

Arbeit
aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Rostock
Vorstand: Prof. Dr. Wasielewski.

Das morphologische und biologische Verhalten der Diphtheriebakterien in Mischkultur.

Von

Dr. med. Akira Adachi.

(足 立 聰)

(Hygienisches Institut der Universität Nagoya.

Vorstand: Prof. Dr. S. Oba.)

Trotz zahlloser Untersuchungen über den Bau und die Lebensweise der Diphtheriebakterien sind unsere Kenntnisse über diese wichtigen Seuchenerreger noch keineswegs so geklärt, wie es ihrer praktischen Bedeutung entspräche. Die Differentialdiagnose bereitet dem gewissenhaften Untersucher immer wieder Schwierigkeiten, für deren Klärung der entscheidende Versuch- die Virulenzbestimmung im Tierversuch- aus wirtschaftlichen Gründen seltener als früher durchgeführt werden kann. Auch die systematische Stellung der Diphtheriebakterien ist noch keineswegs geklärt. Selbst in anerkannten Lehrbüchern finden wir z. T. aus älteren Werken übernommene Angaben, die nicht auf alle Diphtheriestämme zutreffen und der Aufklärung bedürfen.

Aus diesen Gründen wurden im Vorjahre von Nicolai experimentelle Untersuchungen begonnen, die aus äusseren Gründen und wegen der Schwierigkeit des Problems nicht zum vollen Abschluss gebracht werden konnten. Sie beschäftigten sich mit der Beeinflussung des Wachstums von Diphtheriebakterien auf künstlichen Nährböden durch Mischinfektion. Nicolai benutzte als Mass für diese gegenseitige Beeinflussung nur die Wachstumsenergie. Es bedürfen seine Versuche in dieser Beziehung noch einer Ergänzung. Ausserdem bespricht er als einen Nebenbefund das Auftreten anscheinend fadenbildender Diphtheriebakterienformen in diesen Mischkulturen, deren Echtheit durch Säure-

bildung und Giftigkeit im Tierversuch angeblich erwiesen wurde. Auch zu dieser Frage dürften weitere Versuche erwünscht sein.

Es ist schon von vornherein anzunehmen, dass bei Nebeneinanderwachsen mehrerer Bakterienarten eine gegenseitige Beeinflussung einsetzt, deren roheste Form das Überwuchern und Unterdrücken der einen durch die andere Art ist. Aber sie kann gewiss auch eine feinere sein, indem die Stoffwechselprodukte der verschiedenen Bakterien das Wachstum oder auch nur einzelne biologische Fähigkeiten gegenseitig hemmen oder fördern. Auf die Diphtheriebakterien angewandt kann das heissen, dass z. B. ihre Fähigkeit der Polkörnchen-, der Säure- oder Toxinbildung geändert, ihre Wuchsformen modifiziert werden können. Es sind dies nicht nur rein theoretische Erwägungen, sondern es liegen dem alte klinische Beobachtungen zugrunde, und es ist gewiss fraglich, ob die neben den Parasiten auf dem gleichen Nährboden wachsenden Keime nur schmarotzende Saprophyten sind und bleiben. Dês weiteren ist Klarheit in dieser Frage wichtig, weil bei der üblichen Art der bakteriologischen Diphtheriediagnosestellung mittels Schmierplatte die Möglichkeit eines Überwucherns der Diphtheriebakterien durch bestimmte Begleitbakterien beachtet werden muss.

Es wies schon Löffler (1884) auf das fast konstante Vorkommen von Streptokokken und Diphtheriebakterien bei Diphtherieerkrankungen hin, und es hat sich gezeigt, dass durch dieses gleichzeitige Vorkommen von Diphtherie und Streptokokken jene früher als septische Diphtherie gedeuteten Formen hervorgerufen werden können. Auch Roux und Yersin (1890) haben in ihren Arbeiten über Diphtherie darauf aufmerksam gemacht, und sie erzeugten auch experimentell bei Meerschweinchen mit schwach virulenten Diphtheriebakterien bei gleichzeitiger Streptokokkeninfektion schwer letal endende Diphtherie. Auch schwach virulente Diphtheriebakterien, herausgezüchtet aus der Impfstelle einer Mischinfektion, waren hoch virulent geworden. Sie meinten, so könnten auch andere Mundbakterien ausser den Streptokokken die Schwere der Diphtherieinfektion beeinflussen.

Weiter hat 1891 Barbier (zit. Funk) sich mit dieser Frage beschäftigt und gefunden, dass ein Streptokokkenstamm, den er aus einem Diphtheriefall züchtete, im Tierversuch giftiger war als der Diphtheriestamm selbst: die Streptokokkentiere starben nach 2-3, die Diphtherie-Meerschweinchen nach 2-5 Tagen. Auf der Vaginalschleimhaut eines Meerschweinchens riefen die Diphtheriebakterien keine, die Streptokokken allein leichte, aber beide Stämme zusammen starke Entzündungserschein-

ungen hervor. Arbeitete Barbier mit lebenden Bakterien, so benutzte v. Schreider 1893 alkoholgefällte Toxalbumine aus Kulturen, wobei er auch die aus Mischkulturen stammenden giftiger fand als solche aus reinen Diphtheriestämmen. Worauf die höhere Giftigkeit der Mischkulturen beruhe, suchte Funk (1894) zu beantworten. Entfalten die Streptokokken eine höhere Giftigkeit bei Zugesellung von Diphtherie oder umgekehrt die Diphtheriebakterien in Gegenwart der Streptokokken, oder wird durch das Streptokokkentoxin nur die Empfänglichkeit der Versuchstiere für das Diphtherietoxin gesteigert? Dazu gab er Meerschweinchen, die 24 Stunden vorher mit Antitoxin behandelt worden waren, subkutan eine Diphtherietoxinmenge, die von dem Antitoxin gerade neutralisiert wurde, und gleichzeitig an einer anderen Körperstelle lebende Streptokokken. Das Ergebnis war, dass gleichzeitige Streptokokkeninfektion die Meerschweinchen für das Diphtheriegift nicht empfänglicher machte. Gab er aber anstelle des Toxins lebende Diphtheriebakterien, so wurde trotz des Antitoxins ihre Giftwirkung anscheinend durch gleichzeitige Anwesenheit der Streptokokken gesteigert. Da aber weitere Versuche zeigten, dass durch die Streptokokken die spezifische Beeinflussung des Diphtherietoxins durch das Antitoxin in keiner Weise gestört wurde, so schliessen wir daraus, dass die scheinbar grössere Giftigkeit der Diphtheriebakterien nur dadurch zustande kommt, dass die Abwehrkräfte des Körpers sich auf zwei Infektionen verteilen müssen, und so die Diphtheriebakterien sich ungehemmter vermehren können.

Mya (1894) fand ebenfalls, dass eine gleichzeitige Streptokokken- im Gegensatz zu einer Staphylokokkeninfektion den Tod der Diphtherie-Meerschweinchen beschleunigte. Dagegen wirkte eine Mischung von Diphtheriebakterien und Pneumokokken nicht giftig, und Staphylokokken vor der Diphtherieinfektion gegeben erhöhten offenbar sogar die Widerstandskraft der Tiere. Demgegenüber sah Reuter (1919) eine gegenseitige Virulenzsteigerung von Diphtheriebakterien und Staphylokokken.

Schliesslich hat auch Bernheim sich zunächst 1894 mit dieser Frage beschäftigt. Einmal fand er dabei, dass in Diphtheriemischkulturen sich Diphtheriebakterien und Staphylokokken gut miteinander vertragen, ja dass auf Streptokokkenagar, von dem die alten Kolonien heruntergekratzt waren, Diphtheriebakterien sogar ein besonders üppiges Wachstum zeigten. Auch in Filtraten von Streptokokkenkulturen gediehen die Diphtheriebakterien gut, aber umgekehrt die Streptokokken in Diphtheriefiltraten schlecht. Weiter beobachtete er, dass bei Mischinfektionen mit Streptokokken die Diphtherieinfektion beim Meerschweinchen schwerer

verlief als eine einfache Diphtherie. Staphylokokken verschlimmerten die Krankheit nicht, ja injizierte er Staphylokokken und Diphtheriebakterien an ein und derselben Stelle, so verliefen die Infektionen zum Teil sogar milder. Diphtheriebakterien, die in Brühe, die abgetötete Streptokokken enthielt, gewachsen waren, fand er im Tierversuch giftiger als denselben Stamm aus reiner Brühe. Er hatte aber selbst beobachtet, dass Diphtherie auf streptokokkenhaltigem Material gut gedieh, es mussten also demnach auch von vornherein in diesen Kulturen mehr Diphtheriebakterien vorhanden sein. Dieser Fehler entging ihm. Aber einen anderen bemerkte er selbst, nämlich dass er mit den Diphtherietoxinen den Versuchstieren ja auch die Zerfallsprodukte der Streptokokken injizierte. Er wiederholte also 1897 seine Versuche, indem er abgetötete Streptokokken dem Diphtherienährboden beimischte. Die darauf gewachsenen Diphtheriebakterien waren nicht giftiger als die von den Kontrollröhrchen. Er hatte also bei seinen ersten Versuchen eine summierte Giftwirkung der Streptokokken und Diphtheriebakterien vor sich gehabt.

Auch v. Dungern (1896) und neuerdings Schley und S. Meyer (1919) beobachteten einen bösartigen Verlauf von Diphtherie bei gleichzeitiger Streptokokkeninfektion. Nach ihren Versuchen wurden aber die Streptokokken nicht virulenter, sondern die Diphtheriebakterien bestimmten den schlimmeren Krankheitsverlauf. Ob dem so ist, ist allerdings noch nicht geklärt, denn die diesbezüglichen Versuche von Hilbert (1898) und v. Dungern widersprechen sich in ihren Ergebnissen und Deutungen. Die Virulenzsteigerung der Streptokokken, die Hilbert erhielt, und die sich in Symptomen einer Streptokokkeninfektion zeigten, erklärt v. Dungern durch Herabsetzung der immunisierenden Kräfte des Tieres infolge der Doppelinfection, ohne die die Streptokokkeninfektion nicht eingetreten wäre.

Ladendorf griff 1921 diese Frage wieder auf und prüfte die Virulenzsteigerung avirulenter Diphtheriebakterien durch infektionstüchtige Streptokokken. Unter avirulenten Diphtheriebakterien versteht er solche von Bazillenträgern ohne irgendwelche Zeichen einer Erkrankung und von Dauerausscheidern nach einer Erkrankung. Das Gemisch von Diphtherie und Streptokokken wurde den Meerschweinchen subkutan injiziert. Diphtheriebakterien und Streptokokken von Dauerausscheidern wirkten einzeln ungiftig, vereint aber deletär. Ein anderer Streptokokkenstamm, der von einem nicht an Diphtherie Erkrankten stammte, wurde zwar in seiner Infektiosität durch Diphtheriebakterien offenbar gesteigert, erhöhte aber nicht die Virulenz der Diphtheriebakterien. Ganz eindeutig sind

auch diese und weitere Versuche nicht ausgefallen, was z. T. daran liegen kann, dass oft einige unvermeidbare Nährbodenpassagen genügen, um einen Diphtheriestamm in seiner Virulenz zu ändern, und als avirulent in diesen Versuchen nur die Stämme bezeichnet wurden, die am bazillentragenden Menschen keine Krankheitserscheinungen hervorgerufen hatten. Unsere Versuche zeigten uns auch, dass die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Stämme sehr ungleich sein kann.

Alle diese besprochenen Ergebnisse und Anschauungen gehen zwar noch sehr auseinander, aber man gewinnt im ganzen doch den Eindruck, dass die Virulenz der Diphtheriebakterien durch Zusammenwachsen mit Streptokokken gesteigert werden kann. Nicht unmöglich erscheint auch die Ansicht von Fahr (1916), dass durch die Mischinfektion ein modifiziertes Diphtherietoxin entsteht, gegen das das zur Behandlung verwendete Diphtherie-Antitoxin nicht mehr spezifisch ist. Ob umgekehrt eine Herabsetzung der Giftigkeit der Diphtheriebakterien durch irgendwelche Mischinfektionen möglich ist, ist bisher weniger untersucht. Von Staphylokokken, *bact. acid. lactic.*, *bact. pneumoniae* und *coli* wird, worauf wir später näher eingehen, behauptet, dass sie mehr oder minder stark hemmend auf das Diphtheriewachstum einwirken. Von den Staphylokokken und Pneumokokken meint Deussing (1919), dass sie einen starken, primär abschwächenden Einfluss auf das Diphtherietoxin haben.

Wegen des teuren Tiermaterials war es uns nicht möglich, die Toxizität von Mischkulturen im Tierversuch zu prüfen. Da die Giftigkeit der alkalischen bzw. sauren Reaktion der Bouillonkultursrn in gewissem Grade parallel gehen soll, so verwandten wir statt der Bestimmung der Toxizität die des Säuregrades und versuchten an seiner Änderung eine Beeinflussung der Diphtherie durch Mischbakterien zu beobachten. Bereits v. Schreider erwähnt ganz kurz derartige Versuche, die Zersetzung des Zuckers in Rein- und Mischkulturen zu messen. In beiden fand er sie nahezu konstant. Hilbert beobachtete, dass in Mischkulturen von Diphtherie und Streptokokken die alkalische Reaktion früher eintrat und höhere Grade erreichte als in reinen Diphtheriekulturen. Er meint, da die alkalische Reaktion der Giftigkeit parallel gehe, seien die Mischkulturen auch giftiger als die Reinkulturen. Mit Bernheim und im Gegensatz zu v. Dungern nimmt er an, dass der Grund der grösseren Giftigkeit im rascheren Wachstum der Diphtheriebakterien in der Mischkultur zu suchen sei, nicht dass die Toxinproduktion der einzelnen Stäbchen erhöht wäre.

Da v. Schreiders und Hilberts Versuchsergebnisse nicht über-

einstimmten, so griffen wir zunächst diese Frage erneut auf und untersuchten die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration in Rein- und Mischkulturen (Prot. I a-b).

Zu den Versuchen wurden Traubenzucker- und Peptonbouillon und verschiedene Diphtheriestämme benutzt, in keinem Fall trat aber eine erhebliche Beeinflussung des Säuregrades und des Umschlagens in alkalische Reaktion durch die Mischbakterien ein.

Als diese Untersuchungen zu keinem Ergebnisse führten, gingen wir dazu über, die Beeinflussung der Vermehrungsfähigkeit der Diphtheriebakterien durch Züchtung in Mischkulturen zu untersuchen und gleichzeitig zu sehen, ob in der Bildung der Polkörperchen und in den Wuchsformen Abweichungen unter diesen Bedingungen auftreten.

Zunächst haben wir die oben erwähnten Versuche von Bernheim dahin erweitert, dass wir untersuchten, ob die Beimischung von lebenden, nicht abgetöteten Bakterien zu dem festen Nährboden, auf den dann die Diphtheriebakterien geimpft wurden, deren Wachstum beeinflusste. Ein Protokoll über diese Versuche zu bringen, ist zwecklos, da sich in der Stärke des Wachstums von Diphtheriebakterien auf Mischbakterien und von Mischbakterien auf Diphtherie gegenüber den Reinkulturen kein bemerkenswerter Unterschied bei dieser Methode zeigte.

In den weiteren Versuchen schlossen wir uns der Technik von Nicolai an, indem wir auf Löffler-Serumplatten strichweise erst das eine und dann rechtwinklig dazu das andere Bakterium impften. Die Striche wurden in der 1. und 2. Versuchsserie (Prot. II-IV) in der Reihenfolge 1-3 gezogen, ohne dass die Öse zwischendurch neu beschickt wurde. In der ersten Serie wurden die Diphtheriebakterien über die anderen Bakterien, also zu Zweit ausgestrichen, in der zweiten war es umgekehrt. In die Protokolle wurde nur das Untersuchungsergebnis im mikroskopischen Präparat von bestimmten Punkten aufgenommen, die als Bruch nach der Nummer des zuerst und zu zweit angelegten Impfstriches bezeichnet wurden. Mit den Zahlen in den Protokollen bezeichnen wir die Reichlichkeit der in dem mikroskopischen Bilde vorhandenen Bakterienart. Es lässt sich so natürlich nur grob das zahlenmässige Verhältnis, in dem beide Bakterienarten in dem mikroskopischen Präparate zueinander stehen, feststellen, aber es genügt, um die dabei hervortretenden prinzipiellen Unterschiede im Wachstum zu kennzeichnen.

Prot. II und III zeigen, dass Staphylokokken, Coli, Milchsäure- und Friedländerbakterien das Wachstum der Diphtherie hemmen. Selbst wenn anfangs noch von jeder Art etwa gleich viel vorhanden gewesen

ist, so treten nach 48 und 72 Stunden die Diphtheriebakterien in den Präparaten bald stark zurück, ja sie können bisweilen überhaupt nicht mehr auffindbar sein. Dabei zeigen sich auch Unterschiede in der Stärke dieser Beeinflussung zwischen den einzelnen Stämmen.

An den Kreuzpunkten werden natürlich immer diejenigen Bakterien in der Mehrzahl sein, die zuletzt, also über die anderen, geimpft wurden, in Prot. III also mehr Mischbakterien als in Prot. II. Es zeigt sich auch, wie dieses Zahlenverhältnis bei der Aussaat das Ergebnis beeinflusst, indem bei Überzahl die Staphylokokken und Colibakterien bereits nach 48 Stunden die Diphtheriebakterien gänzlich unterdrückt haben. Während wir in Serie 1 und 2 von jeder Bakterienart eine Öse genommen hatten, benutzten wir in Serie 3 eine 5000000 Keime in ccm enthaltende Bakterienaufschwemmung zum Ausstreichen. Bei dieser dünnen Aussaat ist anscheinend das Mengenverhältnis für die Diphtherie günstiger, erst nach 144 Stunden ist sie den Colibakterien gewichen. Gegen Staphylokokken kommen die Diphtheriebakterien nur langsam auf, können sich aber dann neben ihnen halten (Prot. IV).

Socr wächst in Gegenwart von Diphtheriebakterien nur langsam; nach 24 Stunden gedeihen beide Arten gut nebeneinander. Das Gleiche gilt für Streptokokken und Diphtherie; doch könnte es nach Protokoll III den Anschein haben, als ob Streptokokken unter der Gesellschaft der Diphtheriebakterien leiden.

Eine feinere Abstimmung in dem Mengenverhältnis der Bakterien zueinander ermöglichte uns das folgende Verfahren.

Fährt man mit der Diphtherie-Öse auf der Löfflerplatte über die drei Striche der Mischbakterien, so nimmt man jedesmal auch Material von den Mischbakterien an der Öse mit, das beim Weiterimpfen dann auf dem Diphtheriestrich liegen bleibt. Es wachsen dann also auch zwischen den Kreuzpunkten Mischkulturen. Und zwar werden, je öfter wir mit der Diphtherie-Öse über den Impfstrich der Mischbakterien gefahren sind, desto mehr Mischbakterien sich unter den Diphtheriebakterien finden: im ersten Strich werden es am wenigsten, im letzten am meisten sein.

Wir untersuchten nun auf den Platten der 4. und 5. Serie die Impfstriche an den Stellen, wo sie keinmal, 4 und 8 mal (Prot. V) und wo sie 1-5 mal (Prot. VI) über die Mischkultur hinweggegangen waren.

Das Ergebnis ist, dass die Diphtheriebakterien, je stärker sie mit Staphylokokken, Coli, Milchsäure- und Freidländer Bakterien sich vermischen, desto mehr von den Mischbakterien zurückgedrängt werden, bis sie überhaupt mit Ausnahme der Friedländer-Mischkultur nicht mehr

nachweisbar sind. Soor und Streptokokken haben auch hier keinen schädigenden Einfluss auf die Diphtheriebakterien. Prot. VII gibt einen weiteren Versuch (Serie 6) wieder, bei dem die Diphtherie unverdünnt, die Mischbakterien aber verdünnt (eine Öse in 5 ccm Na Cl-Lösung) verwendet wurden. Und da auch hier die Resultate im wesentlichen die gleichen sind wie in den ersten Serien, so gewinnen die dort gewonnenen Ergebnisse an Zuverlässigkeit trotz der an sich groben Technik.

Wir ergänzten diese Versuche, die mit festen Nährböden und einer Kontrolle der Ergebnisse mittels gefärbten mikroskopischen Präparates arbeiteten, durch solche in flüssigem Nährboden und einer Kontrolle des Wachstums in ihm durch Verstreichen einer Öse daraus mit Drigalski-Spatel auf festem Nährboden, und zwar wurden zur Zählung der Diphtheriebakterien Tellurplatten, der Mischbakterien Agarplatten benutzt. Es boten diese Versuche auch den Vorteil, dass man quantitativ arbeiten, genau zählen konnte, in welchem Mengenverhältnis Diphtherie- und Mischbakterien zueinander standen (Prot. VIII u. IX; siehe auch Prot. I a Spalten II und III).

Es wurden Diphtherie- und Mischbakterien in Traubenzuckerbouillon geimpft und sofort diese Einsaat gezählt. $4-\pm$ bezeichnen die Stärke des Wachstums nach der Bebrütung, wobei $4 = \infty$, $\pm = < 10$ bedeutet. Die anderen Werte liegen dazwischen. Auch hier sind wieder nicht die absoluten Zahlen, sondern das Verhältnis beider Bakterien zueinander massgebend.

Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt im grossen und ganzen die auf festem Nährboden gewonnenen Befunde. Es fiel dabei auf, dass wiederholt die Diphtheriebakterien in Mischkultur mit Staphylokokken sich anfangs rascher vermehrten als in den Reinkulturen; an dem späteren Überwuchern durch die Staphylokokken änderte dieses anfänglich rasche Wachstum allerdings nichts. Prot. IX gibt einen Versuch wieder, bei dem Colibakterien mit fallenden Mengen Diphtheriebakterien zusammengebracht wurden, und derdeutlich den Einfluss des Mengenverhältnisses auf das Überwuchern auch in flüssigen Nährboden zeigt.

Überlicken wir unsere gesamten in Mischkulturen gewonnenen Ergebnisse, so sehen wir, dass uns die verschiedenen Versuchsanordnungen im wesentlichen immer wieder die gleichen Ergebnisse gebracht haben, die aber in einzelnen Punkten von denen Nicolais abweichen:

Am leichtesten vermag *Bact. Coli* die Diphtheriebakterien zu überwuchern, wobei es von dem quantitativen Verhältnis abhängt, wie lange es dauert, bis die Diphtheriebakterien im Präparat oder kulturell nicht

mehr nachweisbar sind. *Bact. Coli* und *acid. lact.* freilich spielen weder bei der Diphtherieerkrankung noch der Diphtheriediagnose eine Rolle, anders aber ist das bei Streptokokken, Staphylokokken, Soor und Friedländer. Soor und Streptokokken, das sagen uns unsere Versuche, werden uns bei dem zur bakteriologischen Diphtheriediagnose benutzten Schmierplattenverfahren nicht stören. Bei Staphylokokken und Friedländer aber kann es auf das Verhältnis von Misch- zu Diphtheriebakterien ankommen, ob uns ein Diphtherienachweis gelingt. Im akuten Krankheitsstadium werden allerdings meist genügend Diphtheriebakterien vorhanden sein, so dass ein Überwuchern nicht möglich ist. Im späteren Verlaufe der Krankheit und bei Bazillenträgern kann aber bei geringer Diphtheriebakterienzahl durch ein Überwuchern die Stellung der bakteriologischen Diagnose erschwert, sogar unmöglich werden.

Die Reagenzglasversuche besagen aber zunächst noch nichts über das Verhalten der verschiedenen Bakterien auf den Tonsillen zueinander. Die öfter beobachtete deletäre Wirkung der Streptokokken-Diphtherie-Mischinfektion beruht auf anderen im Reagenzglas nicht hervortretenden biologischen Faktoren. Klinische Beobachtungen über Mischinfektionen mit Soor sind unseres Wissens nirgends niedergelegt; nach den Reagenzglasversuchen scheinen sie ohne Belang. Anders liegen die Verhältnisse bei den Staphylokokken- und Pneumobakterienmischinfektionen, auf die wir kurz eingehen müssen. Eine günstige Beeinflussung der Diphtherieinfektion durch *staphylococcus pyogenes aureus* ist verschiedentlich beobachtet und von Schiötz (1909) und anscheinend unabhängig davon von de Witt (1912) therapeutisch zu verwerten versucht worden. Bei Friedländermischinfektionen sahen Gaté, Lebeuf und Papacostas (1922) einen leichteren Krankheitsverlauf, so dass Lesbre (1923) damit therapeutische Versuche machte. Der offensichtlich auch in unseren Reagenzglasversuchen vorhandene Antagonismus bestünde bei Pneumobakterien und Staphylokokken auch im infizierten Körper und liesse sich zu einer Verdrängungstherapie bei Diphtheriekranken und -Bazillenträgern ausnutzen. Mit der Schiötzschen Staphylokokken-Spraybehandlung hatten Catlin, Scott und Day (1911), F. L. Wright (1913) und Rolleton (1914) u. A. gute, Fay (1914) aber keine Erfolge. Diese Methode der Diphtheriebehandlung hat sich nicht eingebürgert, schon daraus lässt sich schliessen, dass sie nicht hielt, was sie versprach. Bei dem von Lesbre angegebenen Pneumobakterienverfahren fehlen noch Nachprüfungen. Er selbst erreichte damit 7-12 Tage nach dem Haften der Sekundärinfektion eine Entkeimung der Bazillenträger. Im Reagenzglas

wirkt der Antagonismus der Pneumobakterien etwa gleich stark wie der der Staphylokokken auf die Diphtheriebakterien. Auf der Schleimhaut zeigt sich der der Staphylokokken therapeutisch unwirksam, verhält sich der der Friedländerbakterien dort ebenso, so wird Lesbres Methode bald ebenso verschwinden wie die von Schiötz.

Bact. acid. lact. zogen wir deshalb mit in den Kreis eines Teiles unserer Versuche, weil Wood (1914) angab, durch Spraybehandlung mit ihm bei Diphtheriekranken gute Erfolge gehabt zu haben. Der Ausfall unserer Versuche würde mit diesen therapeutischen Erfolgen übereinstimmen.

Wie bact. acid. lact. so gehören auch die Colibakterien nicht zu unserer Mund flora, und doch versuchte van der Reis (1921) mit ihnen eine Verdrängungstherapie bei Diphtherie. Pesch und Zschokke (1922) griffen auch Nasendiphtherie mit der Reisschen Methode an, hatten aber keine Erfolge. In Reagenzglasversuchen hatte Reis bei geeigneter Dosierung die Diphtheriebakterien durch bact. coli in 15 Minuten "zum Verschwinden gebracht"; ebenso unklar sind die Angaben von Pesch und Zschokke, dass Coli in spätestens einer Stunde einen Diphtheriestamm verdrängt habe. Bei einem anderen Stamm gelang es ihnen allerdings nicht so rasch. Ein Blick auf unsere Protokolle zeigt aber, dass wir bei auf Nährböden beschränkten Versuchen mit den verschiedenen Methoden nie auch nur annähernd so rasch eine Verdrängung beobachtet haben.

Die Colibakterien gehören nicht zur Mundflora selbst, wenn man auch die darmeigenen Stämme nimmt, wie es van der Reis tat. Sie hätten sich dort schon längst angesiedelt, fänden sie in der Mund- und Rachenschleimhaut einen geeigneten Nährboden. So sind die biologischen Voraussetzungen dieser Verdrängungstherapie falsch und die experimentellen Grundlagen mit den unseren in erheblichem Widerspruch.

Es gelten die Ergebnisse solcher und auch unserer Versuche nur für die Verhältnisse im Reagenzglase. Sie sind zunächst praktisch nur wichtig für die Diphtheriediagnose, nicht für die klinische Erkrankung. Fanden wir in unseren Versuchen ein starkes Überwuchern der Diphtherie durch Staphylokokken, oder ging Nicolai von der Beobachtung aus, dass selten Diphtheriebakterien gefunden werden, wenn reichlich Staphylokokken auf der Schmierplatte gewachsen sind, so besagt das klinisch eben noch nichts und ist nur für die bakteriologische Diagnose wichtig. Erst grosse Versuchsreihen, die den klinischen Befund und Verlauf, sowie das Ergebnis der Untersuchung von Frischpräparaten und

Schmierplattenkultur miteinander vergleichen, können einwandfreien Aufschluss geben über den klinischen Einfluss einer Mischinfektion.

Des weiteren galten unsere Versuche der Frage, ob durch Wachsen in Mischkultur die Diphtheriebakterien morphologisch verändert würden, wobei wir die Frage nach der Virulenz solcher veränderter Formen unberücksichtigt lassen mussten. Es sei nur erwähnt, dass die alte Erfahrung, die Virulenz sei unabhängig von Morphologie und Polkörperchenbildung, durch neue Versuche von Jordan und seinen Mitarbeitern (1922) gestützt wird.

Was zunächst die zahlreichen Versuche, die wir über Polkörperchenbildung machten, anbelangt, so können die Ergebnisse kurz zusammengefasst werden: durch das Wachsen in Mischkulturen mit Streptokokken, Staphylokokken, Soor, Coli und Friedländerbakterien wurde in unseren Versuchen die Polkörperchenbildung weder zeitlich noch quantitativ beeinflusst.

Weitere morphologische Untersuchungen galten der Frage der Fadenbildung der Diphtheriebakterien in Mischkulturen, die in der Arbeit von Nicolai kurz gestreift wurde; Nicolai selbst wollte bei einem Diphtheriestamm ein fadenartiges Hineinwachsen in die Staphylokokken- und Soorkolonien beobachtet haben. Da dieser Diphtheriestamm nicht mehr vorhanden war, wiederholten wir Nicolais Versuche mit verschiedenen anderen Diphtheriestämmen und den auch in unseren sonstigen Versuchen benutzten Mischbakterien. Zu den Versuchen wurden die Bakterien in den verschiedensten Mengenverhältnissen auf Löfflerplatten kreuzweise übereinander, zum Teil auch dicht nebeneinander geimpft. Von den zu untersuchenden Stellen wurden nach 24–96 Stunden Klatschpräparate angefertigt, um die natürlichen Lagerungsverhältnisse möglichst zu erhalten.

Bei ihrer Durchmusterung konnten trotz eifrigsten Suchens vielleicht mit Ausnahme von zwei Präparaten nichts gefunden werden, was auch nur irgendwie an Fadenbildung erinnert hätte. Von einem fadenförmigen Hineinwachsen der Diphtherie in die Staphylokokken- und Soorkolonien konnte nicht die Rede sein.

Nur in zwei Präparaten beobachteten wir Diphtheriebakterienformen, deren kurze Beschreibung uns lohnend erscheint; durch welchen Zufall sie entstanden sind, wissen wir nicht. Wir haben trotz zahlreicher Versuche nie wieder ähnliche Formen erhalten können.

Der erste Versuch- betraf eine 48 Stunden alte Mischkultur von Diphtherie und Streptokokken. Neben allerdings wenigen völlig normal

aussehenden Diphtheriestäbchen fanden sich viele z. T. nur schwach färbbare, vielfach auch zarte Stäbchen und fadenförmige Gebilde. Letztere zeigten z. T. gute Körnchenbildung. Bisweilen hatten sie 10–20 und mehr metachromatische Körperchen. Meist lagen diese am Ende der langen dünnen Fäden, aber mitunter war ihre Verteilung auch sehr unregelmässig und die Fäden endeten nicht mit den Polkörnchen. Ihre Gestalt schwankte zwischen Kugel-, Ei- und Kurzstäbchenformen, bald waren sie gross, bald klein, bald nur zart gefärbt, meist gleicher Art innerhalb eines Fadens. Im ganzen also waren die Formen äusserst vielgestaltig, durch eine Kette von Übergängen miteinander verbunden.

Ein ganz ähnliches Bild boten die in einer Soor- Diphtherie-Mischkultur nach 48 Stunden aufgetretenen Formen, nur dass hier die Fäden kürzer waren. Bisweilen waren die metachromatischen Körperchen so zahlreich, und langen so dicht, dass man an Streptokokkenketten erinnert wurde; die Körperchen waren aber selten gleich gross. Hier wie im oben beschriebenen Präparate fanden sich Übergänge zwischen allen Formen. Bemerkenswert waren auch Riesenpolkörperchen, öfter von Spindelform, wenn die Stäbchen oder Fäden sich nach beiden Seiten fortsetzten, von Kolbenform, lagen sie am Ende des Bakteriums.

Eine Reinzüchtung der in beiden Soor- und Streptokokkenmischkulturen beobachteten Fadenformen war nach Anfertigung der Klatschpräparate nicht mehr möglich. Trotzdem wir mit einem alten, uns aus vielen anderen Versuchen wohlbekannten Bakterienstamm arbeiteten, können wir deshalb keinen exakten Beweis der Reinheit der Kultur geben. Eine Verunreinigung scheint uns deshalb wenig wahrscheinlich, weil wir alle Übergänge von den Formen typischer Diphtheriebakterien zu den Fadengebilden glauben beobachtet zu haben. Wenn andere Untersucher und auch wir in Reinkulturen unter bestimmten Verhältnissen gleiche Formen gezüchtet hätten, so könnte das unsere Befunde stützen.

Über fadenartiges Wachstum bei Diphtherie ist in der Literatur öfter berichtet worden.

E. Klein (zit. Kanthack) berichtete bereits 1890: "Viele Bazillen waren in Fäden ausgewachsen, manchmal von grosser Länge, versehen mit Knospen und Kolben entweder an den Enden oder von dem Ende selbst ausgehend", und er verglich die Befunde mit einem Mycelfungus.

In Deutschland war Fränkel (1895) wohl der erste, der Beobachtungen von Verzweigungen bei auf Löffler-Blutserum gewachsenen Diphtheriebakterien nachging. Er erhielt experimentell bei einem Drittel seiner Stämme Riesenwuchs und verzweigte Formen, liess er Diphtherie-

bakterien auf hartgekochtem Eiereiweiss wachsen. Abbildungen gibt Fränkel leider nicht. Abbott und Gildersleeve (1904) hatten wohl die gleichen Diphtherieformen vor sich. Sie erhielten dieses Wachstum auf saurem Eiernährboden. Manche der von diesen Forschern gezeichneten Formen beobachteten auch wir bei Kultivierung eines Diphtheriestammes auf hartgekochtem Eiereiweiss. Es zeigten sich da neben völlig normal aussehenden Diphtheriebakterien leicht färbare, keulenartige Gebilde, dickere Stäbchen, sowie unregelmässige Grösse und Lagerung der Babes-Ernstschen Körperchen. Eigentliche Fäden beobachteten wir allerdings nicht. Die nächste Passage auf hartgekochtem Eiereiweiss wies schon fast nur noch normale Formen auf. Ein solcher Eierstamm wurde nach drei Passagen wieder mit Mischbakterien auf Löffler Serum zusammengebracht, ohne dass er darin irgendwelche abnorme Formen zeigte.

Bernheim und Folger (1896) sahen in Diphtheriebelägen neben den normalen Diphtherieformen auch kürzere und längere Fäden. Da sie z. T. Verzweigungen aufwiesen, sprachen sie sie auf Grund der Fränkelschen Befunde als Formen der Diphtheriebakterien an. Ihre Züchtungsversuche sind sehr verschieden ausgefallen. Nur in einzelnen Fällen gelang eine Kultur, und nur aus einzelnen Kolonien konnten sie diese Fäden züchten. Eine Passage erreichten sie ebenfalls meist nicht. Diesen Beobachtungen möchten wir einen Befund von uns an die Seite stellen.

Auf einer mit Material von einem Diphtherieverdacht beschickten Löffler-Schmierplatte beobachteten wir einmal lange, mitunter durch das ganze Gesichtsfeld gehende Fäden. Wir glaubten zunächst einen fadenbildenden Diphtheriestamm vor uns zu haben, bis uns eine gewisse unregelmässige Lagerung der Polkörnchen auffiel: sie lagen öfters nicht am Ende der Fäden oder, was wichtiger ist, nicht in der Mitte der Stäbchen; sondern seitlich verschoben an einer Längsseite. Schliesslich gelang es, einen echten Diphtheriestamm von einem fadenbildenden Bakterium zu trennen, wie hatten es also mit einer Mischkultur zu tun gehabt. Brachten wir beide Bakterienarten wieder zusammen, so traten mitunter wieder die gleichen, scheinbar fadenartigen Diphtherieformen auf, wie in der Ausgangskultur. Um welche Bakterienart es sich dabei handelte, darüber sind Untersuchungen von Herrn Dr. Kirchner im Gange.

Es folgten die Arbeiten von Spirig (1899-1903). Dieser beobachtete auf alten Diphtheriekulturen feine kreideartige Auflagerungen, deren mikroskopische Untersuchung zeigte, dass sie aus typischen Diph-

theriestäbchen, daneben aber auch aus kokkenartigen Gebilden bestanden. Diese hatten verschiedene Grösse, lagen bald frei, bald im Inneren von unfärbaren Fäden, die homogen und unseptiert waren. Auf Löfflerserum verimpft wuchs ein dichtes Geflecht aus verzweigten unseptierten Fäden, die nicht menschen- und tierpathogen waren. Überführung in toxische Diphtherie gelang nicht. Er hält die Fäden nicht für eine der bekannten Streptothrixarten, sondern meint, da er eine Verunreinigung glaubt ausschliessen zu können, die Diphtheriebakterien stellten nur ein Entwicklungsstadium dieser von ihm gefundenen Aktinomycespezies dar.

Auch in einer späteren Arbeit gelingt ihm nicht ein lückenloser Beweis dafür, dass echte Diphtheriebakterien ein Luftmycel bilden, und damit bleibt es auch zweifelhaft, ob die beobachteten und abgebildeten Fäden eine Form des Diphtheriestäbchens sind.

Wir müssen also Zweifel haben, ob die von Spirig beobachteten fädigen Gebilde Löfflersche Stäbchen waren, denn sie zeigten keine Neisserfärbung und waren nicht pathogen.

In gleicher Weise ist eine kritische Zurückhaltung auch den Arbeiten Concettis (1901) gegenüber geboten. Die subakute Laryngitis, bei der er ein fadenbildendes "Diphtheriebakterium" fand, war für Diphtherie wenig charakteristisch, und die Heilung auf Injektion von Antitoxin hin, die er als einen Beweis für die Diphtherienatur seiner Bakterien heranzieht, war so langsam, dass sie nicht überzeugend auf das Antiserum zurückgeführt werden kann. Sie dauerte einen Monat, gleichzeitig wurde lokal mit Formalin behandelt. Die Diagnose wurde nach einem Neisser-Präparat gestellt. Aus seinen Abbildungen gewinnt man den Eindruck, dass es sich wohl um eine Mischkultur gehandelt hat, aus der er dann durch Züchtung unter sog. anaeroben Verhältnissen in Stichtkultur toxische nie wieder fadenbildende Diphtheriebakterien züchtete. Nach unsrer Meinung wurden sie nur durch dieses Züchtungsverfahren von den sie verunreinigenden fadenbildenden Bakterien (Leptothrixfäden?) getrennt.

Es besteht in Frischpräparaten die Gefahr einer Verwechslung mit ebenfalls Polfärbung zeigenden Stäbchen, worauf Gins (1913), Heymann und Landau (1916) u. A. hinwiesen, die wahrscheinlich zu den Leptothrixarten gehören. Auch der von Serkowski (1915) beschriebene *bac. seu granulobac. putrif. nov. sp.* kann vielleicht ... doch liegen nähere Untersuchungen noch nicht vor ... zur Ursache von Irrtümern werden. Frischpräparate allein sind, da Polkörnchen tragende Stäbchen auch sonst in der Mundhöhle gefunden werden, nur ein Hilfsmittel bei der Diph-

theriediagnose, nie beweisend.

Wie steht es aber mit der Züchtung? Wäre sie leicht, so müssten derartige Fäden die Diphtheriediagnose schon oft gestört haben: das ist nicht der Fall. Im Gegenteil zeigen die Untersuchungen Landaus, dass eine Züchtung selten gelingt, besonders wuchsen seine diphtherie-ähnlichen Stäbchen auf Löfflerserum schwer. Es fiel Landau auch auf, dass dann bereits in der ersten Generation die Fäden seltener waren. Er sah alle Übergänge von Fäden zu diphtheriebakterienähnlichen Stäbchen und beobachtete allmähliche Umwandlung in beiden Richtungen. Heymann vermutete, die fadenbildenden Mikroorganismen seien zu meist anaerob zur Leptothrixgruppe gehörend. Landaus Stäbchen wuchsen anaerob nicht. Kulturell verhalten sie sich auch anders als das von Serkowski beschriebene Bakterium. Beide sind also nicht mit ihm identisch.

Eine Sichtung des vorliegenden Materials ist zunächst noch nicht möglich, und es ist schwer, einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Gebilden zu finden. Bei Spirig und Concetti scheint es uns fraglich, ob sie mit Reinkulturen gearbeitet haben. Es könnte sich um eine Verunreinigung mit diphtherieähnlichen fadenbildenden Mundbakterien handeln, wobei wir offen lassen müssen, ob es Leptothricheen oder Serkowskische Stäbchen waren. Derartige Bakterien wurden von Bernheim und Folger, Gins und Landau in Frischpräparaten beobachtet und z. T. auch herausgezüchtet. Klein, Fränkel, Abbott und Gildersleeve hatten aber allem Anscheine nach fadenbildende Diphtheriestämme vor sich und unter bestimmten Verhältnissen gezüchtet.

Es besteht also immerhin die Möglichkeit, dass Nicolai und auch wir in unseren Mischkulturen fadenbildende Mutationen vor uns hatten. Zu einem abschliessenden Urteil konnten wir aber noch nicht gelangen; zumal das Auftreten dieser Formen noch vom Zufall abhing, wir sie noch nicht willkürlich hervorrufen konnten. Nach den Arbeiten von Schmitz (1916) und Almquist (1918) scheint die Wandlungsfähigkeit in der Diphtheriegruppe, um deren Morphologie der Streit noch nie zur Ruhe gekommen ist, recht gross zu sein und der Forschung noch ein weites Feld offen zu stehen.

Fassen wir die bisher gewonnenen Ergebnisse über die Frage der morphologischen und biologischen Beeinflussung der Diphtheriebakterien durch Wachsen in Mischkultur zusammen, so ergibt sich folgendes:

1) Säure- und Polkörperchenbildung bei Diphtherie werden in

Mischkulturen mit Staphylokokken, Streptokokken, Coli, Soor und Friedländerbakterien nicht beeinflusst.

2) Die klinische Beobachtung einer Verstärkung der Virulenz von Diphtherie durch Mischinfektion fand in unseren Versuchen keine Begründung.

3) Die bakteriologische Diphtheriediagnose kann durch eine reiche Mitaussaat von Staphylokokken und Friedländerbakterien erschwert werden: Streptokokken und Soor stören bei ihr nicht.

4) Die Verdrängungstherapie bei Diphtherie-Bazillenträgern durch Coli und *Bact. acid. lact.* wird aus biologischen Gründen abgelehnt, wenn auch ein Antagonismus dieser Bakterienarten gegen Löfflerstäbchen vorhanden ist. Besser begründet scheint nach unseren Versuchen die Staphylokokken- und Pneumobakterien-Spraybehandlung. Klinisch hat sich die erste angeblich nicht bewährt, über die letztere fehlen noch genügend Erfahrungen.

5) Es wird als möglich angesehen, dass unter noch unbekanntem Verhältnissen in Mischkulturen mit Soor und Streptokokken eine Fadenbildung bei Diphtheriebakterien auftritt.

Zum Schlusse der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor v. Wasielewski für die Erlaubnis, diese Untersuchungen im Hygienischen Institut der Universität Rostock ausführen zu dürfen, und Herrn Privatdozent Dr. Winkler für seine Ratschläge bei der Ausführung der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Protokoll Ia.

Kultur in Traubenzuckerbouillon	I Wasserstoffzahl nach Stunden:					II 1) auf Tellur- und Agarplatte				III im mikr. Präp.			
	24	72	120	216		24	72	120	216	24	72	120	216
Di Stamm 6895	5,0	4,6	4,2	4,6	Di	2	2	2	2	I	2	3	3
Di+Strept.	5,2	4,8	4,4	4,4	Di	2	2	2	2	I	2	2	2
Strept.	6,8	4,4	4,4	4,4	Str	2	2	2	2	I	2	2	2
Di+Staph.	5,0	4,6	4,6	4,6	Str	4	4	4	4	2	3	2	2
Staph.	5,4	4,2	4,2	4,0	Di	2	2	2	2	I	I	I	I
Di+Coli	4,4	4,2	4,4	4,4	Sta	4	4	4	4	2	4	4	4
Coli	4,6	4,4	4,4	4,4	Sta	4	4	4	4	4	4	4	4
Di+Soor	5,0	4,4	4,6	4,8	Di	1	±	±	±	I	2	I	±
Soor	5,4	5,2	5,2	5,4	Co	4	4	4	4	3	4	4	4
Di+Friedl.	4,8	4,6	4,8	4,8	Co	4	4	4	4	4	4	4	4
Friedl.	5,2	4,8	4,8	4,8	Di	2	2	2	3	I	2	2	3
Bouill.	7,2	—	—	—	So	—?	I	I	I	I	I	I	I
					So	I	2	2	2	I	I	4	4
					Di	2	±	±	±	±	I	I	±
					Fr	4	4	4	4	4	4	4	4
					Fr	4	4	4	4	4	4	4	4

1) cf. S. 14.

Protokoll Ib.

Kultur in Peptonbouillon	Wasserstoffzahl nach Tagen				
	1	3	5	8	14
Di Stamm 6690	6,8	6,8	7,0	7,0	8,1
Di+Strept.	7,0	7,0	7,2	7,6	7,7
Strept.	6,8	7,2	7,2	8,0	8,0
Di+Staph.	6,8	7,0	7,4	8,0	8,2
Staph.	6,8	6,8	7,4	7,8	8,1
Di+Coli	6,8	7,0	7,6	8,0	8,2
Coli	6,8	7,4	7,8	8,2	8,2
Di+Soor	6,8	7,0	7,4	7,6	7,3
Soor	7,0	7,0	7,4	7,6	7,8
Di+Friedländer	6,8	7,0	7,4	8,0	8,3
Friedländer	7,2		7,6	8,0	8,2
Bouillon	7,4				

Protokoll II.

Kreuzweises Impfen von Di über Mischbakterien
Untersucht Kreuzpunkt $\frac{2}{2}$.

Mischkultur Di mit:		Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von:		Di	Sta	Di	Str	Di	Co	Di	So	Di	Fr.	Di	a. l.
A. Di-Stamm 6895	nach Stnd.												
	24	2	3	4	±	3	4	I	±	2	3	2	4
	48	2	4	4	±	2	4	2	2	±	4	—	4
	72	I	4	4	±	2	4	2	2	±	4	—	4
B. Di-Stamm 817	24	I	4			I	4	4	±				
	48	I	4			I	4	4	±				
	72	±	4			—	4	4	I				

Protokoll III.

Kreuzweises Impfen von Mischbakterien über Di
Di-Stamm 6895. A. Kreuzpunkt $\frac{2}{2}$
B. Kreuzpunkt $\frac{2}{3}$

Mischkultur Di mit:		Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von:		Di	Sta	Di	Str.	Di	Co	Di	So	Di	Fr.	Di	a. l.
A. Nach 24 Stnd.		I	4	4	I	I	3	4	±	I	4	I	4
	" 48 "	±	4	4	I	±	4	4	±	±	4	I	4
	" 72 "	±	4	4	I	—	4	4	I	±	4	—	4
B. Nach 24 Stnd.		I	4	3	2	2	3	4	I	±	4	2	4
	" 48 "	—	4	4	±	—	4	4	I	±	4	±	4
	" 72 "	—	4	4	±	—	4	4	I	±	4	—	4

Protokoll IV.

Kreuzweises Impfen von Di über Mischbakterien,
je 1 Öse einer Verdünnung 50 Mill. in 1 ccm.
Untersucht Kreuzpunkt $\frac{1}{1}$.

Mischkultur Di mit:		Staph.		Strept.		Coli		Soor		Friedl.		acid. lact.	
Wachstum von:		Di	Sta	Di	Str.	Di	Co	Di	So	Di	Fr.	Di	a. l.
nach 24 Stunden		—	I	±	I	I	I	I	±	I	2	I	I
" 48 "		—	I	I	I	±	I	I	I	I	2	±	I
" 72 "		±	I	I	I	±	I	I	I	±	2	±	I
" 96 "		±	I	I	I	±	I						
" 144 "		±	I	I	I	—	I						

Protokoll V.

Di +	Wachstum von	Der Di-Impfstrich ging über die Mischbakterien									Std.
		o mal			4 mal			8 mal			
Staph.	Di Staph.	4	4	4	±	±	±	±	+	—	
	—	—	—	4	4	4	4	4	4		
Strept.	Di Str	4	4	4	I	±	±	±	±	±	
	—	—	—	4	4	4	2	4	4		
Soor	Di Soor	4	4	4	3	4	4	3	4	4	
	—	—	—	I	3	4	I	4	4		
Coli	Di Coli	4	4	4	I	—	—	I	—	—	
	—	—	—	4	4	4	4	4	4		
Friedländer	Di Fr	4	4	4	I	±	2	I	I	I	
	—	—	—	4	4	4	4	4	4		
	nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72	

Protokoll VI.

Di +	Wachstum von	Der Di-Impfstrich ging über die Mischbakterien								Di-Stamm
		o mal	1 mal	2 mal	3 mal	4 mal	5 mal			
Staph.	Di Sta	4 4 4	I I I	I I ±	I + +	I — —	— — —	— — —	6895	
	—	— — —	2 4 4	3 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4		
Strept.	Di Str	2 2 2	I I I	I I I	I I I	I I I	I I I	I I I	6895	
	—	— — —	I I I	I I I	I I I	I I I	I I I	I I I		
Coli	Di Co	2 4 4	I I ±	± ± ±	± ± ±	± ± ±	?	— — —	6895	
	—	— — —	2 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4		
Soor	Di So	2 4 4	3 4 4	2 4 4	2 4 4	2 4 4	2 4 4	2 4 4	6895	
	—	— — —	I 2 2	I 2 2	I 2 2	I 2 2	I 2 2	I 2 2		
Friedl.	Di Fr	4 4 4	2 I I	I I I	I I I	I ± ±	I ± ±	± ± ±	817	
	—	— — —	3 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4		
B. acid. lact.	Di ac. l.	4 4 4	3 2 I	3 I I	3 I ±	3 I ±	3 I ±	3 I ±	6690	
	—	— — —	3 4 4	3 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4		
Strept.	Di Str	4 4 4	2 4 4	2 3 4	2 3 3	2 2 2	— — —	— — —	817	
	—	— — —	± I ±	2 2 ±	2 2 2	2 2 2	— — —	— — —		
	nach	24 48 72	24 48 72	24 48 72	24 48 72	24 48 72	24 48 72	24 48 72	Std.	

Protokoll VII.

Di +	Wachstum von	Der Di-Impfstrich ging über die Mischbakt. (I Öse in 5 ccm Na Cl-Lösung)				
		o mal	1 mal	2 mal	3 mal	4 mal
Staph.	Di Sta	2 4 4	I I +	? — —	± — —	— — —
	—	— — —	I 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4
Strept.	Di Str	3 4 4	3 4 4	3 4 4	3 4 4	3 4 4
	—	— — —	± ± ±	± ± I	I I I	I 2 2

Di +	Wachstum von	Der Di-Impfstrich ging über die Mischbakt. (1 Öse in 5 ccm Na Cl-Lösung)														
		o mal			1 mal			2 mal			3 mal			4 mal		
Coli	Di	2	4	4	±	±	±	±	—	—	±	—	—	±	—	—
	Co	—	—	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Soor	Di	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	So	—	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Friedl.	Di	4	4	4	2	3	1	1	2	1	1	1	±	1	1	—
	Fr.	—	—	—	2	4	4	2	3	4	3	4	4	4	4	4
	nach	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72

Stunden

Protokoll VIII.

Di +	Einsaat Di: Mischb:	Wachstum von	Wachstum in Traubenzuckerb.				nach Std.	Di- Stamm
			24	48	72	96		
Staph.	150:170	Di	4	3	±	±		6895
		Sta	4	4	4	4		
"	50:220	"	3	3	2	1		817
		"	4	4	4	4		
Strept.	150:20	Di	1	±	1	1		6895
		Str	1	1	2	2		
"	275:275	"	2		2	2		817
		"	1		2	1		
Coli	150:100	Di	2	2	1	1		6895
		Co	4	4	4	4		
"	30:30	"	±		±	—		817
		"	4		4	4		
Soor	150:100	Di	1	4	4	4		6895
		So	2	4	4	4		
"	275:350	"	3		3	3		817
		"	±		3	3		
Friedl.	275:175	Di	±		2	1		817
		Fr.	4		4	4		
B. acid. lact.	50:50	Di	4	2	±	±		6895
		a. l.	4	4	4	4		

Protokoll IX.

Bact. coli + Di in fallenden Mengen in Traubenzuckerbouillon.

Einsaat	Wachstum von	Wachstum nach Stunden			
		24	48	72	96
∞ : ∞	Di	4	4	4	4
	Co	4	4	4	4

∞ : 750	Di	4	4	4	1
	Co	4	4	4	4
∞ : 175	"	1	1	1	—
	"	4	4	4	4
∞ : 23	"	1	—	—	—
	"	4	4	4	4

Literatur.

- Abbot, A. C. u. Gilderleeve, N.,** On the branching occasionally exhibited by Bacillus diphtheriae. C. f. B. 35 1904 S. 273.
- Almquist, W. u. Koraen, S.,** Studien über Biologie und Wuchsformen der Diphtheriebakterie. Ztschr. f. Hyg. 85. 1918 S. 347.
- Bernheim, J.,** Über die Mischinfektion bei Diphtherie. Ztschr. f. Hyg. 18. 1894 S. 529.
" " Über die Rolle der Streptokokken bei der experimentellen Mischinfektion mit Diphtheriebazillen. Arch. f. Hyg. 28. 1897. S. 133.
- Bernheim, J. u. Folger, C.,** Über verzweigte Diphtheriebazillen C. f. B. 20. 1896. S. 1.
- Catlin, Scott u. Day,** Successful use of the staphylococcus-spray on diphtheria carriers. Journ. of the Americ. med. Assoc. Bd. 67 1911. S. 1952. Ref. C. B. R. 52. 1911 S. 249.
- Concetti, L.,** Über die aktinomykotische Form des Löfflerschen Bacillus in gewissen Zuständen saprophytischen Lebens. Arch. f. Kinderheilkde. 31. 1901. S. 227.
- Deussing, R.,** Zur Kenntnis der Mischinfektion bei Diphtherie. Ztschr. f. Hyg. 88. 1919. S. 346.
- v. Dungern,** Steigerung der Giftproduktion des Diphtheriebazillus. Ztschr. f. Bakt. 1896. 19. S. 137.
- Fahr, Th.,** Beiträge zur Diphtheriefrage. Virch. Arch. 221. 1916. S. 38.
- Fay, J.,** Staphylokokkusspray bei Diphtheriebazillenträgern. California Stat. Journ. of Med. 5. 1913. (Ref. C. B. R. 1914. 60. S. 371).
- Fränkel, G.,** Eine morphologische Eigentümlichkeit des Diphtheriebazillus. Hyg. Rdsch. 8. 1895. S. 349. (Ref. C. f. B. 17. 1895. S. 896).
- Funk,** Experimentelle Studien über die Frage der Mischinfektion bei Diphtherie. Ztschr. f. Hyg. 17. 1894. S. 467.
- Gaté, Lebeuf et Papacostas,** Fréquence relative dans les angines de l'association "Bacille de Löffler-Pneumobacille". Cpt. rend. biol. 86. 1922 S. 929. (Ref. Cbl. f. d. ges. Hyg. II. 1922. S. 224.)
- Gins,** Zur Färbung der Diphtheriebazillen. D. m. W. 1923. Nr. 11. S. 502.
- Heymann, B.,** Diskussionsbemerkung zu dem Vortrage von Mühsam über Behandlung der Diphtheriebazillenträger. B. kl. W. 1916. Nr. 24 S. 964.
- Hilbert,** Über die Steigerung der Giftproduktion der Diphtherie. Ztschr. f. Hyg. 1898. 29. S. 157.
- Jordan, J. H., Smith u. Kingsbury,** Pathogenicity of the Diphtheriagroup. The Lancet. 1922. 18. Nov.- S. 1052.
- Kanthack, A. A.,** Über verzweigte Diphtheriebazillen. C. B. I. 20. 1896. S. 296.
- Ladendorff,** Über die Steigerung der Giftwirkung klinisch avirulenter Diphtheriebazillen durch die Symbiose mit Streptokokken bei Meerschweinchen. Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere 22. 1911. S. 151.

- Landau, H.,** Über diphtherieähnliche Stäbchen in der normalen Mundhöhle und ihre Beziehungen zur Leptothrix. Berl. kl. W. 1916. Nr. 26. S. 717.
- Löffler, J.,** Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen u. s. w. Mitteil. a. d. kaiserl. Ges. Amt II. 1884.
- Meyer, S.,** Experimentelle Studien über den Einfluss antitoxischen und normalen Pferdeserums auf die Infektion des Meerschweinchens mit lebenden Diphtheriebazillen u. Streptokokken sowie auf die Vergiftung mit reinem Diphtherietoxin. M. m. W. 1919. Nr. 31. S. 873.
- Mya, G.,** Über die Pathogenität der Diphtherieinfektion. (Ref. C. B. 15. 1894. S. 682.)
- Nicolai, J.,** Über die Beeinflussung des Wachstums von Diphtheriebazillen auf künstlichen Nährböden durch Mischinfektion. Inaug. Diss. Rostock 1922.
- Pesch, K. u. O. Zschokke,** Versuche über Verdrängung von Diphtheriebazillen durch Colibakterien in der Nase von Keimträgern. M. m. W. 1922. Nr. 35. S. 1276.
- van der Reis,** Die künstliche Ansiedlung von Bakterien in Mund- und Rachenhöhle. M. m. W. 1921. Nr. 11. S. 325.
- Reuter,** Über die Virulenzsteigerung der Diphtheriebazillen durch Staphylokokken u. s. w. Diss. 1919.
- Rolleston, J. D.,** Behandlung chronischer Diphtheriebazillenträger mit Bouillonkulturen von Staph. Pyog. aureus. Brit. Journ. of Child. Diseases. 7. 1913. (Ref. C. B. R. 1914. 60. S. 371.)
- Roux u. Yersin,** Recherches sur la Diphthérie (3. mémoire). Ann. d. l'Inst. Past. IV. 1890. S. 385.
- Schiötz, A.,** Uskadeliggyrelse of Infektionsbærere ved Difteri. Ugeskrift for Læger. 1909. S. 1382. (Ref. Hyg. Rdsch. 1911 S. 11.)
- Schley,** Über die Virulenzsteigerung des Diphtheriebazillus durch den Streptokokkus etc. Diss. Lpzg. 1919.
- Schmitz, H. E. F.,** Die Wandlungsfähigkeit der Bakterien. C. f. B. Or. 77. 1916. S. 369.
- Serkowski, St.,** Bacillus u. Granulobacillus putrifivus nov. sp. C. f. B. Or. 75. 1915. S. 1.
- Spirig, W.,** Die Streptothrix-(Actinomyces-) Natur des Diphtheriebazillus. Cbl. f. Bakt. Or. 26. 1899. S. 540.
- " " Studien über den Diphtheriebazillus. Ztschr. ff. Hyg. 42. 1903. S. 420.
- v. Schreider, M.,** Über Mischkulturen von Streptokokken und Diphtheriebazillen. C. B. 1892. 12. S. 289.
- de Witt, L.,** Report of some experiments on the action of Staphylococcus aureus on the Klebs-Löffler-Bacillus. Journ. of Infect. Diseases. X. 1912. S. 24. (Ref. C. B. R. 1912. S. 248.)
- Wood, H. B.,** Lactic acid bacillus spray for diphtheria. Journ. of the Americ. med. Assoc. 61. 1913. S. 392. (Ref. C. B. R. 60. 1914. S. 370.)
- Wright, F. L.,** Results of Schiötz method in ridding diphtheria cases and carriers of diphtheria bacilli in the State Agricultural and Industrial School. Journ. of the Americ. med. Assoc. 61. 1913. S. 26. (Ref. C. B. R. 1914. 60 S. 370.)