

## Über eine Doppelbrechung in Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis*

In Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis* entstehen, wie bekannt, eigenartig gewundene, zopfartige Stränge («cords»), die aus geordneten Bakterien bestehen. Diese «Zöpfe» wurden schon von KOCH<sup>1</sup> genau beschrieben und abgebildet. Neuerdings wurde festgestellt, daß «cords» nur bei *virulenten* Stämmen auftreten<sup>2</sup>. Ihre Bildung kann durch Zusatz von «Tween» verhindert werden. In Kulturen von *avirulenten* Stämmen, in denen die Bazillen ganz regellos liegen, gibt es «Zöpfe», wenn dem Nährmedium Embryonalextrakt beigegeben wird<sup>3</sup>. Aggregationen von orientierten Bakterien sind, unter anderem, auch bei dem apathogenen *Mycobacterium phlei* zu bemerken; sie sind hier leicht mit Solvenzien für Lipoide aufzulösen<sup>4</sup>.

Die einzelnen Tuberkelbazillen sind in den «Zöpfen», mehr oder minder vollkommen, parallel der Länge nach ausgerichtet. Irgendeine Kittsubstanz dürfte sie – wie das schon KOCH<sup>1</sup> erwogen hat – zusammenhalten. Es scheint bisher, nach der hier zugänglichen Literatur, noch nicht geprüft worden zu sein, wie sich die «Zöpfe» im polarisierten Licht verhalten. Sie könnten aus verschiedenen Gründen doppelbrechend sein. So wäre z. B. damit zu rechnen, daß ein Strukturbestandteil des Tuberkelbazillus optisch anisotrop ist. Da die Bakterien in den «Zöpfen» einen Verband mit geordneten, übereinanderliegenden Teilchen bilden, könnte sich die vermutlich nur sehr geringfügige Doppelbrechung der einzelnen Zellen «summieren» und damit erst feststellbar werden. Weiterhin darf daran gedacht werden, daß die Moleküle der wahrscheinlich lipoiden Kittsubstanz orientiert sind.

An einem einzelnen Bakterium dürfte die Doppelbrechung nur sehr schwer zu erkennen sein. Zu dieser Frage scheint keine neuere Arbeit vorzuliegen. Nach AMANN<sup>5</sup> soll es in den Kapseln der Milzbrandbazillen doppelbrechende Elemente geben, die nach Tingierung mit bestimmten Farbstoffen dichroitisch werden.

Wie vorweggenommen sei, erweisen sich die «Zöpfe» tatsächlich als schwach doppelbrechend.

**Methode.** Ein frisch isolierter, viruenter Stamm von *Mycobacterium tuberculosis* wird auf festem Agarnährboden nach DUBOS<sup>6</sup>, mit Ölsäure-Serumzusatz, gezüchtet. In den untersuchten Proben sind die «Zöpfe» sehr gut ausgebildet. Teilstücke der Kulturen werden mit aller Vorsicht vom Agar abgestrichen. Zum Ablösen der festhaftenden ganzen Kolonien wird die Platte auf fester CO<sub>2</sub> zum Gefrieren gebracht, und dann bei Zimmertemperatur auftauen gelassen. Die einzelnen Kulturen schwimmen dann unbeschädigt auf einer dünnen Wasserschicht und können leicht mit einer Platinöse auf den Objektträger gebracht werden. Geprüft werden auch «Zöpfe» aus Kulturen in flüssigem Medium<sup>6</sup>. Alle Präparate werden in Wasser untersucht.

Für die Messung der nur sehr schwachen Doppelbrechung wird, ein besonders konstruierter Kompensator mit drehbarer Glimmerplatte<sup>7</sup> von etwa 1/20 Å Verzögerung im weißen Licht verwendet. Er

<sup>1</sup> R. KOCH, Mittheilungen aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 2 (1884), dort S. 53. Auch R. KOCH, *Gesammelte Werke*, Bd. 1 (1912), dort S. 525. Vgl. auch B. MÖLLERS in: *Hb. d. pathogenen Mikroorganismen* (W. KOLLE, R. KRAUS, P. UHLENHUTH) 3. Aufl., Bd. 5., Teil 2 (1928), dort S. 645.

<sup>2</sup> G. MIDDLEBROOK, R. J. DUBOS und C. PIERCE, *J. Exper. Med.* 86, 175 (1947).

<sup>3</sup> H. BLOCH, *J. Exper. Med.* 88, 355 (1948).

<sup>4</sup> J. BRETEY, J. BROWAEYS und D. DERVICHIAN, *Ann. Inst. Pasteur* 71, 233 (1945).

<sup>5</sup> J. AMANN, *Chl. Bakteriol.* 13, 775 (1893).

<sup>6</sup> R. J. DUBOS und G. MIDDLEBROOK, *Amer. Rev. Tubercul.* 56, 334 (1947). Vgl. auch: R. J. DUBOS, *Exper.* 3, 45 (1947).

<sup>7</sup> W. J. SCHMIDT in: *Hb. biolog. Arbeitsmeth.* (E. ABDERHALDEN) Abt. V, Teil 10 (1934), dort S. 535.

gestattet es, die Subtraktions- und Additionslage rasch zu wechseln. Damit wird für das Auge der Kontrast helldunkel sehr deutlich. Der Kompensator ist am üblichen Polarisationsmikroskop (Leitz) befestigt. Als intensive Lichtquelle dient eine Osram-Punktlichbirne (Wechselstrom, 2 A).

Die Präparate dürfen natürlich nur aus parallel liegenden «Zöpfen» bestehen. Durch Überkreuzen oder schräges Überschneiden werden die polarisationsoptischen Effekte aufgehoben oder reduziert. Solche geeigneten Teile sind leicht am Rand einer als Ganzes isolierten Kolonie zu finden.

Ein in *Diagonalstellung* gebrachter Abschnitt eines «Zopfs» aus einer Kultur auf festem Medium wird deutlich aufgeheilt oder verdunkelt, wenn die Glimmerplatte aus der Auslöschenstellung hin- und hergedreht wird. Die «Zöpfe» sind, bezogen auf ihre Länge, *negativ* doppelbrechend. Bei schwacher Vergrößerung sind die Erscheinungen besonders eindrucksvoll, wenn ein «Zopf» an einer Stelle um 90° abgebogen ist. Beim raschen Bewegen der Glimmerplatte zeigen dann beide Teile entgegengesetzte Helldunkel-Effekte. An «Zöpfen» von etwa 5 μ Breite (und vorderhand unbekannter Dicke) beträgt die Verzögerung etwa 4 mμ im weißen Licht. Bei Proben aus Kulturen in flüssigem Medium zeigt sich folgendes: An isoliert liegenden «Zöpfen» von etwa 5 μ Breite ist die Doppelbrechung mit den gegebenen Hilfsmitteln bisher nicht feststellbar. Aggregate paralleler «Zöpfe», die nicht nur nebeneinander, sondern auch übereinander, liegen (Breite etwa 10–15 μ), sind deutlich doppelbrechend.

Es ist zu überlegen, worauf die geringfügige Doppelbrechung zurückzuführen ist.

Agarpartikel (die den «Zöpfen» orientiert angelagert sein müßten), können als Ursache für die optische Anisotropie nicht in Frage kommen. Ebenso liegt kein durch das Gefrieren entstandenes Artefakt vor: Auch Stücke, die aus einer Kultur in flüssigem Medium stammen oder die lediglich von der Kulturplatte abgeschnitten wurden, sind doppelbrechend.

Nach Ansicht mancher Autoren sind die Tuberkelbazillen von einer Wachs- oder Fetthülle umgeben. Diese Auffassung ist bekanntlich stark umstritten<sup>1</sup>. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen geben keinen sicheren Entscheid<sup>2</sup>. Eine Hülle aus orientierten Lipoidpartikeln könnte doppelbrechend sein. Dabei wäre – aus hier nicht näher zu erörternden Gründen – mit einem *negativen* Vorzeichen, bezogen auf die Länge der Bakterien zu rechnen. Die optische Anisotropie dieser sicher sehr dünnen Hüllschicht könnte bei der gegebenen Untersuchungstechnik wohl nur bei einer «Summation», wie sie oben geschildert wurde, nachweisbar sein. Weiterhin ist an eine Doppelbrechung der die Bakterien zusammenhaltenden Kittsubstanz zu denken. Dieses Bindemittel dürfte nach den Beobachtungen bei *Mycobacterium phlei*<sup>3</sup> ganz oder teilweise aus Lipoid bestehen. In fadenförmigen Gebilden mit Lipoid können die Moleküle, wie man aus zahlreichen Untersuchungen weiß, *quer* zur Längsrichtung liegen: Das führt zu einer Doppelbrechung mit *negativem* Vorzeichen bezogen auf die Länge. Schließlich ist noch folgendes zu überlegen: Die «Zöpfe» bilden eine Art von Stäbchen-Mischkörper. Die orientierten länglichen Partikel, d. h. die Tuberkelbazillen, und ihre Abstände, sind klein, aber nicht submikroskopisch, wie das die Theorie im allgemeinen wohl

<sup>1</sup> Vgl. hierzu u.a.: G. KNAYSI, *J. Infectious Diseases* 45, 13 (1929). – *Botan. Rev.* 4, 83 (1938). Ferner: I. M. LEWIS, *Bacteriol. Rev.* 5, 181 (1941).

<sup>2</sup> A. LEMBKE und H. RUSKA, *Klin. Wschr.* 19, 217 (1940). – E. WESSEL, *Z. f. Tuberkul.* 88, 22 (1942). Ferner u.a.: C. I. REED, S. R. ROSENTHAL und B. P. REED, *Ann. Inst. Pasteur* 75, 504 (1948).

<sup>3</sup> J. BRETEY, J. BROWAEYS und D. DERVICHIAN, *Ann. Inst. Pasteur* 71, 233 (1945).

verlangt. Es darf erwogen werden, ob sich in den «Zöpfen» auch eine *Formdoppelbrechung*<sup>1</sup> (mit positivem Vorzeichen, bezogen auf die Länge) überlagernd geltend machen könnte.

Die «Zöpfe» bilden sich, wie erwähnt, spontan nur in Kulturen von *virulenten* Tuberkelbazillen. Erst nach einer genaueren Analyse wird zu entscheiden sein, worauf die Doppelbrechung dieser offenbar bedeutsamen morphologischen Besonderheit beruht.

Für die Bereitstellung der Kulturen bin ich dem Hygienischen Institut, Basel (Direktor: Prof. J. Tomcsik), zu Dank verpflichtet.

G. BOEHM

Medizinische Universitätsklinik Bürgerspital, Basel, den 31. August 1949.

#### Summary

Cultures of virulent strains of human tubercle bacilli form, as well known, so-called "cords". These cords are, as is shown in this communication, birefringent. The sign of the double refraction is *negative* with regard to the long axis of the cords. Possible causes of this double refraction are discussed.

<sup>1</sup> W. J. SCHMIDT in: *Hb. biolog. Arbeitsmeth.* (E. ABBERHALDEN) Abt. V, Teil 10 (1934), dort S. 476 ff.

### Untersuchungen über antibiotische Wirkungen an Blutegeln, Blutegelbakterien und deren keimfreien Filtrat

Wie bekannt, gibt es besondere Bakterien (*B. hirudinis*), die mit dem Blutegel (*Hirudo medicinalis*) in Symbiose leben. Bereits DINAND<sup>1</sup> und BOTTEMBERG<sup>2</sup> vermuteten, daß diese Bakterien in der Therapie eine gewisse Rolle spielen. R. KOPP<sup>3</sup> schloß sich dieser Auffassung an.

Wir konnten in langjährigen Versuchen feststellen, daß *B. hirudinis*, gezüchtet aus der äußeren Schleimhaut, dem Darmtraktus oder dem Blut der Bißwunde, antibiotische Wirkung zeigt und daß darüber hinaus das keimfreie Filtrat von Blutegelbazillen ebenfalls antibiotische Effekte aufweist.

Zur Aufklärung der eigenartigen Widerstandsfähigkeit des Blutegels gegen pathogene Erreger wurden Versuche an weißen Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführt, welche mit Spirochäten (*Sp. pallida* und *obermeieri*) infiziert waren. Diesen Tieren wurden bisher ungefütterte Blutegel angesetzt. Es zeigte sich bereits am ersten, mehr noch am zweiten und dritten Tage, daß die Spirochäten in dem von dem Blutegel angesaugten Blut eine Schädigung erleiden, indem sie ihre lebhafte Eigenbeweglichkeit verlieren und starr werden. Dieses Starrwerden tritt auch dann ein, wenn die Egel in warmem Wasser von 35–38° C gehalten werden, so daß ein Kälteschock hier nicht vorliegen kann. Wird den Egel durch Punktierung, z. B. am vierten Tage, Blut entnommen und gesunden Tieren subkutan eingespritzt, so lassen sich im Blut dieser Tiere nach zwei Tagen normal bewegliche Spirochäten feststellen. Eine merkliche Schädigung der Virulenz der Spirochäten konnte nach viertägiger Verweilzeit des infizierten

Blutes im Blutegel nicht beobachtet werden. Läßt man das infizierte Blut jedoch elf Tage im Blutegeldarm und entnimmt man darauf durch Punktierung Blut und spritzt es den Versuchstieren ein, so erfolgt in keinem Falle eine Infektion. Der Blutegelorganismus hat also die Fähigkeit, pathogene Mikroorganismen bis zum vollen Verlust der Infektionstüchtigkeit abzuschwächen.

Unsere Untersuchungsergebnisse stehen in Widerspruch mit Ergebnissen wie sie von KARLINSKI<sup>1</sup>, KARWACKI und SZOKALSKI<sup>2</sup> und WŁADIMIROFF<sup>3</sup> berichtet worden sind. Diese Untersucher stellten fest, daß sich die Erreger des Rückfallfiebers (*Sp. obermeieri*) in Därmen von Blutegeln, die an Erkrankten gesogen haben, bis zu 100 Tagen halten.

Die zunächst von uns mit Spirochäten gemachten Feststellungen wurden später mit einer großen Anzahl weiterer Erreger bestätigt gefunden (Milzbrand, Tetanusbazillen, Staphylokokken, Streptokokken). Für den Milzbrandbazillus konnten wir damit die von CATTERINA<sup>4</sup> und MÜHLING<sup>5</sup> berichteten Ergebnisse bestätigen.

Weitere Versuche zeigten, daß eine Abschwächung der Erreger auch unmittelbar durch Behandlung mit Blutegelbazillenkulturen oder keimfreien Filtraten von derartigen Kulturen erzielt werden kann.

Zwei Kaninchen wurden mit Meningokokken infiziert. Das Angehen der Infektion wurde im Kulturversuch geprüft. An rasierten Körperstellen der Kaninchen wurden dann bisher ungefütterte Blutegel angesetzt. Das angesaugte und nochmals im Kulturversuch geprüfte Blut wurde positiv gefunden. Gemäß der Inkubationszeit von 8–10 Tagen wurde das Blut 10 Tage in den Blutegeln belassen. Am elften Tage wurde je 10 dieser Egel eine kleine Menge Blut entnommen und durch Impfung auf Blutplatten und Bouillon geprüft. In allen Fällen konnten Meningokokken nachgewiesen werden. Den gleichen Egel wurde daraufhin durch Punktierung wiederum Blut entnommen und nach Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung teils subkutan, teils intraperitoneal weißen Mäusen und Kaninchen eingespritzt. Eine Infektion erfolgte in keinem Falle. Es war also bei diesem Versuch gelungen, im Blutegel Vakzine durch nur elftägiges Verweilen des angesaugten infizierten Blutes herzustellen.

Ein entsprechender Versuch wurde mit Kaninchen durchgeführt, die mit *Bacillus tetani* infiziert waren. Nach elftägigem Belassen des aus derartigen Kaninchen abgesaugten und zunächst positiv befundenen Blutes im Blutegel konnte trotz Nachweis des *Bacillus tetani* mit diesem Blutegel auch bei wiederholter Impfung trotz zusätzlicher Zweitinfektion kein Wundstarrkrampf hervorgerufen werden.

Drei Schweinsblasen werden mit je 1000 cm<sup>3</sup> defibriniertem Rinderblut gefüllt, das mit  $1/10$  des Gesamtvolumens an Bouillonkulturaufschwemmung von Meningokokken versetzt ist. Auch an diese Tierblasen werden ungefütterte Egel angesetzt. Infektionsversuche mit dem angesaugten Blut scheitern nach elf Tagen ebenso.

An drei an Rotlauf erkrankten Mastschweinen im Gewicht von etwa 70–80 kg lassen wir je drei Blutegel bis zum Abfallen saugen. Aus je einem der Egel wird anschließend mittels Injektionsspritze das angesaugte Blut entnommen und intramuskulär in die Schweine zurückgespritzt. In Abständen von je 24 Stunden erhalten die Tiere noch zwei weitere Spritzen mit dem Blut, das sich in den am ersten Tage angesetzten Egel befindet. Alle drei Schweine bleiben am Leben, während ein vierter, unbehandeltes Tier stirbt.

Wir sehen also auch bei Kombination mit Eigenblutbehandlung den Erfolg.

An sechs Kaninchen (belgische Riesen) derselben Zucht lassen wir je einen Blutegel je eine Stunde saugen. Drei der Kaninchen werden mit Tularämie infiziert. In die sechs Blutegel werden dann je  $1/2$  cm<sup>3</sup> Blutegelbazillenaufschwemmung gespritzt. Das Blut wird durch

<sup>1</sup> J. KARLINSKI, Fortschr. Medizin 9, 456 (1891).

<sup>2</sup> L. KARWACKI und C. SZOKALSKI, C. R. Soc. Biol. Paris 68, 228 (1910).

<sup>3</sup> A. WŁADIMIROFF, *Rückfallfieber in Handb. pathogen. Mikroorganismen* (Kolle und Wassermann), 1. Aufl. 3, 96 (Jena 1903).

<sup>4</sup> G. CATTERINA, Atti Soc. Veneto-Trent. (2) 3, 208 (1897).

<sup>5</sup> P. MÜHLING, *Die Übertragung von Krankheitserregern durch Wanze und Blutegel*, Diss. Königsberg, auch Zbl. Bakt. Parasitenk. 25, 703 (1899).

<sup>1</sup> E. DINAND und H. BOTTEMBERG, Med. Welt 32, 1147 (1935).

<sup>2</sup> H. BOTTEMBERG, *Die Blutegelbehandlung* (Hippocrates-Verlag, Stuttgart 1948).

<sup>3</sup> RENÉ KOPP, *Le problème du mode d'action thérapeutique des sangsues* (Diss. Strasbourg 1945).