

(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Serolog. Abteilung: Geheimrat *Otto*].)

Weitere Untersuchungen zum d'Herelleschen Phänomen.

Von

R. Otto und H. Munter.

Mit 4 Textabbildungen.

Bereits in unserer ersten Arbeit¹⁾ haben wir darauf hingewiesen, daß von den Bakterien selbst gelieferte bakterienschädigende Stoffe seit längerer Zeit bekannt sind. Im besonderen haben wir die Arbeiten von *Eijkmann*²⁾ sowie die Befunde von *Conradi* und *Kurpjuweit*³⁾ angeführt.

Eijkmann hatte festgestellt, daß der Wachstumsstillstand älterer Kulturen nicht auf einem Aufbrauch der Nährstoffe, sondern auf der Bildung thermolabiler, diffusibler Stoffwechselprodukte beruhte. Solche Hemmungsstoffe wurden in alten Kulturen von Nährgelatine und Nähragar, nicht aber in Bouillon von den Bakterien geliefert. An diese letztere Beobachtung knüpften die Untersuchungen von *Conradi* und *Kurpjuweit* an. Bei der Durchführung ihrer Versuche erwies sich ihnen die Methodik von *Eijkmann* als unzureichend. *Eijkmann* hatte Gelatine-röhrchen mit Zusatz alkalischer Nährbouillon nach vollzogener Beimpfung 2 bis 14 Tage bei 37° stehengelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Röhrchen, in denen sich inzwischen in der bei 37° flüssigen Gelatine üppige Kulturen gebildet hatten, aus dem Brutschrank herausgenommen, bei Zimmertemperatur schräggestellt und auf der schräg erstarrten Oberfläche der Gelatine eine Strichkultur angelegt. Eine Fehlerquelle sahen *Conradi* und *Kurpjuweit* darin, daß bei der ausschließlichen Anwendung von Kolloidkörpern (Agar, Gelatine) die adsorbierten Substanzen ihre Eigenschaften nur unvollkommen zu entfalten vermochten. Auf Grund einer gelegentlichen Beobachtung von *Kurpjuweit* gingen sie dazu über, die *Löfflersche* Nährbouillon als Kulturmedium zu wählen. Auch *Eijkmann* hatte bereits versucht, aus Bouillonkulturen wachstumshemmende Stoffe darzustellen und letztere durch Zentrifugieren von den Bakterienleibern zu trennen. Jedoch blieben seine Bemühungen — wie gesagt — vergeblich. Die Versuchsanordnung von *Conradi* und *Kurpjuweit* war folgende: Eine Anzahl Röhrchen mit 10 ccm Bouillon wurden gleichzeitig in der Weise beimpft, daß von einer 20 Stunden alten Agarkultur der zu prüfenden Bakterienart eine Normalöse in 10 ccm Bouillon gebracht und hieraus nach gehöriger Verteilung wiederum 1 Öse in sämtliche Röhrchen übertragen wurde. Diese Röhrchen wurden dann bei 37° bebrütet und innerhalb bestimmter Zeitabstände herausgenommen und weiterbehandelt. Dabei wurden mittels Meßpipetten fallende Mengen der Bouillon in entsprechende Mengen 2 proz., bei 40° abgekühlten Nähragars übertragen und nach sorgsamer Verteilung der stets auf 10 ccm aufgefüllten Mischung in Petrischalen zu Platten verarbeitet, die im

Dunkeln bis zur Beendigung des letzten Versuches aufbewahrt wurden. Dann fand die gleichzeitige Impfung aller Platten statt, indem von einer frisch bereiteten Bacillenaufschwemmung wiederum eine Normalöse der jeweiligen Bakterienart auf der Oberfläche der Versuchsplatte ausgestrichen wurde. Zur Kontrolle waren gewöhnliche Agarplatten angelegt und beimpft. Die Platten wurden zunächst 48 Stunden bebrütet und ließen dann mit Hilfe der einfachen, evtl. der mikroskopischen Betrachtung der Plattenoberfläche selbst geringe Störungen der normalen Wachstumsvorgänge erkennen. Sämtliche Beobachtungsreihen führten zu dem Resultat, daß in den Bouillonkulturen des *B. coli* während des Wachstums entwicklungshemmende Stoffe auftraten, die nicht nur die eingeimpften Colibacillen, sondern auch andere Coliarten und auch Typhus- und Paratyphusbacillen an ihrer Vermehrung hinderten. Diese „antiseptischen Substanzen“ traten sofort auf, sobald die Lebenstätigkeit der Bakterien einsetzte. Die Wirkung nahm von Stunde zu Stunde an Intensität zu, erreichte nach 24 Stunden ihren Höhepunkt, um mehrere Tage lang auf gleicher Höhe zu verbleiben. Erst nach 6—14 Tagen erfolgte eine allmähliche Abnahme. Die Hemmungswirkung wurde übrigens vermißt, wenn die Autoren einen Teil der wirksamen Bouillonkultur auf die Oberfläche einer Agarplatte brachten, die Flüssigkeit dort verdunsten ließen und danach in der üblichen Weise die Oberfläche der Platte beimpften. Aus menschlichen Ausleerungen gezüchtete Colistämme bildeten in gleicher Weise einen kräftigen Hemmungsstoff. Bei Differenzen in der Wirkungsgröße ließ sich feststellen, daß der wachstumswidrige Einfluß der Kultur von der Wachstumsenergie des Stammes abhing. Die Steigerung des Wachstums zog eine Erhöhung des Stoffwechsels, die Häufung der Stoffwechselprodukte eine Vermehrung der antiseptischen Stoffe nach sich. Die Entwicklung und Hemmung der Bakterien war stetig miteinander verbunden, Wirkung und Gegenwirkung einander gleich.

Abgesehen von den Colibacillen wurde bei weiteren Versuchsreihen das Verhalten von Typhus-, Paratyphus- und Heubacillen, Diphtherie-, *Prodigiosus*-, Ruhr- und Schweinepestbacillen, Staphylokokken, Streptokokken sowie von *Bac. lactis aerogenes* geprüft. In sämtlichen Bouillonkulturen dieser Bakterien wurden die antiseptischen Stoffwechselprodukte mit Sicherheit aufgefunden, jedoch waren sie nicht unerheblichen Schwankungen unterworfen. Dabei zeigte sich, daß die von den Bakterien gebildeten Antiseptica eine für jede Spezies verschiedene Wirkungsgröße aufwiesen, immer machte sich aber eine elektive Wirkung gegenüber denselben oder einer fremden Bakterienart geltend. Durch die Produkte eines bestimmten Colistammes z. B. wurde dieser am stärksten in seiner Entwicklung gehemmt. *Conradi* und *Kurpjuweit* erinnern bei dieser Gelegenheit an die Beobachtung von *Salkowski*, daß bei Enzymen, die die Autolyse der Organzellen bewirken, diese Fermente das Zelleiweiß der sie produzierenden Zellart stärker spalten als fremdartiges Eiweiß.

Zur Bestimmung der äußersten Wirksamkeitsgrenze der Hemmungsstoffe stellten *Conradi* und *Kurpjuweit* hohe Verdünnungen her. Dabei zeigte sich, daß z. B. schon nach 10stündigem Wachstum bei 37° selbst in einer Verdünnung der Bouillon von 1 : 3200 noch Entwicklungshemmung gegenüber Typhus-, Paratyphus- und Colibacillen nachweisbar war. Die Autoren weisen auf den hohen antiseptischen Wert der Bakterienstoffe hin und erinnern daran, daß nach den Versuchen von *R. Koch* die entwicklungshemmende Wirkung der Carbonsäure erst bei einer Verdünnung von 1 : 250 beginnt, während die vollständige Aufhebung des Wachstums erst bei 1 : 850 eintritt. Trotz dieser starken antiseptischen Wirksamkeit der Hemmungsstoffe ließ sich eine sicher keimabtötende Wirkung nicht nachweisen, wie bestimmte Versuchsanordnungen ergaben. Bezüglich der physiologisch-chemischen Eigenschaft dieser Stoffe konnten *Conradi* und *Kurpjuweit* er-

mitteln, daß die wirksamen antiseptischen Substanzen durch Siedehitze zerstört wurden*).

Selbst kurzdauernde Erhitzung auf 60, 70 und 80° zerstörte die Hemmungswirkung der Bouillonkultur, sobald die Erwärmung hinreichte, um die Bakterien abzutöten. Diese in Übereinstimmung mit den Angaben *Eijkmanns* stehenden Befunde ließen die Autoren vermuten, daß die wachstumshemmenden Stoffe der Bakterien der Gruppe der Enzyme nahestehen. Bei Verwendung von 60- und 96proz. Alkohol gelang es ihnen, weder im Niederschlag noch im Filtrat der Bouillonkulturen die Hemmungsstoffe nachzuweisen. Auch nach Filtration der Bouillonkulturen durch bakteriendichte Berkefeldfilter zeigte sich das Filtrat gänzlich unwirksam. Eine Trennung der wirksamen Substanzen, die sie übrigens auch in den menschlichen Entleerungen nachwiesen, ließ sich auch nicht durch Erwärmung oder Antiseptica erzielen, dagegen konnten *Conradi* und *Kurpjuweit* in mehrfach wiederholten Versuchen feststellen, daß eine Trennung der wirksamen Stoffe von den Bakterienleibern mittels Dialyse durch Schilfmembranen möglich ist. Völliges Aufhebung der Wirkung wurde beobachtet, als die Autoren eine wirksame Colibacillenkultur mit gleichen Teilen Dextrin vermischten.

Conradi und *Kurpjuweit* nahmen auf Grund ihrer Versuche an, daß die entwicklungshemmenden Stoffe der Bakterien enzymartige Körper sind, die wahrscheinlich mit den intracellulären Fermenten in naher Beziehung stehen, welche die Selbstzersetzung der Bakterien bedingen. Sie nannten diese neue Gruppe von Protoplasmagiften, deren deletäre Wirkung sich ausschließlich auf den Formenkreis der Mikroorganismen erstreckte, „Autotoxine“.

Da unverkennbar diese Stoffe eine den *d'Herelleschen* Lysinen in vielen Punkten gleichgerichtete Wirkung ausüben (*Conradi* und *Kurpjuweit* beobachteten im übrigen auch schon das Auftreten gegen diese Autotoxine resistenter Keime), so haben wir eine Reihe von Versuchen angestellt, ob sich trotz der Unterschiede (z. B. physikalisch-chemisches Verhalten, Filtrierbarkeit, Dialysierbarkeit) vielleicht eine Identität der wirksamen Stoffe in biologischer Hinsicht nachweisen ließe.

Nachdem *Otto* und *Munter* gezeigt hatten, daß das aus Bakterien allein und das aus Stuhlfiltraten gewonnene Lysin durch ein und dasselbe antilytische Serum neutralisiert werden, lag es nahe zu versuchen, ob auch das *Conradi-Kurpjuweitsche* „Autotoxin“ durch ein solches Antilysin neutralisiert wird.

Bei einer Reihe von Vorversuchen haben wir zunächst feststellen können, (in Übereinstimmung mit den Angaben von *Conradi* und

*) Allerdings trat bei Stuhlaufschwemmungen trotz vorangegangener 1/4-stündiger Erhitzung eine wenn auch schwache Hemmungswirkung gegen Typhus- und Paratyphus-Bacillen ein. Hieraus schlossen *Conradi* und *Kurpjuweit*, daß neben den äußerst wirksamen bakteriellen Hemmungsstoffen sich noch hitzebeständige Stoffe von geringerer Wirksamkeit in den menschlichen Entleerungen vorfinden. *Conradi* und *Kurpjuweit* nehmen an, daß diese letzteren Hemmungskörper aus den Körperzellen (Autolyse der Darmmucosa) entstehen. Da nach den neueren Untersuchungen von *Immendorf* (Mitteilung von Prof. *Miesner*) das Paratyphuslysin auch höhere Temperaturen bis 100° verträgt, so scheint es nicht ausgeschlossen, daß das in den Darmentleerungen gefundene hitzebeständige Lysin vielleicht doch mit dem bakteriellen Autotoxin identisch ist (vgl. S. 407).

Kurpjuweit), daß angegangene Bouillonkulturen mit Gelatine oder Agar vermischt das Wachstum der nach dem Erstarren auf der Oberfläche der Nährböden ausgesäten Bakterienkeime mehr oder weniger verhinderten. Das gleiche war der Fall, wenn wir der flüssiggemachten Gelatine bzw. dem flüssiggemachten und auf etwa 45° abgekühlten Agar bakteriophages Lysin zusetzten [vgl. auch Methode von Fürth; Bail⁴⁾]. Bei diesen Versuchen konnten wir noch folgende Feststellungen machen:

1. Durch Mischen von Lysin und Agar ließ sich an der Wirkung auf die Oberflächenkulturen die Wirksamkeit des dem Nährboden zugesetzten bakteriophagen Lysins nicht nur qualitativ nachweisen, sondern auch exakt quantitativ, wie bei der Auftropfmethode, auswerten.

2. Das dem Nährboden zugesetzte Lysin beeinflusste das Oberflächenwachstum der Bakterien zwar qualitativ und quantitativ, dagegen fand in der Gelatine und dem Agar selbst ein dichtes, im Vergleich zu Kontrollen anscheinend ungestörtes Bakterienwachstum statt. Über diese Tatsache haben inzwischen bereits Bail sowie Doerr und ihre Mitarbeiter ausführlich berichtet. Wir werden auf diese Fragen später zurückkommen, möchten aber hier bereits auf die Ansicht Doerrs hinweisen, nach der die Wirkung der Gelatine dadurch zu erklären ist, daß sie entweder die Folgen der Membranschädigung der Bakterien durch das bakteriophage Lysin verhindert oder aber ein kolloidales Gegengewicht auf einer Membranseite schafft und dadurch den Austritt von Stoffen aus dem Zellinneren bremst.

3. Aus unseren Versuchen ergab sich, daß das Antilysin*), in Agar mit Lysin gemischt, die Wirkung des Lysins neutralisierte (Oberflächenkultur).

4. Dagegen wurde die von den Bakterien ausgehende, ungleich schwächere „autotoxische“ Wirkung durch das Antilysin kaum beeinflusst. Allerdings gelang es uns nicht regelmäßig, dieses Versagen des Antilysin zu demonstrieren, da die meist schwache Wirkung des „Autotoxins“ störend in Erscheinung trat.

Wir verzichten darauf, alle hierhergehörigen Versuchsprotokolle wiederzugeben und lassen hier nur eins folgen, aus dem das Versagen des Antilysinzusatzes auf das „Autotoxin“ von Conradi und Kurpjuweit, dagegen seine prompte Wirkung auf das bakteriophage Lysin deutlich hervorgeht.

Die Versuche wurden im allgemeinen in der Weise angestellt, daß bestimmte Mengen (verschiedene Dosen) einer 48stündigen Bouillonkultur dem verflüssigten Agar zugesetzt und der Agar sodann zu Platten ausgegossen wurde. Gleich nach dem Erstarren erfolgte die Beimpfung der Agaroberfläche mit einem Tropfen einer Bacillenemulsion (1 Öse 24stündiger Agarkultur in 2 ccm Bouillon). Darauf Bebrütung bei 37° C; Ablesung der Resultate nach 24 Stunden.

*) Zur Anwendung gelangten von Kaninchen gewonnene Sera. Sie neutralisierten im Mischungsversuch Lysinverdünnungen 1 : 1000 prompt.

Wie erwähnt, konnten wir die Befunde von *Eijkmann* sowie von *Conradi* und *Kurpjuweit* bestätigen. Auf einem mit Colibacillen versetzten Agar*) z. B. wuchsen nicht nur Kulturen des eigenen Stammes schlecht oder fast gar nicht, sondern auch andere Colistämme zeigten schlechtes Wachstum, ebenso Ruhrbacillen (Typhusbacillen sind nicht geprüft worden); dagegen war das Gedeihen von Proteusbacillen auf der Oberfläche solchen Agars nur gering gestört. Die „bakteriophagen Lysine“ zeigten die oben erwähnten charakteristischen Wirkungen.

Protokoll 1. Versuch vom 2. XI. 1922.

1. $\frac{1}{2}$ Öse Y-Bacillen (in 1,0 ccm Bouillon) wird mit 9 ccm verflüssigtem, bei 45° C gehaltenem Agar gemischt und die Mischung zu Platten ausgegossen;
2. Aussaat wie bei 1, doch ist dem Agar gleichzeitig mit den Bakterien 1,5 ccm Antilysin K zugesetzt;
3. 1 ccm bakteriophages Lysin wird mit 9,0 ccm verflüssigtem (siehe oben) Agar gemischt und dann das Gemisch zu Platten ausgegossen;
4. Plattenguß wie bei 3, doch ist dem Agar gleichzeitig 1,5 ccm Antilysin zugesetzt;
5. Platte mit demselben Agar wie bei 1—4 gegossen; statt 1 ccm Bakterienaufschwemmung bzw. Lysin wurde 1 ccm gew. Bouillon zu 9 ccm Agar vor dem Ausgießen zugesetzt.

Nach dem Erstarren werden alle Platten mit 1 Tropfen Y-Bacillen-Ausschwemmung (1 Öse in 2 ccm Bouillon) beimpft.

Befund am 3. XI. 1922: Agar der Platten 1—4 durch eingesäte Bakterien getrübt.

Platte 1: auf der Oberfläche des Agars kein makroskopisch deutlicher Bakterienrasen, mikroskopisch zahlreiche Kolonien;

Platte 2: schwacher Rasen, makroskopisch schlecht erkenntlich, mikroskopisch wie bei 1;

Platte 3: große sterile Stelle auf der Platte;

Platte 4: guter Bakterienrasen;

Platte 5: guter Bakterienrasen.

Ergebnis: Wirkung des Antilylins auf das bakteriophage Lysin deutlich, auf das „Autotoxin“ kaum erkenntlich (beurteilt nach dem Wachstum der Oberflächenkulturen).

Mehrere in ähnlicher Weise angestellte Versuche ergaben ein ähnliches Resultat. Man hatte öfters den Eindruck, daß die Wirkung des „Autotoxins“ in gewissem Grade durch das Antilysin abgeschwächt wurde, aber *niemals war dessen Einwirkung ebenso deutlich wie auf das Lysin*.

Unsere Versuche ergaben also, daß sich eine deutliche Beeinflussung der wachstumshemmenden Stoffe (Autotoxine) nicht sicher demonstrieren ließ, damit konnte also auch nicht der erstrebte Beweis für die Identität des Autotoxins und des bakteriophagen Lysins erbracht werden. Für das Gegenteil, die Differenz beider Agenzien, lassen sich aus dem negativen Ergebnis unserer Versuche natürlich ebensowenig Schlüsse ziehen. Es ist sehr wohl möglich, daß im Agar von den Bakterien zwar ähnliche, aber in der Auswirkung abweichende Körper gebildet werden. Es kann auch sein, daß unsere Antisera auf die (sozusagen) in statu

*) Wurde die Oberfläche nicht besät, so wuchsen in der Regel auf der Oberfläche des Agars zarte Einzelkolonien.

nascendi befindlichen Agentien bei der *Conradi-Kurpjuweitschen* Versuchsanordnung nicht genügend wirksam waren.

In einer inzwischen erschienenen Arbeit kommt *Hajós*⁵⁾ zu der Ansicht, daß die wachstumshemmende Wirkung der Bouillonkulturen *nicht* mit dem *d'Herelleschen* Lysin identisch ist. Einmal zeigte die „erschöpfte“ (d. h. nach mehrfacher Beimpfung für die Kultur der betreffenden Bakterienart unbrauchbar gewordene) Bouillon nach der von *d'Herelle* angegebenen Technik keine bakteriophagen Eigenschaften, und zweitens wurde die hemmende Wirkung der „erschöpften“ Bouillon durch Erhitzen auf 100° nicht wesentlich beeinflußt. Hierzu möchten wir bemerken, daß in einer solchen Bouillon ein deutlich wirksames Lysin auch nicht zu erwarten ist. Bei unseren Versuchen, das Lysin aus Kulturen allein zu gewinnen, erhielten die erlangten Filtrate regelmäßig anfangs nur sehr schwach wirksame Lysine, die also der Beobachtung leicht entgehen können. Deutliche bakteriophage Wirkung erlangten die Filtrate meist erst nach mehreren „Passagen“. Was die Thermostabilität der hemmenden Stoffe anbetrifft, so hat neuerdings *Immen-dorf*⁶⁾ gezeigt, daß Paratyphuslysine selbst die Erhitzung auf Temperaturen von 100° vertragen. Bei seinen Versuchen handelte es sich um Lysine, die aus paratyphuskranken Schweinen gewonnen waren.

Uns selbst ergaben übrigens (im Gegensatz zu den Befunden von *Hajós*) eigne Versuche mit der Versuchsanordnung von *Conradi* und *Kurpjuweit*, daß die erhitzten Bouillonkulturen stets deutlich herabgesetzte oder gar keine das Bakterienwachstum schädigenden Wirkungen hatte. Nach unserer Ansicht würde auch eine Verschiedenheit in der Hitzewiderstandsfähigkeit nicht so ohne weiteres auf eine Verschiedenheit der Autotoxine und der bakteriophagen Lysine schließen lassen. Auf eine solche hin hat ja auch *d'Herelle* die Nichtidentität des *Twortschen* und bakteriophagen Lysins beweisen wollen, während die Ansicht vieler Autoren doch dahin geht, daß an der Identität beider Phänomene nicht zu zweifeln ist. Hierfür sprechen neuere Befunde von *Gratia* und *de Namur*⁷⁾, die aus Pockenvaccinen bakteriophages Lysin gewinnen konnten. Bei allen 3 Phänomenen, dem von *Eijkmann*, dem *Twortschen* und dem *d'Herelleschen*, kann es sich um Erscheinungen desselben Agens handeln, die nur unter den verschiedenen Versuchsbedingungen andersartig verlaufen. Unsere jetzigen Befunde sprechen allerdings mehr gegen eine Identität des erstgenannten mit den anderen Phänomenen.

Was nun die oben erwähnten *Störungen der bakteriophagen Wirkung in Gelatine* betrifft, so hat wohl zuerst *Bail*⁸⁾ darauf hingewiesen, daß das Wachsenlassen der Bakterien in Gelatine mit dem zugehörigen Bakteriophagen merkwürdig ungünstige Ergebnisse gibt. Auch in Agar wurde die bakteriophage Wirkung behindert. Allerdings ist die Bakteriophagenwirkung nicht immer aufgehoben, denn *Bail*⁹⁾ selbst hat ein Verfahren angegeben, bei dem sich in dem Agar die bakteriophage Wirkung zeigen läßt. (Die zu untersuchende Flüssigkeit wird mit Fleischbrühe verdünnt und mit so viel Bakterienaufschwemmung versetzt, daß eine eben deutliche Trübung auftritt. Man setzt dann so viel verflüssigten Agar von 48° hinzu, daß eine unmittelbar darauf zu gießende Platte eben fest wird. In dem feuchten, weichen Agar entwickeln sich dann, wie wir in Übereinstimmung mit *Bail* bestätigen können, *Taches vièrges*. Daß diese nicht mit den oberflächlich wachsenden Bakterienkeimen in Zusammenhang stehen, konnten wir daraus schließen, daß sie sich

weder mit einem Spatel noch durch Abschwemmen mit Flüssigkeit zerstören lassen.)

*Doerr*¹⁰⁾ hat dann den Nachweis erbracht, daß die Gelatine als solche die charakteristische Wirkungsäußerung des „Bakteriophagen“ verhindert. Er und seine Mitarbeiter^{10a)} haben sich dieses Mittels bedient, um genaue Untersuchungen über das Wachstum von Bakterien in Gegenwart von Bakteriophagen und die Lysinbildung durch Bakterien zu studieren. Diese Befunde *Doerr*s haben uns veranlaßt, uns erneut mit diesem Studium zu beschäftigen, zumal seine ersten Versuche nur mit einem Colistamm und -Lysin ausgeführt waren.

Auf Grund des Verhältnisses der Keimzahl zur Lysinkonzentration bei der Lysinbildung in Bouillonkulturen waren wir anfangs zu der Ansicht gelangt, daß die Lysinbildung eine ausschließliche Folge des Bakterienzerfalles sei. Wir lassen hier zwei derartige Versuche in kurvenmäßiger Darstellung folgen:

Protokoll 2. I. 100 cem Bouillon werden mit $\frac{1}{100}$ Öse Y-Bacillen und 1 Tropfen Y-Lysin gut vermischt und bei 37° gehalten.

II. Als Kontrolle dienen 100 cem Bouillon, die mit $\frac{1}{100}$ Öse Y-Bacillen (ohne Lysinzusatz) beimpft sind. In bestimmten Zeitabständen wird der Titer des Lysins und die Zahl der Keime bestimmt. Ergebnis siehe Kurven.

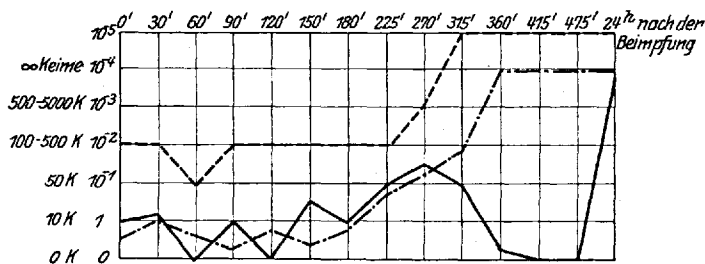


Abb. 1.

---: Titer des Lysins. } Kölbechen I.
 —: Zahl der Keime in der Lysinbouillon.
: Zahl der Keime in der Kontrollbouillon. Kölbechen II.

Protokoll 3. Versuch vom 25. V. 1923.

100 cem Bouillon werden mit $\frac{1}{200}$ Öse Coli M. und 1 Tropfen Lysin „K. M.“ gut vermischt und bei 40° im Wasserbad gehalten. Titration wie oben.

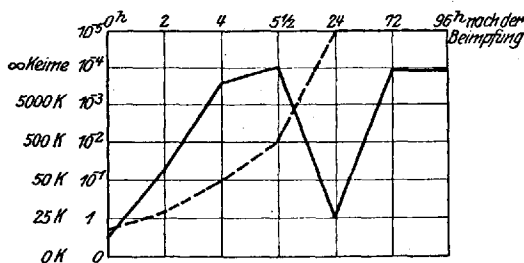


Abb. 2.

---: Titer des Lysins. —: Zahl der Keime in der Lysinbouillon.

Aus diesen Versuchen ist klar ersichtlich, daß die *Haupt-Lysinsteigerung in der Lysinbouillon in dem Moment einsetzt, wo eine deutliche Abnahme der Bakterienkeime nachweisbar war*. Ganz anders verliefen nun, wie wir in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen von Doerr und seinen Mitarbeitern bestätigen können, die Kurven des Lysintiters und der Keimzahl, sobald man die *Züchtung in geeigneter Gelatine-Bouillonlösung* vornimmt. Wir haben dies an verschiedenen Lysinen (bei Ruhr-, Typhus- und Colikulturen) nachgeprüft und im allgemeinen stets ein Ansteigen des Lysins feststellen können, ohne daß eine Abnahme der Keimzahl vor dem Erreichen des Höchsttiters eintrat. Wir lassen wieder zwei Versuche folgen, welche beide mit demselben Lysin und derselben Kultur unternommen wurden wie Versuch 3.

Protokoll 4. Versuch vom 13. III. 1923.

I. 100 ccm 18proz. Gelatine-Bouillon werden mit $\frac{1}{100}$ Öse Coli M. und 1 Tropfen Lysin „K. M.“ gut vermischt und bei 40° im Wasserbad gehalten.

II. Als Kontrolle dienen 100 ccm 18proz. Gelatine-Bouillon mit $\frac{1}{100}$ Öse Coli M. (ohne Lysin). Ergebnis siehe Kurve.

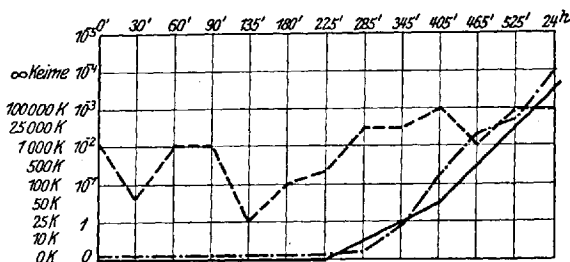


Abb. 3.

-----: Titer des Lysins. —————: Zahl der Keime in der Lysin-Gelatinebouillon. } Kölbchen I.
: Zahl der Keime in der Kontroll-Gelatinebouillon. Kölbchen II.

Protokoll 5. Versuch vom 25. V. 1923.

100 ccm 10proz. Gelatine-Bouillon werden mit $\frac{1}{200}$ Öse Coli M. und 1 Tropfen Lysin „K. M.“ gut gemischt und bei 40° im Wasserbad gehalten.

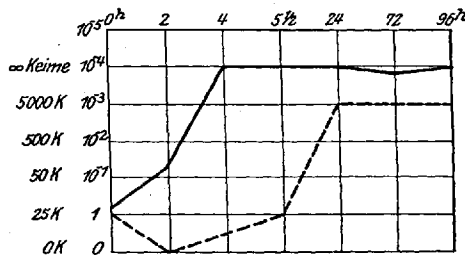


Abb. 4.

-----: Titer des Lysins. —————: Zahl der Keime in der Lysin-Gelatinebouillon.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse darf man wohl annehmen, daß in der Tat die Lysinbildung mit der Auflösung der Bakterien kaum

zusammenhängt, vielmehr eine Erscheinung der geschädigten Bakterienzelle ist. Der terminale völlige Zerfall der Keime dürfte als Folge stärkster Schädigung anzusehen sein.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir übrigens bemerken, daß wir unter „Zerfall“ nicht die völlige „Auflösung“ der Bakterienzelle, sondern auch die „Abspaltung“ bestimmter Receptoren gelten lassen, wie dies auch *Jakobsthal*¹¹⁾ tat [vgl. *R. Otto*¹²⁾]. Wir wollten damit nur sagen, daß das Lysin aus Bakteriensubstanz besteht.

Außer der oben erwähnten Tatsache, daß in den Bouillonkulturen dem Maximum der Lysinwirkung ein Heruntergehen der Bakterienzahl vorauszugehen pflegt, sprach nach unserer Anschauung noch eine Reihe anderer Momente gegen ein von den Bakterien produziertes „Autotoxin“ und mehr für ein aus Bakterieneiweiß bestehendes Lysin. Es waren dies zunächst die Versuchsergebnisse von *Ehrenberg*¹³⁾ bei Eiweißenzymen, welche uns die Abstammung des Lysins aus dem Bakteriensubstrat durch Analogieschluß zu rechtfertigen schienen*). Ferner bestimmten uns das eigentümliche Verhalten des antilytischen Serums (Amboceptorwirkung und die von *d'Herelle* mitgeteilte Steigerung der Empfänglichkeit des Individuums gegen bakterielle Infektionen und gegen Toxinwirkung nach Serumapplikationen) sowie die auch von *d'Herelle* beobachtete gesteigerte Empfänglichkeit der Versuchstiere nach wiederholten Injektionen des „Bakteriophagen“ und schließlich die von ihm beschriebenen eigenartigen Verhältnisse beim Eintritt der Immunität nach Vorbehandlung von Rindern mit großen und kleinen Dosen des Barbone-Bakteriophagen (die stark an bekannte Tatsachen aus der Anaphylaxielehre erinnerten) dazu, das bakteriophage Lysin aus zerfallenen Bakterieneiweißteilchen bestehen zu lassen. Allerdings zeigten uns zu diesem Zweck angestellte Versuche, daß sich eine Lysinanaphylaxie durch Vorbehandlung mit „Bakteriophagen“ nicht erzielen läßt, wie dies folgender Versuch lehrt.

Eine Anzahl Meerschweinchen wurde mit 1 cem 1 : 100 verdünnter bakteriophagenhaltiger Bouillon subcutan präpariert und nach 3 Wochen mit je 1 cem des gleichen Lysins (unverdünnt) intravenös reinjiziert. *Keins der Tiere zeigte anaphylaktische Erscheinungen* (ebensowenig einige zur Kontrolle mit $\frac{1}{100}$ cem Bouillonkultur subcutan vorbehandelte Meerschweinchen).

Schließlich schien sich das Auftreten von Taches viérges besser mit einer hochmolekularen Bakterieneiweiß- als mit einer Toxinlösung in Zusammenhang bringen zu lassen.

Gegen die Anschauung, daß die Lysinbildung eine Funktion der lebenden Bakterienzelle ist, würde es sprechen, wenn, wie einige Autoren es angegeben haben, man Lysin auch aus abgetöteten Keimen gewinnen könnte. So hat *Joetten*¹⁴⁾ berichtet, daß ihm die Fortführung des Lysins in 2 Fällen auch mit Kulturen gelungen sei, die durch Erhitzung auf 56° abgetötet waren. Voraussetzung sei nur, daß die abgetöteten Bakterien in genügender Menge zugesetzt und nicht durch zu hohe Wärmegrade geschädigt seien. Er bezieht sich dabei auf die Beobachtung von *M. Wollmann*¹⁵⁾, die gefunden habe, daß diffusible

*) Ließ *Ehrenberg* 5 proz. Trypsinlösung auf bestimmte Eiweißarten (Fibrin, Casein und Ricin) einwirken, so verdaute später das Fibrin-Trypsingemisch besser Fibrin, als die anderen Gemische dies taten; entsprechend verhielt sich das Casein-Trypsingemisch usw. — Saugte *Ehrenberg* Caseinphosphatlösung durch ein Membranfilter, das Casein nicht durchließ, so zeigte das Filtrat in vitro Fermentwirkung gegenüber dem Casein.

Bakterienstoffe für die Passage bzw. für die Vermehrung des Lysins ausreichend sind. *Paolucci*¹⁶⁾ will ebenfalls unter bestimmten Versuchsbedingungen die Bildung unspezifischer bacteriolytischer Substanzen in vivo und in vitro beobachtet haben. Auch berichten neuerdings *Kabelik*, *Tomášek* und *Bouček*¹⁷⁾, daß man mit hochwirksamen Lysinen auch Bakterienauflösung in einer Kochsalzlösung ohne Nährstoffzugabe erzielen könne und daß sogar die Bakterienauflösung in 10proz. Kochsalzlösung stattfindet; ebenso will *Davison*¹⁸⁾ bei richtiger H-Ionenkonzentration Bakterienauflösung in 0,8proz. Kochsalzlösung beobachtet haben. Auf Grund dieser Angaben haben wir nochmals einige Versuche speziell nach der Richtung hin angestellt, ob in der Tat auch mit abgetöteten Kulturen eine Vermehrung des Lysins eintritt.

Das folgende Versuchsprotokoll zeigt zunächst einen Versuch, bei dem von uns in der üblichen Weise 1. lebende und 2. abgetötete Kulturen zusammen mit kleinen Mengen Lysin bebrütet wurden, in einer Gesamtmenge von 10 ccm Bouillon.

Protokoll 6. Versuch vom 24. V. 1923.

Die Bakterien wurden in der Weise abgetötet, daß eine 24 Stunden alte Bouillonkultur $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad bei 58° gehalten wurde; dann wurde die Sterilität auf der Platte und in der Bouillon geprüft.

Nach Ansetzen der Gemische in einem Wasserbad von 40° wird in bestimmten Zeitintervallen der Titer des Lysins festgestellt. Die verschiedenen Gemische sind mit *L*, *T* und *K* bezeichnet. Es bedeutet:

L = 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen 24 Stunden alter lebender Bouillonkultur *Coli M.* + 1 Tropfen Lysin *M.*

T = 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen 24 Stunden alter abgetöteter Kultur *Coli M.* + 1 Tropfen Lysin *M.*

K = 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen Lysin *M.*

		Titer des Lysins					
		unverd.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
sofort	L.	+ ₄	0	0	0	0	0
	T.	±/+	0	0	0	0	0
	K.	±/+	0	0	0	0	0
1½ Std. + 40°	L.	+ ₁	±	0	0	0	0
	T.	0?	0	0	0	0	0
	K.	0?	0	0	0	0	0
2¾ Std. + 40°	L.	+ ₄	+ ₄	+ ₁	0	0	0
	T.	0?	0	0	0	0	0
	K.	0?	0	0	0	0	0
4 Std. + 40°	L.	+ ₄	+ ³ / ₄	+ ₁	+ ₁	0	0
	T.	+ ₁	0	0	0	0	0
	K.	±	0	0	0	0	0
24 Std. + 40°	L.	+ ₄	+ ₄	+ ₄	+ ⁴ / ₃	±	0
	T.	+ ₁	0	0	0	0	0
	K.	+ ₁	0	0	0	0	0

Wie aus dem obigen Versuch hervorgeht, *steigt der Lysintiter bei lebenden Bakterien innerhalb 24 Stunden von 10^{-1} auf 10^{-4}* , dagegen ergab die Bebrütung mit abgetöteten Kulturen ebenso wie die Kontrolle ohne Kulturen keinen Anstieg des Titors. Ein weiterer Versuch wurde dann auf die Angaben von Joetten hin mit großen Dosen vorsichtig abgetöteter Kulturen angesetzt.

Protokoll 7. Versuch vom 10. VI. 1923.

Eine mit Coli T. beimpfte Kolle-Schale wird 48 Stunden bebrütet und dann mit 10 ccm phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Abschwemmung wird 1 Stunde bei 60° im Wasserbad gehalten. Die Bouillonkontrolle ergibt, daß noch nicht alle Keime abgetötet sind. Erneute Erhitzung für 1 Stunde bei 60°. Die nunmehr angestellte Bouillonkontrolle ergibt kein Bakterienwachstum mehr. Drei Reagenströhrchen werden nun in folgender Weise beschickt. Es erhält:

R. 1: 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen Lysin T. + $\frac{1}{10}$ Öse lebende Colibacillen.

R. 2: 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen Lysin T. + 1 ccm der abgetöteten Colibacillen.

R. 3: 10 ccm Bouillon + 1 Tropfen Lysin T.

Sofort, nach 24 und nach 48 Stunden wird der Lysintiter in den 3 Röhren, die bei 37° gehalten werden, bestimmt.

	sofort	24 Std.	48 Std.
R 1. (lebende Bakt.)	10^{-4}	10^{-6}	10^{-6}
R 2. (abget. Bakt.)	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
R 3. (Kontrolle)	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}

Ergebnis: Auch bei der Bebrütung mit großen Dosen vorsichtig abgetöteter Bakterien ließ sich eine Vermehrung des Lysins nicht erzielen.

Nach unseren Versuchsergebnissen müssen wir also in Übereinstimmung mit den Angaben von d'Herelle, Bordet, Otto und Munter, Bail, Doerr usw. annehmen, daß zur Lysinbildung die Anwesenheit lebender Keime notwendig ist.

Den folgenden Versuchen, bei dem anscheinend mit toten Kulturen Lysinbildung erzielt wurde, wollen wir als Beispiel dafür anführen, wie leicht man beim Arbeiten mit dem Lysin Fehlschlüssen ausgesetzt ist. Wir benutzten ein Lysin „Lanz“, um damit in der üblichen Weise lebende und tote Kulturen auf Lysinbildung zu prüfen. Zu 10 ccm Bouillon wurde in Reihe L (siehe Protokoll 8) ein Tropfen Colikultur (1 Öse auf 1 ccm) plus 1 Tropfen Lysin, in Reihe T 1 Tropfen abgetöteter Kultur plus Lysin und in Reihe K 1 Tropfen Lysin allein getan. Die Gemische blieben bei 40° im Wasserbade; sofort, nach 1 Stunde, nach 2, nach 3, 4 und 24 Stunden wurden Proben entnommen und der Titer des Lysins festgestellt. Nach 24 Stunden ergab nun unerwarteterweise sowohl das mit lebenden als auch das mit toten Bakterien bebrütete Lysin eine erhebliche Titersteigerung auf 10^{-6} bzw. 10^{-5} . Anscheinend war also auch mit toten Kulturen Lysin gewonnen worden. Daß diese Kulturen wirklich abgetötet waren, war

durch Kulturversuch festgestellt worden. Die Erklärung für diesen merkwürdigen Befund ergab die dritte Versuchsreihe. Es hatte sich nämlich auch in der Reihe „Lysin allein“ der Titer von 1^1 auf 10^{-6} gesteigert. Die erneute Prüfung des Lysins ergab, daß das völlig klare, durch Bakterienfilter geschickte und dann in zugeschmolzenen Röhrchen $\frac{1}{2}$ Stunde auf 58° erhitzte Lysin noch Colikeime enthielt. Die Steigerung des Lysins in der zweiten Reihe war also nicht durch den anwesenden abgetöteten Colistamm, sondern durch die im Lysin selbst restierenden lebenden Keime hervorgerufen worden.

Protokoll 8. Versuch vom 17. V. 1923.

		Austitrierung auf Lysinwirkung.							
		unverd.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
sofort	L.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
	T.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
	K.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
1 Std. + 40°	L.	$+4$	$+2$	0	0	0	0	0	0
	T.	$+4$	$+3/4$	0	0	0	0	0	0
	K.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
2 Std. + 40°	L.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
	T.	$\pm_{(30)}$	0	0	0	0	0	0	0
	K.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
3 Std. + 40°	L.	$+4$	$+2$	0	0	0	0	0	0
	T.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
	K.	$\pm_{(20)}$	0	0	0	0	0	0	0
4 Std. + 40°	L.	$+1$	0	0	0	0	0	0	0
	T.	$+4$	0	0	0	0	0	0	0
	K.	$+4$	$+4$	0	0	0	0	0	0
24 Std. + 40°	L.	$+4$	$+4$	$+4$	$+4$	$+4$	$+1$	$\pm_{(10)}$	0
	T.	$+4$	$+4$	$+4/3$	$+4/3$	$\pm_{(20)}$	$\pm_{(5)}$	0	0
	K.	$+4$	$+4$	$+4$	$+4$	$\pm_{(4)}$	$\pm_{(20)}$	$\pm_{(1)}$	0

Ergebnis: Titeranstieg nach 24 Stunden auch in Reihe T u. K (siehe oben Text).

Auf die Fehlerquelle, welche durch restierende lebende Keime bzw. durch mangelnde Keimfreiheit des zu untersuchenden Filtrates bedingt sind, haben wir bereits an anderer Stelle¹⁹⁾ hingewiesen. Wir haben dort ausgeführt, daß bei solchen Störungen weniger Verunreinigungen durch sekundäre Keime in Frage kommen als vielmehr das Zurückbleiben von primären, homologen Keimen. Der Nachweis, daß ein bakteriophages Filtrat steril ist, ist durch einfache Aussaat auf Platten oftmals nicht zu erbringen; denn das Lysin in diesen „Mischkulturen“ (d'Herelle) kann das Anwachsen der Keime verhindern. Auch Verdünnungen mit Bouillon und nachfolgender Bebrütung können aus dem gleichen Grunde im Stiche lassen, wenigstens bei zu kurzer Beobachtungszeit.

Um uns vor derartigen Störungen zu sichern, verfahren wir in der Weise, daß wir außer der *bakteriologischen Prüfung auf Keimfreiheit* noch einen Tropfen des in Frage kommenden Lysins in etwa 50 cm sterile Bouillon bringen und den Titer dieser Verdünnung genau bestimmen. Sodann wird diese Bouillon 24—48 Stunden bei 37° aufbewahrt und nochmals die bakteriophage Wirkung ausgetitert. War das zu untersuchende Filtrat bakterienfrei, so darf keine Titersteigerung eintreten, da sich das Lysin nur bei Gegenwart von lebensfähigen Bakterien vermehren kann. Selbst bei klarbleibender Bouillonkultur weist das Anwachsen des Titers darauf hin, daß noch lebende Keime in dem Lysin vorhanden sind.

Zum Schluß möchten wir noch kurz auf das *Auftreten von taches vièrges* in Stuhlausstrichen hinweisen. Bereits in einer früheren Arbeit [vgl. Otto, Munter und Winkler²⁰)] hatten wir festgestellt, daß einzelne Bakterienkulturen aus unbekannter Ursache spontan resistent gegen das Lysin werden können. Auch hatten wir Protokolle angeführt, aus denen hervorging, daß umgekehrt Bakterienkulturen spontan Lysin bilden. Bezüglich der Bedeutung dieser beiden Momente möchten wir darauf hinweisen, daß sie eine der wichtigsten Fehlerquellen bei der Gewinnung und Prüfung eines Filtrates auf bakteriophages Lysin bedeuten. Durch die Benutzung derartiger ungeeigneter Kulturen können sicher die widersprechendsten Resultate verursacht werden (vgl. Otto und Munter, Handbuch der mikrobiologischen Technik). Wir haben daher dem spontanen Auftreten von lysogenen Keimen stets Beachtung geschenkt und erneut mehrfach solche Kulturen auffinden können. Im besonderen haben wir auch bei der Aussaat von Stuhlausstrichen auf das Auftreten von „taches vièrges“ geachtet und dabei in der Tat in den Plattenausstrichen von Stuhlproben, die zur Untersuchung gingen, solche „taches vièrges“ aufgefunden. Es gelang uns durch Weiterzüchtung vom Rande der „taches“ hochwirksame Colilysine zu erhalten, ein Befund, der uns deshalb von Interesse war, weil es uns früher, bei unseren ersten Versuchen mit Laboratoriumskulturen anfangs gar nicht, später erst nach längerem Bemühen gelungen ist, wirksame Colilysine aus solchen Kulturen zu erzielen. Wenn es dagegen für Bordet und Ciuca mit ihrer Versuchsanordnung (Meerschweinchenversuch) verhältnismäßig leicht war, ein Colilysin zu gewinnen, so legt dieser Befund die Vermutung nahe, daß der benutzte Colistamm von vornherein wohl leicht beeinflussbar war.

Zusammenfassung.

1. Die bei der Versuchsanordnung von Conradi und Kurpjuweit auftretenden, das Bakterienwachstum hemmenden Stoffe („Autotoxine“), welche weder in abgetöteten Bouillonkulturen noch in Filtraten

nachweisbar waren, wurden in ihrer Wirkung durch ein mit einem bakteriophagen Lysin gewonnenes Antilysin nicht wesentlich beeinflusst.

2. Die Wirkung des dem Agar zugesetzten Lysins auf Bakterien, die einerseits *in* den Agar mit eingesät und andererseits *auf* seiner Oberfläche ausgespatelt wurden, ist verschieden: erstere werden in ihrem Wachstum (im Vergleich zu Kontrollen) kaum geschädigt, auf letztere wirkt das Lysin, wie beim Auftropfverfahren, ein.

3. Bei der Lysinbildung *in Gelatine* von bestimmter Konzentration geht entsprechend den Befunden von *Doerr* und seinen Mitarbeitern dem Lysinanstieg kein nachweisbarer Abfall der Bakterienzahl voraus.

4. Aus *toten* Bakterien gelang uns auch bei neueren Versuchen die Gewinnung eines Lysins nicht; die Anwesenheit lebender Keime ist erforderlich.

5. Eine wichtige Fehlerquelle bei Lysinversuchen bedeuten keimhaltige Lysine.

6. Zur Prüfung der Keimfreiheit lysinhaltiger Bouillon wird als beste Methode die Kontrolle des Titers vor und nach voraufgehender Verdünnung und Bebrütung angegeben.

7. Mitteilung über das Vorkommen von „taches vièrges“ in Colikulturen bei Stuhlausstrichen auf Agarplatten.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Otto und Munter*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 52. — ²⁾ *Eijkmann*, Zentralbl. f. Bakteriolog., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **37**, 436; **41**, 367; Berl. klin. Wochenschr. 1906, S. 499 und Dtsch. med. Wochenschr. 1907, S. 265. — ³⁾ *Conradi und Kurpjuweit*, Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 1761, 2164 u. 2228. — ⁴⁾ *Bail*, Wien. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 20, 37, 46; 1922, Nr. 8, 16. — ⁵⁾ *Hajós*, Zentralbl. f. Bakteriolog., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **88**, 583. 1922; Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 20. — ⁶⁾ Nach Mitteilung von Prof. *Mießner*, Hannover (Versuche bisher nicht veröffentlicht). — ⁷⁾ *Gratia und de Namur*, Cpt. rend. des séances de la soc. de Biol. **87**, 364. 1922. — ⁸⁾ *Bail*, Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 35. — ⁹⁾ *Bail*, Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 8. — ¹⁰⁾ *Doerr*, Kin. Wochenschr. 1922, Nr. 30 u. 31. — ^{10a)} *Doerr und Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 422. — ¹¹⁾ *Jacobsthal*, Zentralbl. f. Bakteriolog., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, **89**, Beiheft. — ¹²⁾ *Otto, R.*, Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung 1923. — ¹³⁾ *Ehrenberg*, Naturwissenschaften 1922, S. 20; Biochem. Zeitschr. **128**, 431. — ¹⁴⁾ *Joetten*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 44. — ¹⁵⁾ *Wollmann* siehe *Joetten*. — ¹⁶⁾ *Paolucci*, Rif. med. Jahrg. 36, Nr. 30, S. 662, 1920. — ¹⁷⁾ *Kabélik, Tomášek und Bouček*, ref. Zentralbl. f. Bakteriolog., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Ref. **74**, Nr. 13/14. 1922. — ¹⁸⁾ *Davison*, Brit. journ. of childr. dis. 1922, Nr. 23, S. 531 und Journ. of pathol. a. bacteriol. 1922, S. 475, 491. — ¹⁹⁾ *Otto und Munter*, Handbuch Kraus-Uhlenhut, **2**. — ²⁰⁾ *Otto, Munter und Winkler*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 118.