Glukosamin und pathogene Bakterien.

II. Mitteilung. Weitere Untersuchungen über die Differenzierung der pathogenen Staphylokokken durch ihr Glukosamin spaltendes Vermögen.

Von

Masahiko Kuroya und Masatoshi Kurose.

(黒屋 政彦)

(黒瀬 正敏)

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Kaiserlichen

Tohoku Universität zu Sendai.

Direktor: Prof. Dr. M. Kuroya.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ wurde berichtet, dass die Differenzierung von pathogenen und nicht pathogenen Staphylokokken mittels der Spaltung des Glukosamins möglich ist. Wenn auch verschiedene Methoden, wie Pigmentbildung, Hämolysinbildung, Laktose- oder Mannitspaltung und Plasmakoagulation für die Differenzierung zur Verfügung stehen, so geben sie doch keinen sicheren Anhaltspunkt für den Zweck. Heute erwies sich der P-H-C-Versuch als der zweckmässigste, wo alle 3 Prüfungen, d. h. die Pigmentbildung, die Hämolysinbildung und die Plasmakoagulation zusammen gleichzeitig durchgeführt werden mussten. Der P- und H-Versuch erbringt zuweilen viele Ausnahmen, besonders im *Staphylococcus albus* ist es äusserst schwer durch diese Methode die pathogenen von der nicht pathogenen zu differenzieren. Aber der C-Versuch wurde neulich von Von Daranyi²⁾ (1926), Fischer³⁾ (1936), Walston⁴⁾ (1936), Hallman⁵⁾ (1937), Cruickschank⁶⁾ (1937), Cowan^{7) 8)} (1938), und Fairbrother⁹⁾ (1938), als eine der zuverlässigsten Methoden festgestellt. Nämlich die pathogenen Staphylokokken besitzen nach ihnen immer ein plasmakoagulierendes Ferment, die sog. Staphylokoagulase, dagegen fehlt bei den nicht pathogenen ein solches Ferment. Chapman und seine Mitarbeiter¹⁰⁻¹³⁾ (1934-1938) behaupteten der P-H-C-Versuch als die beste Standardmethode und kamen zu dem Schluss, dass „the coagulase test is the most reliable single test for the differentiation of pathogenic from non-pathogenic staphylococci“.

In dem vorigen Versuche wurden mit 24 Staphylokokkenstämmen die

Untersuchung auf das Vermögen, Glukosamin zu spalten, und der P-H-C-Versuch gleichzeitig ausgeführt, wobei sich ergab, dass die Glukosaminspaltung nicht immer mit dem P- und H-Versuch, aber mit dem C-Versuch vollkommen übereinstimmt. Aus diesem Ergebnisse wurde somit gefolgert, dass die Anwendung der Glukosaminspaltung eine deutliche Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Staphylokokken ermöglicht. In vorliegendem Versuch wurden noch viele Stämme benützt, um diese Tatsache noch deutlicher vor Augen zu führen.

Versuchsmethode und verwendete Stämme.

Glukosamin wurde gleicherweise wie vorher aus Krabbenschalen rein dargestellt, die Glukosaminspaltung und der P-H-C-Versuch wurden zu gleicher Zeit vorgenommen. Die Methoden waren wie folgend.

(1) Nach 24 stündiger Bebrütung in einer 0,5% Glukosamin-HCl enthaltenden Lackmusbouillon bei 37° wurde die Glukosaminspaltung durch den Farbumschlag beurteilt (sog. G-Methode).

(2) Die auf Löfflerscher Serumplatte 24 Stunden lang gezüchteten Stämme wurden noch 2 Tage weiter zur Pigmentbildung bei Zimmertemperatur stehen gelassen (sog. P-Methode).

(3) Die Grösse des hämolysierten Hofes, der nach 24 stündiger Bebrütung von Staphylokokken auf der 5% Kaninchenblutplatte um die vereinzelt Kolonien entstand, wurde gemessen (sig. H-Versuch).

(4) Ein Teil der 1% Natriumzitratlösung wurde mit 2,5 Teilen Kaninchenblut vermischt und zentrifugiert. Zur Plasmakoagulation impfte man Staphylokokken darin und beobachtete nach 48 stündiger Bebrütung bei 37°, ob es zur Koagulation führte (sog. C-Methode).

(5) Ausser den oben angegebenen stellten Verfasser diesmal eine 0,5% Glukosamin-HCl enthaltende Bromthymolblau-Bouillon her, impften darin und beurteilten mittels des Farbumschlags die Veränderung der pH, welche durch die Glukosaminspaltung herbeigeführt wurde. Bei der Messung der pH diente zum Standard McIlvainesche⁴¹⁾ Puffer-Lösung.

Verwendete 100 Stämme wurden aus den von Mai 1940 bis Januar 1941 unserem Institut eingesandten Materialien frisch isoliert. Sie stammten alle aus verschiedenen Krankheitsherden her, wie Osteomyelitis, eitrige Arthritis, Lymphadenitis, Furunkel, Karbunkel, Panarizium, Phlegmone und anderen verschiedenen eitrigen Entzündungen. Zu ihnen liessen sich noch 90 Stämme hinzufügen, unter denen 40 aus dem gesunden Rachen oder irgend einer anderen Quelle und 50 andere aus der Luft herstammten.

Versuchsergebnisse.

(1) *Vergleich von Glukosamin spaltendem Vermögen mit der Pigmentbildung durch Staphylokokken.*

Unter aus verschiedenen pathologischen Herden herausgezüchteten 100

Stämmen waren 80 *Staph. aureus*, 19 *Staph. albus* und 1 *Staph. citreus*, und das Glukosamin wurde durch 78 von *Staph. aureus* und 15 von *Staph. albus* gespalten. Unter 50, aus der Luft gewonnenen Stämmen gehörten 3 dem *Staph. aureus*, 34 dem *Staph. albus* und 13 dem *Staph. citreus* an. Bei ihnen erwies sich die Glukosaminreaktion stets als negativ. Unter 40 aus gesundem Rachen gezüchteten Stämmen waren 24 *Staph. aureus*, 15 *Staph. albus* und 1 *Staph. citreus*. Glukosamin wurde durch 23 von *Staph. aureus*, 1 von *Staph. albus* gespalten. Also unter allen 190 Staphylokokken erwiesen sich 107 Stämme als *Staph. aureus*, von denen 101 (94,39%) glukosaminspaltendes Vermögen besaßen, wohingegen nur 13 (19,3%) unter 68 *Staph. albus* positiv und bei *Staph. citreus* alle negativ ausfielen. Aus diesem Resultat ersieht man einen erheblichen Unterschied zwischen dem P- und G-Versuch (Tabelle 1).

Tabelle 1.
Glukosaminspaltungs- und Pigmentbildungsvermögen.

Quelle der Stämme	Differenzierungsmethode	St. aureus	St. albus	St. citreus
Krankheitsherd (100 Stämme)	Pigmentbildung	80 (80%)	19 (19%)	1 (1%)
	Gl.-spaltg	++	29 (36,3%)	2 (10,5%)
		+	49 (61,2%)	10 (52,7%)
		±	0	3 (15,8%)
		—	2 (2,5%)	4 (21%)
Gesundes Rachen (40 Stämme)	Pigmentbildung	24 (60%)	15 (37,5%)	1 (2,5%)
	Gl.-shaltg	++	1 (4,2%)	0
		+	22 (91,6%)	1 (6,7%)
		±	1 (4,2%)	0
		—	0	14 (93,3%)
Luftkeim (50 Stämme)	Pigmentbildung	3 (9%)	34 (68%)	13 (26%)
	Gl.-spaltg	++	0	0
		+	0	0
		±	0	0
		—	3 (100%)	34 (100%)
Total (190 Stämme)	Pigmentbildung	107 (56,3%)	68 (35,8%)	15 (7,9%)
	Gl.-spaltg	++	30 (26,2%)	2 (3,1%)
		+	71 (66,6%)	11 (16,2%)
		±	1 (1,2%)	3 (4,2%)
		—	5 (6%)	52 (76,5%)

Gl.-spaltg—Glukosaminspaltung.

Grad der Gl.-spaltg:—

++ bedeutet, daß pH von Kulturbouillon bei Glukosaminspaltung zw. 6,4~6,5.

+ bedeutet, daß pH von Kulturbouillon bei Glukosaminspaltung 6,6 ist.

± bedeutet, daß pH von Kulturbouillon bei Glukosaminspaltung 6,8 ist.

— bedeutet, daß pH von Kulturbouillon zw. 6,9~7,0 ist.

(2) *Vergleich von Glukosamin spaltendem Vermögen mit der hämolysierenden Wirkung durch Staphylokokken.*

Unter 100 aus Krankheitsherden gezüchteten Stämmen wurde bei 92 hämolysierende Wirkung gefunden, wovon bei 86 die Glukosaminreaktion positiv, bei 3 schwach positiv war (Tabelle 2). Unter 8 Stämmen ohne hämoly-

sierende Wirkung war die Glukosaminreaktion bei 4 negativ. Also insgesamt bei 90 (90%) unter 100 Stämmen stimmt der H-Versuch mit dem G-Versuch überein, ungeachtet, ob die Reaktionen positiv oder negativ ausfielen. Bei 6 unter 50 aus Luft gewonnenen Stämmen war die hämolysierende Wirkung schwach positiv, doch die Glukosaminreaktion überall negativ. 31 unter 40 Stämmen, die aus normalem Rachen gezüchtet waren, besaßen hämolysierende Wirkung; die Glukosaminreaktion erwies sich aber nur bei 24 davon als positiv, und bei 1 schwach positiv. Daraus geht hervor, dass die H- und G-Versuche in 85,55% miteinander übereinstimmen. Unter allen 190 Stämmen waren beide Versuche bei 167 gleich (87,89%).

Tabelle 2.
Glukosaminspaltungs- und Hämolysinbildungsvermögen.

Quelle der Stämme	Differenzierungsmethode	Grad der Hämolyse			
		##	++	+	—
Krankheitsherd (100 Stämme)	Hämolyse	25 (25%)	54 (54%)	13 (13%)	8 (8%)
	Gl.-spaltg	++	12 (48%)	16 (29,6%)	2 (15,4%)
		+	12 (48%)	36 (66,7%)	8 (61,5%)
		±	1 (4%)	0	2 (15,4%)
		—	0	2 (3,7%)	1 (7,7%)
Gesundes Rachen (40 Stämme)	Hämolyse	3 (7,5%)	15 (37,5%)	13 (32,5%)	9 (22,5%)
	Gl.-spaltg	++	1 (33,3%)	0	0
		+	2 (66,7%)	14 (93,3%)	7 (53,2%)
		±	0	0	1 (7,8%)
		—	0	1 (6,7%)	5 (39%)
Luftkeim (50 Stämme)	Hämolyse	0	0	6 (12%)	44 (88%)
	Gl.-spaltg	++	0	0	0
		+	0	0	0
		±	0	0	0
		—	0	0	6 (100%)
Total (190 Stämme)	Hämolyse	28 (14,3%)	69 (36,5%)	32 (16,8%)	61 (32,4%)
	Gl.-spaltg	++	13 (46,4%)	16 (32,2%)	2 (6,2%)
		+	14 (50%)	50 (72,4%)	15 (46,9%)
		±	1 (3,6%)	0	3 (9,4%)
		—	0	3 (4,4)	12 (37,5%)

Gl.-spaltg—Glukosaminspaltung (man sieh' Tabelle 1).

Grad der Hämolyse:—

bedeutet, daß der Diameter des hämolysierten Hofes 5 mm od. darüber beträgt.

++ bedeutet, daß der Diameter des hämolysierten Hofes 2~5 mm beträgt.

+ bedeutet, daß der Diameter des hämolysierten Hofes der Koloniengröße gleich kommt.

— bedeutet „keine Hämolyse“.

(3) Vergleich der Glukosaminspaltung mit der Plasmakoagulation durch Staphylokokken.

90 unter 100, die aus Krankheitsherden gezüchtet waren, koagulierten das Plasma und spalteten auch das Glukosamin. Ein Stamm mit schwacher Plasma koagulierender Wirkung spaltete auch Glukosamin schwach. Bei 2 unter 9, bei denen der C-Versuch negativ ausfiel, zeigte sich leichte Glukosaminre-

aktion. Die Ergebnisse bei diesen beiden Versuchen gehen also nicht immer parallel. Bei 50 Stämmen aus Luft waren beide Versuche negativ, wogegen sie bei 24 unter 40 aus normalem Rache positiv waren, mit der Ausnahme, dass bei einem unter 16 negativen Stämmen nur die Glukosaminreaktion ein schwaches Resultat ergab. Also unter 190 Stämmen stimmten bei 187 die C- und G-Versuche überein (98, 42%). Hier sah man nur wenige, doch sichere Ausnahmen (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Glukosaminspaltungs- und Plasmakoagulation.

Quelle der Stämme	Differenzierungs- methode	Grad der Plasmakoagulation				
		##	++	+	±	—
Krankheits- herd (100 Stämme)	Plasmakoagulation	44 (44%)	34 (34%)	12 (12%)	1 (1%)	9 (9%)
	Gl.-spaltg	++	26 (59,1%)	5 (14,7%)	0	0
		+	18 (40,9%)	29 (85,3%)	12 (100%)	0
		±	0	0	0	2 (22,2%)
		—	0	0	1 (100%)	7 (77,8%)
Gesundes Rachen (40 Stämme)	Plasmakoagulation	7 (17,5%)	13 (22,5%)	4 (10%)	0	16 (40%)
	Gl.-spaltg	++	1 (14,3%)	0	0	0
		+	6 (85,7%)	13 (100%)	4 (100%)	0
		±	0	0	0	1 (6,3%)
		—	0	0	0	15 (93,7%)
Luftkeim- (50 Stämme)	Plasmakoagulation	0	0	0	0	50 (100%)
	Gl.-spaltg	++	0	0	0	0
		+	0	0	0	0
		±	0	0	0	0
		—	0	0	0	50 (100%)
Total (190 Stämme)	Plasmakoagulation	51 (26,8%)	47 (24,9%)	16 (8,3%)	1 (0,5%)	75 (39,5%)
	Gl.-spaltg	++	27 (52,9%)	5 (10,7%)	0	0
		+	24 (47,1%)	42 (89,3%)	16 (100%)	0
		±	0	0	0	3 (4%)
		—	0	0	1 (100%)	72 (96%)

Gl.-spaltg—Glukosaminspaltung (man sieh' Tabelle 1).

Grad der Plasmakoagulation:—

bedeutet, daß ganze Plasma vollständig koagulierte.

++ bedeutet, daß es mittelmäßig koagulierte.

+ bedeutet, daß es teilweise, besonders im unteren Abschnitt koagulierte.

± bedeutet, daß es schwach koagulierte.

— bedeutet „keine Koagulation“.

(4) *Über den Zusammenhang zwischen der pH-Veränderung infolge der Glukosaminspaltung und der Pathogenität der Staphylokokken.*

Die pH von Bronthymolblau-Bouillon, mit Glukosamin nicht spaltenden Erregern geimpft, blieb zwischen 7,0–6,9, während sie aber zwischen pH 6,6–6,4 lag, wenn es sich um Glukosamin spaltende handelte, lag aber am meisten in der Nähe von pH 6,6. Die pH von Bouillon zeigte annähernd 6,8 im Fall von schwacher Glukosaminspaltung. Da es wahrscheinlich schien, dass die Plasmakoagulation desto stärker wurde, je mehr sich die pH der Bouillon bei Glukosaminspaltung 6,5–6,4 näherte, also je höher die Azidität der Kultur-

flüssigkeit durch die Glukosaminspaltung wurde, wobei aber die Hämolyse nicht immer ein Parallellität zeigte, so kamen Verfasser auf den Gedanken, dass es zwischen der pH-Veränderung bei der Glukosaminspaltung und der Pathogenität der Erreger eine korrelative Beziehung gebe. Schon 1937 teilten Cruickschank und Robert⁶⁾ mit, dass keine korrelative Beziehung zwischen hämolysierendem oder plasmakoagulierendem Vermögen der Staphylokokken und ihrer Virulenz gegen Kaninchen zu finden war. Im Jahre darauf berichtete Chapman¹³⁾ aber, dass die plasmakoagulierende Wirkung um so stärker war, je grösser die Hautreaktion bei Kaninchen wurde. Durch diese Behauptung angeregt, wurde auch in unserem Versuch die Hautreaktion mit 130 Stämmen, die die aus Krankheitsherden gezüchteten 100 und aus anderen Quellen gewonnenen 30 umfassten, ausgeführt, wobei der C-Versuch und die pH-Messung bei Glukosaminspaltung miteinander vergleichend vorgenommen wurden. Bei intrakutaner Injektion der bei 37°, 24 Stunden lang gezüchteten Staphylokokken, die in Dosis vom 0,1 mg in 0,1 ccm Rinderfleischbouillon aufgeschwemmt wurden, traten im allgemeinen eine deutliche Nekrose, hochgradige Rötung und Anschwellung auf dem Rücken jedes Kanin-

Tabelle 4.

Glukosaminspaltungsvermögen und Hautreaktion bei Kaninchen.

Quelle der Stämme	Differenzierungsmethode	Grad der Hautreaktion			
		##	++	+	—
Krankheitsherd (100) Stämme	Hautreaktion	25 (25%)	64 (64%)	4 (4%)	7 (7%)
	Gl.-spaltg {	++	22 (88%)	9 (14,1%)	0
		+	3 (12%)	55 (85,9%)	1 (25%)
		±	0	0	3 (75%)
		—	0	0	7 (100%)
Gesundes Rachen (16) Stämme	Hautreaktion	0	0	1 (6,3%)	15 (93,7%)
	Gl.-spaltg {	++	0	0	0
		+	0	0	0
		±	0	1 (100%)	0
		—	0	0	15 (100%)
Luftkeim (14) Stämme	Hautreaktion	0	0	0	14 (100%)
	Gl.-spaltg {	++	0	0	0
		+	0	0	0
		±	0	0	0
		—	0	0	14 (100%)
Total (130) Stämme	Hautreaktion	25 (19,2%)	64 (49,2%)	5 (4%)	36 (27,6%)
	Gl.-spaltg {	++	22 (88%)	9 (14,1%)	0
		+	3 (12%)	55 (85,9%)	1 (20%)
		±	0	0	4 (80%)
		—	0	0	36 (100%)

Gl.-spaltg—Glukosaminspaltung (man sieh' Tabelle 1).

Grad der Hautreaktion:—

- ## Stärkste und grösste Rötung mit Nekrose u. Anschwellung.
- ++ Mittelstarke und mittलगrosse Rötung mit Nekrose u. Anschwellung.
- + Schwache und kleine Rötung mit keiner Nekrose oder Anschwellung.
- keine Hautreaktion.

chens auf. Die Reaktion erreichte ihr Maximum in ca. 70 Stunden. Wie aus der Tabelle 4 zu ersehen ist, führten die Stämme mit dem Glukosamin spaltenden und die Kulturflüssigkeit stark sauer machenden Vermögen stärkste Hautreaktion herbei. Die Staphylokokkenstämme, die den Nährboden nur schwach sauer (pH 6,8) machten, verursachten im ganzen eine auffallend schwächere Reaktion im Vergleich mit den stärker sauer (pH 6,6) machenden Stämmen. Bei den Stämmen, die die Kulturflüssigkeit bis zur pH 6,9–7,0 brachten, also nicht imstande waren, Glukosamin zu spalten, war die Hautreaktion negativ oder ausserordentlich schwach. Verfasser kamen also zum Schluss, dass die Pathogenität von Staphylokokken mit der Azidität der Kulturbouillon bei Glukosaminspaltung parallel geht. Die Tatsache, dass die Stämme, die das Plasma nicht koagulieren, jedoch das Glukosamin, wenn auch leicht, doch deutlich spalten konnten, eine mehr oder weniger schwach positive Hautreaktion auslöste, und dass die Glukosaminspaltung bezüglich ihren Grades durch pH, also durch die Ziffer deutlich ausgedrückt werden kann, gibt den Grund dafür, dass bei der Bewertung der Pathogenität G-Versuch viel geeigneter ist als der C-Versuch.

Besprechung.

Anschliessend an die frühere Mitteilung wurden diesmal mit 190 neuen Stämmen Glukosaminspaltung und P-H-C-Versuche gleichzeitig durchgeführt, dabei wurde auch noch die pH-Änderung in Bromthymolblau-Bouillon bei Glukosaminspaltung beobachtet. Die Resultate des G-Versuchs stimmten nicht immer mit den des P- oder H-Versuchs, doch mit den des C-Versuchs in 98, 42% überein. Bei den übrigen Stämmen (1,58%) mit negativem C-Versuchsergebnis wurde eine schwache Glukosaminreaktion gefunden. Diese Stämme lösten, den Kaninchen gegeben, eine schwache Hautreaktion aus und wiesen auf die etwaige Pathogenität hin. Daraus wird klar ersichtlich, dass der G-Versuch an Bewertung der Pathogenität von Staphylokokken dem C-Versuch weit überlegen ist.

Schluss.

Mittels Glukosaminspaltung kann die Bewertung der Pathogenität von Staphylokokken leicht ermöglicht werden. Die Pathogenität für Kaninchen scheint stark zu sein, wenn die Azidität der Kulturbouillon bei der Glukosaminspaltung stark ist.

Literatur.

- (1) Kuroya u. Kurose, Tohoku J. Exp. Med., 1940, 38, 591.
- (2) Von Daranyi, Zbl. Bakter. I. Orig., 1926, 99, 74.

- (3) Fischer, Bull. Johns Hopkins Hosp., 1936, 59, 393.
 - (4) Walston, J. Hyg., 1936, 35, 549.
 - (5) Hullman, Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., 1937, 36, 798.
 - (6) Cruickschank u. Robert, J. Path. a. Bacter., 1937, 45, 295.
 - (7) Cowan, J. Path. a. Bacter., 1938, 46, 31.
 - (8) Cowan, J. Path. a. Bacter., 1939, 48, 169 u. 545.
 - (9) Fairbrother, J. Path. a. Bacter., 1940, 50, 83.
 - (10) Chapman, Berens u. Curcio, J. Bacter., 1934, 28, 343.
 - (11) Chapman u. Berens, J. Bacter., 1935, 29, 437.
 - (12) Chapman, Berens u. Curcio, J. Bacter., 1937, 33, 646.
 - (13) Chapman, Berens, Nilson u. Curcio, J. Bacter., 1938, 35, 311.
 - (14) Clark, *The Determination of Hydrogen Ions*. Baltimore, 1928, 214.
-