

II.

Die Wachstumsverhältnisse des *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus erysipelatis* im keimfreien Hundeeiter.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität Greifswald.)

Von Assistenzarzt Dr. Eichel.

Die nachfolgenden Versuchsreihen wurden unternommen, um das Verhalten einiger der bekanntesten pathogenen Mikroorganismen in einem Nährboden zu untersuchen, der ihnen im Reagensglase möglichst dieselben Lebensbedingungen bot, wie solche innerhalb des lebenden Organismus gegeben sind; es sollte vor Allem nachgesehen werden, ob der Eiter — ohne den lebenden Einfluss der Zelle — für sie zum Leben dienen könne oder nicht, und wenn Ersteres der Fall sein sollte, ob sie sich in ihm vermehrten, wenn Letzteres, ob sie in ihm abgetötet oder nur in ihrer Entwicklung gehemmt wurden.

Als Versuchsmaterial diente einerseits aus frischem menschlichen Eiter durch Plattenverfahren gewonnene Reinculturen (*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*-Reinculturen des *Streptococcus erysipelatis* aus dem hygienischen Institut des Herrn Professor Löffler, *Bacillus anthracis* aus dem Blute einer nach Impfung an Milzbrand zu Grunde gegangenen Maus; andererseits wurde der Eiter durch Injection von Oleum terebinthinae bei Hunden gewonnen und in einer sogleich zu beschreibenden Weise als Nährboden benutzt.

Es sei gestattet, an dieser Stelle nochmals¹⁾ darauf hinzuweisen, dass es, um zu einem günstigen Resultate zu gelangen,

¹⁾ Vergleiche die Angaben von Grawitz und de Bary. Dieses Archiv Bd. 108, S. 94.

nothwendig ist, nicht zu grosse Quantitäten von Terpenthin zu nehmen, da dieselben Nekrose machen. Es begegnete mir nehmlich Anfangs, als ich in der Meinung: viel hilft viel, 3—5 ccm einspritzte, um recht viel Eiter zu bekommen, dass ich ein ausserordentlich starkes seröses Exsudat — die ganze Bauchgegend des mittelgrossen Hundes war geschwollen — und in demselben einige nekrotische Gewebsfetzen, aber keinen Eiter bekam. Das Terpenthinöl wurde bei den ersten Versuchen durch mehrmaliges Aufkochen sterilisiert, später wurde die Sterilisirung als überflüssig fortgelassen. Hatte sich am dritten Tage meist der Eiter gesenkt, so wurde die Haut über dem Abscess geschoren und rasirt, der ganze Hund gewaschen, die Stelle der beabsichtigten Incision und ihre Umgebung mit Alkohol, Aether und 1 pro mille salzaurem Sublimat gereinigt, dann wurde unter schichtweiser Durchtrennung der Subcutis und unter sorgfältigster Blutstillung bis auf die Abscesswand geschnitten, dieselbe gespalten und der Eiter in Erlenmeyer'schen Kölbchen aufgefangen. Derselbe war dickflüssig, gelb, mikroskopisch zeigte er zahlreiche mehrkernige Zellen, seine absolute Keimfreiheit ergaben sofort bei der Entnahme angelegte Platten. Die Erlenmeyer'schen Kölbchen wurden, nachdem der etwa benetzte Rand durch Abglühen sterilisiert war, mit Wattepfröpfen versehen und nachdem vorsichtig oben auf den Wattebausch ein Tropfen Sublimat gebracht, — durch Gummikappen geschlossen. In dieser Art aufbewahrt, hielt sich der Eiter beliebig lange, — die längste Untersuchungsdauer ist 15 Wochen, — vollständig keimfrei. Eine Zersetzung desselben trat nie ein, es machte sich die vorgehende Umwandlung mikroskopisch geltend, indem zuerst der Zellenleib aufgelöst wurde und dann nach etwa 10—15 Tagen auch die Kernfärbung nicht mehr gelang.

Eine andere Veränderung, wenn man so sagen darf, des Eiters war die, dass sich 2 verschiedene Schichten in ihm bildeten, nach 1—2 Stunden hatten sich die meisten festen Bestandtheile gesenkt, es stand über ihnen eine klare mehr oder weniger gelblich bis bräunliche Flüssigkeit, die nach kürzerer, oder längerer Zeit, je nach der Menge der beigemischten rothen Blutkörperchen dunkler wurde. Bei den Versuchen wurde möglichst darauf gesehen, was bei einiger Achtsamkeit leicht gelang,

das Eiterserum und den Eiter getrennt zu erhalten, beide wurden nebeneinander in gleicher Weise verwandt.

Die erste Versuchsreihe wurde mit *Staphylococcus aureus* allein vorgenommen. In ein sterilisiertes Reagensrohr wurden etwa 5 ccm Eiter gebracht und demselben von einer verflüssigten Gelatinecultur 1 ccm zugesetzt und dem Brütschrank bei 37° C. übergeben. Vom 18. Januar bis 1. Februar 1889 sind auf den Platten, welche täglich angelegt wurden, *Aureus*colonien nachweisbar.

Es schien nach diesem ersten Versuch, als vermöchte der *Aureus* im Eiter zu leben, es kam nunmehr darauf an festzustellen, ob er sich darin zu vermehren vermöchte. Ein in gleicher Weise mit Eiter beschicktes Reagensrohr wurde daher mit einer Oehse mässiger Grösse einer verflüssigten *Aureus*gelatinecultur geimpft, die nach Umschütteln des Eiters sofort angelegten Platten ergaben die charakteristischen Colonien, am Tage darauf waren weniger Colonien auf den angelegten Platten gewachsen, am dritten Tage nur noch 3, und vom sechsten Tage an gelang es überhaupt nicht *Aureus*colonien zur Entwicklung zu bringen (siehe Tabelle I). Die Impfungen mit den von den Platten erhaltenen Reinculturen bei Thieren ergaben die Virulenz der Kokken.

Hieraus geht hervor, dass der *Aureus* im Hundeeiter sich zu vermehren nicht im Stande war, ja, dass er in geringer Menge eingebracht darin zu Grunde ging. Es handelte sich nun zunächst darum festzustellen, wie viel *Aureus* in den Eiter hineingebracht werden konnte, ohne dass eine längere als 5 tägige Entwicklung zu Stande kam. Es wurden neben einander Röhren mit je 1, 2, 4, 8, 12, 24 Oehsen beschickt, in keiner gelang es länger als die angegebene Zeit *Aureus* am Leben zu erhalten. Eine deutlich sichtbare Verschiedenheit zwischen den am 5. Tage gewonnenen Colonien und denen der früheren Tage bezüglich ihrer Grösse und Virulenz liess sich nicht feststellen.

War so der Eiter an und für sich ungeeignet dem *Aureus* als Nährboden zu dienen, so lag die Frage nahe, ob etwa der Eiweissgehalt desselben dem Mikroorganismus zu concentrirt wäre. Um dies zu entscheiden, wurde in folgender Weise verfahren. Keimfreier Eiter wurde mit 8 Tage lang durch Auf-

kochen sterilisirtem destillirtem Wasser versetzt im Verhältniss von 1:1, 1:2, 1:4, 1:8. Der Eiter sank im Wasser zu Boden, er wurde durch vorsichtiges Umschütteln, sowie durch sterilisirte Glasstäbe mehrmals am Tage in möglichst innige Be- rührung mit dem Wasser gebracht. Die angelegten Platten ergaben, dass das Gemisch keimfrei geblieben war, der Aureus ver mochte sich in der Röhre mit 8 Theilen Wasser nicht einen Tag länger zu erhalten, wie in dem reinen Eiter (siehe Tabelle II).

In gleicher Weise wurde mit dem über dem Eiter stehenden Eiter serum verfahren, auch hier zeigte sich überall das gleiche Verhältniss, nach 5 Tagen zeigte keine Platte mehr eine einzige Colonie (siehe Tabelle III).

Alle diese Versuche sind zu verschiedenen Zeiten wiederholt worden, und da sich regelmässig dasselbe Ergebniss herausgestellt hat, so möchte ich daraus die folgenden Schlüsse ableiten: 1) Der keimfreie Hundeeiter ist ein ungeeigneter Nährboden für den *Staphylococcus aureus*. 2) Der Hundeeiter enthält eine Substanz, welche den *Staphylococcus aureus* auch ohne Lebenstätigkeit von Zellen in seiner Keimfähigkeit vernichtet. 3) Abschwächungen, welche etwa dem Absterben der Kokken voraufgehen könnten, kamen nicht zur Beobachtung. 4) Die Menge der in den Eiter eingebrachten Kokken ist von wesentlicher Bedeutung für die Zeitdauer des Absterbens, da sehr grosse Mengen viel schwerer abgetötet werden als kleine. Eine Erklärung für diese Unterschiede lässt sich zur Zeit nicht geben, da die Natur des im Eiter enthaltenen schädigenden Princips noch völlig unbekannt ist. 5) Wasserverdünnung hebt die Wirkung des Eiters nicht auf.

In gleicher Weise, wie für den *Staphylococcus aureus* angegeben, habe ich Prüfungen über das Verhalten des Milzbrandbacillus a) im reinen Eiter, b) im verdünnten Eiter, c) im reinen Eiter serum, d) im verdünnten Eiter serum ange stellt und täglich durch Entnahme von Proben und Uebertragung derselben auf Gelatineplatten die Wirkung dieser Nährböden controlirt.

Bei Uebertragung einer Oehse einer Gelatincultur des Milzbrandbacillus in die 4 verschiedenen Flüssigkeiten ergab sich

vom 1 Tage an eine Abnahme der Colonien auf den Platten; etwa vom dritten Tage ab hörte das Wachsthum überhaupt auf, oder es kam nur ausnahmsweise eine oder die andere Colonie zur Entwickelung. Auch beim Anthrax wurde die Frage erwogen, ob dem Absterben der Bacillen etwa ein Stadium abgeschwächten Wachsthums mit beschränkter Virulenz vorausgehen möchte, allein diejenigen Bacillen, welche bis zum dritten Tage auf den Platten ausgekeimt waren, brachten bei weissen Mäusen regelmässig Milzbrandinfection mit tödtlichem Ausgang hervor. Dasselbe Ergebniss erzielte ich mit Milzbrandculturen, welche bis zur Bildung reichlicher Sporen gediehen waren. Auch hier Absterben der Mikroorganismen bis zum dritten Tage, nur einmal eine am sechsten Tage, die virulent war (siehe Tabelle IV).

Es geht aus diesen Versuchen, die mehrfach wiederholt wurden, hervor, dass der *Staphylococcus aureus* und *Bacillus anthracis* 1) im keimfreien Hundeeiter nicht lebend zu bleiben vermögen, 2) dass sie sich nicht darin vermehren, 3) dass eine Verdünnung des Eiters auf ihr Wachsthum keinen Einfluss hat. Das für den Eiter Gesagte gilt in gleichem Maasse für das Eiter-serum.

Wenn man den beschriebenen Versuchen den Einwand entgegenhalten wollte, dass nicht der Eiter als solcher, sondern das in ihm enthaltene Terpenthinöl das keimtödende Bakterien-gift enthalten habe, so verweise ich einmal auf die im Bd. 116, S. 134 gegebene Ausführung von P. Grawitz, ferner aber auf die hier sogleich zu besprechenden Erfolge, welche ich mit den anscheinend sehr nahe verwandten Mikroorganismen, dem *Streptococcus pyogenes* und *erysipelatis* erzielt habe. Diese verhielten sich ganz entgegengesetzt.

Bei ihnen gelang es stets — die längste Versuchsdauer war 4 Wochen — die typischen Colonien zur Entwickelung zu bringen und es liess sich nachweisen, dass die Anzahl derselben bis etwa zum sechsten Tage zunahm und sich von da ungefähr constant erhielt, jedenfalls gelang es noch am dreissigsten Tage Colonien von Streptokokken zu entwickeln, die auf Stichculturen übertragen das typische Wachsthum zeigten (siehe Tabelle V und VI). Die Impfversuche ergaben für *Streptococcus pyogenes*

beim Kaninchen positive Resultate. Die Thiere bekamen nach Impfung an der convexen Seite des Ohres, am 2. bis 3. Tage Röthung und Entzündung des ganzen Ohres. Häufig bildete sich an der Impfstelle ein etwa bohnengrosser Abscess, aus demselben liessen sich Streptokokken züchten. Wurde der Abscess nicht eröffnet, so blieb er bis 14 Tage bestehen, um dann allmählich zu verschwinden. Allgemeinerkrankung wurde nicht beobachtet, ebenso wurde bei Injection in die Blutbahn eine Allgemein-infection nicht erreicht. Auch bei Einspritzung von 3 ccm einer stark getrübten Bouilloncultur in die Ohrvene trat eine Erkrankung nicht ein, besonders blieben die Gelenke gesund.

Die Impfversuche mit *Streptococcus erysipelatis* liessen deutliche Erfolge nicht erkennen, es lag dies wohl daran, dass eine frische virulente Cultur mir nicht zur Verfügung stand.

Es erhellt aus diesen Versuchen, dass sowohl der *Streptococcus pyogenes* wie *erysipelatis* im keimfreien Hundeeiter zu leben und sich eine Zeitlang zu vermehren vermag. — Da nun bekanntermaassen beim Menschen in solchen Eiterungsprozessen, welche mit der äusseren Luft in Verbindung stehen, Eiterzerstreuungen vor sich gehen, welche durch andere Bakterien hervorgebracht werden, so schien es von Wichtigkeit, zu erfahren, ob hierbei die eigentlichen als Eiterkokken bekannten Verbreiter der Entzündungen in ihrem Wachsthum gestört würden oder nicht. Da es unmöglich wäre, alle diejenigen Mikroben, welche Fäulniss erregen können, hierauf einzeln zu prüfen, so begnüge ich mich mit der Beschreibung zweier Arten, welche ich aus derartigem zersetzen Eiter vom Menschen durch Reincultur gewonnen habe.

In dem Eiter, der mir als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des *Staphyl. aureus* und *Streptococcus pyogenes* diente, zeigte sich bei den mikroskopischen Untersuchungen, sowie in den Culturen ein kurzes Stäbchen von etwa $4\text{ }\mu$ Länge und $2\text{ }\mu$ Breite. So oft dasselbe in dem Eiter war, war derselbe nach 3—4 Tagen, mochte er vorher noch so dickflüssig sein, dünnflüssig, es gelang kein Eiterkörperchen mehr zu färben, der *Aureus* der vorher im Eiter reichlich vorhanden gewesen, war dann aus ihm verschwunden.

Rein gezüchtet zeigte der Bacillus in der Sticheultur in Gelatine wie Agar längs des ganzen Impfstichs Wachsthum. Am Einstich erhab er sich beim Agar nagelknopfförmig über die Oberfläche, verflüssigte dasselbe gar nicht, während die Gelatine nur sehr allmählich nach 5—6 Tagen verflüssigt wurde, hierbei bildete sich in den älteren Culturen ein Geruch nach Himbeeren, der auch auf Platten die Aufmerksamkeit auf den Bacillus lenkte. Auf schrägem Agar bildete er einen fest zusammenhängenden gelben Ueberzug, auf Gelatineplatten wuchs er in runden, etwas ausgezackten körnigen, gelben Colonien, welche die Gelatine erst am fünften Tage verflüssigten. Pathogene Wirkung auf Kaninchen und weisse Mäuse hatte er nicht.

Brachte ich von diesem Bacillus eine Oehse in 5 ccm Eiter, dem 2 ccm einer verflüssigten Aureus-Gelatinecultur zugesetzt war, so gelang vom 4.—6. Tage die Entwicklung des Aureus nicht mehr, während sie sonst bei Zusatz von solch ungeheuren Mengen Aureus, wie zu Beginn der Arbeit erwähnt, die 4fache Zeit gelang. Mit Aureus zusammen in verflüssigte Gelatine gebracht, entwickelte sich nach gehöriger Vermischung nur der Bacillus. Um festzustellen, ob der Bacillus durch Entziehung von Nährmaterial oder durch Entwicklung eines Ptomaine seine wachsthumshemmende Wirkung übe, wurde ein Erlenmeyer-sches Kölbchen mit etwa 20 ccm Gelatine und einer Reincultur des Bacillus 4 Tage im Brütschrank gehalten, der Bacillus lag in dicker gelber Schicht am Boden der sonst klaren Gelatine, sodann wurde der Bacillus, an dem Sporenbildung nicht bemerkt war, durch 5 Tage hindurch eine Stunde auf 50° erhitzt, dass er in der Gelatine abgestorben, ergaben angestellte Plattenversuche. Von den so erhaltenen Stoffwechselproducten des Bacillus wurden zu reiner Gelatine zugesetzt im Verhältniss von 1:1, 1:5, 1:10, das Gemisch bei 30° verflüssigt und nach dem Erstarren (auch die erste Mischung erstarrte vollkommen fest) Sticheulturen von Aureus angelegt. Dabei zeigte sich, während die gleichzeitig angelegten Controlculturen normales Wachsthum boten, in den Röhren mit 1:1 erst am dritten Tage, in den beiden anderen am zweiten Tage Wachsthum, die Röhre mit 1:1 wurde, während der Impfstich bis zum Boden reichte nur etwa zu ein Viertel, die beiden anderen allerdings längs des

ganzen Impfstiches aber viel langsamer als die Controlröhren verflüssigt. Das Wachsthum des *Staph. aureus* wird also durch die Anwesenheit dieses, den Eiter verflüssigenden und Himbeergeruch verbreitenden Bacillus, sowie durch seine Stoffwechselproducte verzögert.

Bei *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus erysipelatis* war eine Wachsthumshemmung nicht zu bemerken. Aehnlich, nur in geringerem Maasse, zeigte seine wachsthumshemmende Kraft bei in gleicher Weise angestellten Versuchen ein aus menschlichem Eiter, der mir durch die Güte des Herrn Professor Helferich zugestellt war, gezüchteter *Staphylococcus*. Derselbe wuchs auf der Platte in Colonien, die vom *Staphylococcus albus* nicht zu unterscheiden waren, beim Impfstich zeigte er jedoch in Gelatine erst nach 4—5 Tagen eine trichterförmige Verflüssigung mit einer den Trichter auskleidenden zusammenhängenden Haut. Auf schrägem Agar bildete er einen weisslichen das Agar nicht verflüssigenden Belag.

Auch er war den 3 anderen Mikroorganismen gegenüber unwirksam und nicht pathogen.

Die Vermischung der Stoffwechselproducte des *Bacillus* und *Staphylococcus* mit Gelatine wurde auf ihre Reaction nicht geprüft.

Zusammenfassend ergibt sich aus den angestellten Versuchen:

Staphylococcus aureus und *Bacillus anthracis* gehen im keimfreien Hundeeiter zu Grunde. So lange als ihre Colonien auf der Platte erschienen, ist eine Abnahme der Virulenz nicht festzustellen. *Streptococcus pyogenes* und *erysipelatis* vermögen im gleichen Eiter zu leben und sich zu vermehren, der *Streptococcus pyogenes* bleibt dabei sicher virulent.

Zum Schluss meiner Arbeit verfehle ich nicht Herrn Professor Grawitz für seine gütige Anregung und Unterstützung meinen Dank auszusprechen.

T a b e l l e I.

Keimfreier Hundeeiter mit einer Oehse Aureus-Gelatine-Cultur.
25. Mai 1889 beschickt.

Platten.

25. Mai + 26. Mai + 27. Mai + 28. Mai + 29. Mai + 30. Mai +
31. Mai — 6. Juni —

T a b e l l e II.

Keimfreier Hundeeiter mit 1 Oehse Aureus-Gelatine-Cultur und
sterilisirtem destillirtem Wasser.

	Eiter rein	Eiter 1:Wasser 1	Eiter 1:Wasser 2	Eiter 1:Wasser 4	Eiter 1:Wasser 8
12. Juni	+	+	+	+	+
13. -	+	+	+	+	+
14. -	+	+	+	+	+
15. -	+	+	+	+	+
16. -	+	+	+	+	+
17.—24. Juni	—	—	—	—	—
Wiederholt					
1. August	+	+	+	+	+
2. -	+	+	+	+	+
3. -	+	+	+	+	+
4. -	+	+	?	+	+
5. -	+	+	+	+	+
6.—12. Aug.	—	—	—	—	—
Wiederholt 22. Januar 1890.					
22. Januar	+	+	+	+	+
23. -	+	+	+	+	+
24. -	+	+	+	+	+
25. -	+	+	—	+	?
26. Januar bis 3. Februar	—	—	—	—	—

Tabelle III.
Eieterserum mit 1 Oehse Gelatine-Aurens-Cultur und destillirtem sterilisirtem Wasser.

	Serum rein.	Serum 1 : Wasser	Serum 1 : Wasser	Serum 1 : Wasser	Serum 1 : Wasser
2. Juni	++	++	++	++	++
3. -	-	-	-	-	-
4. -	-	-	-	-	-
5. -	-	-	-	-	-
6. -	-	-	-	-	-
7. - 24. Juni	-	-	-	-	-

Ebenso bei den zu gleicher Zeit mit den mit Eiter angestellten Wiederholungen.

T a b e l l e IV.
Keimfreier Hundeeiter mit 1 Oehse verflüssigter
Milzbrand-Gelatine-Cultur.

T a b e l l e V. Streptococcus pyogenes.

Keinfreier Hundeeiter mit 1 Oehse verflüssigter Streptococcus-
Gelatine und Wasser.

Keinfreies Eiterserum mit 1 Oehse verflüssigter Streptococcus-
Gelatine und Wasser.

54

	Eiter rein	Eiter 1:Wass. 1	Eiter 1:Wass. 2	Eiter 1:Wass. 4	Eiter 1:Wass. 8		Serum rein	Serum 1:Wass. 1	Serum 1:Wass. 2	Serum 1:Wass. 4	Serum 1:Wass. 8
31. Juli	+	+	+	+	+	31. Juli	+	+	+	+	+
1. August	++	++	++	++	++	1. August	++	++	++	++	++
2.	-	++	++	++	++	2.	-	++	++	++	++
3.	-	++	++	++	++	3.	-	++	++	++	++
4.	-	++	++	++	++	4.	-	++	++	++	++
5.-10. Aug.	+	+	+	+	+	5.-10. Aug.	+	+	+	+	+
3. December	+	+	+	+	+	Wiederholt.					
4.	-	++	++	++	++	3. December	+	+	+	+	+
5.	-	++	++	++	++	4.	-	++	++	++	++
6.	-	++	++	++	++	5.	-	++	++	++	++
7.-20. Dec.	+	+	+	+	+	6.	-	++	++	++	++
						7.-20. Dec.	+	+	+	+	+

Am 10. Januar aus allen Röhren entnommen überall +.

T a b e l l e VI. Streptococcus erysipelatis wie oben.

31. Juli	+	+	+	+	31. Juli	+	+	+	+	+
1. August	++	++	++	++	1. August	++	++	++	++	++
2.	-	++	++	++	2.	-	++	++	++	++
3.	-	++	++	++	3.	-	++	++	++	++
4.	-	++	++	++	4.	-	++	++	++	++
5.-10. Aug.	+	+	+	+	5.-10. Aug.	+	+	+	+	+
3. December	+	+	+	+	Wiederholt.					
4.	-	++	++	++	3. December	+	+	+	+	+
5.	-	++	++	++	4.	-	++	++	++	++
6.	-	++	++	++	5.	-	++	++	++	++
7.-20. Dec.	+	+	+	+	6.	-	++	++	++	++

++ = Colonien vorhanden + = Colonienzahl vermehrt - = keine Colonien.