

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut der Universität Wien
[Vorstand: Prof. Dr. R. Maresch].)

Zur Tuberkelbacillenzüchtung aus dem Blute.

II. Mitteilung.

Von

Hans Popper, Felix Bodart und Wolfgang Schindler,
Assistent. Demonstratoren am Institut.

(Eingegangen am 30. Mai 1932.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Einleitung.

In den letzten Jahren wurden von *Löwenstein* und seinen Schülern eine Reihe aufsehenerregender Befunde veröffentlicht, welche die Ergebnisse eines neuen Verfahrens zur Züchtung von Tuberkelbacillen aus dem Blute betrafen. Obwohl die Tuberkelbacillenkultur aus dem Blut vor *Löwenstein* kaum jemals gelang, war *Löwenstein* selbst schon seit einer Reihe von Jahren davon überzeugt, daß Tuberkelbacillen im Blute viel häufiger kreisen, als dies bis zu diesem Zeitpunkt allgemein angenommen wurde. Bevor er jedoch daranging, aus dem Blute Tuberkelbacillen zu züchten, hatte er in den letzten 10 Jahren das Züchtungsverfahren für Tuberkelbacillen aus Geweben und Körperflüssigkeiten in einer Weise verbessert, daß in seinem Laboratorium die Bacillenzüchtung den bis dahin allein angewendeten Tierversuch zum Nachweis der Tuberkelbacillen fast völlig verdrängte. In der Folge wurde dieses Verfahren von *Löwenstein* auch auf die Blutkultur angewendet und nun Tuberkelbacillen im *strömenden Blut* von Fällen mit schwerer Tuberkulose, später jedoch auch bei einer Reihe von isolierten, oft nur geringe Allgemeinerscheinungen darbietenden Organ tuberkulosen nachgewiesen.

Ferner gelang es *Löwenstein*, gemeinsam mit *Kren*, bei einer Reihe von Hauterkrankungen auch fraglicher tuberkulöser Herkunft, so z. B. bei Lupus erythematodes, eine Tuberkelbacillämie aufzudecken, was sie zu weitgehenden Schlüssen berechtigte. Ebenso wurde von *Löwenstein* im Verein mit *Meller* und *Urbanek* bei gewissen Augenerkrankungen eine Tuberkelbacillämie gefunden und schließlich in Gemeinschaft mit *Reitter* in einer Reihe von äußerst bemerkenswerten Arbeiten gezeigt, daß bei *rheumatischen Erkrankungen*, in erster Linie bei akutem Gelenkrheumatismus, Tuberkelbacillen im Blute kreisen, woraus auf wichtige ursächliche

Beziehungen zwischen Rheumatismus und Tuberkulose geschlossen wurde. In letzter Zeit hat *Löwenstein* mitgeteilt, daß es ihm gelungen sei, auf-fallenderweise auch noch bei anderen Erkrankungen, so bei der multiplen Sklerose, bei Schizophrenie und bei der Neuritis retrobulbaris *Kochsche* Bacillen im Blute aufzufinden.

Um nun sowohl den *Wert des Züchtungsverfahrens*, wie auch die *Bedeutung ihrer Ergebnisse* beurteilen zu können, wurden in unserem Institut seit etwa 2 Jahren Tuberkelbacillenzüchtungsversuche aus dem Blute durchgeführt. Über einen Teil der Erfahrungen wurde vor etwa einem halben Jahr kurz berichtet. Obwohl wir in dieser Frage auch heute ein völlig abschließendes Urteil noch immer nicht abgeben können, wollen wir dennoch einen neuerlichen Bericht über unsere Erfahrungen veröffentlichen, weil unser Material bereits *mehr als 1000 abgeschlossene Fälle* umfaßt, wir eine Reihe wichtiger Tatsachen doch schon als gesichert ansehen zu können glauben und die bisherigen, von anderen Seiten vorgenommenen Überprüfungsversuche der Befunde *Löwensteins* nur ein sehr unbefriedigendes Ergebnis gezeigt haben.

II. Schrifttum.

Was das Schrifttum über Bacillämie bei Tuberkulose betrifft, verweisen wir auf die zusammenfassenden Darstellungen von *Kahn* aus dem Jahre 1913 und *Russew* (Laboratorium *Löwenstein*) 1926. Hier wird auf die verschiedensten Versuche eingegangen, Tuberkelbacillen im Blute nachzuweisen. So wurde zunächst der färberische Nachweis von Bacillen in Blutausstrichen und in solchen von angereichertem Material versucht, jedoch bald bewiesen, daß die Bakterioskopie ein irreführendes Verfahren sei, da säurefeste Blutbestandteile Tuberkelbacillen vortäuschen können. Ebenso brachten auch Tierversuche wechselnde und durchaus nicht eindeutige Ergebnisse. Züchtungsversuche gelangen, soweit wir das Schrifttum überblicken, vor *Löwenstein* nur *Bingold* in 4 Fällen von miliarer Tuberkulose.

Die beste Übersicht über die bisherigen Nachprüfungen der *Löwenstein*-schen Befunde gewinnt man wohl aus der vor einiger Zeit veranstalteten Umfrage der Medizinischen Klinik, die auf eine Anregung von *Kurt Meyer* hin erfolgte. Hier findet sich auch das Schrifttum der letzten Zeit in ziemlich vollständiger Weise zusammengetragen. Doch sind seither eine Reihe weiterer Arbeiten erschienen.

Bei Durchsicht sämtlicher bisher vorliegender, uns zugänglicher Untersuchungsergebnisse anderer Forscher — selbstverständlich ohne Berücksichtigung aller derjenigen Mitteilungen, die sich nur auf die klinische Erörterung der in *Löwensteins* Laboratorium erhobenen Befunde beschränken — ergibt sich ein ganz wechselndes Bild, wie es aus Tabelle 1 ersichtlich ist.

Tabelle 1.

			Gesamt	+	%-Satz und (Art der posit. Fälle)
Abt	Schweiz. med. Wschr. 1931, 45	Lungentuberkulose Leichenfälle . . .	20	4	20
d'Antona	Zit. bei Lang	schwere Tuberkulosen u. Gelenkrheumatismus .	30	—	—
Bessau	Med. Klin.; Umfrage	Tuberkulose Kinder	60	2	3,3
Bingold u. Spier .	Münch. med. Wschr. 1931, 45	Exsudative Tuberkulose.	15	—	—
Clairmont	Die Chirurgie der Tuberkulose, S. 611. Berlin 1931	akute Polyarthritis	10	—	—
Cohn	Med. Klin.; Umfrage	Tuberkulosen . . .	15	—	—
Domingo	C. r. Soc. Biol. Paris 108, 619	Hauttuberkulose .	27	—	—
Ederle u. Kriech .	Dtsch. med. Wschr. 1932, 1	Tuberkulosen . . .	172	8	4,6 (8 ma-
Engel	Med. Klin.; Umfrage	Rheumatismen . . .	8	2	25,0 (kro. +)
Favero	Zit. nach Zbl. Bakter. 105, 73	andere Krankheit.	24	—	—
Fischer	Klin. Wschr. 1931, 30	Gesunde	12	—	—
Gianetti	Zit. bei Lang	Tuberkulosen . . .	34	4	11 (mikro. +)
Hager	Med. Klin.; Umfrage	Nichttuberkulosen .	15	4	—
Horster	Klin. Wschr. 1931, 52	Hauttuberkulose .	9	—	—
Hüttig	Z. Tbk. 62, 35	Tuberkulosen . . .	22	—	—
Jontofsohn	Z. Tbk. 61, 35 (1931)	chronische Infekt- arthrit.	19	—	—
Kadisch	Med. Klin.; Umfrage	schwere Tuberkulosen	133	17	12,8
Kallos	Münch. med. Wschr. 1931, 45	schwere Tuberkulosen	85	—	—
Koch	Dtsch. med. Wschr. 1931, 90	Gelenkrheumatismus.	9	—	—
Lang	Med. Klin.; Umfrage	Tuberkulosen . . .	64	7	11
Levin	Med. Klin.; Umfrage	Tuberkulosen . . .	50	3	6 (mikro. +)
Mach	C. r. Soc. Biol. Paris 109, 722	Tuberkulosen . . .	58	—	—
Manteufel	Med. Klin.; Umfrage	Gelenkrheumatismus.	10	—	—
		andere Fälle, etwa	30	—	—
		Hauttuberkulose	20	—	—
		Hautfälle	25	—	—
		Lungentuberkulose lebend	81	2	2,5
		Leichen	10	2	20
		Lungentuberkulose	140	2	1,4 (mikro. +)
		Polyarthritis	11	—	—
		andere	12	—	—
		Lungentuberkulose	60	6	10 (mikro. +)
		Polyarthritis	5	2	40 (mikro. +)
		multiple Sklerose .	3	—	—
		Kontrollen	13	—	—
		Tuberkulosen	30	—	—
		Polyarthritis	9	—	—
		Schizophrenie . . .	23	—	—
		multiple Sklerose	8	—	—

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

			Gesamt	+	%-Satz und (Art der posit. Fälle)
<i>Meyer u. Schaede.</i>	Psychiatr.-neur. Wschr. 1931, 48	Schizophrenie . .	50		
<i>Muggia</i>	Zit. nach Zbl. Bakter. 105, 73	Gelenktuberkulose . .	5	—	—
<i>Oekonomopoulo, Papanikolaou, Joanides</i>	Z. Tbk. 63, H. 5	Tuberkulosen . .	4	—	—
<i>Oro</i>	Zit. nach Zbl. Bakter. 104, 208	schwere Lungen- tuberkulose . .	18	—	—
<i>Pollak</i>	Med. Klin. 1931, 31	Hauttuberkulose . .	27	4	14,7
<i>Rabinowitsch . . .</i>	Med. Klin.; Um- frage	Tuberkulosen . .	35	5	14
		Rheumatismus . .	9	—	—
		Kontrollfälle . .	7	—	—
		Lungentuberkulose	242	10	4,1 (davon 7 Fälle makro.)
		Leichen	20	8	40 (makro.+)
<i>Ritter</i>	Beitr. klin. Tbk. 79, 1	Polyarthritis	29	—	—
<i>Saegler</i>	Med. Klin.; Um- frage	andere Fälle	24	—	—
<i>Saenz.</i>	C. r. Soc. Biol. Paris 107, 1455	Lungentuber- kulose	43	3	7 (makro.)
<i>Schwabacher . . .</i>	Lancet 220, 1130	Hämatoogene Tu- berkulose	107	—	—
<i>Sigan</i>	Zit. bei Lang	isolierte Phthisen . . .	51	11	22
<i>Stefanescu, Nanu, Joanescu</i>	Presse méd. 2, 1805 (1931)	Gesamtmaterial	300	18	6 (11 Fälle makro. +)
<i>Unverricht u. Dosquet</i>	Z. Tbk. 63, H. 5	Gesamtmaterial	11	1	9,1
<i>Walter u. Höring .</i>	Med. Klin. 1932, 20	Gelenkrheumatis- mus	16	—	—
		Tuberkulose und Rheumatismus	21	2	9,5(makro.+)
		Lungentuberkulose	91	1	1,1
		andere Fälle	16	—	—
		Tuberkulosen	91	—	—

Die Tabelle zeigt, daß neben vollkommen ablehnenden und entmutigenden Mitteilungen in zahlreichen Fällen doch, wenn auch oft nur mikroskopisch, der Nachweis von alkoholsäurefesten Stäbchen gelang, ja daß in einigen Fällen auch die Reinzüchtung eines Stammes durchgeführt werden konnte. Verhältnismäßig am häufigsten war der Keimnachweis bei schweren Tuberkulosen möglich (*Rabinowitsch, Sägler*).

Soweit wir also das Schrifttum überblicken, scheint es somit von *Löwensteins* Erfolgen abgesehen, 110mal gegückt zu sein, aus dem Blute Lebender ein positives Züchtungsergebnis zu erzielen. Ob es sich dabei um mit freiem Auge sichtbare Wuchsherde oder nur um einen mikroskopischen Nachweis handelte, ist vielen Mitteilungen nicht zu entnehmen. Zwölffmal gelang die Kultur aus dem Leichenblut von Tuberkulosen.

Was die rheumatischen Erkrankungen betrifft, so finden sich hier 5 Fälle, wenn wir von dem nicht näher bezeichneten Material *Saénz'* abssehen. *Domingo* konnte in 2 Fällen von subakutem Gelenkrheumatismus entsprechende Keime züchten, *Nanu, Jonescu, Stefanescu* in einem von akutem Gelenkrheumatismus, während schließlich *Mach* zweimal mikroskopisch alkoholsäurefeste Stäbchen nachweisen konnte. Vereinzelt wurde auch bei Hauterkrankungen ein säurealkoholfester Stamm gezüchtet, während sämtlichen Untersuchern bei allen anderen Krankheiten ein positives Züchtungsergebnis versagt blieb. Hierbei ist auffällig, daß einige Forscher, so z. B. *Rabinowitsch*, wohl nicht so selten Reinkulturen bei Tuberkulosen, nie aber solche auch bei einer großen Zahl von Rheumatismusfällen erzielten. Bemerkenswert ist jedenfalls die Tatsache, daß der Hundertsatz der positiven Ergebnisse mit der Zahl der angelegten Kulturen steigt, was darauf hindeutet, daß eine mit der Zeit erworbene, gründlichere Beherrschung der Technik bessere Erfolge gewährleistet.

III. Untersuchungen an Geweben und Körperflüssigkeiten.

Bevor wir auf das Blutzüchtungsverfahren eingehen, wollen wir darauf hinweisen, daß wir seit einer Reihe von Jahren das unserem Institut überwiesene klinische Untersuchungsmaterial wie *Harne, Auswurf, Eiter, Liquor cerebrospinalis, sowie Gelenk- und Pleurapunkte* entsprechend dem Wunsch der Kliniker, nach *Löwensteins* Verfahren kulturell verarbeitet haben, wobei es vor allem der besonders sorgfältigen Arbeitsweise der wissenschaftlichen Hilfskraft unseres Institutes, Fräulein *A. Hansa*, zu danken ist, daß überraschend gute Ergebnisse erzielt wurden. Ebenso gelang häufig der kulturelle Nachweis von Tuberkelbacillen aus Geweben sowohl von der Leiche, als auch vom Lebenden, selbst dann, wenn der färberische Nachweis im Ausgangsmaterial mißglückt war. Insgesamt wurden in den letzten Jahren 950 derartige Fälle untersucht, von denen 125 ein positives Ergebnis zeigten, wie aus Tabelle 2 hervorgeht.

Tabelle 2.

	Gesamt	Negativ	Positiv	%-Satz der Positiven
Pleuraexsudate.	252	234	18	7,1
Harn	162	146	16	9,8
Auswurf.	124	110	14	11,3
Kniepunktat	79	75	4	5,0
Liquor	33	30	3	9,0
Eiter	28	15	13	46,4
Stuhl	22	21	1	4,0
Bauchwasser.	2	2	—	—
Gewebe: von Lebenden	16	13	3	18,0
von Leichen.	54	41	13	24,0

In nahezu allen Fällen nahmen wir eine Schwefelsäurevorbehandlung des zu untersuchenden Materials vor. Eine genaue Beschreibung der Technik findet sich in den Mitteilungen *Löwensteins*. *Wir können das Verfahren in jeder Hinsicht wärmstens empfehlen.* Es leistete uns insofern wertvolle Dienste, als wir aus wirtschaftlichen Gründen in vielen Fällen auf den Nachweis durch Tierversuche verzichten mußten und die positiven Ergebnisse oft in weitaus kürzerer Zeit sich erzielen ließen. Der Tierversuch wurde nur in jenen spärlichen Fällen durchgeführt, in denen die Kliniker ausdrücklich eine Virulenzprüfung der gezüchteten Stämme verlangten.

IV. Besprechung der Blutkulturmethode.

Seit etwa 2 Jahren wurde das *Löwensteinsche* Verfahren auch von uns zur Untersuchung von Blutproben angewendet. Die ersten, etwa 400 Züchtungsversuche, zeigten jedoch ein vollkommen negatives Ergebnis, obwohl ein wechselndes Material, darunter auch Blut von an miliarer Tuberkulose Verstorbenen herangezogen wurde. Eine neuerliche Belehrung im Laboratorium *Löwensteins* klärte uns darüber auf, daß zwar geringe, aber anscheinend doch bedeutsame Unterschiede zwischen unserer und *Löwensteins* Arbeitsweise bestanden. Diese Einzelheiten betrafen, wie in unserer seinerzeitigen Veröffentlichung bereits erwähnt, vor allem die besonders gründliche Waschung des Bodensatzes, der dadurch an Masse stark verringert und weitgehend von Hämoglobin befreit wird, weiters die gleichmäßige Verimpfung des gesamten Rückstandes und schließlich die genaue mikroskopische Durchsicht der Abstriche jener Kulturröhrchen, bei denen mit freiem Auge kein Wachstum zu erkennen war.

Nach diesen Verbesserungen erprobten wir zunächst unser technisches Können am *Leichenblut* von an miliarer Tuberkulose Verstorbenen und konnten nun tatsächlich sehr bald das Wachstum sichtbarer Wuchsherde aus dem Leichenblut derartiger Fälle und nahezu ebenso regelmäßig von Fällen mit chronisch fortschreitender Lungentuberkulose erzielen. Der Hundertsatz der positiven Kulturen in diesem Material betrug 85%, zeigte also eine Höhe, die zu der Annahme berechtigte, daß bei Berücksichtigung sonstiger unvermeidlicher Fehlerquellen, wie solche jedem bakteriologischen Verfahren anhaften, wohl in allen diesen Fällen *Tuberkelbacillen im Blute anwesend* waren. Wir haben kürzlich in Virchows Archiv ausführlich über unsere einschlägigen Untersuchungsergebnisse, und zwar über 31 positive Fälle berichtet und nebstbei hervorgehoben, daß bei mehreren, wohl fortschreitenden, aber nicht den Tod verursachenden Lungentuberkulosen, ebenso wie bei zahlreichen nicht fortschreitenden Tuberkulosen und tuberkulosefreien Leichen der Kulturversuch mißlang. Diese 31 positiven Kulturen aus dem Leichenblut Schwerttuberkulöser zeigen Stämme mit den zwischen Wachstumseigenschaften der Tuberkelbacillen und erweisen sich auch im Tierversuch, soweit sie geprüft

sind, als entsprechend krankheitserregend. In einigen Fällen wurde nur *mikroskopisch* in den Abstrichen von der Oberfläche der Kulturröhrchen ein Wachstum festgestellt. In Unterkulturen dieser Fälle gelang es nicht, mit freiem Auge erkennbare Wuchsherde zu erzielen.

Neben diesem *Leichenmaterial* wurden etwa 500 Blutproben untersucht, die *aus dem strömenden Blut lebender Kranker* stammten. Die Züchtungsergebnisse dieser Reihe sind jedoch durchaus andere und nicht eindeutige, so daß zu deren Verständnis eine genauere Besprechung der angewendeten Arbeitsweise erforderlich ist.

Die im Haemautröhren oder in Natriumcitrat übersandte, möglichst von Gerinnseln befreite Blutprobe in der Menge von 5—20 ccm wurde in eigene, etwa 80 ccm fassende Zentrifugenröhren überführt und durch Zusatz von 5%iger Essigsäure hämolysiert, wobei ein Farbenumschlag ins Bräunliche die erfolgte Blutkörperchenauflösung anzeigen. Hierauf wurde 10 Min. lang scharf (bei einer Umdrehungszahl von etwa 3000) abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen und ein Rückstand von ungefähr 5—10 ccm erzielt. War die Blutkörperchenauflösung das erstemal noch nicht vollständig oder die Menge des verbleibenden Bodensatzes zu groß, so wurde eine zweite Essigsäurewaschung angeschlossen, nach der sich fast ausnahmslos die Bodensatzmenge stark verminderte. Nun wurden mehrere, gewöhnlich 2—3 Waschungen mit destilliertem Wasser bis zu einer nur mehr leicht rostbraunen Verfärbung der Flüssigkeit vorgenommen, bis ein lockerer, graubrauner Rückstand zurückblieb, dessen Menge gerade ausreichte, um die Nährbodenoberfläche von 4 Kulturröhrchen mit einer gleichmäßigen dünnen Schicht zu bedecken.

Als Fehlerquelle, kann, wie vorhin kurz bereits gestreift, bei diesen Maßnahmen ein *zu geringes Auswaschen* in Betracht kommen, wodurch der Blutfarbstoffgehalt des Bodensatzes, wie auch dessen Masse zu groß bleibt. Nach *Löwenstein* soll der Blutfarbstoff durch seine Sauerstoffzehrung eine wachstumshemmende Wirkung auf Tuberkelbacillen ausüben. Mehr noch würden wir jedoch ein Hindernis für das Wachstum darin erblicken, daß ein wenig gewaschener, massiger und blutfarbstoffreicher Bodensatz auf der Nährbodenoberfläche zu einem *lackartigen Überzug* erstarrt. Weiters ist es fehlerhaft, *nicht den ganzen Bodensatz zu verimpfen*, um so mehr da nahezu in allen positiven Fällen immer *nur ein* Kulturröhrchen Wachstum zeigte. Bei nicht einwandfreiem Material, wie z. B. bei Leichenblut, schlossen wir, entsprechend den Angaben *Löwensteins*, eine Behandlung des Rückstandes mit *10%iger Schwefelsäure* von 10 Min. Dauer an. Durch diese Schwefelsäureeinwirkung nimmt der Rückstand eine tiefschwarze Farbe und zähre Beschaffenheit an und muß durch zweimalige Waschung von der Säure befreit werden.

In letzter Zeit verwenden wir ein anderes, von *Löwenstein* neuerlich empfohlenes Verfahren, bei dem unter Verzicht auf die Essigsäure die Blutkörperchenauflösung *nur durch destilliertes Wasser* erzielt wird. Der

Vorgang gestaltet sich folgendermaßen: Die in das Zentrifugenröhren überführte Blutmenge wird mit keimfreiem *destilliertem Wasser* versetzt, wobei das Blut *lackfarben wird, ein Niederschlag jedoch ausbleibt*. Den Rückstand bildet nach dem ersten Zentrifugieren in der Dauer von mindestens 20 Min. nur mehr ein weißlicher Belag am Boden des Röhrchens, während die darüberstehende Flüssigkeit einen rosa Farbton angenommen hat. Nach einer zweiten Waschung wird der Bodensatz in einer ganz geringen Menge der überstehenden Flüssigkeit aufgeschwemmt und diesmal nur auf 3 Röhrchen verimpft, wobei es sich empfiehlt, für ein *gründliches Verreiben auf der Nährbodenoberfläche* zu sorgen. Auch hier erfolgt in *zweifelhaften Fällen eine Schwefelsäurebehandlung*.

Einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Verfahren bildet die *größere Einfachheit des zweiten*, wobei allerdings auf einen Eiweißniederschlag verzichtet wird, der sicherlich imstande ist, die Bacillen beim Zentrifugieren leichter niederzureißen. Einen geeigneten Maßstab für die Gleichwertigkeit beider Verfahren bilden jedoch die Züchtungsergebnisse der tuberkulösen Leichenfälle, da in diesen Untersuchungen bei dem Wasserverfahren in gleicher Weise wie bei der Essigsäureanwendung *ein sehr befriedigendes Züchtungsergebnis erzielt wurde*. Demzufolge wenden wir derzeit das viel einfache „Wasser“verfahren an und können es auf das Wärmste empfehlen.

Als *Nährboden* benützen wir den von Löwenstein letzthin angegebenen peptonfreien Asparagineiernährboden, der folgende Zusammensetzung aufweist.

Asparagininstammlösung:

Asparagin	4 g	
Kaliumphosphat	1 g	2 Stunden bei 100° im Dampf-
Natrium citricum	1 g	sterilisator keimfrei machen. (Kann
Magnesiumsulfat	1 g	mehrere Monate aufbewahrt werden.)
Destilliertes Wasser	1000 cem	
Glycerin redest. pur. 28°	60 cem	

Zu 300 cem frisch keimfrei gemachter Asparaginlösung kommen 12 g Kartoffelmehl und 24 cem Glycerin. Diese Mischung wird 2 Stunden im *Wasserbad* unter öfterem Umschütteln gekocht, bis auf 56° langsam abgekühlt und hierauf 8 ganze Eier und 2 Dotter zugesetzt. Die vorher mit warmem Wasser gewaschenen, mit Seife und 5%iger Sodalösung abgebürsteten Eier werden mittels eines keimfreien Trichters mit weiter Öffnung in die Asparaginlösung eingebracht. Das Öffnen der Eier erfolgt mit einer abgeglühten Pinzette in der Weise, daß an einem Ende des Eies die Schale an umschriebener Stelle mit der Pinzette abgetragen und über der Trichteröffnung am entgegengesetzten Ende mit der Pinzette durchlocht wird, wodurch der Inhalt des Eies von selbst in den Trichter bzw. in die Asparaginlösung abfließen kann. Hierauf wird fest geschüttelt, bis ein gleichmäßiges Gemenge entsteht und nun entweder 10 cem Malachitgrünlösung oder 20 cem Kongorotlösung zugesetzt (beide Lösungen 2%ig, 2 Stunden im Dampf keimfrei gemacht, die Mengenangabe der Farbstoffe auf 300 cem Asparaginlösung bezogen). Nochmals gut umschüttelt. Abfüllen in Röhrchen.

Bei der Bereitung des Nährbodens wird darauf geachtet, daß das Erstarren in den Röhrchen *nicht im Trockensterilisator*, sondern im

Dampfsterilisator bei einem Wärmegrade von *höchstens 80°* erfolgt. Die Röhrchen bleiben an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 2 Stunden im Sterilisator und werden nach einer 24stündigen Keimfreiheitsprobe bei 37° bis zur weiteren Verwendung im Eisschrank aufbewahrt.

Es muß jedoch schon an dieser Stelle bemerkt werden, daß es uns bisher trotz genauer Übereinstimmung dieser Nährbodenbereitung mit dem Vorgehen *Löwensteins* in keinem Falle gelungen ist, einen Stamm mit makroskopisch sichtbaren Kolonien zu erzielen, wenn in der primären Kultur nur mikroskopisch Stäbchen nachweisbar waren. Nur ein einziges Mal, bei einem Fall von Iridocyclitis, konnten in der ersten Unterkultur ganz feine Wuchsherde gesehen werden, die jedoch in weiteren Überimpfungen nicht mehr zum Angehen zu bringen waren. Sonst war es noch einige Male möglich, in der ersten Unterkultur mikroskopisch im Abstrich die säurefesten Stäbchen neuerlich nachzuweisen. Weitere Überimpfungen blieben hingegen vollkommen steril, so daß die Frage offen gelassen werden muß, ob diese Stäbchen in der Unterkultur wirklich gewachsen waren oder bloß das ursprünglich übertragene Material darstellten. Erwähnt sei noch, daß die Unterkulturen in ähnlicher Weise in mehrwöchigen Zwischenräumen wie die primären Kulturen überprüft wurden. Schließlich möchten wir noch bemerken, daß diejenigen Fälle, bei denen zwei oder mehr von den beimpften Röhrchen sich bei der Überprüfung als verunreinigt erwiesen, ausgeschieden wurden, da wir ja wissen, daß von mehreren beimpften Röhrchen meist nur ein einziges Wachstum zeigt.

V. Untersuchtes Blutkulturmateriale.

Das untersuchte Material von Blutproben umfaßt nach Ausscheidung der ersten 400 Blutuntersuchungen und auch jener Fälle, bei denen Zweifel hinsichtlich einer einwandfreien Arbeitsweise bestanden, 665 verwertbare Beobachtungen, die in folgende Gruppen zerfallen:

- a) Die bereits mitgeteilten und obenerwähnten Versuche der Züchtung von Bacillen aus dem *Leichenblut Tuberkulöser und Nichttuberkulöser*.
- b) Züchtungen aus dem *strömenden Blut* lebender Kranker, bei denen jedoch bis heute der makroskopische kulturelle Nachweis, bzw. die Züchtung eines typischen Tuberkelbacillenstammes mißglückt ist. Hingegen konnte bei einer Reihe dieser Fälle ein *mikroskopischer* Bacillennachweis erbracht werden.
- c) Beobachtungen am *Leichenblut von Endokarditis und Lymphogranulom*, für die das gleiche gilt wie für die zweite Gruppe.
- d) Jene Beobachtungen, bei denen zwar alkoholsäurefeste Stäbchen aus dem Blut gezüchtet werden konnten, diese Keime sich jedoch in ihrem kulturellen Verhalten, wie auch hinsichtlich der Wirkung auf Tiere, *nicht wie Tuberkelbacillen verhielten*. Die Fälle wurden in die obigen Gruppen nicht eingeordnet, sondern werden getrennt besprochen.

a) *Untersuchungen am Leichenblute Tuberkulöser und Nichttuberkulöser (makroskopisch positive Kulturen).*

Die hierher gehörigen Befunde wurden bereits ausführlich in Virchows Archiv mitgeteilt. Dort wurde hervorgehoben, daß aus dem Herzblut Verstorbener, die an miliarer Tuberkulose oder an schwerer zum Tode führender, weit ausgedehnter, tödlicher Lungentuberkulose, bzw. in einem Falle an Harngeschlechtstuberkulose erkrankt waren, *nahezu regelmäßig* der kulturelle Nachweis von Tuberkelbacillenstämmen erbracht werden konnte, der typische biologische Eigenschaften und Tierpathogenität aufwies. Nur vereinzelt gelang in dieser Reihe bloß ein mikroskopischer Nachweis von Keimen, indem im Abstrich vom Kulturröhrchen alkohol-säurefeste Stäbchen gesehen wurden.

Bei einer Reihe von Beobachtungen, bei denen eine zwar fortschreitende, aber weniger ausgedehnte und nicht tödliche Tuberkulose bestand und der Tod durch eine andere Erkrankung verursacht wurde, mißlang der Nachweis von Keimen im Herzblut, ebenso wie bei zahlreichen nicht fortschreitenden Tuberkulosen und aus tuberkulosefreien Leichen. Im ganzen wurde an dieser Stelle über 31 zum allergrößten Teil makroskopisch positive Fälle unter 154 Fällen berichtet. Seither hat sich ihre Zahl auf *46 positive* unter 191 Beobachtungen vermehrt. Über Untersuchung am Leichenblut von Endokarditis und Lymphogranulom wurde damals nicht berichtet. Es wird jetzt in der dritten Gruppe c) von ihnen die Rede sein.

b) *Kulturen aus dem strömenden Blut mit mikroskopischem Keimnachweis.*

Bezüglich des Wertes und der Bedeutung der „mikroskopisch-positiven“ Kultur dürfte eine Erörterung vonnöten sein. Wie uns zahlreiche Untersuchungen aus der Zeit des bakterioskopischen Nachweises der Tuberkelbacillen zeigten, kommen im Blutbodensatz eine Reihe von Stoffen vor, welche die Form säurefester Stäbchen annehmen und so Tuberkelbacillen vortäuschen können. Daher müssen wir in der Beurteilung unserer mikroskopisch positiven Fälle besonders vorsichtig sein und damit rechnen, daß in einem Teil derselben nicht Tuberkelbacillen, sondern Kunstprodukte vorliegen können. Des weiteren können alkohol-säurefeste Spaltpilze, vor allem solche saprophytärer Natur, Tuberkelbacillen vortäuschen.

Die Annahme, daß derartige Saprophyten jedoch nur mikroskopische Kulturen bilden sollten, besitzt verhältnismäßig wenig Wahrscheinlichkeit, da ja gerade die Saprophyten sonst eine starke Wachstumskraft besitzen und wohl kaum nur mikroskopische Wuchsformen erzeugen. Die weitere Möglichkeit wäre die, daß es sich zwar um *typische Tuberkelbacillen* handle, die jedoch infolge irgendwelcher Einflüsse *nicht zu sichtbaren Wachstumsherden auszukeimen vermögen*. Auffallend ist, daß

es uns auch in der Unterkultur nicht gelang, derartige mikroskopische Wuchsherde zu sichtbaren Wuchsherden heranzuziehen. Wir haben bereits in unserer ersten Mitteilung hervorgehoben, daß es schwierig sei, bei einem nur mikroskopisch positiven Fall eine erfolgreiche Unterkultur anzulegen, da man wahllos abimpfen muß und es so dem Zufall überlassen bleibt, ob tatsächlich Stäbchen übertragen werden oder nicht. Der Umstand, daß es uns auch tatsächlich kein einziges Mal gelang, in der Unterkultur makroskopische Wuchsherde zu erzielen, spricht wohl sehr für das Wachstumsunvermögen der Stämme, um so mehr da manchmal bei der mikroskopischen Überprüfung der Unterkulturen Stäbchen gefunden wurden, die, anscheinend doch übertragen, nicht heranwuchsen.

Es ist somit anzunehmen, daß es sich hier, vorausgesetzt, daß tatsächlich Keime vorliegen, um *Kümmerformen* handelt, die keine Wachstumskraft mehr besitzen. Für eine derartige Annahme spricht der noch zu erörternde, im Vergleich hohe Hundertsatz solcher mikroskopisch positiver Befunde bei Miliartuberkulosen und schweren Lungentuberkulosen, dessen Erklärung sonst schwierig wäre.

In folgender Tabelle 3 ist das von uns verarbeitete *Material der Beobachtungen von Züchtungsversuchen aus dem strömenden Blut mit mikroskopischem Züchtungsergebnis* geordnet, wobei wir diejenigen Fälle nicht aufgenommen haben, bei denen hinsichtlich der Arbeitsweise Bedenken obwalteten, wie z. B. die, bei denen mehrere der Kultur röhrchen verunreinigt waren. Nach der Sichtung bleiben 435 Züchtungsversuche übrig, die sich folgendermaßen aufteilen und die in der Zeit vom 20. Juli 1931 bis 20. Februar 1932 angelegt wurden.

Überblicken wir die vorliegende Tabelle, so fällt auf, daß sich unter 44 *Vergleichsfällen* 3 *positive Fälle* finden. Diese Vergleichsgruppe umfaßt jene Beobachtungen, bei denen sich klinisch keinerlei Beziehungen zu einem tuberkulösen oder rheumatischen Leiden nachweisen ließen, die vielmehr wegen anderer Erkrankungen in Behandlung standen. Vollkommen Gesunde wurden von uns nicht untersucht. Der eine dieser Fälle betrifft eine Ischias mit positiver Wa.R. im Blutwasser (bei diesem Fall liegt merkwürdigerweise auch von einer anderen Untersuchungsstelle ein positiver Befund vor), der zweite, eine *Landry-sche Paralyse*, der dritte war unter dem Verdacht einer Tuberkulose des Bauchfelles aufgenommen worden, doch deckte die einige Tage später vorgenommene Leichenöffnung eine Krebsaussaat des Bauchfelles bei Magenkrebs auf, ohne daß sich irgendwelche tuberkulösen Veränderungen nachweisen ließen. Diese Beobachtungen bestätigen teilweise die von uns erörterten *Täuschungsmöglichkeiten* bei mikroskopischen Befunden. Andererseits aber ist doch auffallend, daß sich bei Kranken mit *miliarer Tuberkulose* ein *verhältnismäßig hoher Hundertsatz* derartiger positiver Ergebnisse fand. Ebenso zeigten *schwere Lungentuberkulosen* und bis zu einem gewissen Grad auch *chirurgische Tuberkulosen* nicht allzu spärlich

Tabelle 3.

	Gesamt	Negativ	Positiv	%-Satz der Positiven
Miliare Tuberkulose	7	4	3	42,7
Schwere Lungentuberkulose . . .	18	15	3	16,6
Leichte Lungentuberkulose . . .	49	48	1	2,0
Pleuritis exsudativa	6	6	—	—
Tuberculosis peritonei	5	5	—	—
Knochen-, Gelenktuberkulose . .	36	32	4	11,1
Nieren-, Urogenitaltuberkulose .	1	1	—	—
Adnextumoren (Ätiologie?) . . .	8	8	—	—
Lupus vulgaris, frisch	42	36	6	14,3
Lupus vulgaris, alt	4	4	—	—
Papulo-nekrotisches Tuberkulid .	6	5	1	16,2
Tuberculosis verrusa cutis . . .	2	2	—	—
Lupus erythematodes	27	23	4	14,7
Erythema induratum Bazin . . .	3	3	—	—
Erythema nodosum	2	2	—	—
Erythema exsudativum multiforme	2	2	—	—
Iritis und Iridocyclitis	51	48	3	5,9
Chorioiditis	10	10	—	—
Skleritis	6	4	2	33,3 (?) ¹
Sympathische Ophthalmie	2	2	—	—
Conjunctivitis eczematosa	3	3	—	—
Periphlebitis retinalis tuberculosa	3	3	—	—
Retrobulbäre Neuritis	2	2	—	—
Polyarthritides acuta	38	30	8	21,0
Primäre chronische Polyarthritides	7	5	2	28,6
Chorea minor	6	5	1	16,2
Endopericarditis rheumatica . . .	9	7	2	22,1
Poncet'sche Erkrankung	1	—	1	100,0 (?) ¹
	61	47	14	23,1
Multiple Sklerose	5	5	—	—
Lymphogranulom	4	4	—	—
Mycosis fungoides	5	5	—	—
Sepsis	21	19	2	9,5
Kontrollen	44	41	3	6,8
	435	389	46	11,5

positive Befunde, was die Annahme wesentlich unterstützt, daß es sich zumindest in einem Teil der mikroskopisch positiven Fälle um wirkliche Tuberkelbacillen handelt. So lassen sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die mikroskopischen Züchtungsergebnisse ebenfalls verwerten und würden Löwensteins Angaben, wenn auch nur in einem unvergleichlich geringeren Hundertsatz bestätigen.

¹ Die Fragezeichen sollen besagen, daß bei der geringen Zahl der Beobachtungen die Prozentzahl einen fraglichen Wert hat.

Bei den leichteren Lungentuberkulosen, bei denen wir die Spitzenzprozesse eingereiht haben, fehlen merkwürdigerweise positive Befunde fast vollkommen, ebenso bei der *Pleuritis exsudativa* und der *Peritonitis tuberculosa*, was mit unseren schon erwähnten Befunden am Leichenblut wohl übereinstimmt.

Weiters vermerkt unsere Tabelle bei *Lupus vulgaris*, sowie bei den *papulo-nekrotischen* Tuberkuliden und nicht so selten auch beim *Lupus erythematodes* positive Befunde. Das gleiche gilt von den *Augenerkrankungen*, vor allem von den beiden positiven Ergebnissen bei Scleritis, hingegen bildet unser kleines Material bei sympathischer Ophthalmie und retrobulbärer Neuritis keine Anhaltspunkte für das Vorkommen einer Bacillämie.

Was die *rheumatischen Erkrankungen* betrifft, so fällt zunächst der ziemlich hohe Hundertsatz von 23 bei Berücksichtigung der ganzen Gruppe auf, der sowohl die akuten, wie die primär-chronischen Polyarthritiden umfaßt. In die Gruppe der akuten Polyarthritiden wurden sämtliche uns zugänglichen, allerdings auch die mit Salicylpräparaten vorbehandelten und die subakuten Fälle eingerechnet. Natürlich ermöglichen die gefundenen Zahlen kein abschließendes Urteil, doch sind die einschlägigen positiven Befunde reichlich genug, um uns der strikten Ablehnung nicht anzuschließen, der die Angaben Reitters und Löwensteins von seiten anderer Forscher begegnet sind. Mit Rücksicht auf die Hinweise im Schrifttum möchten wir jedoch erwähnen, daß es sich in allen diesen Fällen nur um eine einmalige Blutuntersuchung jedes der Patienten handelt.

Bei den 4 untersuchten Fällen von *Lymphogranulom* und bei den 5 von *Mycosis fungoides* waren laut Tabelle sämtliche Kulturen negativ.

In der Gruppe der *septischen Erkrankungen* fanden jene Beobachtungen Aufnahme, bei denen ein hochfieberhaftes Krankheitsbild ohne klinische Beziehung zu einem tuberkulösen Krankheitsherd vorlag. Auch hier ließen sich unter 21 Fällen zweimal positive Befunde erheben, einmal bei einer länger dauernden kryptogenetischen Sepsis, das zweitemal bei einer Unterarmzellgewebsentzündung nach Verletzung.

Die Frage einer tuberkulösen Bacillämie, ausgelöst durch septische Erkrankungen, war von mancher Seite erörtert worden. Unsere Untersuchungen am Leichenblut konnten jedoch keine Unterstützung dieser Ansicht bieten.

Im gesamten Material finden sich also 435 Fälle mit 46 mikroskopisch positiven Züchtungsbefunden, was einem Hundertsatz von 11,5 entspricht.

c) Untersuchungen an Leichenblut bei Endokarditis.

Diese Gruppe umfaßt diejenigen Leichenfälle, die wir bewußterweise in der Veröffentlichung, welche die Beobachtungen von a) betrifft, nicht berücksichtigt haben. Es sind dies Fälle von *Endokarditis*, bzw.

Lymphogranulom, die wir hier deshalb anreihen, weil die einschlägigen Züchtungsergebnisse mit jenen aus dem strömenden Blut übereinzustimmen scheinen.

Es wurden 22 Leichenfälle mit entzündlichen Veränderungen an einer oder mehreren Herzklappen untersucht, von denen fünf ulceröse Endocarditiden ohne rheumatische Vorgeschichte betrafen und zum Teil den Charakter der Endocarditis lenta mit einer durch *Streptococcus viridans* hervorgerufenen Bakterämie zeigten. Sie alle waren kulturell negativ. Siebenmal handelte es sich um Fälle mit Klappenfehlern auf rheumatischer Grundlage, bzw. mit Gelenkrheumatismus in der Vorgeschichte, ohne daß sich weder klinisch noch anatomisch Anhaltspunkte für ein Wiederaufflackern des Krankheitsherdes hätten finden lassen. Der Tod war in diesen Fällen regelmäßig durch die Kreislaufschwäche infolge des Klappenfehlers eingetreten. Auch hier negative Züchtungsergebnisse. Zehnmal jedoch waren bei ähnlichen Fällen die Zeichen eines Wiederaufflackerns in Form frischerer und wärzchenförmiger oder thrombotischer Auflagerungen auf einer oder auf mehreren Klappen nachzuweisen. Von diesen Beobachtungen waren vier positiv.

Dreimal waren mikroskopisch die Stäbchen im Kulturausstrich gefunden worden, zweimal bei einer wärzchenförmigen Herzklappenentzündung mit Wiederaufflackern und einmal bei einer solchen mit frischen thrombotischen Auflagerungen auf den Klappen. Bei einem dieser Fälle wurden bei der Leichenöffnung in der linken Lungen spitze eine kleine eingezogene schiefrige Schwiele und im Gewebe der linken Lunge vereinzelte über stecknadelkopfgroße, scharf umschriebene, teils schiefrige, teils grauweißliche, derbe Knötchen gesehen. Bei den beiden übrigen Fällen fehlten sichtbare tuberkulöse Veränderungen.

In dem vierten Fall jedoch entwickelten sich innerhalb von 5 Wochen mit freiem Auge sichtbare Wuchsherde auf den beimpften Nährboden und in weiterer Folge konnte ein typischer Tuberkelbacillenstamm gezüchtet werden, der die charakteristischen kulturellen Eigenschaften des Typus *humanus* mit entsprechender Tierwirkung zeigte. Der Fall betrifft eine 47jährige Frau, die an einer *Mitral- und Aorteninsuffizienz und -stenose* verstorben war. Nebstbei fand sich eine vollständige Verwachsung zwischen Herz und Herzbeutel sowie zahlreiche alte Erweichungsherde in beiden Großhirnhälften; im Leichenbefundbericht findet sich keine Angabe, die für das Bestehen einer tuberkulösen Erkrankung sprechen würde.

Überblicken wir die Beobachtungen von b) und c), so ergibt sich, daß, wenn auch dem mikroskopischen Keimnachweis in den Kulturen nur eine bedingte Beweiskraft zukommt, gerade diejenigen Fälle in einem hohen Hundertsatz positiv waren, bei denen ein solches Ergebnis nach den Angaben Löwensteins zu erwarten gewesen wäre. Besonders bemerkenswert sind in dieser Hinsicht die Züchtungsergebnisse aus dem strömenden

Blut bei den *rheumatischen Erkrankungen*, zu denen auch die entsprechenden Leichenblutbefunde eine weitgehende Ergänzung darstellen. Diese Ergebnisse sind um so bemerkenswerter, als sie mit den Befunden *Löwensteins* bis zu einem gewissen Grade übereinzustimmen scheinen. Im ganzen aber kann kein abschließendes Urteil über die Bedeutung eines derartigen mikroskopischen Keimnachweises gefällt werden, da, wie erwähnt, einerseits auch andere Gebilde, die keine Mikroorganismen sind, sondern von Blutbestandteilen herrühren, Tuberkelbacillen vorzutäuschen vermögen, andererseits auch säurealkoholfeste Saprophyten färberisch und morphologisch von Tuberkelbacillen nicht unterschieden werden können. Ein Erfassen *Kochscher Bacillen* erscheint daher einstweilen in solchen „mikroskopischen Kulturen“ nicht durchführbar, weshalb eine endgültige Entscheidung über die Bedeutung der Angaben *Löwensteins* erst dann getroffen werden kann, wenn mit freiem Auge sichtbare Wachstumsherde und dementsprechend auf ihre biologischen Eigenschaften prüfbare Stämme in zreichender Anzahl vorliegen werden.

An dieser Stelle sei mit Rücksicht auf die manchmal erörterten Beziehungen zwischen Tuberkulose und *Lymphogranulom* folgendes angeführt.

Bei 4 obduzierten Fällen von *Lymphogranulom* wurden im Abstrich von den Kulturröhrchen zweimal mikroskopisch Stäbchen nachgewiesen. Nur in einem dieser beiden Fälle war eine tuberkulöse Spitzennarbe im Befund vermerkt, bei den übrigen fehlten Hinweise auf tuberkulöse Veränderungen. Ein Fall von *Mycosis fungoides* ergab ein völlig negatives Ergebnis, in einem zweiten Fall wurde einer der später zu besprechenden atypischen Stämme wie in den Fällen von d) gezüchtet.

d) Alkoholsäurefeste, nicht Tuberkelbacillen entsprechende Stämme bei verschiedenen Erkrankungen.

Diese Reihe betrifft Fälle, bei denen Stämme aus dem Blut gezüchtet wurden, die sich *in ihrem kulturellen Verhalten wie auch im Tierversuch* deutlich von Tuberkelbacillen unterschieden.

Die Stämme konnten sowohl aus Leichenblut, als auch aus strömendem Blut gezüchtet werden, und zwar zweimal aus Leichenblut Tuberkulöser, viermal aus Leichenblut Nichttuberkulöser und ebenso auch aus strömendem Blut von Tuberkulösen und Nichttuberkulösen. Im allgemeinen zeigen diese in 12 Fällen gefundenen Stämme ein ziemlich einheitliches Verhalten, vereinzelt jedoch konnten bezüglich einiger Eigenschaften wesentliche Unterschiede festgestellt werden.

In der *ersten Zucht*, in der sie meist schon früher als typische Tuberkelbacillenwuchsherde sichtbar werden (etwa nach 2—3 Wochen), lassen sie sich von diesen oft nicht deutlich unterscheiden und erst in der Unterkultur treten dann ihre charakteristischen Wachstumseigentümlichkeiten zutage.

Die erste Zucht zeigte ganz feine, gelbe, zumeist scharf begrenzte Wachstumsherde.

Bei der *mikroskopischen Untersuchung* finden sich größtenteils alkoholsäurefeste Stäbchen. Bei der Durchsicht der Stämme konnten 2 Arten voneinander unterschieden werden, solche mit kürzeren und etwas plumperen Stäbchen und solche mit längeren und schlankeren Formen. Letztere zeigen außer Ansätzen zur Fadenbildung und Unterteilung echte Verzweigungen. Der Grad der Alkoholsäurefestigkeit ist außer bei den Stäbchen eines Stammes nicht einheitlich. Säure allein entfärbt den größten Teil der Keime nicht. Nach mehreren Überimpfungen auf *Löwenstein*-Nährböden nimmt die Alkoholsäurefestigkeit bei fast allen Stämmen noch deutlich ab.

Bei Behandlung mit absolutem Alkohol oder Natriumsulfit ist kein Unterschied gegenüber echten Tuberkelbacillen wahrzunehmen. Der Gramfarbstoff wird nur zum Teil aufgenommen, aber bei der Alkoholdifferenzierung nicht mehr abgegeben. Sehr häufig sieht man ziehnegative, stark mit Methylenblau sich färbende, etwa $\frac{1}{2} \mu$ im Durchmesser haltende, kugelförmige Gebilde, die häufig auch innerhalb der Keime, zum Teil in Endstellung vorkommen. Eine Färbung auf *Ernst-Babésche* Körperchen nach *Neisser* gelingt ebensowenig, wie die Darstellung einer Kapsel. Im hängenden Tropfen erweisen sich die Stäbchen als unbeweglich.

In *Unterzuchten* (Subkulturen), die zur Prüfung der Wuchs-eigen-schaften besonders geeignet sind, fällt zunächst die zunehmende Abnahme der Wachstumsdauer auf, so daß in der zweiten Unterkultur schon nach 3—4 Tagen mit freiem Auge Wuchsherde zu erkennen sind, deren Form im allgemeinen nicht einheitlich ist, die aber fast in allen Fällen auf-fallend feucht sind. Überdies sind die Wuchsherde mit einer einzigen Ausnahme durch einen gelben Farbenton ausgezeichnet. Die jungen Wuchsherde meistens flach, rund, ihr Rand unregelmäßig fein gezackt, ihre Oberfläche auch gehöckert. Nach mehrwöchiger Wachstumsdauer verschmelzen die Wuchsherde zu einem ganz flachen, beetartigen gelben Belag. In einem Falle entstand nach längerer Bebrütung dieser einheitliche Belag nicht, sondern größere, oft ringförmige und verschlungene, trockene, weiße Wuchsherde.

Die Keime sind weitaus genügsamer als echte Tuberkelbacillen, insbesondere in bezug auf ihre geringere Kälte- und Wärmeempfindlichkeit. So ist auf dem *Löwenstein*-Nährboden nach wenigen Tagen auch bei Zimmerwärme, ebenso wie bei 42°, deutliches Wachstum zu erzielen. Auch stellen sie geringere Ansprüche an den Nährboden und gehen schon nach der zweiten Überimpfung auf gewöhnlichem Agar an. Sie wachsen recht üppig auf *Schottmüllerschen* Blutagarnährboden, auf Kochblutagar nach *Voges* und *Levinthal*, auf *Löffler*-Nährboden, weniger gut auf *Drigalski*- und gewöhnlichem Agar. Auch gelingt es, im *Agarstich* ein Wachstum zu erzielen, wobei sich neben entsprechendem Oberflächenwuchsherd meist ein ziemlich reichliches, gegen die Tiefe abnehmendes

Wachstum in Form einer unregelmäßig wolkigen, schleierartigen Trübung des Nährbodens von der Stichrinne aus entwickelt (s. Abb.). Auf Glycerinagar das Wachstum üppig, auf Glycerinkartoffel spärlicher, hier die Wuchs herde meist deutlich schleimig und gelb, auf Gelatine hingegen kümmerliches Wachstum. Niemals Verflüssigung der beimpften Nährböden.

Bei Züchtungsversuch in flüssigen Nährmitteln wie gewöhnlicher Fleischbrühe, Leberbrühe, Glycerinfleischbrühe und Milch zeigte sich nur in der Glycerinfleischbrühe ein Wachstum in Form eines spinnwebenhäutchenartigen Bodensatzes, in der Milch eine Keimvermehrung ohne Veränderung des Nährmittels. Unter Sauerstoffabschluß weder auf festen, noch flüssigen Nährmitteln ein Wachstum zu erzielen.

Um unsere Keime von echten Tuberkelbacillen abzutrennen, setzten wir sie der Einwirkung einer 25%igen Antiforminlösung durch 5 Min. aus, wie dies von *Spindler-Engelsen, Hauptmann* und *Bartscher* angegeben wird. Darnach wurde durch Behandlung mit destilliertem Wasser das Antiformin weg gewaschen und der Rückstand kultiviert. Diese Behandlung soll menschenpathogene Tuberkelbacillenstämme nicht schädigen, hingegen Saprophyten abtöten. Unsere Ergebnisse mit diesem Verfahren sind jedoch keineswegs eindeutig, einige Stämme erweisen sich als antiforminwiderstandsfähig, andere wieder nicht.

Einwirkung von 10%iger Schwefelsäure durch 10 Min. scheint die Keime insofern zu schädigen, als sie etwas langsamer heranwachsen.

Ausschlaggebend für die Beurteilung der Keime erscheint uns wohl *ihr Verhalten im Tierkörper*. Mit allen Stämmen wurden Meerschweinchen unter die Haut und in die Bauchhöhle, ferner Kaninchen, Hühner und Frösche geimpft. Von den geimpften Meerschweinchen ging bisher in halbjähriger Beobachtungszeit keines an tuberkulösen Veränderungen ein. Ebenso fehlen Gewichtsverluste. Von den in Blutadern geimpften Kaninchen gilt das gleiche, mit Ausnahme eines Tieres, das mit Stamm 5 geimpft und nach 37tägiger Beobachtungszeit starb. Bei der Obduktion fanden sich in der Leber umschriebene Nekroseherde von Stecknadelkopf bis Erbsengröße. Die Milz dabei klein, die übrigen Organe unverändert. In einem Ausstrich von den Nekrosen der Leber alkoholsäurefeste Stäbchen, die jedoch kulturell nicht zum Angehen zu bringen waren. Eine neuerliche Impfung auf ein anderes Kaninchen zeigte bisher, das ist nach 61 Tagen, kein positives Ergebnis. Die in die Flügelblutader geimpften Hühner gleichfalls nach 66tägiger Beobachtungsdauer gesund, ebenso die in die Muskulatur geimpften Frösche.

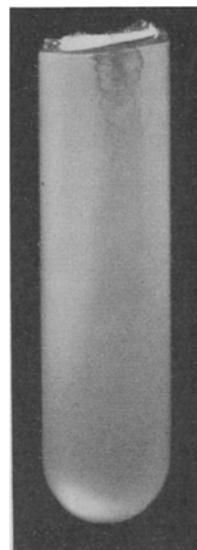


Abb. 1. Agarstichkultur eines „gelben Stammes“ nach längerer Bebrütung.

Diese Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß *unsere Keime im allgemeinen nicht tierpathogen sind*. Der eine positive Tierversuch spricht insofern nicht gegen diese Behauptung, als es auch manchmal nach Behandlung mit sicher saprophytären Keimen zu Erkrankung von Tieren kommen kann, wie dies im Schrifttum mehrfach vertreten wird.

Anschließend in kurzer Darstellung unsere einschlägigen Fälle:

Stamm 1. Aus dem Leichenblut eines 36jährigen, an einer kavernösen Lungen-tuberkulose verstorbenen Mannes. Feuchte, schleimige, gelbe Wuchsherde, gegen Antiformin widerstandsfähig.

Stamm 2. Aus dem strömenden Blut eines Pat. mit abheilendem Lupus vulgaris des Gesichtes und der Gliedmaßen und Fungus eines Kniegelenkes. Trockene, gelbe, nicht antiforminwiderstandsfähige Wuchsherde.

Stamm 3. Aus dem Leichenblut eines 69jährigen, an Mycosis fungoides verstorbenen Mannes mit geringfügigen alten tuberkulösen Veränderungen. Der seinerzeit aus dem strömenden Blut angelegte Züchtungsversuch war vergeblich geblieben. Auffallend trocken wachsende Keime mit bestem Wachstum bei 42°. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 4. Aus dem Leichenblut einer 59jährigen, an einer frischen Gehirn-erweichung verstorbenen Frau mit alten tuberkulösen Spitzenschwielen. Wachstum in Form eines flächenhaften, gelben Rasens, gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 5. Aus dem strömenden Blut eines Pat. mit Lupus vulgaris faciei und papulo-nekrotischen Tuberkuliden. Wachstum in gelben, feuchten Wuchsherden. Gegen Antiformin widerstandsfähig. Eines der geimpften Kaninchen eingegangen (Knötelchen in der Leber).

Stamm 6. Aus dem strömenden Blut einer Kranken mit tuberkulöser Hüft-gelenkentzündung, gegen Antiformin widerstandsfähig.

Stamm 7. Aus dem strömenden Blut eines Pat. mit Episcleritis tuberculosa. Sehr spärliches Wachstum auf Agarnährböden. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 8. Aus dem Leichenblut eines 1 $\frac{1}{2}$ -jährigen, an miliarer Tuberkulose und tuberkulöser Hirnhautentzündung verstorbenen Kindes. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig. Aus dem Liquor des Kindes bei Lebzeiten ein einwandfreier Tuberkelbacillenstamm mit typischem Wachstum und Meerschweinchenpathogenität gezüchtet.

Stamm 9. Aus dem Leichenblut einer an Atherosklerose und Kreislaufschwäche verstorbenen Frau mit alten tuberkulösen Spitzenschwielen. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 10. Aus dem Leichenblut eines an Lymphogranulom der Leber verstorbenen Mannes. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 11. Aus dem strömenden Blut eines 11jährigen Kindes mit rheumatischer Endokarditis. Gegen Antiformin nicht widerstandsfähig.

Stamm 12. Aus dem strömenden Blut eines Pat. mit Dermatitis artifcialis ohne tuberkulöse Veränderungen. Trockene, weiße, manchmal wie bestaubte, oft ringförmige oder wallartig wachsende Wuchsherde. Auf Glycerinfleischbrühe Bildung eines weißen, bröckeligen Oberflächenhäutchens. Mikroskopisch oft lange, zu Fäden auswachsende, nur zum geringen Teil alkoholsäurefeste Stäbchen, teilweise stark segmentiert.

Entsprechend der gegebenen Charakteristik bestehen somit wesentliche Unterschiede zwischen diesen Spaltpilzen und den Tuberkelbacillen, sowohl hinsichtlich der Wirkung auf Tiere, als auch des Verhaltens bei

der Züchtung. Die Keime sind von allen menschenpathogenen Formen des Kochschen Bacillus, vom Typus *humanus*, vom Typus *bovinus* und, wenn auch weniger scharf, vom Typus *gallinaceus* deutlich zu trennen. Sie müssen der großen Gruppe der nicht menschenpathogenen, anscheinend saprophytären säurefesten Stäbchen zugerechnet werden, die *Löwenstein* als „echt-färbige“ Bacillen bezeichnet. Es handelt sich hier um jene Gruppe, welcher der *Timothee*-Bacillus, die anderen auf Gräsern wachsenden Säurefesten, sowie die von *Petri* und *Rabinowitsch* in Milch und Butter gefundenen Keime angehören. Teilweise wurden Vertreter dieser Spielarten auch in von Menschen stammendem Material, wie im Auswurf, auf den Mandeln und in Stühlen gefunden. Eine genauere Einreihung unserer Stämme in eine bestimmte Gruppe dieser alkohol-säurefesten Mikroorganismen ist nicht möglich. Sie wäre auch deswegen schwierig, weil ein allgemein gültiges System dieser Keime noch aussteht. Auch nach der Gruppierung von *Lehmann-Neumann* läßt sich eine Einreihung unserer Mikroorganismen nicht durchführen.

Hingegen wurde vor kurzer Zeit von *Tiedemann* ein Keim beschrieben, der in einer *Löwenstein*-Kultur aus dem Blute eines Falles mit Choro-retinitis angegangen war. Der Keim ähnelt im wesentlichen sowohl hinsichtlich der färberischen und der kulturellen Eigenschaften, als auch in bezug auf seine fehlende Tierpathogenität der Mehrzahl unserer Stämme (mit Ausnahme von Fall 12). *Tiedemann* beschreibt die außerordentliche färberische Veränderlichkeit seines Stammes ähnlich der unserer Stämme. Da der Forscher den Keim aus mehreren Fraktionen der zu untersuchenden Blutprobe züchten konnte, neigt er der Ansicht zu, daß der Mikroorganismus als apathogener Parasit im Blute kreiste und vergleicht dieses Verhalten mit dem Wachstum von nicht tierpathogenen „echt-färbigen“ Keimen auf der Oberfläche von Futterpflanzen, das keine Veränderungen zur Folge hat. *Tiedemann* meint, daß die große Zahl positiver Befunde bei bakterioskopischen Untersuchungen von Blutbodensatz auch in Fällen ohne Tuberkulose auf solche reaktionslos im Blut kreisende Keime zurückzuführen sei.

In dem Bestreben, seinen Stamm einer der bisher bekannten Gruppen einzureihen, bespricht *Tiedemann* das einschlägige Schrifttum, ohne jedoch seinen Keim einwandfrei einreihen zu können. Weder das *Mycobacterium lacticola* nach *Lehmann-Neumann* und *Haag*, noch die Gruppe des *Mycobacterium Phlei* und das *Mycobacterium Eos* und schließlich die von *Maher* gezüchteten Stämme ließen sich in ihren Eigenschaften mit dem Stamm von *Tiedemann* decken. Die meiste Ähnlichkeit besteht mit dem *Mycobacterium luteum* nach *Söhngen*, jedoch fehlt diesem Keim die Alkoholfestigkeit und auch seine Säurefestigkeit ist beschränkt. Wenn wir daher auch unsere Stämme zu der Gruppe des *Mycobacterium luteum* rechnen, müssen wir sie wegen ihrer Alkohol- und Säurefestigkeit als eine besondere Art des *Mycobacterium luteum* bezeichnen. Der

Stamm 12 mit seinem weißen, trockenen Wachstum und der eigen-tümlichen Form seiner Wuchsherde schließt sich hier nicht an, könnte vielleicht den Schimmelpilzen nahestehen.

Eine weitere, genaue Besprechung der „echt-färbigen“ Bacillen über-schreitet den Rahmen dieser Arbeit. Uns handelt es sich lediglich darum, nachzuweisen, daß in diesen Fällen nicht Tuberkelbacillen oder andere, bisher unbekannte, krankmachende Keime vorliegen.

An dieser Stelle sei übrigens erwähnt, daß von *Saenz* aus dem Blute eines Kranken, der an kryptogenetischem Fieber, Lymphknotenschwellungen und unbestimmten nervösen Erscheinungen litt, ein säurefester Stamm gezüchtet werden konnte, der verhältnismäßig rasch mit weißen Kolonien wuchs und eine fast fehlende Tierpathogenität aufwies. Er wird von dem Forscher als paratuberkulöser Bacillus angesprochen. Einen von *Löwenstein* aus dem Blute eines an Lupus erythematodes erkrankten Kranken isolierten Tuberkelbacillenstamm mit abwegigem Verhalten im Tiersversuch beschreibt *Mach* näher.

Bemerkenswert ist, daß *Rabinowitsch* gleichfalls das ungewöhnliche Verhalten der 7 von ihr aus dem strömenden Blut gezüchteten Tuberkelbacillenstämme betont. Sie fallen durch ihr graues bis ausgesprochen gelbes, zuweilen zäh-schleimiges Wachstum auf und ein Teil ihrer Stämme zeigt auch bei Zimmertemperatur ein, wenn auch langsameres, Wachstum. Die Tierpathogenität ist sehr gering. Aus dem Leichenblute gelang ihr jedoch regelmäßig eine Züchtung von typischen Tuberkel-bacillen.

Woher stammen aber die von uns beschriebenen Keime? *Kreisen* sie im *Blut* als nicht krankheitserregende Parasiten, wie *Tiedemann* es für seinen Stamm anzunehmen geneigt ist, oder sind sie als *Verunreinigungen des Untersuchungsmaterials* aufzufassen, bzw. wurden sie bei der Verarbeitung dem Material zugeführt? Die Annahme, daß sie im Blute kreisen, steht insofern mit unseren Erfahrungen in Widerspruch, als bisher kaum ein Kreisen apathogener Keime im Blute erwiesen ist. Für die Annahme, die Stämme als eine Verunreinigung anzusehen, spricht Fall 8, bei dem mehrere Tage vor dem Tode aus dem Liquor ein typischer, tierpathogener, menschlicher Tuberkelbacillenstamm gezüchtet wurde und bei der einige Tage später erfolgten Leichenöffnung aus dem Herzblut einer der geschilderten „gelben Stämme“ anging. Dieser Befund wäre am leichtesten in der Weise zu deuten, daß der gelbe Stamm als Verunreinigung den ursprünglich aller Wahrscheinlichkeit nach im Blut vorhandenen, weißen, pathogenen Tuberkelbacillenstamm infolge ihres rascheren und kräftigeren Wachstums überwuchert hat.

Mit der *Möglichkeit einer sekundären Verunreinigung* des Ausgangs-materials, ebenso mit einer Mischinfektion rechnet ja das *Löwensteinsche* Kulturverfahren und empfiehlt aus diesem Grunde die Schwefelsäure-waschung. Überdies wirken die Farbstoffzusätze des Nährbodens wachstumshemmend auf verunreinigende Keime. Doch werden durch diese Maßnahme nur die nichtsäurefesten Keime vernichtet, die säurefesten hingegen bleiben unversehrt und werden überdies durch den Eiernähr-boden in ihrem Wachstum in hohem Maße gefördert.

Der Umstand, daß man bei der Löwensteinschen Blutkultur *mit der Anwesenheit alkoholsäurefester, apathogener Saprophyten rechnen* und *einer Verfälschung der Befunde durch ihr Vorhandensein aus dem Wege gehen muß, ist daher mit allem Nachdruck zu betonen.* Es wird in Zukunft, zumindest in allen wichtigen und zweifelhaften Fällen notwendig sein, die aus dem Blute, möglicherweise auch aus anderem Material gezüchteten Stämme genau auf ihre kulturellen Eigenschaften und auch auf ihre Tierpathogenität zu prüfen, um so mehr da man die jugendlichen Wuchsformen der „gelben Stämme“ leicht für typische Tuberkelbacillenherde halten kann. Diese Verwechslungsmöglichkeit besteht in besonderem Maße in der ersten Zucht, da inmitten des reichlich aufgetragenen Materials z. B. in den Blutrückständen zunächst nur ganz feine Wuchs-herde sichtbar sind, deren abweichende Farbe nicht auffällt. Daher sollten unbedingt in allen solchen Fällen *Unterzuchten* angelegt werden und erst an diesen die kulturellen Eigenschaften näher geprüft werden.

Bei der genauen Untersuchung der Stämme im Vergleich mit zahlreichen typischen Tuberkelbacillenstämmen, sowie einigen bekannten Saprophyten, die wir der Liebenswürdigkeit des Wiener serotherapeutischen Institutes verdanken (so z. B. ein Butterstamm nach *Rabinowitzch*, ein Grasstamm nach *Moeller* und ein Milchstamm nach *Tobler*) hatten sich uns als geeignete Unterscheidungsmerkmale zwischen den echten Tuberkelbacillen und den von uns gezüchteten, zuletzt besprochenen Stämmen einige Eigenheiten bewährt. Hinsichtlich der Ansprüche an den Nährboden muß wohl von vornherein darauf hingewiesen werden, daß es auch bei echten Tuberkelbacillen nach mehreren Überimpfungen auf künstlichen Nährböden schließlich gelingt, sie selbst auf verhältnismäßig einfache Weise zum Angehen zu bringen. Dies gilt besonders für den Typus *gallinaceus*, der überhaupt in seinem kulturellen Verhalten unseren Saprophyten nahezustehen scheint.

Dagegen möchten wir als brauchbare Unterscheidungsmerkmale der Saprophyten hervorheben: 1. die fast regelmäßige und ausgesprochene und auffällige *Pigmentierung*, die schon in der ersten Unterkultur deutlich ist; 2. die *geringe Kälte- und Wärmeempfindlichkeit*, derzu folge es gelingt, auch bei Zimmerwärme auf *Löwenstein*-Nährböden nach einiger Zeit einen deutlichen Rasen der „gelben Stämme“ zu erzielen, was bei den echten Tuberkelbacillen nicht der Fall ist; 3. das *Verhalten von Agarkulturen*, sowohl vom Schrägagarnährboden, als auch von Agarstichen. In den ersten Überimpfungen unterbleibt bei echten Tuberkelbacillen ein Wachstum am Schrägagar meist ganz, während die „Echt-Färbigen“ auch hier schon deutliche Rasenbildung erkennen lassen. Noch ausgesprochener ist dieser Unterschied im Agarstich, wo die Saprophyten in Form des kennzeichnenden wolkigen Schleiers wachsen. Selbstverständlich kann — als sicherste Probe — die *Prüfung der Tierpathogenität* des gezüchteten Stammes angeschlossen werden, doch erfordert diese Entscheidung eine lange

Wartezeit, weswegen wir zwecks rascherer Klärung die in kaum 14 Tagen durchführbare Prüfung der geschilderten kulturellen Eigenschaften empfehlen möchten. Sie erlaubt mit Sicherheit, zumindest typische Tuberkelbacillen in einzelnen Fällen auszuschließen.

VI. Zusammenfassung.

Fassen wir die gesamten Ergebnisse zusammen, so können wir derzeit nach Anwendung des *Löwensteinschen* Blutkulturverfahrens in etwa 1000 Fällen folgende Meinung äußern:

1. Das Züchtungverfahren als solches ist *ganz ausgezeichnet* und hat sich hinsichtlich seiner Anwendung auf Körperflüssigkeit und Gewebe sehr gut bewährt. Bei der Erledigung eines großen klinischen Einlaufes von fast 1000 Fällen konnte auf den Tierversuch verzichtet werden.
2. Ebenso ist es zum Nachweis von Tuberkelbacillen im *Leichenblut* sehr zu empfehlen, da es gelingt, in einem *ganz ungewöhnlich hohen* Hundertsatz von schwersten Tuberkulosen den spezifischen Erreger aus dem Leichenblut zu züchten.
3. Bei der Untersuchung von Blutproben lebender Patienten versagte das Verfahren: es gelang niemals, sichtbare Tuberkelbacillenkulturen zu erzielen.
4. In 435 Züchtungsversuchen aus dem strömenden Blut konnten hingegen 46mal im Abstrich vom bebrüteten Kulturröhrchen *alkohol-säurefeste Stäbchen mikroskopisch* nachgewiesen werden. Diesen mikroskopischen Bacillenbefunden ist nur eine bedingte Beweiskraft zuzuerkennen.
5. Bei den mikroskopisch positiven Fällen fällt der hohe Hundertsatz (23%) bei *rheumatischen Erkrankungen, bei entsprechenden Haut- und Augenveränderungen, sowie bei schweren Tuberkulosen* auf.
- 6) Bei 10 Fällen von frischer, bzw. wieder aufflammender rheumatischer *Endokarditis* wurden in der Kultur aus dem Leichenblut dreimal mikroskopisch Stäbchen nachgewiesen, einmal wurde ein Tuberkelbacillenstamm gezüchtet.
7. In 12 Fällen (sowohl aus Leichen, als auch aus strömendem Blut) wurden anscheinend saprophytäre, nicht pathogene, „echt-färbige“ *Bakterien* gezüchtet, die nicht den Tuberkelbacillen zuzurechnen sind. Bei der Verwertung von Kulturen nach der Methode *Löwensteins* muß mit der Möglichkeit einer Verwechslung dieser echt-färbigen Pseudotuberkelbacillenstämme mit wirklichen Tuberkelbacillen gerechnet werden. Eine Trennung zwischen Tuberkelbacillen und „Echt-färbigen“ ist auf Grund kultureller Eigenschaften möglich.
8. Die geschilderten Befunde bieten teilweise eine Bestätigung der Angaben *Löwensteins* und seiner Mitarbeiter, doch kann, da wir aus dem strömenden Blut bisher keine Stämme züchten konnten, ein abschließendes Urteil nicht abgegeben werden.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt und besonders Züchtungsversuche an Geweben von an rheumatischen Erkrankungen Verstorbenen vorgenommen.

Schrifttum.

Bingold: Beitr. Klin. Tbk. **68** (1928). — *Kren u. Löwenstein*: Berl. klin. Wschr. **1930**. — *Löwenstein*: Dtsch. med. Wschr. **1930**, 1010; Münch. med. Wschr. **1930**, 1662; **1931**, 261; **1931**, 1078; **1931**, 1080; Med. Klin. **1931**, 1669; Zbl. Bakter. **120** (1931). — *Maresch*: Ges. Ärzte Wien (Sitz. v. 16. Okt. 1931) Wien. klin. Wschr. **1931**, Nr 43. — *Meller*: Wien. klin. Wschr. **1932**, 2. — *Philibert u. Mach*: C. r. Soc. Biol. Paris **109**, 720 (1931). — *Popper, Schindler u. Bodart*: Wien. klin. Wschr. **1931**, Nr 48; Virchows Arch. (im Druck). — *Rabinowitsch*: Med. Welt **1931**, 46, 47. — *Reitter u. Löwenstein*: Münch. med. Wschr. **36**, 1522 (1930). — *Russew*: Wien. Arch. inn. Med. **20**, 231. — *Saenz*: C. r. Soc. Biol. Paris **107**, 1457 (1931). — *Söhrgen*: Zbl. Bakter. II. Org. **37**, 595. — *Tiedemann*: Zbl. Bakter. I. Org. **122**. — *Umfrage der Med. Klin.* **1932**, 4, 8, 9.
