

# Untersuchungen über Fehlerquellen der Weil-Felixschen Reaktion und die Verwendbarkeit erhitzter Bazillenaufschwemmungen zur Fleckfieberdiagnose.<sup>1</sup>

Von

**Dr. Georg Wolf,**

Bakteriologe am Medizinsamt der Stadt Berlin.

## I. Die agglutinationshemmenden Einflüsse bei der Weil-Felixschen Reaktion.

Die Bedeutung der von Weil und Felix (1) gefundenen Reaktion für die serologische Diagnostik des Fleckfiebers steht heute nicht mehr zur Diskussion. Der Beginn ihres Auftretens und die Höhe des Agglutinititers unterliegen gewissen individuellen Schwankungen; meist ist sie erst vom 7. Krankheitstage an deutlich positiv (1 : 200), jedenfalls nie vor dem 5. und erreicht ihren Höhepunkt zur Zeit der Entfieberung. Darüber wurde von mir bereits in einer früheren Arbeit berichtet (2).

Nun ist aber die von vielen Autoren (Fuchs (3), Otto (4), Dietrich (5), Csépai (6), Schiff (7) u. a.) beobachtete Veränderlichkeit der Agglutinabilität des *Proteus X<sub>19</sub>* eine Fehlerquelle, die Beachtung verdient. Weil und Felix führen die Schwankungen, bzw. die Verringerung der Agglutinabilität darauf zurück, daß die Stämme nicht auf einwandfreiem, neutralem Agar fortgezüchtet sind. Auch Sachs (8) schreibt der Zusammensetzung des Nährbodens eine solche Bedeutung für das Verhalten der X-Stämme zu. Er erhielt eindeutige Resultate nur mit Kulturen, die auf einem mit frischem Fleisch, nicht mit Fleischextrakt bereitetem Agar fortgezüchtet waren. Neuerdings zeigten Weltmann u. Seufferheld (9), sowie Schiff (10), daß auch der Zuckergehalt des Nährbodens die Agglutinabilität der *X<sub>19</sub>*-Bazillen beeinflußt. Auf zuckerfreiem Nährboden gewachsene Bazillen werden überhaupt nicht agglutiniert, während mit steigendem Zuckergehalt die Geschwindigkeit der Reaktion, die Stärke der Ausflockung und die Titerhöhe zunimmt. Auch wir haben die Erfahrung machen müssen, daß der gleiche Stamm von einem Tage zum anderen seine Agglutinierbarkeit erheblich verändern kann, daß Suspensionen des gleichen Stammes, von zwei verschiedenen Agarröhrchen am gleichen Tage her-

<sup>1</sup> Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden in Rumänien ausgeführt.

gestellt, in ihrer Agglutinabilität durch das gleiche hochwertige Fleckfieber-serum so erhebliche Differenzen aufwiesen, daß Beseitigung dieser Fehler-quelle dringend geboten erscheint.

Im Gegensatz zu den Bazillen aus der Typhus-Coli-Gruppe büßt der Proteuskeim  $X_{19}$  seine Agglutinabilität durch Konservierungsmittel wie Phenol, Formalin erheblich ein. Csépai (a. a. O.), Sachs (a. a. O.), Schiff (a. a. O.) haben aber unabhängig voneinander gefunden, daß sich ein zur Serodiagnostik des Fleckfiebers brauchbares Präparat durch Erhitzen der lebenden Bazillen auf mindestens  $60^{\circ}$  herstellen läßt, und daß die Agglutina-bilität der erhitzten Bazillenabschwemmung auch durch Zugabe von 0,5 Prozent Phenol nicht mehr leidet. Die Tatsache, daß nur die leben-den  $X_{19}$ -Bazillen durch geringfügige äußere Einflüsse ihre Agglu-tinabilität verlieren, bildet den Ausgangspunkt unserer Versuche.

Die erste Versuchsreihe mit Sublimat ergab die folgenden inter-essanten Verhältnisse: Von einem hochwertigen Fleckfieberserum (Titer gegen  $X_{19}$  1 : 25600) wurden Serumverdünnungen 1 : 500 hergestellt, also noch sehr agglutininreiche Konzentrationen. Dazu wurde je ein Tropfen von frischen  $X_{19}$ -Suspensionen gegeben, die mit fallenden Mengen Sublimat versetzt waren. Einwirkung des Sublimats auf die Bazillenaufschwemmung mindestens  $\frac{1}{2}$  Stunde. Ausgegangen wurde von einer Sublimatverdünnung 1 : 1000, die in üblicher Weise aus den fertigen eosinhaltigen Kochsalz-Sublimatpastillen, ein anderes Mal zur Kontrolle aus einer reinen Sublimat-lösung hergestellt war. Nach Beendigung des Versuches wurden die stehen-gebliebenen Röhrechen mit den fallende Mengen von Sublimat enthaltenden  $X_{19}$ -Suspensionen 1 Stunde auf  $80^{\circ}$  im Wasserbad erhitzt und nochmals mit dem hochwertigen Fleckfieberserum zur Weil-Felixschen Reaktion benutzt. Die Resultate beider Agglutinationen sind in der Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Einfluß von Sublimat auf die Agglutinabilität frischer und erhitzter  $X_{19}$ -Kulturen.

Fleckfieber- serum- 1 cem Verdünnung	$X_{19}$ frisch mit Sublimat	Aggl. nach		$X_{19}$ erhitzt mit Sublimat	Aggl. nach	
		2 Std.	24 Std.		2 Std.	24 Std.
$\frac{1}{500}$	Susp. mit $\frac{1}{5000}$ Subl.	—	—	dieselbe Suspension 1 Std. auf $80^{\circ}$ erhitzt	+++	+++
desgl.	desgl. $\frac{1}{10\ 000}$ „	—	—	desgl.	+++	+++
„	„ $\frac{1}{20\ 000}$ „	—	—	„	+++	+++
„	„ $\frac{1}{40\ 000}$ „	—	±	„	+++	+++
„	„ $\frac{1}{80\ 000}$ „	+	+	„	+++	+++
„	Susp. ohne Subl.	+++	+++	„	+++	+++

Ganz geringe Mengen Sublimat haben also ausgereicht, um lebende  $X_{19}$ -Kulturen ihrer Agglutinabilität völlig zu berauben (bei  $1/40000$  noch fast völlige Hemmung, bei  $1/80000$  noch erhebliche Verminderung der Agglutination); nach einstündigem Erhitzen auf  $80^\circ$  ist die Agglutinabilität in vollem Maße wieder hergestellt.

Es muß durch das Sublimat aus den lebenden  $X_{19}$ -Bazillen ein Stoff frei gemacht worden sein, der die Agglutinierbarkeit der Bazillen herabzusetzen oder ganz aufzuheben vermag. Csépai bezeichnet ihn als Hemmungskörper des Proteusagglutinogens. In der frischen Suspension ist er garnicht oder nur in geringen Mengen vorhanden. Erst durch Temperatureinwirkung von 50 bis  $55^\circ$  wird er in größerer Menge frei, ebenso auch durch chemische Einflüsse, und geht bei  $60^\circ$  wieder vollständig zugrunde; er ist also thermolabil. Wird nun durch Erhitzen der Kultur auf 60 oder darüber der Hemmungskörper vernichtet, so findet das Sublimat ebensowenig wie andere Gifte einen Angriffspunkt und beeinträchtigt infolgedessen die Reaktion nicht mehr. Es sei hier gleich festgestellt, daß dieselben Sublimatzugaben Typhusbazillen nicht in ihrer Agglutinabilität beeinträchtigen. Der Versuch wurde in genau derselben Weise ausgeführt. Zu frisch bereiteten Typhusbazillen-Suspensionen wurde Sublimat in fallenden Mengen von  $1/5000$  bis  $1/80000$  gegeben; die nach zwei Stunden abgelesene Agglutination war in allen Röhrchen ebenso gut wie in der Kontrolle ohne Sublimat. Auch hier wurde eine Serumverdünnung  $1/500$  eines agglutinierenden Serums (Titer 1 : 10000) benutzt. Das Ergebnis entspricht der Tatsache, daß auch Formalin und Phenol die Agglutinabilität der Typhusbazillen nicht herabsetzen. (Fickers Diagnostikum.)

Von Interesse mußte nun noch sein, wie die Sublimat- $X_{19}$ -Suspensionen sich Seren bzw. Seraverdünnungen gegenüber verhalten, die nur wenig Agglutinin enthalten. Das zeigt der folgende Versuch (Tabelle II):

Hier wurde ein Serum mit einem etwas niedrigeren Titer (nach 2 Stunden + 6400) benutzt. Nach 2 Stunden war in Verdünnung 1 : 50 die Agglutination mit  $1/80000$  Sublimat enthaltender Suspension vollkommen unterdrückt; nach 8 Stunden (b) noch fraglich ( $\pm$ ) und erst nach etwa 20 bis 24 Stunden (c) feinflockig ( $++$ ) positiv; dagegen war in den stärksten Verdünnungen die Reaktion auch nach 8 und 24 Stunden vollkommen unterdrückt.

Nach Sachs bewahrt die auf  $80^\circ$  erhitzte und dann karbolisierte Aufschwemmung ihre volle Agglutinabilität, während die lebenden Bazillen ihre Agglutinierbarkeit durch den Phenolzusatz fast ganz verlieren. Man kann sogar die Kulturabschwemmung zuerst mit Phenol versetzen und dann erhitzen; auch die karbolisierte und danach auf 60 bis  $100^\circ$  erhitzte

Tabelle II.

Ein hochwertiges Fleckfieberserum, austitriert mit lebenden  $X_{19}$ -Bazillen und mit solchen, die einen Zusatz von  $1/10\,000$  bzw.  $1/80\,000$  Sublimat erhalten haben.

Serum- verdünnung 1 ccm	$X_{19}$ lebend ohne Sublimat			$X_{19}$ mit $1/10\,000$ Sublimat			$X_{19}$ mit $1/80\,000$ Sublimat		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
$1/50$	+++	+++	+++	—	±	++	—	±	++
$1/100$	+++	+++	+++	—	±	++	—	±	++
$1/200$	+++	+++	+++	—	±	++	—	±	++
$1/400$	+++	+++	+++	—	±	++	—	±	++
$1/800$	+++	+++	+++	—	—	++	—	—	++
$1/1600$	+++	+++	+++	—	—	++	—	—	++
$1/3200$	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—
$1/6400$	±	±	+++	—	—	—	—	—	—
$1/12\,800$	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a = Ablesung nach 2 Std., b = Ablesung nach 8 Std., c = Ablesung nach 24 Std.

Aufschwemmung ist wieder in vollem Maße agglutinabel. Dasselbe gilt für Formalin, wie die nachstehenden Tabellen III und IV zeigen.

Tabelle III.

Einfluß von Phenol auf die Agglutinabilität frischer und erhitzter  $X_{19}$ -Kulturen.

Fleckfieber- Serum 1ccm Verdünnng.	$X_{19}$ frisch mit Phenol	Aggl. nach		$X_{19}$ erhitzt mit Phenol	Aggl. nach	
		2 Std.	8 Std.		2 Std.	8 Std.
$1/500$ +	$X_{19}$ mit $1/50$ Phenol	—	—	dieselbe Suspension 1 Std. auf $80^\circ$ erhitzt	—	+++
"	" $1/100$ "	—	—	desgl.	—	+++
"	" $1/200$ "	±	±	"	—	+++
"	" $1/400$ "	+++	+++	"	—	+++
"	" $1/800$ "	+++	+++	"	—	+++
"	" $1/1000$ "	+++	+++	"	—	+++
"	$X_{19}$ ohne Phenol	+++	+++	"	—	+++

In diesem Versuch zeigt Phenol bis zu einer Menge von 1 : 200 (0,5 Prozent) eine deutliche Hemmung der Agglutination. Zum annähernd gleichen Ergebnis kam auch Csépai. Mit den erhitzten Bazillen ist in Versuch 3 die Agglutination nach 2 Stunden überhaupt noch nicht zustande gekommen; auch sonst verläuft die Reaktion hierbei meist etwas langsamer. Nach 8 Stunden ist sie aber in allen Röhren gleich stark, auch der Zusatz von 2 Prozent Phenol (1 : 50) hat die Agglutination hier nicht behindert.

Genau in der gleichen Weise ist der Versuch mit Zusatz von Formalin ausgefallen. Auch hier Hemmung des Agglutinationsphänomens bei Benutzung lebender Kulturen, deutlicher Eintritt der Agglutination bei Benutzung der erhitzten Bazillen. Es sei hier erwähnt, daß Hemmung immer bedeutet, daß bei Betrachtung der Röhren mit dem bloßen Auge eine deutliche Häufchenbildung nicht zu erkennen ist. Die Angabe von Neuber (11) und Schürer und Stern (12), daß sich mit 1 Prozent Phenol bzw. Formalin abgetötete X<sub>19</sub>-Aufschwemmungen zur Agglutination gut eignen, beruht wohl darauf, daß die genannten Autoren die Agglutination mikroskopisch ablasen. Eine ganz feine, makroskopisch nicht, mikroskopisch aber noch erkennbare Zusammenballung findet tatsächlich auch bei der Benutzung der Phenol- und Formalinkulturen statt; ungleich viel deutlicher und der Kontrolle völlig gleichend wird aber die Agglutination, wenn man statt der frischen Suspension die erhitzte benutzt. Das zeigt die Tabelle IV.

Tabelle IV.

Einfluß von Formalin auf die Agglutinabilität frischer und erhitzter X<sub>19</sub>-Kulturen.

Fleckfieber- serum 1 ccm Verdünnung.	X <sub>19</sub> frisch mit Formalin	Aggl. nach		X <sub>19</sub> erhitzt mit Formalin	Aggl. nach	
		2 Std.	8 Std.		2 Std.	8 Std.
1/500 +	mit 1/50 Formalin	—	± (ganz fein)	Die gleichen Formalin- Suspensionen 1 Stunde auf 80° erhitzt	++	+++
"	" 1/1000 "	—	±		++	+++
"	" 1/200 "	—	±		++	+++
"	" 1/400 "	±	+		++	+++
"	" 1/800 "	±	+++		++	+++
"	" 1/1000 "	±	+++		++	+++
"	" 1/1500 "	+++	+++		++	+++
"	" 1/2000 "	+++	+++		++	+++
"	ohne Formalin	+++	+++		++	+++

Das Ergebnis ist im wesentlichen das gleiche wie im Phenolversuch, nur daß Formalin noch etwas stärker hemmt (noch bis 1 : 1000 ±). Die Agglutination mit der erhitzten Kultur tritt auch hier etwas langsamer ein; sie hat nach 2 Stunden ihren Höhepunkt noch nicht erreicht, ist aber in allen Röhren gleich stark. Sämtliche Versuche wurden mehrere Male wiederholt und ergaben kaum erhebliche Abweichungen.

Die Versuchsanordnung war stets die gleiche. Zu 1 ccm der Serumverdünnung 1 : 500 eines Standardserums, das in Verdünnung 1 : 10 mit Phenol-Kochsalzlösung zu allen Versuchen benutzt wurde, war 1 Tropfen der X<sub>19</sub>-Suspension gegeben. Da nicht jedes Agarröhrchen einen gleich gut agglutinablen Stamm zu enthalten braucht, wurde immer von mehreren Röhren

eine größere Menge Mischsuspension hergestellt; zu abgeteilten Portionen davon wurden die abgestuften Mengen der Zusatzmittel (Sublimat, Phenol, Formalin) gegeben. Die Einwirkungsdauer der Zusatzmittel auf die  $X_{19}$ -Kultur betrug mindestens eine halbe Stunde.

In weiteren Versuchen sollte noch die Wirkung einer Säure und Lauge, von Soda und Alkohol auf die Agglutinabilität des Bazillus  $X_{19}$  geprüft werden, möglichst also von solchen Stoffen, die im Laboratoriumsbetrieb viel zur Verwendung gelangen. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß Säuren schon allein ohne Gegenwart von Immuns Serum eine Agglutination geben, eine Tatsache, die von L. Michaelis (13) sogar zur Ausarbeitung einer besonderen Methode zur Differenzierung der Typhus- und Paratyphusbazillen durch Säureagglutination benutzt wurde. Das Ergebnis der Säureagglutination mit dem Bazillus  $X_{19}$  lebend und abgetötet, einmal mit Essigsäure, einmal mit Salzsäure, ist aus Tabelle V ersichtlich. Von reiner Essigsäure und reiner Salzsäure, wie sie dem Laboratorium zur Verfügung standen (Ac. acet. glac. und Ac. hydrochl. pur.), werden Verdünnungen mit destilliertem Wasser gemacht und dazu 1 Tropfen einer frischen und einer erhitzten  $X_{19}$ -Kultur gegeben. Ablesung sofort (a), nach 2 Stunden (b) und nach 8 Stunden (c) (Tabelle V).

Von Interesse ist, daß die Säureagglutination fast sofort nach Zugabe der Suspension eintritt, nach 2 Stunden und 8 Stunden um eine bis zwei Stufen weitergeht. Geringe Unterschiede zwischen der Agglutination der lebenden und der erhitzten Kultur zeigt die Tabelle. Die Ausflockung ist namentlich in den starken Konzentrationen sehr groß, es handelt sich dabei wohl um eine richtige Eiweißfällung; in den schwächeren Konzentrationen gleicht sie vollkommen den Immunagglutinationen. Ganz interessant ist die Beobachtung, daß auch die Säureagglutination mit der erhitzten Kultur später eintritt als mit dem lebenden Stamm, sich also ähnlich wie die Agglutination durch Immunsere verhält (vgl. Tabelle V). Diese Untersuchungen haben aber nicht nur ein theoretisches Interesse, sie sind auch für die Praxis des Laboratoriums von Bedeutung. Sie zeigen eine Fehlerquelle nach der anderen Seite, indem schon minimale Mengen von Säure eine Immunagglutination vortäuschen können.

Natronlauge und Soda können die Weil-Felixsche Reaktion hemmen, wenn die  $X_{19}$ -Aufschwemmungen mehr als 0,5 bis 1 Prozent davon enthalten; das kann praktisch einmal von Bedeutung sein, wenn die benutzten Reagenzgläser stark mit Soda gespült werden oder wenn neue Gläser benutzt werden, die noch viel Alkali beim Kochen abgeben. Auch hier liegt eine gewisse Fehlerquelle vor, die bei der Technik der Weil-Felixschen Reaktion zu berücksichtigen ist, indem nur mit sorgsam in reinem Wasser ge-

Tabelle V.  
Säureagglutination mit frischer und erhitzter X<sub>19</sub>-Kultur.

Ac. acet. glac.	X <sub>19</sub> frisch			X <sub>19</sub> erhitzt			Ac. hydroehl.	X <sub>19</sub> frisch			X <sub>19</sub> erhitzt						
	a	b	c	a	b	c		a	b	c	a	b	c				
1/100	+	+	+	+	+	+	1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/200	+	+	+	+	+	+	1/200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/400	+	+	+	+	+	+	1/400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/800	+	+	+	+	+	+	1/800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1600	+	+	+	+	+	+	1/1600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/3200	+	+	+	+	+	+	1/3200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/6400	+	+	+	+	+	+	1/6400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/12800	+	+	+	+	+	+	1/12800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/25600	+	+	+	+	+	+	1/25600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/51200	+	+	+	+	+	+	1/51200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/102400	+	+	+	+	+	+	1/102400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	-	-	-	-	-	-	NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

spülten und möglichst alkalifreien Gläsern gearbeitet werden darf. Natronlauge allein ohne Immuns Serum löst in stärkeren Konzentrationen (1 : 25 bis 1 : 400) die Bazillen auf, in schwächeren läßt sie dieselben unbeeinflußt. Natronlauge schädigt also das Agglutinogen selbst, infolge der eiweißlösenden Wirkung der Laugen, hat infolgedessen auf die erhitzten Bazillen denselben Einfluß wie auf die lebenden. Ganz ähnlich verhält sich auch Soda, schädigt also auch das Agglutinogen und stört dadurch die Reaktion.

Von Wichtigkeit schien es in diesem Zusammenhang noch, den Einfluß der Kochsalzkonzentration auf die  $X_{19}$ -Agglutination zu prüfen. Bordet (14) fand schon 1899, daß die Bakterien in einer salzfreien Lösung durch agglutininhaltige Sera allein nicht ausgeflockt werden, sondern daß die Gegenwart von Salz dazu erforderlich ist. Um die für die Ausflockung des Bazillus  $X_{19}$  notwendige Menge NaCl festzustellen, wurde folgender Versuch gemacht.

Von einem hochwertigen Fleckfieberserum (Titer gegen  $X_{19}$  1 : 25 600) werden Verdünnungen 1 : 500 hergestellt, die fallende Mengen Kochsalz enthalten, beginnend mit einer 0,8 Prozent NaCl enthaltenden Serumverdünnung; dazu wird ein Tropfen einer frischen  $X_{19}$ -Abschwemmung gegeben, die mit destilliertem Wasser hergestellt ist. Das Resultat der Agglutination nach zweistündigem Aufenthalt der Röhren im Brutofen geht aus Tabelle VI hervor.

Tabelle VI.  
Einfluß der Kochsalzkonzentration auf die Agglutinabilität der  $X_{19}$ -Bazillen.

Fleckfieberserum 1 cem Verdünnung	Kochsalzlösung	Aggl. nach 2 Std.
$\frac{1}{500}$ in	0.8 % = 1 : 125 NaCl	+++
"	0.4 % = 1 : 250 "	+++
"	0.2 % = 1 : 500 "	+++
"	0.1 % = 1 : 1000 "	+++
"	0.05 % = 1 : 2000 "	+++
"	0.025 % = 1 : 4000 "	+++
"	0.0125 % = 1 : 8000 "	+++
"	0.00625 % = 1 : 16000 "	+++
"	0.003125 % = 1 : 32000 "	—
"	dest. Wasser . . . . .	—

Die Agglutination trat also noch komplett ein, wenn die zur Verdünnung des Immuns Serum benutzte Kochsalzlösung weniger als den hundertsten Teil der physiologischen Kochsalzlösung enthielt (Verdünnung 1 : 16000). Es sind demnach nur Spuren von Kochsalz erforderlich, um die Agglutination auszulösen; diese sind aber erforderlich, wie die beiden folgenden Verdün-

nungen mit 1:32000 und destilliertem Wasser zeigen. Zu berücksichtigen ist natürlich noch die geringe Kochsalzmenge, die an sich in dem Serum jeder Verdünnung enthalten ist. Berechnen wir die physiologische Menge in 1 ccm Serum mit 0·8 Prozent =  $\frac{8}{1000}$  g, so haben wir im Kubikzentimeter der Verdünnung 1:500 0·000016 g natives Kochsalz, die den einzelnen Kochsalzverdünnungen noch zuzurechnen wären. Sie ist fast genau halb so groß wie die Kochsalzmenge in Verdünnung 1:32000 (0·000031 g), die schon nicht mehr zur Agglutination genügt hat (siehe Tabelle). Genau genommen ist also die letzte Verdünnung in destilliertem Wasser nicht ganz kochsalzfrei, sondern enthält 0·000016 g Kochsalz im Kubikzentimeter, das entspricht einer Verdünnung 1:62500. Die gleiche Kochsalzmenge wäre natürlich auch allen vorstehenden Serumverdünnungen zuzuzählen. Diese Berechnung der nativen Kochsalzmenge in der mit destilliertem Wasser hergestellten Serumverdünnung 1:500, die allein zur Agglutination nicht mehr ausreicht, ergibt also die vollkommene Übereinstimmung mit der experimentell als zur Agglutination erforderlich festgestellten Salzmenge.

In unserem Zusammenhang heißt es, daß Fehlerquellen durch Kochsalzmangel kaum je bei der Weil-Felixschen Reaktion entstehen können im Gegensatz zur Komplementablenkungsmethode, wo die hämolysierende Wirkung des destillierten Wassers eine ganz bedeutende Fehlerquelle darstellt. Sollte selbst einmal die Verdünnung der zur Weil-Felix-Reaktion eingesandten Sera anstatt mit physiologischer Kochsalzlösung unbeabsichtigt mit destilliertem Wasser vorgenommen sein, so genügt die Menge Kochsalz in dem einen Tropfen  $X_{10}$ -Suspension, der den Serumverdünnungen von 1 ccm zugefügt wird, vollkommen zur Auslösung der Agglutination. Dem entspricht auch die Berechnung: 1 Tropfen der  $X_{10}$ -Suspension in physiologischer Kochsalzlösung wird dann mit 1 ccm Serumverdünnung in destilliertem Wasser = 20 Tropfen verdünnt, es entsteht aus der 0,8 prozentigen NaCl-Lösung also 1 ccm einer 0,04 prozentigen Lösung oder eine Verdünnung des Kochsalzes 1:2500. Dabei ist die in dem Serum nativ enthaltene Menge, die bei stärkeren Serum-Konzentrationen nicht einmal ganz unbedeutend ist, nicht berücksichtigt. Ein Blick in unsere Tabelle lehrt ohne weiteres, daß die Kochsalzkonzentration 1:2500 noch längst zur Auslösung der Agglutination ausreichend ist, was auch durch einen dementsprechenden Versuch bestätigt wurde. Stellt man nämlich eine Fleckfieber Serumverdünnung 1:500 mit destilliertem Wasser her und gibt dazu einen Tropfen gewöhnlicher  $X_{10}$ -Suspension in NaCl-Lösung, so tritt komplette Agglutination nach zwei Stunden ein; sie unterbleibt nur, wenn auch die  $X_{10}$ -Abschwemmung mit destilliertem Wasser hergerichtet war. Nur dann kann der Kochsalzmangel die Rolle einer Fehlerquelle spielen. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Typhusbazillen-Agglutination durch Immuns Serum, nur daß hier die mindest erforderliche Kochsalzkonzentration etwas höher zu liegen scheint (1:8000); jedenfalls sind aber auch nur minimale Mengen von Kochsalz zur Ausflockung erforderlich.

Von weiteren Stoffen, die wir noch in ihrem Einfluß auf die Agglutinabilität der  $X_{19}$ -Bazillen untersucht haben, sei noch der Alkohol erwähnt. Fallende Mengen von Alkohol (1 : 50 bis 1 : 2000) der frischen  $X_{19}$ -Suspension zugegeben, hatten keinerlei störenden Einfluß auf die Agglutinabilität der  $X_{19}$ -Bazillen. Alkohol schädigt also die Agglutination nicht. Deshalb haben Bien und Sontag (15) sogar ein Dauerdiagnostikum hergestellt, das 33 Prozent absoluten Alkohol enthält.

#### Zusammenfassung:

1. Nach unseren Versuchen können Spuren von Sublimat ( $1/40000$  bis  $1/80000$ ), geringe Mengen von Phenol, Formalin die Agglutinabilität der  $X_{19}$ -Bazillen im Gegensatz zu Typhusbazillen vermindern oder vollkommen aufheben. Soda und Natronlauge stören die Reaktion, indem sie das Agglutino-gen selbst (die Bazillenleiber) angreifen. Kochsalz ist zur Agglutination nur in geringsten Mengen erforderlich, Alkohol stört die Reaktion nicht.

2. Die benutzten Pipetten, Reagenzgläser usw. dürfen daher nicht in Sublimat- oder Phenolbehälter gebracht werden, auch nicht mit Säuren oder anderen starkwirkenden Substanzen in Berührung kommen, da Säuren noch in starker Verdünnung eine unspezifische Agglutination vortäuschen. Es empfiehlt sich, die zur Weil-Felix-Reaktion gebrauchten Gegenstände besonders reinigen zu lassen, jedenfalls getrennt von den übrigen bakteriologischen Geräten. Es genügt einfaches Auskochen in Wasser und Trocknen im Trockenschrank. Pipetten können mit Alkohol und Äther behandelt werden.

3. Mit Rücksicht auf die Agglutinabilitätsschwankungen ist bei Verwendung der lebenden  $X_{19}$ -Bazillen zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers stets ein positives Serum als Kontrolle mitzubedenken, dessen Titer gegen  $X_{19}$  bekannt ist. Man wird dann vor groben Fehlern, die einmal durch völliges Versagen des Stammes entstehen können, gesichert sein.

## II. Vergleichende Untersuchungen mit lebenden und abgetöteten $X_{19}$ -Bazillen an Fleckfieber- und anderweitig Kranken.

Im Vorangegangenen wurde bereits festgestellt, daß die auf  $60^{\circ}$  und darüber erhitzten  $X_{19}$ -Bazillen ihre Agglutinabilität nicht so leicht durch äußere Schädigungen einbüßen, wie die lebende Kultur. Selbst 1 Prozent Sublimat, 2 Prozent Formalin und Phenol beeinträchtigen die Agglutinabilität der erhitzten  $X_{19}$ -Bazillen nicht. Es liegt daher sehr nahe, zur Ausschaltung der nicht immer übersehbaren Fehlerquellen die erhitzte  $X_{19}$ -Kultur an Stelle der frisch abgeschwemmten zu benutzen.

Csépai hat zuerst auf die besondere Eignung der erhitzten  $X_{19}$ -Bazillen zur serologischen Diagnose aufmerksam gemacht und danach unabhängig von ihm Sachs und Schiff.

Die Brauchbarkeit der erhitzten Bazillenabschwemmungen im Vergleich zur frischen Kultur sollte nun an einem größeren Material untersucht werden. Csépai hat seine Dauersuspensionen durch zweistündiges Erhitzen auf 60 bis 63°, Sachs durch einstündiges Erhitzen auf 80°, Schiff durch Erhitzen 2 bis 30 Minuten lang auf 100° hergestellt. Zunächst sollte an einigen sicheren Fleckfieberseren gezeigt werden, ob Unterschiede in der Agglutinabilität der nach obigen Angaben bereiteten Suspensionen bestehen unter Vergleich mit einer frischen  $X_{19}$ -Kultur. Die Abschwemmungen waren sämtlich so hergestellt, daß 18 bis 24stündige Schrägagarkulturen mit 2 ccm 0.5 Prozent Phenol enthaltender, physiologischer Kochsalzlösung abgespült und gemäß den obigen Angaben erhitzt wurden. Die Ablesung erfolgte nach 2stündigem (a), 8stündigem (b) und 20 bis 24stündigem (c) Aufenthalt der Röhrcn im Brutofen.

Tabelle VII.

Ein hochwertiges Fleckfieberserum, autitriert mit frischen und erhitzten  $X_{19}$ -Bazillen.

Fleckfieberserum I Verdünnung 1 ccm	$X_{19}$ frisch			60—63°			80°			100°		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
$1/_{900}$	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$1/_{1600}$	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$1/_{8200}$	+++	+++	+++	+	+++	+++	±	+++	+++	+	+++	+++
$1/_{6400}$	+++	+++	+++	—	+	+++	—	+	+++	—	+++	+++
$1/_{12800}$	±	+++	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	+	+++
$1/_{25600}$	—	±	±	—	—	±	—	—	±	—	—	+++
$1/_{51200}$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Es handelt sich in Tabelle VII um ein sehr hochwertiges Serum (Titer 1 : 25600 ±). Die Agglutination mit den erhitzten Suspensionen tritt langsamer ein, hat auch nach 8 Stunden ihren Höhepunkt noch nicht erreicht, wohl aber nach 24 Stunden; die auf 100° erhitzte Suspension ist um diese Zeit sogar noch um eine Stufe weiter agglutiniert als die übrigen Suspensionen. Im übrigen stimmen die Werte gut überein. Es dürfte sich im wesentlichen gleich bleiben, mit welcher Modifikation man arbeitet; das entscheidende Moment ist nur, daß die zur Herstellung des Diagnostikums benutzte

Kultur an sich gut agglutinabel ist und die Temperatur, bei der die Erhitzung vorgenommen wird, über der Abtötungstemperatur des Proteus X<sub>19</sub> liegt, also mindestens 60° beträgt, besser noch etwas übersteigt. Daß die Agglutination mit den erhitzten Suspensionen etwas langsamer eintritt, ist ein gewisser Nachteil gegenüber der frischen Kultur; dafür ist die Reaktion aber meist auch in den stärksten Verdünnungen mit der erhitzten Suspension deutlicher und leichter zu erkennen. Zu ähnlichen, aber nicht ganz so günstigen Resultaten sind auch Werner und Leoneanu (16) bei Benutzung der auf 80° erhitzten Bazillen gekommen. Das Verhalten derselben Suspensionen gegenüber einem anderen Serum ist in Tabelle VIII aufgezeichnet.

Tabelle VIII.

Ein weiteres Fleckfieberserum, austitriert mit frischen und erhitzten X<sub>19</sub>-Bazillen.

Fleckfieberserum II Verdünnung 1 ccm	X <sub>19</sub> frisch			62°			80°			100°		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1/500	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
1/1000	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
1/2000	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
1/4000	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
1/8000	+	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
1/16000	—	±	±	—	+	++	—	±	++	—	+	++
NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Auch hier gute Übereinstimmung; die erhitzten Suspensionen gehen alle um eine Stufe weiter als die frischen. Nach 2 Stunden ist aber mit diesem Serum und erhitzten Bazillen überhaupt noch keine Agglutination eingetreten. Die einzelnen Seren verhalten sich darin nicht immer ganz gleich; im endgültigen Resultat bestehen aber kaum je Unstimmigkeiten zwischen lebender und erhitzter Kultur, nur daß der Agglutinationstiter mit der letzteren oft verdoppelt ist. Die Verstärkung der Agglutinierbarkeit hat aber vielleicht einen Vorteil gegenüber geringwertigen Fleckfieberseren, also im Beginn der Erkrankung, da die Frühdiagnose mittels der Agglutinationsreaktion dadurch erleichtert werden kann. Im folgenden lassen wir noch eine Reihe von schwachen und starken Seren folgen, bei denen in gleicher Weise die Reaktion mit allen vier Suspensionen angestellt wurde (vgl. Tabelle IX).

Die Tabelle IX, die zusammen mit den beiden besonders aufgeführten Seren im ganzen 10 verschieden starke Sera von Fleckfieberkranken wieder-

Tabelle IX.

Acht verschieden starke Fleckfiebersera, ausstitriert mit frischen und erhitzten Tabellen.

Fleckfieber- serum Nr.	X <sub>19</sub> frisch			62°		
	a	b	c	a	b	c
853	+ 3200	+ 6400	+ 12800	+ 1600	+ 6400	+ 25600
886	+ 3200	+ 6400	+ 12800	+ 800	+ 6400	+ 12800
II	+ 1600	+ 3200	± 6400	± 1600	± 3200	+ 6400
925	± 400	+ 400	+ 400	+ 100	+ 400	+ 800
969	+ 100	+ 200	+ 400	+ 100	+ 400	+ 800
937	± 400	+ 400	+ 400	± 200	+ 400	± 1600
1049	+ 12800	+ 25600	+ 51200	+ 3200	+ 12800	+ 51200
1098	+ 400	+ 400	+ 400	+ 400	+ 800	+ 1600

Fleckfieber- serum Nr.	80°			100°		
	a	b	c	a	b	c
853	+ 1600	+ 6400	+ 25600	+ 1600	+ 6400	+ 25600
886	± 1600	+ 6400	+ 25600	± 1600	+ 6400	+ 12800
II	+ 800	+ 1600	+ 6400	± 320	+ 6400	± 25600
925	+ 100	+ 400	± 1600	+ 50	+ 400	+ 800
969	± 100	+ 400	+ 1600	+ 50	+ 200	+ 1600
937	+ 100	+ 400	± 1600	± 100	+ 400	± 1600
1049	+ 3200	+ 12800	+ 51200	+ 1600	+ 51200	± 102400(!)
1098	+ 400	+ 800	± 1600	+ 400	+ 1600	+ 1600

a = Ablesung nach 2 Std., b nach 8 Std., c nach 24 Std.

gibt, zeigt, daß es gleichgültig ist, mit welcher der drei erhitzten Suspensionen man arbeitet. Ganz allgemein ist die Reaktion bei allen Dauersuspensionen nach 2 Stunden noch nicht so weit wie mit der frischen Kultur, nach 24 Stunden aber meist bis zum doppelten oder vierfachen Titer des mit der frischen Aufschwemmung erreichten fortgeschritten.

In einigen Fällen ist die Agglutination mit der auf 100° erhitzten Kultur noch etwas weiter gegangen, als mit den andern Dauersuspensionen. Da es aber nicht regelmäßig der Fall ist, dürften hier zufällige Momente eine Rolle spielen, die teils mit dem Serum, teils mit dem gerade benutzten Stamm zusammenhängen. Von Wichtigkeit ist aber, daß die Erhitzung des Stammes auf 100° nicht zu kurz andauert. Schiff gibt 2 bis 30 Minuten als gleichwertig für die Agglutinierbarkeit der X<sub>19</sub>-Bazillen an, dabei muß aber mindestens darauf geachtet werden, daß die Suspension tatsächlich im Wasserbad selbst kocht; sonst reichen zwei Minuten nicht aus, um eine gut agglutinable Aufschwemmung zu erhalten. Im übrigen besteht nach meiner Erfahrung

kein Zweifel darüber, daß sich mit jeder der erhitzten Suspensionen gute Resultate erzielen und dadurch Fehlerquellen, die in der Veränderlichkeit der Agglutinabilität frischer Kulturen ihren Grund haben, ausschalten lassen. Die erhitzten Suspensionen, die wir benutzten, wurden etwa alle 10 Tage neu gemacht; außerdem wurde zum Vergleich mit einer 3 Monate aufgehobenen Dauersuspension gearbeitet, ohne daß eine Verminderung der Agglutinierbarkeit eingetreten war.

Um noch an einem größeren Material die Brauchbarkeit der erhitzten Aufschwemmung im Vergleich mit der frischen, täglich überimpften Kultur zu prüfen, wurden von Anfang April 1918 an sämtliche der Untersuchungsstelle zur Weil-Felixschen Reaktion übersandten Sera gleichzeitig mit der frischen Kultur und einer nach Csépai auf 60 bis 63° erhitzten, 0.5 Prozent Phenol enthaltenden X<sub>19</sub>-Abschwemmung untersucht. Es wurden im ganzen 296 Sera geprüft, von denen einige demselben Kranken entstammten.

Die Sera gingen uns teils vom Seuchenlazarett, teils von einem am Ort befindlichen Zivilspital zu. Die Kranken konnten also ständig klinisch kontrolliert werden. Von den Seren waren 144 positiv, die sämtlich klinisch einwandfreien Fleckfieberfällen angehörten. Die Agglutination mit der erhitzten Kultur war zwar durchweg etwas langsamer eingetreten, erreichte aber nach 24 Stunden oft das Doppelte der Titerhöhe, bis zu der die frische Abschwemmung agglutinierte. Die Agglutination wurde nach 2, 8 und 24 Stunden abgelesen. Dabei hat die erhitzte Suspension, das Dauerdiagnostikum, den Vorteil, daß in den starken Serumverdünnungen bzw. in noch agglutininarmen Seren die Häufchenbildung deutlicher ist, gröber im Vergleich zur frischen Kultur. Darauf hat bereits Sachs hingewiesen. Es entstehen dann bei der Beurteilung weniger Zweifel, ob es sich um die für Fleckfieber spezifische oder etwa um eine unkomplette Agglutination handelt, die dann und wann auch einmal bei anderen Seren auftritt.

Bei dieser Gelegenheit sei gleich bemerkt, daß die unspezifischen Reaktionen mit den erhitzten Bazillen häufiger eintreten als mit den lebenden. Unter den eingesandten Seren befanden sich 152, die Nichtfleckfieberkranken entnommen waren, teils absichtlich, teils unter den zur Weil-Felix-Reaktion eingesandten befindlich. Es ist kein Zweifel, daß die erhitzten X<sub>19</sub>-Bazillen gegenüber den im Fleckfieberserum enthaltenen Agglutininen empfindlicher sind als die lebenden Bazillen; dasselbe ist aber auch der Fall gegenüber den Normalagglutininen anderer Sera. Nun ist zwar die Art dieser unspezifischen Agglutination eine ganz andere; sie ist nie komplett, die Häufchen sind sehr fein, oft nur mit der Lupe deutlich erkennbar, die Flüssigkeit dazwischen ist nie geklärt, sondern auch nach längerem Stehen wolzig getrübt. Zudem tritt die unspezifische Reaktion meist erst nach 24 Stunden in Verdünnungen, die 1:100 übersteigen, auf. Die unspezifischen Agglutinationen sind also im allgemeinen gut von den spezifischen Fleckfieberreaktionen zu unter-

scheiden; immerhin darf man sie aber nicht ganz vernachlässigen, da sie gelegentlich auch dem Erfahrenen Zweifel verursachen können. Einzelheiten zeigt Tabelle X, in der 50 Kontrollsera aufgeführt sind, die in der Reihenfolge, in der sie der Untersuchungsstelle zugingen, mit frischer und abgetöteter Kultur zum Vergleich untersucht wurden.

Die Tabelle X umfaßt 50 Sera von Kranken, die nicht an Fleckfieber erkrankt waren und nach der Anamnese auch früher keine darauf deutende Infektion überstanden hatten. Trotzdem wurde feine Agglutination bei einer Reihe von Fällen beobachtet, mit dem frischen Stamm nach 2 Stunden 6 mal in Verdünnung 1:50 und 1 mal in Verdünnung 1:100; mit der erhitzten Suspension ging der letztere Fall (Serum Nr. 143) nach 2 Stunden sogar bis 1:400 inkomplett und ganz fein. Nach 8 Stunden (*b*) und nach 24 Stunden (*c*) sind Mitagglutinationen bis zur Verdünnung 1:100 und darüber noch in einer ganzen Reihe von Fällen eingetreten; nach 8 Stunden mit dem frischen Stamm 3 mal, mit dem erhitzten 9 mal, nach 24 Stunden mit dem frischen Stamm 9 mal, mit dem erhitzten 17 mal. Ein Blick auf die zu diesem Zweck wiedergegebene Tabelle lehrt am anschaulichsten, daß die nichtspezifischen Agglutinationen mit erhitzter  $X_{16}$ -Aufschwemmung entschieden häufiger sind als mit dem lebenden, frischen Stamm. Mit der gesteigerten Empfindlichkeit der erhitzten Suspension gegenüber Fleckfieberagglutininen geht also auch die Zunahme der Agglutinabilität gegenüber Nichtfleckfiebersera parallel. Liest man die Reaktion nach 2 bis 3 Stunden für den klinischen Gebrauch ab, so wird auch bei Benutzung erhitzter Bazillen kaum ein Fehler vorkommen, wenn man die komplette Agglutination in Verdünnung 1:200 erst als beweisend für Fleckfieber, in Verdünnung 1:50 und 1:100 als fraglich bezeichnet und letztere noch einmal wiederholen läßt. Aus dem Verhalten des Titers wird dann ohne weiteres in jedem Fall der richtige Schluß gezogen werden können.

Unter den 50 Fällen dieser Tabelle findet sich nur einer (Serum 143), bei dem unter richtiger Einhaltung der Versuchsanordnung ein Fehler möglich gewesen wäre. Es handelt sich um einen Fall von Paratyphus B mit schweren Lungenerscheinungen. Die Reaktion war nach 2 Stunden mit dem frischen Stamm 1:100, mit dem erhitzten 1:400, nach 8 Stunden 1:400 bzw. 1:800 positiv; die Agglutination fein und inkomplett. Bei Benutzung des frischen Stammes war auch hier kein Fehler möglich; das Resultat wurde als fraglich bezeichnet. Mit der erhitzten Suspension hätte die Höhe des erreichten Titers irreführend wirken können, wenn auch die Ausflockung ganz feinkörnig war. Die Reaktion wurde nach einigen Tagen wiederholt und fiel, wie ein Blick auf die Tabelle zeigt, vollkommen negativ nach 2 Stunden mit beiden Suspensionen, nach 8 und 24 Stunden in Verdünnung 1:50

Tabelle X.  
50 Sera Nichtfleckfieberkranker, untersucht mit frischen und erhitzten  $X_{19}$ -Bazillen.

Serum Nr.	Klinische Diagnose	$X_{19}$ frisch			Dauersuspension 62°			Bemerkungen
		a	b	c	a	b	c	
6	Pleuritis . . . . .	—	—	—	—	—	—	
8	Paratyphus B . . . . .	—	—	—	—	—	—	
9	Darmkatarrh. . . . .	—	—	—	—	—	+ 100f.	f. = feine Agglutination.
19	Paratyphus B . . . . .	—	—	—	—	—	—	
28	desgl. . . . .	—	—	—	—	—	—	
33	Darmkatarrh. . . . .	—	—	—	—	—	—	
44	? . . . .	—	—	—	—	—	—	
48	Ruhr . . . . .	—	—	—	—	—	—	
58	Paratyphus B . . . . .	—	—	+ 100f.	—	—	+ 200f.	
71	? . . . .	—	+ 50f.	+ 50	—	+ 50f.	+ 50f.	
72	Fieberhafte Erkrankung . . . . .	—	—	—	—	—	—	
73	Bronchialkatarrh . . . . .	—	—	—	—	—	—	
74	desgl. . . . .	—	—	—	—	—	—	
75	Malaria. . . . .	+ 50f.	+ 50f.	+ 50f.	+ 50f.	+ 50f.	+ 50f.	
76	Darmkatarrh. . . . .	—	—	+ 50f.	—	—	+ 50f.	
78	Paratyphus klin. . . . .	—	—	—	—	—	—	
81	Ruhr . . . . .	—	—	—	—	—	—	
84	desgl. . . . .	—	—	+ 50f.	—	—	+ 50	
88	Fieberhafte Erkrankung . . . . .	—	+ 50f.	+ 100f.	—	—	+ 50f.	
89	desgl. . . . .	—	—	—	—	—	—	
90	" . . . . .	—	—	—	—	—	—	
91	Typhus klin. . . . .	+ 50f.	+ 100f.	+ 100	+ 50f.	+ 100f.	+ 100f.	
92	desgl. . . . .	+ 50f.	+ 50f.	+ 100f.	+ 50f.	+ 100f.	+ 100	
99	Ruhr . . . . .	—	—	+ 50	—	—	+ 100	
103	desgl. . . . .	—	—	—	—	—	—	



positiv mit dem frischen, 1:100 mit dem erhitzten Stamm aus. Ein Irrtum war also auch hier nach der Wiederholung nicht mehr möglich; wie die gleichzeitig angestellte Widalsche Reaktion auf Typhus, Paratyphus A und B (siehe Tabelle) zeigt, handelt es sich um einen Organismus, der infolge der Infektion mit Paratyphus B-Bazillen überhaupt viele Nebenagglutinine gebildet hatte, darunter auch solche für den Proteus  $X_{19}$ .

Hornemann (17), Tschipeff und Fürst (18) haben schon darauf aufmerksam gemacht, daß besonders Sera von Paratyphuskranken nicht selten eine Agglutination mit dem Proteus  $X_{19}$  geben. Unter den untersuchten 152 Kontrollfällen befindet sich eine Reihe frischer Paratyphus A- und B-Fälle, bei denen die Bazillen im Blute, mittels Galle angereichert, nachgewiesen waren. Das Ergebnis der  $X_{19}$ -Agglutination mit diesen Seren ist in der Tabelle XI noch einmal übersichtlich zusammengestellt.

Aus dieser Zusammenstellung, die 19 Fälle von Paratyphus B und 11 Fälle von Paratyphus A umfaßt, geht hervor, daß nicht so selten im Serum Paratyphuskranker Agglutinine für den Proteus  $X_{19}$  gebildet werden. Von den 30 Seren Paratyphuskranker gaben insgesamt eine unspezifische Agglutination in Verdünnung 1:100 oder darüber

	mit der frischen $X_{19}$ -Suspension	mit der erhitzten
nach 2 Stunden	4	5
nach 8 Stunden	5	9
nach 24 Stunden	9	13

Der für Fleckfieber als beweiskräftig angesehene Titerwert von 1:200 wurde nach 2 Stunden mit der frischen Bazillenaufschwemmung in keinem Fall erreicht, mit der erhitzten zweimal (Serum 143 und 203). Bei längerem Stehenlassen der Röhren traten mit der frischen wie mit der erhitzten Suspension Nachagglutinationen ein, die öfter Werte von 1:400, einmal sogar 1:800 erreichten. Diese unspezifischen Reaktionen wurden häufiger bei Paratyphus B als bei Paratyphus A beobachtet.

Von den 152 Kontrollseren gaben im ganzen (einschließlich der 50 in Tabelle X angeführten und der 30 Paratyphussera) eine unspezifische Agglutination in Verdünnung 1:100 oder darüber

	mit der frischen $X_{19}$ -Suspension	mit der erhitzten
nach 2 Stunden	4	5
nach 8 Stunden	6	18
nach 24 Stunden	21	37

Der Titerwert 1:200 wurde nach 2 Stunden mit der frischen Suspension in keinem Fall, mit der erhitzten zweimal erreicht (vgl. vorher). Es haben

Tabelle XI.

19 Sera Paratyphus B-Kranker und 11 Sera Paratyphus A-Kranker, untersucht mit frischen und erhitzten X<sub>19</sub>-Bazillen.

Serum Nr.	Diagnose	X <sub>19</sub> frisch			Dauersuspension			Zeitpunkt der Blutentnahme
		a	b	c	a	b	c	
8	Paratyphus B	—	—	—	—	—	—	Nach Ablauf des Fiebers. desgl.
19	"	—	—	—	—	—	—	"
28	"	—	—	—	—	—	—	Kurz nach der Entfieberung. desgl.
58	"	—	—	+ 100	—	—	—	"
110	"	—	—	+ 100	+ 100	+ 200	+ 200	Auf der Fieberhöhe.
148	"	+ 100	+ 400	+ 400	+ 400	+ 800	+ 800	Derselbe nach 9 Tagen.
172	"	—	+ 50	+ 50	—	+ 100	+ 100	Auf der Fieberhöhe. desgl.
198	"	—	—	—	—	—	—	"
199	"	—	—	—	—	—	—	"
202	"	+ 50	+ 100	+ 100	+ 50	+ 205	+ 400	"
203	"	+ 100	+ 200	+ 200	+ 200	+ 200	+ 200	Derselbe nach 12 Tagen.
212	"	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	+ 200	+ 200	"
247	"	—	+ 50	+ 100	—	+ 100	+ 100	"
265	"	—	+ 50	+ 50	—	+ 50	+ 50	"
221	"	+ 50	+ 50	+ 400	+ 50	+ 100	+ 400	Auf der Fieberhöhe. desgl.
223	"	—	+ 50	+ 200	± 50	+ 50	+ 400	"
243	"	—	—	—	—	—	—	28 Tage nach der Entfieberung.
244	"	—	—	—	—	—	—	20 " " " "
245	"	—	—	—	—	—	—	16 " " " "
180	"	—	—	—	—	—	—	Auf der Fieberhöhe. desgl.
201	"	—	—	—	—	—	+ 50	"
211	"	—	—	—	—	—	—	"
213	"	—	—	—	—	—	—	"
231	"	—	—	+ 50	—	—	+ 50	"
276	"	—	+ 50	+ 50	± 100	± 200	± 400	"
404	"	—	—	—	—	—	—	"
725	"	—	—	—	—	—	—	"
802	"	—	—	—	—	—	—	"
806	"	—	—	—	—	—	—	"
864	"	+ 100	+ 200	+ 200	+ 100	+ 400	+ 400	"

a = Ablesung nach 2 Std., b nach .8 Std., c nach 24 Std.

also nur Sera Paratyphuskranker unter der Gesamtzahl der 152 Kontrollen derartige Werte erreicht. Umso mehr muß daran festgehalten werden, die Agglutination mit erhitzten Suspensionen in Verdünnung 1:200 nur dann für Fleckfieber als beweiskräftig anzusehen, wenn das Resultat nach längstens 2 bis 3 Stunden abgelesen wird. Mit dem frischen Stamm kann dabei nie ein Fehler gemacht werden, mit dem erhitzten nur, wenn man die feinflockige unspezifische Ausflockung von der grobflockigen, aus „Fetzen und Brocken“ [Oettinger (19)] bestehenden Fleckfieberagglutination nicht zu unterscheiden gelernt hat.

Die Paratyphusbazillen haben auch kulturell mit den Proteusbazillen eine gewisse Ähnlichkeit. (Paratyphus- und Proteusbazillen bilden Gas in Traubenzucker, röten die Lackmusmolke zunächst, Paratyphus B- und Proteusbazillen rufen dann nach 48 Stunden einen deutlichen Farbumschlag hervor; alle drei lassen Milchzucker in Barsieckowscher Nährlösung unverändert und können, abgesehen von der Verflüssigung der Gelatine durch Proteusbazillen schnell nur durch ihr differentes Verhalten gegenüber Mannit kulturell unterschieden werden. Mannit in Barsieckowscher Nährlösung bleibt vom Proteus unbeeinflusst, während Paratyphus A-Bazillen ihn unter Säurebildung, Paratyphus B-Bazillen unter Säure- und Gasbildung zerlegen [Wolff (20)]. Eine Mitagglutination infolge Verwandtschaft gewisser Antigenbestandteile der beiden Bazillenarten scheint uns bei den paratyphösen Erkrankungen das Wahrscheinlichste, nicht etwa eine Mischinfektion.

Neuerdings hat Popoff (21) behauptet, „daß die Agglutinationsreaktionen für die Differentialdiagnosestellung der Eberth'schen, paratyphösen und der Fleckfiebererkrankungen nicht zu verwerten sind. Diese Reaktionen zeigen sehr oft so große und so unerwartete Schwankungen, daß die wenigen Fälle, in welchen ihre Resultate tatsächlich mit den klinischen Feststellungen zusammenfallen, nicht maßgebend für ihre diagnostische Verwendung sein können“. Mag diese Behauptung auch für die Seradiagnostik des Typhus und Paratyphus eine gewisse Berechtigung haben, da infolge der häufigen Schutzimpfungen während des Krieges die Gruber-Widalsche Reaktion an diagnostischem Wert verloren hat, so trifft sie hinsichtlich der Beurteilung der Weil-Felix'schen Reaktion für die serologische Diagnose des Fleckfiebers keineswegs zu und stellt jedenfalls ein Novum unter der großen Zahl kritischer Äußerungen über den praktischen Wert dieser Agglutinationsreaktion dar.

Im vorstehenden wurde gezeigt, daß es bei richtiger Methodik im allgemeinen möglich ist, die durch die Sera Paratyphuskranker verursachten Mitagglutinationen auszuschalten, wenn auch zugegeben werden muß, daß die Beurteilung eines solchen Serums gelegentlich Schwierigkeiten machen kann.

Weiter macht Popoff den Einwand, gestützt auf Untersuchungen von Mühlens und Stojanoff (22), daß Fleckfiebersera nicht nur den Bazillus

X<sub>19</sub>, sondern auch wiederum Typhus- und Paratyphusbazillen so häufig mit-agglutinieren, daß der Wert der Weil-Felixschen Reaktion auch dadurch problematisch wird. Auch dieser verschiedentlich erhobene Einwand erscheint nicht gerechtfertigt, wenn man die Sera bis zum Endtiter auswertet. Nachstehend (Tabelle 12) einige Fleckfiebersera von nicht gegen Typhus geimpften Patienten der Zivilbevölkerung, austitriert gegen X<sub>19</sub>-, Typhus- und Paratyphusbazillen, deren Zahl wir beliebig erhöhen könnten.

Tabelle XII.

10 Fleckfiebersera, nicht gegen Typhus schutzgeimpften Patienten entstammend, austitriert gegen X<sub>19</sub>-, Typhus- und Paratyphusbazillen.

Fleckfieber- serum Nr.	X <sub>19</sub>			Typhusbazillen		
	a	b	c	a	b	c
853	+ 3200	+ 6400	+ 12800	+ 50	+ 50	+ 100
686	+ 3200	+ 6400	+ 12800	+ 100	+ 100	+ 200
II	+ 1600	+ 3200	± 6400	—	—	—
925	± 400	+ 400	+ 400	± 50	+ 50	+ 100
969	+ 100	+ 200	+ 400	—	—	—
1049	+ 12800	+ 25600	+ 51200	+ 100	+ 100	+ 200
1074	+ 1600	+ 1600	+ 3200	+ 50	+ 50	+ 100
1096	+ 400	+ 800	+ 800	+ 50	+ 100	± 200
1098	+ 400	+ 800	+ 800	± 50	± 50	+ 500
1102	+ 12800	+ 25600	+ 25600	+ 50	+ 100	+ 400

Fleckfieber- serum Nr.	Paratyphus A-Bazillen			Paratyphus B-Bazillen		
	a	b	c	a	b	c
853	—	—	—	—	—	—
686	—	—	—	± 50	+ 50	+ 50
II	—	—	—	—	—	—
925	—	—	—	—	—	—
969	—	—	—	—	—	—
1049	—	—	—	—	—	—
1074	—	+ 50	+ 50	+ 50	+ 50	+ 50
1096	—	—	± 100	—	± 50	± 100
1098	—	—	± 100	—	± 50	± 100
1102	—	—	—	—	± 50	± 200

Es ist gewiß, daß bei Typhusschutzgeimpften, die an Fleckfieber erkranken, eine höhere Ausflockung der Typhus- und Paratyphusbazillen beobachtet ist. Daß bei fieberhaften Erkrankungen eine alte Widalsche Reaktion wieder stärker positiv werden kann, ist schon öfter mitgeteilt worden, unter

anderen [Meinicke (23), Paneth und Schwartz (24), Cancik (25), Mühlens und Stojanoff (a. a. O.), Zlocisti (26), Elkeles (27)] auch von Weil und Felix (28) selbst, gleich im Beginn ihrer Entdeckung. Diese Mitagglutinationen können aber kaum je die primäre Bedeutung der  $X_{19}$ -Agglutination in Frage stellen, die beim Fleckfieber Titerwert erreicht, wie wir sie von anderen Immunitätsreaktionen kaum kennen.

Wägen wir die Vorteile und Nachteile bei Benutzung der frischen und erhitzten Kultur zur Anstellung der Weil-Felixschen Reaktion ab, so dürfen wir wohl sagen, daß sich die erhitzten Bazillen gut verwenden lassen. Die so hergestellte Dauersuspension ist längere Zeit haltbar und mindestens so gut agglutinabel wie der frische Stamm. Überall da, wo man ein gut eingerichtetes Laboratorium nicht zur Verfügung hat, also zum Gebrauch auf einer vom Laboratorium weit entfernten Seuchenstation oder an abgelegenen Orten bei Expeditionen u. dgl. wird man die Dauersuspension gut gebrauchen können; aber auch im Laboratorium dann, wenn man nicht imstande ist, die oft unübersehbaren äußeren Einflüsse zu beseitigen, die die Agglutinabilität der frischen  $X_{19}$ -Kultur von einem Tag zum anderen verändern können, wie im ersten Teil dieser Arbeit ausgeführt wurde. Der großen Unsicherheit infolge Versagens des frischen Stammes, die durch die in ihrer Agglutinabilität immer gleich bleibende erhitzte Suspension ausgeschaltet wird, steht als Nachteil der erhitzten Bazillen das langsamere Eintreten der Agglutination und die größere Empfindlichkeit auch gegen unspezifische Sera gegenüber.

#### Zusammenfassung:

1. Die Dauersuspensionen nach Csépai, Sachs und Schiff, die durch Erhitzen der  $X_{19}$ -Bazillen auf 60 bis 63, 80 und 100° unter Zugabe von 0.5 Prozent Phenol gewonnen werden, erwiesen sich bei Untersuchung von 144 Fleckfiebersera als mindestens so gut agglutinierbar wie die frische Suspension. Meist übertreffen sie aber deren Agglutinabilität sogar um das Doppelte bis Vierfache. Untereinander weisen sie keine nennenswerten Differenzen auf.

2. Die Agglutination tritt mit den erhitzten Bazillen langsamer ein, ist aber meist nach 2 bis 3 Stunden, immer nach 8 Stunden deutlich erkennbar. Die Agglutination selbst ist grobklumpiger und infolgedessen besonders in den starken Serumverdünnungen, bzw. in noch agglutininarmeren Seren leichter zu erkennen als die Häufchenbildung der lebenden Kultur.

3. An 152 Sera Nichtfleckfieberkranker, darunter 30 Sera Paratyphuskranker, wurde die Reaktion gleichzeitig mit lebenden und mit erhitzten Bazillen kontrolliert. Von diesen zeigten vier Sera von Paratyphuskranken

mit lebender, fünf Sera mit erhitzter Suspension inkomplette Agglutination in Verdünnung 1:100 schon nach 2 Stunden, während nach 8 und 24 Stunden noch in einer ganzen Zahl derartige unspezifische Mitagglutinationen eintraten, mit der erhitzten Kultur öfter als mit der lebenden. Der Titerwert von 1:200 wurde nach 2 Stunden mit der frischen Bazillenaufschwemmung in keinem Fall, mit der erhitzten zweimal erreicht.

4. Die unspezifischen Reaktionen lassen sich durch Einhaltung genauer Ablesungszeiten und durch Beachtung von Mindesttitern ausschalten. Komplette Agglutination in Verdünnung 1:100 nach 2 bis 3 Stunden macht die Diagnose Fleckfieber wahrscheinlich; ein Agglutinationstiter von 1:200 kann in allgemeinen als beweisend für Fleckfieber angesehen werden. Mit Rücksicht auf das gelegentliche Vorkommen solcher Titer, insbesondere bei Paratyphus, zumal wenn man die erhitzten Bazillen benutzt, sind jedoch Reaktionen, die nur bis zu dem angegebenen Werte gehen, nach einigen Tagen zu wiederholen. Ein gut geübter Beobachter wird allerdings solche unspezifischen Reaktionen in der Regel als nicht völlig komplett von echter Fleckfieber-Agglutination unterscheiden können. Eine zweite Ablesung ist in jedem Falle am nächsten Tage vorzunehmen.

5. Durch Verwendung der erhitzten Bazillen werden die Fehlerquellen ausgeschaltet, die durch Schwankungen in der Agglutinabilität der frischen Kultur entstehen können. Die erhitzten Bazillen sind infolge Fortfalls des thermolabilen Hemmungskörpers (Csépai) immer gleichmäßig agglutinabel, die lebenden nur dann, wenn man die zahlreichen hemmenden Einflüsse (siehe Teil 1) fernhalten kann; die Abschwemmungen erhitzter Bakterien sind nach der Herstellung auf ihre Agglutinabilität zu prüfen und können dann mehrere Wochen benutzt werden.

## Literaturverzeichnis.

1. Weil und Felix, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1916. Nr. 2, 28, 31.
2. G. Wolff, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1917. Nr. 48.
3. Fuchs, *Feldärztl. Bl. d. k. u. k. 2. Armee.* 1916. Nr. 16.
4. Otto, *Med. Klinik.* 1916. Nr. 44.
5. Dietrich, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1916. Nr. 51.
6. Csépai, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1917. Nr. 38 u. 40.
7. Schiff, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1917. Nr. 41.
8. Sachs, *Ebenda.* 1917. Nr. 31, 1918. Nr. 17.
9. Weltmann und Seufferheld, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1918. Nr. 52.
10. Schiff, *Münch. med. Wochenschrift.* 1919. Nr. 6.
11. Neuber, *Ebenda.* 1917. Nr. 21.
12. Schürer und Stern, *Ebenda.* 1917. Nr. 27.
13. L. Michaelis, *Die Wasserstoff-Ionenkonzentration.* Berlin 1914.
14. Bordet, *Annal. Past.* 1899, zitiert nach Höber: *Physikalische Chemie der Zelle.* Leipzig 1914.
15. Bien und Sontag, *Münch. med. Wochenschrift.* 1917. Nr. 43.
16. Werner und Leoneanu, *Ebenda.* 1918. Nr. 22.
17. Hornemann, *Mündliche Mitteilung.*
18. Tschipeff und Fürst, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1918. Nr. 28.
19. Oettinger, *Zentralbl. f. Bakt.* 1918. Bd. LXXX.
20. G. Wolff, *Ebenda.* 1918. Bd. LXXXI.
21. Popoff, *Med. Klinik.* 1918. Nr. 31.
22. Mühlens und Stojanoff, *Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene.* 1917. Nr. 21.
23. Meinicke, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1916. Nr. 40.
24. Paneth und Schwartz, *Archiv f. Hygiene.* 1917. Bd. LXXXVI.
25. Cancik, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1916. Nr. 49.
26. Zlocisti, 3. Beiheft zum *Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene.* 1918. Bd. XXII.
27. Elkeles, *Med. Klinik.* 1919. Nr. 18.
28. Weil und Felix, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1916. Nr. 31.