

(Aus dem Institute der wissenschaftlich-gerichtlichen Expertise, Odessa.)

Identifizierung des Kotes nach Colibakterien.

Von

Priv.-Doz. Dr. Erwin Hoen.

Bakteriologische Untersuchungen des Kotes, die bisher in der Gerichtspraxis angewendet wurden, hatten hauptsächlich die Aufgabe, ihn nach dem Befunde verschiedener pathogener Erreger wie Typhus-, Dysenteriebacillen u. a. zu identifizieren. Das Bacterium coli als meist vorkommender Darmsaprophyt wurde wegen seiner allgemeinen Verbreitung nicht in Betracht genommen.

Unsere Untersuchungen hatten nicht den Zweck, Colibakterien als solche im Kote nachzuweisen, sondern deren individuelle Eigenschaft, mit Seren von Tieren zu agglutinieren, die mit einem bestimmten Stamm der Colibakterien immunisiert worden waren.

Als Grundmethode für die Identifizierung der pathogenen Bakterien wird heutzutage die Agglutinationsreaktion angewandt. Dagegen kann die Agglutinationsreaktion für die Coligruppe nicht angewandt werden, da jeder einzelne Colistamm nur von dem Serum agglutiniert wird, welches mittels dieses Stammes hergestellt worden ist.

Auf diese Weise zeigen verschiedene Colibakterienstämme in der Agglutinationsreaktion eine strenge Individualität, indem sie nur mit sogenannten homologen Seren agglutinieren, d. h. mit solchen, die aus entsprechenden Colistämmen hergestellt sind¹.

Diese individuelle Eigenschaft eines jeden Colistammes kann unserer Meinung nach in der kriminalistischen Praxis zur Identifizierung einer Persönlichkeit, welcher Träger des betreffenden Colistammes ist, angewandt werden.

Pfaundler beobachtete, daß agglutinierende Seren, hergestellt aus dem Colibakterienstamme einer bestimmten Person, auch mit allen oder den meisten anderen Colistämmen, isoliert aus dem Darmkanal desselben Individuums, agglutinieren, dagegen vollkommen inaktiv bleiben in bezug auf Bakterienkulturen, isoliert von anderen Personen.

Besonders bemerkenswert sind die Ergebnisse von *Burk*, der 140 Colibakterienstämme von verschiedenen Personen untersuchte. Ein agglutinierendes Serum, gewonnen aus einem dieser Stämme, agglutinierte diesen selbst noch in der Verdünnung 1:5000. Es erwies sich, daß von 139 heterogenen Kulturen, d. h. isoliert

¹ Gemeint sind nur die saprophytischen Formen der Darm-Colibakterien, und nicht die pathogenen-hämolyisierenden, bei denen heute gemeinsame Receptoren festgestellt werden.

von anderen Personen, nur 1 Stamm mit demselben agglutinierenden Serum, verdünnt 1:1000 und 6 andere, verdünnt 1:100, eine Agglutination ergaben, während die übrigen Stämme überhaupt nicht agglutinierten.

Anlaß zu vorliegenden Untersuchungen in dieser Richtung war folgender Fall: Im Juli 1926 wurde im Dorfe K. die Bürgerin S. nebst ihrem 2 Monate alten Kinde ermordet. Der Verdacht fiel auf den Bürger N. Beide Leichen waren mit Kot verunreinigt, die Hand der Frau blutig und der After mit Kot beschmutzt. Die Sektion zeigte, daß der Frau vor der Erürgung Schwefelsäure in den Mund gegossen worden war. Das Kind war ebenfalls mit Schwefelsäure getränkt und auch erdrosselt worden.

Dem Odessaer Institut für wissenschaftlich-gerichtliche Expertise wurden unter anderem 2 eingetrocknete Stückchen Kot zugestellt, eines von der Leiche des Kindes, das andere vom Stiefel des Bürgers N., um zu konstatieren, ob dieselben ein und desselben Ursprungs seien.

Die 2 Kotportionen zeigten (bei unmittelbarer mikroskopischer Untersuchung des unvorbehandelten Kotes) in jedem Gesichtsfelde Askarideneier. Auch die Reste der pflanzlichen Faserstoffe in den beiden Kotportionen erwiesen sich als identisch.

Obgleich Askariden zu den häufig vorkommenden Parasiten gehören, ist jedoch eine solche Menge von Eiern wie in diesem Falle nur selten anzutreffen.

Da die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Identität dieser 2 Kotstücke wiesen, war eben aus diesem Grunde die Identifizierung nach den Colibakterien von besonderem Interesse.

Zwecks Aussaat und Isolierung der Colibakterien in Reinkultur wurde eine gewisse Kotmenge vom Stiefel des Bürgers N. und von der Kinderleiche in sterilen Reagenzgläsern mit einer Minimalmenge von Kochsalzlösung aufgeweicht und auf Endoagar ausgesät.

Nach 24stündigem Bebrüten wuchsen unter den zahlreichen Kolonien einzelne dunkelrot gefärbte mit Fuchsinglanz an der Oberfläche. Diese Kolonien wurden in Reagenzgläser auf Agar umgesät, darauf auf Indolbildung, Milchgerinnung und auf Gelatineverflüssigung hin nach der unten beschriebenen Methode geprüft.

Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß die isolierten Stämme Colibakterien waren, wurden von jeder Aussaat 2 Kulturen gewählt, miteinander gemischt und damit Kaninchen immunisiert.

Auf diese Weise wurden 2 agglutinierende Seren gewonnen, von denen ein jedes den Stamm agglutinierte, aus welchem es hergestellt war. Der Agglutinationstiter war bei dem einen Serum 1:800 und bei dem anderen 1:500.

Bei einer direkten und gekreuzten Agglutination erwies sich, daß ein jedes dieser Seren mit der eigenen wie mit der aus der 2. Kotportion

isolierten Kultur eine Agglutination ergab bis zur Höhe des Agglutinationstiters der Seren.

Somit wurde die völlige Identität der Colibakterien in den beiden Kotportionen in bezug auf ihre Agglutinationsfähigkeit nachgewiesen.

Wir unternahmen die Ausarbeitung dieser Methode der Identifizierung des Kotes nach den agglutinierenden Eigenschaften der Colibakterien, da der beschriebene Fall nicht einzeln dasteht.

Es kommt nicht selten vor, daß Verbrecher ihre Fäkalien am Orte des Verbrechens hinterlassen, und damit ist die Möglichkeit gegeben, nach Identifizierung derselben den Täter zu überführen.

Hellwig, der sich mit dieser Eigenart der Diebe befaßte, teilt mit, daß Diebe oft Faecesspuren am Orte ihres Verbrechens hinterlassen, teils als Verhöhnungsakt, oder aus Angst und Erregung. Auch soll unter den Verbrechern der Aberglaube herrschen, daß ein Verbrechen nicht entdeckt wird, wenn der Täter am Orte seiner Tat etwas „von sich“ zurückläßt. So findet man Fäkalien auf Betten, Fensterbrettern, Stühlen usw.

Da der Zweck unserer Forschung die Identifizierung der Colibakterien in 2 Faecesportionen ist, von denen die eine das vom Verbrecher zurückgelassene „Corpus delicti“, die 2. Portion dem des Verbrechens verdächtigen Subjekte entnommen ist, entstehen folgende Fragen:

1. Inwiefern überwiegt ein bestimmter Typus von Colibakterien im Darmkanal des betreffenden Individuums?

2. Ist es möglich, aus mehreren Colistämmen, die zurzeit im Kote vorhanden sind, den nötigen Stamm für die Immunisierung des Kaninchens zu finden?

3. Inwiefern ändern sich die Eigenschaften des Darmcoli beim Verbleiben in Kot, welcher längere Zeit einer Austrocknung ausgesetzt war?

Besonders wichtig ist die Frage, wie lange ein bestimmter Typus von Colibakterien im Darmkanal eines gewissen Individuums vorherrschen kann, d. h. ist es möglich, nach mehr oder weniger langer Zeit in dem Kote Colistämme aufzufinden, die ihren agglutinierenden Eigenschaften nach identisch sind mit den Colibakterien, die bei der ersten Untersuchung isoliert worden waren?

Nach *Radziewsky* und *Totsuka* ist ein bestimmter Typus von Colibakterien für einen bestimmten Darmkanal nicht konstant, da physiologisch periodische Veränderungen eintreten können.

Von besonderem Interesse in dieser Hinsicht ist die Arbeit von *Totsuka*, Z. Hyg. 45, 1903.

Der Verf. setzte sich zum Ziel, die Identität aller Colibakterien in dem Kote eines bestimmten Individuums festzustellen in bezug auf Veränderungen, die im Laufe von Wochen eintreten können.

Folgendes Verfahren wurde von ihm angewendet: Mit einem von 32 aus einem Kote isolierten Colistämmen wurde ein agglutinierendes Serum hergestellt und geprüft, wie sich die übrigen 31 Stämme zu ihm verhielten. Es erwies sich, daß nur 17 Colistämme mit diesem Serum agglutinierten, 14 nicht agglutinierten.

Darauf isolierte der Verf. im Laufe einer jeden der folgenden 12 Wochen aus dem Kote derselben Person 32 neue Colistämme und verglich deren agglutinierende Fähigkeiten mit denen des agglutinierenden Serums, hergestellt aus dem oben-erwähnten einen Stamme. Es zeigte sich, daß die Zahl der agglutinierenden Stämme allmählich abnahm, so daß nach 12 Wochen nur 4 mit dem agglutinierenden Ausgangsserum positiv reagierende Stämme übrig blieben.

Es sei bemerkt, daß der Verf. absichtlich nur solche Kolonien wählte, die sich äußerlich voneinander unterschieden.

Ausführlicher beschreibt der Verf. in seiner Arbeit die Methodik der Identifizierung von Colibakterien als solche nicht, sondern sagt nur, daß alle Kulturen auf ihre Beweglichkeit hin, auf Indolbildung, Säurebildung mit Milchmolke und auf Milchgerinnung geprüft wurden.

Bei der Identifizierung der Colibakterien in 2 oder mehr Kotportionen ist es unserer Ansicht nach unerlässlich, die untereinander am nächsten verwandten Colistämme zu isolieren, d. h. solche, die der Eigenschaft ihrer Kultur nach am ähnlichsten sind. Somit wäre zu erwarten, daß auch nach der Agglutinationsreaktion die gewählten Stämme identisch sein würden.

Außerdem muß bei der Identifizierung Gewißheit bestehen, daß die isolierten Stämme auch wirklich Colibakterien darstellen. Daher sind die Grundmerkmale, welche die Colibakterien charakterisieren, näher zu betrachten.

Die Eigenschaften der Colibakterien in bezug auf Zersetzung verschiedener Zuckerarten und Bildung von Stoffwechselprodukten sind so mannigfaltig, daß es kaum möglich ist, auch aus einer großen Anzahl von Kotportionen eine Kultur zu gewinnen, die allen Anforderungen einer klassischen Colikultur entspricht.

Um Zeit und Mühe zu sparen ist es daher zweckmäßig, nur 4 Grundreaktionen zu benutzen, die zur Identifizierung der Colibakterien vollkommen genügen:

1. Bildung von Fuchsinglanz auf Endoagar, 2. Nichtverflüssigung der Gelatine, 3. Milchgerinnung, 4. Indolbildung.

In Kürze sei hier die Beschreibung der *Methodik* für solche Untersuchungen angeführt, d. h. der Isolierung von Colibakterien aus dem Kote und Feststellung der biologischen Eigenschaften der isolierten Kulturen.

Das am Orte des Verbrechens entnommene Material für die Aussaat muß aus den tiefer gelegenen Schichten des Kotes genommen werden, da die Oberfläche durch Erde, Staub, Fliegen usw. verunreinigt sein kann.

Die Isolierung der Reinkultur wird in üblicher Weise auf Fuchsin-Endoagar ausgeführt. Nach 24stündiger Bebrütung unterscheiden sich die Colibakterienkolonien von den anderen durch dunkelrote Färbung und charakteristischen Fuchsinglanz auf der Oberfläche.

Einige solcher Kolonien (bis 5) werden mit der Platinöse entnommen, in Reagenzgläser mit gewöhnlichem Agar ausgesät und im Brutschranke belassen zur weiteren Prüfung ihrer biologischen Eigenschaften.

Nach 24 Stunden wird aus jedem Reagenzglas mit der Öse die Kultur auf folgende Nährböden übertragen:

1. in ein Glas mit 10 ccm 5—10proz. Peptonwasser (Prüfung der Kultur auf Indolbildung);

2. in ein Glas mit sterilisierter Milch;

3. in ein Glas mit Nährgelatine.

Bei Versuchen auf Indolbildung ist zweckmäßiger Peptonwasser zu gebrauchen, da Fleischbouillon oft Zucker enthält, der Indolbildung verhindert.

Nach 2tägigem Aufenthalt der Aussaat im Brutschrank wird das Peptonwasser auf Vorhandensein von Indol geprüft, wobei zu diesem 1 ccm 0,005proz. Natrium-nitrosumlösung und 1 ccm 25proz. Schwefelsäurelösung hinzugefügt werden. Nach Mischung bleiben die Reagenzgläser eine $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen, darauf werden 2—3 ccm Amylalkohol hinzugesetzt und stark geschüttelt. Falls Indol vorhanden ist, färbt sich der Alkohol rosa oder rot.

Die Milchgerinnung muß in der Regel bei 37° nach 2 Tagen und nicht später als nach 5 Tagen eintreten.

Die Colibakterien verflüssigen in der Regel die Gelatine nicht. Da die Prüfung auf Gelatineverflüssigung bei gewöhnlichen Temperaturverhältnissen (20°) viel Zeit erfordert, ist zur Beschleunigung der Reaktion zweckmäßig die Methode von *Rivas* zu gebrauchen, nach welcher die besäten Reagenzgläser mit Nährgelatine bei 37° 2 Tage im Brutschranke gehalten und dann in Eiswasser gestellt werden. Wenn die Gelatine erstarrt, hat die zu prüfende Kultur dieselbe nicht verflüssigt.

Die erwähnten Proben dürften zur Einschätzung von Colibakterien genügen und Kulturen, die diesen Anforderungen entsprechen sind als Colibakterien zu betrachten.

Trotzdem eine Indolbildung bei einigen Colibakterientypen nicht stattfindet, ist es notwendig, um mögliche Fehler zu vermeiden, ausschließlich indolbildende Stämme zu gebrauchen.

Da möglichst identische Colikulturen in Betracht kommen, werden aus den 2 zu identifizierenden Kotportionen absichtlich solche Kolonien gewählt, die ihren morphologischen und biologischen Eigenschaften nacheinander nahestehen.

Was die Herstellungstechnik der agglutinierenden Seren betrifft, wäre es natürlich am zweckmäßigsten, aus jedem Kote mehrere Coliseren herzustellen, wodurch auch die Methodik an Genauigkeit gewinnen würde.

Zur Vereinfachung genügt es jedoch, sich auf die Immunisierung zweier Kaninchen zu beschränken, die mit 2 aus den zu identifizierenden Kotportionen gewonnenen Kulturen immunisiert werden.

Bei den Untersuchungen ist es unerläßlich, nicht nur eine Colikultur als solche zu isolieren, sondern auch zu prüfen, ob der gewählte Colibakterienstamm auch wirklich einen zurzeit vorherrschenden Typus der Colibakterien im betreffenden Kote darstellt.

Zu diesem Zwecke muß aus dem Kote nicht nur eine Kolonie isoliert werden, sondern 5, und nach der Herstellung des Serums müssen dessen agglutinierende Fähigkeiten in bezug auf die übrigen 4 zu gleicher Zeit isolierten Kulturen geprüft werden.

Nur wenn das Serum mit den meisten von diesen agglutiniert, ist man sicher, den richtigen Stamm getroffen zu haben, andernfalls ist ein anderer Stamm zu wählen.

Zur Gewinnung eines Immunisierungsmaterials wird eine 24stündige Kultur mit Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Kultur selbst in einem Wasserbad bei 58—60° während 1 Stunde abgetötet. Zur Konservierung wird bis 0,5proz. Carbonsäure hinzugefügt. Diese carbolisierte Kultur wird dann im Laufe der ganzen Immunisierungszeit gebraucht.

Die Immunisierung des Kaninchens wird nach der üblichen Methode ausgeführt; aber, da selbst eine abgetötete Colikultur für die Tiere verhältnismäßig giftig sein kann, ist die Injektion mit kleinen Dosen unter Kontrolle des Gesundheitszustandes und Gewichtes der Tiere auszuführen.

Bei der Immunisierung mit kleinen Dosen und nicht häufigen Injektionen gewinnt man die am meisten spezifischen Seren. Der Hauptwert des Serums besteht nicht in der Höhe seines Titers, sondern in der Spezifität des Serums. Daher darf die Immunisierungszeit nicht lange währen und es genügt zur Verwendung ein Serum mit nicht hohem Titerwerte (500—700), gewonnen durch 2—3 intravenöse Injektionen in 4—5tägigen Abständen.

An einem dunkeln und kühlen Orte kann das Serum lange erhalten werden.

Nach diesen Methoden wurden Colibakterien von 10 Kotportionen verschiedener Personen untersucht, so daß aus jeder dieser Kotportionen je eine Colikultur isoliert wurde. Darauf wurde mit jeder dieser Kulturen ein Kaninchen immunisiert.

Alle immunisierten Kaninchen ergaben ein agglutinierendes Serum mit Titerwert 1 : 250—1 : 1200. Der Titer des Serums wurde in folgender Weise bestimmt:

Zu 1 ccm Serumverdünnung wurde in einem Agglutinationsröhrchen $\frac{1}{2}$ Öse eintägiger Agarkultur hinzugesetzt, auf 2 Stunden bei 37° in den Brutschrank gestellt, danach herausgenommen, 2 Stunden bei Zimmertemperatur belassen und das Reaktionsergebnis abgelesen.

Um die Spezifität der Agglutination zu ermitteln wurde eine direkte und eine gekreuzte Agglutinationsreaktion vorgenommen, d. h. mit jedem Serum eine Agglutination mit dem Ausgangsstamme wie mit allen übrigen Stämmen.

Es erwies sich, daß jedes Serum bis zu seinem Titerwerte nur die eigene homologe Kultur agglutinierte, die übrigen 9 Kulturen aber nicht die geringste Spur einer Agglutination zeigten.

Um ein Urteil zu gewinnen, bis zu welchem Grade die Reaktion spezifisch ausfällt, wurden alle Seren, unabhängig von ihrem Titerwerte 1 : 100 verdünnt, und mit denselben die beschriebene direkte und gekreuzte Agglutinationsreaktion angestellt.

Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt: 3 Kreuze (+++) bezeichnen völlige Agglutination, d. h. Klärung der Flüssigkeit, 2 (++) eine mittlere, d. h. nur teilweise Klärung und 1 Kreuz (+) eine schwache, d. h. mit geringen Agglutinationsspuren.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, agglutinierten alle 10 Seren voll-

Tabelle.

	Endtiter d. agglutinieren Serums	Agglutination von Kulturen mit Serum verdünnt 1:100									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 M	300	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 G	500	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—
3 C	600	—	—	+++	—	—	—	—	—	—	—
4 P	600	—	—	—	+++	—	—	++	—	+	—
5 S	250	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—
6 E	300	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—
7 M	500	—	—	—	++	—	—	+++	—	—	—
8 K	700	—	—	—	—	—	—	—	+++	—	—
9 A	1200	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—
10 S	800	—	—	—	—	—	—	—	±	—	+++

ständig ihre homologen Stämme. Außerdem wirkte das Serum agglutinierend in Verdünnung 1:100 auf 4 heterogene Kulturen, auf 3 nicht gänzlich und in einem Falle mit zweifelhaftem Resultat.

Da die Agglutination heterogener Kulturen nur bei 2,5—12mal höherer Konzentration des Serums eintrat, als dem Endtiter des Serums entsprach, kann der Schluß gezogen werden, daß die Agglutinationsreaktion zur Identifizierung der Colibakterien und somit auch des Kotes vollständig anwendbar ist.

Die von uns vorgeschlagene Methode zur Prüfung agglutinierender Seren nicht nur mit der Ausgangskultur, sondern auch mit 4 anderen Colibakterienstämmen, isoliert aus demselben Kot, hat den Zweck zu zeigen, ob der gegebene Stamm seinen individuellen Eigenschaften nach, den Repräsentanten der Mehrzahl der Colibakterien, der zur Zeit in dem Kote vorherrscht, darstellt oder nur einzeln und zufällig im Kote sich befindet.

Bei Berücksichtigung all dieser Bedingungen ist zu erwarten, daß auch nach längerer Zeit aus der Coliflora serologisch identische Colistämme mit den anfangs gezüchteten Stämmen gewonnen werden können.

Die weiteren Untersuchungen in bezug auf die Lebensfähigkeit und immun-biologische Beständigkeit der Colibakterien in verhältnismäßig ausgetrocknetem Kote ergeben, daß nach 1 Monat die Zahl der lebensfähigen Colistämme bedeutend gesunken war. Jedoch gelang die Isolierung der typischen Colistämme ohne weiteres. Viele von diesen Stämmen agglutinierten mit einem Immunserum, das einen Monat vorher aus einem Colistamme desselben Kotes hergestellt worden war.

Auf diese Weise wird auch die Frage gelöst, daß zu solchen Untersuchungen nicht nur frischer, sondern auch längere Zeit gelagerter Kot geeignet ist.

Somit wird die Möglichkeit gegeben, auf Grund der immun-serologischen Eigenart der Colibakterien den Kot und die Persönlichkeit selbst zu identifizieren.