere Hämolysinversuche in vitro noch nicht endgültig abgeschlossen. Jedoch tragen wir kein Bedenken, schon einige der bisherigen Resultate bekannt zu geben. Wir hoffen, später diese ebenso wie die Toxinfrage noch eingehender behandeln zu können.

Das Vorhandensein von gelösten Hämolysinen wurde geprüft an Bouillonkulturen verschiedenen Alters, und zwar für gewöhnlich in einer Versuchsreihe 6 Stämme aus verschiedenen Gruppen gleichzeitig, also z. B. 302 a, S III virulent, El Tor V, El Tor-Wien V und 5, sowie Vibrio

Metschnikoff. Die zuerst verwendete Bouillon war nach der Vorschrift in der Anleitung zur Cholerauntersuchung hergestellt, später wurde auch zum Teil nach der Krausschen Vorschrift hergestellte Bouillon benutzt. Zu den Hämolysinversuchen in vitro wurden verwendet sowohl (nach Kraus) durch Reichelkerzen geschickte Filtrate sowie in einer großen Zentrifuge (3000 Umdrehungen) $\frac{1}{2}$ Stunde lang zentrifugierte Bouillonkultur. Die Filtrate erwiesen sich häufig als nicht steril, da, wie schon aus früheren Untersuchungen bekannt ist, die Vibrionen leicht die Filter passieren: In über der Hälfte der Filtrate ließen sich nach Anreicherung von je 1 ^{cem} in 10 ^{cem} Peptonwasser in 24 Stunden Vibrionen nachweisen, wenn auch häufig die direkt mit der filtrierten Bouillon beimpften Platten steril blieben. Fast noch besser wie die Filtration führte das Zentrifugieren in der angegebenen Weise zu steriler Bouillon, wenn wir sofort nach dem Zentrifugieren vorsichtig mit der Pipette die Flüssigkeit abnahmen. Jedenfalls konnten wir häufig (mitunter in der Hälfte der Zentrifugate) auch durch Anreicherung in der abgenommenen Flüssigkeit keine Vibrionen nachweisen. Erwähnt sei noch, daß, während die meisten Zentrifugate¹ klar wurden, andere nach mehrmaligem Zentrifugieren trüb blieben (z. B. 302a, S III virulent), und zwar blieben meistens die trübe, welche in Bouillon kräftige Häutchenbildung gezeigt hatten. Bei den El Tor-Stämmen vermißten wir oft diese letztere Erscheinung. — Über die Technik sei kurz folgendes erwähnt: abgestufte Mengen der Flüssigkeit wurden in gut gereinigten sterilen Reagenzgläsern mit steriler 0.85 prozentiger NaCl-Lösung auf 2 ^{cem} aufgefüllt. Nach Zusatz von je 1 Tropfen 3 mal gut gewaschenen Blutes 2 Stunden stehen lassen im Brutschrank; dann 20 Stunden auf Eis; dann Ablesen des Resultates.

Aus den von Angenete und uns angestellten Hämolysinprüfungen ergab sich, daß außer bei den geprüften El Tor-Stämmen noch bei den Kulturen 302a, 322, Saratow III virulent, Baku I virulent, Baku I S, Messina, 70 virulent und 74 virulent sowohl in vibrionenfrenen Zentrifugaten wie in sterilen Filtraten zu gewissen Zeiten in einwandfreier Weise mehr oder minder stark wirkende Hämolysine vorhanden waren. Geprüft wurde zum Teil gleichzeitig an Hammel- und Ziegenblut bei 302a, 322 und S III (Angenete hatte die El Tor-Stämme sowie 302a und 322 an Kaninchenblut geprüft) oder gleichzeitig an Hammel- und Kaninchenblut bei den Kulturen Saratow III virulent, Baku I virulent, Messina, 70 und 74 virulent. Zwischen den Zentrifugaten und Filtraten konnten meist wesent-

¹ Mit „Zentrifugat“ haben wir hier und im folgenden die beim Zentrifugieren erhaltene Flüssigkeit bezeichnet.

liche Unterschiede in der Stärke der hämolytischen Wirkung festgestellt werden zugunsten der Zentrifugate. Es ist ja durch die Untersuchungen von Meinicke und anderen bekannt, daß die Filter zweifellos einen Teil der Hämolsine zurückhalten. Trotzdem gelang es, bei einigen Filtraten schon bei einer Menge von 0.1 (Angenete bei 0.05) eine komplette Hämolyse festzustellen.

Auch wir konnten die von Angenete bereits beobachtete Unbeständigkeit in dem zeitlichen Auftreten und eventuellen Verschwinden der Hämolsine feststellen, selbst bei gleichalterigen Kulturen desselben Stammes in korrespondierenden Versuchen, namentlich aber auch bei Verwendung verschiedener Nährböden. So verhielt sich die Hämolsinbildung in der nach der Anleitung hergestellten Bouillon wesentlich anders als in der Krausschen Bouillon. Während z. B. bei Saratow III. vir. in der Krausschen Bouillon die kräftigsten Hämolsine nach 24 Stunden und bei den späteren Untersuchungen in den Filtraten mitunter nur noch Spuren von Hämolyse zu beobachten waren, war in der Anleitungsbouillon in den Filtraten erst nach 72 Stunden ein deutlich nachweisbares Hämolsin vorhanden (bei 1.0 Filtrat); an den folgenden bis zum 7. Tage nahm dasselbe noch wesentlich zu (bei Zentrifugat bei 0.05, bei Filtrat bei 0.25 komplette Hämolyse). Die Stämme 302a, 322, Messina, 70 vir. und 74 vir. zeigten die stärksten Hämolsine nach 24 bis 48 Stunden; dabei die Stämme 302a und 322 in Anleitungsbouillon mehr als in der Krausschen. Bei 302a und 322 waren am 2. und 3. Tage in den Filtraten häufig nur noch Spuren von Hämolsin, in den Zentrifugaten wesentlich länger deutliche Hämolsine nachzuweisen, allerdings auch in diesen quantitativ schnell abnehmend. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Angenete überein, der in 2-tägigen Bouillonkulturen von Stamm 302 und 322 kräftig wirkende filtrierbare Hämolsine fand, die dann aber schnell an Wirksamkeit abnahmen, so daß sie am 4. Tage nur noch in größeren Filtratmengen in Spuren nachweisbar und am 6. Tage gänzlich verschwunden waren. — Auffallend war auch die Beobachtung am *Vibrio Metschnikoff*. Derselbe zeigte in den ersten Tagen in Krausscher Bouillon höchstens Spuren von filtrierbarem Hämolsin, dann aber plötzlich am 7. Tage ein kräftiges Hämolsin (bei 0.05 +, bei 0.25 +++). Dagegen war in der Anleitungsbouillon am 1. Tage kein Hämolsin in beiden Bouillonarten weder im Zentrifugat noch im Filtrat nachzuweisen; am 2. Tage nur im Zentrifugat Spuren bei größeren Mengen; am 3. Tage etwas mehr im Zentrifugat und Spuren im Filtrat bei größeren Dosen; am 4. Tage wieder dasselbe Resultat wie am 2. Tage und am 7. Tage erst deutliche Hämolyse (+) im Zentrifugat 0.25 und Spuren im Filtrat (bei Filtrat mit Hammelblut

Tabelle II. Verflüssigung der Gelatineplatte.

Lfd. Nr.	S t a m m	Nach 40 Stunden	Nach 72 Stunden	Nach 120 Stunden	Anmerkung: Bei früherem Versuch nach 22 Stunden
20	Messina	+	++	+++	.
9	74 S	++	+++	.	.
16	Sa. III S	±	+	+++	.
17	Ba. I S	++	+++	.	.
18	Sa. III vir.	++	.	.	+++
19	Ba. I vir.	+++	.	.	.
21	74 vir.	±	±	+	.
22	El Tor I	±	+	+(schwach)	—
23	El Tor II	++	+++	.	±
24	El Tor IV	++	+++	.	+++
25	El Tor V	±	+	+++	—
26	El Tor VI	+++	.	.	+++
27	El Tor IV vir.	+++	.	.	+++
28	El Tor VI vir.	+++	.	.	+++
29	El Tor (Wien) III	++	+++	.	+++
30	El Tor „ IV	+++	.	.	++
31	El Tor „ V	±	+	++	±
32	El Tor „ VI	++	+++	.	++
33	El Tor (Wien) 1	±	±	+(schwach)	.
34	El Tor „ 2	+	++	+++	.
35	El Tor „ 3	+++	.	.	.
36	El Tor „ 4	++	+++	.	.
37	El Tor „ 5	±	+	+++	.
38	El Tor „ 6	+++	.	.	.
39	70 vir.	++	+++	.	+
43	70 S	++	+++	.	.
40	302 a	+++	.	.	+++
41	322	++	+++	.	+++
79	Vibrio Bonn	++	+++	.	.
80	V. Metschnikoff I	++	+++	.	.
81	V. „ II	++	+++	.	.
82	V. 437	++	+++	.	.
83	V. 1517	+++	.	.	.
84	V. 53	—	—	±	.
85	V. 56	—	—	—	.
86	V. 152	—	—	—	.
87	V. 1455	—	—	—	.

bei 0·05, mit Ziegenblut bei 0·5). Auch bei den El Tor-Stämmen aus den verschiedenen Serien war selbst in demselben Nährboden das Verhalten keineswegs bei allen Versuchen kongruent, wenn auch bei der Krausschen Bouillon eine gewisse Ähnlichkeit im Ausfall der Reaktionen festzustellen war. Bei diesen Stämmen waren die Hämolyse stärker in der Anleitungsbouillon, insbesondere bei El Tor Wien V.

Aus unseren Untersuchungen ergibt sich, daß bei der Unbeständigkeit des zeitlichen Auftretens der Hämolyse bei Cholera- und ähnlichen Vibrionen aus einem negativen Resultat am 6. Tage (Schumacher) oder am 2. und 5. Tage (Meinicke) nicht schon auf Fehlen von filtrierbaren Hämolyse geschlossen werden darf. Es muß mindestens an 7 aufeinanderfolgenden Tagen untersucht werden, eventuell noch länger.

Bei der Untersuchung unserer choleraähnlichen Vibrionensämme, deren wir neun aus unserer alten Institutssammlung entnahmen und von denen die meisten schon über 1 Jahr auf Agar fortgezüchtet waren, zeigte es sich, daß vier derselben (V. 53, 56, 152 und 1455) keine auf der Blutplatte nachweisbare Aufhellung, selbst keinen matten Saum auf Kaninchen- oder Menschenblut, hervorzurufen imstande waren. Auf Hühnerblut zeigte nur V. 53 eine $\pm$ -Reaktion. Auf der Taf. IV ist eine solche Vibrionenplatte (Fig. 3) abgebildet und im Gegensatz dazu eine kräftige Aufhellungszonen nach 22 Stunden zeigende Choleraplatte. (Fig. 4.) Die Mikrophotogramme, die wir der Liebenswürdigkeit des Hrn. Prof. Zettnow verdanken, sind aufgenommen unter möglichst gleichmäßigen Bedingungen (Exposition usw.) bei auffallendem Licht; dabei waren die Schalen mit naß anliegendem weißem Papier hinterklebt, so daß an den Stellen, wo sich rote Blutkörperchen befinden, der Untergrund schwarz, wo das Hämoglobin gelöst und reduziert ist, dagegen hell erscheint. Bei den kleineren Kolonien des choleraähnlichen *Vibrio* kommen bei auffallendem Licht die Lichtreflexe bedeutend größer und kräftiger zum Ausdruck als bei den flacheren, jedoch in derselben Zeit bedeutend stärker gewachsenen Cholerakolonien. Die weißen Punkte im Untergrund und die feinen Risse auf der einen Seite der Vibrionenplatte rühren von Luftblasen bzw. Rissen her, die beim Ausstreichen entstanden sind.

Erwähnt sei noch, daß wir versucht haben, auf der Blutagarplatte gleichzeitig ausgesäte hämolysinbildende Cholera- und -ähnliche Vibrionen zu unterscheiden. In der Art der Hofbildung (außer mitunter in der Intensität) zeigten sich keine deutlichen Unterschiede. Jedoch waren die choleraähnlichen Vibrionenkolonien stets kleiner wie die echten Cholerakolonien. Allerdings hatten wir ja nur alte Sammlungsstämme

zur Verfügung, so daß auf diesen Unterschied nicht allzuviel Wert zu legen ist. Ähnlich waren auch nicht hämolysinbildende Vibrionen von nicht hämolysinbildenden Cholera-Kolonien durch minder kräftiges Wachstum zu unterscheiden.

Aus unseren Untersuchungen an choleraähnlichen Vibrionen ergibt sich, daß es Stämme gibt (— allerdings Sammlungskulturen —), die auf der Blutplatte keinerlei Hofbildung zeigen. (Vgl. auch Meinicke.)

Schumacher erklärt die Hofbildung auf der Blutplatte bei seinen hämolysinbildenden Vibrionen aus dem Zusammenwirken von zwei Komponenten: „1. Hämolyse, d. h. Austritt von Hämoglobin aus den roten Blutkörperchen und 2. Reduktion des freien Hämoglobins —, wodurch die eigentliche Aufhellung entsteht —, diese abhängig von der proteolytischen Fermentbildung der ausgesäten Bakterienart. Die Aufhellungshöfe seien daher das Produkt aus einem hämolytischen und proteolytischen Faktor, deren Zusammenwirken unbedingt erforderlich sei. Schumacher fand, daß alte Sammlungsstämme von choleraähnlichen Vibrionen, die das Verflüssigungsvermögen für die Gelatineplatte verloren hatten, auch auf der Blut-, selbst der Kaninchenblutplatte die Hofbildung vermissen ließen. Hierzu sei erwähnt, daß, wie aus Tabelle II hervorgeht, unsere choleraähnlichen nicht hämolysinbildenden Vibrionenstämme 56, 152 und 1455 auf Gelatine, selbst nach 5 Tagen auch keine Spur von Verflüssigung bewirkten; *Vibrio* 53 ließ erst am 5. Tage eine Andeutung von Verflüssigung erkennen ($\pm$). Die Tabelle II enthält auch die Resultate der Prüfung auf Peptonisierungsvermögen bei unseren Hämolysinstämmen. Es zeigte sich, daß dieselben sich keineswegs gleichmäßig verhielten; manche hatten selbst nach 40 bis 48 Stunden noch keine kräftige Verflüssigung der Gelatine bewirkt, einige zeigten diese sogar erst am 5. Tage und auch dann nur schwach (z. B. El Tor I, El Tor Wien 1 und 74 virulent). Bei mehreren in der Tabelle nicht aufgeführten Nachprüfungen war das Verhalten nicht ganz gleichmäßig; manche Stämme verflüssigten langsamer, manche schneller. Stets aber verflüssigten die am kräftigsten hämolysinbildenden Stämme El Tor V, El Tor Wien V und El Tor Wien 5 sowie auch El Tor I und El Tor Wien 1 langsam; mitunter nach 48 Stunden nur eine Andeutung von Verflüssigung.

Eine ähnliche Unbeständigkeit wie bei der Entstehung von Hämolysinen konnten wir auch bei unseren Prüfungen auf das eventuelle Vorhandensein von „Toxinen“ in Bouillonkulturen verschiedenen Alters finden. Es soll später noch über unsere nach Analogie der Krausschen Versuche angestellten Experimente eingehend berichtet werden.

Vorläufig sei schon mitgeteilt, daß wir bei den meisten der El Tor-Stämme in Zentrifugaten von ein- und mehrtägigen Bouillonkulturen eine Giftbildung feststellen konnten: Bei intravenöser Einspritzung von 1^{cem} der Zentrifugate sahen wir häufig akute Todesfälle bei Kaninchen unter toxischen Erscheinungen: Schreien, Dyspnoe, Krämpfen, Lähmungen usw. Jedoch zeigte sich in unseren Fällen die Wirkung nicht so frühzeitig, wie Kraus sie beobachtete (nach 2 bis 5 Minuten), obgleich wir eine größere Dosis einspritzten. Die früheste Vergiftung war nach 10 bis 15 Minuten, meist nach 30 bis 70 Minuten oder nach längerer Zeit (bis mehrere Stunden) festzustellen. Selbst nach 19 Stunden konnte einmal ein Tierverslust unter den genannten plötzlich akut auftretenden Erscheinungen konstatiert werden. Auch bei einigen Stämmen unserer Sammlung (es sind erst wenige daraufhin untersucht), den Stämmen 302a, SIII virulent, 70 virulent und 1231 hatten wir nach 3 bis 17 Stunden Tierversluste, je einmal akut bei 302a nach 3½ und bei 1231 nach 3 Stunden unter denselben Erscheinungen.

In Filtraten, selbst von den El Tor-Stämmen, auch den im Juni uns von Kraus übersandten Kulturen, konnten wir bisher bei intravenöser Einspritzung von 1^{cem} bei Kaninchen und bei intraperitonealer Einspritzung derselben Dosis bei Meerschweinchen, keine Tierversluste, selbst nicht nach 48 bis 72 Stunden, feststellen. Allerdings hatten wir zu diesen Versuchen bisher nach der Choleraanleitung hergestellte Bouillon verwendet. Vielleicht zeigt sich, was noch zu prüfen ist, in der nach Kraus hergestellten Bouillon ein anderes Verhalten. Offenbar hängen sowohl Hämolysin- wie Toxinbildung bei den Vibrionen, wofür auch die differenten Beobachtungen der verschiedenen Autoren sprechen, von verschiedenen Umständen ab, zu denen wahrscheinlich zu rechnen sind: 1. Beschaffenheit des Nährbodens (Peptonart, Alkaligehalt usw.), 2. Blutart bei Hämolysinbildung, 3. Alter und Wachstum der Kultur, eventuell Zerfall von Vibrionen, 4. Alter des Stammes und Art der Weiterzüchtung (Tierpassagen). Die Herkunft des Cholerastammes, ob aus Leiche oder Stuhl (wir haben besonders darauf geachtet), scheint ohne Einfluß zu sein.

Die Frage nach der Art der in den Kulturen vorhandenen toxischen Substanz können wir heute nach unseren Untersuchungen noch nicht entscheiden. Auch muß das genauere vergleichende Studium der von den einzelnen Stämmen gebildeten Hämolysine noch näheren Aufschluß über den Charakter derselben ergeben.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.