Aus der Universitäts-Frauenklinik in Königsberg i. Pr.
(Direktor: Prof. Dr. G. Winter.)

Die Hämolysen der Streptokokken.¹⁾

Von Prof. W. Zangemeister.

Die Hämolysen der Streptokokken steht augenblicklich im Vordergrund unserer bakteriologischen Spezialinteressen. Wir wissen heute, daß es nur eine Art kapselfreier Streptokokken beim Menschen gibt und daß die saprophytisch vegetierenden und die pathogenen Stämme ihre differenten Fähigkeiten keiner Artverschiedenheit verdanken.

Gerade die Forschung der letzten Jahre hat aber auch die Tatsache festgestellt, daß verschiedene Streptokokkenstämme praktisch äußerst wichtige Unterschiede aufweisen können, die wir als erworbene Stammeseigenschaften auffassen müssen. Die Trennung zwischen solchen Stammesdifferenzen und

wirklichen Artverschiedenheiten ist theoretisch natürlich keine vollkommene, wenngleich sie praktisch unbedingt aufrecht erhalten werden muß. Erworbene Eigenschaften sind dahin zu definieren, daß nur eine beschränkte Anzahl von Generationen die veränderten Lebenserscheinungen erzeugt hat, während voraussichtlich Tausende von Jahren nötig waren, um Differenzen der Art hervorzubringen; oder mit anderen Worten, daß Stammeseigenschaften in relativ kurzer Zeit entstehen und verschwinden, Arteigenschaften aber nicht.

Im großen und ganzen stellt man sich vielfach die Veränderlichkeit der Lebereigenschaften der Streptokokken heute noch viel zu groß vor. Meine jahrelang fortgeführten Arbeiten haben gezeigt, daß die Zähigkeit, mit der der einzelne Stamm an seinen Spezialeigenschaften festhält, eine recht große ist und daß gegenteilige Beobachtungen zumeist auf Täuschungen beruhen.

So läßt sich z. B. die Virulenz eines Stammes für eine Tierart nicht, wie man gewöhnlich annimmt, durch wenige Tierpassagen wesentlich steigern und durch bestimmte Maßregeln (z. B. Erhitzen) beliebig herabsetzen. Größere Virulenzveränderungen sind, wie ich festgestellt habe, zumeist nur scheinbare, sofern sie im Experiment zutage treten.¹⁾

Auf Grund dieser Tatsache gewinnt naturgemäß die Fähigkeit eines Stammes, sich im tierischen Organismus — und zwar in dessen Geweben — zu vermehren, die Pathogenität, an praktischer Bedeutung, und es erscheint noch mehr als vordem wünschenswert, einem Streptokokkenstamm jene Fähigkeit resp. Tendenz „ansehen“ zu können.

Dieser Aufgabe schien die Feststellung der hämolytischen Eigenschaft eines Stammes gewachsen zu sein.

Stellten doch 1905 Schottmüller und Mau²⁾ an 400 Wöchnerinnen fest, daß sich der hämolytische Streptococcus fast nur fand, wenn Fieber bestand, indes sich der nichthämolytische oft bei nichtfiebernden Wöchnerinnen, oder, wenn Fieber vorhanden war, neben dem hämolytischen nachweisen ließ. Dieses Ergebnis wurde 1907 bestätigt durch Gonnet³⁾ und durch Fromme⁴⁾. Ersterer fand bei 100 gesunden Schwangeren 16 mal nichthämolytische Streptokokken im Vaginalsekret und bei denselben 100 Frauen am 5.—7. Wochenbettstag: 6 mal nichthämolytische Streptokokken (diese Wöchnerinnen waren fieberfrei) und 4 mal hämolytische (diese Wöchnerinnen hatten die „Zeichen der puerperalen Infektion“).

Fromme⁴⁾ fand unter 100 Schwangeren 27 mal nichthämolytische Streptokokken und 19 mal dieselben unter 36 fieberfreien Wöchnerinnen. Andererseits waren alle bei nachweislich infektiösen Fällen gefundenen Genitalstreptokokken hämolytisch.

Fromme stellt auf Grund seiner Untersuchungen u. a. die bedeutungsvollen Sätze auf, daß 1.⁵⁾ in der Vagina von normalen Schwangeren und Wöchnerinnen und im Uterus der letzteren hämolytische Streptokokken nicht vorkommen und daß 2.⁶⁾ der Befund typisch hämolysierender Streptokokken im Uterus oder der Vagina fiebernder Wöchnerinnen die Prognose dubiös erscheinen läßt, da 3.⁷⁾ die Hämolysen eine Eigenart der virulenten Streptokokken sei.

In einer späteren Arbeit mit Heynemann⁸⁾ hat Fromme ausgesprochen: 1. daß der Streptococcus des Puerperalfiebers „ein typisch hämolysierender Keim ist und daß man ihn durch diese Eigenschaft von den übrigen nur wenig oder nichtpathogenen Streptokokken auf das genaueste unterscheiden kann“; 2. daß der Nachweis der hämolytischen Streptokokken bei fiebernden Wöchnerinnen sogar ein sicheres Zeichen ist, daß die betreffende Patientin aufs schwerste gefährdet ist.

Diese Sätze lassen sich nicht aufrecht erhalten!

Die Einwände Freymuths⁹⁾ sind dabei für mich nicht maßgeblich; denn Freymuth hat bei seinen Untersuchungen offenbar technische Fehler begangen; anders sind seine Ergebnisse garnicht zu erklären. Die Hallenser Klinik hat selbst die Unhaltbarkeit des Frommeschen Standpunktes zugegeben.

Heynemann¹⁰⁾ führt nämlich an, daß ausgesprochene hämolytische Streptokokken gefunden werden können, ohne daß sie für den Menschen hochvirulent zu sein brauchen, und teilt mit, daß

1) Ähnlich äußert sich auch Kurth, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt, Bd. 7, H. 2 u. 3. — 2) Münchener medizinische Wochenschrift 1905, S. 434. — 3) L'Obstetr. 1907, No. 1. — 4) Archiv für Gynäkologie, No. 85, S. 154. — 5) l. c. S. 170 u. 174. — 6) l. c. S. 182. — 7) l. c. Das geht aus den Erörterungen S. 182 hervor. — 8) Fromme und Heynemann, Berliner klinische Wochenschrift 1908, No. 19. — 9) Freymuth, Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie, Bd. 61, S. 544. — 10) Archiv für Gynäkologie, Bd. 86, H. 1, S. 89.

1) Vortrag in der Nord-Ostdeutschen Gesellschaft für Gynäkologie in Königsberg i. Pr. am 23. Januar 1909.

sich unter 50 fieberfreien Wöchnerinnen 31mal (!) ausgesprochene hämolytische Wöchnerinnen gefunden haben.

Fromme¹⁾ selbst hat sich dann dahin rektifiziert, daß er zugibt, daß man bei ganz normalen Wöchnerinnen typisch hämolytische Streptokokken findet, und zwar sogar in $\frac{3}{4}$ aller Fälle!

Neuerdings teilt Sigwart²⁾ mit, daß er auch bei einer gesunden Schwangeren sowie 38mal unter 56 Wöchnerinnen des 2. bis 5. Wochenbettages hämolytische Streptokokken gefunden habe. Zu ähnlichen Resultaten gelangte C. Fraenkel³⁾, während Konrad⁴⁾ versucht, die Frommeschen Sätze zu stützen.

Diese Tatsachen schränken natürlich den prognostischen Wert der Streptokokkenhämolyse im Sinne Frommes wesentlich ein.

Daß Fromme selbst der Hämolyse die ihr zuerst beilegte eminente Bedeutung nicht mehr zuerkennt, geht⁵⁾ daraus hervor, daß er in der letzterwähnten Arbeit nach Mitteln und Wegen sucht, um „die hochvirulenten hämolytischen Streptokokkenformen trennen zu können von den zurzeit in ihrer Virulenz herabgesetzten (hämolytischen) Formen.“

Die Sätze Frommes verlieren aber noch weiter durch die heute nicht mehr zu bestreitende Tatsache, daß auch unter den nicht hämolytischen Streptokokken sich zweifellos pathogene Stämme finden.

Schottmüller⁶⁾ zählt bereits die Erkrankungen auf, bei denen sich der Streptococcus „mitior“ als Erreger findet; weitere Angaben darüber finden sich bei Schultze,⁷⁾ Heim,⁸⁾ Fränkel,⁹⁾ Henkel,¹⁰⁾ Lüdke und Polano.¹¹⁾ Die Hallenser Klinik hat selbst Fälle erlebt, in welchen an der ätiologischen Bedeutung des nicht hämolytischen Streptococcus für das vorhandene Wochenbettsfieber kein Zweifel bestehen konnte (Heynemann, Archiv für Gynäkologie, Bd. 86, S. 11.)

Es steht also fest, daß hämolytische Streptokokken als Saprophyten vorkommen und daß nicht hämolytische Streptokokken schwere und selbst tödliche (Schultz, Henkel) Infektionen hervorrufen können.

Neben der klinischen Bearbeitung der Frage habe ich mich auch der experimentellen Klarlegung zugewandt. Das Experiment ist hier imstande, über manche Frage Aufschluß zu geben.

A. Worin besteht die Erscheinung der Hämolyse? Wenn man gewöhnliche Streptokokken nicht zu dicht in Blutagar einsät, oder, besser, mit der Nadel auf Blutagar ausstreicht, so bildet sich — oft schon nach einigen Stunden — um die noch kaum sichtbare Kolonie ein heller Hof, in welchem die sonst undurchsichtige Blutplatte hell und durchsichtig geworden ist (vgl. Tafel IV bei Fromme, Archiv für Gynäkologie, Bd. 85).

Die Form des Hofes auf Agar ist derart, daß um eine runde Kultur ein kreisrunder Hof entsteht. Impft man auf dicke Blutagarschichten und macht man dann senkrechte Ausschnitte, so erkennt man, daß auch auf dem Querschnitt der Hof in einer gewissen Entfernung von der Kultur plötzlich aufhört. Der gleiche Hof tritt auch dann auf, wenn man unter Luftabschluß (überschichtet) züchtet.

Die äußere Umgrenzung des Hofes ist meist recht scharf, namentlich wenn das Blut nicht zu spärlich zugesetzt und mit dem Agar gut vermengt worden ist. Die Größe des Hofes beträgt etwa 2—3 mm im Radius; sie ist bei verschiedenen Stämmen nicht immer ganz gleich, variiert aber im ganzen nur wenig bei ausgesprochen hämolytischen Streptokokken. Daß der Hof nie wesentlich größer wird, auch wenn man längere Zeit abwartet, liegt daran, daß die Kulturen über ein gewisses Maß hinaus nicht mehr weiter wachsen und

daran, daß die hämolysierenden Stoffe (siehe unten) offenbar nicht unbegrenzt weit diffundieren können.

Mikroskopisch zeigt der Hof keine Blutkörperchenschatten mehr. Die Haufen von roten Blutkörperchen nehmen vom Rand des Hofes an sehr schnell an Zahl ab; nur in der Grenzschicht sieht man Haufen hellerer Blutkörperchen.

Die Aufhellung des Blutagars in der Umgebung der Kultur tritt am schnellsten und deutlichsten in Erscheinung, wenn man gewöhnlichem Glycerinagar 10% Blut zersetzt und die Schicht etwa 3—4 mm dick macht (10 cm in einer Petrischale).

Eine zu dicke Schicht läßt die Aufhellung schlechter resp. später erkennen, eine zu dünne verhindert bald das Streptokokkenwachstum infolge Eintrocknung der Masse im Brutschrank.

Setzt man dem Agar viel mehr Blut zu, so dauert es länger, bis der Hof hell wird, setzt man ihm viel weniger zu, so ist der Farbenkontrast zwischen gefärbter und entfärbter Schicht weniger deutlich.

Im übrigen muß betont werden, daß ein relativ großer Spielraum vorhanden ist und daß der Größe der Blutbeimengung bei weitem nicht die Bedeutung zukommt, die ihr Fromme beilegt.

Werden endlich die Platten zu dicht mit Streptokokken gesät, so werden die Höfe undeutlich dadurch, daß 1. die einzelnen Kolonien in ihrer Entwicklung behindert werden und 2. eine Säuerung des Agars sofort die Platte braun verfärbt.

Impft man die Streptokokken in Blutbouillon, so sieht man nach 24 Stunden den unteren Teil der Bouillon durchsichtig weinrot, während in Kontrollröhrchen (oder bei nicht hämolytischen Streptokokken) die Blutkörperchen in der Kuppe des Reagenzröhrchens als kleiner, schwarzer Bodensatz liegen und die Bouillon darüber völlig ungefärbt bleibt. Es ist aber bei dieser Bouillonkultur darauf zu achten, daß

1. die molekulare Konzentration der Bouillon der des Blutes nahezu gleich ist (was bei der üblichen Nährbouillon der Fall ist).

Ist die Bouillon zu verdünnt, so findet auch in ungeimpften Röhrchen Farbstoffaustritt statt; ist sie zu konzentriert, so unterbleibt¹⁾ derselbe auch in den geimpften Gläsern.

2. wird die Säuerung der Bouillon verhindert (z. B. durch Zusatz pulverisierter Kreide, Marmorstaub); sonst findet eine unter Umständen störende Braunfärbung statt (Methämoglobin).

Die Weinrotfärbung kommt dadurch zustande, daß das Hämoglobin unter der Streptokokkenentwicklung reduziert wird (Spektrum des reduzierten Hb.). [Röhrchen mit reinem Blut bleiben (unter Luftzutritt) so lange hellrot (blutrot), wie sie steril bleiben; sie nehmen sofort die eigentümliche kirschrote Färbung an, sobald Bakterienentwicklung stattfindet.]

B. Wodurch wird der helle Hof auf der Blutagarplatte hervorgerufen?

Wer die Erscheinung auf Blutagar zuerst sieht, muß den Eindruck gewinnen, daß die Streptokokken das Hämoglobin um die Kultur herum weggefressen hätten. Daß dieser Eindruck wirklich erweckt wird, zeigen die Bezeichnungen einzelner Autoren: „Resorptionshof“ u. dgl. Das ist aber nicht der Fall!

Ich habe auf Blutagarplatten Strich neben Strich Streptokokken geimpft, derart, daß der größte Teil der Platte aufgehellt wurde, und danach kolorimetrisch den Hämatingehalt des wieder verflüssigten Agars bestimmt. Es zeigte sich bei mehreren Analysen keine Differenz gegenüber Kontrollplatten, d. h. es war auf Hämatin bezogen kein Blutfarbstoff verbraucht worden. Ferner findet in Blutbouillon keine wesentliche Abnahme des Hämoglobins statt; hier läßt sich der Farbenvergleich unmittelbar mit dem Hämoglobin selbst ausführen. Die Farbintensität zeigt sich gegenüber Kontrollröhrchen auch unverändert, wenn man das Hämoglobin in Methämoglobin oder in Hämatin überführt. Am besten eignet sich zu diesen Ermittlungen Bouillon, die mit lackfarbenem Blut versetzt ist. Die Säuerung der Bouillon muß selbstverständlich verhindert werden.

Bei Verfeinerung der Untersuchungsmethode, nämlich wenn man der Bouillon nur Spuren von Hämoglobin zusetzt und die Streptokokken lange Zeit wachsen läßt, ergab sich, daß eine

1) Zentralblatt für Gynäkologie 1908, S. 1213 u. 1415. — 2) Zentralblatt für Gynäkologie 1909, S. 153. Archiv für Gynäkologie, Bd. 87, S. 469. Diese letztere Arbeit konnte nicht eingehend berücksichtigt werden. Die Ergebnisse und Schlußfolgerungen stimmen mit den meinigen weithin überein. — 3) Münchener medizinische Wochenschrift 1909, S. 311. — 4) Hegars Beiträge zur Geburtshilfe, Bd. 13, S. 364. — 5) trotz der Versicherung Frommes, daß sich seine Ansichten über die Wichtigkeit der Hämolyse . . . nicht geändert hätten (Münchener medizinische Wochenschrift 1909, S. 311). — 6) Münchener medizinische Wochenschrift 1903, S. 849 u. 909. — 7) Münchener medizinische Wochenschrift 1907, S. 1167. — 8) Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, No. 50, S. 139. — 9) Münchener medizinische Wochenschrift 1905, S. 548. — 10) Zeitschrift für Geburtshilfe Bd. 63, S. 93. — 11) Münchener medizinische Wochenschrift 1909, S. 9.

1) Die Hemmung der Hämolyse durch 2% NaCl-Zusatz hat bereits Kerner (Zentralblatt für Bakteriologie I. O. 38, 223) festgestellt.

minimale Verringerung des Hämoglobingehaltes in der Tat allmählich eintritt. Aber es handelt sich dabei nur um Spuren, die allein die „hämolytische Entfärbung“ nicht erklären können.

Ich dachte dann daran, der helle Hof könne wohl zustandekommen infolge einer Veränderung des Blutfarbstoffes nächst der Kultur, um so mehr als Bouillon in der Tat braun gefärbt wurde, bevor ich die Säuerung verhinderte.

Auch ergab die spektroskopische Untersuchung des Hofes, daß neben den Streifen des Oxyhämoglobins diejenigen des Methämoglobins resp. des sauren Hämatins vorhanden waren.

Ich stellte weiterhin fest, daß quer über die Kultur auf das Blutagar aufgelegtes blaues Lackmuspapier sich im Bereich des Hofes rötet. Da außerdem zwischen meinen hämolysierenden und nicht hämolysierenden Streptokokkenstämmen ein Unterschied sich darin zeigte, daß die ersteren auf blauem Lackmusagar einen schönen roten Hof bildeten, die letzteren meist nicht, so schien es das Nächstliegende zu sein, die Säureproduktion¹⁾ in direkte oder indirekte Beziehung zur Bildung des Entfärbungshofes zu bringen. Darin bestärkte mich noch die Tatsache, daß auf Blutplatten, die durch Zusatz von Kalinitrit oder Erwärmen auf 60° methämoglobinisiert waren, ein Entfärbungshof zwar eintrat, nicht aber auf Hämatinplatten.

Das hat sich aber nicht bestätigt. Erstens konnte ich auch auf solchem Blutagar, welcher durch Kreidezusatz an der Säuerung verhindert wurde, einen Aufhellungshof nachweisen. Zweitens fand ich im Laufe der Zeit eine Anzahl anderer Keime, die einen breiten Entfärbungshof auf Blutagar erzeugten, ohne im geringsten zu säuern, und andere die stark säuerten, ohne einen Aufhellungshof zu bilden. (Natürlich hat dieser letzte Beweis nur eine bedingte Gültigkeit.) Schließlich fand ich einen nicht hämolytischen Streptokokkenstamm, welcher trotzdem erheblich Säure bildete.

Bald stellte sich heraus, daß das Suchen nach einem Umsetzungsvorgang im Bereich des Hofes trotz des fehlenden (resp. minimalen) Hämoglobinschwundes garnicht nötig ist und daß der Farbstoffaustritt aus den roten Blutkörperchen die Bildung des hellen Hofes in erster Linie veranlaßt, ein Vorgang, der — wie die Blutbouillonkultur zeigt — von der Säurebildung vollständig unabhängig ist. Das ließ sich durch folgende Versuche feststellen:

1. Auf Agar, dem lackfarbenes Blut zugesetzt wird, entsteht keine Spur eines Entfärbungshofes (sofern wirklich alle roten Blutkörper aufgelöst waren).

2. Pulvert man eine stark hämolytische Substanz, z. B. Saponin auf Blutagar, so entsteht sehr bald im Umkreis dieser Substanz ein schöner Entfärbungshof, völlig gleich dem der Streptokokken. Dieser Saponinhof bleibt auf lackfarbenem Blutagar ebenfalls aus.

Die Aufhellung entsteht: 1. dadurch, daß Blutfarbstoff aus dem betroffenen Bezirk austritt und sich durch Diffusion im umgebenden Agar verteilt; 2. dadurch daß die Durchsichtigkeit des mit lackfarbenem Blut durchsetzten Agars eine große ist, während sie bei Vermischung des Agars mit deckfarbenem Blut völlig ermangelt.

Die Diffusion des ausgetretenen Hämoglobins in das Agar läßt sich sehr schön dadurch nachweisen, daß man über das Blutagar eine Schicht von gewöhnlichem Agar gießt. Die letztere färbt sich über der Streptokokkenkultur allmählich rot.

Neufeld und Händel unterscheiden zwei Arten von Hämolyse: die eine (z. B. durch Saponin) besteht nur in einem Farbstoffaustritt aus den roten Blutkörpern, die andere in einer völligen Auflösung derselben (z. B. durch gallensaure Salze). Nach meinen Untersuchungen lösen die Streptokokken die roten Blutkörper ebenfalls völlig auf, man erkennt nur in der Randzone des Blutagarhofes noch Blutkörperchenschatten. Boxer³⁾ will aber sowohl auf Agar wie in Bouillon stets noch Schatten gesehen haben.

(Schluß folgt.)

1) Natvig (Archiv für Gynäkologie Bd. 76, S. 808) beschuldigt die Säureproduktion in der Tat für die Hämolyse in Bouillon.

2) Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt Bd. 28, S. 572. — 3) Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 1905.