[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin
(Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky; Abt.-Vorsteher: Prof. Dr. Lentz)
und der gynäkol. Abteilung des Rud. Virchow-Krankenhauses zu Berlin.]
(Prof. Dr. Koblanek.)

Über Streptokokken-Hämolyse.

Von

Dr. E. Sachs,

Assistenten der gynäkologischen Abteilung.

Meine Versuche, die zum Teil im Laboratorium der gynäkologischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses, zum Teil im Kgl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin mit dem Material angestellt wurden, das sich mir auf der septischen Wochenstation des Rudolf Virchow-Krankenhauses bot, bezweckten in erster Linie einige von Natvig¹ aufgeworfene Fragen zu beantworten, und zwar besonders die Frage nach dem Zusammenhang der Hämolyse und der Säurebildung der Streptokokken. Zu diesem Zweck wurde die Abhängigkeit der Hämolyse und der Säurebildung von dem Kulturmedium untersucht, und beides miteinander verglichen. Weitere allgemeine Untersuchungen über Hämolyse der Streptokokken schlossen sich an. Während dieser Arbeit hatte ich reichlich Gelegenheit, Erfahrungen über die Konstanz der Hämolyse auf Blutplatten und in Bouillon zu sammeln.

Die Literatur über Säurebildung der Streptokokken ist ziemlich umfangreich. Ich folge den Ausführungen Friedbergers,² die, ohne vollständig zu sein, sich auf Säure- und Alkalibildung der pathogenen Mikroorganismen im allgemeinen beziehen.

¹ Bakteriologische Verhältnisse in weiblichen Genitalsekreten. *Archiv für Gynäkologie*. 1905. Bd. LXXVI.

² Kolle-Wassermann. *Handbuch*. Bd. I. S. 509.

Am häufigsten wurde zur Titration Lackmuspapier oder Rosolsäure benutzt. Phenolphthalein soll zur Titration von Nährlösungen ungeeignet sein. Zuerst bestimmte Buchner¹ durch Zusatz von Lackmuslösung zur Zuckerpeptonfleischextraktlösung die Säure- bzw. Alkalibildung (bei Cholera-bazillen).

Behring² benutzte feste, mit Lackmus gefärbte Nährböden (bei Milzbrand). Petruschky³ führte dann die Lackmusmolke dazu ein.

Kaufmann⁴ gelang der qualitative Nachweis der Säure- bzw. Alkalibildung durch Züchtung in Jequirityinfus, dessen schwach gelbe Farbe durch Alkalibildner grün gefärbt wird, während Säurebildner sie entfärben.

Im Beijerrinkschen⁵ Kreidenährboden lösen säurebildende Arten die zugesetzten Karbonate, und um die Kolonien der säurebildenden Bakterien entstehen durchsichtige Felder.

Quantitative Untersuchungen stellte Sommaruga⁶ an. In Nährmedien, deren Alkaleszenz genau bestimmt war, wurde mit Hilfe von Normalschwefelsäure und unter Verwendung wäßriger Rosolsäure als Indikator die Titeränderung bei Anwesenheit von säure- bzw. alkalibildenden Bakterien festgestellt.

Nach Gotschlich⁷ beruht im allgemeinen die Säurebildung auf einer Spaltung von Zucker (oder ähnlichen Substanzen: Glycerin usw.), während die Alkalibildung ein synthetischer Vorgang ist, und mit Wachstum und Vermehrung der Bakterien in innigem ursächlichen Zusammenhang steht.

Wenn demnach die Säurebildung auch nur bei Gegenwart von säureabspaltenden Substanzen in den Nährmedien statthat, so ist die Menge der abgespaltenen Säure in der Kultur doch eine nicht unbedeutend schwankende, und da auch im lebenden Körper die Gelegenheit zur Säurebildung gegeben ist, so lohnt es sich, der Frage in dem Zusammenhang, den Natvig konstruiert, nachzugehen.

Säurebildung der Streptokokken speziell studierten Hajek z. B. durch Zusatz von Lackmustinktur zum Nährmedium. (Zitiert nach Natvig⁸.) v. Lingelsheim titrierte Bouillonkulturen mittels Rosolsäure.⁹ Nach ihm produzieren alle Streptokokken Säure. Die Menge schwankt bei den

¹ *Archiv für Hygiene.* Bd. III. S. 418.

² *Diese Zeitschrift.* Bd. VII. S. 177.

³ *Centralblatt für Bakteriologie.* Bd. VI. S. 657.

⁴ *Ebenda.* Bd. X. S. 65.

⁵ *Ebenda.* Bd. IX. S. 781.

⁶ *Diese Zeitschrift.* Bd. XII. S. 290.

⁷ *Kolle-Wassermann. Handbuch.* Bd. I. S. 100.

⁸ *A. a. O.* S. 755.

⁹ *Diese Zeitschrift.* Bd. X. S. 348.

Stämmen von verschiedener Herkunft (auch bei Longusstämmen) in ziemlich weiten Grenzen. Die durchschnittliche Säureproduktion in der gewöhnlichen Nährbouillon (von 10^{cem} normal NaOH auf 1 Liter) betrug 10 bis 20^{cem} Normalsäure pro Liter. Zuckerzusatz vermag die Säuremenge auf das Mehrfache emporzutreiben.¹ Vergleiche mit älteren Kulturen ergaben keine nennenswerten Abweichungen. Beziehungen zur Virulenz haben sich nicht ergeben. In stark alkalischen Nährböden mit 2 Prozent Peptonzusatz entsprach die Säureproduktion 20^{cem} Normalsäure pro Liter.²

v. Lingelsheim konstatierte, daß die Säureproduktion der Wachstumsenergie ziemlich parallel ging.²⁻³

Pasquale verwandte Rosolsäure zur Aciditätsbestimmung in 6 Tage alten Kulturen.⁴

Auch Mme. Sieber-Schoumoff⁵ hat die von den Streptokokken gebildete Säure quantitativ bestimmt.

Dann hat Natvig selbst umfangreiche Titrierungen an 21 Stämmen vorgenommen, davon: 18 fakultativ anaeroben und 3 obligat anaeroben.

Er bestimmte die Säurebildung in gewöhnlicher neutraler Bouillon, und in neutraler 1½ prozentiger Traubenzuckerbouillon, nach 24stündigem Wachstum der Kulturen bei 37°.

Seine Versuchsanordnung gab ihm Aufschluß über:

- a) den stufenweisen Verlauf der Säurebildung,
- b) den Zeitpunkt des Eintritts des Säuremaximums, und
- c) die Lebensfähigkeiten der Bakterien in der durchsäuerten Bouillon.

Seine Resultate sind folgendermaßen zusammenzufassen:

1. Die Säureproduktion beginnt sehr früh und der Säuregrad erreicht sein Maximum schon nach ein paar Tagen. Später verändert sich derselbe nicht mehr.

2. In Traubenzuckerbouillon sterben die Bakterien 24 Stunden bis 3 Tage, nachdem der Säuregrad sein Maximum erreicht hat; gelegentlich später, wenn nämlich das Wachstum und die Säureproduktion der Bakterien langsamer vor sich geht.

¹ v. Lingelsheim in Kolle-Wassermanns *Handbuch*. Bd. III. S. 315.

² *Diese Zeitschrift*. Bd. XII. S. 314.

³ v. Lingelsheim, Ätiologie und Therapie der Streptokokkeninfektionen. Behrings *Beiträge*. 1899. Bd. I. S. 12.

⁴ *Beiträge zur pathol. Anatomie*. 1893. Bd. XII. S. 465.

⁵ Recherches sur les Strept. *Path. Arch. des sciences biol. méd. exp.* Petersburg 1892. S. 202. — Zit. nach Natvig.

3. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die gebildete Säure eine wesentliche Ursache für den Tod der Bakterien ist. In einer neutralen Bouillon ohne Zuckerzusatz, in der die Säurebildung geringer ist, lebten die Bakterien 2 bis 6 Wochen. Sie werden also in Traubenzuckerbouillon im wesentlichen von ihrer eigenen Säure getötet.

4. Sind die Bakterien abgestorben, so erfolgt keine Säurebildung mehr. Diese scheint somit stets an den Stoffwechsel lebender Bakterien gebunden zu sein.

5. In neutraler 1½ prozentiger Traubenzuckerbouillon ist die Menge der erzeugten Säure für die verschiedenen Stämme sehr verschieden, und ändert sich im Laufe der Zeit recht erheblich. In gewöhnlicher neutraler Bouillon dagegen variiert die Säureproduktion der verschiedenen Stämme nur innerhalb engerer Grenzen.

6. Die gebildete Säure in Kubikzentimetern Normalsäure pro Liter ausgedrückt, schwankt in Traubenzuckerbouillon von 5.5 bis 36.0^{cem} pro Liter. In gewöhnlicher Neutralbouillon von 1.5 bis 17.0^{cem}. Es stimmt dies mit den Ergebnissen von Pasquale und von v. Lingelsheim überein.

In alkalischer Bouillon fand Pasquale eine Säurebildung zwischen 3.25 bis 16.32^{cem} pro Liter. v. Lingelsheim 10 bis 20^{cem} pro Liter.

Natvig zeigte dann weiter den Einfluß der ursprünglichen Alkaleszenz der Bouillon auf die Säurebildung. Seine Stämme bildeten in alkalischer Bouillon weniger Säure als in neutraler.

Ehe ich zur Schilderung meiner eigenen Untersuchungen übergehe, möchte ich folgendes vorausschicken:

Über die Herkunft meiner Stämme ist anzuführen, daß die meisten von mehr oder weniger schweren Wochenbettsfieberfällen stammten, und zwar aus dem Blut oder aus dem Lochialsekret, nur einige apathogene stammten von anderen Orten.

1. Stamm Schl. (Herkunftsort: Tonsillarabstrich nach Scharlach.) (*Streptococcus brevis non haemolyticus*.)

2. Stamm L. (Aus dem Uterus einer später an puerperaler Sepsis gestorbenen Kranken.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)

3. Stamm W. (Von der Vulva einer Patientin, die an puerperaler Parametritis gelitten hatte.) (*Streptococcus brevis non haemolyticus*.)

4. Stamm E. (Aus dem Uterus bei einer sehr schweren puerperalen Thrombophlebitis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)

5. Stamm Kind E. (Von der gesunden Conjunctiva des Kindes der vorigen Patientin.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
6. Stamm St. (Aus dem Blut bei einer tödlich verlaufenen puerperalen Sepsis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
7. Stamm Au. (Aus dem Uterus bei einer schweren puerperalen Sepsis, die nach Uterusexstirpation geheilt wurde.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
- 8. Stamm Z. (Aus dem Blut bei einer tödlich endenden puerperalen Thrombophlebitis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
9. Stamm B. (Aus dem Eiter bei einer puerperalen septischen Peritonitis, die zum Tode führte.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
10. Stamm W. (Aus Eiter aus dem Parametrium 8 Wochen nach der Entbindung.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
11. Stamm K. (Aus dem Eiter aus dem Parametrium $\frac{3}{4}$ Jahr nach der Entbindung, die von schwerer Sepsis gefolgt war.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
12. Stamm Z. (Aus dem Blut bei einer tödlichen puerperalen Sepsis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
13. Stamm Bö. (Aus dem Peritonealeiter bei einer tödlichen puerperalen Sepsis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
14. Stamm A. (Aus dem Blute bei einer tödlichen puerperalen Sepsis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
15. Stamm Fe. (Aus der Scheide einer an schwerer puerperaler Parametritis Erkrankten.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
16. Stamm He. (Aus der Scheide einer an mäßig schwerer puerperaler Parametritis Erkrankten.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
17. Stamm Rō. (Aus dem Peritonealeiter bei einer schweren puerperalen Sepsis.) (*Streptococcus longus haemolyticus*.)
18. Speichelstreptococcus aus dem Munde eines Gesunden. (*Streptococcus brevis non haemolyticus*.)
19. Stamm Ew. (Aus der Vagina einer leichtkranken Wöchnerin.) (*Streptococcus brevis non haemolyticus*.)

Ausführlicher über diese Fälle habe ich in einer klinischen Arbeit¹ berichtet. Wenn auch meine Untersuchungen die Beobachtung bestätigten, daß die Virulenz eines hämolytischen Stammes in vivo und in vitro nicht etwas sich stets Gleichbleibendes ist, so zwingen mich doch meine klinischen Untersuchungen dazu, anzunehmen, daß jedenfalls ein Unterschied zwischen den hämolytischen und den nicht hämolytischen Stämmen be-

¹ Bakteriologische Untersuchungen beim Kindbettfieber. *Zeitschr. f. Geb. u. Gyn.* Bd. LXV. 1.

steht, derart, daß die ersteren sehr oft zu schwerer Erkrankung führen, also mit hoher Pathogenität begabt sein können, während es nur selten vorkommt, und anscheinend nur unter besonders begünstigenden Umständen, daß ein nicht hämolytischer Streptokokkenstamm als Erreger einer schweren Erkrankung anzusehen ist.

Zu meinen Untersuchungen verwandte ich folgende Bouillonarten:

1. Die gewöhnliche leicht alkalische Bouillon vom Titer 10 bis 12^{ccm} normal NaOH auf 1 Liter über dem Lackmusneutralpunkt.
2. Marmorstaubbouillon vom Titer 15.
3. Stark alkalische Bouillon vom Titer 20 bis 22.
4. 1prozentige Traubenzuckerbouillon vom Titer 10.
5. Bouillon mit Zusatz von 0.1prozentiger Milchsäure, vom Titer 8.

Zur Herstellung der Marmorstaubbouillon wurde der Marmorstaub mehrmals unter Sedimentieren gewaschen, dann im Trockenschrank 1 Stunde bei 130° sterilisiert. Darauf wurde er messerspitzenweise der Bouillon zugesetzt und mit dieser wie gewöhnlich 3 mal je 1/2 Stunde im Dampftopf sterilisiert.

Der Marmorstaub dient als Mittel die von den Bakterien gebildete Säure zu binden. Da er spezifisch sehr schwer ist, so sinkt er schnell zu Boden; es kommt daher bei der Verwendung der Marmorstaubbouillon doch nicht zu einer vollkommenen Absättigung der von den Bakterien gebildeten Säure durch das am Boden des Reagensglases liegende Ca_2CO_3 , sondern ein Teil der bakteriellen Säure wird von der Soda der Bouillon in Beschlag genommen. Wahrscheinlich sprechen hier Wachstumsverhältnisse mit: Die bald zu Boden, also in den Marmorstaub sinkenden Streptokokken scheiden ihre Säure so nahe dem Ca_2CO_3 aus, daß hier eine Absättigung durch den Marmorstaub sehr leicht stattfinden kann. Vollständig ist indes auch hierbei die Absättigung nicht, wie meine Aciditätsbestimmungen deutlich erwiesen haben; jedenfalls aber gelingt es durch die Verwendung des Marmorstaubes eine mit säurebildenden Bakterien beschickte Bouillon lange ungefähr auf dem ursprünglichen Alkaleszenzgrade zu erhalten.

Als festen Nährboden für die hämolytischen Versuche benutzte ich Blutagarplatten, die bei der Blutimpfung steril geblieben waren. Diese Platten waren meistens mit 2 1/2^{ccm} Blut zu 8 bis 10 Agar vermisch.

Als Blut für die Bouillonhämolyse und für meine Blutplatten habe ich, abgesehen von den Fällen, wo die Verwendung von Kaninchenblut im Versuch begründet war, nur Menschenblutkörperchen genommen, die von defibriniertem, mehrere Male gewaschenem Blute stammten und mir

teils aus Placentarblut, teils aus meinen klinisch-bakteriologischen Blutuntersuchungen stets reichlich zur Verfügung standen.

Die gewaschenen roten Blutkörperchen halten sich einige Tage auf Eis, doch ist es ratsam, nicht länger als 3 Tage alte Blutkörperchen zu benutzen, um nicht durch etwaige Autolyse falsche Resultate zu bekommen.

Blutplatten halten sich, wenn beim Gießen keinerlei Fehler untergelaufen sind (z. B. zu heißer Agar, nicht absolut trockene Petrischalen usw.), sicher 8 Tage im dunklen Eisschrank.

Um Natvigs Behauptung nachzuprüfen, daß die Hämolyse möglicherweise nur eine Funktion der von den Bakterien gebildeten Säure sei, konnten verschiedene Wege eingeschlagen werden.

I. Die Beobachtung der Hämolyse:

- a) In Kulturmedien verschiedener Alkaleszenz (stark alkalisch, schwach alkalisch, milchsäurehaltig), und Vergleich der Stärke der Säurebildung in ihnen.
- b) Unter Bedingungen, unter denen die Bakterien sicher reichlich Säure bilden (Traubenzuckerbouillon),
und unter Bedingungen, unter denen fast jede Spur der gebildeten Säure sofort gebunden wird (Marmorstaubbouillon).

II. Beobachtung der Hämolysekurve:

- a) Da die Durchsäuerung der Bouillon stetig bis zu einem gewissen Grade zunimmt, müßte der Säurekurve auch eine ansteigende Hämolysekurve entsprechen, wenn z. B. die Gesamtmenge der gebildeten Säure das Ausschlaggebende ist.
- b) Und ebenso dürfte eine Abstumpfung der gebildeten Säure durch NaOH nicht verfehlen, auf diese sogenannte „Hämolysekurve“ einzuwirken, falls diese abhängig von der Quantität der gebildeten Säure ist.

III. Der Vergleich der Säure- und der Hämolysekurven hämolytischer und nicht hämolytischer Stämme:

Es war ein Unterschied bei der Säurebildung hämolytischer oder nicht hämolytischer Stämme zu erwarten, und umgekehrt bei gleicher oder ähnlich starker Säurebildung eine annähernd gleiche oder doch ähnliche Hämolysekurve.

IV. Der Vergleich der Säurekurve und Hämolysekurven mehrere Monate alter Stämme.

Verwandt wurden zu diesen Untersuchungen nacheinander die oben-erwähnten Stämme.

Die Versuche wurden natürlich nicht zu gleicher Zeit angestellt, und auch nicht alle mit allen Stämmen, sondern es wurden möglichst nur frisch aus dem Körper gezüchtete Stämme verwandt, soweit es nicht, wie zur Entscheidung der letzten Frage, besonders auf alte Stämme ankam.

Außerdem stellte ich Untersuchungen an, die die Hämolyse im Filtrat und im Extrakt betrafen, sowie Nachprüfungen einiger allgemeiner Angaben über Streptokokkenhämolyse, besonders der Angaben einiger Autoren, die das Vorhandensein eines Streptotoxins nach Analogie zum Staphylo-toxin beweisen wollten.

Bei den Aciditätsprüfungen versuchte ich zuerst mit 100^{ccm} Bouillon haltigen Erlenmeyerkolben zu arbeiten. Dies hat verschiedene Nachteile. Das tägliche Öffnen der Kölbchen, die mehrfache Entnahme von Untersuchungsmaterial aus ihnen läßt sich nicht tagelang so absolut sicher steril vornehmen, daß nicht in dem einen oder dem anderen Kölbchen eine Verunreinigung zustande käme, die dann natürlich die ganze Versuchsreihe störte. Dann aber schien mir, die Aciditätskurve betreffend, eine Fehlerquelle darin zu liegen, daß ich täglich mit verschiedenen Mengen Kulturmedium arbeiten mußte, und es schien mir wahrscheinlich, daß bei gleich reichlichem Wachstum eines Stammes in zwei ungleich großen Medien, bei gleicher Säurebildung, der Alkalitätsgrad der geringeren Menge stärker durch die Säurebildung beeinflußt werden müßte, als der der größeren Menge. Um dies auszuschließen, beimpfte ich bei jedem Versuch zur Bestimmung der Aciditätskurve und des Verlaufes der Hämolyse je 10 bis 12 Röhrchen von gleichem Gehalt an Nährbouillon, die mit den verschiedenen Kulturbouillons gefüllt waren, und hatte so den Vorteil (abgesehen von der Verdunstung), täglich genau gleiche Mengen verwenden zu können, die außerdem sicher Reinkulturen geblieben waren, bzw. bei etwaigen Verunreinigungen leicht ausgeschieden werden konnten, ohne den ganzen Versuch zu stören.

Als Nachteil dieser Methode ist vielleicht zu erwähnen, daß die Kulturen trotz möglichst gleichmäßiger Beimpfung nicht in allen Röhrchen gleich kräftig wuchsen, und so leichte Aciditätsschwankungen in den einzelnen Röhrchen, bzw. an den einzelnen Tagen vorkamen.

Es wurden also von jedem Stamme 10 bis 12 Röhrchen jeder verwendeten Bouillonart beimpft, und diese Kulturen dauernd für die Zeit des Versuches in den Thermostaten von 37° C gestellt. Zugleich kam eine Anzahl nicht beimpfter Röhrchen derselben Bouillon zur Kontrolle in den Brutschrank. Täglich wurde ein Röhrchen und ein Kontrollröhrchen herausgenommen und verarbeitet.

Die Hämolyse in Bouillonkulturen wurde gewöhnlich derart bestimmt, daß zu je 2^{cem} der betreffenden Bouillon 2 Tropfen defibrinierten, gewaschenen Menschenblutes hinzugesetzt wurden; das Gemisch kam für 2 Stunden in den Thermostaten (37° C) und dann 20 bis 22 Stunden auf Eis.

Zu quantitativ hämolytischen Vergleichen (bei Vergleich mehrerer Stämme oder eines Stammes in verschiedenen Kulturmedien), erwies es sich als vorteilhaft, zu fallenden Mengen der gut durchgeschüttelten Bouillonkultur, die mit ClNa auf 1^{cem} aufgefüllt waren, 1^{cem} 5 prozentiger Erythrozytenaufschwemmung hinzuzufügen.

Die Bezeichnung der Ergebnisse geschah nach dem Neisser-Wechsberg'schen¹ Schema, so daß

c = komplett,	f. c. = fast komplett,	inc. = inkomplett,
g. r. = ganz rot,	K. = Kuppe,	Sp. = Spur,
	ø = Null.	

unterschieden wurden.

Die Verdünnung des Bakteriengemisches erwies sich vorteilhafter, als die Änderung des Blutzusatzes, wodurch eine quantitative Abschätzung ja auch möglich gewesen wäre. Weniger als 1^{cem} 5 prozentiger Blutkörperchenaufschwemmung macht selbst bei kompletter Lösung nur schwache Rotfärbung von im ganzen 2^{cem} Flüssigkeit. Die Herstellung höherer als 5 prozentiger Lösungen hätte bedingt, stets mehrere solcher Lösungen vorrätig zu haben, was zum mindesten unbequem gewesen wäre.

Betreffs der Verarbeitung der Marmorstaubbouillon ist folgendes zu vermerken:

Zu Titrationen wurde die klare, über dem Marmorstaub stehende Bouillon benutzt, da bei Gegenwart ungelösten Ca₂CO₃ die Titration möglicherweise falsche Werte ergeben hätte. Für die Versuche, die ich zur Lösung der die Hämolyse betreffenden Fragen anstellte, mußte indes die Bouillon benutzt werden, die noch reichlich Ca₂CO₃ im Überschuß enthielt.

Zur Frage IIb ist folgendes zu bemerken: meine Untersuchungen gingen von der Vorstellung aus, daß sich ähnlich wie bei den Staphylokokken, auch bei den Streptokokken eine täglich ansteigende Hämolysekurve nachweisen ließe, die dann natürlich durch Neutralisation der täglich gebildeten Säure bis zum ursprünglichen Titer der Bouillon sich ändern müßte, wenn hierbei wirklich reichliche Säurebildung von Wichtigkeit war. Die Hämolyse in derart durch NaOH auf ihren ursprünglichen Titer gebrachter Bouillon, in der also alle von den Bakterien gebildete

¹ Diese Zeitschrift. Bd. XXXVI.

Säure neutralisiert war, nenne ich der Kürze halber „Neutralhämolyse“. Zur Titration der gebildeten Säure und zur Abstumpfung benutzte ich $\frac{1}{100}$ normal NaOH und $\frac{1}{100}$ normal HCl, die beide genau aufeinander eingestellt waren.

Auf Tabelle I habe ich in einem Vorversuch ermittelt, welche Menge NaOH bzw. HCl zugesetzt werden können, ohne daß diese schon allein zur Hämolyse führen.

Tabelle I.

Nr.		2 Stunden bei 37°	2 Stunden auf Eis
1	2 ^{cem} Bouillon + 1·0 ^{cem} $\frac{1}{10}$ normal HCl + 2 Tr. Menschenblut	f. c.	f. c.
2	„ + 0·5 „ + „	g. r.	gr. K.
3	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø
4	„ + 0·05 „ + „	Ø	Ø
5	2 ^{cem} Bouillon + 2·0 ^{cem} $\frac{1}{20}$ normal HCl + 2 Tr. Menschenblut	f. c.	f. c.
6	„ + 1·0 „ + „	gr. K.	gr. K.
7	„ + 0·5 „ + „	Sp.	Ø
8	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø
9	2 ^{cem} Bouillon + 2·0 ^{cem} $\frac{1}{100}$ normal HCl + 2 Tr. Menschenblut	Ø	Ø
10	„ + 1·0 „ + „	Ø	Ø
11	„ + 0·5 „ + „	Ø	Ø
12	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø
13	2 ^{cem} Bouillon + 1·0 ^{cem} $\frac{1}{10}$ normal NaOH + 2 Tr. Menschenblut	gr. K.	gr. K.
14	„ + 0·5 „ + „	Ø	Ø
15	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø
16	„ + 0·05 „ + „	Ø	Ø
17	2 ^{cem} Bouillon + 2·0 ^{cem} $\frac{1}{20}$ normal NaOH + 2 Tr. Menschenblut	f. c.	f. c.
18	„ + 1·0 „ + „	Spur	Spur
19	„ + 0·5 „ + „	Ø	Ø
20	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø
21	2 ^{cem} Bouillon + 2·0 ^{cem} $\frac{1}{100}$ normal NaOH + 2 Tr. Menschenblut	Spur	Ø
22	„ + 1·0 „ + „	Ø	Ø
23	„ + 0·5 „ + „	Ø	Ø
24	„ + 0·1 „ + „	Ø	Ø

Wir sehen aus dieser Tabelle, daß bei Verwendung von $\frac{1}{100}$ normal NaOH selbst der Zusatz von 2^{cem} kaum Hämolyse macht, während HCl schon in schwächeren Verdünnungen, nämlich 1^{cem} $\frac{1}{20}$ normal HCl Blut löst.

Zur Titration benutzte ich Lackmuspapier, und zwar in der Form des Duplittestpapiere von Dietrich-Helffenberg, ein Papier, das sehr fein reagiert. Wer sich darauf eingearbeitet hat, bekommt gute, brauchbare Resultate. Zur Titration wurde mit der Platinöse ein Tröpfchen auf den violetten Streifen des Papiere aufgetüpfelt, bis dieser gerade eine Spur Farbveränderung zu zeigen begann.

Es gehört allerdings zu der Methode Übung und sehr gute Beleuchtung. Ich verwandte auch hier $\frac{1}{100}$ Normallösungen und titrierte gewöhnlich $2 \times$ je 1 ^{cem} der gut durchgeschüttelten Bouillonkultur.

Beim Filtrieren waren viele Fehlerquellen auszuschalten:

1. Das Filter war bisweilen nicht bakteriendicht; — mehrere Male konnten aus dem Filtrat Streptokokken gezüchtet werden. Ob unsichtbare Risse im Filter oder nicht sorgfältige Herstellung daran Schuld waren, mag dahingestellt bleiben, jedenfalls hatte ich in diesen Filtraten dann den Keimen entsprechende Hämolyse. Die Kontrolle auf Filterdichtigkeit ist also bei jedem derartigen hämolytischen Versuch durch Einsaat des Filtrates in Nährböden unerlässlich; und zwar muß man, da es sich stets nur um wenig Keime handelt, größere Mengen Filtrat benutzen.

2. Nach dem Sterilisieren enthielten die Filter stets Verbrennungsprodukte, daher mußten sie vor dem Filtrieren der Kulturen erst mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült werden. Hierbei konnte im Filter oder in dem Glase ClNa-Lösung in Spuren zurückbleiben, was natürlich die Acidität in Richtung einer Verdünnung der Kultur, also Abnahme der Acidität bzw. der Alkaleszenz der Filtrate beeinflussen mußte. Ich half mir damit, daß ich für 1 Chamberland- oder 1 Reichelkerze 2 Filterflaschen benutzte, die erste zum Auswaschen der Kerze gebrauchte, die ausgewaschene Kerze noch vor weiterem Gebrauch $\frac{1}{4}$ Stunde trocken absaugte und dann zum Filtrieren der Kultur die zweite, ganz trockene Flasche verwandte. Die trotzdem ziemlich regelmäßig in stark alkalisch und stark säurehaltigen Filtraten beobachtete Titerverminderung im Gegensatz zur dazugehörigen Kultur findet ihre Erklärung dadurch, daß kolloidale Alkali- bzw. Säure-Eiweißverbindungen in den Bakterienkulturen entstehen, die nicht vollständig durch das Filter hindurchgehen.

Ich benutzte je nach der Menge der Kultur Reichelkerzen, Porzellanfilter oder Liliputfilterkerzen (Infusorienerde). An einer Beeinflussung der Alkaleszenz durch Säuren, die im Filtermaterial vorhanden sind (Kieselsäure), liegt die Titerverminderung nicht, da bei nicht beimpfter Bouillon die Differenzen nicht vorhanden sind, wie Kontrollproben ergaben.

Bei der Beurteilung der Plattenhämolyse schloß ich mich ganz Schottmüller an und nannte Hämolyse die glashelle Aufhellung im Umkreis von etwa 1 bis 2 ^{mm} um die fast stets kleinbleibende, nie konfluierende Kolonie herum. Auf stärker bluthaltigen Platten (3 ^{cem}:8 ^{cem} z. B.) wird die Aufhellung überhaupt nicht glashell, sondern mattgelb, ein Zeichen, daß es sich hier um quantitative Unterschiede handelt, da

ja der hämolytische Effekt gleich dem Quotienten aus der Stärke der Hämolyse und der Zahl der aufzulösenden roten Blutkörperchen ist.

Daneben gibt es sicher noch Streptokokken, die, auch auf schwach bluthaltiger Platte sehr viel schwächer hämolysieren, als die von mir zu meinen Versuchen verwandten.

Ich fand solche Streptokokken in mehreren günstig verlaufenen Erkrankungsfällen zu einer Zeit, als meine Versuche zum Abschluß gelangt waren, und aus äußeren Gründen nicht fortgesetzt werden konnten.

Bei der stets gleichartigen Zusammensetzung der Nährmaterialien kann die Regelmäßigkeit und Gleichartigkeit des Wachstums meiner Stämme, trotz der großen Zahl der Überimpfungen nicht wundernehmen. Von meinen hämolysierenden, stets langkettigen Stämmen wurde die Bouillon nie getrübt, und zwar weder die alkalische, noch die nach mehreren Tagen der Beimpfung stets saure, mit Milchsäure versetzte, Bouillon. Dagegen wuchsen die avirulenten, nicht hämolysierenden, kurz-kettigen Stämme stets mit diffuser Trübung der Bouillon. Diese avirulenten Stämme bildeten in allen Bouillonarten stets nur kurze Ketten. Die oft ausgesprochene Behauptung, daß besonders lange Ketten als Einleitung einer Involution aufzufassen seien,¹ konnte ich bei meinen langkettigen Stämmen bestätigen.

Die kurz-kettigen Formen blieben selbst nach monatelangem Fortzüchten kurz-kettig, während die langkettigen Stämme, in alten Kulturen allerdings, bis zu 100 gliedrigen Ketten mit reichlichen Involutionsformen auswuchsen.

Ein konstantes Verhalten des Bodensatzes der Streptokokken, worauf z. B. Kurth² seine Einteilung gründete, konnte ich nicht beobachten, die Beschaffenheit des Bodensatzes schwankte bisweilen bei demselben Stamm.

Am längsten übertragungsfähig hielten sich die Streptokokken im Gelatinestich, wo sie allerdings äußerst langsam wuchsen, und im Agar-Schrägröhrchen, das zugeschmolzen im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufgehoben wurde. Hierin hielten sie sich teilweise über 2 Monate lang übertragbar, und dann stets in gleicher Weise hämolytisch, wie zu Beginn der Versuche, während meine nicht hämolytischen Stämme auch nach Monaten nicht hämolysierten. Einzelne Stämme wurden bis zu 6 Monaten beobachtet. Tierpassagen wurden nicht eingeschaltet.

In den Bouillons waren die Streptokokken weniger gut haltbar; noch am besten in der Marmorstaubbouillon; ganz gut auch in stark alkali-

¹ v. Lingelsheim in Kolle-Wassermanns *Handbuch*. Bd. III. S. 307.

² *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt*. Bd. VII.

scher, etwas schlechter in gewöhnlicher Bouillon. In Traubenzuckerbouillon wuchsen sie zwar sehr üppig, verloren aber bald ihre Übertragungsfähigkeit. Serum beförderte das Wachstum sehr. Am wenigsten günstig für die Haltbarkeit der Stämme ist milchsäurehaltige Bouillon, wenn die Kokken auch hierin am ersten Tage ganz gut wachsen.

Diese Erfahrungen stehen in striktem Gegensatz zu denen Turros,¹ der saure Nährböden sowohl für die Reinzüchtung, als auch für die weitere Kultivierung der Streptokokken empfiehlt; sie decken sich aber teilweise mit den Erfahrungen anderer Forscher, besonders Natwigs, der feststellte, daß die Streptokokken in ihrer eigenen Säure zugrunde gehen. Daß es aber nicht durchaus die eigene Säure zu sein braucht, wie z. B. beim Wachstum in Traubenzuckernährböden, zeigen die Beobachtungen bei der Züchtung in milchsäurehaltiger Bouillon, wo die Säureproduktion geringer ist, als in der Traubenzuckerbouillon, wo aber trotzdem die Lebensfähigkeit der Streptokokken nur eine äußerst beschränkte ist. Auf die Schädlichkeit der von den Streptokokken aus ihrem Nährmedium gebildeten Säure für ihre Fortpflanzung haben schon v. Lingelsheim u. a. hingewiesen.

In festen Nährböden bilden beide Streptokokkenarten nur selten Ketten von mehr als 4—6—8 Gliedern, oft liegen sie in Haufen zusammen, so daß aus dem mikroskopischen Verhalten der auf Agar gewachsenen Kulturen nicht immer eine sichere Diagnose auf Streptokokken oder Staphylokokken zu stellen ist; hier muß daher oft die Bouillonkultur zu Hilfe genommen werden.

Auch das makroskopische Aussehen der Streptokokkenkolonien auf der Blutagarplatte kann sich, besonders in älteren Kulturen, stark von der gewöhnlichen Form der stecknadelspitzengroßen Kolonien unterscheiden. So fand ich sichere, in Bouillon ohne Trübung wachsende, langkettige Streptokokken, die neben den gewöhnlichen kleinen doppelt so große Kolonien auf derselben Platte bildeten. Die großen und die kleinen Kolonien stammten aus dem Blut einer später an Pyämie zugrunde gegangenen Patientin, und verhielten sich auf den verschiedensten Nährmedien ganz identisch, speziell wuchs der große Keim, frisch auf Blutagar verbracht, klein wie ein gewöhnlicher Streptococcus. Genauereres darüber habe ich a. a. O. mitgeteilt.²

Virulenzprüfungen an Tieren habe ich ganz unterlassen, da Tier- und Menschenpathogenität durchaus nicht parallel gehen. Hierauf haben

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XVII. S. 865.

² *Zeitschr. f. Geb. u. Gyn.* Bd. LXV.

schon Koch und Petruschky¹ hingewiesen, die z. B. zeigten, daß maximal Kaninchen virulente Streptokokken nicht imstande waren, beim Menschen Erysipel zu machen, ferner Knorr² und Petruschky,³ die zeigten, daß Streptokokken, deren Virulenz für Mäuse sehr gesteigert war, in ihrer Virulenz für Kaninchen gelitten hatten und umgekehrt.

Meine eigenen Erfahrungen bestätigen dies, indem es mir trotz zahlreicher, teils mit Bouillonkulturen, teils mit Abschwemmungen von Agar-kulturen in Kochsalzlösung angestellter Versuche mit für den Menschen hochpathogenen Stämmen, nie gelang, Kaninchen ohne besondere Kunstgriffe (z. B. Erkältung) subkutan oder intravenös zu infizieren. Das mag Zufall gewesen sein, zeigt aber, wie wenig Wert Virulenzbestimmungen an Tieren für die Beurteilung menschenpathogener Streptokokken haben.

Ich wende mich nun meinen eigenen Untersuchungen zu.

Natvig unterscheidet bei seinen Stämmen zweierlei betreffs der Hämolyse in Bouillon. Seine sämtlichen 17 Stämme hämolysierten in neutraler Bouillon, während 12 von ihnen in alkalischer Bouillon nicht hämolysierten. Natvig erklärt dies damit, daß die in den alkalischen Bouillonkulturen gebildete Säure gleich vom Alkali gebunden wurde, und somit die Säurewirkung ausblieb. Hieraus schließt er, daß die Hämolyse in neutraler Bouillon im wesentlichen wenigstens ein Resultat der Säureproduktion und der daraus folgenden Reaktionsveränderung in den Kulturmedien ist.

Ich habe, um dies nachzuprüfen, meine Stämme 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 in Bouillons von verschiedenster Alkaleszenz untersucht, und habe bei den hämolysierenden Stämmen in allen Nährmedien Hämolyse gefunden, die in allen ziemlich gleichmäßig schon in 24 stündigen Kulturen nachweisbar war, während die Möglichkeit des Nachweises allerdings in Abhängigkeit vom Kulturmedium zeitlich sehr schwankte. Die nicht hämolysierenden Stämme 1 und 3 hämolysierten weder in alkalischer noch in fast neutraler, mit Milchsäure versetzter Bouillon. (S. Tabelle II.)

Diese Tabelle zeigt einmal, wie verschieden die Säurebildung eines und desselben Stammes in den verschiedenen Nährmedien ist:

In der leicht alkalischen Bouillon wurde gebildet:

15 (die Erhöhung des Titors nach Verdunstung)	—	2 = 13 ^{cem} Normalsäure pro Liter,
in der stark alkalischen.	21 — 7 = 14	„ „ „ „
in 1proz. Traubenzuckerbouillon	11 + 16 = 27	„ „ „ „
in Milchsäurebouillon	5 + 8 = 13	„ „ „ „

¹ Diese Zeitschrift. Bd. XXIII.

² Ebenda. Bd. XIII. ³ Ebenda. Bd. XVII.

Tabelle II.

Stamm 6.

Datum	Versuchstag	Leicht alkalische Bouillon, Titer: 13				Marmorstaub-Bouillon Titer: 15				Stark alkalische Bouillon, Titer: 20				1 Proz. Traubenzucker-Bouillon, Titer: 10				Milchsäurehaltige Bouillon 0.1 Prozent, Titer: 2			
		Kontrolle		A.	H.	Kontrolle		A.	H.	Kontrolle		A.	H.	Kontrolle		A.	H.	Kontrolle		A.	H.
		A.	H.			A.	H.			A.	H.			A.	H.			A.	H.		
3/8		13	—	—	—	15	—	20	—	—	—	10	—	2	—	—	—	—	—	—	—
4/8	1.	13	—	11	+	15	—	20	—	18	+	10	—	3	—	—	—	—	—	—	—
5/8	2.	13	—	8	+	15	—	20	—	9	+	11	—	5	—	—	—	—	—	—	—
6/8	3.	14	—	4	+	15	—	20	—	8	+	11	—	5	—	—	—	—	—	—	—
7/8	4.	14	—	2	+	16	—	21	—	8	+	10	—	6	—	—	—	—	—	—	—
8/8	5.	15	—	2	+	16	—	21	—	7	+	11	—	6	—	—	—	—	—	—	—
9/8	7.	15	—	2	—	16	—	21	—	8	+	12	—	6	—	—	—	—	—	—	—
10/8	9.	15	—	3	—	16	—	21	—	8	—	12	—	6	—	—	—	—	—	—	—
11/8	11.	15	—	3	—	17	—	21	—	8	—	12	—	6	—	—	—	—	—	—	—
12/8	12.	—	—	—	—	17	—	21	—	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die mit $\frac{1}{100}$ normal Salzsäure für 1^{cem} ermittelten Werte sind auf 1 Liter Kultur und normal Salzsäure umgerechnet.
A. = Alkaleszenz. Kein Zeichen vor der Zahl bedeutet alkalisch. Ein - Zeichen davor, bedeutet sauer.
H. = Hämolyse.
Kontrolle = ein unbeimpftes Röhrchen, [dessen Alkaleszenz infolge der Verdunstung schwankt].

Wir sehen weiter aus dieser Tabelle u. a., daß das Auftreten der Hämolyse in allen Medien gleich schnell vor sich geht, und zwar schon nach 24 Stunden, also viel früher, als bei Staphylokokkenkulturen, bei denen in der Bouillon gewöhnlich erst am 7. Tage oder noch später Hämolyse nachweisbar ist. Die Möglichkeit des Hämolysinnachweises schwindet nun in der milchsäurehaltigen Bouillon schon nach 2 Tagen, in Traubenzuckerbouillon nach 4 Tagen; in der gewöhnlichen, leicht alkalischen Bouillon gelingt der Nachweis bis zum 5., in stark alkalischer bis zum 7. Tage, in marmorstaubhaltiger Bouillon sogar bis zum 9. Tage.

Die Möglichkeit des Hämolysinnachweises wechselt zeitlich bei den einzelnen Stämmen in hohem Maße. Die angeführte Tabelle ist natürlich nur für den einen Stamm gültig, ich habe andere Stämme untersucht, bei denen die Hämolyse in Traubenzuckerbouillon bis zum 5., in leicht alkalischer bis zum 7., in stark alkalischer bis zum 9. und in Marmorstaubbouillon bis zum 12. Tage nachweisbar war.

Ich führe diese Tabellen nicht an, weil sie nichts neues bringen und ich bei diesen Stämmen teilweise keine gleichlaufende Aciditätsbestimmung vorgenommen habe.

Bei meinen Stämmen 1 und 3 fand ich in keinem Medium auch nur eine leiseste Andeutung von Hämolyse, obwohl auch hier die Versuche ebenso ausgedehnt durchgeführt wurden, wie bei den hämolysierenden Stämmen. Besonders das Ausbleiben der Hämolyse in milchsäurehaltiger Bouillon steht in gewissem Gegensatz zu Natvigs Annahmen. Ich verzichte darauf, die Tabelle, die ich bei der Prüfung dieses Stammes erhielt, hier mitzuteilen. Der Aciditätsverlauf unterscheidet sich fast in nichts von dem auf Tabelle II mitgeteilten Aciditätsverlauf des hämolytischen Stammes.

In Tabelle II sind zugleich Säurebestimmungen der Stämme vermerkt. Hierbei zeigt sich nun eine der Hämolyse beinahe zeitlich gleich andauernde Säurebildung insofern, als sich eine Zunahme in der Acidität, also Säureproduktion, fast ebenso lange nachweisen ließ, wie die Hämolyse.¹ Dies könnte so aufgefaßt werden, daß wirklich die Hämolyse der Streptokokken nichts weiter wäre, als eine Säurewirkung, doch ist dem nicht so. Beides sind Vorgänge, Lebensäußerungen der sich vermehrenden Bakterien, die nebeneinander hergehen, ohne daß eins die Bedingung des anderen ist. Dies ergibt sich aus dem Vergleich der Hämolyse, speziell in Marmorstaub-

¹ Daß der Nachweis nicht ganz so lange gelingt, liegt daran, daß bei der Prüfung auf Hämolyse infolge des Zusatzes frischer Blutkörperchen, den Streptokokken neues Nährmaterial geboten wird, während das Wachstum — nicht die Vermehrungsfähigkeit — in der Bouillon ohne Zusatz von Blutkörperchen früher aufhört.

und Milchsäurebouillonkulturen. In Marmorstaubbouillon wird die gebildete Säure fast gänzlich von Ca_2CO_3 gebunden.¹ Die Säure hat jedenfalls sicher viel weniger, wenn überhaupt Gelegenheit, auf die roten Blutkörperchen einzuwirken. Nichtsdestoweniger zeigt der Vergleich der beiden Kurven in Tabelle III, daß der Vorgang der Hämolyse genau ebenso schnell und in gleich starkem Maße in der fast säurefreien Marmorstaubbouillon, wie in der milchsäurehaltigen einsetzt, nur die Dauer des Vorganges ist eine verschiedene.

Zur Erklärung der Tabellen III bis III d ist folgendes zu bemerken:

Da meine Stämme nach 24 Stunden alle, wenn überhaupt, so gleich fast komplett hämolysierten, so suchte ich zur weiteren Differenzierung der Stärke der Hämolyse eine noch weiter ins Einzelne gehende quantitative Hämolysekurve zu gewinnen, als es das Schema von Neisser-Wechsberg erlaubt.

Ich hatte dazu zwei Wege:

Einmal: mehr Zusatz von roten Blutkörperchen, z. B. statt 1^{cem} 5 prozentiger, 1^{cem} 10 prozentiger Lösung; dann war zu erwarten, daß die stärker hämolysierenden Stämme auch hier leichter eine komplette Lösung (c. L.) zustande bringen würden, als schwächer hämolysierende, die es bei Zusatz von 1^{cem} 5 prozentiger Blutkörperchenlösung gerade noch zu einer c. L. bringen. Aber diese Methode hat den Nachteil, daß es dann in der stark rot gefärbten Lösung zu Vergleichen des Rückstandes kam — bei 2^{cem} Gesamtmenge ist ja schon bei Gegenwart von 1^{cem} 5 prozentiger Blutkörperchen-Auflösung das ganze Gemenge bei kompletter Lösung tiefrot.

Um hierbei möglichen Täuschungen zu entgehen, beschritt ich den anderen Weg, und habe nach guter Durchschüttelung der Bouillon mit fallenden Mengen Kultur gearbeitet. 1.0, — 0.5, — 0.1, und 0.05, die mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1^{cem} aufgefüllt wurden. Ich erhielt dabei Tabellen, von denen ich einige anführe. (Tabelle III a bis III d.)

Der Vergleich dieser vier Tabellen zeigt, wie ungleich stark die einzelnen Stämme hämolysieren. Zugleich weisen diese Kurven noch auf etwas anderes hin. Wie aus meinen weiteren Untersuchungen hervorgehen

¹ Nicht ganz vollständig; wir sehen eine Abnahme der Alkaleszenz um 2 Promille normal NaOH; d. h. die von den Streptokokken gebildete Säure wird z. T. von dem freien Alkali der Bouillon selbst gebunden, zum größten Teil allerdings vom zugesetzten Ca_2CO_3 . Das mag z. T. von äußeren Umständen abhängen, wie Schütteln, wodurch das schwere Ca_2CO_3 aufgewirbelt wird und mit den in der Bouillon wachsenden Bakterien in direkten Kontakt kommt. Zum Teil mag es auch davon abhängen, ob die Bakterien sich bald zu Boden senken oder suspendiert bleiben.

wird, läuft die Hämolyse ziemlich genau parallel der Zahl der Keime, die sich vermehrt haben. Die Abstufung des hämolytischen Effektes bei Verwendung abgestufter Kulturmengen läßt sich hierdurch sehr gut erklären, ebenso wie kleine Schwankungen an einzelnen Tagen (z. B. Tabelle IIIb

Tabelle III.

Quantitativ häm. Kurve in Marmorstaubbouillon (mit überschüssigem Marmorstaub) und in Milchsäurebouillon.

Stamm 7.

Je 12 Röhren Marmorstaubbouillon und milchsäurehaltige Bouillon wurden beimpft und in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Täglich wurde davon aus 1 Röhren zu fallenden Mengen, die mit Kochsalzlösung auf 1^{ccm} aufgefüllt waren, 1^{ccm} 5 prozentige Menschenblutkörperchen-Aufschwemmung hinzugesetzt. Dies kam 2 Stunden bei 37° C in den Brutschrank, dann etwa 20 Stunden auf Eis.

8. Tag, Tabelle IIIc 6. Tag) sich gut so erklären lassen, daß an diesem Tag in der Ausgangskultur weniger Keime gewachsen waren, also auch weniger Keime bei der Übertragung zum hämolytischen Versuch verwandt wurden.

Tabelle IIIa.
Quantitativ häm. Kurve in gewöhnlicher Bouillon. Stamm 10.

Stamm 10. Körperalter Stamm, d. h. nach 8 Wochen dauerndem hohen Fieber infolge einer Parametritis.

Die Tabellen IIIa bis d zeigen außerdem, daß das Alter der Stämme für die Hämolysen auch bei genauest quantitativer Bestimmung ziemlich irrelevant ist. Es gibt alte Stämme, deren Kurve genau so aussieht wie die eines frisch aus dem Körper gezüchteten Stammes; das spricht dagegen, daß im Altern die Hämolysenbildung sich ändert, wogegen die Säurebildung alter Stämme nach Natvigs Angaben zunimmt.¹

¹ A. a. O. S. 765.

Aus den Tabellen III bis III d geht ferner hervor, daß die Hämolysinsbildung nicht, täglich zunimmt, sondern, daß sie sich vom 1. Tage an etwa gleich bleibt, und erst dann, wenn die Vermehrungsfähigkeit aufhört (s. u.), allmählich abnimmt. Auch dieses spricht gegen einen unmittelbaren Einfluß der Säurebildung auf die Hämolyse der Streptokokken,

Tabelle IIIb.
Quantitativ hämol. Kurve in gewöhnlicher Bouillon.

Stamm 12.

Stamm 12. Körperfrischer Stamm. 2 Wochen in Kultur gezüchtet.
Schwere Sepsis, 4 Tage nach der Entbindung aus dem Blut gezüchtet.

da ja, infolge der eine Zeitlang dauernd neugebildeten Säure, die Durchsäuerung der Bouillon täglich ansteigt, wenigstens solange ein Wachstum in der ursprünglichen Bouillon ohne Blutkörperchenzusatz statthat.

Aus dem Vergleich der Tabellen IIIa bis d geht aber noch einiges andere hervor, was mir für die Frage des Verhältnisses der Hämolyse zur Virulenz von Bedeutung zu sein scheint.

Diejenigen Stämme, die hämolysierten, haben auch nach monatelanger Fortzüchtung in künstlichem Nährboden und nach monatelangem Aufbewahren ohne Fortzüchtung ihr Hämolysierungsvermögen nicht verloren. Tabelle IIIa bis d geben hierüber Auskunft. Ich hatte geglaubt, daß vielleicht die quantitative Hämolyssekurve der Virulenz parallel liefe,

Tabelle IIIc.
Quantitativ hämol. Kurve in gewöhnlicher Bouillon.

Stamm 2.

Stamm 11. Ganz alter Stamm, d. h. nach 4 Monate langer Fortzüchtung in künstlichen Nährmedien.

weil, wie Tabelle IIIa zeigt, dieser seit $\frac{3}{4}$ Jahren im Körper befindliche Stamm, der zur Zeit der Gewinnung eine klinisch ganz leichte Parametritis verursacht hatte, während er vordem zu einer schwer septischen Allgemeininfektion geführt hatte, verhältnismäßig sehr schwach hämolysierte. (Daß es sich bei der Patientin um denselben Stamm handelte, werde ich allerdings nie beweisen können.) Aber die weiter

fortgesetzte Untersuchung (Tabelle IIIc z. B.) zeigte bald, daß kein konstantes Verhältnis zwischen Hämolyse und Alter (d. h. in diesem Fall = Virulenzverlust) besteht; ich nahm als natürlich an, daß derartig monatelang in künstlichen Nährböden ohne Tierpassage gezüchtete Stämme an Virulenz verloren haben müßten.

Tabelle III d.
Quantitativ hämol. Kurve in gewöhnlicher Bouillon. Stamm 8.

Stamm 13. Ganz frischer Stamm, d. h. direkt aus dem Körper gezüchtet.

Aber ich habe junge, frisch aus dem Körper gezüchtete Stämme untersucht, die selbst in zusagender Bouillon nur einige Tage hämolysierten, und ältere Laboratoriumsstämme, die sich umgekehrt verhielten, wie auch bei Stämmen, die gleich beim akuten Beginn einer Erkrankung gezüchtet sind, sich betreffs der Stärke der Hämolyse kein konstanter Unterschied gegenüber den Stämmen nachweisen ließ, die nach langdauernder Erkrankung (6 bis 8 Wochen und mehr — bis $\frac{3}{4}$ Jahr) aus dem Körper

gewonnen wurden. Aus dieser Überlegung folgt nun mit großer Wahrscheinlichkeit, daß Hämolysinbildung und Virulenz nicht in festem Verhältnis zueinander stehen. Wir können höchstens daraus, daß die hämolysierenden Stämme im Gegensatz zu den nicht hämolysierenden alle von schweren Krankheitsprozessen stammen, den Schluß ziehen, daß die Hämolyse der Streptokokken ausnahmslos die Eigenschaft von Stämmen ist, die unter günstigen Bedingungen sehr virulent sein können.

Daß Hämolyse und Virulenz nicht stets parallel gehen, ist schon aus der einfachen Überlegung zu folgern, daß Streptokokken, die Menschenblut zu hämolysieren imstande sind, ausnahmslos Kaninchen- und Hammelblut auflösen, während doch die Virulenz für Kaninchen durchaus kein Maßstab für die Virulenz dem Menschen gegenüber ist, und umgekehrt.

Interessant war es, die Frage nach dem Wachstum und der Hämolysinbildung von Streptokokken zu verfolgen, je nachdem sie oberflächlich auf eine Blutplatte aufgestrichen wurden oder mit dem Blutagar vermischt wuchsen. Hier ist vor allem der Vergleich mit hämolytischen Staphylokokken wichtig.

Benutzt wurden zu diesem Versuche:

Stamm 18 Speichelstreptococcus, ein nicht hämolysierender Stamm von der Vulva (3), vier virulente Stämme (4, 7, 9, 13) und zum Vergleich ein Staphylococcus aureus-Stamm.

Tabelle IV.

Lf. Nr.	Nr.	Stamm	Traubenzucker-Blut-Agar					
			oberflächlich beimpft			Mischplatte		
			+	—		+	—	
1		Staphyloc. aureus	einige	meist	etwa gleich viel + u. —	+	—	+
2	18	Speichel-Streptococcus	alle	—	—	—	—	—
3	3	Nicht hämol. Streptococcus	alle	—	—	—	—	—
4	4	Virulenter Streptococcus	alle	+	+	+	+	+
5	7	desgl.	alle	+	+	+	+	+
6	9	desgl.	alle	+	+	+	+	+
7	13	desgl.	alle	+	+	+	+	+
Nach Stunden:			24	48	72	24	48	72

Tabelle IV. (Fortsetzung.)

Lf. Nr.	Nr.	Stamm	Gewöhnlicher, leicht alkalischer Blut-Agar							
			oberflächlich beimpft				Mischplatte			
			+	-	etwa gleich	+	-	+	-	+
			einige	meist	viel + u.	meist	wenig	wenig	meist	einige
										reichlich
										viel
1		Staphyloc. aureus								
2	18	Speichel-Streptococcus	alle	—	—	—	—	—	—	—
3	3	Nicht hämol. Streptococcus	alle	—	—	—	—	—	—	—
4	4	Virulenter Streptococcus	alle	+	+	+	+	+	+	+
5	7	desgl.	alle	+	+	+	+	+	+	+
6	9	desgl.	alle	+	+	+	+	+	+	+
7	13	desgl.	alle	+	+	+	+	+	+	+
Nach Stunden:			24	48	72	24	48	72		

Während also die Hämolyse der Staphylokokken, entsprechend den von Neisser-Wechsberg erwähnten Beobachtungen meistens erst am 2. Tag sich zu zeigen beginnt, während in der sogenannten Gußmischplatte (d. h. Zusatz der Bakterien zu dem flüssigen Blutagargemenge und Ausgießen in eine Petrischale) auch nach 72 Stunden sehr viele, besonders die tiefliegenden Keime ohne hämolytischen Hof wuchsen, zeigten Stamm 3 und der Speichelstamm niemals Hämolyse, die vier pathogenen Stämme dagegen wuchsen unabhängig davon, ob sie auf die Platte aufgetragen waren oder mit dem Blutagar vermischt waren, konstant gleich nach dem ersten Wachstum ausnahmslos alle deutlich hämolytisch.

Das Aussehen einer mit Staphylokokken beimpften Blutagarplatte ändert sich, was die Hämolyse betrifft, in den ersten Tagen regelmäßig so, daß man konstant stark, schwach und gar nicht hämolysierende Keime nebeneinander hat. Selbst auf den ältesten Platten sind stets einige nicht hämolysierende Keime neben den anderen vorhanden. Ein Urteil über den hämolytischen Charakter einer Staphylokokkenkultur kann man also meist erst nach 2 bis 3 mal 24 Stunden definitiv abgeben.

Demgegenüber wachsen Streptokokken sowohl in der Tiefe der Blutagarplatte wie im Aufstrich konstant gleichmäßig und zwar je nachdem mit oder ohne Hämolyse; diese Hämolyse nimmt zwar nach 24 Stunden noch etwas zu, tritt aber nie erst nach 24 Stunden in die Erscheinung.

Bei den Mischkulturen werden die hämolytischen Höfe bisweilen nicht so deutlich glashell, wie beim oberflächlichen Auftragen. Das findet seine einfache Erklärung darin, daß hier oft die Kolonien zu nahe aneinanderwuchsen und sich offenbar gegenseitig am Wachstum hinderten, eine Erfahrung, die ich bei Stamm 12 auch bei der Blutentnahme zur Untersuchung auf Streptokokkensepsis machen konnte. An 3 aufeinanderfolgenden Tagen ergab die Blutuntersuchung starke Zunahme der Keime in der gleichen Blutmenge.

Während aber nun auf der am 1. Tage angelegten Platte etwa 90 Kolonien gezählt wurden, die gut voneinander getrennt standen, sich nicht gegenseitig hinderten und von großen hellen Höfen umgeben waren, zeigte die Platte vom 2. Tage unzählbare Kolonien, die aber ebenfalls deutliche, wenn auch weniger helle Höfe hatten.

Am 3. Tage war die Platte so übersät, daß zwischen den einzelnen Kolonien kaum ein freier Platz war. Trotzdem konfluieren die Kolonien nicht, die hämolytischen Höfe waren zwar deutlich vorhanden, aber ganz matt.

Wundern darf uns dies Ergebnis nicht, denn die Hämolyse entspricht, wie unsere quantitativen Versuche zeigen werden, vollständig der Wachstumsintensität der Stämme, soweit eben ein Stamm überhaupt hämolysiert.

In Tabelle II habe ich unter Kolonne Pl. H. (= Plattenhämolyse) vermerkt, bis zu welchem Tage die Kulturen an den einzelnen Tagen auf frisches, reichliches Nährmaterial (Blutagar) verbracht, sich mit Erfolg verimpfen ließen und hierbei zugleich die Konstanz der Hämolyse untersucht.

Hieraus geht hervor, daß ein einmal hämolytischer Stamm, wenn er überhaupt übertragbar war, d. h. noch lebte, stets wieder hämolytisch wuchs. Daß das Hämolysierungsvermögen der Stämme in der ursprünglichen Bouillon nach Zusatz frischer Blutkörperchen-Aufschwemmung nicht ganz so lange anhält, wie die Fähigkeit zur Hämolyse auf der neuen Blutagarplatte, liegt daran, daß diese natürlich ein viel besserer Nährboden ist, als die verbrauchte Bouillon, selbst nach Blutzusatz. (Vgl. Anmerkung auf S. 478.)

Bevor die Streptokokken absterben, kommt ein Stadium der Latenz, in dem sie zwar noch leben und auf frischem, ihnen zusagendem Nährboden auch noch übertragbar sind, indem sich sonst aber keine Lebensfunktionen nachweisen läßt.

Der Parallelismus zwischen Vermehrungsintensität und Stärke der Hämolyse ist für das Verständnis mancher bekannten Tatsache wichtig, so z. B. für die Prüfung der Hämolyse in Traubenzuckerbouillon. Traubenzuckerzusatz soll die Hämolyse hindern, und in der Tat läßt sich in Trauben-

zuckerbouillon Hämolyse nur kürzere Zeit nachweisen, als in gewöhnlicher Bouillon ohne Traubenzuckerzusatz; dies hängt aber nur davon ab, daß die Streptokokken in Traubenzuckerbouillon früher absterben, daß also ihre Fähigkeit sich zu vermehren eine viel geringere und kürzer dauernde ist, als in gewöhnlicher Bouillon, und da die Hämolyse, was sich nicht ziffernmäßig zeigen läßt, durchaus eine Funktion des sich vermehrenden Streptokokkus ist, so kann es leicht vorkommen, daß die Traubenzuckerbouillonkultur nicht mehr hämolysiert, während die gewöhnliche Bouillonkultur noch eine komplette Hämolyse macht.¹

Der Traubenzucker ist aber nur für das Wachstum bzw. das frühere Absterben der Streptokokken von Wichtigkeit, für die Hämolyse an sich ist er ganz irrelevant.

Wenn die Säurebildung wirklich nicht nur ein Parallelvorgang der Hämolysinbildung, sondern ein ursprüngliches Moment sein soll, dann mußte es glücken, durch Abstumpfung der gebildeten Säure bis zur ursprünglichen Acidität irgendwie auf die hämolytische Kurve einzuwirken, in dem Sinne, daß die Kurve in einer derartig täglich auf den ursprünglichen Titer gebrachten Bouillonkultur geringere Werte erreichen müßte, als in der sich selbst überlassenen Bouillon.

Bei den darauf gerichteten Untersuchungen gelang es mir nicht ein einziges Mal, einen Einfluß auf die Stärke oder Dauer der Hämolyse zu erlangen, so daß sich die Hämolysinbildung nie irgendwie von der gleichzeitig beobachteten Hämolysinbildung der Streptokokken ohne NaOH-Zusatz unterschied. (S. Tabelle V.)

Die auf Tabelle I durchgeführten Kontrollversuche zeigen, daß die verwendeten Quantitäten $\frac{1}{100}$ normal NaOH allein nicht imstande sind, irgend nennenswerte Hämolyse zu machen.

Daß die gebildete Säure als solche nicht maßgebend für das Hämolysierungsvermögen der einzelnen Stämme ist (auch nicht in statu nascenti), ergibt sich aus der Tatsache, daß die Säurebildung der nicht hämolysierenden Stämme (innerhalb der normalen Schwankungen der einzelnen Stämme) durchaus nicht geringer ist als die der hämolysierenden; man müßte denn gerade annehmen, daß die von beiden Streptokokkenarten gebildete Säure eine verschiedene sei, wie es ja wohl auch schon behauptet ist.

¹ Vgl. hierzu Schlesinger, Bemerkungen. *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XLIV. S. 430.

Tabelle V.

Zu diesem Versuch wurden von jedem der 5 Kulturmedien 10 Röhren mit je 10^{cem} Bouillon gefüllt, beimpft und in den Brutschrank bei 37° gestellt.

Am nächsten Tag und an den folgenden Tagen wurde mit je 1 Röhren jeder Abteilung folgendes ausgeführt:

1. Aciditätsbestimmung,
2. Untersuchung auf Hämolyse (2 Stunden 37°, 20 Stunden Eis),
3. Abstumpfung der bis zum Versuchstag gebildeten Säure durch entsprechende Mengen $\frac{\text{NaOH}}{100}$ und Zusatz von Blutkörperchen zur Prüfung der Hämolyse.

Nach	Gewöhnliche B.						Marmorstaub-B.						Stark alkal. B.						Traubenzucker-B.						Milchsäure-B.					
	gebildete Säure pro 1 ^{cem} auf 1/100 normal berechn.	Hämolyse	Zusatz von 100 normal NaOH auf 1 ^{cem}	Hämolyse	gebildete Säure 100, die nicht von Ca_2CO_3 gebunden wurde	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	Säure 100	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	Säure 100	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	Säure 100	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	Säure 100	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	Säure 100	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse	$\frac{\text{NaOH}}{100}$ -Zusatz	Hämolyse
1 Tag	0.4	+	0.4	+	0.2	+	0.8	+	0.8	+	0.8	+	0.8	+	0.8	+	0.8	+	1.8	+	1.8	+	1.8	+	0.7	+	0.7	+	0.7	+
2 Tagen	0.8	+	0.8	+	0.1	+	1.1	+	1.1	+	1.1	+	1.1	+	1.1	+	1.1	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
3 "	0.9	+	0.9	+	0.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
4 "	1.0	+	1.0	+	0.1	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
5 "	1.0	+	1.0	+	0.1	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
6 "	1.0	+	1.0	+	0	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	1.3	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
8 "	0.9 ¹	+	0.9	+	0	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+
10 "	0.9	+	0.9	+	0	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	1.2	+	2.6	+	2.6	+	2.6	+	1.0	+	1.0	+	1.0	+

¹ Die Abnahme der Säure ist wohl durch Verdunstung bedingt. Die Schwankungen an verschiedenen Tagen ist eine Folge des verschieden starken Wachstums in verschiedenen Röhren.

Aus den bisherigen Untersuchungen geht also hervor, daß die Hämolyse nicht einfach eine Säurefunktion ist, denn sie tritt auch ein, wenn fast alle Säure in statu nascendi abgesättigt wird (Marmorstaub), sie fehlt bei nicht hämolysierenden Stämmen, obwohl deren Säurebildung ebenso groß ist, wie die der hämolysierenden Stämme. Die Hämolysekurve verläuft ganz unabhängig von der täglich ansteigenden Säurekurve und die tägliche Neutralisierung der gebildeten Säure ist auf sie ohne Einfluß. Die ursprüngliche Acidität des Nährmediums hat für die Hämolysebildung nur insoweit Bedeutung, als das Wachstum der Streptokokken darin gefördert oder gehindert wird.

Soviel zur Beantwortung der oben gestellten Fragen über die Abhängigkeit der Hämolyse der Streptokokken von der Säurebildung. Ich will jetzt noch auf einige andere Fragen eingehen, die sich mir während der oben geschilderten Untersuchungen aufdrängten.

Einmal die Möglichkeit der Trennung des Hämolsins von Streptokokkenkörpern, bzw. der Nachweis des Hämolsins in der bakterienfreien Bouillon.

Zuerst versuchte ich die Trennung durch Filtrieren zu erreichen.

Hierzu habe ich mit einem Stamm fortgesetzt Untersuchungen über die Hämolyse im Filtrat angestellt, und hierbei die Erfahrung anderer teilen müssen, daß das gewöhnlich verwandte Filtermaterial nur mit Vorsicht zu gebrauchen ist. Die verschiedensten Male bekam ich mehr oder weniger starke Hämolyse in den Filtraten, aber stets konnte ich in diesen Filtraten Streptokokken (durch Abimpfung reichlicher Menge in Traubenzuckerbouillon) nachweisen, die durch das Filter hindurch gegangen waren. Ich kann also die Forderung nur eindringlichst wiederholen, bei derartigen Filtratuntersuchungen stets die Probe auf Sterilität des Filtrates anzuschließen. Ähnliche Erfahrungen scheint auch Aronson gemacht zu haben.¹

Der Einzige, dem es gelang, im Streptokokkenkulturfiltrat ein Hämolsin nachzuweisen, ist Besredka.² Ich habe etwa 10 verschiedene stark hämolytische Stämme darauf untersucht, aber stets ohne Erfolg. Besredka erwähnt, daß das Hämolsin, das er in derartigen Filtraten von Serumbouillonkulturen nachweisen konnte, sehr labil sei, und schon nach 30 Stunden bei Zimmertemperatur aus der Kultur verschwinde, da es möglicherweise durch Stoffwechselprodukte der Bakterien zerstört wird.

¹ *Berliner klin. Wochenschrift.* 1902. S. 972.

² *Annales de l'Institut Pasteur.* T. XV.

Ich habe deshalb 12, 16 und 20 stündige Kulturen und ihre Filtrate untersucht mit dem Erfolg, daß die Filtrate niemals hämolysierten, während die Kulturen nach 20 Stunden komplett, die jüngeren Kulturen ganz rot und inkomplett hämolysierten.

Tabelle VI.

Stamm 13.

12 Stunden		16 Stunden		20 Stunden		3 Tage alte Kultur	
Kultur	Filtrat	Kultur	Filtrat	Kultur	Filtrat	Kultur	Filtrat
g. r.	ø	inc.	ø	c.	ø	c.	ø

Da das gebildete Hämolysin möglicherweise durch das Filter zurückgehalten wurde, versuchte ich, auf andere Weise den Nachweis, und zwar durch Sedimentieren. Zu diesem Zwecke zentrifugierte ich 2 je 1 und 4 Tage alte stark hämolytische Bakterienkulturen auf einer elektrischen Zentrifuge $\frac{3}{4}$ Stunde lang (3000 Umdrehungen in der Minute). Die abgeheberte klare Flüssigkeit wurde nun untersucht, sie erwies sich als steril aber zugleich ohne die geringste Fähigkeit zu hämolysieren.

Tabelle VII.

Stamm 11.

Stamm 12.

Hämolysen der Kultur	Sedimentiert	Hämolysen der Kultur	Sedimentiert
c.	ø	c.	ø

Konnte ich somit niemals ein von den Streptokokken selbst abtrennbares Hämolysin nachweisen, so bestand immerhin die Möglichkeit, daß das Hämolysin im Körper der Streptokokken entstehend, erst beim Absterben frei wird. Von vornherein spricht dagegen, daß Hämolysen gerade in den frischesten Kulturen schon nachweisbar ist, während in alten Kulturen, die viel mehr absterbende Individuen besitzen, keine Hämolysen auftritt. Ich suchte der Lösung dieser Frage dadurch näher zu kommen, daß ich mir Kulturextrakte herstellte. Ich beimpfte hierzu 6 Bouillonkölbchen mit verschiedenen alten, gut hämolysierenden Streptokokken und schüttelte sie im Schüttelapparat 4 mal 24 Stunden. Diese Bakterienaufschwemmung, die mikroskopisch kaum noch Ketten von mehr als 2 bis 3 Gliedern enthielt, untersuchte ich nach meiner gewöhnlichen Methode auf Hämolysen und fand nach 2 Stunden im Brutschrank eine große Kuppe gelöst, während die Lösung nach 24 Stunden fast komplett war. Einen Teil der geschüttelten Bakterienaufschwemmung filtrierte und sedimentierte ich. Das Filtrat ergab keine Hämolysen, ebensowenig wie die durch langdauerndes Sedimentieren erhaltene bakterienfreie Bouillon.

Besredka ging nun bei seinen Versuchen, in denen er mit Sicherheit Hämolyse im Filtrat nachweisen konnte, davon aus, daß Streptokokkenstämme nur dann ein Hämolysin in die Kulturflüssigkeit abgeben, das dann im Filtrat nachweisbar ist, wenn die Bedingungen für das Wachstum besonders günstige sind, d. h. wenn die Verhältnisse in der Kultur denen im lebenden Kaninchenkörper möglichst genau entsprechen. (Er arbeitete nur mit Kaninchen.) Als Vorbedingung für das Auftreten der Hämolyse im Filtrat fand er die Verwendung eines Stammes, der das Blut des mit ihm infizierten Kaninchens lackfarben zu machen imstande war. In anderen Fällen erhielt er selbst bei sehr stark hämolysierenden tier-virulenten Stämmen keine Filtrathämolyse. Trotz sehr zahlreicher Allgemeininfektionen mit Streptokokken, bei denen ich reichlich die Bakterien aus dem Blute züchten konnte, war es mir nie gelungen, an der Leiche lackfarbenes Blut beim Menschen nachzuweisen. An vom Lebenden entnommenem Blut, das mit der von Wunschheimschen Methode¹ auf Hämolyse bzw. Nachhämolyse untersucht war, konnte ich nur in 2 Fällen Nachhämolyse nachweisen. In beiden Fällen waren im Blute Streptokokken frisch gewachsen und hatten dadurch die Hämolyse verursacht.

Obwohl also Besredkas Vorbedingung des Lackfarbigwerdens des Blutes im infizierten Organismus (Mensch) nicht erfüllt war, prüfte ich dennoch zwei menschenpathogene Stämme mit menschlichem Serum unter Benutzung der Versuchsanordnung Besredkas. Ich ließ also die frisch aus dem Menschen gezüchteten Stämme nach Zugabe einiger Tropfen defibrinierten Blutes in menschlichem Blutserum wachsen, wo sie sehr reichlich gediehen und gut hämolysierten, und filtrierte das Serum mit C1Na zu gleichen Teilen verdünnt durch Chamberlandfilter. Auch dieses Filtrat zeigte keine Hämolyse.

Besredkas Versuch ist von Kerner² u. a. nachgemacht worden. Ich hatte leider keine Gelegenheit dazu, da ich aus äußeren Gründen meine Versuche abbrechen mußte. Auch erwiesen sich meine hochvirulenten, teilweise aus dem Blut gezüchteten Streptokokkenstämme für Kaninchen weder bei subkutaner noch bei intravenöser Infektion pathogen. Besredka gibt an, daß seine direkt aus Kaninchenblut stammenden und in Kaninchenserum übertragenen Streptokokken nur in den ersten 16 bis 20 Stunden ein Hämolysin ausscheiden, das sich im Filtrat nachweisen läßt. Das ist, immerhin wunderbar, da die quantitative Hämolyse in diesen ersten 16 bis 20 Stunden durchaus nicht stärker ist als in den

¹ Aus dem hyg. Institut der k. k. Universität Innsbruck. 1905. Über Hämolyse im Reagensglas und im Tierkörper.

² Centralblatt für Bakteriologie. Bd. XXXVIII.

nächsten Tagen, wo der Hämolysinnachweis im Filtrat auch Besredka nicht mehr geglückt ist. Ebenso unerklärt scheint mir die Tatsache, daß derselbe hämolysierende Stamm ein im Filtrat nachweisbares Hämolysin liefern soll oder nicht, je nachdem er im Kaninchenleib das Blut lackfarben gemacht hat oder nicht, was nach Besredka in bestimmter Abhängigkeit davon stehen soll, ob das Kaninchen subkutan oder intravenös geimpft ist. Andererseits geht Besredka wie erwähnt davon aus, daß ein Hämolysin nur nachweisbar ist, wenn die Streptokokken unter den besten Bedingungen gezüchtet werden. Die intravenöse Impfung führt nun im allgemeinen schneller zum Tode als die subkutane. Jedenfalls sind die Wachstumsbedingungen nicht schlechtere als bei der Subkutanimpfung. — Das Lackfarbigwerden des strömenden Blutes scheint in gewisser Abhängigkeit von der Dauer der Infektion zustehen. — Die von Besredka hervorgehobene Tatsache, daß der durch intravenöse Impfung gezüchtete Stamm kein Hämolysin nachweisen läßt, ist daher bisher nicht erklärt. Bevor man mit Sicherheit annehmen darf, daß Streptokokken ein Hämotoxin in die Kultur abscheiden, wird es noch anderer Beweise bedürfen als des, nur für einen bestimmten Ausnahmefall positiven Besredkaschen Versuchs.

Ich glaube, daß es für die Frage der Hämolysinbildung der Streptokokken von großer Bedeutung ist, die Besredkaschen Versuche oder allgemeiner die Frage nachzuprüfen, ob das in Besredkas Ausnahmefall im Filtrat nachgewiesene Hämolysin identisch ist mit den Stoffen, die im allgemeinen die Auflösung der roten Blutkörperchen bei Anwesenheit von Streptokokken herbeiführen.

Neben den Versuchen Besredkas u. a., die seine Experimente z. T. mit Erfolg wiederholt haben (Kerner), suchte man das Vorhandensein eines Hämotoxins noch auf andern Wege zu erhärten.

Es sind von verschiedenen Autoren indirekte Beweise für das Vorhandensein eines Streptokokkentoxins erbracht worden. Besonders Kerner¹ und Schlesinger² haben in Anlehnung an die grundlegende Arbeit von Neisser-Wechsberg das Streptokokkenhämolysin (aus der Kultur) nach der von Neisser-Wechsberg für das Staphylolysin (Filtrat) angegebenen Methode untersucht, und dabei meist Resultate erhalten, die nach ihrer Meinung das Vorhandensein eines Hämotoxins aus seinen dem Staphylo-toxin entsprechenden Eigenschaften beweisen sollten.

Ich habe schon oben auf den Unterschied in der hämolysierenden Fähigkeit der Streptokokken und der Staphylokokken hingewiesen

¹ A. a. O. S. 623.

² Diese Zeitschrift. Bd. XLIV. S. 428.

(Tabelle IIIa bis d und Tabelle IV). Ich will auch von vornherein das Unzulässige in Schlesingers und Kerners Versuchen betonen, die die unfiltrierte Kultur (Streptokokken) mit dem Filtrat (Staphylokokken) vergleichen. Nichts destoweniger habe ich ihre Versuche nachgeprüft und meine Nachprüfungen haben zu interessanten Resultaten geführt.

Schlesinger wies zuerst nach, daß das Streptohämolysin eine haptophore und eine toxophore Gruppe haben müsse, deren erste in Analogie zum Staphylohämolysin schon bei 0° in Wirkung trete, während die toxophore Gruppe erst bei Bruttemperatur zu wirken imstande sei.

Sein dies beweisender Versuch ist folgender:

1. 5 ^{cem} 4 Tage alter Streptokokkenbouillonkultur + 1 Tr. Kaninchenblut.	Hämolysen
2 Std. Brutschrank,	} f. c.
18 „ auf Eis.	
2. 5 ^{cem} derselben Bouillonkultur + 1 Tr. Kaninchenblut.	} Spur.
2 Std. 0°.	
Rasch abzentrifugiert, mit kalter CNa-Lösung ausgewaschen, dann 5 ^{cem} Kochsalz dazu.	
3. 1 Std. 37°,	} f. c.
18 „ Eis.	

Diesen Versuch kann man jederzeit nachmachen und seine Richtigkeit feststellen. Aber die Erklärung ist nicht durchaus bindend.

Zum Beweis diene folgender Versuch, den ich angestellt habe:

1. 1 ^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 ^{cem} 5 prozentiges Kaninchenblut.	Hämolysen
2 Std. Brutschrank,	} c.
18 „ Eis.	
2. 5 ^{cem} derselben Kultur werden mehreremal mit CNa-Lösung ausgewaschen und von der bouillonfreien Streptokokkenaufschwemmung in CNa-Lösung	} g. r.
1 ^{cem} + 1 ^{cem} 5 prozentiger Kaninchen-Blutkörperchen-aufschwemmung	
2 Std. in Brutschrank gestellt,	
18 „ Eis.	

Dieser Versuch zeigt, daß Streptokokken in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, der 1 ^{cem} 5 prozentiger Kaninchenblutkörperchen-aufschwemmung (= 1 Tropfen unverdünnten Blutes) zugesetzt ist, imstande sind zu hämolysieren, wenn auch nicht so stark, wie in Bouillon. Schlesingers Versuch ist also zum mindesten nicht eindeutig, da sein Stamm 1 Stunde mit CNa-Lösung und Blut im Brutofen stand, also Gelegenheit zur Vermehrung hatte.

Daß diese Vermehrung der Streptokokken das allein Maßgebende ist, wird durch folgende Versuche bewiesen.

I.

1. Je 2 Röhrchen enthaltend 1^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur werden mit je 1 Tropfen¹ unverdünnten gewaschenen Kaninchenblut versetzt und kommen auf 2 Stunden in den Brutschrank bei 37°, dann eines davon 20 Stunden auf Eis.

2. Je 2 Röhrchen enthaltend 5^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur werden nach gutem Durchschütteln mit Kochsalzlösung ausgewaschen und auf 5^{cem} aufgefüllt. Davon kommen je 1^{cem} + 1 Tropfen unverdünnten gewaschenen Kaninchenblut 2 Stunden in den Brutschrank (37°), eines davon für 20 Stunden auf Eis.

In beiden Röhrchen zeigte sich Hämolyse, und zwar

Röhrchen 1: komplett,
" 2: ganz rot.

Zugleich mit einer 4 Tage alten, unbehandelten, gleichzeitig angelegten Bouillonkultur desselben Stammes werden nun die zweiten Röhrchen von 1. und 2. folgendermaßen weiter behandelt:

Je 1^{cem} wird mit je 99^{cem} steriler ClNa-Lösung verdünnt und 20 Minuten im Schüttelapparat geschüttelt. Hiervon wird wiederum 1^{cem} mit 99^{cem} ClNa-Lösung verdünnt und in gleicher Weise behandelt. Von der so erhaltenen 10 000 fachen Verdünnung werden Traubenzuckeragarplatten mit 1 und 3 Tropfen gegossen und die Keime ausgezählt.

(Tropfflasche: 13 Tropfen der Verdünnung = 1^{cem}.)

Es ergab sich:

Röhrchen 1: 18 980 000 Keime im Kubikzentimeter. (Hämolyse: c.)
" 2: 8 070 000 " " " (" : g. r.)

In dem unbehandelten Röhrchen 3: 550 000 Keime im Kubikzentimeter.

Die Keimvermehrung in Röhrchen 1 gegenüber der Zahl der Keime in dem unbehandelten Röhrchen 3 war ebenso wie die Hämolyse, eine weit stärkere als in Röhrchen 2.

II.

1. Ein Röhrchen, enthaltend 5^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 Tropfen unverdünnten gewaschenen Kaninchenblutkörperchen kommt 2 Stunden auf Eis. (Hämolyse: Ø.)

2. Ein Röhrchen, enthaltend 5^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 Tropfen unverdünnten gewaschenen Kaninchenblutkörperchen kommt 2 Stunden auf Eis, wird dann rasch abzentrifugiert, mit kalter Kochsalzlösung ausgewaschen und auf 5^{cem} aufgefüllt, davon kommt dann eins 1 Stunde in den Brutofen bei 37°. (Hämolyse: Kuppe.)

¹ Diese Form des Blutzusatzes mußte gewählt werden, um die Verdünnung der Kultur durch die hinzugesetzte Kochsalzlösung auszuschließen.

Wie in Versuch I wird nun von jedem dieser Röhrchen und von einer 4 Tage alten unbehandelten, gleichzeitig angelegten Bouillonkultur desselben Stammes je eine 10 000 fache Verdünnung im Schüttelapparat angelegt und davon mit je 1 und 3 Tropfen zur Zeit Traubenzuckeragarplatten gegossen.

Es ergab sich: 1: 976 000 Keime,
2: 7 020 000 " ,
und im unbehandelten Röhrchen 3: 699 400 " .

Also in Röhrchen 1: (Hämolyse: Ø) eine ganz geringe,
" " 2: (" : Kuppe) eine recht kräftige Keimzahl-
vermehrung im Vergleich zu der Vermehrung in dem unbehandelten Röhrchen.

Durch diesen Versuch ist meines Erachtens bewiesen, daß bei einer Temperatur von 0°, bei der keine nennenswerte Keimvermehrung stattfindet, auch keine Hämolyse eintritt.

Beides tritt aber bei Bruttemperatur kräftig in die Erscheinung, und zwar, wenn auch schwächer, auch in Kochsalzlösungsaufschwemmung, wenn man nur durch den Zusatz roter Blutkörperchen für Nährmaterial sorgt.

Schlesingers Versuch findet dadurch also eine viel einfachere Erklärung, als es die Übertragung der beim Staphylotoxin nachgewiesenen, einem Toxin spezifischen Eigenschaften ist, wie sie in der Annahme Schlesingers zum Ausdruck kommt.

Eine weitere Übereinstimmung mit Toxinen fanden Schlesinger und auch Kerner in der Hitzeunbeständigkeit des Hämolsins.

Kerner konstatierte, daß 30 Minuten bei 55° gehaltenes Streptohämolsin völlig vernichtet wird.

Schlesinger gibt zu dieser Frage folgende Tabelle:

3^{cem} Streptokokkenbouillon + 1 Tropfen Kaninchenblut.

	Kontrolle	1/2 Stunde 47—48°	1/2 Stunde 57°	1/4 Stunde 60°
Lösung:	gr. K.	Spur	Spur	Ø

Aber auch hiermit beweist er nicht zwingend das Vorhandensein eines thermolabilen Hämolsins. Der Versuch kann ebenso gut anders, ohne ein in die Kultur ausgeschiedenes „Hämolsin“ erklärt werden.

Ich stellte zur Nachprüfung folgenden Versuch an:

1. Je 2 Röhrchen, enthaltend 1^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 Tropfen Kaninchenblut, kommen 1 Stde. in den Brutofen bei 37°.
2. Je 2 Röhrchen, enthaltend 1^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 Tropfen Kaninchenblut, kommen 1 Stde. in den Brutofen bei 48°.
3. Je 2 Röhrchen, enthaltend 1^{cem} 4 Tage alter Bouillonkultur + 1 Tropfen Kaninchenblut, kommen 1/2 Stde. in den Brutofen bei 60 bis 61°.

Tabelle VIII.

Dieser Versuch ergab folgendes:

	Kontrolle	1 Stunde 37°	1 Stunde 48°	½ Stunde 60–61°
Lösung		c. L.	g. r.	Koagulation, Braunfärbung, Flüssig- keit darüber fast klar
10 000 fache Verdünnung auf Trauben- zuckeragar ausgegossen	227 500 Keime pro Kubik- zentimeter	16 995 000	5 330 000	162 500

Die ursprünglich vorhandenen 227 500 Keime vermehrten sich also
in 1 Stunde bei 37° auf 16 995 000,
" 1 " " 48° " 5 330 000,
nach ½ Stunde bei 60° waren dagegen nur noch 162 500 Keime vorhanden.
Bei 60° war also nur ein Teil der übertragenen Keime aufgegangen,
ein Teil war abgetötet, wenn es auch noch nicht zur völligen Sterilisierung
gekommen war, was im allgemeinen mit den in der Literatur niedergelegten
Erfahrungen übereinstimmt.

Jedenfalls geht aus dem Vergleich dieser beiden Versuche die Ab-
hängigkeit der Hämolyse von der Keimvermehrung wiederum deutlich
hervor. Nur wo frisches Wachstum, da trat Hämolyse ein, und die bei
60° in der Entwicklung gehemmten, ja auf 162 500 verminderten Keime
konnten noch keine Hämolyse hervorrufen.

In Analogie zu Beobachtungen an anderen bakteriellen Hämolysinen
untersuchte außerdem Kerner die Hämolysinproduktion in Kulturen,
denen Kochsalz in größeren Mengen zugesetzt war. Er fand bei Zusatz
von 2 prozentiger Kochsalzlösung stets eine beträchtliche Abschwächung
der Hämolyse. Er schreibt dazu: „Auf die Wachstumshemmung konnte
ich den Unterschied in der Stärke der Hämolyse nicht zurückführen, weil
die makroskopische und mikroskopische Untersuchung eine sehr deutliche
Vermehrung der Streptokokken ergab.“ Ich habe den Versuch nach-
geprüft, habe mich allerdings nicht mit der makroskopischen und mikro-
skopischen Beurteilung begnügt, sondern die Keime ausgezählt und fand:

Tabelle IX.

	Hämolyse nach 2 Stunden 37°	Keimzahl
in gewöhnlicher Bouillonkultur	f. c.	34 450 000
in 2prozent. ClNa-haltiger Bouillonkultur	inc.	27 267 500

also der etwas geringeren Keimzahl entsprechend auch eine etwas geringere
Hämolyse.

Die weitere Angabe Kerners, daß direkt aus dem Tierkörper stammende Streptokokken besonders stark hämolysierten, während nach einmaliger Überimpfung auf künstlichen Nährböden das hämolytische Vermögen bis zum ursprünglichen Grade der Stammkultur herabgesetzt wurde, um dann konstant zu bleiben, konnte ich leider nicht der Kontrolle durch Keimauszählung unterwerfen, da mir kein tierpathogener Stamm zur Verfügung stand; doch glaube ich, daß all diese Erklärungen für die Vermehrung der hämolytischen Kraft durch Tierpassage (nicht der Anzüchtung, über die ich keine Erfahrung besitze) der Nachprüfung durch Keimauszählung bedürfen, da Blutserum ein vorzügliches Medium für Streptokokken ist, dies allein würde die stärkere Hämolyse infolge des besseren Wachstums vollkommen erklären.

Ein weiterer indirekter Beweis für die Anwesenheit eines Toxins wäre der Nachweis einer Toxoidbildung, bei der die haptophore Gruppe, wie beim Toxin sich an die entsprechenden Zellrezeptoren verankert, und diese dadurch vor der Verbindung mit einer anderen haptophoren Gruppe und vor der Wirkung des dieser entsprechenden toxophoren Anteiles schützt. Schlesinger glaubt, diesen Nachweis geführt zu haben. Es gelang ihm folgender Versuch:

A. 5^{cem} 8 tägiger Bouillonkultur, die am 3. und 4. Tage stark hämolysiert hatten, + 1 Tropfen Kaninchenblut kommen auf 2 Stunden in den Brutschrank bei 37°. (Hämolyse: Ø.)

Abzentrifugiert — ausgewaschen + 5^{cem} f. c. lösender Bouillonkultur. (Hämolyse: Kuppe.)

Also eine Hemmung der Hämolyse, bei Zusatz gut hämolysierender Kultur, was durch eine vorherige Verankerung der Zellrezeptoren an die haptophore Gruppe des Toxoids bewirkt wird.

Ich habe mit mehreren Stämmen diesen Versuch nachgeprüft, stets zugleich mit den nötigen Kontrollen, und bin zu entgegengesetzten Resultaten gekommen. Es trat in meinen Fällen stets eine der Kontrollstamm-hämolyse entsprechende Hämolyse ein.

Wie Schlesinger zu seinem abweichenden Resultat kommt, weiß ich nicht. Bei der starken Verschiedenheit des Wachstums der Streptokokken in den Bouillonröhrchen ist es vielleicht nicht ausgeschlossen — von einer Kontrolle erwähnt er nichts —, daß der zur Nachhämolyse verwandte Streptokokkenstamm nur schlecht wuchs und dabei nur wenig hämolysierte.

Bei längerem Aufenthalt im Brutschrank war in meinen Versuchen stets eine komplette Lösung der roten Blutkörperchen eingetreten, so daß ich eine Bindung der Blutkörperchenrezeptoren an die haptophore Gruppe des zuerst hinzugefügten Streptokokkentoxins nicht zugeben kann.

Bei meinen Nachuntersuchungen dehnte ich einen dieser Versuche dann noch folgendermaßen aus:

I.

Mir standen drei Kulturen zur Verfügung: A. eine 16 Tage alte, B. eine 8 Tage alte und C. eine 2 Tage alte Streptokokkenkultur desselben Stammes. Die beiden ersten hatten vom 1. bis 7. Tage gut hämolysiert. Die erste war nicht mehr übertragbar (also tot), während die zweite Kultur noch in frische Bouillon übertragen, auskeimte. Die dritte Kultur, die jünger war, hämolysierte gut, und war natürlich auch noch gut übertragbar.

Stamm A. Alter, nicht mehr übertragbarer Stamm.

Stamm B. Alter, in seiner ursprünglichen Bouillon nicht mehr hämolysierender,¹ aber noch übertragbarer Stamm.

Stamm C. Frischer Stamm.

A.				Hämolysen
1.	2 ccm A + 2 Tr. Menschenblut:	2 Std. 37°, dann 20 Std. Eis.		Ø
2.	2 " A + 2 " "	2 " 37°, " 20 " "		Ø
3.	2 " A + 2 " "	2 " 37°, " 20 " "		Ø
B.				
1.	2 ccm B + 2 Tr. Menschenblut:	2 Std. 37°, dann 20 Std. Eis.		Ø
2.	2 " B + 2 " "	2 " 37°, " 20 " "		Ø
3.	2 " B + 2 " "	2 " 37°, " 20 " "		Ø

Am nächsten Tage wurden verarbeitet:

Stamm A.		Hämolysen
Röhrchen A ₁ :	Blutkörperchen ausgewaschen, auf 1 ccm angefüllt + 1 ccm Kultur C: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis . . .	} f. c.
" A ₂ :	1 ccm der am Tage vorher zur Hämolysen gebrauchten Kultur + 1 ccm Kultur C: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis.	
" A ₃ :	1 ccm der am Tage vorher zur Hämolysen gebrauchten Kult. + 1 ccm sterile Bouillon: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis.	} Ø
Stamm B.		
Röhrchen B ₁ :	Blutkörperchen ausgewaschen, auf 1 ccm angefüllt + 1 ccm Kultur C: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis . . .	} f. c.
" B ₂ :	1 ccm der am Tage vorher zur Hämolysen gebrauchten Kultur + 1 ccm Kultur C: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis.	
" B ₃ :	1 ccm der am Tage vorher zur Hämolysen gebrauchten Kult. + 1 ccm sterile Bouillon: 2 Std. 37°, 20 Std. Eis.	} K.
Stamm C.		
4.	2 ccm Bouillonkultur + 2 Tr. Menschenblut: 2 Std. 37°, 20 St. Eis.	f. c.

Aus diesem Versuch geht mit Sicherheit hervor, daß keine Bindung zwischen Blutkörperchen und der haptophoren Gruppe eines eventuell ge-

¹ D. h. bei Zusatz von Blut zu der Bouillon, ohne Zusatz frischer Bouillon.

bildeten Toxoids bestand, da die frisch zugesetzte Kultur (C) es stets zu einer Lösung brachte, die vollständig der Kontrolle (4.) entsprach. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Blutkörperchen abzentrifugiert und ausgewaschen wurden, oder ob zu der benutzten blutkörperchenhaltigen Bouillon die frische Streptokokkenkultur direkt hinzu kam.

A₃ und B₃ zeigen den Unterschied in den beiden ungleich alten Stämmen. B₃, zu einem Stamm gehörig, der sich bei Zusatz frischer Bouillonkultur noch übertragen ließ, zeigte eine, wenn auch sehr schwache Hämolyse, während die abgestorbenen Streptokokken des Stammes A auch nicht durch Zufuhr frischer Bouillon zu neuer Vermehrung und damit zur Hämolyse angeregt werden konnten.

II.

Parallel diesem hämolytischen Versuch ging ein zweiter, der die Zahl der übertragbaren Keime in den einzelnen Röhren festzustellen suchte.

Ich benutzte dieselben Stämme A, B und C. Von jeder gut durchgeschüttelten Kultur wurde vorerst 1^{ccm} 10 000 fach verdünnt und dann von dieser Verdünnung mit je 1, 3 und 6 Tropfen Platten gegossen und ausgezählt.

Es ergaben:

Stamm A:	1 Tropfen	0 Keime	} = 0 im Kubikzentimeter.
	3 "	0 "	
	6 "	0 "	
Stamm B:	1 Tropfen	5 Keime	} = 5 Keime pro Tropfen = 650 000 im Kubikzentimeter.
	3 "	12 "	
	6 "	33 "	
Stamm C:	1 Tropfen	138 Keime	} = 140 Keime pro Tropfen = 18 200 000 i. Kubikzentimeter.
	3 "	422 "	
	6 "	840 "	

Von Stamm A und B legte ich mir nun 4 Röhren von je 1^{ccm} Inhalt an, die, mit 1^{ccm} 5 prozentiger Blutkörperchenaufschwemmung versetzt, 2 Stunden bei 37° in den Brutofen kamen. (Resultate genau ebenso wie auf S. 499 angegeben.)

Dann wurden die Röhren 10 000 fach verdünnt, und zwar nachdem vorher die folgenden Maßnahmen vorgenommen waren.

Stamm A.

1. 1 Röhren nach 2 Stunden Aufenthalt im Brutschrank bei 37° unverdünnt zur Platte gegossen:

1 Tropfen	0 Keime	} = 0 Keime im Kubikzentimeter.
3 "	0 "	
6 "	0 "	

2. (Röhren A₁ des Versuches I entsprechend) Blutkörperchen ausgewaschen, auf 1^{ccm} angefüllt + 1^{ccm} Kultur C 2 Std. bei 37°. Dann 10 000 fach verdünnt und mit 1, 3 und 6 Tropfen zur Platte ausgegossen:

- 1 Tropfen 148 Keime } = 138 Keime pro Tropfen
 3 " 312 " } = 17 940 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 921 " }
3. (Röhrchen A₂ entsprechend) 1^{cem} der vorher zur Hämolyse benutzten Kultur + 1^{cem} Kultur C 2 Std. bei 37° usw.:
- 1 Tropfen 172 Keime } = 170 Keime pro Tropfen
 3 " 540 " } = 22 100 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 995 " }
4. (Röhrchen A₃ entsprechend) 1^{cem} der zur Hämolyse benutzten Kultur + 1^{cem} sterile Bouillon 2 Std. bei 37° usw.
- 1 Tropfen 0 Keime } = 0 Keime im Kubikzentimeter.
 3 " 0 " }
 6 " 0 " }

Stamm B.

5. Dasselbe mit Stamm B, wie eben angegeben:
- 1 Tropfen 8 Keime } = 8 Keime pro Tropfen
 3 " 22 " } = 104 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 50 " }
6. Dasselbe wie bei 2., entsprechend Röhrchen B₁:
- 1 Tropfen 140 Keime } = 142 Keime pro Tropfen
 3 " 414 " } = 18 460 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 869 " }
7. Dasselbe wie bei 3., entsprechend Röhrchen B₂:
- 1 Tropfen 163 Keime } = 150 Keime pro Tropfen
 3 " 440 " } = 19 500 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 897 " }
8. Dasselbe wie bei 4., entsprechend Röhrchen B₃:
- 1 Tropfen 43 Keime } = 40 Keime pro Tropfen
 3 " 142 " } = 4 200 000 Keime im Kubikzentimeter.
 6 " 217 " }

Der Übersichtlichkeit wegen stelle ich die Resultate dieser beiden Versuchsreihen nebeneinander:

	I	II
	Hämolyse	Keimzahl pro Kubikzentimeter
A ₁ :	f. c.	17 940 000
A ₂ :	f. c.	22 100 000
A ₃ :	Ø	Ø
B ₁ :	f. c.	18 460 000
B ₂ :	f. c.	19 500 000
B ₃ :	K.	4 200 000
Stamm A:	Ø	Ø
Stamm B:	Ø	650 000
Stamm C:	f. c.	18 200 000

Der Parallelismus der Keimzahl in den einzelnen Röhrchen (Versuch II) mit der hämolytischen Kraft (Versuch I) ist in die Augen springend, und auch dieser Versuch ist meines Erachtens nur so zu deuten, daß die Hämolyse in engster Abhängigkeit von der Zahl der frisch gewachsenen Keime steht.

Mit derselben Methode untersuchte ich Filtrate und Bakterienextrakte auf Toxoidbildung, ohne je ein Toxoid nachweisen zu können. Frisch zugesetzte wirksame Streptokokkenkultur hämolysierte stets komplett oder fast komplett.

Somit kann ich die indirekten Beweise für das Vorhandensein eines toxinartig wirkenden Stoffes bei der Hämolyse der Streptokokken nicht anerkennen, wie ja überhaupt von den meisten Autoren überhaupt eine Giftbildung, wenigstens bei den hochvirulenten Streptokokkenstämmen, geleugnet wird. Ich zitiere hier v. Lingelsheim,¹ nach dessen Ansicht die hochvirulenten Streptokokken kein Gift oder nur Spuren eines solchen in die Kulturflüssigkeit übergehen lassen. Er fügt hinzu: „Gegenüber anders lautenden Behauptungen bin ich mit der Zeit immer mißtrauischer geworden, um so mehr, als die sichere Abtötung der Streptokokken nicht gelingt und auch Filtrate noch einzelne Streptokokken enthalten können.“²

Allerdings erkennt v. Lingelsheim ein Hämolysin der Streptokokken an, das aber von den Streptokokkentoxinen ganz verschieden sei, nicht giftig ist und „nach Schlesinger äußerst thermolabil ist“.

Zur Frage der Arteinheit, und zum Verhalten der Hämolyse als Unterscheidungsmerkmal verschiedener Arten, will ich nicht Stellung nehmen, da meine Versuche hierzu nicht geeignet sind. Ich will nur darauf hinweisen, daß meine sämtlichen Stämme während der ganzen, teilweise Monate dauernden Beobachtungszeit ihr Verhalten zur Bouillon und zur Hämolyse auf Agarplatten nicht änderten. Ich weise ferner darauf hin, daß die Stämme, die ich von Gesunden (oder bei Saproemien) herauszüchten konnte, sich von allen anderen durch ihr Wachstum in der Bouillon (fast stets Bouillon trübend) und auf der Blutagarplatte (stets ohne jede Hämolyse) unterschieden, daß jedenfalls ein Parallelismus besonders zwischen dem Fehlen der Hämolyse und der mangelnden Pathogenität besteht, und daß wir doch vielleicht gezwungen sind, von klinischen Gesichtspunkten ausgehend, wenn auch nicht verschiedene Arten, so doch Stämme mit dem konstanten Merkmal der Hämolyse anzunehmen. — Diese hämolytischen Stämme können allerdings nun wiederum Veränderungen

¹ Kolle-Wassermann. IV. S. 11.

² Vgl. auch Aronson, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1902. Nr. 42 u. 43.

in ihrer Virulenz erleiden, wie aus meinen Versuchen deutlich hervorgeht, so daß sicher Hämolyse zwar das Zeichen von Streptokokken ist, die menschenpathogen sind, waren oder werden können, ohne daß nun aber wiederum die Hämolyse zu jeder Zeit gleichbedeutend mit Virulenz ist, während das Fehlen der Hämolyse eine Eigenschaft von mehr saprophytär lebenden Streptokokken zu sein scheint, die eben wie alle Saprophyten nur unter besonderen Umständen Ursache einer schweren Erkrankung werden können.

Ich habe mich bemüht, stets mit möglichst frischen Stämmen zu arbeiten, um dadurch Änderungen, wie sie die Anpassung an die künstliche Kultur vielleicht hervorbringt, möglichst auszuschalten. Zu den einzelnen zeitlich auseinander liegenden Versuchen habe ich deshalb immer nur die Stämme benutzt, die ich gerade frisch aus dem Körper gezüchtet hatte. Meine Versuche sind nicht zu dem Zweck einer Widerlegung oder Bestätigung der Freymuthschen¹ Angaben gemacht worden, und doch ist es natürlich, daß ich nach meinen umfangreichen Versuchen mir ein Urteil über seine Arbeit gebildet habe, das ich hier zum Ausdruck bringen will. Freymuth hat behauptet, daß die Hämolyse der Streptokokken etwas sehr wechselndes sei, daß derselbe Stamm in einer gewissen Prozentzahl hämolysiere, und unter gleichen Verhältnissen in einer gewissen Prozentzahl ohne Hämolyse, ja auf derselben Platte mit und ohne Hämolyse wachse, anscheinend ohne Gesetzmäßigkeit. Ich muß gegen seine Untersuchungen einwenden, daß sein Material, das sich auf 1 pathogenen und 26 apathogene Stämme erstreckt, unzureichend ist für den Nachweis einer Eigenschaft, die nach der Behauptung anderer eben nur bestimmten, und zwar pathogenen Stämmen zukommen soll.

Eine Blutplatte, die 0,2^{cem} Blut auf 5 oder 10^{cem} Agar enthält, entspricht ungefähr der Talquistskala von 5 bis 10 Prozent Hämoglobin. Eine so schwach bluthaltige Platte zeigt zwar deutlich Hämolyse, indem sie statt diffus getrübt, glashell durchsichtig wird, aber diese Durchsichtigkeit wird schon bedingt durch die kleinsten blutschädigenden Momente, die bei der gewöhnlichen Blutplatte (2:5 oder 2:10) noch lange keine Hämolyse machen.

Nun hat außerdem Pribram² nachgewiesen, daß alle Bakterien beim Wachstum in Spuren hämolysieren, ohne daß es deshalb jemandem einfallen wird, derartig in Spuren Blut auflösende Stämme zu den hämolytischen zu rechnen.

¹ *Zeitschr. f. Geb. u. Gynäkol.* Bd. LXI.

² Kolle-Wassermann. *Ergänzungsband.* S. 1.

Aus Freymuths Tabellen scheint mir hervorzugehen, daß er nur in Versuchstabelle I bei 81 Impfungen 2^{cem} Blut benutzt hat, jedes Mal, ohne Hämolyse zu erzielen. Wieviel Blut er sonst zugesetzt hat, gibt er nicht an. Vielleicht erklärt sich aus der geringen Menge des Blutzusatzes die bisweilen beobachtete Hämolyse bei sonst „nicht hämolysierenden“ Stämmen. Wer je einen wirklich hämolytischen Stamm in Händen gehabt hat, dem wird es unverständlich erscheinen, daß der virulente Stamm Freymuths so unregelmäßige Resultate auf der Blutplatte und so geringe Hämolyse in Bouillon ergeben hat. Ich muß mich daher der schon von Fromme¹ ausgesprochenen Ansicht anschließen, daß Freymuths virulenter Stamm nicht im landläufigen Sinne hämolytisch war. Das Vorhandensein bei einem Krankheitsprozeß beweist noch nicht die ätiologische Wertigkeit. Das lange Fortzüchten auf künstlichen Nährböden reicht entgegen Frommes Ansicht nicht aus, um die merkwürdigen Ergebnisse Freymuths zu erklären.

Meine diesbezüglichen Versuche, die mit 4 avirulenten und 15 virulenten Stämmen teilweise über 6 Monate hinaus fortgesetzt wurden, wobei niemals Tierpassage vorgenommen wurde, wobei die Stämme z. T. 2 Monate lang eingeschmolzen aufgehoben waren, ergaben das absolut ausnahmslose Resultat, daß die avirulenten Stämme auf der Blutplatte 2:10^{cem} niemals auch nur eine Andeutung von Hämolyse zeigten, während die anderen Stämme stets, solange sie überhaupt auf Agar übertragbar waren, als hämolytische Stämme wuchsen. Ebenso verhielten sie sich in der Bouillon.

Das Schema, nach dem Freymuth den Grad der Hämolyse beurteilt, weicht in wichtigen Punkten von der von Neisser-Wechsberg eingeführten Nomenklatur ab, und zwar wie mir scheint nicht vorteilhaft, ist indes auch von anderen benutzt.

Bei Freymuth bezeichnet „ganz rot“ den Höhepunkt der Hämolyse. Es kann die Bouillon aber ganz rot sein und doch eine inkomplette, fast komplette oder ganz komplette Lösung vorliegen, Grade, die Neisser-Wechsbergs Nomenklatur auseinanderzuhalten erlaubt. Zur Beurteilung der Hämolyse ist natürlich die Angabe der Menge der verwandten Bouillon von größter Wichtigkeit, da 2^{cem} schneller „ganz rot“ werden als 10^{cem}. Nähere Angaben hierüber konnte ich bei Freymuth nicht finden, ebensowenig darüber, wie lange (2 Stunden? 1 Tag? 2 Tage?) und bei welchen Temperaturen er seine Bouillon geprüft hat.

Unter Hämolyse versteht man bekanntlich den Austritt des Häoglobins aus den roten Blutkörperchen. Dies Ereignis tritt ein, sobald das

¹ *Berliner klin. Wochenschrift*. 1908.

Stroma der roten Blutkörperchen irgendwie geschädigt wird. Diese Schädigungen können mannigfacher Art sein: biologischer oder rein physikalisch-chemischer. Hierzu gehört die Zerstörung der roten Blutkörperchen durch aqua destillata, und auch ihr Untergang infolge der Einwirkung von Säuren und Alkalien. Hiervon waren wir ausgegangen, und es gelang uns nachzuweisen, daß die beim Bakterienwachstum in Betracht kommenden Säuremengen einerseits nicht imstande sind, Hämolyse zu bewirken, daß aber auch andererseits die Hämolyse unabhängig von der Säurebildung, höchstens in mittelbarer zeitlicher Abhängigkeit von ihr verläuft, insofern die Säurebildung die Kokken abtötet und so das hämolytische Vermögen an sich vernichtet. Trotzdem wir nicht imstande waren, ein Hämolysin, d. h. ein Toxin nachzuweisen, ist es uns doch am wahrscheinlichsten, daß es sich um biologische Vorgänge handelt, weil die äußeren physikalischen Bedingungen, wie Salzgehalt und Säurebildung, bei den verschiedensten hämolytischen und nicht hämolytischen Stämmen gleich gestaltet werden können, ohne daß dadurch bei den hämolytischen Hämolyse wegfielen oder bei den anderen aufträten.

Daß es sich nicht um ein beim Untergang der Streptokokken frei werdendes oder sonstwie vom Streptokokkenkörper mit unserer Methode trennbares Hämolysin handelt, haben wir schon oben besprochen. Meine sämtlichen Versuche haben gezeigt, daß nur der wachsende Streptococcus Hämolyse verursacht, daß die Stärke der Hämolyse, d. h. die Menge der aufgelösten Blutkörperchen der Menge der vermehrungsfähigen Keime parallel geht.

Jedenfalls handelt es sich um eine Funktion des lebenden Zellprotoplasmas, möglicherweise um die Wirkung eines ausgeschiedenen außerordentlich labilen Fermentes, das nur in statu nascendi wirkt, und sich daher von der Bakterienzelle getrennt nicht nachweisen läßt.

Ich will nun in aller Kürze die Ergebnisse meiner Versuche zusammenfassen.

1. Die Hämolyse der Streptokokken ist eine konstante Eigenschaft bestimmter Streptokokkenstämmen.

2. Hämolyse und Virulenz gehen nicht unbedingt parallel miteinander, vielmehr läßt sich Hämolyse konstant auch bei alten Stämmen nachweisen, die durch langdauernde Züchtung in künstlichen Nährböden ohne Tierpassage ihre Virulenz eingebüßt haben. Die Hämolyse ist andererseits fast ausnahmslos die Eigenschaft von Streptokokkenstämmen, die unter günstigen Bedingungen sehr pathogen werden können.

3. Hämolyse und Säurebildung der Streptokokken in den verschiedenen Nährmedien sind abhängig von ihrer Fähigkeit, sich darin zu vermehren.

4. Die Hämolyse der Streptokokken ist keine Säurefunktion, denn sie tritt auch ein, wenn man die Säurewirkung, wie z. B. durch Züchtung in Marmorstaubbouillon fast gänzlich ausschließt, und wird andererseits durch eine stärkere Durchsäuerung der Bouillon nicht verstärkt.

Da die Lebensdauer der Streptokokken indes in Abhängigkeit von der Durchsäuerung des Kulturmediums steht, so ist in gewissem Sinne auch die Hämolyse mittelbar von der Säurebildung abhängig.

5. Zuckerbouillon schädigt die Hämolyse nur insofern, als das Wachstum der Streptokokken und damit die Fähigkeit zu hämolysieren, in ihr früher ein Ende erreicht, als in gewöhnlicher Bouillon ohne Traubenzuckerzusatz.

6. In Streptokokkenbouillonkulturen ist im allgemeinen kein freies Hämolysin nachweisbar.

7. Der Toxincharakter des Streptokokkenhämolysins ist bisher nicht einwandsfrei bewiesen.