

Acta Medica Okayama

Volume 8, Issue 3

1952

Article 3

MAY 1953

Ein Neues Verfahren zur Messung der Bakteriziden Fähigkeit des Vollblutes

Dennosuke Jinnai*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Ein Neues Verfahren zur Messung der Bakteriziden Fähigkeit des Vollblutes*

Dennosuke Jinnai

Abstract

Das oben erwähnte Verfahren hat vor den anderen Methoden besonders die Vorzüge, 1) daß man dadurch zu einem sicheren Resultat gelangen und gleichzeitig auch jedes Datum mit exakten Ziffern zum Ausdruck bringen kann, 2) daß bei diesem Verfahren keineswegs erforderlich ist, eine bestimmte Anzahl von Keimen einschließende Bakterienaufschwemmung herzustellen und auch Kontrollversuch anzustellen, 3) daß es von den Fehlern des Mischverhältnies zwischen der Bakterienlösung und dem Blut nicht so erheblich beeinflußt wird, und 4) daß man durch dieses Verfahren gleichzeitig mehrere bakterientotende Faktoren untersuchen kann. Ferner hat dieses Verfahren auch den Vorzug, daß es praktisch sehr einfach auszuführen ist und nur 6 Stunden nach der Blutentnahme bereits das Ergebnis liefert. Es gestattet ferner, die bakterizide Kraft des Blutes gleichzeitig bei 6 - 8 Menschen zu untersuchen, was mich zur Überzeugung fuhr, daß es in der Klinik hochgeschätzt werden wird. Auch das Verfahren und die ebenfalls vom mir aufgestellte Formel zur zusammenfassenden Beurteilung kann man nach meinem Erachten durch entsprechende Veränderungen einiger Faktoren ohne jede Schwierigkeiten auch für andere Bakterienarten anwenden. Man wird wohl gegen eine einzige Lucke dieses Verfahrens, daß die mikroskopische Untersuchung und die Berechnung allzu verwickelt zu sein scheint, Einwand erheben, eine Lucke, zu deren Schluß jedoch nur eine kurzfristige Übung erfordert wird, durch welche die mikroskopische Untersuchung innerhalb 30 Minuten, die Berechnung nur in 5 Minuten vollendet werden kann. (Zur Berechnung bedarf es einer Gau'schen Logarithmentafel.) Obgleich das geschilderte Verfahren noch viele, genauere Prüfungen erheischende Punkte in sich einschließt, muß es hier, wenn auch in Grundzügen, jetzt schon angeführt werden, da ich der festen Überzeugung bin, daß es im Vergleich zu den bisherigen Methoden ein dem wirklichen Wert der Bakterizidie des Vollblutes im lebenden Organismus viel näheres Resultat liefert.

*Copyright ©OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL

Aus der I. Chirurgischen Klinik der Medizinischen Fakultät
der Okayama Universität zu Okayama, Japan.

Ein Neues Verfahren zur Messung der Bakteriziden Fähigkeit des Vollblutes

Von

Prof. Dr. Densosuke Jinnai

Eingegangen am 31 März 1953.

I. Einleitung.

Es ist nichts dagegen zu sagen, daß man zur Feststellung der Abwehrkräfte eines lebenden Organismus gegenüber bakteriellen Erkrankungen zunächst die Widerstandsfähigkeit des Blutes untersucht, die man bisher durch die Bakterizidie des Blutserums oder durch den Opsoninindex zum Ausdruck gebracht hat. Für uns Kliniker jedoch ist es besonders prägnant, sich über die bakterizide Fähigkeit des Vollblutes zu orientieren. Unter den bisherigen Züchtungsmethoden der Bakterien im Vollblut gilt bis heute das von *Wright* angegebene Verfahren, „Slide cell culture“, nicht nur als die beste, sondern auch als die einfachste.

In der letzten Zeit hatte ich Gelegenheit, durch Anwendung dieser Methode die Resistenz des lebenden Organismus gegenüber Staphylokokken-Infektionen festzustellen. Es ist wohl meiner eigenen Unerfahrenheit zuzuschreiben, daß es mir nicht gelang, durch Anlehnung an diese Methode hinreichende Resultate zu erheben. Da ich aber dabei gewisse Nachteile, die an dieser Methode hafteten, finden konnte, habe ich ein neues Verfahren konstruiert, welches diese Nachteile hinreichend ausschaltet. Im folgenden wird davon die Rede sein.

II. Die bisherige Methode.

Die Methode von *Wright*, „Slide cell culture“, besteht darin, daß Bakterienaufschwemmung und das zu untersuchende Blut in einem bestimmten Verhältnis miteinander vermischt und ein Tropfen von diesem Gemisch auf ein mit Papier verklebtes Objektglas

-eingeträufelt wird, auf welches man ein anderes Objektglas aufsetzt. Nachdem man den Rand dieser Gläser mit weichem Paraffin umzogen hat, wird das Präparat in einen Brutschrank bei 37°C eingelegt, nach Ablauf von 24 Stunden nimmt man das Präparat aus dem Schrank heraus und zählt die auf der Blutplatte entwickelten Kolonien auf. Die Bakterienaufschwemmung muß so geschaffen sein, daß eine bestimmte Menge von ihr eine ebenfalls bestimmte Zahl von Bakterien in sich einschließt. Bevor die eigentliche Untersuchung vorgenommen wird, muß man durch einen Vorversuch die Zahl der Kolonien, welche sich auf der Agarplatte entwickeln werden, bestimmen. Die Zahl der ursprünglich gezüchteten Bakterien wird dann mit *A*, die Zahl der nach der Kultur auf der Blutplatte vorhandenen Kolonien mit *B* bezeichnet, und durch die Formel $\frac{A-B}{A} \times 100$ berechnet man den Index der Bakterizidie, der also die bakterientötende Fähigkeit des Vollblutes ausdrücken soll.

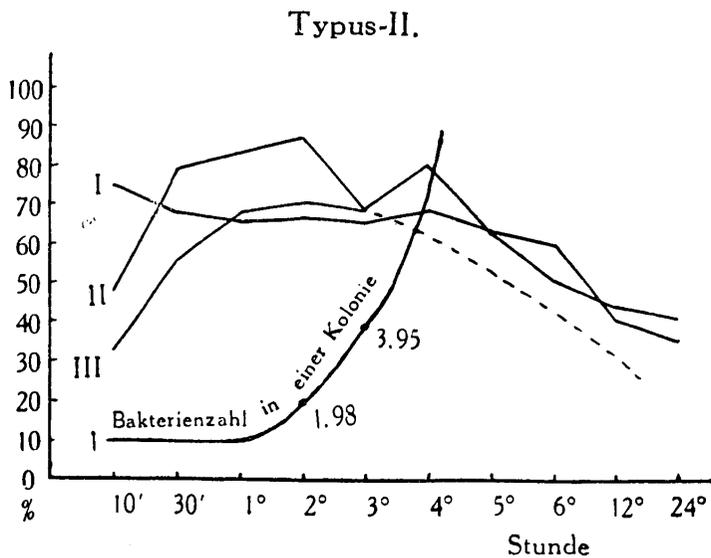
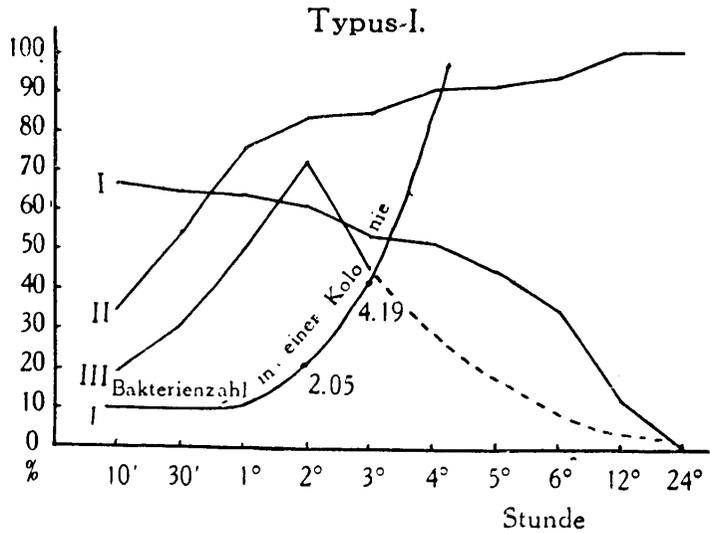
Bei Anwendung dieser Methode konnte ich aber nicht zu einem zuverlässigen Resultat kommen, was sich darin begründen läßt, daß 1) die Herstellung der eine bestimmte Zahl von Bakterien einschließenden Lösung sehr schwer fällt, 2) daß die Ergebnisse durch eine wenn auch verschwindend kleine Differenz im Mischverhältnis der Bakterienlösung mit dem Blut sehr empfindlich Schwankungen erleiden, 3) daß die Kolonien sehr geneigt sind, sich nur am Rande der Blutplatte intensiv zu entwickeln, usw.. Um die Ursachen dieser Nachteile klarzulegen, habe ich endlich vorgenommen, die Entwicklungsvorgänge der Bakterien im Vollblut zeitlich zu verfolgen.

III. Der zeitliche Verlauf der Kultur im Vollblut.

Ich habe nämlich eine Öse (ca. 2 mg) Staphylokokken aus 24 stündiger Kultur in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und eine Staphylokokkenaufschwemmung hergestellt. Aus dieser Bakterienlösung (über die Herstellungsmethode weiter unten) habe ich durch Befolgung der oben erwähnten Methode 20 Präparate angefertigt und in einen Brutschrank bei 37°C eingelegt, um sie nach Ablauf von 1/6, 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 und 24 Stunden wieder aus dem Schrank herauszunehmen und nach der Fixierung

und Färbung folgende Berechnungen bei starker Vergrößerung anzustellen (Abb. 1).

Abb. 1.



Die Präparate ließen sich annähernd in 2 Typen einteilen, der Typus-I zeigt eine schwächere und der Typus-II dagegen eine stärkere Resistenz des Blutes.

1) Der prozentuale Anteil der Summe von Polynucleären und

großen Mononucleären an der Gesamtzahl der Leukozyten (Kurve I).

Die phagozytäre Tätigkeit der poly- und der mononucleären Leukozyten beginnt schon vor Ablauf der ersten 10 Minuten. In der 10. Minute findet sich aber fast kein einziges Leukozyt mehr, welches für sich allein mehr als 6 Mikroben aufgefressen und dadurch Zerfall erlitten hat. Nach Ablauf von 20 Minuten vermehrt sich im Verlauf der Zeit die Zahl der in einem Leukozyt aufgenommenen Bakterien, was eine allmähliche Zunahme zerbrochener Leukozyten zur Folge hat. Nach Ablauf von 2 Stunden erfolgen die Spaltung und Wucherung der Bakterien und die Leukozyten, welche die durch Spaltung neubelebten kräftigen Bakterien, und zwar in Form von Kolonien, phagozytieren, erfahren naturgemäß zunehmend Abbruch, so daß der prozentuale Anteil der poly- und der mononucleären großen Leukozyten an den gesamten Leukozyten die Tendenz zeigt, allmählich abzunehmen. Aber bei dem Typus-II bleiben die polynucleären Leukozyten auch nach Ablauf von 24 Stunden noch in ziemlich großer Anzahl zurück, weil hier nicht nur die Leukozyten selbst viel intensiver widerstandsfähig sind, sondern auch die Zahl der Bakterien stärker abgenommen hat. Die Lymphozyten dagegen erleiden keinen Abbruch und erhalten sich nach Ablauf von 24 Stunden noch völlig intakt.

2) *Der Prozentsatz der phagozytären Leukozyten gegenüber der Gesamtzahl der Polynucleären und großen Mononucleären (Kurve II).*

Bei dem Typus-I neigt dieser Prozentsatz dazu allmählich zuzunehmen, während er bei dem Typus-II gegen Beginn der 3. Stunde eine Abnahme erfährt. Das kommt daher, daß bei dem letzteren einerseits die Zahl der extrazellulären Bakterien infolge der Bakterizidie der Leukozyten abnimmt, andererseits die stärker resistenten Leukozyten die in sich aufgenommenen Bakterien schnell verdauen.

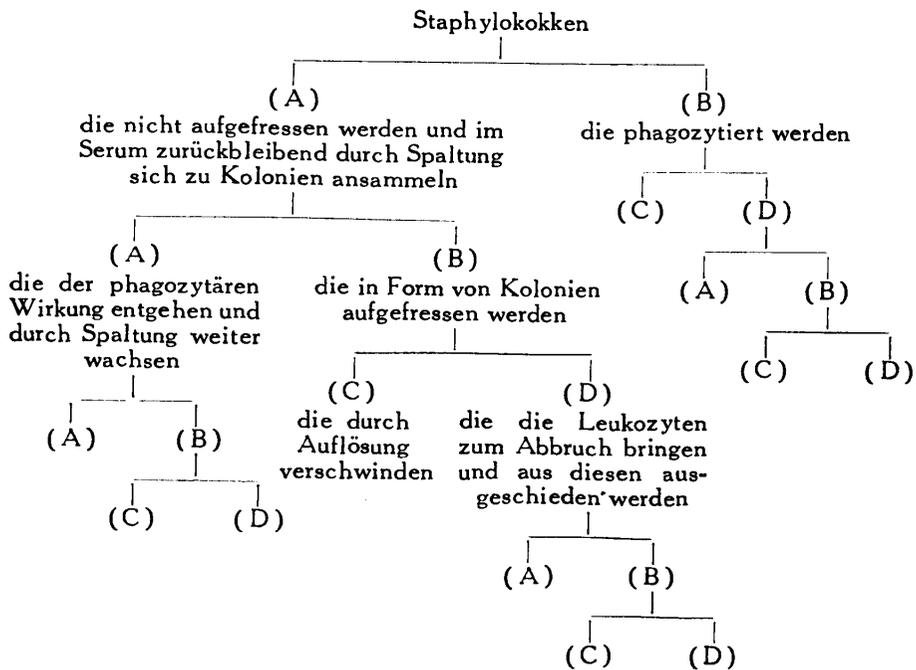
3) *Der Prozentsatz der aufgefressenen Bakterien gegenüber den gesamten Bakterien (Kurve III).*

Dieser Prozentsatz wird vor Ablauf von 2 Stunden fortwährend nur gesteigert, weil bei noch nicht aufgefressenen Bakterien keine Spaltung stattfindet. In der 2. Stunde aber beginnt schon die Spaltung bei den genannten Bakterien, in der 3. Stunde werden bei dem Typus-I durch die Spaltung Kolonien gebildet und andererseits

die Bakterien, welche beim Abbruch der übermäßig phagozytierten Leukozyten aus diesen ausgeschieden werden, nehmen in der Zahl zu und die Leukozyten verringern sich dementsprechend, was eine Herabsetzung des betreffenden Prozentsatzes zur Folge hat. Beim Typus-II verhält es sich etwas anders. Die Zahl der aufzufressenden Bakterien wird geringer, da sie extrazellulär nur in kleinerer Menge zurückgeblieben sind. Sowohl extra- als auch intrazellulär erfolgt in der Zahl der Bakterien fortwährend eine stärkere Verringerung und der in Frage kommende Prozentsatz wird dadurch beinahe konstant, welcher aber im Verlauf der Zeit einer allmählichen Herabsetzung unterliegt, weil die aufgefressenen Bakterien vollständig aufgelöst werden und schließlich verschwinden. Eine Ausnahme davon bildet die Peripherie der Präparate, wo die der Phagozytose entgangenen Bakterien zur Entwicklung gelangen und reichlich Kolonien bilden. Hier werden daher diese peripherischen Bakterien außer acht gelassen und nicht mitberechnet.

4) *Spaltung der extrazellulären Bakterien.*

In der Vollblutkultur gestaltet sich das Schicksal der Bakterien sehr verschiedenartig. Tabellarisch läßt es sich folgendermaßen angeben :



Im Blut gesunder Menschen fangen die von mir angewandten Staphylokokken nach Ablauf von ungefähr $1\frac{1}{2}$ Stunden die 1. Spaltung an, welche in der 2. Stunde vollendet und durch welche die meisten der Kokken zu zweien abgespaltet werden. In der 3. Stunde vermehrt sich jeder der meisten Kokken durch die 2. Spaltung zu vieren. In der 4. Stunde scheinen sie sich je zu 8-16 zu spalten, bei den Präparaten jedoch werden mehrere Kolonien von verschiedener Größe, welche 4 bis ca. 40 Bakterien in sich einschließen, beobachtet, weil die aufgefressenen Bakterien wegen des Abbruches der Leukozyten aus diesen ausgeschieden werden und infolge der Agglutination der Kokken selbst die gebildeten Kolonien je einige zu einer größeren Kolonie sich vereinigen (Abb. 2).

Abb. 2. (640 fach)
Das 4 stündige Präparat bei gesundem Menschen.



- a) die Kolonie, die aus einem einzigen Bakterium gewachsen ist.
- b) das Leukozyt, das am Abbruch nahe liegt und daran ist, Bakterien auszuschleiden.
- c) die angesammelten Kolonien, die beim Abbruch der Leukozyten ausgeschieden werden.

Daraus ergibt sich, daß, wie weiter unten noch die Rede sein wird, die Untersuchung spätestens innerhalb von 4 Stunden ausgeführt werden muß. Zu erwähnen ist aber, daß es Kolonien gibt, welche die Staphylokokken nur in Vierzahl enthalten. Das kommt daher, daß diese Kokken viel später als normal zur Entwicklung gelangt sind, weil sie erst dann, nachdem sie aufgefressen und ausgeschieden wurden, sich zu spalten begonnen haben. Ferner finden sich unter den Präparaten der 10., 30. Minute usw. auch solche, die nur 2 Bakterien zeigen. Dies rührt davon her, daß die Kokken infolge der ungeschickt hergestellten Bakterienlösung miteinander in Verbindung getreten sind, was sich an ihrer schwächeren Färbung als die der erst nach Ablauf von 2 Stunden zur Spaltung gekommenen Bakterien deutlich erkennen läßt.

Bei den 24 stündigen Präparaten wird beobachtet, daß bei dem Typus-I Kolonien von 4-30 μ Durchmesser in zählig großer Anzahl verstreut vorhanden sind, während beim Typus-II nur spärliche Kolonien im zentralen Abschnitt, ausgenommen die Umgebung mit großer Zahl von Kolonien, anzutreffen sind.

IV. Fehlerquellen der bisherigen Methode.

Auf Grund der oben beschriebenen zeitlichen Beobachtungen lassen sich folgende Erscheinungen erheben, von welchen die Fehlerquellen der bisherigen Methode herrührten.

a) In einem Leukozyt sind gleichzeitig mehrere Bakterien oder Kolonien aufgefressen vorhanden, welche beim Abbruch des Leukozytes ausgeschieden werden und zusammen eine Kolonie bilden (Abb. 2).

b) Einige von diesen phagozytären Leukozyten sammeln sich zusammen, kommen zum Abbruch und scheiden die eingeschlossenen Bakterien aus sich heraus, welche beisammen eine Kolonie bilden (Abb. 3).

c) Im kulturellen Frühstadium ballen sich die Bakterien durch eigene Bewegungen zusammen.

Der Befund von a) und b) ließ sich an den 3 stündigen Präparaten nur einigermaßen, an den 4 stündigen aber reichlich beobachten. Die Agglutination der Bakterien selbst wurde bei der Untersuchung der Spaltungsvorgänge auf dem Filmnährboden fest-

gestellt, indem sich die Bakterien, auf der Agar-membran hin und her wandernd, zu einer Kolonie zusammenballten.

Im Verlauf der 24stündigen Kultur kann man nämlich beobachten, daß bei den Leukozyten die Phagozytose und Kokkenausscheidung mehrmalig wiederholt werden, und daß die Zahl der auf der Blutplatte gebildeten Kolonien infolge der oben geschilderten Agglutination der Kokken allmählich abnimmt, wenn auch in der Wirklichkeit gar keine Bakterie abgetötet wird. Ich bin daher zur Überzeugung gelangt, daß die bisherige Zählmethode, bei der man die Zahl der nach der Züchtung vorhandenen Bakterien einfach von der Zahl der zuerst gezüchteten Bakterien abzieht, zu einem übergroßen Wert führt, d. h. gleich wie, daß man größere und kleinere Kolonien ohne weiteres gleichsetzt.

Abb. 3. (1100 fach)
Das 4 stündige Präparat bei
gesundem Menschen.



die Bakterien, die dem
Schwund nahe sind.

V. Das von dem Verfasser aufgestellte Verfahren.

Auf Grund der oben erwähnten zeitlichen Beobachtungen habe ich nun unternommen, durch Untersuchung der folgenden drei Dinge :

- a) Das phagozytäre Vermögen der Leukozyten,
- b) die Widerstandsfähigkeit der Leukozyten,
- c) die das Wachstum der Keime hemmenden Kräfte des Blutserums,

die bakterizide Fähigkeit des Vollblutes festzustellen.

Wie bereits in den vorstehenden Beobachtungen hingewiesen worden ist, muß man die phagozytäre Fähigkeit der Leukozyten nur innerhalb der Zeitspanne, in der die Bakterien noch keine Spaltung unternehmen, die aufgefressenen Bakterien noch nicht auf-

Abb. 4. (1200 fach)
Präparat-A (20 Minuten lang kultiviert) bei
gesundem Menschen.



gelöst werden und der Abbruch der Leukozyten noch nicht erfolgt, also vor Ablauf von 10 oder 20 Minuten berechnen. (Für eine gleichzeitige Untersuchung von mehr als einem Fall ist in bezug auf die Bequemlichkeit der Behandlung die 20. Minute nach der Züchtung am geeignetsten.). Die Berechnung der wachstumshemmenden Fähigkeit des Serums muß, wie in der vorstehenden Schilderung dargestellt wurde, vor Ablauf von vier Stunden vorgenommen werden, weil einerseits die in den einzelnen Kolonien eingeschlossenen Bakterien sich genau aufzählen lassen, andererseits die Bakterien noch nicht vollständig phagozytiert worden sind. Es

läßt sich dann die Resistenzkraft der Leukozyten sogleich feststellen, wenn man die ersteren Präparate, bei denen die Leukozyten noch keinen Abbruch erleiden, und die letzteren mehrere Stunden zurückgelegenen Präparate miteinander vergleicht (Abb. 4 u. 5). Die Methode gestaltet sich folgendermaßen :

Abb. 5. (900 fach)
Präparat-B (3 Stunden und 20 Minuten lang kultiviert)
bei gesundem Menschen.



1) *Die angewandten Bakterien.*

Als Material diente der *Staphylococcus pyogenes aureus* von konstanter Virulenz. Zur Wahl des Bakterienstammes muß man zunächst an das Blut der zu untersuchenden Tiere die vorliegende Methode anstellen, um einen solchen Stamm auszuwählen, dessen Virulenz graduell zwischen der des oben genannten I. und der des II. Typus liegt. Zu empfehlen ist es, daß man vorerst den Wachstumszustand des gewählten Stammes 24 stündiger Kultur auf einem für den Stamm optimalen Nährboden (Agarfilmnährboden von $\text{pH} = 7.2$) untersucht. Die Tabelle 1 zeigt bezüglich der von

Tab. 1.

Spaltungshäufigkeit	Bakterienzahl in einer Kolonie	erforderliche Zeitdauer
3	8	3 St. 20 Min.
2.807	7	3 St. 8 Min.
2.585	6	2 St. 55 Min.
2.322	5	2 St. 39 Min.
2	4	2 St. 20 Min.
1.585	3	1 St. 55 Min.
1	2	1 St. 20 Min.

mir angewandten Bakterien auf dem eben genannten optimalen Nährboden bei der Temperatur von 37°C die Spaltungshäufigkeit, die Bakterienzahl in einer Kolonie und die hierfür erforderliche Zeitdauer. Für die Kultur zeigt die von *Buchanan* sog. „logarithmic growth phase“ die geeignetste Zeitspanne an, wo die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Bakterien gleich ist. Als Kultur ist also eine 24

stündige am besten.

2) Die Herstellung der Bakterienlösung.

Bei dem vorliegenden Verfahren müssen die Bakterien in jeder Kolonie zur Aufzählung voneinander vollständig gesondert sein. Zu diesem Behuf wird eine Platinöse (ca. 2.0 mg) eines dem Nährboden entnommenen Bakterienbelags in 10 ccm destilliertem Wasser aufgeschwemmt und nachdem die Bakterien in dieser Aufschwemmung mit einer Pipette ausreichend verrieben worden sind, wird zu der Aufschwemmung eine 1.7%ige Kochsalzlösung in der Menge von 10 ccm hinzugesetzt, um somit eine Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung herzustellen.

3) Technik.

Zunächst bringt man mit einer Meßpipette 0.05 ccm Bakterienlösung auf eine Agglutinationsplatte und entnimmt dann eine Menge von 0.5 ccm des zu untersuchenden Blutes mittels einer Injektionsspritze. Diese kleine Menge des Blutes wird mit der Bakterienlösung versetzt, mittels einer Platinöse durchmischt, sogleich danach in eine Kapillarenpipette aufgesaugt, auf zwei bereits vorbereitete, oben angegebene Objektträger abgeträufelt und mit den anderen Objektträgern zugedeckt. Diese zwei Präparate werden schließlich mit Paraffin umrahmt und in einen Brutschrank bei der Temperatur von 37°C eingelegt.

Aus dem Schrank wird sodann das eine Präparat (A) nach Ablauf von 20 Minuten, das andere (B) nach Ablauf von 3 Stunden und 20 Minuten herausgenommen (eine Zeitdauer, in welcher die betr. Bakterien auf dem optimalen Nährboden bei 37°C die Spal-

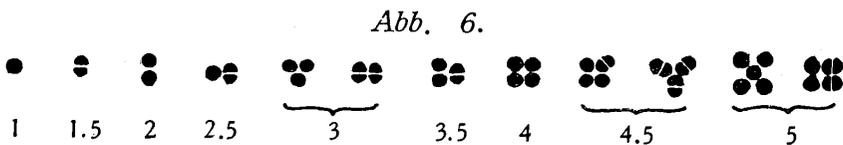
tung $n = 3$ mal durchmachen und sich auf 8 vermehren), das Paraffin wird von den beiden entfernt und die Objektträger werden von den aufgelegten Objektgläsern abgetrennt, um die die Blutplatte anhaftenden Objektträger allein zu fixieren und zu färben. Zur Fixierung legt man die Objektträger 20 Minuten lang in eine Mischung von 0.5%iger Eisessigsäure und 3.0%iger Formalinlösung ein, spült 20 Minuten im Wasser ab und, nachdem sie ausgetrocknet sind, färbt man sie durch 1 stündige Einlegung in 2.0%ige *Giemsalösung*.

4) *Zählung*.

Das Präparat-A beobachtet man, die Randpartie außer acht lassend, bei starker Vergrößerung (900 – 1000 fach), indem man den Objektträger entlang den Durchmesser der Blutplatte jedesmal um 0.5 mm hinzieht, um die Zahl der aufgefressenen Bakterien, der extrazellulären Bakterien, der Lymphozyten und anderer Leukozyten festzustellen. Durch diese Zahlen kann man finden 1) das Verhältnis (p) der Zahl der aufzufressenden Bakterien zur Gesamtzahl der Bakterien und 2) den prozentualen Anteil (R) der Summe der Polynucleären und der großen Mononucleären an der Gesamtzahl der Leukozyten.

Beim Präparat-B erhält man den Wert (R') ebenfalls wie oben. Zur Zählung der in jeder Kolonie befindlichen Bakterien bewegt man kontinuierlich das Präparat unter dem Mikroskop und aus 50 von diesen Kolonien berechnet man den auf eine Kolonie entfallenden Durchschnittswert (Z).

Die Zahl der in einer Kolonie anwesenden Bakterien ist, wenn sich die Bakterien noch auf dem Wege der Spaltung befinden, mit 1.5 anzusetzen,



wie aus der oben angegebenen Abbildung 6 zu ersehen ist. Dabei ist zu beachten, daß man an der Kolonie, welche aus einigen Kolonien besteht, nicht zählt, sondern daß nur die Kolonie aufgesucht werden muß, welche aus einem einzigen Bakterium gewachsen ist. Ferner muß man die Kolonien in der Randpartie, in der sie sich außerordentlich intensiv entwickeln, außer acht lassen.

VI. Formel für die zusammenfassende Beurteilung.

Um aus den drei Daten, die man durch die oben geschilderten Berechnungen erhält, nämlich die phagozytäre Fähigkeit p , die Resistenzkraft der Leukozyten R'/R und das das Wachstum der Bakterien hemmende Vermögen Z , zu einer zusammenfassenden Beurteilung zu gelangen, habe ich folgende Formel aufgestellt :

Bezeichnet man den phagozytären Index des Vollblutes mit C , so besteht folgende Gleichung :

$$C = \frac{2^n - \left[2 \left\{ 1 - p \left(\frac{R'}{R} \right)^2 \right\} \right]^{\frac{\log Z}{\log 2}}}{2^n} \times 100$$

Mit dem n in der Formel wird die Zahl der im Verlauf der Kultur des Präparates-B auf optimalem Nährboden stattgefundenen Bakterienspaltung bezeichnet.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, muß $n = 3$ ($2^n = 8$) sein, d. h. die Zeitdauer von 3 Stunden und 20 Minuten ist zur Kultur am geeignetsten. (Bei dem Präparat-B ist es berechtigt, die Zeitdauer der Kultur je nach der Bakterienart, der Virulenz usw. zu verändern.)

In der obigen Formel stellt der Ausdruck $\frac{\log Z}{\log 2}$ die Malzahl der Spaltungen im Blutserum bei der Kultur im Vollblut während der gleichen Zeitdauer wie der für n -malige Spaltungen auf optimalem Nährboden verstrichenen dar (n'), weil

$$2^{n'} = Z, \quad \text{also} \quad n' = \frac{\log Z}{\log 2} \quad \text{ist.}$$

Unter Ausschluß der Phagozytose beträgt ferner, wenn man die ursprüngliche Zahl der Bakterien mit a bezeichnet, die Zahl der nach n -maligen Spaltungen vermehrten Bakterien $a \times 2^n$. Werden die Bakterien bis zum Ende der 1. Spaltung soviel wie p unter der ursprünglichen Zahl a phagozytiert, so beträgt die Zahl der Bakterien nach Ablauf der 1. Spaltung $a(1-p) \times 2$. Nach Ablauf der 2. Spaltung wird die Zahl der Bakterien also $\{a(1-p) \times 2\}(1-p) \times 2 = a(1-p)^2 \times 2^2$. Daher läßt sich die Zahl der Bakterien nach Ablauf von n' -maligen Spaltungen aus der Form $a \{2(1-p)\}^{n'}$ berechnen.

Nach Ablauf einer bestimmten Zeit nach der Kultur verhält sich die phagozytäre Fähigkeit proportional zur Zahl der freißfähigen Leukozyten (Polynucleären und Mononucleären), so daß die Freißfähigkeit p durch den Zerfall der Leukozyten eine entsprechende Herabsetzung erleidet, die phagozytäre Fähigkeit der Leukozyten nach der Kultur läßt sich also durch den Ausdruck $p \frac{R'}{R}$ wiedergeben. Unter den Bakterien jedoch, welche bei dem Präparat-A im Anfang in die aufgefressenen miteingesetzt worden sind, finden sich auch solche, die die Leukozyten zerbrechen und sich extrazellulär weiteren Wachstums erfreuen. Die Zahl dieser Bakterien entspricht aber ungefähr dem Verhältnisanteil der Zahl der zerbrochenen Leukozyten an dem R , d. h. $\frac{R-R'}{R}$, so daß die Zahl der in der Tat phagozytierten Bakterien unter der Gesamtzahl der Bakterien so viel wie $1 - \frac{R-R'}{R}$ betragen kann. Der wirkliche Wert der phagozytären Fähigkeit p nach Ablauf einer bestimmten Kulturzeitdauer kann also durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$p \left(\frac{R'}{R} \right) \left(1 - \frac{R-R'}{R} \right) = p \left(\frac{R'}{R} \right)^2$$

Setzt man diesen Wert an Stelle p der oben angeführten Formel ein, so besteht folgender Ausdruck:

$$a \left[2 \left\{ 1 - p \left(\frac{R'}{R} \right)^2 \right\} \right]^{n'}$$

Wenn es sich aber um eine einzige Bakterie handelt, so kann man die konstante Zahl a auslassen und durch die Formel

$$\left[2 \left\{ 1 - p \left(\frac{R'}{R} \right)^2 \right\} \right]^{\frac{\log Z}{\log 2}}$$

zweifelsohne die Zahl der nach n' -maligen Spaltungen im Vollblut anwesenden Bakterien zum Ausdruck bringen. Da 2^n die Zahl der auf optimalem Nährboden im Verlauf derselben Zeitdauer aus einer einzigen Bakterie gewucherten Bakterien darstellt, kann man die Differenz zwischen dieser Zahl und der Zahl der in der Kultur des Vollblutes aus einer Bakterie gewachsenen Bakterien, d. h. die Zahl abgetöteter Bakterien, aus der Form

$$2^n - \left[2 \left\{ 1 - p \left(\frac{R'}{R} \right)^2 \right\} \right]^{\frac{\log Z}{\log 2}}$$

berechnen. Um diese Differenz in der Form von Index mit den Ziffern von 0 - 100 darzustellen, ist die Formel

$$\frac{2^n - \left[2 \left\{ 1 - p \left(\frac{R'}{R} \right)^2 \right\} \right]^{\frac{\log Z}{\log 2}}}{2^n} \times 100$$

erforderlich.

VII. Untersuchungsergebnisse.

Um den klinischen Anwendungswert des von mir aufgestellten Verfahrens zu beweisen, hat derselbe die verschiedenen Untersuchungen unternommen, die in jedem Fall gute Ergebnisse aufwiesen.

1) *Der normale Wert der bakteriziden Fähigkeit des Vollblutes beim Gesunden.*

Die Untersuchung bei 26 gesunden Menschen ergab (Tab. 2): der bakterizide Index $C =$ annähernd 55 - 70 %, $p = 0.138 - 0.275$ (im Mittel 0.203), $\frac{R'}{R} = 0.763 - 0.960$ (im Mittel 0.897), $Z = 3.77 - 4.75$ (im Mittel 4.15).

Tab. 2.

Nr.	Ges.	Alter	p	R' / R	Z	C
1	♂	32	0.168	0.958	3.79	65.7 %
2	♂	30	0.256	0.910	4.75	65.2 %
3	♂	26	0.261	0.922	4.03	69.5 %
4	♀	21	0.270	0.903	4.19	68.7 %
5	♂	35	0.275	0.900	3.77	70.9 %
6	♀	17	0.150	0.889	3.88	62.1 %
7	♂	28	0.138	0.831	4.20	57.3 %
8	♂	27	0.157	0.896	4.12	60.9 %
9	♂	24	0.211	0.908	4.05	65.6 %
10	♀	21	0.232	0.880	3.98	66.5 %
11	♀	28	0.186	0.806	4.07	60.8 %
12	♂	21	0.229	0.947	3.81	69.4 %

Ein Neues Verfahren zur Messung d. Bakteriziden Fähigkeit usw. 311

13	♂	31	0.145	0.952	3.87	63.5%
14	♂	35	0.190	0.867	4.15	62.2%
15	♂	23	0.244	0.915	3.96	68.6%
16	♂	29	0.210	0.906	4.74	61.2%
17	♀	23	0.262	0.933	4.32	68.7%
18	♀	20	0.262	0.934	4.18	69.5%
19	♂	30	0.167	0.763	4.38	56.0%
20	♂	21	0.154	0.934	4.13	62.4%
21	♂	33	0.140	0.902	4.67	55.4%
22	♂	23	0.213	0.833	4.47	60.5%
23	♀	23	0.159	0.960	4.09	63.0%
24	♀	45	0.225	0.931	4.33	65.8%
25	♀	21	0.188	0.831	4.18	60.8%
26	♂	26	0.194	0.908	3.87	65.6%
Durchschnittswert			0.203	0.897	4.15	64.1%

Die bakterizide Fähigkeit des Vollblutes der gesunden Menschen hat gewisse individuelle Schwankung. Von jedem Faktor ist dieselbe der Freßfähigkeit am höchsten.

2) *Der Wert nach der Injektion oder der peroralen Einverleibung von Sulfonamid-Präparaten.*

a) Bei 6 gesunden Menschen von den vorstehenden (Nr. 13 - 18) wurde eine Injektion von 30%iger Neostaplon-Lösung (p-aminobenzolsulfonacetamid-natrium) in der Menge von 5.0 ccm in den Gesäßmuskel vorgenommen und 2 Stunden danach das Blut zur Untersuchung entnommen.

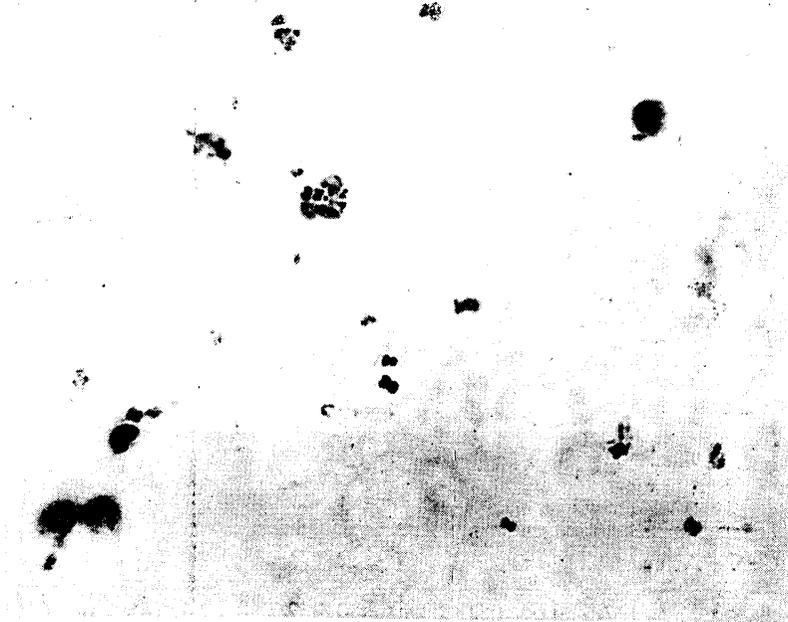
Tab. 3. Bei intramuskulärer Injektion von 30% Neostaplonlösung.

Nr.	Ges.	Alter		p	R'/R	Z	C
1	♂	31	Vor	0.145	0.952	3.87	63.5%
			Nach	0.341	0.970	3.70	77.7%
2	♂	35	V.	0.190	0.867	4.15	62.2%
			N.	0.363	0.959	3.48	79.0%
3	♂	23	V.	0.244	0.915	3.96	68.6%
			N.	0.322	0.987	2.98	79.4%
4	♂	29	V.	0.210	0.906	4.74	61.2%
			N.	0.423	0.970	2.94	85.0%

5	+0	23	V.	0.262	0.933	4.32	68.7%
			N.	0.251	0.923	4.07	68.8%
6	+0	20	V.	0.262	0.934	4.18	69.5%
			N.	0.346	0.888	3.01	77.3%
Durchschnittswert			V.	0.219	0.918	4.20	65.6%
			N.	0.341	0.950	3.36	77.9%

b) Den anderen 6 gesunden Menschen von den vorstehenden (Nr. 19- 24) wurde Gerisonpulver (p-aminobenzolsulfonamid) in der Dosis von 2.0 g peroral einverleibt und 7 Stunden danach das Blut entnommen.

Abb. 7. (760 fach)
Präparat-B bei der peroralen Einverleibung
von Sulfonamidpulver.



Wie die Tabelle 3 und 4 zeigt, wurde der bakterizide Index bei allen Fällen bis auf einen Fall (den 5. Fall), bei dem das Resultat gleich blieb, in auffallend erheblichem Maße gesteigert (Abb. 7).

Es ist sicher hervorzuheben, daß bei der Ansteigerung der bakterientötenden Kraft durch dieses Mittel die Freßfähigkeit der

Ein Neues Verfahren zur Messung d. Bakteriziden Fähigkeit usw. 313

Tab. 4. Bei peroraler Einverleibung von Gerisonpulver.

Nr.	Ges.	Alter		p	R'/R	Z	C
7	♂	30	Vor	0.167	0.763	4.38	56.0%
			Nach	0.319	0.851	3.98	70.5%
8	♂	21	V.	0.154	0.934	4.13	62.4%
			N.	0.385	0.843	3.76	77.5%
9	♂	33	V.	0.140	0.902	4.67	55.4%
			N.	0.231	0.969	3.65	71.1%
10	♂	23	V.	0.213	0.833	4.47	60.5%
			N.	0.335	0.872	3.44	74.5%
11	♀	23	V.	0.159	0.960	4.09	63.0%
			N.	0.297	0.872	3.54	72.2%
12	♀	45	V.	0.225	0.931	4.33	65.8%
			N.	0.313	0.850	3.36	73.2%
Durchschnittswert			V.	0.176	0.887	4.35	60.5%
			N.	0.316	0.876	3.62	73.2%

Leukozyten eine Hauptrolle spielt, und daß daran auch das wachstumhemmende Vermögen des Serums teilnimmt.

3) Bei Traubenkokkeninfektion.

Die 13 leichten Fälle von ambulanten Kranken und 5 schweren Patienten im Krankenhaus, welche einen von Staphylokokken hervorgerufenen Eiterherd haben, wurden untersucht (Tab. 5).

Tab. 5.

	Nr.	Ges.	Alter	Krankheitsname	p	R'/R	Z	C
Leichte Fälle	1	♀	23	Gesichtsfurunkel	0.312	0.851	3.98	70.1%
	2	♂	20	Geschwür durch Insektenstich	0.366	0.871	3.60	75.4%
	3	♂	22	wie oben	0.224	0.968	3.57	71.1%
	4	♂	22	Furunkel an Knie	0.245	0.986	3.69	72.4%
	5	♂	22	subkutaner Abszeß	0.350	0.926	3.57	76.8%
	6	♂	27	vereiterte „Trichophytie“	0.220	0.943	4.22	66.4%
	7	♂	23	Gesäßfurunkel	0.233	0.923	3.92	67.3%
	8	♂	23	Drüsenabszeß am Hals	0.474	0.975	3.03	85.5%
	9	♂	23	wie oben	0.321	0.909	4.18	72.3%
	10	♂	23	Intermuskulärer Abszeß	0.242	0.963	3.89	70.5%
	11	♀	27	subkutane Phlegmone	0.290	0.951	3.53	74.6%
	12	♂	22	Furunkel am Unterschenkel	0.371	0.842	3.76	73.8%

	13	♂	22	Gesichtsfurunkel	0.153	0.954	3.92	63.6%
	Durchschnitt				0.292	0.928	3.76	72.3%
Schwere Fälle	14	♀	55	Intermuskulärer Abszeß	0.261	0.987	2.97	76.6%
	15	♂	27	subakute Osteomyelitis	0.204	0.963	4.13	66.4%
	16	♀	16	Gesichtsfurunkel mit Agranulozytose	0.107	0.828	5.13	46.4%
	17	♂	23	Psoasabszeß	0.201	0.679	4.77	52.1%
	18	♂	15	Gesichtskarbunkel mit Sepsis	0.143	0.925	1.92	78.8%
	Durchschnitt				0.183	0.876	3.78	64.1%

Die bakterizide Fähigkeit des Vollblutes bei diesen Kranken vermehrt sich im allgemeinen in leichten Fällen, obgleich es sich in schweren Fällen vermindert. Dabei beteiligt sich jeder Faktor, d. h. p , R'/R und Z , gleichmäßig an der Zunahme der bakteriziden Wirkung.

4) Bei Lungentuberkulösen.

Die Ergebnisse bei Lungentuberkulösen sind wie folgt (Tab. 6). Bei der exsudativen Form nimmt der Wert der Bakterizide stark ab, ist aber bei der produktiven fast normal oder leicht höher. Es ist berechtigt anzunehmen, daß bei der Herabsetzung der bakteriziden Fähigkeit der exsudativen Form die Abnahme der Resistenzkraft der Leukozyten und die Absteigerung des wachstumhemmenden Vermögens des Serums sicher eine Hauptrolle spielen.

Tab. 6.

	Nr.	Ges.	Alter	p	R'/R	Z	C
produktive Form	1	♂	33	0.333	0.793	4.94	64.0%
	2	♂	23	0.373	0.886	5.01	72.0%
	3	♂	21	0.281	0.878	4.60	66.4%
	4	♂	25	0.269	0.785	4.86	59.8%
	5	♂	22	0.330	0.769	4.56	64.5%
	6	♂	31	0.413	0.939	4.07	79.7%
	7	♂	40	0.349	0.903	3.94	74.7%
	8	♂	23	0.213	0.869	4.55	61.2%
	Durchschnittswert			0.320	0.853	4.57	67.8%
	9	♂	27	0.427	0.513	5.90	45.7%

Ein Neues Verfahren zur Messung d. Bakteriziden Fähigkeit usw. 315

exsudative Form	10	♂	26	0.210	0.676	5.26	48.3%
	11	♂	30	0.198	0.548	4.99	45.9%
	12	♂	26	0.181	0.614	5.60	41.3%
	13	♂	28	0.215	0.690	5.47	47.5%
	14	♀	24	0.189	0.656	4.86	49.9%
	Durchschnittswert				0.237	0.616	5.35

5) Bei Krebskranken (Tab. 7).

Bei Krebskranken zeigt sich eine leichte Verstärkung der bakteriziden Kraft; diese Verstärkung hat ihren Grund hauptsächlich in der Ansteigerung der phagozytären Fähigkeit und der wachstumhemmenden Kraft des Serums.

Tab. 7.

Nr.	Ges.	Alter	Krankheitsname	p	R'/R	Z	C
1	♂	63	Pyloruskrebs	0.212	0.921	4.18	65.3%
2	♂	64	Ösophaguskrebs	0.299	0.996	2.99	78.6%
3	♀	39	{ Pyloruskrebs mit Lebermetastase	0.247	0.947	4.11	69.2%
4	♂	38	Magenkrebs	0.209	0.869	4.16	63.5%
5	♂	51	Kardialkrebs	0.257	0.831	3.21	71.1%
6	♂	50	{ Magenkrebs mit schwerer Kachexie	0.268	0.961	4.94	67.9%
7	♂	37	Retroperitonealkrebs	0.182	0.925	3.13	70.4%

6) Bei Basedowkranken (Tab. 8).

Die bakterientötende Fähigkeit der Basedowkranken ist im allgemeinen normal oder etwas herabgesetzt. Doch je stärker dabei der Steigerungsgrad der Schilddrüsenfunktion wird, desto

Tab. 8.

Nr.	Ges.	Alter	Gr. Umsatz	p	R'/R	Z	C
1	♀	45	63.3%	0.159	0.919	3.53	66.1%
2	♀	19	16.1%	0.179	0.711	4.71	52.4%
3	♀	58	3.6%	0.104	0.832	4.47	52.5%
4	♀	33	4.7%	0.201	0.482	4.92	44.9%
5	♂	43	75.6%	0.174	0.996	3.68	67.8%
6	♀	56	44.2%	0.193	0.843	3.66	65.3%

größer ist der bakterizide Index. Vorzugsweise wird die Schwankung des bakteriziden Wertes durch die Resistenzkraft und das wachstumhemmende Vermögen verursacht.

7) *Bei Diabetikern* (Tab. 9).

Diabetiker zeigen die erhebliche Herabsetzung der bakterienabtötenden Fähigkeit, welche auf der Abschwächung der Resistenzkraft der Leukozyten beruht.

Tab. 9.

Nr.	Ges.	Alter	p	R'/R	Z	C
1	♂	55	0.245	0.800	4.38	61.9%
2	♀	20	0.299	0.382	4.87	45.0%
3	♀	55	0.125	0.694	4.70	48.9%

VIII. Zusammenfassung.

Das oben erwähnte Verfahren hat vor den anderen Methoden besonders die Vorzüge, 1) daß man dadurch zu einem sicheren Resultat gelangen und gleichzeitig auch jedes Datum mit exakten Ziffern zum Ausdruck bringen kann, 2) daß bei diesem Verfahren keineswegs erforderlich ist, eine bestimmte Anzahl von Keimen einschließende Bakterienaufschwemmung herzustellen und auch Kontrollversuch anzustellen, 3) daß es von den Fehlern des Mischverhältnisses zwischen der Bakterienlösung und dem Blut nicht so erheblich beeinflußt wird, und 4) daß man durch dieses Verfahren gleichzeitig mehrere bakterientötende Faktoren untersuchen kann.

Ferner hat dieses Verfahren auch den Vorzug, daß es praktisch sehr einfach auszuführen ist und nur 6 Stunden nach der Blutentnahme bereits das Ergebnis liefert. Es gestattet ferner, die bakterizide Kraft des Blutes gleichzeitig bei 6-8 Menschen zu untersuchen, was mich zur Überzeugung führt, daß es in der Klinik hochgeschätzt werden wird. Auch das Verfahren und die ebenfalls vom mir aufgestellte Formel zur zusammenfassenden Beurteilung kann man nach meinem Erachten durch entsprechende Veränderungen einiger Faktoren ohne jede Schwierigkeiten auch für andere Bakterienarten anwenden.

Man wird wohl gegen eine einzige Lücke dieses Verfahrens,

daß die mikroskopische Untersuchung und die Berechnung allzu verwickelt zu sein scheint, Einwand erheben, eine Lücke, zu deren Schluß jedoch nur eine kurzfristige Übung erfordert wird, durch welche die mikroskopische Untersuchung innerhalb 30 Minuten, die Berechnung nur in 5 Minuten vollendet werden kann. (Zur Berechnung bedarf es einer *Gauss'schen* Logarithmentafel.)

Obgleich das geschilderte Verfahren noch viele, genauere Prüfungen erheischende Punkte in sich einschließt, muß es hier, wenn auch in Grundzügen, jetzt schon angeführt werden, da ich der festen Überzeugung bin, daß es im Vergleich zu den bisherigen Methoden ein dem wirklichen Wert der Bakterizidie des Vollblutes im lebenden Organismus viel näheres Resultat liefert.

Literatur.

- Buchanan and Fulmer*, Physiology and Biochemistry of Bacteria (London), 1, 16 (1928). — *Buchner, Longard and Riedlin*, Zbl. Bakt., 2, 1 (1887). — *Bull and Bartual*, J. exper. med., 31, 233 (1920). — *Colebrook and Storer*, Brit. exper. Path., 5, 47 (1924). — *Dales*, Zbl. Gynäk., 55, 281 (1931). — *Fodor*, Dtsch. med. Wschr., 13, 745 (1887). — *Geller und Sommer*, Arch. Gynäk., 131, 293 (1927). — *Gotschlich*, Handbuch der pathologischen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann), 1, 189 (1929). — *Heist, S. Soliscohen and M. Soliscohen*, J. of Immunol., 3, 261 (1918). — *Heist and Soliscohen*, J. of Immunol., 4, 147 (1919). — *Itoh*, KEKKAKU, 8, 291 (1930). — *Jinnai*, NIPPON-GEKA-GAKKAI-ZASSHI, 44, 468, 500 (1943). — *Kumamoto*, IGAKU-KENKYU, 14, 597 (1940). — *Lane-Clayton*, J. of Hyg., 9, 239 (1909). — *Magara*, NIPPON-FUJINKA-GAKKAI-ZASSHI, 26, 1940 (1931). — SANKA-TO-FUJINKA, 2, 16 (1934). — JIKKEN-IGAKU-ZASSHI, 13, 187 (1929). — *Matsunami*, J. of Immunol., 5, 51 (1920). — *Matsunami and Kolmer*, J. of Immunol., 3, 201 (1918). — *Meissner*, Zbl. Bakt. orig., 106, 210 (1928). — *Nakamura*, SAIKINGAKU-KESSEIGAKU-KENSAHO, 401 (1940). — *Neisser*, Handbuch der pathologischen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann), IV, 1. Teil, 437 (1929). — *Nishikawa*, KEKKAKU, 14, 671 (1936). — *Nuttall*, Z. f. Hyg., 4, 353 (1888). — *Ogata*, KEKKAKU, 10, 117 (1932). — *Ogata und Shibukawa*, KEKKAKU, 10, 247 (1932). — *Penfold*, J. of Hyg., 14, 215 (1914). — *Penfold and Norris*, J. of Hyg., 12, 527 (1912). — *Pfalz*, Arch. Gynäk., 134, 73 (1928). — Arch. Gynäk., 138, 93 (1929). — Klin. Wschr., 8, 1661 (1929). — Klin. Wschr., 9, 1343 (1930). — *Pfannenstiel*, Z. Immforsch., 56, 389 (1928). — *Pfannenstiel und Quante*, Z. Immforsch., 88, 1 (1936). — *Prausnitz und Meissner*, Zbl. Bakt. orig., 94, 376 (1925). — Zbl. Bakt. orig., 97, 171 (1926). — *Robinson*, J. inf. Dis., 39, 61

(1926). — *Sato*, JIKKEN-IGAKU-ZASSHI, **10**, 871 (1926). — *Shimizu*, JIKKEN-IGAKU-ZASSHI, **24**, 924, 1070 (1940). — *Slator*, J. of Hyg., **16**, 100 (1917). — A System of Bacteriology in Relation to Medicine, **1**, 145 (1930). — *Smiley*, J. inf. Dis., **33**, 88 (1923). — *Takahashi*, JIKKEN-IGAKU-ZASSHI, **11**, 374 (1927). — *Takahashi and Ashimura*, KEKKAKU, **8**, 1504 (1930). — *Toda*, TODA-SHIN-SAIKINGAKU, 26 (1939). — *Wilson*, J. of Bact., **7**, 405 (1922). — *Wright*, Lancet, **206**, 218 (1924). — *Wright, Colebrook and Storer*, Lancet, **204**, 365, 417, 472 (1923). — *Wolff*, Z. Immforsch., **45**, 515 (1926). — Z. Immforsch., **50**, 543 (1927). — Z. Immforsch., **56**, 279 (1928). — *Yamakawa*, IGAKU-KENKYU, **12**, 1675 (1938). — *Yamashita*, IGAKU-KENKYU, **16**, 1203 (1942).