Studien über die Beziehung zwischen der Virulenz und den giftigen Leibessubstanzen der Mäusetyphusbazillen.

I. Mitteilung.

Von

Kôiti Yamamoto

(山本 耕一)

*(Aus dem Bakteriologischen Institut der Kaiserlichen
Tohoku Universität zu Sendai, Direktor:
Prof. Dr. M. Kuroya.)*

Seit längerer Zeit ist schon bekannt, dass ein Bakterium ein und derselben Art je nach dem Stamm nicht nur eine auffallende Virulenzschwankung zeigt, sondern manchmal auch hoch virulent werden kann, wenn es ein oder mehrere Tiere passiert hat. Wovon rührt denn solche Virulenzverschiedenheit her? Was man als die wichtigen Faktoren des Bestehens der „Virulenz“ aufgezählt hat, ist die Fähigkeit des Mikroorganismus, erstens sich im lebenden Organismus zu vermehren und zweitens in ihm Gift zu bilden. Letzteres führt nicht nur zur Intoxikation des angegriffenen Körpers, sondern liefert auch den Mikroorganismen eine bessere Bedingung zu ihrer Vermehrung im Körper, also sind die obenerwähnten Faktoren nicht voneinander unabhängig.

Als einer der Vorläufer auf diesem Gebiet veröffentlichte schon Kruse¹⁾, dass die durch Bakterien erzeugten „Angriffstoffe“ die Abwehrstoffe des eingedrungenen Körpers neutralisieren und den Abwehrmechanismus des Lebewesens vernichten soll. Nach Wyssokowitsch²⁾ setzt das unter dem Einfluss von Bakterien erzeugte Ptomain die Zellenenergie des Körpers so weit herab, dass die Bakterien, die sonst nicht virulent waren, zu einer lebhaften Vermehrung veranlasst werden, was schliesslich den Tod der Tiere herbeiführt.

Gamaleia³⁾ fand dann auch, dass die Kaninchen, die sich bis dahin refräktär verhielten, durch gleichzeitige Verabreichung von Darmcholera und Prodigiosusextrakt oder Chemikalien, wie Nitrite, Nitrate, Leucin, angesteckt werden konnten. Von allen Theorien über diesen Gegenstand war seinerzeit die sog. „Aggressintheorie“ am überzeugendsten. Als erste beschäftigten sich Kruse

und Bonaduce⁴⁾ mit diesen Substanzen und ermittelten, dass die Injektion abgetöteter Bakterien die Milzbrandinfektion erheblich beschleunige. Diese infektionbegünstigenden Stoffe nannte man „Lysine“ und später „Aggressine.“ Andere Autoren, besonders Bail⁵⁾ dehnten ihre Forschungen über die „Aggressine“ noch ferner auf verschiedene Bakterien aus, auf sterilisierte Extrakte von Bakterien und wiesen die Kruseschen Substanzen nach. Es sei hier noch die Theorie von F. Gál⁶⁾ erwähnt, nach welcher die Vergiftung durch die Spaltungsprodukte des Bakterieneiweisses, Peptone und Endprodukte, die unter Einwirkung von Fermenten im Organismus entstehen, zustande kommt. Was die Virulenzverschiedenheit betrifft, so erklärte er, dass virulente Bakterien im infizierten Organismus einen stärkeren Reiz zur Fermentproduktion ausüben, als nicht virulente, so dass aus virulenten Bakterien mehr Spaltungsprodukte sich bilden, als aus nicht virulenten. Er konnte nachweisen, dass Fermente, wie Trypsin und Erepsin die Virulenz des *Collibacillus* erhöhen. Thiel und Embelton⁷⁾ erklärten, dass das Bakterienprotoplasma infolge von proteolytischer Degeneration eine toxische Substanz liefert und, dass die echte Virulenz von dem Vermögen abhängt, eine Kapsel zu bilden.

Was als ein Faktor der Bakterienvermehrung im Körper noch in Betracht kommt, ist die Adaptation. Wenn die Lebensbedingungen dem Erreger ungünstig sind, so bekommt er die Fähigkeit, sich der Umwelt anzupassen und dort zu vermehren. Solche Bakterien, also serumfeste Bakterien sind zuerst von Jensen⁸⁾, Wassermann und Ostertag⁹⁾, und von Jaffé und Besserer¹⁰⁾ bei verschiedenen Bakterienarten beobachtet worden.

Manche von den oben erwähnten Autoren haben versucht, die Virulenz mit der Kapselbildung in Zusammenhang zu bringen, und so sahen Preisz¹¹⁾, Gruber und Futaki¹²⁾, und Bail¹³⁾, dass die abgeschwächten Varietäten der Milzbrandbazillen gar keine oder fast keine Kapsel bildeten. Stamatin¹⁴⁾, Schaefer¹⁵⁾, Sterne¹⁶⁾, von Buza¹⁷⁾, und andere Autoren stellten ferner fest, dass sich die starkvirulenten Milzbrandbazillen im empfänglichen Tiere mit einer Kapsel umgeben, besonders der letztgenannte von ihnen sagt in seiner neuerlich erschienenen Mitteilung, dass die Virulenz des Anthraxbazillus nicht nur durch die Kapselbildung, sondern auch durch haemopeptische Eigenschaft bedingt ist.

Der Verfasser lenkte daher sein Augenmerk auf die Zusammensetzung der Körpersubstanzen der zwei verschieden stark virulenten Mäusetyphusstämmen und versuchte auf diese Weise, den Schlüssel zur Lösung des Virulenzproblems zu finden.

Von den Autoren, wie Voges¹⁸⁾ und Koske¹⁹⁾, wurde schon erkannt, dass in alter Bouillonkultur der Paratyphus-Enteritidis-Gruppe die toxische Substanz enthalten ist. Branham²⁰⁾ veröffentlichte auch, dass der flüssige Nährboden von *B. enteritidis* und ihm nahe verwandten Bakterien auf Kaninchen und Mäuse toxisch einwirkt, und die daraus isolierte proteinfreie Substanz erst durch das Zerfallen der Bakterienleiber frei gemacht wird. Ecker²¹⁾ berichtete schon im Jahre 1917 über die toxische Eigenschaft der 24stündigen Kultur der Paratyphusbazillen. Die intrakutane Verimpfung von Extrakten, die Ecker

und Rimington²²⁾ aus Breslaubazillen gewannen, mit wenig Stickstoff und viel Kohlenhydraten, riefen bei Kaninchen die Hautreaktion hervor.

Die von Casper²³⁾ mit Antiformin gewonnenen Breslaubazillenextrakte waren sehr toxisch für Mäuse bei intraperitonealer Injektion. Casper schrieb die toxischen Eigenschaften dieser Extrakte ihrer polysaccharidartigen C-Substanz zu.

Menten und King²⁴⁾ gewannen aus Berkefeld-Filtraten von Paratyphus B-Bazillen mittels konzentrierter Essigsäure eine phosphor- und schwefelfreie, toxische Fraktion.

Furth und Landsteiner²⁵⁾ berichteten, dass unter den aus Paratyphusarten isolierten Substanzen mit verschiedenen chemischen und serologischen Eigenschaften nur die mit dem Proteincharakter toxisch war.

Raistrick und Topley²⁶⁾ befassten sich sehr eingehend mit diesen Forschungen. Sie gewannen aus dem abgetöteten, azetonextrahierten und getrockneten Bazillenpulver von *Bact. aertrycke* verschiedene Fraktionen, unter denen die Fraktion mit 68 Proz. Alkohol behandelte Fraktion (Zeichen: 68) einen guten Immunisierungseffekt zeigte. Nach chemischer Analyse zeigte bei immunologisch wirksamen Fraktionen der Zuckergehalt 28,8–37,8 Proz. Die Präparate können kaum intaktes Protein enthalten, da die Eiweisreaktion, abgesehen von Ninhydrin- und Biuretprobe, negativ ausfiel. Ob die toxisch und immunologisch wirksame Substanz ein und dieselbe ist, oder ob es sich um mehrere Substanzen handelt, bleibt nach ihnen noch ungeklärt.

Boivin und Mesrobian²⁷⁾ berichteten im Jahre 1935 über die Ergebnisse von Untersuchungen, in deren Verlauf es ihnen gelungen ist, aus den mit Trichloressigsäure und nachfolgendem Azetonzusatz behandelten *Aertrycke*-Kulturen eine für Mäuse stark toxisch wirkende und das antibakterielle Serum bis zu hoher Verdünnung präzipitierende Substanz herauszugewinnen. Diese Substanz, die sie als „Antigène complet“ bezeichneten, zerlegte sich beim Kochen in schwach saurer Reaktion in freie Fettsäure und in Polysaccharid. Dieses Polysaccharid präzipitiert hoch spezifisch entsprechendes antibakterielles Serum, jedoch ist es deshalb nicht immunogen im echten Sinne des Wortes, weil es im Tierkörper keine Antikörper auslösen kann. Ivánovics²⁸⁾ erhielt aus Agarkulturen der Breslaubazillen mittels kalter Essigsäure sehr toxische Extrakte, die nach Hydrolyse durchschnittlich eine 20 Proz. frei werdende reduzierende Substanz lieferten. Ihr Stickstoffgehalt betrug ca. 3 Proz. Bei ihnen erwies sich von Eiweisreaktionen nur die Biuretprobe als positiv. Auch bei uns kamen Hosoya und Kawasima²⁹⁾ infolge der Untersuchungen über die giftigen Substanzen der Typhus, Paratyphus A- und B-Bazillen zu fast gleichen Resultaten mit den oben genannten Autoren.

Versuche.

Die zu den Versuchen verwendeten Stämme.

Zu diesen Untersuchungen wurden zwei seit Jahren in der Sammlung unseres Instituts befindliche Mäusetyphusstämmen, deren einer

als „Ms 166“, der andere als „Ms 163“ bezeichnet ist, herangezogen. Die Virulenz des „Ms 166“ war bezogen auf Mäuse niederwertig, mit dessen 0,1 mg geimpft, erst die Tiere alle zugrunde gingen, während die des „Ms 163“, dessen M.L.D. anfänglich 0,02 mg betrug, aber durch 20 mal wiederholte Tierpassage zu 0,0005 mg gesteigert wurde, sehr hochwertig war. Den „Ms 166“ agglutinierte spezifisches Immuneserum bis 1:20 000, dagegen den „Ms 163“ bis 1:5 000. Beide Stämme zeigten auf Endoschem Agar typische S-förmige Kolonien. Die Bazillen wurden auf gewöhnlichen Agarnährböden von pH 7,2, die mit Rinderfleisch hergestellt wurden, bei 37° 24 Stunden lang gezüchtet und für jeden Versuch wurden 161 g von „Ms 166“ und 208 g von „Ms 163“ gebraucht.

Methodik zur Herstellung des Bazillenextraktes.

In diesem Versuche wurde zur Herstellung des Bazillenextraktes ein eigenartiges Verfahren nach Kuroya³⁰⁾, welches aus dem Waschen und Umrühren, und dem darauf folgenden Zerreiben der Bakterienmasse besteht, vorgenommen.

Zuerst hatte man eine kleinere Portion der Kulturen bei 80° in Luftbad zu konstantem Gewicht getrocknet und dadurch das Trockengewicht der Mengen der ganzen Kulturen ausgerechnet. Dann wurde die Bakterienmasse in einem grossen Becherglas mit 1,5 l destilliertem Wasser aufgeschwemmt und die so erhaltene Suspension etwa 5-6 Stunden lang tüchtig umgerührt. Es soll auf diese Weise der die Oberfläche des Bakterienleibes bildende Teil in Wasser losgelöst werden. Die abgeschleuderte Bakterienmasse wurde nochmals in Wasser homogen suspensiert und abermals etwa 15 Minuten lang zentrifugiert. Diese Manipulation wiederholte sich so oft, bis die letzte klare obere Flüssigkeit auf Zusatz von Trichloressigsäure keine Trübung mehr zeigte. Die angesammelte Flüssigkeit, die die Bakterien noch in beträchtlicher Menge enthielt, wurde dann mit Hilfe von „Sharpless“ Zentrifuge von 14 000 Umdrehungen pro Minute abgeschleudert. Die so extrahierte Flüssigkeit war bei pH 6,6-7,0 und stellte einen gelblichen Farbenton dar. Je 10 ccm dieses Extraktes wurde dann in 3 Petri-Schalen abgetrocknet und aus dem durchschnittlichen Wert die gesamte Menge der ins Wasser ausgezogenen Substanzen ungefähr ausgerechnet. Die so erhaltene Lösung wurde zum Schluss mit Toluol vermischt und dann in dunkler Eiskammer stengelassen, um die in der Lösung noch lebend enthaltenen Bakterien abzutöten. Die so her-

gestellte Lösung nennt man provisorisch „Extrakt I“.

Der abgeschleuderte Bakterienrest schliesst in sich noch eine Menge zu extrahierende Substanzen, die erst nach dem Zerfall des Leibes in Freiheit gesetzt werden können. Zu diesem Zwecke wurde die Bakterienmasse im Exsikkator über CaCl_2 mässig entwässert, im Mörser mit gleicher Menge von Quarzsand so lange (ungefähr 5–6 Stunden) tüchtig zerrieben, bis die Bakterienmasse zäh und schwer mazerierbar geworden war, wobei sie sich unter dem Mikroskop als nur homogen gefärbtes Protoplasma darstellte. Die zerriebene Bakterienmasse wurde dann mit 1 l destilliertem Wasser aufgeschwemmt und nach ganz gleicher Manipulation wie beim Extrakt I behandelt, was dann „Extrakt II“ ergab.

Giftigkeit der aus beiden Stämmen gewonnenen Extrakte für Mäuse.

Je 1,0 ccm, 0,5 ccm, 0,2 ccm, 0,1 ccm, dieser Extrakte, dessen einer Waschwasserextrakt der Bakterienleiber, der andere ein Extrakt der mazerierten Bakterienreste war, erhielten Mäuse intraperitoneal eingespritzt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, betrug M.L.D. des Extraktes I und II aus Stamm „Ms 166“ in Trockengewicht gerechnet, 0,24 mg u. 0,5 mg, dagegen die aus Stamm „Ms 163“ 0,75 mg u. 0,31 mg. Es besteht also fast kein deutlich Unterschied zwischen beiden Extrakten in bezug auf ihre Giftigkeit.

Nach der Injektion lagen die Tiere mit geschlossenen Augen und beschleunigter Atmung unruhig da und gingen unter allmählicher Schwäche in 5–38 Stunden ein.

Hier ist höchstens beachtenswert, dass sich aber bei zwei Mäusen, die Extrakt II aus Stamm „Ms 163“ bekamen, akute typische Nervensymptome einstellten. Etwa 1 Stunde nach der Injektion gerieten die Tiere plötzlich in einen Erre-

Tabelle 1.

Giftigkeit der aus 2 verschiedenen Stämmen extrahierten Extrakte für Mäuse.

Stämme		„Ms 166“		„Ms 163“	
Extrakt		I	II	I	II
TG per 1 ccm		1,2 mg	2,5 mg	1,5 mg	3,13 mg
Injektions-Dosis per 10 g des Körpergewichts (i. p.)	1,0 ccm	1/1	1/1	3/3	1/1
	0,5	3/3	2/2	3/3	2/2
	0,2	3/3	3/3	2/3	3/3
	0,1	2/3	1/3	1/3	3/3
	0,05	1/3			2/3
M. L. D.		0,24 mg	0,5 mg	0,75 mg	0,31 mg

3/3 bedeutet, dass unter 3 gebrauchten Tieren alle 3 gestorben sind, u. desgl.

gungszustand, liefen hier und da aufspringend fort und endeten schliesslich unter Krampf und Paräse der hinteren Extremitäten letal. Bei der Sektion sah man in fast allen Fällen die Hyperämie des Peritoneums und der Dünndärme, besonders zeichnete sich die Milz durch ihren rötlichvioletten oder noch häufiger dunkelvioletten Ton aus. Da

Tabelle 2.—3.

Intrakutane Reaktion durch Extrakte aus Stamm
 „Ms 166“ „Ms 163“

Extrakt		I (TG 1,2 mg)		II (TG 2,5 mg)	
Verdünnung	Reak- tion	Grösse (mm)	Inten- sität	Grösse (mm)	Inten- sität
Stammlösung (0,2 ccm)	N	4 × 3	##	4 × 2	##
	R	15 × 16	##	15 × 15	##
	A		+		+
1 : 2 (0,2 ccm)	N				
	R	13 × 12	##	14 × 15	##
	A				
1 : 4 (0,2 ccm)	N				
	R	12 × 11	##	10 × 9	++
	A				
1 : 8 (0,2 ccm)	N				
	R	11 × 10	##	7 × 8	++
	A				
1 : 16 (0,2 ccm)	N				
	R			7 × 7	++
	A				
1 : 32 (0,2 ccm)	N				
	R			6 × 5	++
	A				

Extrakt		I (TG 1,5 mg)		II (TG 3,13 mg)	
Verdünnung	Reak- tion	Grösse (mm)	Inten- sität	Grösse (mm)	Inten- sität
Stammlösung (0,2 ccm)	N			4 × 3	##
	R	16 × 15	##	12 × 10	##
	A		+		+
1 : 2 (0,2 ccm)	N			3 × 3	##
	R	15 × 14	##	10 × 10	++
	A		+		
1 : 4 (0,2 ccm)	N				
	R	12 × 10	##	5 × 6	++
	A				
1 : 8 (0,2 ccm)	N				
	R			2 × 3	+
	A				
1 : 16 (0,2 ccm)	N				
	R				
	A				
1 : 32 (0,2 ccm)	N				
	R				
	A				

Die Grösse der Rötung und der Nekrose sind in mm ausgedrückt. N=Nekrose
 R=Rötung
 A=Anschwellung

aber ihr Gewicht, abgesehen von einem Fall, leichter als 0,1 g war, wies sie keine so deutliche Anschwellung auf, vorausgesetzt, dass das Gewicht der Milz von normalen Mäusen im Durchschnitt 0,1 g wiegt. Diarrhoe wurde bei Extrakten aus Stamm „Ms 166“ bei 5 unter 17 Todesfällen, hingegen bei den aus Stamm „Ms 163“ bei 8 unter 20 Todesfällen beobachtet. Die Aszitesansammlung liess sich in gar keinem Fall erkennen. Die Kultur aus Herz- und Milzblut fiel immer negativ aus.

Intrakutane Reaktionsfähigkeit des Extraktes I und II aus beiden Stämmen.

Jeder Extrakt wurde nach Zusatz von NaCl in Konzentration von 0,85 Proz. mit physiologischer Kochsalzlösung verschieden verdünnt, wie es in der Tabelle 2 und 3 dargestellt ist, in einer Dosis von 0,2 ccm in den Rücken der gesunden Meerschweinchen intrakutan injiziert und das Resultat nach 48 Stunden beobachtet.

Die Rötungen fand man bei Extrakten aus Stamm „Ms 166“ noch in Verdünnung 1 : 8–1 : 32, dagegen bei Extrakten aus Stamm „Ms 163“ nur in Verdünnung 1 : 4–1 : 8. Die grösste Rötung zeigte 15 × 16 mm. Ausserdem fand man manchmal Nekrose und Anschwellung, besonders in höherer Konzentration. Im allgemeinen bemerkt man, dass in bezug auf die Hautreaktion beide Extrakte II stärker wirksam sind als Extrakte I und insbesondere Extrakt II aus „Ms 166“ am stärksten aktiv ist. Diese Tatsache, wie nachher wieder erwähnt, zeigt, dass die Hautreaktionsfähigkeit dem PF-Gehalt in der Lösung zuzuschreiben ist.

Isolierung der in Extrakten enthaltenen Fraktionen.

Wird ein Bazillenextrakt mit Säure versetzt, so tritt im allgemeinen eine homogene Trübung, ja sogar ein flockiger Niederschlag in einer geeigneten pH-Zone auf, welcher im isoelektrischen Punkte bis zum Maximum gelangt. Die Bestimmung des Trübungsgrades geschah in der Weise, dass man in eine Reihe von Reagenzgläsern je 0,9 ccm des Extraktes verteilte, durch Zusatz von Essigsäure von verschiedener Konzentration innerhalb 0,1 ccm verschieden abgestufte pH gab und sie zuletzt mit destilliertem Wasser so ergänzte, dass die Gesamtmenge gerade 10 ccm erreichte und jede entstehende Trübung mittels Nephelometer de A. Boudouin et H. Bénard gemessen wurde (Fig. 1). Auf diese Weise erfuhr man, dass der isoelektrische Punkt für beide Ex-

trakte, I und II aus Stamm „Ms 166“ bei pH 3,7- und pH 4,4 liegt. Über die beiden Extrakte aus Stamm „Ms 163“ wird es später beschrieben.

(A) Isolierung der Fraktionen
der Extrakte I und II aus
Stamm „Ms 166“.

Nach Figur 1 wurden beide Extrakte aus „Ms 166“ mit Essigsäure zu pH 3,7 oder 4,4 gebracht und 5 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen. Der abgeschleuderte Niederschlag wurde dann unter allmählichem Zusatz von N/5 NaOH und wenig Wasser gelöst, dann wieder mit Essigsäure in geeigneter pH gefällt. Diese Manipulation wiederholte sich so lange, bis die letzte überstehende Flüssigkeit keine Molischsche Reaktion mehr zeigte. Bei dieser Reinigung fand eine Verschiebung der pH (anfänglich 3,7 oder 4,4, später 3,9 oder 5,0) statt. Das in solcher Weise gereinigte Eiweiss wurde dann erneut gelöst, mit Toluol übergeschichtet und in dunkler Eiskammer aufbewahrt. Diese Fraktion bezeichnete man vorläufig als „PF₁“. Jede Flüssigkeit, die durch Ansäuerung und Zentrifugieren vom Niederschlag ausgeschieden worden war, wurde nun angesammelt, neutralisiert und unter vermindertem Druck bei niedriger Temperatur (37°–40°) auf 1/5 ihres Anfangsvolumens konzentriert, dann wieder mit Säure zu pH 3,7 oder 4,4 gebracht und abgeschleudert. Der so gewonnene Niederschlag wurde zu PF₁ hinzugesetzt.

Da hierbei die abgetrennte überstehende Flüssigkeit noch getrübt war, wurde diese nun weiter mit 50 Prozent. Trichloressigsäure (pH 1,2) angesäuert, dann stark abzentrifugiert und dadurch die klare überstehende Flüssigkeit und der Niederschlag voneinander vollkommen abgetrennt.

Dieser Niederschlag zerfiel ferner in zwei Fraktionen, von denen die eine mit Bezeichnung „PF₂“ wieder mit Essigsäure bei pH 3,7 oder 4,4, und die andere dagegen mit Bezeichnung „PF₃“ nur mit Trich-

Fig. 1.

Trübungsgrad der Extrakte
aus schwach virulenten
Stamm „Ms 166“
(mit CH₃CO₂H versetzt).

Fig. 2.

loressigsäure (pH 1,2) gefällt wurde. Die PF_2 und PF_3 wurden nach wiederholter Reinigung ebenso wie PF_1 aufbewahrt.

Nach der Entfernung der auf diese Weise vollkommen ausgezogenen PF-Fractionen, wurde die Lösung wieder angesammelt und neutralisiert. Diese wurde wiederum bei Unterdruck und $37^\circ\text{--}40^\circ$ eingengt und in einem Kollodiumsack 4 Tage lang gegen Leitungswasser dialysiert. Die so behandelte Lösung wurde—wie dies im folgenden bei jeder alkoholischen Fällung üblich war—mit Salzsäure bis pH 5,0 angesäuert und mit 5 Raumteilen abs. Alkohol zur Fällung gebracht.

Der Niederschlag wurde erneut wiederum in wenig Wasser gelöst. Diese Fällung wurde 3mal wiederholt und zuletzt nach dem Waschen mit Äther im Exsikkator vollständig getrocknet. Die so gewonnene Substanz nennt man „CF I und II“ (Über Obengeschildertes siehe Fig. 2).

(B) Isolierung der Fraktionen der Extrakte I und II
aus Stamm „Ms 163“.

Die Extrakte aus diesem Stamm unterscheiden sich von den aus Stamm „Ms 166“ dadurch, dass es durch Ansäuerung zu keiner Fällung kommt. Dies bedeutet, dass zwischen den extrahierten Substanzen aus beiden Stämmen nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ eine grosse Differenz vorhanden sein muss, mit anderen Worten, ein stark virulenter Stamm vom schwach virulenten strukturell verschieden ist. Also ist das Isolierungsverfahren der Fraktionen vom obigen im wesentlichen abweichend.

a) Isolierung der Fraktionen aus Extrakt I.

Da bei diesem Extrakt nur durch Trichloressigsäure (pH 1,2) eine kaum erkennbare Trübung auftrat, so ging die Behandlung folgendermassen vor sich. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck und bei $37^\circ\text{C--}40^\circ\text{C}$ bis auf etwa $1/20$ des Anfangsvolumens eingengt und deren kleinere Portion wieder zur Trübungsprobe herangezogen, wobei sich ergab, dass sowohl durch 10 Proz. Trichloressigsäure (pH 3,7) als auch durch 50 Proz. Trichloressigsäure (pH 1,2) eine derart leichtgradige Trübung auftrat, dass es kaum zur Bildung der Trübungskurve kam. Diese zur Probe angestellte Lösung wurde wieder angesammelt, neutralisiert und in einer Kollodiummembran gegen Leitungswasser 4 Tage lang dialysiert, und dann nochmals bei vermindertem Druck konzentriert. Nach dem gleichen Verfahren mit Salzsäure, Alkohol

und Äther wie oben, wurde aus dieser Lösung eine weissliche Substanz „CF I“ herausgewonnen.

b) Isolierung der Fraktionen aus Extrakt II.

Da eine leichte Trübung durch Salzsäure, Essigsäure und Trichloressigsäure auftrat, so wurde die Lösung bis auf etwa 1/14 ihres Volumens konzentriert und dann erfolgte damit die Bestimmung der Trübungskurve mit Essigsäure (Fig. 3). Die Trübung erreichte dabei bei pH 4,4 den höchsten Wert, doch sie brachte keinerlei Niederschlag mit sich. Im Gegensatz dazu sah man durch Ansäuerung mit Trichloressigsäure (pH 1,2) eine kleine Menge Niederschlag entstehen. Dieser Niederschlag wurde mittels N/5 NaOH gelöst, die Lösung fällte nicht wiederum durch Essigsäure, sondern nur durch Trichloressigsäure (pH 1,2).

Fig. 3.
Trübungsgrad des eingedampften
Extraktes II aus „Ms 163“
(mit $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ versetzt).

Diese Substanz wurde mit Bezeichnung „PF“ in getrocknetem Zustand aufbewahrt. Während mehrmals wiederholter Reinigung

Fig. 4.
„Ms 163“ (stark virulent)
Extrakt I
Konzent. b. Unterdr. u. 37° – 40°
auf ca 1/20 des Volum.
|
Dialyse (im Kollodiumsack)
|
Konzent. b. Unterdr. u. 37° – 40°
|
HCl (pH 5)
3 malige Ausfällung mit 5
Raumt. abs. Alkohol und
Waschen mit Äther
|
Trocken
CF I

der PF wurde die überstehende Flüssigkeit, die anfänglich einen milchweisslichen Ton zeigte, helldurchsichtig. Diese Flüssigkeit wurde dann wieder angesammelt und bei vermindertem Druck konzentriert. Nachdem man dann diese Flüssigkeit nach der Dialyse mit Salzsäure, Alkohol und Äther behandelt hatte, wurde sie teils in Lösung, teils in Gestalt von Trockensubstanz gehalten. Diese Fraktion nennt man „CF II“. Die obengeschilderten Verfahren veranschaulichen Fig. 4 und 5.

Giftigkeit der Fraktionen.

(A) Giftigkeit für Mäuse.

Jede Fraktion—gewonnen aus beiden Stämmen—wurde in gleicher Weise wie bei Extrakten den Mäusen intraperitoneal eingespritzt.

Wie aus Tabelle 4 und 5 ersichtlich ist, ist M. L. D. der CF I und II aus „Ms 166“ 0,2 mg und 0,5 mg, während PF (PF₁, PF₂, und PF₃) bei demselben Stamm 2 mg–0,5 mg betrug. Bei „Ms 163“ betrug M. L. D. von CF I und II, und PF 0,2 mg, 0,2 mg, und 2 mg.

Im allgemeinen also ist CF (M. L. D. 0,2 mg–0,5 mg) giftiger als PF (M. L. D. 0,5 mg–2 mg) und alle mit Trichloressigsäure isolierten PF sind schwächer giftig als die anderen.

Der Sektionsbefund ergab keinen deutlichen Unterschied im Vergleich mit dem bei den durch Extrakte eingegangenen Tieren, nur dass sich die Hyperämie der Nebenniere und die Diarrhoe bei den eine deutliche Eiweissreaktion zeigenden Fraktionen wie PF einstellten. Aber es ist doch noch fraglich, ob solch ein Befund für diese Fraktionen als

Tabelle 4.

Giftigkeit der aus Extrakten von schwach virulentem Stamm „Ms 166“ isolierten Fraktionen für Mäuse.

Extrakt		I				II			
Injektions-Dosis per 10 g des Körpergewichts (i. p.)	Fraktion	CF	PF ₁	PF ₂	PF ₃	CF	PF ₁	PF ₂	PF ₃
	4,0mg		1/1	1/1	1/1		1/1	1/1	1/1
	2,0		2/2	2/2	3/3		3/3	3/3	3/3
	1,0	1/1	3/3	3/3	1/3	1/1	3/3	2/3	2/3
	0,5	3/3	2/3	3/3		3/3	2/3	1/3	
	0,2	3/3		2/3		2/3			
	0,1	2/3							
M. L. D.		0,2mg	1,0 mg	0,5 mg	2,0 mg	0,5 mg	1,0 mg	2,0 mg	2,0 mg

3/3 bedeutet, dass unter 3 gebrauchten Tieren alle 3 gestorben sind, u. desgl.

Tabelle 5.

Giftigkeit der aus Extrakten von stark virulentem Stamm „Ms 163“ isolierten Fraktionen für Mäuse.

Extrakt		I		II	
Fraktion		CF	CF	PF	
Injektions-Dosis per 10 g des Körpergewichts (i p.)	2,0 mg			3/3	
	1,0	3/3	3/3	1/3	
	0,5	3/3	3/3	0/1	
	0,2	3/3	3/3		
	0,1	2/3	1/3		
	0,05	2/3			
M. L. D.		0,2 mg	0,2 mg	2 mg	

3/3 bedeutet, dass unter 3 gebrauchten Tieren alle 3 gestorben sind, u. desgl.

charakteristisch gilt oder nicht.

(B) Intrakutane Reaktion.

Mit 0,85 Proz. Na Cl-Lösungen wurden sowohl CF I und II, und PF₁ I und II aus „Ms 166“, als auch CF I und II aus „Ms 163“ derart verdünnt, dass je 0,8 mg, 0,4 mg, 0,2 mg, 0,1 mg in 0,1 ccm derselben enthalten sind. Bei intrakutaner Injektion in Dosis von 0,2 ccm jeder Lösung in den Rücken der Meerschweinchen, wurde die Hautreaktion nach 48 Stunden in verschiedener Stärke und Grösse hervorgerufen.

Bei CF I und II aus „Ms 166“ schwankte im allgemeinen die Rötung zwischen 10 × 11 mm—4 × 2 mm im Durchmesser. Nekrose war nur in einem Fall gefunden. Bei PF₁ desselben Stamms fand man an allen Injektionsstellen Nekrose von 2 × 1 mm—1 × 1 mm Durch-

messer, 16×15 mm— 12×11 mm grosse Rötung, wobei die Anschwellung mit ihnen immer parallel einherging (Tab. 6 und 7). Auch bei CF I und II aus „Ms 163“ begleitete die Hautreaktion an Injektionsstellen Nekrose von 4×3 mm— 1×2 mm Grösse, Rötung von 10×14 mm— 10×11 mm und etwaige Anschwellung (Tab. 8). Zwar ist es sehr schwer, über die Hautreaktion herbeiführende Giftigkeit einzelner Fraktionen—in so wenigen Fällen—ausschlaggebendes Urteil abzugeben, denn die Reaktion ist je nach der Individualität des Tieres leicht verschiebbar, aber aus dem Befund, dass, wie man aus Tabellen erkennt, bei Stamm „Ms 166“ an Stärke die eiweissreaktionzeigenden Fraktionen den negativen weit überlegen sind, kann mit Wahrscheinlichkeit darauf gefolgert werden, dass bei der Hautreaktion dem Eiweiss eine Rolle zukommt.

Tabelle 6.

*Intrakutane Reaktion durch
CF I und II aus Stamm
„Ms 166“.*

Fraktion	CF I			CF II		
	Injektions-Dosis	Reaktion	Grösse (mm)	Intensität	Grösse (mm)	Intensität
1,6 mg (0,2 ccm)	N		1×1	+		
	R		10×11	##	7×7	++
	A			+		
0,8 mg (0,2 ccm)	N					
	R		5×6	++	4×4	+
	A					
0,4 mg (0,2 ccm)	N					
	R		4×3	+	4×2	+
	A					

Tabelle 7.

*Intrakutane Reaktion durch
PF I und II aus Stamm
„Ms 166“.*

Fraktion	PF ₁ I			PF ₁ II		
	Injektions-Dosis	Reaktion	Grösse (mm)	Intensität	Grösse (mm)	Intensität
0,8 mg (0,2 ccm)	N		2×1	++	1×1	+
	R		16×15	##	17×15	##
	A			+		+
0,4 mg (0,2 ccm)	N		1×1	+	1×1	+
	R		13×12	##	14×13	##
	A			+		+
0,2 mg (0,2 ccm)	N		1×1	+	1×1	+
	R		13×11	##	12×11	##
	A			+		+

Die Grösse der Rötung und der Nekrose sind in mm ausgedrückt. N=Nekrose

R=Rötung

A=Anschwellung

Tabelle 8.
Intrakutane Reaktion durch
CF I und II aus Stamm
„Ms 163“.

Fraktion		CF I		CF II	
Injektions-Dosis	Reaktion	Grösse (mm)	Intensität	Grösse (mm)	Intensität
1,6 mg (0,2 ccm)	N	4×3	##	3×3	##
	R	10×14	##	15×15	##
	A		++		++
0,8 mg (0,2 ccm)	N	4×2	##	2×3	++
	R	10×8	++	15×12	##
	A		+		+
0,4 mg (0,2 ccm)	N	2×3	++	1×2	++
	R	10×7	++	10×11	##
	A		+		+

Die Grösse der Rötung und der Nekrose sind in mm ausgedrückt.

N=Nekrose R=Rötung

A=Anschwellung

Präzipitationsversuch der Fraktionen mit Kaninchenimmunsera.

Zum Versuche dienten CF II und PF₁ II aus „Ms 166“, und CF I und II aus „Ms 163“. Zur Ermittlung des Präzipitationsversuches wurden 1 Proz. Lösungen der Fraktionen in verschiedenen Verdünnungen über das rohe Kaninchenimmunserum, das mit betreffenden Mäusetyphusbazillen immunisiert ist, geschichtet. Beim positiven Ausfall trat ein weisslicher Ring an der Grenze zwischen der Lösung und dem Serum auf. Die Resultate wurden nach einer 2stündigen Inkubation bei 37°C abgelesen. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, erwiesen sich diese Fraktionen, besonders CF in vitro als serologisch hoch aktiv. Vor allem präzipitierte CF

II aus „Ms 166“ das spezifische Serum in einer Verdünnung von 1:5 × 10⁵.

Tabelle 9.
Präzipitation der Fraktionen mit Kaninchenimmunsera.

Verdünnung		10 ⁻²	10 ⁻³	5×10 ⁻³	10 ⁻⁴	2×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵
Fraktion „Ms 166“	CF II	##	##	##	##	##	++	++	++	+
	PF ₁ II	##	##	##	++	+				
	CF I	##	##	##	++	++	+			
	CF II	##	##	++	++	+				

Über die Ausbeute der extrahierten Substanzen
aus beiden Stämmen und über dieselbe
der daraus isolierten Fraktionen.

Im Vergleich der Ausbeute an die extrahierten Substanzen aus

beiden Stämmen und an die daraus isolierten Fraktionen kam man zum folgenden Ergebnis.

Aus 37,12 g (TG) von „Ms 166“ wurde bei Extrakt I 6,84 g von Trockensubstanz ausgezogen, also 18,4 Prozent. Trockensubstanz der Bakterien schon durch Waschen und Umrührung ins Wasser übergegangen, hingegen bei Extrakt II 9,0 g trockene Substanz, also 34 Proz. der Residuemenge (26,45 g). Bei „Ms 163“ entspricht die ins Extrakt I extrahierte Substanz (11 g) auf das Trockenbakteriengewicht (44,096 g) bezogen 24,94 Proz., dagegen die ins Extrakt II ausgezogene 16,746 g, gleicherweise gerechnet wie oben, 53,98 Proz. Die Gesamtmenge der extrahierten Substanzen betrug bei „Ms 166“ 15,84 g, entspricht also 42,7 Proz. Trockenbakteriengewicht, hingegen bei „Ms 163“ 27,746 g, also 62,92 Proz. Aus diesen Ziffern lässt sich entnehmen, dass stark virulente Mäusetyphusbazillen als schwach virulente vielleicht zerstörbar sind und viel leichter ihre Leibes-substanzen in ihr Medium abgeben können. Was die Ausbeute an isolierte Fraktionen betrifft, so gelangte man zu folgendem sehr interessanten Resultat. Die Gesamtmenge der aus beiden Extrakten von „Ms 166“ erhaltenen PF belief sich auf 5,9722 g, machte also 37,7 Proz. der gesamten extrahierten Substanzen aus, von denen die PF II 85,9 Proz., hingegen PF I nur 14,1 Proz. in Anspruch nahm. Das Gewicht von CF I und II betrug im ganzen 0,4585 g, entspricht also 2,88 Proz. der gesamten extrahierten Substanzen. Von 0,4585 g fällt auf CF I 0,3625 g und auf CF II 0,096 g. Daraus lässt sich verstehen, dass schon durch das erste Verfahren 79,1 Proz. der ganzen CF extrahiert war.

Die obenangegebenen Ergebnisse berechtigen zur Annahme, dass bei schwach virulenten Mäusetyphusbazillen, während CF vorwiegend die Oberfläche des Bakterienleibes bildet und leicht zu extrahieren ist, PF den Hauptbestandteil desselben darstellt und erst durch Zerreiben frei gemacht werden kann.

Wenn man sich nun zum „Ms 163“ wendet, so sieht man, dass bei diesem Stamm PF nur in unbeträchtlich kleiner Menge (0,0234 g) ausschliesslich aus Extrakt II mittels Trichloressigsäure (pH 1,2) isoliert war, während CF I und II in allem 12,537 g betrug.

Von CF I und II macht auf das ganze Gewicht gerechnet, die erstere 7,37 Proz. und die letztere 92,6 Proz. aus. Aus diesem Ergebnisse geht hervor, dass sehr stark virulente Mäusetyphusbazillen von schwach virulenten strukturell deutlich verschieden sind, d. h. die Leiber der stark virulenten Bakterien meistens aus sog. Kohlenhydrat-

Tabelle 10.

Die Ausbeute an die aus 2 verschieden stark virulenten Mäusetyphusstämmen extrahierten Substanzen und an die aus denselben isolierten Fraktionen.

Stämme	Extrakt	Bakterienmenge (g)	Wasser zur Extraktion (ccm)	Extrahierte Trock. subst.		Isolierte	
				per/ccm (mg)	im Total (g)	PF (g)	CF (g)
„Ms 166“ schwach virulent	I	161,0 TG: 37,12 (a)	5700	1,2	6,84 (a') 18,4 % (a als 100)	0,8422 12,3 % (a' als 100) 14,1 % (P als 100)	0,3625 5,3 % (a' als 100) 79,1 % (c als 100)
	II	96,0 Residue n. d. Waschung TG: 26,45 (b)	3600	2,5	9,0 (b') 34,0 % (b als 100)	5,13 57,0 % (b' als 100) 85,9 % (P als 100)	0,096 1,07 % (b' als 100) 20,9 % (a als 100)
	Summe				15,84 (E) 42,7 % (a als 100)	5,9722 (P) 37,7 % (E als 100)	0,4585 (C) 2,88 % (E als 100)
„Ms 163“ stark virulent	I	208,0 TG: 44,096 (a)	7300	1,5	11,0 (a') 24,94 % (a als 100)	Spur	0,924 8,4 % (a' als 100) 7,37 % (c als 100)
	II	146,0 Residue n. d. Waschung TG: 31,018 (b)	5350	3,13	16,746 (b') 53,98 % (b als 100)	0,0234 0,14 % (b' als 100)	11,613 69,3 % (b' als 100) 92,6 % (c als 100)
	Summe				27,746 (E) 68,92 % (a als 100)	0,0234 (P) 0,084 % (E als 100)	12,537 (C) 45,2 % (E als 100)

Abkürzungen: a = Trockengewicht der gesamten Bakterienkultur

b = Trockengewicht der gesamten Residue

a' = Trockengewicht der extrahierten Substanz in Extrakt I

b' = Trockengewicht der extrahierten Substanz in Extrakt II

P = Gesamte PF-Menge

C = Gesamte CF-Menge

E = Gesamte extrahierte Substanz (a' + b')

Komplex, welcher löslich in schwach saurer Reaktion und zugleich sehr toxisch für Mäuse ist, gebaut sind (Tab. 10).

Die chemischen Eigenschaften der Fraktionen.

Zu qualitativen chemischen Reaktionen wurde eine 1 Proz. Lösung jeder Fraktion herangezogen (Tabelle 11).

Farbenreaktion.

Die Farbenreaktion für Eiweiss fiel bei PF ganz entschieden positiv und bei CF etwas schwächer positiv aus. CF I und II aus beiden Stämmen zeigten Biuretteaktion, Pauly'sche Diazoreaktion und Sakagutische Reaktion. Die Molisch'sche war vor allem bei beider CF I am stärksten und bei CF II aus „Ms 163“ mittelmässig stark. Ninhydrinprobe konnte an CF I und II aus „Ms 166“ aus Mangel an Material nicht durchgeführt werden.

Koagulationsversuch.

PF-Lösung koagulierte durch Erhitzung in schwach saurer Reaktion, dagegen nicht in neutraler Reaktion, während CF I und II in beiden Reaktionen nicht koagulierten. Hellersche Probe war nur bei PF positiv. Wie schon erwähnt, waren CF I und II aus beiden Stämmen mit Alkohol ausfällbar.

Präzipitationsversuch.

PF-Lösung wurde durch alle Alkaloidreagenzien präzipitiert. Natriumsulfat, Ammoniumsulfat und Phosphorwolframsäure erzeugten in CF II aus „Ms 163“ einen starken flockigen Niederschlag, doch die üblichen Reagenzien nur Trübung.

Kohlenhydratreaktion.

CF I und II aus beiden Stämmen reduzierten Fehling'sche Lösung spärlich in statu, im Gegensatz hierzu nach einer 5stündigen Hydrolyse mit 3 Proz. Salzsäure sehr deutlich, PF-Lösungen reduzierten es spurweise, wenngleich nach einer mehrstündigen Hydrolyse.

Für Orcin-Salzsäure-Reaktion (Pentose oder Glukuronsäure) und Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion (Pentose oder Glukuronsäure) ergaben alle Lösungen ein positives Resultat. Als ein Stück vorher in Anilinazetat eingetauchtes Filterpapier dem Dampf, welcher erst nach der Abdampfung der mit Salzsäure erhitztenen zu prüfenden Lösung—mit Ausnahme von PF—entsteht, ausgesetzt wurde, verfärbte es sich rosarötlich. Das spricht auch für die Anwesenheit einer Zuckerkom-

Tabelle 11.

Die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Fraktionen.

Stamm		„Ms 166“		„Ms 163“	
Extrakt		I, II	I, II	I	II
Fraktion		CF	PF	CF	CF
Farbenreaktion	Biuretreaktion	+	+	+	+
	Xanthoproteinreaktion	±	+	±	+
	Millonsche Reaktion	±	+	+	+
	Hopkins-Colesche Reaktion	—	+	+	+
	Neubauer-Rhodesche Reaktion	—	+	—	±
	Ninhydrinreaktion	—	+	+	+
	PbS-Reaktion	—	±	—	—
	Molischsche Reaktion	##	—	##	##
	Paulysehe Diazoreaktion	+	+	+	+
	Sakagutische Reaktion	+	+	+	+
	Liebermannsche Reaktion	—	±	—	—
Koagulationsreaktion	Erhitzung in neutraler Reaktion	—	—	—	—
	Erhitzung in saurer Reaktion	—	+	—	—
	Hellersche Reaktion	—	+	—	—
Präzipitationsreaktion	Trichloressigsäure	±	##	+	+
	Sulfosalicylsäure	—	##	+	+
	Na ₂ SO ₄	±	##	+	##
	2/3 Sättigung mit (NH ₄) ₂ SO ₄	+	##	##	##
	25% Quecksilberazetat	±	##	+	+
	Phosphorwolframsäure	+	##	+	##
	Bleisubazetat	+	##	+	+
	Tanninsäure	+	##	+	+
Zuckerreaktion	NaCl	—	+	+	+
	Reduktion der Fehlingschen Lös. nach Hydrolyse mit 3% HCl	+	±	+	+
	Orcin-HCl-Reaktion	+	+	+	+
	Phloroglucin-HCl-Reaktion	—	+	+	+
	Anilinazetatreaktion	+	±	+	+
	Glukosaminreaktion	+	±	+	+

± spur

+ schwach positiv, Trübung (bei Präz.versuch)

stark positiv, Flockung (bei Präz.versuch)

Tabelle 12.

N, P-, Asche- und Zuckergehalt von verschiedenen Fraktionen.

Stamm		„Ms 166“		„Ms 163“	
Extrakt		I		I	II
Analyse	Fraktion	CF	PF	CF	CF
N		2,27 %	13,2 %	2,19 %	6,69 %
P		3,6 %	0,84 %	0,45 %	0,59 %
Reduzierende Substanz	Dauer d. Hydrolyse	0	3,0 %	0	1,8 %
	1 St.	30 %	0	55,1 %	6,75 %
	1 1/2 St.	32,6 %	1 %	59,9 %	17,94 %
	2 St.	32,8 %	2 %	52,67 %	10,48 %
	3 St.	32,2 %	8,2 %	51,74 %	8,39 %
	4 St.	30,8 %	9 %	51,09 %	7,22 %
	6 St.	17,6 %	7,8 %	18,57 %	0,26 %
Asche		12,5 %	2,51 %	12,5 %	16,6 %

ponente (Pentose oder Glukuronsäure). Unter allen Fraktionen zeigten insbesondere CF nach Alkalisierung mit dem Ehrlichschen Reagens eine für Glukosamin charakteristische Reaktion.

Stickstoff, Phosphor, Reduktionskraft und Asche wurden auch quantitativ bestimmt (N nach Mikrokjeldahl, Phosphor nach Lohmann-Jendrassik und Reduktionskraft nach Hagedorn-Jensen) (Tab. 12). Die Resultate sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Beurteilung jeder Fraktion lautet aus obigen Eigenschaften folgenderweise, aber zuvor sei hier vorteilshalber über CF II aus „Ms 163“ besprochen.

Bei ihr

1. fällt die Farbenreaktion für Eiweiss und Kohlenhydrat positiv aus,
2. tritt durch Erhitzung in neutraler und saurer Reaktion keine Koagulation auf,
3. wird nach Zusatz von 2 Raumteilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung ein auffallender flockiger Niederschlag erzeugt,
4. ist es mit Alkohol ausfällbar,
5. sind ferner Phloroglucin-Salzsäure, Orcin- und Glukosaminreaktionen positiv.

Aus diesen Eigenschaften geht mit aller Wahrscheinlichkeit hervor, dass CF II aus „Ms 163“ eine glukoproteinartige Verbindung, bestehend aus Eiweiss und Kohlenhydrat, oder ein Gemisch derselben darstellt, worüber in fortsetzender II. Mitteilung noch genauer gesprochen werden wird.

Auf Grund aller chemischen Eigenschaften wurde wohl auch der Beweis erbracht, dass eine Art Eiweiss in PF aus „Ms 166“ und eine Art Polysaccharid in CF I aus „Ms 166“ und „Ms 163“ enthalten sind. Da aber einerseits bei PF die Kohlenhydratreaktion und andererseits bei CF I die Eiweissreaktion leicht bewiesen sind, so liegt die Vermutung nahe, dass diese Substanzen nicht einmal einheitlich, sondern mit anderer Komponente gemischt sein, wovon noch im folgenden die Rede sein wird. CF I aus „Ms 163“ scheint nach Gehalt an reduzierender Substanz (59,9 Proz.) und an geringem Stickstoff dem sog. reinen Polysaccharid sehr nahe verwandt zu sein.

Wegen zu geringer Ausbeute konnte der Versuch an PF aus „Ms 163“ nicht angestellt werden, jedoch kann man diese Fraktion mit der aus „Ms 166“ als identisch auffassen, weil diese immer durch Trichlor-essigsäure (pH 1,2) ausgefällt wurde.

Besprechung.

Aus der schon im Jahre 1933 von Tomscik und Szongott³¹⁾ gemachten Äusserung, dass bei der Virulenz der Milzbrandbazillen dem Polysaccharid überhaupt keine Rolle zugeschrieben wird, und ferner aus der von Ivánovics³²⁾ neulich bekannt gemachten Mitteilung, dass sich Anthrax-Polysaccharid aus der virulenten und avirulenten Varietät desselben Stamms in gleichen Mengen herausnehmen liess, ist leicht zu entnehmen, dass bei diesen Bakterien das Polysaccharid sowohl quantitativ wie auch qualitativ mit der Virulenz nichts zu tun hat. In den Versuchen über die Beziehung zwischen der Virulenz und der Antigenstruktur von Salmonellen (*S. aertrycke*) gewann Boivin³³⁾ mittels Trichloressigsäure aus zwei S-Varianten den sog. antigène glucido-lipidique 0 von gleicher Menge und von chemisch und biologisch fast gleichen Eigenschaften, ungeachtet ihrer Verschiedenheit in Virulenz. Jedoch aus dem R-Variant konnte er ihn gar nicht gewinnen. Nach Pike und Mackenzie³⁴⁾, die sich auch mit diesem Gegenstand mit schwach und stark virulenten glatthförmigen Stämmen der Mäusetyphusbazillen beschäftigten, besteht zwischen den Polysacchariden aus beiden Stämmen chemisch und toxisch keine merkliche Differenz, so dass sie für die Virulenz nicht entscheidend sind. Der Hauptfaktor,

der die Virulenzverschiedenheit herbeiführt, ist nach ihnen die Fähigkeit, mit der sich die stark virulenten Bakterien im Tierkörper viel lebhafter vermehren als die schwach virulenten.

Kuroya und seine Mitarbeiter³⁰⁾ fanden in ihrem Versuche an Typhusbazillen, dass die Leibessubstanz von stark virulenten Bakterien viel leichter als die von schwach virulenten in Lösung übergang, und schlossen ferner daraus, dass dieser Unterschied eine der Ursachen der Virulenzverschiedenheit sein kann, vorausgesetzt, dass ein solcher auch in vivo eventuell möglich sei. Diese Forscher, und später Kuroya und Nisimura²⁵⁾ konnten ferner feststellen, dass die M. L. D. der PF und CF bei Typhusbazillen 2,6 mg und 0,4 mg, und die der PF bei Cholerabazillen 2,5 mg betrug, also vom ganzen gesehen, CF giftiger als PF, doch quantitativ die letztere der ersteren weit überlegen ist, und dass sogar aus stark virulenten Bakterien mehr CF als aus schwach virulenten herausgenommen wird. Sie kamen also durch diesen Versuch zu dem Resultat, dass die Virulenz eines Stamms sowohl auf PF als auch auf CF zurückgeführt werden soll.

An Hand des eigenen Versuches konnte gezeigt werden, dass schwach virulente Mäusetyphusbazillen sowohl an Ausbeute der Extrakte und der Fraktionen als auch in ihrer Toxität den schwach virulenten Typhusbazillen gleichzusetzen waren, während bei stark virulenten Mäusetyphusbazillen PF einen unbeträchtlich kleinen Teil, hingegen CF den grössten Teil ausmacht. Ferner, da CF II 92,6 Proz. der gesamten CF-Menge entspricht, so geht es nicht zu weit zu sagen, dass bei diesen Bakterien CF II den Hauptbestandteil bildet. Von CF II wird in der nächsten Mitteilung eingehend die Rede sein.

Schlussfolgerungen.

1. Es wurde an Mäusetyphusbazillen ein Versuch gemacht, in welchem nach einer Beziehung zwischen der Virulenz und den giftigen Substanzen gesucht wurde.
2. Die Leibessubstanzen sind bei stark virulenten Bakterien leichter zu extrahieren als bei schwach virulenten.
3. Schwach virulente Bakterien bestehen aus Eiweiss, das den Hauptbestandteil der Körper bildet, und wenig Polysaccharid. Stark virulente Bakterien setzen sich dagegen vorwiegend aus einem Kohlenhydrat-Eiweisskomplex zusammen, dessen Einheitlichkeit noch kaum bestätigt ist.
4. Unter allen Fraktionen, die sich sämtlich für Mäuse giftig verhalten, ist CF am stärksten.

5. Die Virulenz kommt infolgedessen wenigstens zu einem Teile dem Gehalt an bakterienleibbildender CF zu.

Diese Arbeit wurde von dem Saito-Hoonkai unterstützt, wofür Verfasser ihm herzlichsten Dank ausspreche.

Literatur.

- (1) Kruse, W., *Microbiol.*, Leipzig 1910, 1021.
- (2) Wyssokowitsch, W., *Zeitschr. f. Hyg.*, 1886, 1, 3.
- (3) Gamaleia, N., *Zit. aus Hdb. d. path. Mikrorg.*, 1929, 1, 456.
- (4) Kruse u. Bonaduce, *Ibid.*, 456.
- (5) Bail, O., *Zentralbl. f. Bakt.*, 1900, 27, 517.
- (6) Gál, F., *Zeitschr. f. Immunf.*, 1912, 14, 685.
- (7) Thiele, F. H., u. Embelton, D., *Arch. d. med. exp. et d'anat. path.*, 1914, 26, 60; *Zeitschr. f. Immunf.*, 1913, 19, 643.
- (8) Jensen, *Zit. aus Hdb. d. path. Mikrorg.*, 1929, 1, 464.
- (9) Wassermann, A., u. Ostertag, R., *Monatsh. f. prak. Tierheilkunde.*, 1902, 13, 466.
- (10) Jaffé, J., u. Besserer, A., *Deutsch. med. Wochensch.*, 1905, 2044.
- (11) Preisz, H., *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 1907, 44, 209; ebenda, 1907, 47, 585.
- (12) Gruber, M., u. Futaki, K., *M. m. W.*, 1907, 54, 249.
- (13) Bail, O., *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 1915, 75, 159.
- (14) Stamatin, N., *Archiva veterinara*, 1934, 26, 1.
- (15) Schaefer, W., *C. r. Soc. Biol.*, 1936, 122, 897.
- (16) Sterne, M., *Zit. aus Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 1940, 146, 18.
- (17) von Buza, L., *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 1939, 143, 244; ebenda 1940, 146, 18.
- (18) Voges, O., *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 1896, 20, 906.
- (19) Koske, F., *Arb. a. d. K. Gesundheitsamte*, 1906, 24, 305.
- (20) Branham, S. E., *J. Infect. Dis.*, 1925, 37, 291.
- (21) Ecker, E. E., *J. Infect. Dis.*, 1917, 21, 541.
- (22) Ecker, E. E., u. Rimington, C., *J. Hyg.*, 1928, 27, 44.
- (23) Casper, W., *Zeitschr. f. Hyg.*, 1928, 109, 170.
- (24) Menten, M. L., u. King, C. G., *J. Infect. Dis.*, 1930, 46, 275.
- (25) Furth, J., u. Landsteiner, K., *J. of Exp. Med.*, 1929, 49, 11.
- (26) Raistrick, H., u. Topley, W. W. G., *Brit. J. Exp. Path.*, 1934, 15, 113.
- (27) Boivin, A., u. Mesrobianu, L., *Revue d'Immun.*, 1935, 1, 555.
- (28) Ivánovics, G., *Zeitschr. f. Immunf.*, 1936, 87, 310.
- (29) Hosoya, S., u. Kawashima, S., *Zikken Igaku*, 1936, 20, 913.
- (30) Kuroya, M., Osio, K., u. Pin. K. H. Tohoku *J. Exp. Med.*, 1940, 38, 167.
- (31) Tomscik, J. u. Szongott, H., *Zeitschr. f. Immunf.*, 1932, 76, 214.
- (32) Ivánovics, G., *Zeitschr. f. Immunf.*, 1940, 97, 402.
- (33) Boivin, A., *C. r. Soc. Biol.*, 1939, 132, 370.
- (34) Pike, R. M., u. Mackenzie, G. M., *J. Bact.*, 1940, 40, 171 u. 197.
- (35) Kuroya, M., u. Nisimura, H., *J. Shanghai Science Inst.*, 1939, 4, 159.