

Neufeld
Levinthal

DR. PETER H. LEVIN
THE ROCKEFELLER INSTITUTE
FOR MEDICAL RESEARCH
NEW YORK

Ueberreicht vom Verfasser.

Abdruck aus der

Zeitschrift für Immunitätsforschung, Bd. 55. 1928. Heft 3/4

herausgegeben von

E. Friedberger
(Berlin-Dahlem)

R. Kraus
(Wien)

H. Sachs
(Heidelberg)

P. Uhlenhuth
(Freiburg i. Br.)

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut „Robert Koch“, Berlin.]

Beiträge zur Variabilität der Pneumokokken.

Von **F. Neufeld** und **Walter Levinthal**.

I. Umwandlung virulenter in avirulente Pneumokokken.

Unter den Bakterienarten, die angesichts ihrer beträchtlichen Neigung zu Umwandlungen als labile bezeichnet werden können, steht im Vordergrund als ein dankbares Objekt für Variabilitätsstudien der Pneumokokkus. Die außerordentliche Empfindlichkeit des eigentlichen Krankheitserregers, des typspezifischen und virulenten Keimes, macht die unveränderte Erhaltung seiner Eigenschaften im Laboratorium zu einer schwierigeren Aufgabe als die Gewinnung avirulenter Varianten. Dabei erweisen sich diese Umwandlungen in der Richtung zum apathogenen Saprophyten, die die amerikanischen Autoren treffend „Degradierung“ genannt haben, als Ausdruck irgendwelcher Schädigungen der Keime. Die Verhütung solcher Degradierungen gelingt einmal durch Konservierung der Bakterien im Zustande der Latenz (in eingetrockneten Organstücken im Exsikkator oder nach der Methode von Ungermann in überschichtetem Serum) und andererseits durch Ausschaltung schädigender Faktoren bei der Züchtung, durch regelmäßige Weiterimpfung junger Kulturen. Zu diesem Zweck bewährte sich uns in bisher nicht mitgeteilten Versuchen ausgezeichnet die künstliche Herabsetzung der Wachstumsintensität durch Züchtung bei 25°; nach diesem Verfahren glückte bei zweitägiger Ueberimpfung die jahrelange Erhaltung intakter, maximal virulenter Stämme (Levinthal).

Wie bekannt, verfügen wir über mehrere Methoden, um die Umwandlung hochvirulenter in völlig avirulente Pneumokokken, die von früheren Untersuchern oft, aber doch mehr als ein zufälliger, meist unerwünschter Befund beobachtet wurde, durch bestimmte Verfahren regelmäßig zu erzielen. Dazu dient vor allem die Züchtung in Bouillon mit Zusatz von spezifischem Immunsérum: je nach Menge und Stärke des zugesetzten Serums treten schon in der ersten oder erst in folgenden Generationen bei täg-

licher Ueberimpfung neben den virulenten avirulente Formen auf, bis schließlich sämtliche Keime in avirulente umgewandelt sind. (Stryker, Griffith, Amoss, Reimann u. a.). Eine zweite Methode zur Gewinnung von avirulenten Formen ist die Züchtung in Bouillon mit allmählich steigendem Zusatz von Galle (Amoss, Reimann). Häufig, wenn auch wohl nicht so regelmäßig, gelingt die gleiche Umwandlung durch Züchtung bei 39° C (Yoshioka). (Literatur s. bei Neufeld und Schnitzer, „Pneumokokken“, in Kolle-Wassermann, 3. Aufl.)

Auf die Frage, inwieweit auch im infizierten Tier unter dem Einfluß von spezifischen Antikörpern eine Umwandlung der Erreger in schwach oder avirulente Formen erfolgt, wollen wir hier nicht eingehen. Seit den Untersuchungen von Bernhardt und Paneth ist aber bekannt, daß unter dem Einfluß normaler Abwehrkräfte des Organismus virulente Diphtheriebazillen sich in avirulente verwandeln, und daß dieselbe Umwandlung in vitro durch Einwirkung von Normalserum sich erzielen läßt — Ergebnisse, die Levinthal unter Anwendung des Ein-Zell-Kulturverfahrens bestätigt hat. Offenbar handelt es sich dabei um ein allgemeines Gesetz; so spalten selbst maximal virulente hämolytische Streptokokken im Körper der Maus schon innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion schwach virulente, grünewachsende Streptokokken ab (Morgenroth und Mitarbeiter, Kuczynski und Wolff).

Wir haben nun versucht, entsprechende Umwandlungen von Pneumokokken in vitro unter dem Einfluß normaler Organe zu erzielen; bei dieser Versuchsanordnung ist der störende Faktor des Tierkörpers mit seiner Saprophytenflora ausgeschaltet. Wir knüpften dabei an eine Beobachtung von Richet¹⁾ an. Richet hat kürzlich mitgeteilt, daß Organstücke von Kaninchen oder Meerschweinchen (Leber, Milz, Muskel), wenn sie frisch einer Aufschwemmung von Tuberkelbazillen in Kochsalzlösung zugesetzt wurden, nach etwa 2 Wochen nicht nur eine Abtötung (geprüft im Meerschweinchen), sondern sogar eine teilweise Auflösung (geprüft im Zählpräparat) herbeiführten, während die gekochten Organe eine entsprechende sichere Wirkung vermissen ließen.

1) Ch. Richet fils, La bactériolyse tissulaire du bacille de Koch. Compt. rend. société biol., T. 96, 1927, p. 965.

Auch unsere Versuche an Pneumokokken wurden in Parallelreihen mit frischen und mit gekochten Organstücken angesetzt. Geprüft wurden Niere, Herz, Milz und Leber, die unter sterilen Kautelen entbluteten Kaninchen entnommen und nach der Zerschneidung in Bouillon blutfrei gespült waren.

Die bohnen- bis pflaumenkerngroßen Stücke wurden entweder sofort in Röhren mit 5,0 cem Bouillon beschickt und nach 24stündiger Sterilitätsprüfung am nächsten Tage beimpft, oder vor der gleichen Bearbeitung 8 Tage lang ohne Zusatz der Nährflüssigkeit im Eisschrank konserviert. In beiden Fällen wurde kurz vor der Beimpfung die eine Reihe der mit Bouillon beschickten Organröhren 5 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt.

Als Nährflüssigkeit eignete sich weniger gut die autoklavierte Bouillon, die bei uns aus Pferdefleisch hergestellt wird; die besten Resultate ergab eine einfache, nicht autoklavierte, nur dampftopferhitze, gepufferte Kalbfleischbrühe mit Wittepepton pH 7,8.

Die Einsaat des maximal virulenten Typ I (Stamm Agr.) betrug einmal $\frac{1}{2}$ Tropfen einer 24stündigen Pferdeserumbouillon, einmal einen Tropfen einer wenige Stunden bebrüteten, gerade erkennbar getrühten Kultur im gleichen Medium. Sämtliche Röhren blieben dauernd im Brutschrank und wurden anfangs täglich, später alle 2 Tage, schließlich in 3—5tägigen Abständen mittels Kapillarpipetten abgeimpft und auf Blutplatten ausgesät.

Die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen, die untereinander nur unbedeutende Differenzen zeigten, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen.

1) Während die Bouillonkontrollröhren ohne Organzusatz nach 2—3—5 Tagen steril und nach einigen weiteren Tagen durch Autolyse völlig geklärt waren, blieben die Pneumokokken in den Gläsern mit den gekochten Organstücken unerwartet lange am Leben. Nieren-, Milz- und Herzkulturen konnten meist noch nach einem Monat, manchmal nach $1\frac{1}{2}$ Monaten mit reicher Kolonieausbeute abgeimpft werden.

Anders verhielten sich nur die gekochten Leberrohren; nach 3—5 Tagen, also gleichzeitig mit den Bouillonkontrollen, erwiesen sie sich als steril; nur einmal blieb eine solche Kultur fast einen Monat lang am Leben. Möglicherweise spielt die Säurebildung aus dem Glykogen eine unheilvolle Rolle für die Bakterien.

2) Im Gegensatz zu den Röhren mit gekochten Organen entfalteten die frischen Organstücke eine charakteristische Wirkung auf die Pneumokokken. Insbesondere wenn die Organe bald nach ihrer Entnahme aus dem Tierkörper verarbeitet wurden, erwiesen sich die Keime nach wenigen Tagen als abgetötet. Wenn

auch das Absterben oft fast gleichzeitig wie in den Bouillonkontrollen auftrat, so ist es nicht angängig, deshalb den Organzusatz für unwirksam zu halten und den frühen Tod der Keime auf die eigenen Stoffwechselprodukte zu beziehen. Aus dem Vergleich mit den entsprechenden Kulturen mit gekochten Organen schließen wir vielmehr, daß von dem frischen Organstück eine Schädigung besonderer Art ausgeht, die auf labilen Stoffen beruht. Der schädigende Faktor wird nämlich nicht nur durch die Erhitzung auf 100° fast oder völlig ausgeschaltet, sondern auch durch die Konservierung der Organe im Eisschrank deutlich abgeschwächt. Das in der Tabelle dargestellte Beispiel gibt davon ein deutliches Bild. Die Röhren mit den 8 Tage auf Eis gehaltenen, nicht gekochten Nierenstücken überlebten 17 resp. 20 Tage, während die entsprechenden Kulturen mit gekochten Organen beide 44 Tage am Leben blieben.

3) Die Wirkung dieses thermolabilen Faktors zeigt sich nun nicht nur in seiner Fähigkeit, die Bakterien abzutöten, sondern kann sich schon frühzeitig in einer Umwandlung der virulenten, typspezifischen Keime zu avirulenten, nicht mehr typspezifischen, also degradierten Varianten äußern. Die täglichen Plattenaussaaten geben von dieser Variation ein vorzügliches Bild und zeigen die schrittweise Zunahme des Prozesses. So erscheinen beim Beginn des Umwandlungsprozesses zwischen den zahlreichen unveränderten, großen und feucht glänzenden Kolonien des virulenten Typs nur vereinzelte kleine, trockene Variantenkolonien, die nun von Tag zu Tag zunehmen, um mehr oder weniger rasch die Ueberhand zu gewinnen und schließlich allein übrig zu bleiben.

Abgesehen von Größe, Feuchtigkeit und Wölbung der Kolonie ist das charakteristischste Symptom die Beschaffenheit der Oberfläche, die auf Chloroformblutplatten, aber auch schon auf dem gewöhnlichen 5proz. Pferdeblutmischagar bei mikroskopischer Schrägbetrachtung im auffallenden Licht (Objektiv 10mal, Okular 5mal = 50fach) meist überaus deutlich wird: virulente Pneumokokken besitzen eine spiegelglatte (smooth) Oberfläche, die sogenannte S-Form, degradierte erscheinen körnig zerklüftet oder rau (rough) als R-Formen (Arkwright u. v. a.). Stets entspricht diesem Unterschied der Kolonieoberfläche ein verschiedenes Verhalten der Bakterien bei der Verreibung in Wasser und bei der Züchtung in flüssigem Medium: S-Bakterien lassen sich völlig homogen aufschwemmen und wachsen in Bouillon rein diffus (D), R-Bakterien krümeln bei der Verreibung mehr oder weniger stark und wachsen in Bouillon als Bodensatzhäutchen von granulierter Beschaffenheit (G) (de Kruif).

Tabelle I.

Aussaat nach		Ungekocht					Gekocht					
		Niere	Niere	Milz	Leber	Leber	Niere	Niere	Milz	Leber	Leber	
1. Woche	1 Tag	++S	++S	++S	++S	++S	++S	++S	++S	++S	++S	++S
	2 Tagen	++S	++S	++S	+S	+S	++S	++S	++S	±S	—	—
	3 „	+S	+S	++S	—	±S	++S	++S	++S	±S	—	—
	5 „	++R	±S	—	—	±S	++S	++S	++S	—	—	—
	6 „	++R	±S	—	—	+S	++S	++S	++S	—	—	—
	7 „	++R	±S	—	—	++R	++S	++S	++S	—	—	—
	8 „	++R	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—
2. Woche	9 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	10 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	12 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	14 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
3. Woche	16 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	17 „	++R	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	20 „	—	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	22 „	—	++R	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
4. Woche	24 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	26 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	29 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
5. Woche	31 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	33 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
	37 „	—	—	—	—	++S	++S	++S	—	—	—	—
6. Woche	40 „	—	—	—	—	++S	++S	++R	—	—	—	—
	44 „	—	—	—	—	+S	+S	++R	—	—	—	—
	62 „	—	—	—	—	+S	+S	+R	—	—	—	—

Organversuch in Pneumokokkenbouillon. Organe vor Verarbeitung 8 Tage auf Eis. Einsaat Pneumokokkus Typ I (Stamm Agr.).
 S = Spiegelglatte Kolonien des virulenten Stammes. R = Rauhe Kolonien der avirulenten Variante. s = Kleinere, glatte Kolonien einer schwach virulenten Zwischenstufe. ++ = große Mengen von Kolonien. + = geringere Mengen von Kolonien.
 ± = wenige Kolonien. 2 = 2 Kolonien.

Agglutination und Virulenzprüfung bestätigen die tief eingreifende Differenz.

Die Tabelle I gibt den erfolgreichsten der Versuche wieder, der in 10 Reihen, 5 gekocht, 5 ungekocht, und zwar mit je 2 Nieren-, je 1 Milz- und je 2 Leber-Röhrchen angesetzt wurde.

Den auffallendsten Unterschied zeigt der Vergleich der gekochten und rohen Nieren-Röhrchen. Charakteristisch aber ist auch der mehrfach beobachtete Gegensatz in der Milzreihe; während das ungekochte Organ nach 5 Tagen ohne Uebergang durch ein Stadium der Umwandlung sterilisiert, treten im gekochten Röhrchen gegen Ende der 4. Woche mehr und mehr R-Kolonien auf und haben im Laufe der 5. Woche die S-Formen völlig verdrängt; erst am Beginn der 7. Woche kündigt dann die starke Verminderung der Aussaat den nahen Tod auch der Variante an. Auch daß in dieser Reihe am 6. und 7. Tage schon ganz vereinzelt eine R-Kolonie in der dichten S-Aussaat auftaucht, spricht für einen besonderen Reichtum dieses Organs an dem schädigenden Faktor, der durch Kochen also nicht vollständig zerstört wird.

Bemerkenswert erscheint weiterhin ein Befund aus der Reihe des ersten mit gekochter Niere beschickten Röhrchens. In der letzten positiven Aussaat treten neben unveränderten S-Kolonien überwiegend etwas kleinere, aber ebenfalls glatte Kolonien (s) auf, deren Bouillonkultur rein diffuses Wachstum zeigt. Während die Agglutination unverändert die des Typ I ist, weist der Tierversuch auf die beginnende Degradierung hin; der Stamm zeigt im Vergleich mit der unveränderten S-Kultur erheblich verminderte Virulenz, einmal um das 10000fache, ein zweites Mal sogar um das 1000000fache, und hat die Fähigkeit der Kapselbildung auch im septisch überschwemmten Tierkörper verloren.

Mäuseversuch intraperitoneal 0,5 ccm einer 24stündigen Serumbouillonkultur, gezüchtet bei 25°, verdünnt mit Bouillon.

Variante s.

1. Versuch: 1:10000 †₃, Kapsel —.
1:1000000 überlebt.
2. Versuch: 1:100 †₂, Kapsel —.
1:10000 überlebt.

Typischer Stamm S.

- 1:100000000 †₂, Kapsel +.
1:10 Milliarden nicht geprüft.

Die erhebliche Herabsetzung der Virulenz in Verbindung mit dem Verlust des Kapselbildungsvermögens trotz der Vermehrung im Tierkörper beweist das mehrfach bestrittene Vorkommen schwach virulenter Zwischenstufen¹⁾.

In der Tabelle I sind die avirulenten Varianten als R-Formen zusammengefaßt. In der Tat haben sie alle das Merkmal der rauhen Kolonieoberfläche, des G- (granulierten, d. h. Bodensatz-) Wachstums in Bouillon, der Avirulenz, der Inagglutinabilität durch Typseren miteinander gemeinsam. Daß sie dennoch Differenzen untereinander aufweisen, ließ sich an drei Varianten zeigen, die alle aus der Aussaat der ersten ungekochten Nierenreihe am 3. Tage durch Abimpfung einer einzigen R-Kolonie abgespalten worden waren, und die wir als R a, R b, R c bezeichnen. Die drei Abarten zeigten nach Isolierung in Ein-Zell-Kulturen neben geringfügigen, aber deutlichen kulturellen Unterschieden eine etwas verschiedene Gallelöslichkeit; der Stamm a wird in 10proz. Natrium

1) Für die Präparate aus den Mäuseorganen bewährt sich die in Deutschland zu wenig bekannte Kapselfärbung nach Muir, die etwas modifiziert ausgezeichnete, kontrastreiche Bilder gibt.

Kapselfärbung nach R. Muir.

Lösungen:

Unverdünntes Karbolfuchsin nach Ziehl,
Löfflers Methylenblau,
Spezialbeize.

Beize:

Gesättigte Lösung von Sublimat 2 Teile
20proz. Lösung von Tannin 2 Teile
Gesättigte Lösung von Kalialaun 5 Teile

Der dünne, lufttrockene Ausstrich wird in der Flamme fixiert.

- 1) Färbung mit dem Karbolfuchsin unter wiederholter leichter Erwärmung (Dampfbildung) 2 Minuten.
- 2) Gründliche Spülung unter dem Wasserstrahl.
- 3) Beizung 1 Minute.
- 4) Gründliche Spülung unter dem Wasserstrahl. Während dieser Wasserspülung läßt man einmal ganz kurz, d. h. 1 Sekunde lang, Methylalkohol über das Präparat fließen.
- 5) Gegenfärbung mit dem Löfflerblau 1—2 Minuten. Wasserspülung, Trocknung. Zur Konservierung der Präparate muß das Zedernöl jedesmal sorgfältig entfernt werden, da sonst die Färbung stark abblaßt.

Die Kokken sind wie die Zellkerne leuchtend rot, die Kapseln wie das Zellplasma hell blau gefärbt.

taurocholicum bei Zimmertemperatur schnell und komplett, b langsam, aber komplett, c sehr langsam und nur unvollständig gelöst, während sich diese Unterschiede bei 37° mehr oder weniger verwischen. Vor allem aber verhielten sich die beiden Varianten R a und R b in den nunmehr zu schildernden Umwandlungsversuchen völlig verschieden.

II. Umwandlung von avirulenten in virulente Pneumokokken desselben und eines fremden Typus.

Die Ein-Zell-Kulturen der beiden degradierten Stämme R a und R b, deren Entstehung soeben geschildert wurde, haben wir benutzt, um damit die bedeutsamen Versuche von F. Griffith über die Umwandlung avirulenter Pneumokokken (R-Formen) in virulente (S-Formen) des gleichen oder auch eines fremden Typus nachzuprüfen. Die Mitteilung von Griffith ist soeben im Journal of Hygiene (1928, Vol. 27, p. 113) erschienen; durch das Entgegenkommen von Herrn Dr. Griffith, der dem einen von uns gelegentlich eines Besuches in London im November v. Js. seine Ergebnisse ausführlich mitteilte, wurden wir in den Stand gesetzt, schon vorher mit den Versuchen zu beginnen.

Es ist bekannt, daß avirulente Pneumokokken mit so weitgehender Abschwächung, daß nicht nur 0,5—1 ccm frischer Bouillonkultur, sondern auch der abzentrifugierte Bodensatz von 10 ccm und mehr von Mäusen ohne Folgen vertragen wird, gelegentlich wieder in die virulente Ausgangsform zurückschlagen können. Meist wurden die Rückschläge bei Einspritzung größerer Kulturmengen in Mäusen beobachtet, und man hat daran gedacht, daß in solchen Kulturen doch immer mindestens ein hochvirulenter Keim übrig geblieben sei, sodaß es sich nicht um eine Rückverwandlung, sondern um eine Auslese aus einer Mischung mit zahlreichen avirulenten Keimen handeln würde. Daß eine solche Erklärung zum mindesten nicht für alle Fälle zutrifft, beweist unter anderem die von Levinthal mitgeteilte Beobachtung, wonach ein aus einer einzigen Zelle gewonnener völlig avirulenter Pneumokokkus in vitro zur vollen Virulenz zurückschlug. Auch ohne Einzellkultur läßt sich nachweisen, daß R-Formen von Pneumokokken, die aus Passagen eines virulenten Stammes in verdünntem Immuserum gewonnen waren, sich untereinander durch die Form

der Agglutination, durch das Immunisierungsvermögen und vor allem durch ihre wechselnde Fähigkeit zum Rückschlag in die Ausgangsform unterscheiden können. Hierfür liefern Versuche von Griffith (S. 123 f.), auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, interessante Beispiele.

Wie andere Autoren, hat auch Griffith gesehen, daß einzelne seiner Varianten, besonders solche, die nur wenige Passagen in Immuserumverdünnungen durchgemacht hatten, leicht im Mäusekörper zurückschlugen, andere nur selten und noch andere niemals. Am ehesten ließ sich ein Rückschlag erzwingen, wenn große Mengen der Kokken und zwar subkutan eingespritzt wurden (Bodensatz von 50—100 ccm).

Bekanntlich führt man den Unterschied zwischen virulenten und avirulenten (degradierten) Pneumokokken nach den grundlegenden Untersuchungen von Avery und seinen Mitarbeitern darauf zurück, daß nur die ersteren eine spezifische lösliche Substanz (S-Substanz) besitzen, die von den Autoren rein dargestellt und als Polysaccharid erkannt wurde. Jeder Pneumokokkentypus besitzt sein eigenes Kohlehydrat, das vom homologen Serum noch in Verdünnungen von etwa 1:1 Mill. präzipitiert wird: auf ihm beruht die Virulenz des Kokkus und alle typenspezifischen Reaktionen (Serumschutz, Agglutination, Präzipitation).

Griffith nimmt nun an, daß die degradierten R-Pneumokokken zum Teil diese S-Substanz nicht ganz verloren, sondern vielfach noch einen Rest davon behalten haben, der aber unter gewöhnlichen Umständen nicht genügt, um sie virulent zu machen. „Wird aber ein solcher Stamm in großer Menge subkutan injiziert, so löst sich die Mehrzahl der Kokken auf und das dabei frei werdende S-Antigen liefert das Material, woraus die überlebenden R-Kokken ihre rudimentäre S-Struktur wieder aufbauen.“ Offenbar haben aber die partiell degradierten Kokken nur sehr wenig S-Substanz übrig behalten, und es erschien daher möglich, durch Zugabe abgetöteter virulenter Pneumokokken mehr geeignetes Material zu liefern; dafür könnte dann die Menge der lebenden R-Pneumokokken weitgehend reduziert werden, und zwar so weit, daß niemals ein spontaner Rückschlag zu erwarten wäre. Das S-Antigen der abgetöteten virulenten Keime soll also dabei als Reiz oder als Futter dienen.

Die von dieser Ueberlegung ausgehenden Versuche von Griffith sprechen für die Richtigkeit seiner Voraussetzungen: es gelang ihm vielfach, avirulente I- und II-Pneumokokken dadurch zum Rückschlag in die virulente Ausgangsform zu bringen, daß er sie in Mengen von 0,25—0,5 ccm Bouillonkultur gleichzeitig mit großen Mengen (Bodensatz von 50—100 ccm Bouillon) abgetöteter virulenter Kokken des gleichen Typus subkutan einer Maus einspritzte. Beim Typ II-Pneumokokkus konnte ein Rückschlag auch dann noch erzielt werden, wenn die virulenten Kokken im Dampftopf abgetötet waren, während beim Typus I das abgetötete Material nur dann wirksam war, wenn es 2—3 Stunden auf 60°, gelegentlich auch, wenn es 1 Stunde auf 80° erhitzt war; das Antigen des Typus II erwies sich also als stärker thermo-resistent.

Weitere Versuche ergaben nun aber, daß der Rückschlag zur Ausgangsform zuweilen auch dann erfolgte, wenn anstatt der homologen heterologe Pneumokokken in abgetötetem Zustande injiziert wurden: so schlugen avirulente R II-Pneumokokken zu virulenten S II-Pneumokokken zurück, wenn sie zugleich mit bei 60° abgetöteten virulenten Kokken des Typus I subkutan injiziert wurden. Daß in allen diesen Versuchen das erhitzte Material in der Tat abgetötet war, wurde durch zahlreiche Kontrollen festgestellt: niemals konnten daraus durch Kultur, auch bei langer Beobachtung, oder durch Einspritzung großer Mengen bei Mäusen (ohne gleichzeitige Einspritzung lebender avirulenter Kokken) lebensfähige Kokken nachgewiesen werden. Aus diesen Versuchen schließt Griffith zuerst, wie schon erwähnt, daß bei der Umwandlung der S- in die R-Form etwas von dem S-Antigen übrig bleibt, und zwar bei verschiedenen R-Stämmen in verschiedenem Maße, daß dieses rudimentäre Antigen durch die beschriebene Versuchsanordnung bis zur vollen Stärke regeneriert werden kann, und ferner daß ein virulenter Stamm eines Typus neben seinem Hauptantigen eine gewisse Menge von Antigen eines anderen Typus enthalten kann.

Wenn die letztere Annahme richtig ist, so ergibt sich daraus die Möglichkeit der Umwandlung eines Typus in den anderen; ja, wenn es gelänge, durch Züchtung in homologem Immuserum das

Hauptantigen eines Pneumokokkus auf dieselbe kleine Menge herunterzudrücken, die der Kokkus an heterologem Antigen von Anfang an enthält (und die durch das Wachstum in seinem zugehörigen Immuneserum voraussichtlich nicht beeinträchtigt werden würde), so müßte ein derartig degradiertes Kokkus ebenso leicht zur Umwandlung in den betreffenden fremden als zum Rückschlag in den eigenen Typus zu bringen sein.

Auch diese Voraussetzung fand Griffith durch das Experiment bestätigt: ein degradiertes R II-Pneumokokkus, der zusammen mit bei 60—70° abgetöteter virulenter Typ I-Kultur Mäusen subkutan injiziert wurde, wandelte sich teils in den virulenten Typ II, teils in den virulenten Typ I um. Ferner konnten R I-Pneumokokken durch gleichzeitige Einspritzung mit abgetöteten S II-Kokken in virulente II-Pneumokokken umgewandelt werden, ebenso eine R-Form der Gruppe IV in virulente Kokken sowohl des Typus I als II, je nachdem abgetötete I- oder II-Kokken zugesetzt werden, und schließlich wurden aus R I- wie R II-Stämmen durch Zusatz abgetöteter Typ III-Kokken Mucosusstämme gewonnen; hier konnte die Umwandlung, da dem Autor kein spezifisches III-Serum zu Gebote stand, nicht durch Agglutination bestätigt werden. Es sei bemerkt, daß die Umwandlung eines Typus in den anderen im allgemeinen nicht so leicht zu erfolgen scheint, wie der Rückschlag in die Ausgangsform des gleichen Typus; daher durfte die Erhitzung bei diesen Versuchen nicht zu weit getrieben werden (nur bis 60° 2 Stunden). In jedem Fall wurde aber auch hier durch zahlreiche Kontrollen die sichere Abtötung festgestellt. Gegen die Annahme, daß die virulenten Stämme nicht durch Umwandlung aus dem avirulenten entstanden, sondern aus einzelnen überlebenden Keimen des scheinbar abgetöteten Materials hervorgegangen sind, spricht besonders die Beobachtung, daß auch auf 100° erhitzte Typ II-Kokken den Rückschlag avirulenter II-Pneumokokken zu virulenten hervorbringen können.

Versuche, die Griffith unternahm, die gleiche Umwandlung durch Züchtung mit typenspezifischem Material *in vitro* zu erzeugen, sind ausnahmslos vergeblich gewesen.

Eine einstweilen kleine Reihe eigener Versuche hat die bemerkenswerten Ergebnisse des englischen Autors bestätigt. Es hat sich gezeigt, daß die sichersten Resultate unter genauer Einhaltung

seiner Methodik zu erzielen sind. Insbesondere scheint die Verwendung ganz junger S-Kulturen als „Futter“ für die R-Stämme von entscheidender Bedeutung zu sein. So hat uns die Benutzung 24stündiger Brutschrankkulturen zur Herstellung der abgetöteten Suspensionen nur ganz vereinzelt ein positives Resultat ergeben, und zwar nur bei Verwendung von einfacher, nicht von Serumbouillon. Es wird zu prüfen sein, ob die 24stündige Züchtung bei 25° mit verminderter Vermehrungsintensität nicht bessere Ergebnisse zeitigt.

Der entscheidende Versuch wurde unter strikter Innehaltung der Griffithschen Vorschriften folgendermaßen angestellt.

2 Erlenmeyerkolben zu 300 ccm mit vorgewärmter 2proz. Dextrosebouillon wurden mit je 3,0 ccm einer 24stündigen Kultur in Serumbouillon (25°) des Pneumokokkus II (Stamm Erfurt), bezeichnet S II, beimpft und nach 5 Stunden Bebrütung bei 37°, deutlich, aber schwach getrübt, verarbeitet. Ein gleicher Kolben, entsprechend beimpft mit dem Stamm Agr. (Typ I), bezeichnet S I, wurde gleichzeitig und in genau entsprechender Weise behandelt. Die jungen Kulturen wurden in einer großen Zentrifuge 1½ Stunden lang scharf ausgeschleudert und nach Abpipettieren der überstehenden klaren Kulturflüssigkeit so weit eingengt, daß 0,6 ccm von S II etwa 60 ccm Originalkultur, 0,8 ccm von S I etwa 60 ccm Originalkultur entsprach. Die beiden außerordentlich stark getrühten Aufschwemmungen wurden in Reagenzgläsern eingeschmolzen und in ein Wasserbad von 60° versenkt, in dem sie unter mehrfachem Schütteln 40 Minuten belassen wurden. Nach Öffnen der Gläser Verteilung zu 0,6 bzw. 0,8 ccm in kleine Standgläschen und Zufügung von je 0,5 ccm Rinderserum zu jedem Glas. 37° über Nacht. Am nächsten Tage wurden von jedem Gläschen 0,1 ccm in Serumbouillon sowie 2 Tropfen auf Blutplatten ausgesät, die Bouillonröhrchen nach 24stündiger Bebrütung noch einmal auf Platten verimpft. Alle Gläschen erwiesen sich als steril, ein Resultat, das in anderen Versuchsreihen auch schon nach 20 Minuten langer Erhitzung auf 60° regelmäßig gewonnen wurde. Die lebenden R a- und R b-Kulturen in Serumbouillon (25° 24 Stunden), die wie stets reines Bodensatzwachstum aufwiesen, wurden nach Entfernung der Hälfte der überstehenden klaren Flüssigkeit aufgeschüttelt und in der Dosis von 0,2 ccm verwandt; diese Dosis wird stets der abgetöteten, wie beschrieben, mit Rinderserum versetzten und bebrüteten S-Aufschwemmung zugefügt und gemeinsam einer Maus subkutan am linken Hypochondrium injiziert.

Das Resultat des Versuches zeigt Tabelle II.

Kontrollen von je 2 Mäusen, die 0,2 ccm der R-Kulturen allein erhielten und überlebten, sind fortgelassen. Die gestorbenen († mit Ziffer des Todestages) oder getöteten (‡ mit Ziffer des Tötungstages) Mäuse wurden sorgfältig sezirt, Kapselpräparate und Aussaaten auf Blutplatten von der Injektionsstelle (= Lok.) der Bauchhöhle (= Per.), dem Herzblut (= Cor.) gemacht.

Tabelle II.

6 Mäuse				2 Mäuse	2 Mäuse
<i>S II abgetötet + Ra lebend</i>				<i>S II abgetötet + Rb lebend</i>	<i>S II abgetötet allein</i>
3 † ₃	Lok.	Per.	Cor.	2 † ₉ steril	2 † ₉
Kapsel	+	+	+		1 steril
Kultur	++ SII u. R	++ SII	++ SII		1 Pneum. —, aus Cor 3 Kolon. Streptoc. virid.
1 todkrank † ₃	Lok.	Per.	Cor.		
Kapsel	+	+	+		
Kultur	++ SII u. R	++ SII	++ SII		
1 † ₉	Lok.	Per.	Cor.		
Kultur	Pneum. +, überwuch. Proteus	1 Kol. SII	—		
1 † ₉	steril				
2 Mäuse				1 Maus	2 Mäuse
<i>SI abgetötet + Ra lebend</i>				<i>SI abgetötet + Rb lebend</i>	<i>SI abgetötet allein</i>
1 † ₃	Lok.	Per.	Cor.	† ₉ steril	2 † ₉
Kapsel	—	—	—		1 steril
Kultur	± R	++ R	± R		1 Cor. steril, Lok. u. Per. Sapro- phyten
1 † ₃	Lok.	Per.	Cor.		
Kapsel	+	+	+		
Kultur	++ rein SI	++ SI	++ SI		

† = gestorben, † = getötet, Index = Tag des Todes resp. der Tötung, SI = virulente Pneumokokken vom Typ I, SII = virulente Pneumokokken vom Typ II. Ra und b sind avirulente Varianten des Typ I.

Von 6 Mäusen, die S II abgetötet, zusammen mit der avirulenten Variante Ra lebend erhalten haben, ist also in 5 Tieren die Umwandlung eines degradierten I-Stammes in den virulenten Typ II gelungen. 4 Mäuse, die mit der gleichen Dosis desselben S II-Antigens injiziert worden waren, in 2 Fällen zusammen mit der Variante Rb, in 2 Fällen allein, sind völlig negativ geblieben.

In der kleinen Reihe, die mit dem abgetöteten Material S I behandelt worden ist, starb von den 2 mit R a kombiniert gespritzten Tieren 1 vorzeitig mit einem reinen R-Befund, dessen reiche Ausbeute aus der Peritonealaussaat bei spärlichem Gehalt von Injektionsstelle und Herzblut einen Fehler bei der Einspritzung und eine Begünstigung des Wachstums der einverleibten R-Kokken durch die in die verletzte Bauchhöhle gelangte S I-Substanz vermuten läßt. Es sei daran erinnert, daß abgetötete Pneumokokken des Typus I (nicht solche des Typus II nach Schiemann und Casper) bei intraperitonealer Einspritzung schon in kleineren Mengen, als sie hier verwendet wurden, Mäuse töten (Yoshioka). Bemerkenswert ist, daß das Ergebnis der Plattenaussaat auf Grund des Kapselpräparates vorausgesagt werden konnte. In der zweiten Maus glückte die Rückwandlung in den S I-Typ, während die 3 Mäuse, bei denen das abgetötete S I-Sediment nicht mit dem Stamm R a kombiniert worden ist, negativ blieben.

Der Gedanke, daß die typenspezifischen Pneumokokken nicht aus dem avirulenten Stamm R a durch Umwandlung resp. Reversion entstanden seien, sondern dem nicht völlig abgetöteten S-Sediment entstammen, scheint uns, abgesehen von dem negativen Ausfall aller Kultur- und Tierversuche mit dem erhitzten Material allein in unseren (ebenso wie in Griffiths) Versuchen, besonders auch durch die Parallelreihen mit dem Stamm R b widerlegt, die niemals auch nur einen verdächtigen Befund darboten haben, ebensowenig wie in anderen hier nicht zu besprechenden Versuchsreihen die kombinierte Einspritzung mit Colibazillen.

An sich wäre es denkbar, daß durch Erhitzen weitgehend geschädigte Pneumokokken zwar nicht durch Bebrütung *in vitro*, aber doch durch Einspritzung in ein empfängliches Tier wieder zum Wachsen zu bringen sind. Analoge Beobachtungen sind gelegentlich bei Desinfektionsversuchen nicht nur mit chemischen Mitteln, sondern auch mit Erhitzen gemacht worden. In manchen Fällen sind sie wohl einfach dadurch zu erklären, daß für die betreffenden Bakterien unsere Nährböden nicht optimal sind; dies dürfte für die Pestbazillen zutreffen, bei denen mehrfach Impfstoffe, die durch schonende Abtötung hergestellt waren, bei Aussaat auf Nährböden steril erschienen, während sie im Tierversuch

noch infektiös waren. Dagegen hat B. Lange¹⁾ gelegentlich auch bei Verwendung optimaler Nährböden weitgehend geschädigte Bakterien nicht durch Kulturversuch, sondern nur durch den Tierversuch noch als lebend nachweisen können, während öfter das Gegenteil der Fall war. In den vorliegenden Versuchen, sowohl in denen von Griffith wie den unserigen, sind aber auch die Tierversuche ausnahmslos negativ ausgefallen, und zwar auch dann, wie schon hervorgehoben, wenn gleichzeitig lebende Colibazillen oder auch eine R-Variante von Pneumokokken mitinjiziert wurde, die offenbar zu weit degradiert war, um noch zur Ausbildung, sei es der eigenen verloren gegangenen oder einer fremden S-Substanz, fähig zu sein. Für die Hypothese, daß scheinbar abgetötete Pneumokokken nur dann wieder zum Leben erwachen können, wenn sie zusammen mit lebenden und avirulenten, aber nicht allzu weit degradierten Kokken eines fremden Typus einem empfänglichen Tier injiziert werden, für eine solche Annahme fehlt uns jede Analogie.

Vielmehr zwingt das immer wieder bestätigte Resultat zu dem Schluß, daß die Umzüchtung zum virulenten Typ an eine besondere Zustandsform der avirulenten Variante gebunden ist. Diese Zustandsform reicht zwar nicht mehr für einen spontanen Rückschlag aus, wie zahlreiche Kontrollversuche gezeigt haben, befähigt aber den Stamm, aus dargereichter spezifischer S-Substanz im Tierkörper Material zum Aufbau des jeweiligen Types zu entnehmen, eine Eigenschaft, die andere Varianten der gleichen Herkunft anscheinend endgültig verloren haben.

Für die von Griffith gegebene Erklärung der Umwandlung haben wir eine sehr naheliegende Analogie, nämlich die Beobachtungen über Paragglutination. Auch hier sehen wir Bakterien die spezifischen Eigenschaften fremder Bakterien — und zwar in diesem Falle von Bakterien einer anderen Art — annehmen.

Kuhn und Woithe, denen wir die Entdeckung dieses merkwürdigen Phänomens verdanken, züchteten aus dem Darm von chronisch Ruhrkranken Colistämme, bisweilen aber auch Kokken, die manchmal nur in geringem Grade, vielfach aber auch bis zur

1) Bruno Lange und K. H. Keschischian, Beiträge zur Methodik der Desinfektionsmittelprüfung. II. Mitteilung. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 101, 1923, S. 88.

Titergrenze mit Ruhrseren agglutinierten und ihrerseits in vorbehandelten Tieren die Bildung von Ruhragglutininen anregten. Ornstein züchtete im Felde in ruhrverseuchtem Milieu aus Stuhl und Blut vielfach nicht nur Coli-, sondern auch Typhusstämmen, die mit Flexnerruhrserum Paragglutination zeigten, und von anderen Beobachtern liegen zahlreiche ähnliche Befunde vor. Auch in vitro ist es in einer Reihe von Fällen [Literatur siehe bei Papamarku¹⁾] gelungen, Colibazillen eine Paragglutination für fremde Arten anzuzüchten, indem man sie in Nährböden wachsen ließ, die Leibesbestandteile der betreffenden Arten enthielten. Wenn von den zahlreichen derartigen Versuchen, die in verschiedener Richtung variiert wurden, nur verhältnismäßig wenige zu dem gewünschten Erfolge führten, so ist das im Lichte der durch Griffith neu gewonnenen Erkenntnisse vielleicht zum Teil darauf zurückzuführen, daß nur Bakterienstämme, die sich in einem ganz bestimmten intermediären Zustande befinden, zu solchen Umwandlungen geeignet sind, vielleicht nur dann, wenn ihr eigenes Hauptantigen weitgehend zurückgedrängt und andererseits eine gewisse Anlage zur Ausbildung eines fremden Antigens vorhanden ist. Jedenfalls dürfte es geboten sein, von diesen Gesichtspunkten aus die Versuche zur künstlichen Erzeugung paragglutinierender Bakterien wieder aufzunehmen.

Ob die „Auffütterung“ geeigneter avirulenter Varianten zu virulenten Typen auch mit S-Substanz, die durch Extraktion gewonnen ist, oder durch die typspezifisch mit Pneumokokkus II verwandte Varietät E von Friedländerbazillen²⁾, die uns bisher nicht zur Verfügung stand, zu gewinnen ist, muß weiterem Studium vorbehalten bleiben. Einige solcher Versuche, die abgetöteten S-Kokken durch gallegelöste Pneumokokken oder durch ein daraus von Herrn Prof. Schiemann hergestelltes Extrakt zu ersetzen, das reichlich das typenspezifische Kohlehydrat enthielt, sind bei uns bis jetzt negativ geblieben.

1) Papamarku, Beitrag zur Frage der Weil-Felixschen Reaktion und der Paragglutination. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 87, 1918, S. 469.

2) Arbeiten von Avery, Heidelberger und Goebel, The soluble specific substance of a strain of Friedländer's bacillus. Journ. exp. Med., Vol. 42, 1925, p. 701 u. 709 u. 727.

Die zum Aufbau von S nötige Substanz ist anscheinend nicht völlig identisch mit dem typenspezifischen Antigen, das nach zahlreichen Versuchen auch durch langes Erhitzen auf 100° nicht wesentlich geschädigt wird. Vielleicht ist eine Vorstufe des spezifischen Kohlehydrates oder ein an Proteinstoffe gebundenes Kohlehydrat notwendig. Auch Griffith sagt bei der Erklärung seiner Beobachtungen, daß er unter der zum Aufbau nötigen S-Substanz „die spezifische Proteinstruktur des virulenten Pneumokokkus versteht, die ihn befähigt, ein spezifisches lösliches Kohlehydrat herzustellen“.

Zusammenfassung.

1) In Bouillonröhrchen mit Zusatz von Kaninchenniere und -leber, die dauernd bei 37° gehalten wurden, trat vom 3. Tage an eine Umwandlung eingesäter virulenter Typ I-Pneumokokken in avirulente (R-)Formen ein, ebenso, wenn auch verzögerter, in einem Röhrchen mit Zusatz gekochter Milch, während die Kontrollkulturen in einfacher Bouillon in 2—3 Tagen abstarben und autolysierten, ohne daß dabei Umwandlungen beobachtet wurden. In Röhrchen mit Zusatz gekochter Niere blieben die Pneumokokken bis zur 6. Woche lebend und unverändert; nur einmal trat nach der 6. Woche eine in kleinen, aber glatten Kolonien wachsende Zwischenform auf, mit stark verminderter Virulenz und ohne Kapselbildung in der septisch überschwemmten Maus.

2) In Bestätigung der neuen Versuche von Griffith gelang es, eine vom Typus I gewonnene avirulente R-Variante durch subkutane Einspritzung zusammen mit abgetöteten S-Kokken in typische virulente Pneumokokken umzuwandeln, und zwar durch Zusatz abgetöteter Typ II-Kokken in II-Pneumokokken, durch Zusatz abgetöteter Typ I-Kokken in I-Pneumokokken. Bei einer anderen R-Variante der gleichen Herkunft wurde bei derselben Versuchsanordnung eine Umwandlung nicht beobachtet.