[Aus dem hygienischen Institut der Universität Halle a/S.]
(Director: Geheimrath Prof. Dr. C. Fraenkel.)

Die Pneumokokken. Vergleichende Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung der Agglutination.

Von

Amy Kindborg, M.D.

Unsere fortschreitende Kenntniss der Bakterien hat es mit sich gebracht, dass manche Begriffe, unter denen man früher eine einzige Bakterienart verstand, insofern eine Aenderung erfahren haben, als wir jetzt an deren Stelle eine Vielheit zwar nahe mit einander verwandter und in wesentlichen Eigenschaften übereinstimmender, unter sich jedoch Unterschiede aufweisender Bakterien zu setzen gelernt haben. Dies gilt ganz besonders von den Bakterien der Typhus- und Coli-Gruppe, von den Tuberculoseerregern und von den Eiterkokken. Man ist jedoch in diesen Bestrebungen noch weiter gegangen und hat versucht, selbst einen scheinbar so scharf umschriebenen und eng begrenzten Begriff, wie den des Fränkel-Weichselbaum'schen Pneumococcus in eine Reihe von Unterarten aufzulösen. Es ist dies eine zweite und gewissermaassen rückläufige Phase in der Entwicklung der Lehre vom Pneumococcus, denn ursprünglich war man zu der Aufstellung dieses Begriffs dadurch gelangt, dass man die im Speichel normaler Personen und im Bronchialsecret Pneumoniekranker vorkommenden Diplokokken, auf Grund der Erkenntniss ihrer gemeinsamen Eigenschaft, bei Versuchsthieren Septicämie zu erregen, zu einer Art vereinigt hatte.

Der Erste, der diese beiden mit einander verglich, war A. Fränkel¹;

¹ A. Fränkel, Verhandlungen des III. Congresses für innere Medicin. 1884. *Zeitschrift für klin. Medicin.* 1886. Bd. X.

vor ihm hatten schon Friedländer¹ und auch andere Forscher einen kokkenähnlichen Mikroorganismus aus pneumonischem Sputum beschrieben, von welchem jetzt noch eine Bakterienart unter dem Namen des *Pneumobacillus* Friedländer als Erreger mancher Pneumoniefälle anerkannt wird, mit dem eigentlichen *Pneumococcus* jedoch nichts zu thun hat.

Die grundlegenden Untersuchungen über die Erreger der menschlichen Pneumonie stammen aus dem Jahre 1886 von A. Weichselbaum², der ausser dem eben erwähnten Friedländer'schen Organismus, hauptsächlich den Fränkel'schen *Diplococcus* in entsprechenden Krankheitsfällen gefunden hat; daneben fand er auch Streptokokken, von denen es nach unserer jetzigen Kenntniss dahingestellt bleiben mag, ob es sich um wirkliche Streptokokken (in Fällen von septischer Pneumonie) oder nicht etwa um streptokokkenähnliche Varietäten der Pneumokokken gehandelt hat. — Schon im folgenden Jahre wurde die Weichselbaum'sche Entdeckung des *Diplococcus Pneumoniae* von Gamaleia³ und Anderen bestätigt. Um die Erforschung der septicämieerregenden Mikroorganismen des Speichels hat sich besonders Sternberg⁴, ferner auch Biondi⁵ bemüht, welch' Letzterer einen solchen unter dem Namen *Bacillus Salivarius Septicus* im Jahre 1887 beschreibt und auch schon der Ansicht huldigt, dass derselbe mit den von Fränkel und Weichselbaum gefundenen Pneumonieerregern identisch sei. Von dem Vorkommen streptokokkenähnlicher Varietäten des *Pneumococcus* sprechen bereits einige Jahre nach dessen Entdeckung Banti⁶, der vier Arten hauptsächlich nach der Kettenbildung unterscheidet, und vor Allem Kruse und Pansini⁷, die mit einem sehr grossen Material von Pneumoniestämmen gearbeitet haben. Auch Foà⁸, der nach anderen Gesichtspunkten mehrere Varietäten des *Pneumococcus* unterscheidet, bezeichnet eine dieser Varietäten als *Streptococcus lanceolatus*. Artenunterschiede machen ausserdem Eyre und Washbourn⁹, und zwar nach der Virulenz und der Widerstandsfähigkeit der betreffenden Stämme. Levy und Steinmetz¹⁰ beschreiben auch mehrere

¹ Friedländer, Virchow's *Archiv*. Bd. LXXXVII. — *Fortschritte der Med.* Bd. I. Nr. 22. S. 287.

² A. Weichselbaum, *Medicin. Jahrbücher*. Wien 1886. — *Monatsschrift für Ohrenheilkunde*. 1888. Nr. 8 u. 9. — *Centralblatt für Bakteriologie*. 1883. Bd. V.

³ Gamaleia, *Annales de l'Institut Pasteur*. T. II. p. 440.

⁴ Sternberg, Ref. in *Centralblatt für klin. Medicin*. 1885.

⁵ Biondi, *Diese Zeitschrift*. 1887. Bd. II. S. 199.

⁶ Banti, *Archiv di anatom. norm. e pathol.* Firenze 1890.

⁷ Kruse und Pansini, *Diese Zeitschrift*. 1892. Bd. XI, S. 279.

⁸ Foà, *Ebenda*. 1893. Bd. XV. S. 369.

⁹ Eyre and Washbourn, *Lancet*. Vol. I. p. 19.

¹⁰ Levy und Steinmetz, *Archiv für experim. Pathologie*. Bd. XXXVII. S. 89.

Abarten, meinen aber, dass diese in einander übergeführt werden können, und in ähnlichem Sinne äussert sich Stoltz.¹ — Als dann mit der Entdeckung des Agglutinationsphänomens durch Gruber und Widal eine neue Untersuchungsmethode in die Bakteriologie eingeführt wurde, hat dieselbe auch auf den *Pneumococcus* Anwendung gefunden. Dabei stellte es sich dann heraus, dass bei Fällen von menschlicher Pneumonie die agglutinirende Wirkung des von dem Kranken gewonnenen Serums sich gegenüber den von demselben Falle isolirten Pneumokokken deutlicher zeigte als gegenüber Anderen (Gargano und Fattori²), und dass es sogar Fälle gab, in denen eine Agglutination überhaupt nur mit demselben Stamme zu erreichen war. Bezançon und Griffon³, die die letztere Erscheinung beobachtet haben, sahen sich daher zu der Vermuthung veranlasst, dass man sich möglicher Weise des Agglutinationsverfahrens zur Unterscheidung verschiedener Rassen des Pneumokokkus bedienen könne. Anderweitige Aeusserungen über die Benutzung der Agglutinationsmethode zur Unterscheidung verschiedener Pneumococccenarten habe ich in der mir zugänglichen Litteratur nicht finden können. Dagegen haben Eyre und Washbourn⁴ festgestellt, dass sich auch die immunisirenden Eigenschaften des Serums nicht gleichmässig gegen alle Pneumokokkenstämme richteten, und sind daher der Meinung, dass ein specifisches Immunserum ein Mittel sei, um mehrere Rassen des typischen *Pneumococcus* unterscheiden zu lassen. In ähnlichem Sinne äussert sich Foà, welcher die verschiedenen und einander widersprechenden Ergebnisse der Autoren bei Immunisierungsversuchen mit Pneumokokken darauf bezieht, dass die Untersucher verschiedene Varietäten dieses Mikroorganismus vor sich hatten. Diese Schlussfolgerungen sind indessen, wie man sieht, bisher immer nur aus vereinzelten und zufälligen Befunden gezogen worden, während systematische Untersuchungen darüber bislang noch nicht vorlagen, so dass Weichselbaum in seinem Aufsatz über den *Pneumococcus* im Handbuch von Kolle-Wassermann eine weitere Bearbeitung dieser Gebiete in dem gedachten Sinne als wünschenswerth hinstellt.

Ich bin daher gern einer Aufforderung Herrn Prof. Fränkel's gefolgt, solche Untersuchungen an einem grösseren Material von eigens zu diesem Zwecke isolirten Pneumokokkenstämmen vorzunehmen, nicht ohne dieses Material zugleich auch noch von anderen Gesichtspunkten aus zu bearbeiten.

¹ Stoltz, *Centrabblatt für Bakteriologie*. Abth. I. Bd. XXIV. S. 387.

² Gargano e Fattori, *Rivista critica di clinica medica*. 1903. Nr. 12—15.

³ Bezançon et Griffon, *Soc. de Biol.* Juin 5. — *Semaine méd.* p. 217.

⁴ Eyre and Washbourn, *Brit. med. Journ.* Vol. II. p. 124.

Bei meinen Untersuchungen ging ich in der Weise vor, dass ich mir eine grössere Anzahl von Pneumokokkenstämmen aus verschiedenen Quellen (normalem Speichel, pneumonischem Sputum, Empyem u. s. w.) isolirte und diese zunächst in ihrem morphologischen und culturellen Verhalten, später in ihren Beziehungen zum Serum mit einander verglich. Dabei sei des besseren Verständnisses wegen von vornherein bemerkt, dass ich unter der Bezeichnung „Stamm“ stets die Fortzüchtung eines einzelnen und genau in seinen Eigenschaften bestimmten Pneumococcus, unter „Art“ oder „Rasse“ eine Mehrzahl verschiedener in gewissen maassgebenden Eigenschaften übereinstimmender Bakterien der genannten Typen verstehe. Dass die einzelnen von mir isolirten Stämme während der ganzen Dauer der Untersuchungen streng aus einander gehalten werden, bedarf eigentlich nicht der ausdrücklichen Erwähnung.

Solcher Stämme wurden im Ganzen 24 isoliert und zwar:

Speichelkokken	Pneumonisches Sputum	Tuberculöses Sputum
5 Stämme.	7 Stämme.	enthalt. Pneumokokken
Otitis media-Eiter	Empyemeiter	4 Stämme.
2 Stämme.	2 Stämme.	Panophthalmitis
Meningitis	Abscess aus dem Gehirn	1 Stamm.
2 Stämme.	1 Stamm.	

Bevor wir auf die Besprechung dieser Stämme eingehen, mögen erst einige Worte über die

Methodik ihrer Gewinnung und Erhaltung

gesagt sein.

Als der beste Weg zur Cultivirung eines Pneumococcus aus irgend einem Material, in dem man sich von seiner Anwesenheit durch Ausstrichpräparat überzeugt hat, ist die directe intraperitoneale Impfung von Mäusen, welche von allen Versuchsthieren am meisten für diesen Mikroorganismus empfänglich sind — falls derselbe nicht seine Virulenz völlig eingebüsst hat, was bei Material aus Empyem oder alten Abscessen zuweilen vorkommt — und nach der Impfung in 10 bis 24 Stunden zu Grunde gehen. Die zu diesem Zweck nöthige Menge des Materials beträgt bei Sputum höchstens $\frac{1}{2}$ ccm. Man findet dann, falls man ein noch zahlreiche andere Bakterien enthaltendes Material, wie z. B. Sputum eingespritzt hat, eine blutig-eitrige Masse in der Bauchhöhle, die verschiedene Bakterienarten enthält, wohingegen im Herzblut der mit eingebrachte Pneumococcus sich in Reincultur vorfindet. Man bedient sich also am besten des Herzblutes

sofort nach Eröffnung des Thieres unter sorgfältiger Vermeidung der Bauchhöhle zur Anlegung von Culturen, von denen man selbst dann positiven Ausfall erwarten darf, wenn es bei mikroskopischer Durchsicht des Herzblutes nicht gelingt, Pneumokokken aufzufinden. War die intra-peritoneale Impfung mit einer Reincultur des *Pneumococcus* erfolgt, was zu einer nicht-eitrigen, sondern meistens blutig-serösen Ausschwitzung in der Bauchhöhle führt, so ist auch diese Flüssigkeit und ebenso der Milzsaft zur Anlegung von Culturen geeignet.

Weniger vortheilhaft als die im Vorstehenden aus einander gesetzte Methode, jedoch bei einiger Uebung ebenfalls ausführbar, ist die directe Isolierung der Pneumokokken aus dem zu untersuchenden Material. Dieselbe erfolgt entweder in der üblichen Weise auf Platten, wobei man es jedoch nicht mit drei Platten, wie es sonst wohl angängig ist, bewenden lassen darf, sondern besser vier oder fünf solche anlegt, um die Pneumokokkencolonieen ganz gesondert zu erhalten und vor der Ueberwucherung durch andere Bakterienarten, der sie sehr leicht ausgesetzt sind, zu schützen. Noch einfacher ist es, sich hierzu der Methode des auf einander folgenden Ausstrichs auf 4 bis 5 Röhrchen mit geeignetem Nährboden zu bedienen. Ueber die in Betracht kommenden Nährmedien, sowie über das Aussehen der Culturen siehe den diesen Dingen besonders gewidmeten Abschnitt. In den meisten Fällen wurde von mir sowohl die Methode der Isolierung des *Pneumococcus* mit diesem Verfahren als die seiner Gewinnung mittels des Thierversuches angewandt, worauf ich mich jedes Mal von der Identität der beiden so gewonnenen Pneumokokken überzeugte. Die Isolierung des *Pneumococcus* unter Ausschluss des Thierkörpers hat indessen den ausserordentlichen Nachtheil, dass hierbei das betreffende Bacterium meist seine Virulenz vollständig einbüsst und damit für die weiteren Untersuchungen verloren ist. Denn bekanntlich ist der *Pneumococcus* ein Organismus, der sehr dazu neigt, seine Virulenz und mit dieser auch seine Cultivirbarkeit zu verlieren. Es ist daher, um einen Pneumokokkenstamm überhaupt am Leben zu erhalten, nöthig, dass er erst durch Thierpassage auf einen gewissen Virulenzgrad gebracht ist. Bei meinen Arbeiten wurde jede Pneumokokkencultur, die zu weiteren Versuchen bestimmt war, zunächst einer 6 bis 7 maligen unmittelbar auf einander folgenden Thierpassage unterzogen. Während der Dauer der Fortzüchtung wurde die Thierpassage regelmässig alle 4 Wochen und ausserdem immer nach je 14 Tagen die Uebertragung auf neue Nährböden vorgenommen. Auf diese Weise gelang es, die meisten der behandelten Stämme über ein Jahr lang lebend und virulent zu erhalten. Sämmtliche untersuchten Stämme boten in ihrer

Morphologie

das Bild des typischen Pneumococcus, wie es schon von Fränkel und Weichselbaum gezeichnet und seitdem durch zahlreiche Beobachtungen allgemein anerkannt ist. Es handelte sich also um paarweise gelagerte Mikroorganismen von der bekannten Lancettform (d. h. an je einem Ende spitz zulaufend und mit den breiten Seiten einander zugekehrt), mit deutlicher Kapselbildung im Thierkörper und positiver Färbbarkeit nach Gram. — Bei aller Uebereinstimmung in diesen Grundzügen wiesen indessen die einzelnen Stämme mannigfache und zum Theil ihrerseits wieder gewissen Gesetzen unterworfenen Unterschiede auf. So war namentlich für die einzelnen Stämme eine bestimmte Grösse ihrer Individuen charakteristisch. Doch bestanden, wenn es sich um Abweichungen von der Norm handelte, diese, gleichviel welchem Material die Culturen entstammten, eher in einer ungewöhnlichen Grösse als in einer Kleinheit der Individuen, denn die letztere Eigenschaft war nur bei einem einzigen unserer Stämme vorhanden, bei diesem allerdings in so hohem Grade, dass seine mikroskopische Beobachtung zu einer äusserst schwierigen und ermüdenden Aufgabe wurde. Dabei bestanden zwischen der Herkunft der betreffenden Stämme und ihrer Grösse gar keine Beziehungen, dagegen bestanden solche nach einer anderen Richtung hin, in welcher sich ebenfalls durchgreifende Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen zeigten; damit meine ich die einzelnen Pneumokokken innewohnende Eigenschaft der Kettenbildung, und zwar war der Zusammenhang zwischen dieser Eigenschaft und der Grösse der Individuen derart, dass es stets die grösseren Pneumokokken waren, welche die längsten Ketten zu bilden pflegten. Dieses Vermögen kommt, wenn es einem Stamm überhaupt in besonderem Maasse eigen ist, sowohl in der Cultur wie im Thierkörper zum Ausdruck, wenn auch in letzterem nicht in so hohem Grade als bei der künstlichen Züchtung. Bei letzterer waren einzelne unserer Stämme (Stamm Nr. I Speichelcoccus, Stamm Nr. VII Tuberculosesputum-Pneumococcus, Stamm Nr. IX Panophthalmitis, Stamm Nr. XIII Meningitis) im Stande, Ketten von ausserordentlicher Länge zu bilden, die sich in mannigfachen Windungen durch das ganze Gesichtsfeld zogen, so dass der Gedanke nahe lag, es möglicher Weise mit Streptokokken zu thun zu haben; indessen ist der Pneumococcus von diesen Mikroorganismen, mit denen er durch die gemeinsame Eigenschaft der Kettenbildung nahe verwandt erscheint, bei hinreichend genauer Beobachtung wohl zu unterscheiden. Diese Unterscheidung lässt sich am besten dadurch treffen, dass man den betreffenden Organismus in den Thierkörper bringt. Dann zeigen sich nämlich im

Herzblut, wo der *Pneumococcus*, wie seit jeher festgestellt ist, auch nach gleichzeitiger Einbringung zusammen mit anderen Mikroorganismen, z. B. aus dem Sputum, in Reincultur aufzutreten pflegt, neben einzelnen typischen Pneumokokken, ebenfalls die erwähnten, wenn auch hier bedeutend kürzeren und niemals gewundenen Ketten, die sich überdies durch Kapselbildung und Zusammensetzung aus einzelnen an einander gelagerten Diplokokkenpaaren als mit den Einzelformen zusammengehörig erweisen. Die Bildung der Ketten aus einzelnen Diplokokkenpaaren lässt sich überdies bei einiger Aufmerksamkeit selbst in den Culturen, wo die Kapseln mit den gewöhnlichen Mitteln nicht zu beobachten sind, erkennen und zur Unterscheidung von den aus lauter gleichmässigen Kugeln gebildeten Ketten der Streptokokken verwenden. — Diese Eigenschaft der Kettenbildung gehört zu den unveränderlichen Eigenschaften einzelner Stämme, denn wenn wir auch bei den meisten Pneumokokken im Condenswasser oder in Bouillonculturen kürzere Ketten auftreten sehen, so kommt es doch nur bei gewissen Stämmen zur Bildung der erwähnten langen und gewundenen Ketten, und es fehlte andererseits einem unserer Stämme, und zwar dem schon einmal angeführten kleinsten die Eigenschaft der Kettenbildung ganz. Ein Wechsel im Verhalten der Kettenbildung wurde bei keinem unserer Stämme beobachtet, dasselbe war vielmehr während der ganzen Dauer unserer Versuche im Thierkörper wie in der Cultur stets das gleiche.

Von den Beziehungen der Grösse und der Kettenbildung zur Virulenz der betreffenden Stämme soll in einem späteren Capitel die Rede sein.

Ausser der bekannten Anordnung zu Diplokokken ist es besonders

Die Kapsel,

welche dem *Pneumococcus* das charakteristische Aussehen verleiht. Dieser Bestandtheil kommt jedoch erst bei färbender Behandlung der Präparate recht zur Geltung, und zwar sind für diesen Zweck eine Reihe von Methoden angegeben worden. Darnach bedienen sich die Einen des Gentianaviolets, die Anderen einer Carbol-Fuchsin-Mischung, bei verschiedener Weise der Fixirung. Auf die erstere Art färben Albrecht und Ghon¹, welche in Anlehnung an die Pittfield'sche Geisselfärbungsmethode folgende beiden Lösungen verwenden, die jedes Mal frisch vor dem Gebrauche zubereitet und filtrirt werden müssen:

1. Sol. alum. concentr. 1.00
 ,, alkoh. concentr. Gentianaviolett 10.00
2. Acid. tann. 1.00
 Aqu. dest. 10.00

¹ Albrecht und Ghon, *Beulenpest*. II. S. 604.

zu gleichen Theilen mischen, das Präparat damit, unter leichtem Erwärmen, auf dem Deckglas färben und, wenn nöthig, mit Alkohol oder verdünnter Essigsäure entfärben.

Des nämlichen Farbstoffes bedient sich auch Pane¹, welcher dabei in nachstehender Weise verfährt.

Von einer frisch bereiteten alkoholischen 4 procentigen Gentianaviolett-lösung wird ein Tropfen zu 1^{cem} Wasser zugesetzt, damit einige Sekunden gefärbt und mit Wasser abgespült. Falls zu stark gefärbt, mit Alkohol entfärben.

Besser als diese beiden Methoden gefiel uns unter denen, die Gentianaviolett anwenden, das Verfahren von Raebiger², welcher sich zur Fixirung des Formalins bedient. Es geschieht dies in der Weise, dass 15 bis 20^{grm} Gentianaviolett mit 100 bis 150^{cem} einer 4 procentigen Formalinlösung übergossen und nach Umrühren über Nacht stehen gelassen werden. Der Farbstoff darf dann nicht vollständig gelöst sein. Filtriren und damit ohne vorherige Fixirung oder Erwärmung des Deckglaspräparats 20 Sekunden färben.

Mit Carbol-Fuchsin färben Gabbi³ nach raschem Trocknen über der Flamme eine Minute mit 1 bis 2 Tropfen folgender Mischung:

1 ^{grm} Fuchsin	15 ^{grm} Alkohol
2 bis 5 „ Carbolsäure	100 „ Wasser

und Boni⁴, dessen Verfahren sich dadurch auszeichnet, dass er zum Zweck der Fixirung den Gewebssaft, in dem die Bakterien sonst suspendirt sind, durch eine Eiweisslösung zu ersetzen sucht. Das Weisse eines Hühnereies wird mit 50^{grm} Glycerin und 2 Tropfen Formalin geschüttelt und filtrirt. Diese Lösung ist, wie wir uns überzeugt haben, mehrere Monate haltbar. Das Präparat wird mit einem Tropfen dieser Mischung auf dem Deckglase verrieben und unter leichtem Erwärmen, bis zu dem Grade, dass eben weisse Dämpfe aufsteigen, vorsichtig über der Flamme getrocknet und dann ganz kurz mit Carbol-Fuchsin gefärbt. Mit diesem Verfahren meint Boni die Kapsel auch nachweisen zu können, wo unsere anderen Methoden nicht ausreichen. Er will nämlich sowohl in älteren Pneumokokkenculturen, als auch in Culturen anderer, bisher für kapsellos gehaltener Bakterien solche Bildungen nachgewiesen haben. — Dass man nach der genannten Methode sehr schöne Bilder von Kapseln erhält und

¹ Pane, *Riforma med.* Nr. 98. — Ref. *Centralbl. f. Bakteriologie.* Bd. XXIV. S. 289.

² Raebiger, *Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene.* Bd. XI. S. 68.

³ Gabbi, *La Riforma med.* 1889. Nr. 31.

⁴ Boni, Ref. *Centralblatt für Bakteriologie.* Bd. XXVIII. p. 705.

auch in älteren Culturen Erscheinungen sieht, die für Kapseln gehalten werden können, sei zugegeben; doch haben wir uns des Eindrucks nicht erwehren können, als ob gerade dieses Verfahren am leichtesten zur Entstehung von Kunstproducten Veranlassung geben könnte. Wir konnten auch, was die Schönheit des Präparats anlangt, keiner dieser Methoden vor der einfachen Anwendung von verdünntem Carbol-Fuchsin (1:4 oder 1:5) oder dem Gram'schen Verfahren den Vorzug geben. Mittels dieser beiden Methoden lassen sich die Kapseln in Gewebssäften von Thieren, Sputum und in frisch aus dem Thierkörper angelegten Culturen — bis zur 3. bis 4. Generation, am besten bei Verwendung von Blutagar — sehr schön zur Darstellung bringen. Ebenso wenig wie besonderer Färbungsmethoden bedarf es unseres Erachtens besonderer Nährmedien, wie sie gleichfalls zur besseren Sichtbarmachung der Kapsel angegeben worden sind.

Wie bei allen Bakterienarten treten auch beim *Pneumococcus* in alten Krankheitsherden die sogenannten

Involutionsformen

auf. Solche beschreiben u. A. auch Stoltz¹ und Michaelis², welcher letzterer sie in 28 Fällen von seröser Pleuritis angetroffen hat. Von dem Vorkommen solcher Involutionsformen konnte ich mich ebenfalls überzeugen, wenn ich Material aus alten Eiterherden zur Untersuchung bekam. Die darin vorgefundenen Pneumokokken machten dann den Eindruck, als ob die Componenten der einzelnen Paare immer mehr aus einander wichen und dabei gleichzeitig immer kleiner würden, bis das Ganze schliesslich wie ein Bacillenleib aussah, von dem im ungefärbten Präparat die Enden stärker lichtbrechend, bzw. im gefärbten nur diese mit dem Farbstoff tingirt erschienen. Mit diesem Vorgang geht zugleich ein Verlust der Kapsel Hand in Hand. Ganz ähnliche Gebilde sah ich bei einem meiner Pneumokokkenstämme, den ich über 1 Jahr lang zu Versuchen gezüchtet hatte, vorübergehend auch in den Culturen auftreten. Dabei war aber die Virulenz des betreffenden Stammes noch erhalten und durch geeignete Erhöhung derselben mittelst besonderer, später näher zu schildernder Thierpassagen gelang es, die Involutionsformen aus der Cultur verschwinden zu lassen. Hingegen wurde in alten, sich selbst überlassenen Culturen, deren Virulenz verloren gegangen war, zwar eine Aenderung der Conturen und granulöser Zerfall der Individuen, aber niemals das Vorkommen bacillenähnlicher Formen beobachtet.

¹ Stoltz, *Centralblatt für Bakteriologie*. Abth. I. Bd. IV. S. 337.

² Michaelis, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1902. Nr. 20.

Das Verhalten der Pneumokokken in der
Cultur

ist bekannt, und hierin zeigten die von uns untersuchten Stämme im Allgemeinen grosse Uebereinstimmung. Bei allen fand sich die allbekannte Wahrnehmung bestätigt, dass sie bei einer schwach alkalischen Reaction des Nährmediums am besten gedeihen, obwohl sie sich auch noch eine schwach saure oder stark alkalische Reaction gefallen lassen. Auch fand ich bestätigt, dass der *Pneumococcus* zwar die Gegenwart von Sauerstoff vorzieht, aber auch anaërob fortkommen kann, denn bei Anlegung von Stichcultur in Agar oder Gelatine sieht man auch Wachstum in Form einzelner Colonieen längst des Stichcanals auftreten. — Als Regel stellte es sich heraus, dass diejenigen Stämme, welche in der Cultur am üppigsten wuchsen, die geringste Virulenz besaßen und umgekehrt, eine auch bei anderen Bakterien beobachtete Erscheinung. In flüssigen Medien, insbesondere dem gebräuchlichsten derselben, der Bouillon, kamen die Unterschiede der Wachstumsenergie in dem Grade der durch die Bakterien verursachten wolkigen Trübung zum Ausdruck. Auf festen Nährböden stellten sich die Unterschiede so dar, dass die weniger virulenten Stämme compact zusammenhängende grauweisse Beläge bildeten, während die virulenteren in Form durchscheinender Ueberzüge wuchsen. Die Farbe derselben war entweder ein zartes Perlgrau oder sie waren ganz wasserklar wie Thautropfen, mit denen man sie öfters verglichen hat. Letztere Wachstumsform zeigte sich aber immer nur vorübergehend kurz nach der Isolirung und ging nach 2 bis 3 Generationen in die erwähnte perlgraue Form über, die manchmal auch einen grünlich metallischen Schimmer zeigte. Diese Unterschiede der Erscheinungsformen traten am deutlichsten bei Verwendung von Agarnährböden hervor. Bei Wachstum auf erstarrtem Serum trug die Eigenfarbe dieses Nährbodens dazu bei, die Unterschiede zu verwischen und auf Gelatine wuchsen die Pneumokokken im Allgemeinen spärlich, das heisst in Form von äusserst kleinen, leicht gelblichen, weit aus einander liegenden Colonieen. Dieses spärliche Wachstum auf Gelatine rührt jedenfalls davon her, dass der *Pneumococcus* als ein pathogener Mikroorganismus an eine höhere Temperatur angepasst ist. Zwei von meinen Stämmen konnten überhaupt auf Gelatine auch bei einer Temperatur von 27 bis 28° C. nicht zum Wachstum gebracht werden. Die übrigen wuchsen auch bei dieser relativ hohen Temperatur nur in der gekennzeichneten spärlichen Weise, und bei noch niedrigeren Temperaturen (Zimmertemperatur 18° C.) waren bloss noch Spuren von Wachstum bemerkbar. Eine Mittelstellung nahmen drei

Stämme ein, welche bei Zimmertemperatur gar nicht mehr wuchsen, bei 27 bis 28° dies zwar noch thaten, aber nach bedeutend längerer Zeit als die anderen, nämlich in 2 bis 3 Tagen. Eine Ausnahme bildete nur der von mir in einer besonderen Abhandlung¹ beschriebene Pneumococcus, welcher schon nach seinem Vermögen, Gelatine zu verflüssigen, eine Sonderstellung einnahm und der auch noch bei Temperaturen von 9° C. im Eisschrank üppiges Wachsthum zeigte. Eine Beziehung dieser Wachsthumsvielfachheit zur Herkunft oder zur Virulenz der Stämme konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnte eine solche Beziehung zu der durch manche Stämme verursachten Gerinnung der Milch, welche für alle ein gutes Nährmedium darbot, gefunden werden. Den Pneumococcus auf Kartoffeln zu züchten, ist uns nicht geglückt.

Aus diesen Erörterungen geht zur Genüge hervor, dass beim praktischen Arbeiten mit Pneumokokken am besten Bouillon- oder Agarnährböden von schwach alkalischer Reaction Verwendung finden, und dass auch gegen erstarrtes Serum nichts einzuwenden ist. Auf durchsichtigen festen Nährböden — Agar oder Gelatine — sehen die Pneumokokkencolonieen bei schwacher Vergrösserung körnig aus, sind von kreisrunder Form und bieten ausser einem dunkleren Centrum und einer etwas helleren Randzone keine Besonderheiten.

Im Einzelnen wurden verschiedene, theils von anderen Autoren angegebene Nährböden geprüft, theils neue Zusammensetzungen versucht. Nachgeprüft wurde z. B. die von Guarnieri² angegebene Agargelatine mit hohem Peptongehalt. Dieser Nährboden, den man auch der Bruttemperatur aussetzen kann, bewährte sich in unseren Versuchen insofern, als er den Pneumokokken sehr günstige Wachstumsbedingungen darbot, und die Einzelcolonieen darin eine aussergewöhnliche Grösse erreichten. Bemerkenswerth ist auch, dass auf diesen Nährböden alle Stämme, die überhaupt Neigung zur Kettenbildung zeigten, ganz besonders lange und verschlungene Ketten bildeten.

Diesen Vorzügen stehen andererseits einige erhebliche Nachtheile gegenüber, die das Arbeiten mit dem erwähntem Nährmedium zu einem unangenehmen machen: kann man sich desselben doch nicht wie des Agars zur Anlegung von Strichculturen bedienen, da es bei Brüttemperatur zu einer halbflüssigen Masse zusammensickert. Doch kann man dem Uebelstand durch Anlegung von Sticheulturen, in denen der Pneumococcus,

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd XXXII. S. 573.

² Guarnieri, *Atti dell' Accad. med. di Roma*. 1888. Vol. IV. Vgl. Flügge, *Die Mikroorganismen*. Bd. II. S. 118.

wie bereits erwähnt, längs der Impfstiche wucherte, noch abhelfen. Der grösste Nachtheil dieses Nährbodens ist aber der, dass man die Abimpfung niemals vornehmen kann, ohne dabei grosse Theile des Substrates mit auf die anzufertigenden Präparate, oder die einem Versuchsthiere einzuspritzende Aufschwemmung hinein zu bekommen.

Ebenso wenig erwies sich die von Carnot und Fournier¹ empfohlene Benutzung von Hirnsubstanz zur Bereitung von Agar in unseren Versuchen von Nutzen. Allerdings hatten diese Autoren mit Kaninchen- und Menschengehirn gearbeitet, während wir das leichter erhaltbare Kalbsgehirn benutzten, in dem Glauben, dass dies für den gewünschten Zweck keinen Unterschied machen könne.

Ein solcher mit Gehirnsubstrat hergestellter Agar filtrirt sehr schwer und büsst bei der Filtration seinen Nährwerth in so hohem Maasse ein, dass nur noch spärliches Wachsthum darauf eintritt. Verzichtet man andererseits auf die Klärung des Agars durch Filtration, so wird derselbe gerade bei dieser Art der Herstellung besonders trübe und dadurch unangenehm.

Eines von dem üblichen völlig abweichenden Verfahrens zur Herstellung eines für den Pneumococcus geeigneten Nährbodens bedienten sich Adolph Smith² und Grawitz und Steffen³, indem sie pneumonisches Sputum durch einstündiges Erhitzen auf 65° C. zur Erstarrung brachten, dasselbe dann fractionirt sterilisirten und darauf Culturen anlegten. Doch machten schon die Erfinder dieser Methode darauf aufmerksam, dass sehr mucinreiche Sputa bei Erhitzung leicht flüssig, statt hart werden. Uns ist es überhaupt niemals geglückt, eine Verflüssigung trotz sorgfältigster Behandlung der Sputa zu vermeiden. Wir versuchten dann, veranlasst durch das üppige Wachsthum der Pneumokokken auf dem Guarnieri'schen Nährboden, ob dies nicht vielleicht nur dessen hohem Peptongehalt zu verdanken sei und stellten, um den Nachtheil des halbflüssigen Nährsubstrats zu vermeiden, einen Agar von erhöhtem Peptongehalt her. Auf diesem konnten wir denn auch ein reichlicheres Wachsthum beobachten und ganz besonders dann, wenn dieses Medium noch mit Blut (Kaninchen- oder Menschenblut) bestrichen wurde. Ein solcher Blutzusatz erwies sich übrigens auch bei allen anderen Nährböden von Vortheil, namentlich zeigten sich dann die Kapseln besonders schön ausgebildet. Für gewöhnliche Zwecke genügt es indessen vollständig, wenn man sich des

¹ Carnot et Fournier, *Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol.* T. XII. p. 357.
— Ref. Baumgarten's *Jahresbericht*. 1900. Bd. XVI. S. 37.

² Adolph Smith, *Centralblatt für klin. Medicin.* 1893. S. 625.

³ Grawitz u. Steffen, *Centralblatt für Bakteriologie.* 1894. Bd. XVI. S. 257.

zur Züchtung des *Pneumococcus* altbewährten Glycerinagars, und zwar von der erwähnten schwach alkalischen Reaction bedient, da ein solcher einfach herzustellen ist und die erwähnten complicirteren Medien nur in der Ueppigkeit der darauf gewachsenen Culturen, aber nicht in deren Haltbarkeit und Virulenz sich überlegen zeigten. Zur Erhaltung der Virulenz, für die man schon alle möglichen Auskunftsmitel angenommen hat, fanden wir ein sehr einfaches Verfahren als besonders geeignet; wir benutzten nämlich die Coagula von steril in einem Erlenmeyer'schen Kölbchen aufgefangenem normalem Kaninchenblut, dessen abgesetztes Serum anderem Zwecke diente, zur Anlegung von Pneumokokkenculturen und fanden, dass sich alle darauf gezüchteten Stämme ohne weitere Umzüchtung $4\frac{1}{2}$ Monate lang lebensfähig und vollvirulent erhielten. Der gewachsene Pilzrasen ist allerdings auf diesem Substrat, dessen rothbraune, in's Grünliche schimmernde Farbe er annimmt, sehr schwer erkennbar.

Ueber das Wachsthum der Pneumokokken in flüssigem Normalserum soll in einem besonderen Capitel, wo von den Beziehungen der Pneumokokken zum Serum überhaupt die Rede sein wird, Näheres mitgetheilt werden.

Ueber die Virulenz

der Pneumokokken weiss man schon lange, dass sie grossen Schwankungen unterliegt. Im Besonderen ist der Unterschied in der Virulenz zwischen Speichel- und Pneumonie-Pneumokokken schon Fränkel aufgefallen, und es bedurfte, wie Eingangs bereits erwähnt, erst eines intensiveren Studiums, bevor man darüber zur Klarheit kam, dass der die Schleimhäute gesunder Individuen bewohnende Mikroorganismus und der Erreger der Pneumonie ein und derselben Bakterienart angehörten. Späterhin lernte man dann den *Pneumococcus* als einen viel weiter verbreiteten Krankheitserreger beim Menschen kennen: man hat diese Bakterien in Entzündungsprocessen verschiedener Art, so bei Pleuritis, Pericarditis, Meningitis, Gehirnabscessen, Arthritis und Otitis media, aber auch als Erreger septicämischer Infectionen gefunden. Hat man doch sogar in Fällen von croupöser Pneumonie die specifischen Mikroorganismen öfter aus dem Blut der betreffenden Kranken gezüchtet.

Wir hatten uns nun zur Aufgabe gemacht, eine Reihe verschiedener Pneumokokken zu untersuchen, namentlich in der Absicht, uns darüber Klarheit zu verschaffen, ob, wie Manche wissen wollen, es verschiedene Arten von Pneumokokken gäbe, oder in welcher Beziehung die aus verschiedenen Quellen stammenden Pneumokokken sonst zu einander ständen.

Pneumokokken aus menschlicher Septicämie standen uns nicht zu Gebote, dagegen hatten wir eine Anzahl aus typischen Pneumonie-fällen isolirt, ferner solche aus tuberculösem Sputum, aus Meningitis, Gehirnabscessen, Otitis media, Panophthalmitis, sowie die leicht zu erhaltenden Speichelkokken gesunder Personen. Nach dieser Eintheilung liesse sich zwar im Allgemeinen der Satz aufstellen, dass die Virulenz der Pneumokokken nach ihrem Ursprung eine verschiedene ist, indem die Pneumoniekokken die höchste, die aus Sputum (tuberculösem und normalem) und aus frischen entzündlichen Processen eine mittlere, und die aus alten Eiterherden (Empyem, Gehirnabscessen) gar keine Virulenz besitzen. Im Einzelnen kommen jedoch von dieser Regel vielfache Ausnahmen vor; so fanden wir auch Pneumonie-Pneumokokken ohne Virulenz, ebenso einen avirulenten Stamm von Meningitis, ferner konnten wir aus 2 Fällen von Otitis media je einen hochvirulenten und einen avirulenten Stamm isoliren, wogegen die Speichelkokken mehr eine konstante Virulenz mittleren Grades besaßen. Hierzu sei noch bemerkt, dass die Pneumokokken aus tuberculösem Sputum besonders leicht dem Absterben bei der künstlichen Züchtung ausgesetzt schienen, so dass es überhaupt immer nur gelang, einen von etwa 4 bis 5 solchen Stämmen dauernd zur weiteren Untersuchung am Leben zu erhalten. — Die Virulenz der Pneumokokken richtet sich natürlich auch nach der Art der inficirten Versuchsthiere und dem Vorgang der Infection. Wir wissen seit den Untersuchungen Gamaleia's¹, dass am empfänglichsten Mäuse und Kaninchen, weniger empfänglich Meer-schweinchen, Schafe und Hunde sind, während Geflügel bisher für un-empfänglich galt. Letzteres konnten wir jedoch nicht bestätigen, denn es gelang uns wiederholt, mit einem unserer virulentesten Stämme eine tödtliche Infection bei Tauben hervorzurufen. Doch sind diese Beziehungen zwischen Virulenz und Versuchsthier mitunter ganz specifisch, da es Pneumokokkenstämme giebt, die nur für Mäuse virulent, für Kaninchen dagegen avirulent sind und umgekehrt. Der Infectionsmodus spielt insofern eine Rolle, als, wie bei den meisten Bakterien die intravenöse Ein-verleibung am wirksamsten und die intraperitoneale wieder der subcutanen überlegen ist. Bei den meisten der von uns untersuchten Stämme wurde die genaue Feststellung des Virulenzgrades gegenüber Mäusen als dem am leichtesten in grösseren Mengen zu bearbeitenden Versuchsthier unter-nommen, wobei ausschliesslich die intraperitoneale Infection angewandt wurde. Bei diesen Versuchen zur Virulenzbestimmung wurden durch-gängig 24 Stunden alte Bouillonculturen aus dem Herzblut der

¹ Gamaleia, *Annales de l'Institut Pasteur*. T. II. p. 440.

zuletzt getödteten Thiere benutzt; in den Fällen, wo Bouillonculturen sich von vornherein als wirkungslos erwiesen, bedienten wir uns der Aufschwemmungen von Agarculturen, um so noch grössere Bakterienmengen ohne allzu grosse Erhöhung der zur Suspension nöthigen Flüssigkeitsmenge einverleiben zu können. Doch sei bemerkt, dass auch eine derartige Steigerung der einverleibten Bakterienmenge bei Stämmen, deren Bouillonculturen der Virulenz ermangelten, keine Wirkung hatte. Wir konnten solche Stämme daher mit gutem Recht als avirulent bezeichnen. Dies waren unter 24 Stämmen im Ganzen 1 Stamm aus Pneumonie, 1 aus Otitis media, 2 aus Empyem, 2 aus Meningitis und 1 aus Gehirnabscess. Führt hingegen die Einspritzung einer jungen Bouilloncultur zum Tode des Versuchsthieres, so wurden unter fortwährender Verringerung der Dosis weitere Thierpassagen vorgenommen, bis eine Grenze erreicht war, bei der die Versuchsthiere nicht mehr starben. Traf dies ein, so wurde noch eine Reihe von Thieren mit der zuletzt tödtlichen Dosis geimpft und dann nach Anlegung neuer Bouillonculturen aus diesen Thieren die Dosis weiterhin versuchsweise herabgesetzt, um zu sehen, ob die Virulenz der betreffenden Pneumokokken durch die letzte Thierpassage nicht eine weitere Steigerung erhalten hätte. Es gelang uns nämlich dadurch, bei einer Reihe von Stämmen die Virulenz gegenüber Mäusen erheblich zu steigern und das Verfahren wurde in der erwähnten Weise fortgesetzt, bis von den Versuchsthiere keines mehr der Impfung erlag. Die bei der vorangegangenen Infection noch tödtliche Dosis wurde dann als Dosis letalis minima bezeichnet. Um mit einer constanteren Maasseinheit zu arbeiten, bedienten wir uns auch bei Bouillonculturen der Maassöse und schwemmten das damit entnommene Material in 1^{cem} steriler Bouillon auf. Bei der geringsten tödtlichen Dosis angelangt, wurde die Zahl der in der Maassöse enthaltenen Bakterien durch die Anlegung von Agarplatten und Zählung der aufgegangenen Colonieen festgesetzt. Diese nach zahlreichen Thierpassagen in der geschilderten Weise erreichte und durch weitere Passagen nicht mehr zu steigernde, zur Tödtung einer Maus erforderliche Menge betrug bei den Speichelkokken, deren Virulenz eine, wie schon gesagt, ziemlich constante war, gerade eine solche Maassöse, hingegen schwankte die tödtliche Dosis bei den Pneumonie-Pneumokokken zwischen $\frac{1}{2_{000\,000}}$ (entsprechend 5 Colonieen) und $\frac{1}{10\,000}$ (entsprechend 200 Colonieen derselben Oese). Nur bei dem in jeder Beziehung eine Ausnahme bildenden, bereits erwähnten, Gelatine verflüssigenden Pneumococcus war die Virulenz zwar vorhanden, aber doch erheblich geringer. Die kleinste tödtliche Gabe betrug nämlich $\frac{1}{2}$ ^{cem} Bouilloncultur.

Bei den aus entzündlichen Processen stammenden Pneumokokken,

die, wie ebenfalls schon bei der allgemeinen Besprechung erwähnt, eine mittlere Stellung zwischen den genannten einnahmen, schwankte die tödtliche Menge, soweit sie nicht überhaupt avirulent waren, zwischen einer ganzen und $\frac{1}{50}$ Oese.

Die bei den Pneumonie-Pneumokokken von uns gefundene noch tödtliche Gabe von $\frac{1}{2\,000\,000}$ Oese dürfte wohl der höchsten, bisher überhaupt festgestellten Virulenz dieses Mikroorganismus entsprechen, denn sie findet in der Litteratur nur in den Angaben Eyre und Washbourn's¹ ein Gegenstück, indem diesen Autoren zu Folge $\frac{1}{1\,000\,000}$ Oese eines Pneumococcus auf Kaninchen noch tödtlich wirkte. Es handelte sich dabei ebenfalls um einen Pneumonie-Pneumococcus. Ueber die Vergleichung mit Pneumokokken aus anderen Quellen liegen keine Angaben vor.

Selbstverständlich spielt für die Beurtheilung der Virulenz auch die Zeit, innerhalb deren die Versuchsthiere der Infection erliegen, eine Rolle. In unseren Versuchen starben die Mäuse, wenn sie mit höchvirulenten Stämmen geimpft waren, selbst nach den kleinsten Gaben stets innerhalb 12 bis 16 Stunden, bei Stämmen von mittlerer Virulenz bedurfte es 24 Stunden und nur in Ausnahmefällen vergingen 2 bis 3 mal 24 Stunden bis zum Untergange der Versuchsthiere an Pneumokokkeninfection; der erwähnte hochvirulente Stamm von Eyre und Washbourn tödtete in der angegebenen kleinsten Menge die Mäuse innerhalb 4 Tagen.

Da bei den aus menschlicher Pneumonie gewonnenen Pneumokokken von mehreren Autoren Unterschiede in der Virulenz während der einzelnen Stadien dieser Krankheit angegeben worden sind, so versuchten wir, auch dieser Frage näherzutreten. Indessen stellte sich nun dabei eine Schwierigkeit entgegen, deren Ueberwindung uns nicht gelungen ist. Wenn wir nämlich, um die Virulenz der Pneumokokken bei der Entnahme derselben unmittelbar aus dem Sputum ohne jegliche Erhöhung durch Thierpassagen zu bestimmen, die Isolirung des Bacteriums direct aus dem Auswurf versuchten, so hatte, bevor uns dies, mittels Ausstrich- oder Plattencultur, gelang, die Virulenz des Bacteriums bereits derartig abgenommen, dass, wenn die Reincultur erhalten war, die Versuchsthiere daran nicht mehr zu Grunde gingen, was wohl bei den Thieren der Fall war, die mit demselben Sputum geimpft waren, aus dem die Reincultur stammte. Da wir dieses Verfahren in 17 Fällen mit dem gleichen negativen Resultate versuchten, mussten wir auf eine derartige Vergleichung der Virulenz in den verschiedenen Stadien der Pneumonie verzichten. — Da nun in der Bakteriologie kein einziges Beispiel dafür bekannt ist, dass ein virulenter Organismus diese Eigenschaft bei einer künstlichen Züchtung

¹ Eyre and Washbourn, *Journ. of Path. and Bact.* Vol. V. p. 13.

von nur 3 bis 5 tägiger Dauer verliert und der *Pneumococcus* sonst, wenn er auch nur einmal durch den Thierkörper gegangen ist, seine Virulenz viel länger in den Culturen zu bewahren pflegt, so müssen wir auf Grund unserer Versuche annehmen, dass der *Pneumococcus* im menschlichen Sputum eine hohe Virulenz von vornherein nicht besitzt und er erst beim Durchgang durch den Thierkörper aus dem Auswurf zu einem Organismus von den bekannten pathogenen Eigenschaften wird.

In diesen Ausführungen haben wir bereits die Frage der Erhaltung der Virulenz des *Pneumococcus* gestreift. Auch diese Frage haben wir zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht, deren Ergebnisse wir im Folgenden mittheilen. Es ist bekannt, dass der *Pneumococcus* ein Mikroorganismus ist, dessen Virulenz in der Cultur sehr rasch abnimmt. Doch liegen in der Litteratur einige Angaben von Autoren vor, denen es geglückt ist, Pneumokokken längere Zeit ohne Vornahme von Thierpassagen, ja sogar ohne Uebertragung auf neue Nährmedien virulent zu erhalten. So gelang es Foà¹ 60 Tage lang, indem er das Blut pneumokokken-inficirter Thiere nach 24stündigem Aufenthalt bei Brüttemperatur im Dunkeln und in der Kälte aufbewahrte. Zu ungefähr demselben Resultate (67 Tage) will Sclavo² durch Aufheben der Milz inficirter Thiere in Glycerin gekommen sein, und die Erhaltung der Virulenz für etwas kürzere Dauer (50 Tage) erreichte er durch Anlegen von Culturen in frischen Hühnereiern. Andere Autoren haben ähnliche Resultate mit noch anderen Methoden erlangt. Wir haben von deren Nachprüfung abgesehen und vielmehr darauf Werth gelegt, die Haltbarkeit der Culturen auf den üblichen Medien zu bestimmen, und sind in der Lage, darüber folgende Angaben machen zu können.

Am geringsten ist die Haltbarkeit von Bouillonculturen; dieselben sterben nach 2 bis 3 Wochen völlig ab. Agarculturen halten sich länger, nämlich 1 bis 1 1/2 Monat, und Culturen auf Glycerinagar sogar 2 bis 2 1/2 Monate und ungefähr ebenso lange Culturen auf Blutagar oder erstarrtem Serum.

Diese Resultate entsprechen also ungefähr denen der italienischen Forscher, oder übertreffen diese sogar. Jedenfalls geht aus unseren Versuchen zur Genüge hervor, dass es zur Erhaltung der Virulenz und der Lebensfähigkeit des *Pneumococcus* für die angegebene Zeit besonderer Methoden nicht bedarf, die üblichen Nährböden vielmehr genügen. Richtig ist allerdings, dass Blut ganz besonders für die Erhaltung des

¹ Foà, *Diese Zeitschrift*. 1893. Bd. XV. S. 369.

² Sclavo, *Annales de l'Institut Pasteur*. 1893. T. VII. p. 221.

Pneumococcus und seiner Virulenz günstig ist. Es gelang uns nämlich, wie schon erwähnt, auf den Coagulis von steril entnommenem, normalen Kaninchenblut, dessen Serum anderen Zwecken gedient hatte, eine grössere Anzahl unserer Pneumokokkenstämme über 4 Monate vollvirulent zu erhalten. Es ist dies eine relativ sehr lange Zeit für die Aufbewahrung von Pneumokokken ohne Umzüchtung, wenngleich sich in der Litteratur 2 Angaben finden, denen zu Folge die Erhaltung der Pneumokokken ohne Umzüchtung über ein Jahr lang geglückt ist. Die eine dieser Angaben stammt von G. Bernabeo¹, die andere von Bezançon und Griffon², die ebenfalls Blut, aber im defibrinirten Zustande und in Verdünnung mit Ascitesserum anwandten.

Unsere obigen Angaben sind noch dahin zu ergänzen, dass natürlich die Lebensfähigkeit der Culturen bei den einzelnen Stämmen verschieden ist, und zwar lässt sich die allgemeine Regel aufstellen, dass je virulenter ein Pneumokokkenstamm ist, desto besser und länger sich auch seine Cultur hält; was auch Weichselbaum mit Recht in seinem Referat über die Pneumokokken im Handbuch von Kolle-Wassermann hervorhebt. Dem Absterben der Culturen pflegt ein Verlust der Virulenz voranzugehen, nach welchem immer noch eine Weiterzüchtung von 3 bis 5 Generationen möglich ist.

Nach diesen Angaben über die Virulenz der Pneumokokken und ihre Erhaltung müssen wir bei der Besprechung der

Pathologischen Veränderungen

verweilen, welche der genannte Mikroorganismus im Körper geeigneter Versuchsthiere hervorruft.

Alle bisherigen Untersucher stimmen darin überein, dass die am meisten empfänglichen Thiere — Kaninchen und Mäuse — gleichviel in welcher Weise inficirt, an einer allgemeinen Septicämie zu Grunde gehen und man bei der Section den Krankheitserreger im Herzblute und in der Milz am reichlichsten findet. In Bezug auf Einzelheiten des Sectionsbefundes lauten indessen die Angaben der Autoren verschieden, namentlich über die Beschaffenheit der Milz; welche bald als weich und hyperämisch, bald als fibrös und hart beschrieben wird. Foà³ unterscheidet darnach sogar verschiedene Rassen des Pneumococcus, während Banti⁴ der Züchtungsweise des Pneumococcus, ob aërob oder anaërob, die Verschiedenheit der pathogenen Wirkung zuschreibt.

¹ Bernabeo, *Riforma medica*. Vol. XII. Nr. 21.

² Bezançon et Griffon, *Annales de l'Institut Pasteur*. T. XIV. p. 449.

³ Foà, *Diese Zeitschrift*. 1893. Bd. XV. S. 369.

⁴ Banti, *Arch. di anat. norm. e pathol.* 1890. Vol. V. p. 62.

Im Gegensatz zu diesen Autoren habe ich in meinen zahlreichen Versuchen niemals eine harte und fibröse Beschaffenheit der Milz, sondern immer nur ein weiches, blutreiches, wenig vergrössertes Organ gefunden. Im Uebrigen bot die Bauchhöhle nach intraperitonealer Infection das Bild einer ausgedehnten Peritonitis von sero-sanguinolentem (bei Mischinfection mittelst Sputums auch wohl eitrig-sanguinolentem) Charakter. Von den Bauchorganen zeichnen sich ausser der Milz noch die Nieren durch Hyperämie aus. Der Tod der Thiere erfolgte bei jeder Art der Infection unter dem Bilde einer Septicämie mit besonders reichlichem Pneumokokkenbefunde im Herzblut und in der Milz. Bei Kaninchen, weniger bei Mäusen, fand ich auch nach intraperitonealer Impfung mehrmals eine seröse Pericarditis. Bei Impfung in die Lunge von Thieren haben andere Autoren, z. B. Banti¹ umschriebene Pneumonien und Pleuritiden beobachtet, was ich sowohl bei Kaninchen wie bei Mäusen bestätigt fand; auch in diesem Falle erlagen aber die Thiere einer Septicämie. Abscessbildung, wie sie gleichfalls von mehreren Autoren nach subcutaner Impfung als Wirkung zur Allgemeininfection nicht genügender Gaben beschrieben worden ist, habe ich in meinen Versuchen niemals angetroffen, die Thiere starben, wie gesagt, entweder an Septicämie oder sie überlebten die Impfung ohne weitere Krankheitserscheinungen; höchstens zeigte sich nach subcutaner Impfung ein leichtes Infiltrat an der Impfstelle. Eine besondere und nur in einem Falle von mir bei ungenügender Gabe beobachtete Erscheinung war ein ausgedehntes Erysipel der Bauchhaut, welches ausheilte. Hingegen ist es mir nicht gelungen, künstlich ein ausgesprochenes Erysipel durch Pneumokokken zu erzeugen, wie dies Neufeld², Schürmeyer³ und Anderen geglückt ist; einige Male traten allerdings am Kaninchenohr, wo die Oberfläche nach leichter Scarification inficirt wurde, Veränderungen auf, die man allenfalls als erysipelartig ansprechen konnte.

Verhalten der Pneumokokken zum Serum.

Haben wir in den bisherigen Capiteln gewissermaassen die classischen Eigenschaften unseres Bacteriums besprochen, d. h. diejenigen, welche man von jeher zum Gegenstande der Untersuchung zu machen pflegte, und dabei — wie dies aber bei unserer Aufgabe einer möglichst vollständigen Bearbeitung des Pneumococcus nicht zu vermeiden war —

¹ Banti, *Archiv. per le scienze med.* Vol. XIII. Nr. 3.

² Neufeld, *Diese Zeitschrift.* Bd. XXXVI. S. 254.

³ Schürmeyer, *Centralblatt für Bakteriologie.* Bd. XXV. Nr. 5 u. 6. S. 183.

manches schon Bekannte wiederholen müssen, so haben wir doch andererseits auch den Anforderungen der modernen Wissenschaft Rechnung getragen, welche den Beziehungen zwischen Bakterien und Immunserum nachzugehen und die dabei gewonnenen Ergebnisse zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken nutzbar zu machen sucht. An hierauf gerichteten Bestrebungen hat es zwar auch bei dem Studium des Pneumococcus bisher schon nicht völlig gefehlt. Indessen ist die Zahl derer, die sich damit beschäftigt haben, klein und die Summe der von ihnen mitgetheilten Erfahrungen noch nicht bedeutend. Es rührt dies unseres Erachtens daher, dass die meisten der betreffenden Forscher sich vielfach mit den Beziehungen des Pneumococcus zu menschlichem Serum als dem praktisch wichtigsten beschäftigt haben, ohne dass vorher genügende Erfahrungen an dem leichter und umfassender zu bearbeitenden Material der Laboratoriumsthiere vorlagen. Wir hielten es daher für rathsam, hier einzusetzen und zunächst das Verhalten der Pneumokokken gegenüber dem Serum geeigneter Versuchsthiere, und zwar zunächst gegenüber normalem und dann auch gegen Immunserum zu prüfen.

Auf das verschiedene Verhalten des Pneumococcus gegenüber normalem und Immunserum hat bereits Metschnikoff¹ hingewiesen, indem er darauf aufmerksam machte, dass der Pneumococcus in Immunserum in Form länger verschlungener Ketten, in normalem Serum hingegen stets in Gestalt von einzelnen Individuen oder höchstens kürzeren Ketten zum Wachsthum gelangte, eine Erfahrung, welche später von Bezançon und Griffon², sowie von Pane³, Huber⁴ und Neufeld⁵ bestätigt wurde. Diese Verschiedenheit zwischen den beiden Serumarten kommt im Verhalten des Pneumococcus, den letztgenannten Autoren zufolge, auch schon makroskopisch zum Ausdruck, indem sich in normalem Serum eine gleichmässige Trübung wie in Nährbouillon bildet, im Gegensatz zum Immunserum, worin das Wachsthum in Form zusammengeballter, am Boden des Gefässes unterhalb einer klaren Flüssigkeitsschicht liegender Bakterienhaufen statt hat.

Wir begegnen damit auch beim Pneumococcus dem bereits bei den verschiedenen Bakterienarten bekannten und heutzutage in der Bakteriologie eine grosse Rolle spielenden Phänomen der Agglutination.

¹ Metschnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*. T. V. p. 474.

² Bezançon et Griffon, *Ebenda*. T. XIV. p. 444.

³ Pane, *Riforma med.* 1897—1898. — *Centralblatt f. Bakteriologie*. Bd. XXI. S. 664.

⁴ Huber, *Centralblatt für innere Medicin*. 1902. Nr. 17.

⁵ Neufeld, *Diese Zeitschrift*. Bd. XL. S. 54.

Und zwar finden wir diese Agglutination den genannten Autoren zufolge sowohl bei dem in Fällen menschlicher Pneumonie von selbst entstehenden, als bei dem durch Infection geeigneter Thiere künstlich erzeugten Immunserum. Doch liegen hier nach den bisherigen Untersuchungen die Verhältnisse wesentlich anders, als wie es uns z. B. von dem bekanntesten und ältesten Object des Agglutinationsphänomens, nämlich vom Typhusbacillus her geläufig ist. Denn während das letztgenannte Bacterium von jedem unverdünnten Normalserum agglutiniert zu werden pflegt und sogar bei menschlichem Serum ein Agglutinationswerth von 1:20 bis 1:30 noch als normal angesehen wird, fanden alle bisherigen Beobachter beim Pneumococcus die Agglutinationsgrenze nicht etwa eines normalen, sondern eines Immunserums wesentlich niedriger liegend, d. h. bei Verdünnungsgraden, deren Wirksamkeit man beim Typhus noch im Bereich oder wenigstens an der Grenze des Normalen liegend anzusehen gewöhnt ist, ja manche der genannten Untersucher konnten sogar nur bei Anwendung unverdünnten Immunserums Agglutinationserscheinungen auslösen.

Der höchste Werth ist bisher beim menschlichen Serum, und zwar bei pneumoniekranken Kindern durch Jehle¹ vor nicht langer Zeit gefunden worden. Dieser Werth betrug 1:160. Erheblich geringer war die Agglutinationsfähigkeit der von Neufeld² untersuchten menschlichen und Thiersera, von denen bereits ein im Verhältniss von 1:60 agglutinirendes als stark wirkend bezeichnet wird. Darnach kommen die von Bezançon und Griffon³ durch Immunisirung von Kaninchen erhaltenen Werthe von 1:50, und noch geringer sind die von Pane⁴) angegebenen, der bei Eselserum ein Verhältniss von 1:30, Kuhserum aber bei 1:25 und Kaninchenserum nur bei 1:15 agglutinirend fand. Ueber das Verhalten von menschlichem Serum liegen aus neuester Zeit noch Angaben von Gargano und Fattori⁵ vor, welche im Gegensatz zu den höheren Werthen Jehle's nur eine Agglutination von 1:10 feststellen konnten. — Ein anderes Moment, welches das Agglutinationsphänomen beim Pneumococcus von dem uns bei dem Typhusbacillus bekannten unterscheidet, ist die zu seiner Auslösung nöthige Zeitdauer. Während man nämlich bei diesem gewöhnt ist, mit einem schnellen Eintreten der Agglutination zu rechnen und für praktische Zwecke eine Einwirkung von $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden bei Brüttemperatur als Grenze des Versuches an-

¹ Jehle, *Wiener klin. Wochenschrift*. 1903. Nr. 32.

² Neufeld, *Diese Zeitschrift*. Bd. XL. S. 54.

³ Bezançon et Griffon, *Société d. Biol.* Juin. 5. — *Sem. méd.* p. 217.

⁴ Pane, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXI. S. 664.

⁵ Gargano e Fattori, *Rivista critica di clinica med.* 1903. Nr. 12—15.

zunehmen pflegt, haben es die bisherigen Untersucher für nöthig gefunden, das Wachsthum des Pneumococcus in dem betreffenden Serum, d. h. einen Zeitraum von 15 bis 24 Stunden abzuwarten. Bezançon und Griffon¹ sagen in einer ihrer Arbeiten ausdrücklich, dass die bei Typhus übliche Widalsche Technik beim Pneumococcus nicht anwendbar sei, sondern in der eben angegebenen Weise verfahren werden müsse.

Mit Rücksicht auf diese Angaben haben wir uns zunächst derselben Versuchsanwendung bedient und den Pneumococcus in normalem und Immunserum sich selbst überlassen. Dabei stellte sich denn zunächst heraus, dass, wie von genannten Forschern richtig beobachtet worden war, die Pneumokokken im Allgemeinen im unverdünnten Immunserum agglutiniert wurden, während sie von normalem Serum nicht weiter beeinflusst wurden, sondern sich gleichmässig darin entwickelten. Indessen ändern sich diese Verhältnisse sofort, wenn man statt des Kaninchenserums, an welchem die erwähnten Beobachtungen gemacht worden waren, ein stärker wirkendes Serum, nämlich Hammelserum anwendet. Dann kann man die Agglutination in der geschilderten Weise auch bei normalem Serum, und zwar nicht bloss in nur unverdünntem Zustande, sondern sogar noch in Verdünnungen ziemlich hohen Grades eintreten sehen; der Unterschied zwischen normalem und Immunserum ist also auch für den Pneumococcus kein absoluter, sondern — wie bei Typhus — nur ein gradueller.

Der mikroskopische Befund, welchem das geschilderte makroskopische Aussehen bei positiver Agglutination entspricht, war eine deutlich vermehrte Neigung des Pneumococcus zur Kettenbildung, wie dies schon Metschnikoff erkannt hatte, wogegen man bei gleichmässiger Trübung des Serums genau wie in einer Bouilloncultur nur einzelne Diplokokken antraf. Dieser Unterschied kam sogar bei denjenigen unserer Stämme zum Ausdruck, welche, wie in dem ersten Capitel erwähnt, ein besonders ausgebildetes Kettenwachsthum von vornherein zeigten, denn bei solchen Stämmen wurden die Ketten in agglutiniertem Zustande der Bakterien noch länger und verschlungener. Indessen sei zugegeben, dass sich, wie Bezançon und Griffon² behaupten, das Auftreten der Agglutination mikroskopisch bei den Stämmen ohne Kettenbildung besser beurtheilen lässt. Man konnte dann unter dem Mikroskop deutlich verfolgen, wie die einzelnen Diplokokken zu Ketten zusammentraten und diese Ketten sich dann kreuzweis über einander

¹ Bezançon et Griffon. Ref. Baumgarten's *Jahresbericht*. 1900. Bd. XVI. S. 41.

² Bezançon et Griffon, *Annales de l'Institut Pasteur*. T. XIV. p. 449.

lagerten, bis dass aus etwa je 12 bis 15 solcher Ketten eigenthümliche und charakteristische sternförmige Figuren entstanden. Beim weiteren Fortschreiten des Agglutinationsphänomens traten dann immer mehr Ketten hinzu, so dass schliesslich aus den eben beschriebenen Sternbildungen unförmige Klumpen entstanden, wie sie als Ausdruck der Agglutination von den früheren Beobachtern, die nur dieses Endstadium gesehen hatten, beschrieben worden sind.

Dieses Einhergehen makroskopischer und mikroskopischer Erscheinungen sahen wir indessen nicht bei jedem Agglutinationsversuch, selbst bei Verwendung unverdünnten Immunserums auftreten. Bezançon und Griffon führen diese Thatsache bereits an und Huber spricht von einer Art unvollkommener Agglutination, welche zwar mikroskopisch wahrgenommen werden konnte, makroskopisch jedoch die gleichmässige Trübung des Serums nicht veränderte. Es sei an dieser Stelle bereits bemerkt, dass auch wir einer solchen Erscheinung in unseren Versuchen begegneten, dieselbe aber niemals als positiven Ausfall berücksichtigten, sondern als solchen nur die deutlich mikroskopisch und makroskopisch wahrnehmbare Agglutination gelten liessen. Die Ursache des verschiedenen Ausfalles der Agglutinationsprüfung, auch bei Verwendung unverdünnten Immunserums, findet sich in der Arbeit von Bezançon und Griffon bereits angedeutet. Diese beiden Forscher bemerkten nämlich, dass mitunter menschliches Serum nur mit den von demselben Krankheitsfalle stammenden Pneumokokken, hingegen nicht mit den in ihrem Laboratorium vorhandenen Culturen Agglutination gab, eine Erscheinung, die übrigens Gargano und Fattori in ähnlicher Weise wahrgenommen haben. Bezançon und Griffon wurden durch diese Beobachtung zu der Annahme veranlasst, dass es möglicher Weise verschiedene Varietäten des Pneumococcus geben könne, deren Unterscheidung allein durch das Agglutinationsverfahren möglich sei. Dieser Spur sind wir nun gemäss unseren, zu Beginn der Arbeit auseinandergesetzten Absichten nachgegangen und haben eine grössere Anzahl von thierischen Immunseris auf entsprechend viele Pneumokokkenstämme einwirken lassen. Eine Gruppe solcher Versuche wurde zunächst mit dem Serum immunisirter Kaninchen angestellt. Zum Zweck der Immunisirung bewährte sich folgende Methode: Die Thiere erhielten 6 bis 7, durch einstündiges Erhitzen auf 60° abgetödtete und in Bouillon (oder steriler Kochsalzlösung) aufgeschwemmte Agarculturen — es war dies die höchste ohne Schaden für die Thiere anwendbare Einzeldosis — in einer Sitzung in die Ohrvenen eingespritzt. Dann wurde nach 8 bis 10 Tagen aus der Carotis steril Blut entnommen und das so gewonnene Serum zu Versuchen benützt. Eine Lösung von Blut-

farbstoff im Serum, welche beim Absetzen zuweilen vorkommt, störte die Agglutinationsversuche durchaus nicht, wie andere Autoren angeben, wenn es auch natürlich angenehmer ist, mit einem klaren Serum zu arbeiten. Von dem so gewonnenen Serum wurden Verdünnungen mit steriler Kochsalzlösung zunächst $\bar{a}\bar{a}$, davon 1 zu 10 hergestellt und in ihrer Wirksamkeit gegenüber einer Reihe von Pneumokokkenstämmen geprüft. Dabei stellte sich nun heraus, dass die Anzahl der beeinflussten Stämme bei Verdünnung $\bar{a}\bar{a}$ partes geringer war, als bei Verwendung des unverdünnten Serums, und bei Verdünnung von 1 zu 10 geringer als bei $\bar{a}\bar{a}$ partes, wobei jedoch ausdrücklich hervorgehoben sei, dass bei den Stämmen, die der Agglutination überhaupt zugänglich waren, die Deutlichkeit der Erscheinung nichts zu wünschen übrig liess. Diese Beobachtung veranlasste uns, zu einem noch höheren Grade der Verdünnung überzugehen und trotz der gegentheiligen Angabe Bezançon's und Griffon's die Widal'sche Technik zur Anwendung zu bringen. Dieselbe bewährte sich denn auch vollkommen, so dass meines Erachtens kein Grund besteht, zur Agglutination von Pneumokokken andere Methoden als die sonst übliche zu benutzen. Im Einzelnen gestaltete sich die Ausführung in der Weise, dass wir unsere Proben gleich nach der Ansetzung des Versuches und von da ab nach Aufenthalt derselben im Brutschrank in kurzen Zwischenräumen mikroskopisch auf das Eintreten der bereits ausführlich beschriebenen Agglutinationserscheinungen controlirten. Diese pflegten sich bei Verwendung unverdünnten Serums und bei Verdünnungen von $\bar{a}\bar{a}$ partes im Verlauf einer halben Stunde, bei Verdünnungen höheren Grades innerhalb 3 bis 4 Stunden, einzustellen, und nach noch längerer Zeit, nämlich 12 bis 15 Stunden war dann die Reaktion auch makroskopisch deutlich, und nur solche Versuche, bei denen die Reaction bis zu diesem Grade verfolgt werden konnte, liessen wir, wie bereits erwähnt, als positive gelten. Waren bei Verdünnung des Serums auf 1 zu 10 nur sehr wenige Stämme der Agglutination zugänglich befunden worden, so blieb, wenn wir noch höhere Grade der Verdünnung anwandten, immer nur ein einziger Stamm übrig, und zwar alle Mal derjenige, mittels dessen die Immunisirung der betreffenden Thiere erfolgt war. Es entspricht diese Beobachtung den bereits angeführten Bezançon's und Griffon's sowie ferner Gargaro's und Fattori's, die bei menschlicher Pneumonie das Serum gegenüber dem von demselben Kranken stammenden Pneumococcus am wirksamsten fanden. Dieser sogenannte homologe Stamm erwies sich in unseren Versuchen mit thierischen Immunseris der Agglutination regelmässig in so hohem Grade zugänglich, dass wir Verdünnungen des Serums anwenden konnten, wie sie bei

Agglutinationsversuchen mit Pneumokokken überhaupt noch niemals erreicht worden sind. Die folgenden Tabellen, aus welchen das Ergebniss unserer Agglutinationsversuche mit Kaninchenserum bis zu einer Verdünnung von 1 bis 1000 zu ersehen ist, mögen diese Verhältnisse erläutern.

Versuchs-Serie Nr. I.

A. Kaninchenserum.

Serum I.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Controle
I	+	+	+	+	+	+	+	—	—
II	+	+	+	—	—	—	—	—	—
III	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IV	+	+	+	—	—	—	—	—	—
V	+	+	—	—	—	—	—	—	—
VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	+	+	—	—	—	—	—	—	—
VIII	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IX	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Serum II.

I	+	+	+	—	—	—	—	—	—
II	+	+	+	+	+	+	—	—	—
III	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IV	+	—	—	—	—	—	—	—	—
V	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	+	+	—	—	—	—	—	—	—
VIII	+	+	+	—	—	—	—	—	—
IX	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Serum III.

I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II	+	—	—	—	—	—	—	—	—
III	+	+	+	+	+	+	+	+	—
IV	+	+	—	—	—	—	—	—	—
V	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VI	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VIII	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IX	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Serum IV.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Controle
I	+	+	—	—	—	—	—	—	—
II	+	—	—	—	—	—	—	—	—
III	+	—	—	—	—	—	—	—	—
IV	+	+	+	+	+	+	+	+	—
V	+	+	—	—	—	—	—	—	—
VI	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VIII	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IX	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Serum VIII.

I	+	+	—	—	—	—	—	—	—
II	+	—	—	—	—	—	—	—	—
III	+	+	+	—	—	—	—	—	—
IV	+	+	—	—	—	—	—	—	—
V	+	+	—	—	—	—	—	—	—
VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VII	+	—	—	—	—	—	—	—	—
VIII	+	+	+	+	+	+	+	—	—
IX	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Stamm I, II aus normalem Speichel,

„ III, IV, V, VI aus pneumonischem Sputum,

„ VII aus tuberculösem Sputum,

„ VIII aus Eiter von einer Otitis media.

„ IX aus panophthalmitischem Secret.

Noch schärfer ersichtlich wurden diese so weit festgestellten That-
sachen, als wir dazu übergangen, von Thieren mit einem von Natur
stärker wirksamen Serum, nämlich von Schafen, ein Immunserum
zu gewinnen. Zu diesem Zwecke wurden zwei kräftige und gesunde
Schafe im Gewicht von etwa 70 Pfund in folgender Weise immunisirt.
Sie erhielten zuerst in's Unterhautzellgewebe Einspritzungen von Bouillon-
culturen, die durch einstündiges Erhitzen auf 60° C. abgetödtet waren,
später lebende Agarculturen, von kleinen Dosen ansteigend. Die Thiere
reagirten auf jede Gabe mit einer Temperatursteigerung von ungefähr
1°, die in einem Tage vorüberging. Die Einspritzungen wurden in
Zwischenräumen von 14 Tagen wiederholt, so dass der Zeitraum der
Immunisirung sich über mehrere Monate hin erstreckte. Wenn die
Thiere 2 bis 4 Massenculturen vertragen konnten, wurde die Immuni-
sierung für abgeschlossen erachtet, und es sei noch ausdrücklich bemerkt,

dass beide Thiere sich während der ganzen Immunisirungszeit bei vollkommener Gesundheit befanden. Einige Tage nach vollendeter Immunisirung erfolgte die Entnahme von Blut durch einen Troikart aus der Vena jugularis externa. Die Versuche mit diesem Serum wurden in derselben Weise, wie mit dem Kaninchenserum angestellt. Im Gegensatz zu letzterem wirkte, wie bereits erwähnt, schon das normale Hammelserum — von denselben Thieren vor der Impfung entnommen — auf die Pneumokokken stark agglutinirend, und zwar erwiesen sich bei einer Verdünnung ∞ partes und 1 zu 10 fast alle Pneumokokkenstämme der Agglutination zugänglich, während bei weiteren Verdünnungen die Zahl der beeinflussten Stämme proportional dem Grade der Verdünnung abnahm. Doch wurden durch das eine unserer beiden Hammelsera zwei Pneumokokkenstämme noch bis zu einer Verdünnung von 1 zu 250 angegriffen; wir begegnen damit also einer Wirkung normalen Serums, die alle bisher von Immunseris erreichten Werthe übertrifft. Durch die Immunisirung wurde naturgemäss die ohnehin schon so hohe Agglutinationskraft dieser Sera noch erheblich gesteigert, doch gingen mit der Steigerung auch Veränderungen der agglutinirenden Eigenschaft des Serums Hand in Hand; es war nämlich die Agglutinationskraft des Immunserums gegenüber den Pneumokokken im Allgemeinen unter die des normalen Serums herabgesunken. Gegenüber dem zur Immunisirung verwendeten Stamme jedoch hatte sich wiederum eine Specificität ausgebildet, welche in der Wirksamkeit von Verdünnungen so hohen Grades zum Ausdruck kam, wie sie bisher überhaupt nur bei hochwirksamem Typhus- und Cholera-serum beobachtet worden ist. Die Agglutinationsgrenze betrug nämlich bei einem unserer Thiere 1 zu 5000 und bei dem anderen, welches eine längere und auch höhere Immunisirung durchgemacht hatte, 1 zu 100 000, wofür die nachstehende Tabelle, aus welcher gleichzeitig auch der Rückgang der allgemeinen Agglutinationskraft gegenüber der des Normalserums zu ersehen ist, als Beleg dienen möge.

B. Hammelserum.

Normalserum.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{100000}$	Controle
I	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
II	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IV	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
V	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Normalserum. (Fortsetzung.)

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2500}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{100000}$	Controle
VI	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VIII	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Immunserum III.

I	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IV	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VI	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VIII	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm I, II aus normalem Speichel,
 „ III, IV, V, VI aus pneumonischem Sputum,
 „ VII aus tuberculösem Sputum,
 „ VIII aus Otitis media-Eiter,
 „ IX aus Panophtalmitissecret.

Versuchs-Serie Nr. II.

A. Kaninchenserum.

Serum A.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Controle
A.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Serum B.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Controle
A.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Serum C.

A.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Serum D.

A.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Serum E.

A.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Serum F.

A.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G.	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Serum G.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Controle
A.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Stamm A., B., C. aus tuberculösem Sputum,
„ D., E. aus normalem Speichel,
„ F., G. aus pneumonischem Sputum.

B. Hammelserum.

Normalserum.

Cultur	un- verdünnt	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{100000}$	Controle
A.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Immunserum G.

A.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Stamm A., B., C. aus tuberculösem Sputum,
„ D., E. aus normalem Speichel,
„ F., G. aus pneumonischem Sputum.

Die Frage nach der

Immunität

gegen den Pneumococcus haben wir bereits bei der Behandlung der Agglutination gestreift, da die Immunisirung sonst gegen den Pneumococcus empfänglicher Thiere nöthig war, um die agglutinirenden Sera zu erhalten. Da wir aber in dem Serum auch die Träger der immunisirenden Kräfte zu sehen gelernt haben, so ist es wohl nicht unberechtigt, wenn wir gemäss dem im Eingang des vorigen Capitels Gesagten auch die Lehre von der Immunität zu den der modernen Forschung angehörigen Abschnitten rechnen, wiewohl es an Untersuchungen über die Möglichkeit einer Immunisirung gegen den Pneumococcus überhaupt schon bei den ältesten Forschern nicht gefehlt hat. Hat doch bereits A. Fränkel¹ im Jahre 1886 festgestellt, dass ein Thier, welches eine Pneumokokkeninfection überstanden hat, dadurch gegen die Wirkung grösserer Dosen geschützt ist, eine Wahrnehmung, die noch in demselben Jahre von Foà und Bordoni-Uffreduzzi² bestätigt wurde. Erst später, nämlich im Jahre 1891, gelang es Emmerich und Fawitzky³, sodann Foà und Carbone⁴, mit dem Serum immunisirter Thiere andere Thiere gegen die Pneumokokkeninfection zu schützen. Daraufhin hat es nicht an Versuchen gefehlt, derartiges Immunserum bei Fällen menschlicher Pneumonie anzuwenden. Zuerst waren es G. und F. Klemperer⁵, dann vor Allem Washbourn⁶ unter Verwendung von Pferde- und Pane⁷ unter Verwendung von Eselserum, die behaupteten, ein für Menschen wirksames Heilserum gefunden zu haben; doch hat bis jetzt keines der Pneumokokkensera die darauf gesetzten Hoffnungen erfüllt. Daher ist die Zahl der Forscher, die sich eine Immunisirung gegen den Pneumococcus zur Aufgabe gesetzt haben, auffallend gross und entsprechend auch die Zahl der hierfür angegebenen mehr oder minder complicirten Methoden. Von allen diesen hat sich nur die älteste und einfachste, die schon von den beiden erstgenannten Beobachtern hier angewandt wurde, Eingang verschafft und sich bis zum heutigen Tage erhalten. Wir meinen damit das Verfahren, den Thieren erst durch Hitze abgetödtete oder abgeschwächte und erst später lebende vollvirulente Culturen in

¹ A. Fränkel, *Zeitschrift für klin. Medicin.* 1886.

² Foà e Bordoni-Uffreduzzi, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1886.

³ Emmerich und Fawitzky, *Münchener med. Wochenschrift.* 1891.

⁴ Foà e Carbone, *Gaz. med. di Torino.* 1891. — *Riforma med.* 1891.

⁵ G. u. F. Klemperer, *Berliner klin. Wochenschrift.* 1891.

⁶ Washbourn, *Brit. med. Journ.* 1897.

⁷ N. Pane, *Riforma medica.* 1897—1898. — *Centralblatt für Bakteriologie.* Bd. XXI. S. 664.

steigender Dosis subcutan einzuspritzen. Mittelst dieser Methode, deren sich namhafte Forscher, wie Kruse und Pansini¹, die beiden Klemperer², Levy und Steinmetz³, Mennes⁴, Issaëff⁵ und insbesondere Washbourn bedient haben, ist es uns gelungen, die beiden im vorigen Capitel besprochenen hochwerthigen Schafsera zu gewinnen. Auf dieselbe Weise gelang es uns, Kaninchen so weit zu immunisiren, dass sie die Einspritzung einer ganzen virulenten Agarcultur vertragen konnten. Indessen hat dieses Verfahren gerade bei Kaninchen den grossen Nachtheil, dass es sich über längere Zeiträume (bis mehrere Monate) hin erstreckt und Jeder, der mit Kaninchen gearbeitet hat, weiss, wie leicht diese Thiere verheerenden Seuchen ausgesetzt sind und wie schwer es ist, immunisirte Exemplare mehrere Monate lang lebend und gesund zu erhalten. Daher leistete uns eine in neuerer Zeit viel geübte Methode, da sie in kürzester Zeit die Gewinnung brauchbarer Immunsera ermöglicht, gute Dienste. Dieselbe besteht in einer einmaligen intravenösen Einverleibung einer grösseren Menge abgetödteter Cultur. Das den Thieren nach 8 bis 10 Tagen entnommene Serum besass die im vorigen Capitel besprochenen und tabellarisch wiedergegebenen hohen agglutinirenden Eigenschaften. Die Schutzwirkung dieser Sera wurde nicht untersucht. Für diese Zwecke diente uns allein das Schafserum, nachdem wir vor der Immunisirung dieser Thiere festgestellt hatten, dass das normale Schafserum — ebenso wie übrigens auch das normale Kaninchen-serum — jeder Schutzwirkung völlig entbehrte. Als empfängliches Versuchsthier benutzten wir für diese Untersuchungen weisse Mäuse, weil man mit solchen Thieren am leichtesten grössere Versuchsreihen ansetzen kann. Und zwar umfasste eine solche jedes Mal 16 Mäuse, die folgender Versuchsanordnung ausgesetzt wurden:

Einverleibung } von Serum.

17 Stunden vor der Impfung	2 Stunden vor der Impfung	zu gleicher Zeit mit der Impfung	2 Stunden nach der Impfung
-------------------------------	------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------

Jede dieser Gruppen betraf 3 Stück und bei jeder wurde ein viertes inficirtes Thier ohne Serumbehandlung als Controlthier belassen.

Die Impfung erfolgte intraperitoneal, die Einverleibung des Serums unter die Haut.

¹ Kruse und Pansini, *Diese Zeitschrift*. 1892. Bd. XI.

² Klemperer, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1891.

³ Levy und Steinmetz, *Archiv für experim. Pathol*. 1896. Bd. XXXVII.

⁴ Mennes, *Diese Zeitschrift*. 1897. Bd. XXV.

⁵ Issaëff, *Annales de l'Institut Pasteur*. 1893.

Die Menge des Impfmateri als betrug jedes Mal $\frac{1}{100}$ Oese einer 24stündigen Bouilloncultur, entsprechend dem 20 000 fachen der geringsten tödtlichen Dosis ($= \frac{1}{2000000}$) des betreffenden Stammes.

Die beigegebene Serummenge betrug je $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$ und $\frac{1}{100}$ ccm bei einer der 3 Mäuse.

Das Ergebniss dieser Versuche war folgendes:

Mit Immunserum vor der Infection (gleichviel ob 17 oder 2 Stunden) behandelte Mäuse kamen stets durch.

Mit Immunserum gleichzeitig mit der Infection behandelte Mäuse kamen meist durch.

Mit Immunserum nach der Infection behandelte Mäuse erlagen meist.

Die unbehandelten Controlthiere erlagen stets.

Hierzu sei ausdrücklich bemerkt, dass sich das Immunserum nur dann in der eben erwähnten Weise als wirksam erwies, wenn die Impfung der Versuchsthiere mit demselben Pneumokokkenstamme erfolgte, mittels dessen das Immunserum erzeugt worden war, und dass es jedem anderen Stamme gegenüber sich ebenso unwirksam wie normales Hammelserum zeigte.

Dieses Verhalten der immunisirenden Eigenschaften unseres Serums entsprach also genau der im vorigen Capitel festgestellten Specificität der agglutinirenden Fähigkeit, die ebenfalls immer nur gegenüber dem zur Gewinnung des Serums verwendeten Stamme (dem sogenannten homologen), diesem gegenüber jedoch in auffallend hoher Wirksamkeit nachgewiesen worden war.

Durch diese Ergebnisse wird es erklärlich, weshalb sich noch keines der durch die verschiedenen Methoden gewonnenen „Immunsera“ in der Praxis bewährt hat. Jedoch bleibt für dieses Ziel noch ein Weg zu beschreiten übrig, den Tavel bei der Gewinnung des Streptokokkenserums, wie es scheint, mit Erfolg eingeschlagen hat, nämlich die Immunisirung mit möglichst vielen Stämmen, die Erzeugung eines sogenannten polyvalenten Serums.

Einen Versuch nach dieser Richtung zu machen hatte ursprünglich auch in unserer Absicht gelegen, indessen haben uns äussere Gründe zur Aufgabe dieser Absicht gezwungen und es muss späteren Bearbeitern dieser Frage überlassen bleiben, auf dem angegebenen Wege nach Erfolgen zu suchen.¹

¹ Inzwischen ist ein nach den Angaben von Roemer hergestelltes polyvalentes Serum von der Firma Merck in Darmstadt in Handel gebracht worden.

Anhangsweise sei hier noch einer eigenthümlichen, von Neufeld¹ zur Immunisirung von Kaninchen angegebenen Methode gedacht, die wir ebenfalls in den Bereich unserer Untersuchungen gezogen haben. Der genannte Forscher giebt nämlich an, dass die normale Gallenflüssigkeit von Kaninchen in hohem Maasse die Gabe besitzt, die Pneumokokken aufzulösen und dass die so gewonnene klare Flüssigkeit ein hervorragendes Mittel zur Immunisirung von Thieren derselben Art darstelle. Indessen giebt Neufeld selbst bereits zu, dass es Pneumokokkenstämme geben könne, die diesem Auflösungsprocess nicht unterliegen.

Wir hatten mit dieser Methode gar kein Glück: von unseren Stämmen wurde keiner durch die Galle beeinflusst, sie entwickelten sich im Gegentheil darin sehr üppig, so dass die Flüssigkeit trüb wurde und erwiesen sich bei Aussaat auf Agar im Gegensatz zu den Angaben Neufeld's als lebensfähig.

Zusammenfassendes Ergebniss.

Neuere Arbeiten über den Pneumococcus, über welche in der Einleitung berichtet worden ist, haben es bereits in hohem Grade wahrscheinlich gemacht, dass wir in dem Fränkel-Weichselbaum'schen Diplococcus nicht ein bestimmtes Bacterium, sondern eine Vielheit nahe verwandter Mikroorganismen vor uns haben. Für diese Vermuthung haben wir durch die schon im Beginn unserer Untersuchungen erfolgte Auffindung eines aus menschlicher Pneumonie gezüchteten Diplococcus, der sich durch die Gabe, Gelatine zu verflüssigen, von allen bisher bekannten Pneumokokken unterschied, in seinen sonstigen Eigenschaften jedoch in keiner Weise von deren bekanntem Typus abwich, rascher als wir vermutheten, eine neue Stütze gefunden. Im Uebrigen wiesen die von uns untersuchten Stämme in ihrer Morphologie, Cultur, Pathogenität und Virulenz zwar Unterschiede auf, indessen nicht grössere, als wir sie auch bei anderen Bakterien, die wir deswegen doch für etwas Einheitliches ansehen müssen, zu finden gewöhnt sind. Hingegen hat uns die systematische Untersuchung der Beziehungen zwischen Bakterien und Serum mittels des Immunisierungs- und besonders des Agglutinationsverfahrens mit Sicherheit gezeigt, dass die Verhältnisse bei den Pneumokokken genau denen bei den Streptokokken, mit denen sie ja ohnehin als nahe verwandt zu betrachten sind, entsprechen. Zwar sind Unterschiede der Agglutination verschiedener Stämme durch Immunserum auch beim Typhusbacillus gefunden worden², allein diese

¹ Neufeld, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXIV. S. 454.

² Laubenheimer, *Dissertation*. Giessen 1903.

Unterschiede sind doch nur graduelle und äussern sich keineswegs im Sinne einer spezifischen Beeinflussung des zur Immunisirung verwendeten Stammes. Daher wird es gewiss auch Niemand einfallen, den Begriff des Typhusbacillus in eine Vielheit auflösen zu wollen, was natürlich mit der Abtrennung des Paratyphus, auf dessen Verhältnisse hier einzugehen sich erübrigt, nichts zu thun hat. Bei den Streptokokken — bei den Staphylokokken passt der Vergleich nicht, weil hier die Unterschiede viel deutlicher zu Tage liegen — hat man sich aber schon längst daran gewöhnt, diese Bakterien trotz völliger äusserlicher Uebereinstimmung für eine Vielheit von Arten anzusehen und hat aus dieser Anschauung durch die Gewinnung polyvalenter Sera schon längst praktische Consequenzen gezogen. Ausserdem ist die Richtigkeit dieser Auffassung erst ganz neuerdings durch eine Arbeit von Fischer¹ aus dem Tavel'schen Institut ebenfalls mit Hülfe des Agglutinationsverfahrens endgültig bewiesen worden. Ebensolche Beweiskraft dürfen wir aber auch wohl für die in vorstehender Arbeit veröffentlichten Agglutinations- und Immunisirungsversuche in Anspruch nehmen und man wird sich daher gewöhnen müssen, von jetzt ab nicht mehr von dem „Pneumococcus“, sondern von den „Pneumokokken“, ebenso wie von den „Streptokokken“ zu sprechen. Ob es freilich gelingen wird, auch in diesem Falle der veränderten Anschauung praktische und für die Therapie nutzbare Consequenzen abzugewinnen, muss die Zukunft lehren.

Schlussätze.

1. Die dem Typus des Fränkel-Weichselbaum'schen Pneumococcus entsprechenden Bakterien können morphologische Unterschiede aufweisen. Dieselben äussern sich meist in der Richtung überwiegender Grösse, aber auch in ausserordentlicher Kleinheit der Individuen.

2. In den culturellen Eigenschaften herrscht zwischen den einzelnen Stämmen grosse Uebereinstimmung. Nur ein sonst typischer und virulenter Stamm unterschied sich durch seine Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, auffallend von allen anderen. Alle Pneumokokken gedeihen am besten bei schwach alkalischer Reaction. Für praktische Zwecke ist das altbewährte Glycerinagar allen complicirten Nährböden vorzuziehen.

3. Die Virulenz der Pneumokokken unterliegt grossen Schwankungen. Am virulentesten pflegen die Pneumonie-Pneumokokken zu sein, doch giebt es hiervon Ausnahmen.

¹ Fischer, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXXVII.

Die höchste von uns — und bisher überhaupt — beobachtete Virulenz betrug $\frac{1}{2\ 000\ 000}$ Oese einer 24 stündigen Bouilloncultur (entsprechend 5 Colonieen) für weisse Mäuse.

Speichelkokken besitzen eine constantere Virulenz mittleren Grades.

Avirulent sind meist Stämme aus alten Eiterherden (Abscessen, Empyem).

Zur Erhaltung der Virulenz ist öftere Umzüchtung und Thierpassage nothwendig; doch gelang es uns auf diese Weise ohne Zuhülfnahme besonderer Methoden den grössten Theil unserer Stämme über ein Jahr lang lebend und virulent zu erhalten.

4. Pathogen kann der Pneumococcus für weisse Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen und im Gegensatz zu früheren Beobachtungen auch für Tauben sein. In der Art der Pathogenität weisen die einzelnen Stämme Unterschiede auf. Der Tod der Versuchsthiere erfolgte durch Septicämie.

5. Die Agglutination ist eine specifische für den Stamm, mittelst dessen das agglutinirende Serum erzeugt ist. Dies gilt sowohl für Kaninchen-, wie für das stärker wirksame Schafserum. Der Grad der Agglutination kann ein sehr hoher sein (1:1000 bei Kaninchen-, 1:100 000 bei Schafserum.)

Für die Anstellung der Agglutination eignet sich zunächst die Widal'sche Technik. Nach 24 Stunden ist die Agglutination bei positivem Ausfall auch makroskopisch erkennbar.

6. Es gelingt active und passive Immunisirung gegen den Pneumococcus; doch ist auch die Immunisirung für den dazu benützten Stamm streng specifisch.

7. Die Pneumokokken sind eine Vielheit verwandter Bakterien, ebenso wie die Streptokokken.