

Amalytische Untersuchungen epieutan wirksamer Stoffe der Staphylokokken (Staphylococcus aureus)

Autor(en): **Miescher, G. / Lincke, H. / Storck, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche**

Band (Jahr): **4 (1948)**

Heft 5-6

PDF erstellt am: **18.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-306944>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik Zürich
 Direktor : Prof. Dr. G. Miescher

Analytische Untersuchungen epicutan wirksamer Stoffe der Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*)

Von G. Miescher, H. Lincke und H. Storck

Die Tatsache, daß das Ekzem an seiner Oberfläche eine reiche Bakterienflora, vor allem Staphylokokken und Streptokokken beherbergt, ist schon lange bekannt.

An der Zürcher Klinik hat 1935 *Robert* durch serienweise Testungen festgestellt, daß mit Bouillonfiltraten von verschiedensten Mikroben (Staphylokokken, Streptokokken, *Pyocyanus* u. a.) bei vielen Menschen Reaktionen erhalten werden, die nicht nur klinisch, sondern auch histologisch dem Bild des Ekzems entsprechen (*Miescher*). Es wurde dadurch für die Staphylokokken bestätigt, was 34 Jahre früher schon *Bender*, *Bochard* und *Gerlach* nachgewiesen haben. Leider hat jene Arbeit in der Folge nicht die Beachtung gefunden, welche sie verdient hätte.

In den letzten Jahren hat *Storck* mit Unterstützung der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften die Versuche *Roberts* auf breiter Basis fortgesetzt, wobei in erster Linie die gesamte Bakterienflora des einzelnen Ekzemfalles analysiert und am Patienten selbst durchgetestet wurde. Aus den Untersuchungen *Storcks* geht hervor, daß zahlreiche Ekzempatienten auf ihre eigenen, aus den Ekzemherden gezüchteten Mikroben und auf deren Bouillonfiltrate positiv reagieren, weitaus am häufigsten auf Staphylokokken. Es ergibt sich hieraus der zwingende Schluß, daß die in den Ekzemherden oft in großer Menge vorhandenen Bakterien einen wichtigen Einfluß auf das klinische Bild und den Verlauf des Ekzems besitzen müssen, wobei sie in der Ätiologie ebensosehr eine primäre wie eine sekundäre Rolle spielen können.

Daß die Gegenwart von Bakterien mit ihren Stoffwechselprodukten zum Auftreten ekzematogener Wirkungen führen kann, ist nach der Erfahrung über die Kontaktekzeme nicht verwunderlich, geht doch daraus hervor, daß eine sehr große Zahl selbst einfacher chemischer Sub-

stanzen wie Jod, Sublimat, Resorcin, Formol u. a. Ekzeme hervorrufen können.

Von großem Interesse ist die Frage, welche Bakterienstoffe für die ekzematoiden Reaktionen verantwortlich sind. Handelt es sich um einfache kleinmolekulare Substanzen wie bei den meisten Kontaktekzemen, oder um die auch für die toxischen und immunbiologischen Eigenschaften verantwortlichen Exo- und Endotoxine?

Im folgenden wird über analytische Untersuchungen berichtet, welche die Isolierung des hautwirksamen Prinzipes zum Ziele haben. Wir benützen zur Verarbeitung die *Staphylococcus-aureus*-Stämme 55 und 200, welche aus Ekzemherden gewonnen worden waren und sich bei der Lappchenprobe als sehr wirksam erwiesen hatten (Rötung, Schwellung, Knötchenbildung). Die Exotoxine dieser Stämme haben nur eine geringe hämolysierende Wirkung im Gegensatz zum Nelis-Stamm, den *Robert* verwendet hat. Toxin 55 hämolysiert Kaninchenerythrocyten nur unverdünnt, Toxin 200 bis zu einer Verdünnung von 1:5.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir in der gleichen Weise vor, wie bei der Isolierung der Endo- und Exotoxine, indem wir einerseits das Bouillonfiltrat, andererseits die vom Nährboden befreiten Bakterien chemisch aufarbeiteten.

Die Testung wurde z. T. an den Patienten vorgenommen, von welchen der Stamm gewonnen worden war, z. T. auch an andern Patienten, bei denen sich das Bouillonfiltrat bzw. die Bakteriensuspension als wirksam erwiesen hatte. Bei allen Testungen wurden stets das Ausgangsprodukt (Bouillonfiltrat, Bakteriensuspension) sowie etwaige dem Präparat von der Aufarbeitung beigemengte Verbindungen zum Vergleich mitgetestet. Da auch mit hochmolekularen Substanzen als Wirkungsträger gerechnet werden mußte, für welche die Hornschichtschranke ein möglicherweise schwierig passierbares Hindernis darstellt, wurde nach einer Methode, welche *Storck* bei seinen Untersuchungen angewendet hat, die Testsubstanz zusammen mit pulverisierter Glaswolle eingerieben, um die Hornschicht dadurch aufzulockern. Die Überlegung, daß im Ekzembereich ebenfalls eine mehr oder weniger defekte Hornschicht vorliegt, rechtfertigt diese Hilfsmaßnahme. Die eingeriebene Stelle wurde in der üblichen Weise mit Leinenlappchen und Billrothbatist bedeckt und die Ablesung nach 24 Stunden vorgenommen.

Es wurden dabei registriert der Rötungsgrad (R), die Infiltration (I), die Anwesenheit von Knötchen (K), die Schwellung (S), die Anwesenheit von Pusteln (P). Der Reaktionsgrad wurde jeweils in römischen Zahlen von 0–III ausgedrückt, wobei I gering, II kräftig bzw. reichlich und III sehr kräftig bzw. sehr reichlich bedeutet.

A. Bouillonfiltrate.

1. Gewinnung und Aufarbeitung der Bouillon.

0,6 bis 10 Liter Bouillon wurden mit einer Staphylococcus-Aureus-Suspension beimpft und während 7 bis 12 Tagen im Brutschrank aufbewahrt. Mit Ausnahme der Aufarbeitung IV, bei welcher der Stamm 29 zur Untersuchung gelangte, verwendeten wir immer den Stamm 55. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Lösung zur völligen Klärung durch ein bakteriendichtes Filter gesogen.

Zur *Aufarbeitung* (vergleiche Schema 1) engten wir die Bouillon auf etwa den 10ten Teil ihres Volumens ein und fällten in der Regel zunächst mit Ammonsulfat die *Eiweißkörper* aus. Nur in den zwei ersten Aufarbeitungen erfolgte vorher die Abtrennung der *Lipoide* durch Ausäthern der Lösung¹⁾. Die von den Proteinen befreite Nährlösung kann durch Dialyse dann weiter in restliche *niedermolekulare* und *hochmolekulare Komponenten* getrennt werden. Die Gewinnung der niedermolekularen Anteile nötigt, gegen täglich erneutes stehendes Wasser zu dialysieren, ein Verfahren, das besonders bei größeren Mengen umständlich und langwierig ist und von uns daher nur in den Aufarbeitungen I, III und IV angewandt wurde.

Zur Gewinnung der Glycolipoide verfahren wir nach der von Boivin und Mesrobeau angegebenen Methode, indem wir den eingeengten Dialysierückstand mit dem 4fachen Volumen Alkohol oder Aceton fällten. Jedoch nur bei der Aufarbeitung I resultierte ein isolierbarer Niederschlag, und auch hier betrug er lediglich ein Bruchteil der nicht dialysablen Fraktion. In den übrigen Fällen engten wir den Dialysierückstand nach erfolgloser Ausfällung der Glycolipoide im Vacuum zur Trockne ein.

Unter den niedrigmolekularen Verbindungen befinden sich vor allem anorganische Salze, ferner einfache Peptide, Aminosäuren, niedrigmolekulare Kohlehydrate usw. Unter den nicht dialysierbaren Komponenten ist hauptsächlich an hochmolekulare Kohlehydrate und Kohlehydrat-Komplexe (Glykolipoide), ferner eventuell an unvollständig abgetrennte Proteine zu denken.

Besondere Beachtung schenkten wir der Isolierung der *Eiweißfraktion*, die sich bei der Testung regelmäßig aktiv erwies. In der ersten Aufarbeitung wurden die gesamten Proteine noch mit Trichloressigsäure ausgefällt und lediglich durch Waschen mit Wasser gereinigt. Später, in den Aufarbeitungen III und IV, versuchten wir durch fraktionierte

¹⁾ Bei der ersten Aufarbeitung wurden diese aus der eingeengten Bouillon auf der Schüttelmaschine mit Äther ausgeschüttelt. In den Aufarbeitungen III und IV erfolgte das Ausäthern in einer Apparatur zur kontinuierlichen Extraktion von Flüssigkeiten in 10 Etappen (insgesamt 745 Std.). Die einzelnen Extrakte wuschen wir gründlich mit Wasser, trockneten sie über Natriumsulfat und dampften das Lösungsmittel ab. Sie wurden zu zweien und dreien vereinigt, dann, da sie immer noch einen beträchtlichen Gehalt an wasserlöslichen Verbindungen aufwiesen, ein zweites Mal gewaschen.

Fällung des eingeeengten Toxins mit Ammonsulfat eine grobe Trennung in *Globuline* und *Albumine* durchzuführen²⁾).

Beide Fraktionen wurden anschließend durch drei bis viermaliges Umfällen aus wässriger Lösung vom größeren Teil der mitgerissenen Bestandteile befreit. Während die gefällten Albumine unter Zusatz von Wasser bis auf Spuren wieder in Lösung gingen, hinterließen die gefällten Globuline regelmäßig einen Rückstand, den wir der Kürze halber als «*irreversibel gefällte Proteine*» bezeichnet haben.

Die Testung dieser drei Eiweißfraktionen in einprozentiger Lösung (vergleiche Seite 362 und Tab. 1, Seite 363) ergab, daß das Antigen sich in der *Albuminfraktion* vorfindet. Zu dessen weiterer Anreicherung wurde daher die rohe Albuminfraktion durch Dialyse von mitgerissenen niedermolekularen Verbindungen befreit. Zunächst dialysierten wir in einem Vorversuch eine kleinere Menge Albumine gegen stehendes, täglich erneutes Wasser (Aufarbeitung III, Fortsetzung), später, nachdem sich gezeigt hatte, daß die wirksame Komponente nicht diffundiert, die Hauptmenge gegen fließendes Leitungswasser (bis zu 53 Tagen).

Im Vorversuch lösten wir eine Probe von 1,0 g der getrockneten Albuminfraktion in 9,0 cm³ Wasser auf und dialysierten die dunkelgelbe, annähernd klare Lösung in einem verschlossenen Dialysierschlauch unter Zusatz von 0,5% Phenol gegen 1 Liter destilliertes Wasser, das im Laufe von 13 Tagen 9mal ausgewechselt wurde. Der Dialysierückstand hellte rasch auf und schied eine geringe Menge eines Niederschlags ab. Sein Trockenrückstand betrug nach der Dialyse noch ca. 90 mg, hatte also um mehr als das Zehnfache abgenommen (hoher Ammonsulfatgehalt der vorgereinigten Albumine). Im Hauptversuch wurde zur möglichst vollständigen Entfernung der niedermolekularen Verbindungen die sterile 10prozentige wässrige Lösung der restlichen Albumine 53 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert. Der Trockenrückstand betrug nach dieser Behandlung noch etwa den 50. Teil (2,3%) der angesetzten Menge. Möglicherweise traten durch geringe Undichtigkeiten in der Membran Verluste an Eiweißkörpern auf.

Die Hauptschwierigkeit bei diesen länger dauernden Dialysen lag in der Sterilhaltung des Dialysierückstandes. Die zu dialysierenden Lösungen wurden vor dem Einfüllen in Cellophanschläuche steril filtriert, die Schläuche dicht verschlossen und die Dialyse gegen fließendes mit Toluol überschichtetes Wasser durchgeführt (vergleiche Abbildung 1). Trotzdem siedelten sich an der Außenseite der Membran regelmäßig Pilze an, und auch der Dialysierückstand blieb nicht immer klar und steril. Bisweilen auftretende Verluste in der biologischen Wirksamkeit der Albuminfraktion nach der Dialyse hängen möglicherweise hiermit zusammen, können jedoch auch durch Undichtigkeiten in der Membran bedingt sein. Erst später gingen wir dazu über, das Leitungswasser zuvor mit Toluol zu sättigen und dadurch die Gefahr einer Infektion des Dialysierückstandes zu verringern.

In den folgenden Untersuchungen (Aufarbeitung V und VI) verein-

²⁾ Die Hälfte der von 9650 auf 1300 g eingeeengten und mit Äther gründlich extrahierten toxinhaltigen Bouillon wurde mit dem gleichen Volumen einer bei 37° gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt, 2½ Tage im Eisschrank aufbewahrt und von den gefällten Globulinen durch Zentrifugieren befreit. Die restliche, noch die Albumine enthaltende Lösung wurde mit Ammonsulfat gesättigt, 2–3 Tage bei 37° stehen gelassen und dann analog behandelt.

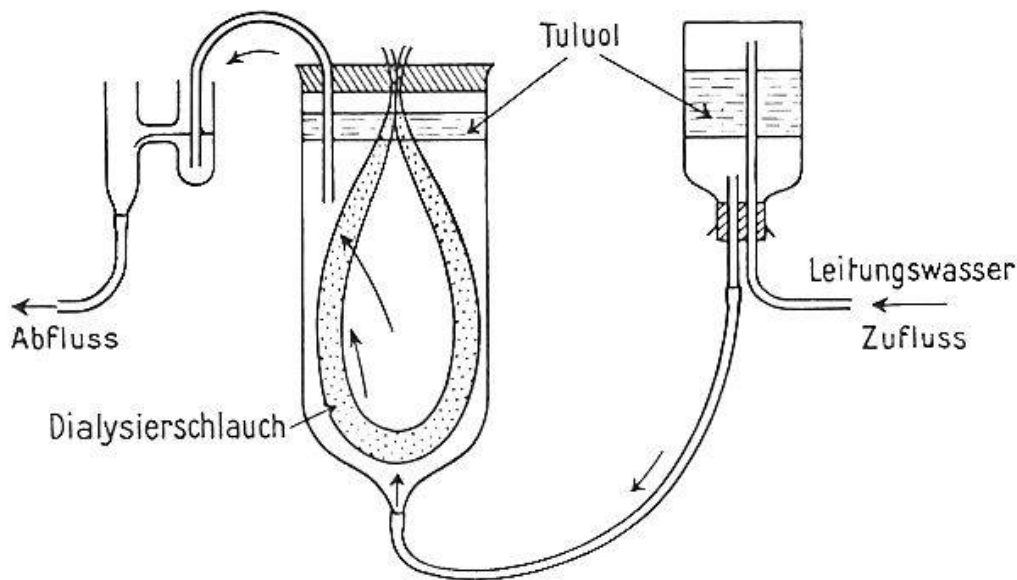


Abb. 1.

fachten und verbesserten wir das Verfahren dadurch, daß wir zunächst die gesamten Proteine durch Sättigung mit Ammonsulfat ausfällten (die gesättigte Lösung wurde 2 Tage bei 37° stehen gelassen), dann in Wasser aufnehmen, von unlöslichen Anteilen (irreversibel gefällten Proteinen) befreien und zur Entfernung der Salze die steril filtrierte Lösung 53 bzw. 15 Tage wie oben beschrieben dialysierten. Die so vorbehandelten Lösungen engten wir dann im Vacuum auf den zehnten bis zwanzigsten Teil vorsichtig ein (ca. den hundertsten Teil des ursprünglichen Toxins) und unterwarfen die Konzentrate der *Elektrodialyse* gegen fließendes bidestilliertes Wasser, wobei schon nach wenigen Stunden ein Niederschlag (wahrscheinlich *Globuline*) auszufallen pflegte. Diese Dialysen wurden bei einem Spannungsgefälle von 34 bis 37 Volt pro cm bis zu 48 Tagen bzw. 365 Elektrodialysierstunden, jedenfalls bis zur Konstanz der Stromstärke, fortgesetzt. Die so erhaltenen Ausbeuten an Albuminen liegen zwischen 0,01 und 0,025%. Sie zeigen im biologischen Test in 0,1–0,5prozentiger Verdünnung immer noch die Wirksamkeit des ursprünglichen zehnfach eingengten Toxins. Eine weitere Bearbeitung der Fraktion im Sinne einer höheren Anreicherung wurde noch nicht unternommen.

Hingegen führten wir noch einige orientierende Versuche mit der gereinigten Albuminfraktion aus. Um den Einfluß der hydrolytischen Spaltung auf die Wirksamkeit dieser Fraktion zu bestimmen, behandelten wir je eine Probe mit konzentrierter Salzsäure (5 Tage bei Zimmertemperatur) und mit Pepsin (48 Stunden bei Zimmertemperatur). Beide Ansätze büßten ihre Wirksamkeit hierbei vollkommen ein, so daß angenommen werden muß, daß durch die Hydrolyse die hautwirksamen Eigen-

schaften verloren gehen. Nur eine teilweise Inaktivierung erzielten wir durch einstündiges Erhitzen der gelösten Albumine auf dem Wasserbad oder durch vierminütiges Kochen in 50prozentiger alkoholischer Lösung. Zusatz von Formaldehyd schien deren Wirksamkeit eher etwas zu steigern. (Vergleiche Seite 362.)

Wir fügen an dieser Stelle noch eine Zusammenstellung der auf die frische Bouillon bezogenen Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen an. Da es uns in erster Linie um eine möglichst scharfe Abtrennung der wirksamen Komponenten zu tun war und weniger um deren quantitative Erfassung, haben diese Angaben lediglich orientierenden Charakter.

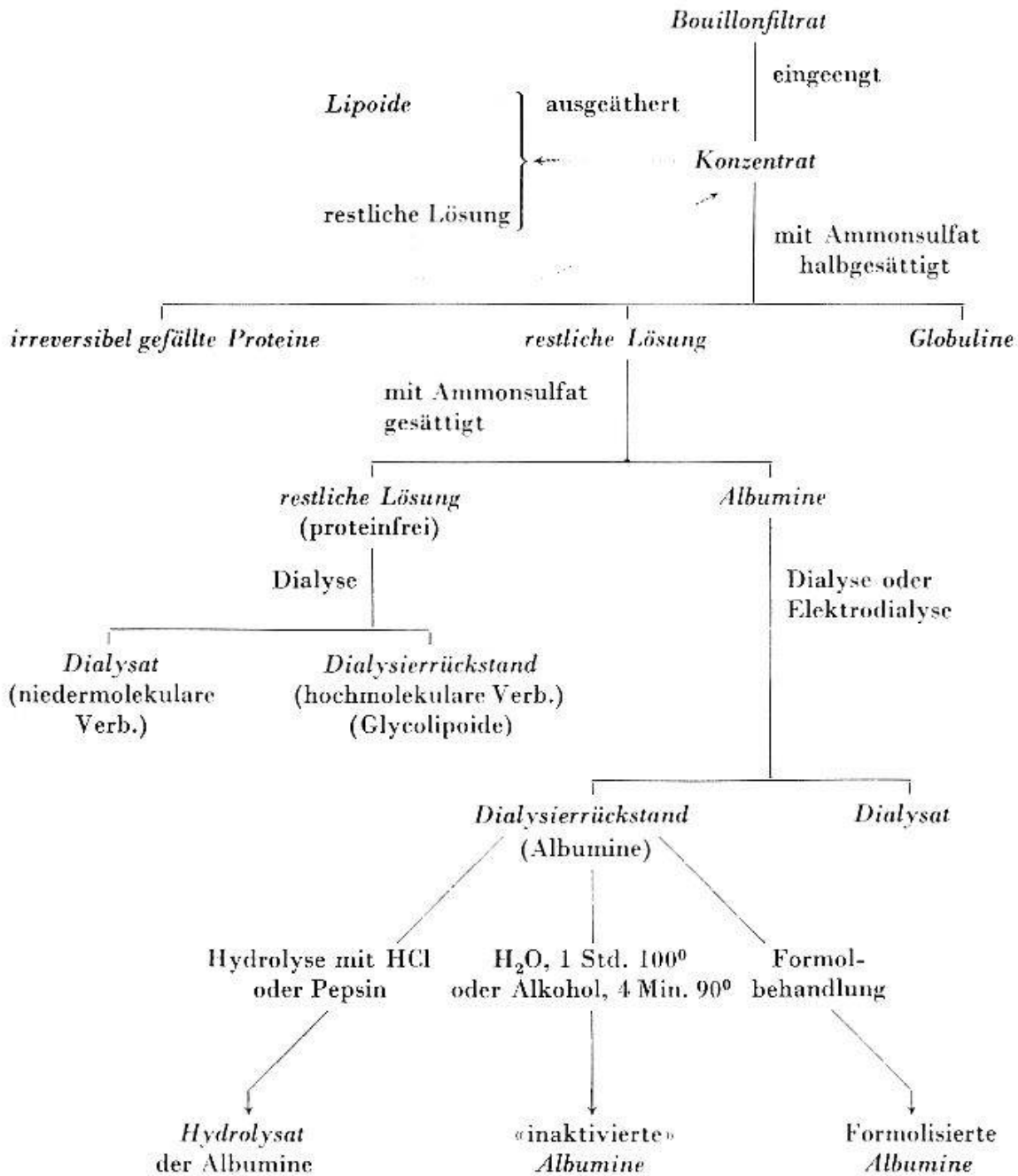
<i>Fraktion</i>	<i>Ausbeute in %</i>
Lipoide	{ 0,014 0,004
irreversibel mit Ammonsulfat gefällte Proteine	{ 0,002 0,002 0,002
durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällte Proteine (Globul.)	{ 0,051 (roh) 0,25 (roh) 0,001 (gereinigt) 0,0009 (gereinigt)
durch Sättigung mit Ammonsulfat gefällte Proteine (Albumine)	{ 0,45 (roh) 0,44 (roh) 0,016 (gereinigt) 0,024 (gereinigt) 0,010 (gereinigt)
durch Trichloressigsäure gefällte Proteine	0,010
nicht dialysierbare Komponenten (außer den Proteinen)	{ 0,006 0,001 0,003

2. Die Testung der Fraktionen.

a. *Vorbereitung der Testproben.* Die zu testenden Substanzen wurden in indifferenten Lösungsmitteln, gewöhnlich in Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung, getestet. Anfänglich verwendeten wir 1prozentige Verdünnungen, später richteten wir die Konzentration der Testlösungen nach dem « Quotienten » der Lösung. Dieser gibt an, in welchem Verhältnis die Konzentration der wirksamen Substanz in der Testprobe zu der im Bouillonfiltrat steht, vorausgesetzt, daß sich das aktive Prinzip quantitativ, d. h. ohne Verluste in der betreffenden Fraktion vorfindet. Die Einführung dieses Faktors an Stelle der Konzentration hat den Vorteil, im Falle unscharfer Trennung besser entscheiden zu können, in welcher Fraktion das hautwirksame Antigen enthalten ist. Denn nehmen wir beispielsweise an, daß bei einer Aufarbeitung von 5 Liter Bouillon neben 20 g Albuminen 0,1 g «irreversibel gefällte Proteine» resultieren, von

Schema 1

Bouillonfiltrat: Schema der Aufarbeitung



denen 1prozentige Lösungen zur Testung gelangen, so liegt in der 1. Probe gegenüber der Ausgangslösung eine Anreicherung von 2,5 (Quotient 2,5), in der zweiten eine solche von 500 (Quotient 500) vor. Falls daher ein Teil des Antigens in dieser zweiten Fraktion zurückgeblieben wäre, so könnte diese, obwohl sich die Hauptmenge bei den Albuminen befindet, zu stärkeren Reaktionen Anlaß geben und so zu Täuschungen führen.

3. Ergebnisse.

Mit Ausnahme der *Lipoide*, die bei der ersten Aufarbeitung eine urtarielle Sofortreaktion ergaben, erwiesen sich im Hauttest nur die *Proteinfraktionen* als wirksam und von diesen wieder nur die nach Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausfallenden *Albumine*. Allerdings wurde die Prüfung auf *Globuline* und auf «*irreversibel gefällte Proteine*» nur einmal durchgeführt. Das Ergebnis war wie folgt (Testung in 1% Lösung):

Bouillonfiltrat	R II	J I-II	K II	Bl I-II
«irrev. gef. Prot.» (Q = 450)	R I-II	J O-I	K O-I	F ±
Globuline (Q = 20)			negativ	
Albumine (Q = 2)	R II	J I-II	K II	Bl O-I

Hiernach zeigen zwar auch die «*irreversibel gefällten Proteine*» eine geringe Reaktion. Es ist jedoch zu beachten, daß – obwohl alle Fraktionen in 1prozentiger Lösung getestet wurden – die Fraktion der «*irreversibel gefällten Proteine*» weitaus den höchsten Quotienten aufweist (Albumine 2, Globuline 20, «*irreversibel gefällte Proteine*» 450).

Die übrigen Fraktionen *Glykolipoide* und *niedermolekulare Verbindungen* bewirkten keine Reaktionen.

Unsere weiteren Untersuchungen galten daher hauptsächlich der Albuminfraktion. Die Frage, ob die Wirksamkeit dieser Fraktion nicht durch mitgefällte, an den Albuminen absorbierte niedermolekulare Stoffe bedingt sei, suchten wir einerseits durch länger dauernde Dialysen (und Elektrodialysen) dieser Präparate und andererseits auf Grund der Ergebnisse ihrer hydrolytischen Spaltung zu entscheiden. Wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, läßt sich auch nach praktisch vollständiger Entfernung der niedermolekularen Komponenten keine Wirkungsabnahme der Albumine feststellen. Hingegen konnten wir weder mit den abgetrennten niedermolekularen Verbindungen, noch mit den durch Pepsin oder Salzsäure hydrolytisch gespaltenen Albuminen Reaktionen hervorrufen. Diese Ergebnisse erlauben mit einer an Sicherheit grenzen-

<i>Fraktion</i>	<i>Reaktion</i>			
Bouillonfiltrat (10fach eingengt)	R I-II	J O-I	K II	Bl I-II
Albumine (dialysiert) (Q = 1,5)	R I-II	J I	K I-II	
Dialysat (der Albumine) (Q = 1,5)			negativ	
hydrolysierte Albumine (mit HCl und Pepsin) (Q = 2)			negativ	
erhitzte Albumine (Wasser, Alkohol) (Q = 2)			einzelne Knötchen	
formolisierte Albumine (Q = 2) (0,00001-0,1%)	R II	J I-II		

- R = Rötung
- J = Infiltration
- K = Knötchen
- Bl = Bläschen

Tabelle 1
Test-Ergebnisse der Aureus-Bouillon-Fractionen

Aufarbeitung	Stamm	Toxinmenge kg	Bebrütungs- dauer (Tage)	Lipoide		Proteine fällbar durch				restliche nieder- molekulare Verbindun- gen		restliche hochmole- kulare Ver- bindungen (Glykoly- poide)	
				Q	R	Halbsätti- gung mit Ammonsulfat	Sättigung mit Ammon- sulfat		Q	R	Q	R	
							Q	R					
I	55	0,6	7	840	Quaddel		1000	++*	15	-	1000	-	
III	55	4,82	7	260	-	20	2	++	1	-	1000	-	
III. Forts. Untersuchung der Albumine							1,5	++					
Dialysierückstand (Vorversuch)							1,5	-					
Dialysat							6	+					
Dialysierückstand (Hauptversuch)							1,5 f	-					
Hydrolysate (HCl, Pepsin)							2	-					
Denaturiert mit:													
Alkohol 50%							2	+					
Wasser 1 Std. 100°							2	+					
Formalin							2	+++					
IV	55	4,82	7	260	-	4	2	-	0,4	-	300	-	
V	55	3,00	9				25	+					

*) Fällung mit Trichloressigsäure

Q = Quotient der Testprobe

R = Reaktion der Testprobe

++ = Reaktion positiv (++++ stärker, +++ gleich, ++ schwächer als Vergleichspräparat)

- = Reaktion negativ

den Wahrscheinlichkeit den Schluß, daß das wirksame Prinzip unter den der Albuminfraktion angehörenden Eiweißkörpern zu suchen ist. Durch kurzes Kochen mit 50prozentigem Alkohol (4 Minuten) oder einstündiges Erhitzen in wässriger Lösung auf 100° findet eine wesentliche, aber nicht vollständige Einbuße der Aktivität statt. Formalinzusatz rief eine geringe Steigerung in der biologischen Reaktion hervor.

B. Bakterienleiber.

1. Züchtung und Reinigung der Bakterien.

Die zur Untersuchung gelangten Bakterien (*Staphylococcus aureus*, Stamm 55, später Stamm 200) wurden mit einer Ausnahme in Bouillon, z. T. unter Durchlüftung mit Sauerstoff gezüchtet (Bebrütungsdauer 30–60 Stunden), abzentrifugiert und gründlich mit Wasser und verdünntem Alkohol gewaschen. Zur Aufarbeitung gelangten Mengen von 0,5 bis 23 g (bezogen auf gereinigte und 2 Stunden im Vacuum bei 120° getrocknete Bakterien). Verwendeter Stamm, Größe des Ansatzes und Züchtungsbedingungen bei den einzelnen Aufarbeitungen sind aus den Tabellen 2 und 3 ersichtlich.

Die günstigsten Ausbeuten erzielten wir unter Verwendung sauerstoffdurchlüfteter Bouillon und bei einer Bebrütungsdauer von 50 Stunden. Sie betragen pro Liter Bouillon unter diesen Bedingungen durchschnittlich 666 mg Bakterientrockengewicht. Der verwendete Sauerstoffstrom wurde vorher durch Filtration mittels einer bakteriedichten Glassinterplatte sterilisiert.

Zur Reinigung der Bakterien erwies sich folgendes Verfahren am vorteilhaftesten: Nachdem man die Erreger von der Bouillon abzentrifugiert hat, schlemmt man sie sorgfältig in 25prozentigem Alkohol auf, schleudert erneut ab und wiederholt das Verfahren mit 50 und ein drittes Mal mit 60prozentigem Alkohol. Die Vereinigung der einzelnen Ansätze erfolgt ebenfalls mit 60prozentigem Alkohol. So behandelt können sie im Eisschrank ohne Gefahr längere Zeit aufbewahrt werden, was namentlich bei der Aufarbeitung größerer Mengen, bei denen sich die Gewinnung des Materials über längere Zeit erstreckt, von Bedeutung ist. Zudem erleichtert die Verwendung von wässrigem Alkohol das Zentrifugieren beträchtlich.

Indessen ist zu beachten, daß durch diese Behandlung den Bakterien eine beträchtliche Menge von Stoffen entzogen wird, Proteine, Farbstoffe (z. B. der gelbe Aureus-Farbstoff) u. a. m. Die Testung dieser Fraktionen ergab aber, daß sie in der Hautprobe unwirksam sind, ihre Entfernung für unsere Zwecke daher kein Nachteil, sondern eher ein Vorteil ist.

Tabelle 2. Test-Ergebnisse der *Aureus*-Bakterien-Fractionen

Auf- arbeitung	Stamm	Trockenge- wicht der Bakterien und Nähr- boden	Be- brütungs- dauer	mit Trichloressigsäure gefällte Proteine												Dialysierück- stand des Tri- chloressigsäure- Extrakts (Glykolipide)			
				1. Na ₂ CO ₃ - Extrakt			2. Na ₂ CO ₃ - Extrakt			3. Na ₂ CO ₃ - Extrakt			Rückstand						
				Q	R		Q	R		Q	R		Q	R			Q	R	
I	55	460 mg Bouillon	7 Tage	2	+++		2	+++											
II	55	11,82 g Agar	30 und 60 Std.				1	—											
III	200	5,19 g Bouillon	30 und 60 Std.	1	—		1	—											
IV	200	+ O ₂ 4,65 g Bouillon	30 und 60 Std.	1	+		1	+											
V	200	+ O ₂ 6,45 g Bouillon	30 und 60 Std.	1	+		1	+											
VI	200	+ O ₂ 20,25 g Bouillon	30 und 60 Std.	2	++		2	++											
VI Fortsetzung		Fractionen aus dem Dialysierückstand der Extrakte 1 und 2		Niederschlag I +			Niederschlag II ++			Niederschlag II ++			Lösung Q = 80 Q = 800						
VIII	209	23,29 g Bouillon + O ₂	50 Std.	40	+++		40	+++		40	+		40	+					
VIII Fortsetzung		Ammonsulfatfällung der vereinigten Extrakte 1 und 2		Niederschlag I Q = 160			Niederschlag II Q = 80			Niederschlag II Q = 80			Lösung Q = 16						
Zu VI		In 60%igem Alkohol lösliche Stoffe		niedermolekulare Verbin- dungen (Dialysat)			hochmolekulare Verbin- dungen: Proteine (Dialysierückstand)												

Tabelle 3
Fractionen der hydrolisierten Bakterien

Auf- arbeitung	Stamm	Trockenge- wicht der Bakterien und Nähr- boden	Be- brütungs- dauer	ätherunlösliche Verbindungen			ätherlösliche Verbindungen			
				unlöslicher Verseifungs- Rückstand	wässrige Lösung		Niederschlag aus wässriger Lösung	Extrakt aus wässriger Lösung		Extrakt aus Verseifungs- Rückstand
					R	Q		R	Q	
VII	200	2,00 g Bouillon + O ₂ + CO ₂	45-84 Std.	±	80	±	+	250	Schorf	—
IXa	200	13,83 g Bouillon + O ₂	50 Std.					1000	—	1000
IXb	200	13,83g Bouillon + O ₂	50 Std.					800	—	800

2. Aufarbeitung der Bakterien.

a. *Trennung in Eiweißkörper, restliche hochmolekulare und in niedermolekulare Verbindungen.* Entsprechend der von Boivin und Mesrobeanu angewandten Methode haben wir die wie oben erwähnt gezüchteten und vorbehandelten Bakterien in destilliertem Wasser suspendiert³⁾ und bei 0° mit dem gleichen Volumen 0,5n Trichloressigsäure versetzt (Endkonzentration an Trichloressigsäure 0,25n). Die Zellen werden auf diese Weise aufgeschlossen, die Proteine koagulieren, während die in der verdünnten Trichloressigsäure löslichen Anteile hinausdiffundieren.

Die Glykolipoidfraktion: Der Trichloressigsäureextrakt enthält – natürlich neben einer Menge anderer Substanzen – ein hochmolekulares Glykolipoid, das durch Dialyse von den übrigen Verbindungen abgetrennt werden kann⁴⁾. Wir dialysierten gewöhnlich 2–3 Tage gegen fließendes Leitungswasser, dann 1 Tag gegen langsam fließendes destilliertes Wasser (insgesamt 50 Liter) und schließlich noch 1–3 Tage gegen stehendes destilliertes Wasser. Die verwendeten apparativen Einrichtungen waren dieselben wie bei den Exotoxin-Aufarbeitungen. Die Ausbeute an rohem Glykolipoid wurden auf Grund des Trockengewichts einer eingeengten Probe des Dialysierrückstands berechnet. Die gefundenen Werte schwankten zwischen 1,1 und 5,2% und betragen im Mittel 2,95%, bezogen auf das Trockengewicht der Bakterien. (Boivin gibt auf Grund seiner Untersuchungen an anderen Erregern Werte zwischen 2 und 5% an.)

Die Titration nach Hagedorn-Jensen ergibt, daß das frische Endotoxin (Glykolipoid) ein geringes Reduktionsvermögen aufweist, das während der Verseifung mit 2n Salzsäure auf dem kochenden Wasserbad im Verlaufe von 100 Minuten um etwa das 25fache zunimmt und dann ziemlich konstant bleibt. Nimmt man an, daß es sich hierbei um einen Zerfall in Hexosemoleküle handelt, so berechnet sich für das Glykolipoid (Rohprodukt) ein Zuckergehalt von 15–26% (Boivin fand 40–50%). Zu denselben Ergebnissen gelangten wir durch Titration des Endotoxins nach Willstätter-Schudel mit Hypojodit, woraus geschlossen werden kann, daß es sich um eine Aldose und nicht um eine Ketose handelt. Durch Ausäthern läßt sich aus dem Verseifungsgemisch des Glykolipoids ferner eine fettartige Substanz isolieren, die wir jedoch, infolge der äußerst geringen verfügbaren Mengen chemisch nicht näher untersucht haben.

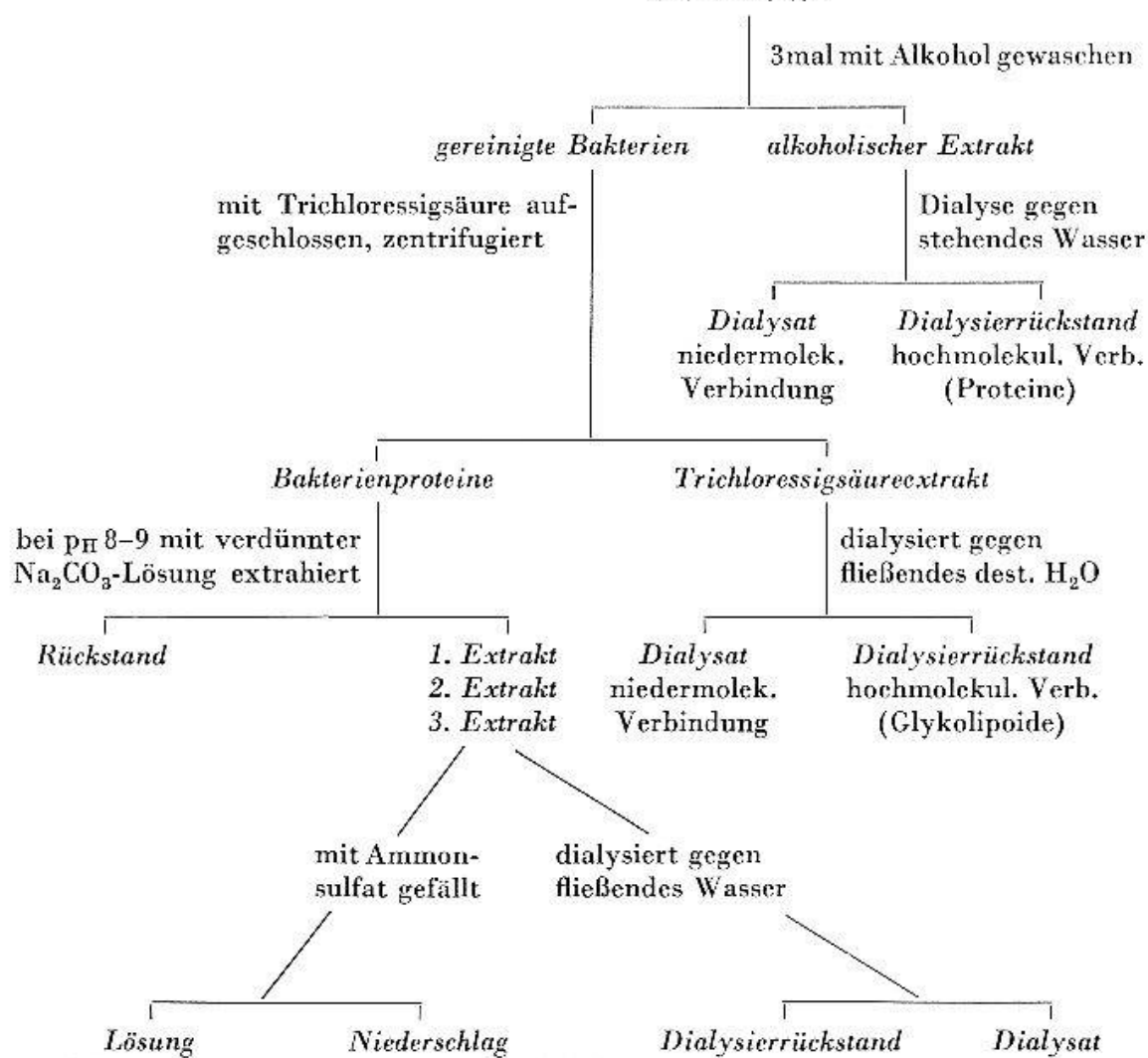
Die Proteinfractionen: Die in der verdünnten Trichloressigsäure nicht

³⁾ 50 mg Bakterientrockengewicht pro ccm.

⁴⁾ In einigen Fällen wurde der Extrakt vor der Dialyse mit Natriumcarbonat neutralisiert.

löslichen Anteile der Bakterien, hauptsächlich *Eiweißkörper*, wurden zur Entfernung der Säure zunächst 3–5mal mit Wasser gewaschen und dann zur weiteren Trennung dreimal bei einem p_H von in der Regel 8–9 mit verdünnter Natriumcarbonat- oder Natriumphosphatlösung extrahiert (meistens 1–3 Tage bei 0°). Da sich auf Grund der Testung die für die Hautreaktion verantwortlichen Komponenten hauptsächlich im ersten und zweiten Extrakt vorfinden (sie gehen schon bei einem p_H von 7,3 in Lösung), wurden diese Fraktionen in einigen Fällen weiter untersucht. Es zeigte sich hierbei erstens, daß die wirksamen Stoffe nicht dialysabel sind⁵⁾ und zweitens, daß sie sich bei der Halbsättigung ihrer Lösungen mit Ammonsulfat im Niederschlag anreichern⁶⁾. Auch diese Befunde sprechen für ihre Eiweißnatur.

Schema 2
Bakterienleiber: Schema der Aufarbeitung
rohe Bakterien



⁵⁾ Wir dialysierten die eingeengten Extrakte 11 Tage gegen fließendes Leitungswasser.

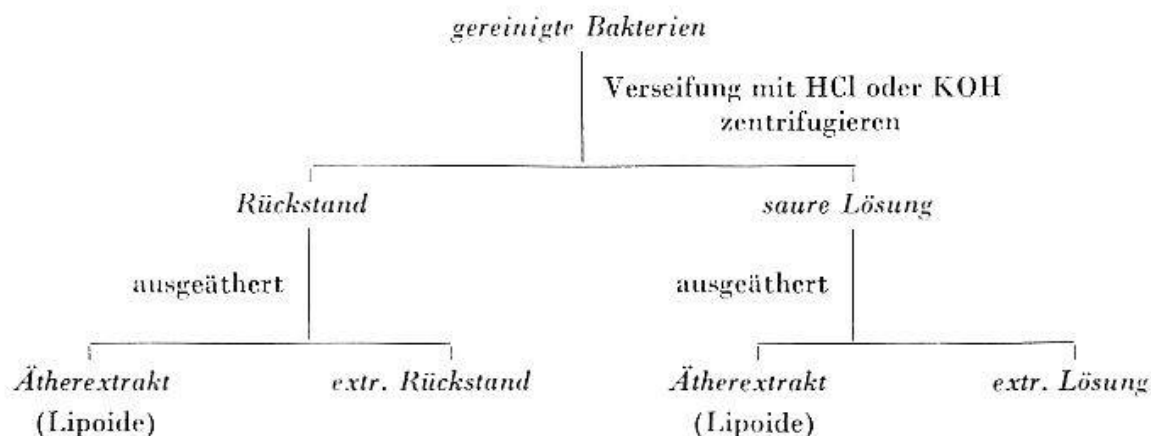
⁶⁾ Durch nachträgliche Ganzsättigung dieser Lösungen mit Ammonsulfat ließen sich aus diesen Lösungen nur noch Spuren an Proteinen ausfällen.

Die gesammelten *alkoholischen Waschlösungen* der Bakterien engten wir unter vermindertem Druck vorsichtig auf ein kleines Volumen ein und unterwarfen das resultierende dunkelgelbe Konzentrat unter Phenolzusatz der Dialyse gegen regelmäßig ausgewechseltes destilliertes Wasser, das laufend eingeeengt wurde. Sowohl der Dialysierrückstand, der, wie die Untersuchung zeigte, gelöste *Proteine* enthielt, als auch das die niedermolekularen Anteile des Extraktes enthaltende Dialysat erwies sich im Hauttest als wirkungslos.

Eine Übersicht über den Gang der gesamten Aufarbeitung findet sich im Schema 2 dargestellt.

b. Isolierung der Bakterienlipoide (Fettsäuren und Unverseifbares). Um auch die Lipoide der Bakterien einer Prüfung zugänglich zu machen, verseiften wir in zwei Fällen die wie üblich vorbehandelten Bakterien durch fünfständiges Erhitzen mit 2*n* Salzsäure auf dem kochenden Wasserbad, in einem Fall durch Behandlung mit alkoholischer Kalilauge. Die Verseifungsgemische wurden dann mit Äther bzw. Petroläther gründlich extrahiert, die Extrakte gewaschen und eingeeengt. Sie hinterließen hellbraune fettartige Rückstände. Die Ausbeute, die bei der ersten Untersuchung 13,5% betrug, sank später auf 3 und 5%. Ob diese Differenz auf die etwas verschiedenen Wachstumsbedingungen zurückzuführen ist, bedarf noch der Prüfung.

Schema der Aufarbeitung



3. Die Testung der Fraktionen.

Die Konzentration der Testproben wurde durchwegs durch den Quotienten angegeben, der in vielen Fällen gleich 1, in anderen (besonders bei den Glykolipoiden) oft auch bedeutend höher gewählt wurde. Er bezieht sich bei den Endotoxinaufarbeitungen auf eine Bakteriensuspension von 25 mg Bakterientrockengewicht/cm³, die zugleich als Vergleichs-

präparat bei jeder Aufarbeitung mitgetestet wurde. Im übrigen verweisen wir auf die diesbezüglichen, bei der Besprechung der Exotoxine gemachten Angaben.

Ergebnisse.

Auf ihre biologische Wirksamkeit im Hauttest untersucht wurden hauptsächlich die verschiedenen *Protein-*, ferner die *Glykolipoidfraktionen*, in drei Fällen die *Bakterienlipoide* und nur in einem Fall das *Dialysat*, d. h. die große Masse der übrigen niedermolekularen Verbindungen. Diese erwiesen sich im Hauttest als unwirksam. Die Resultate sind in Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

Abgesehen von einer toxischen Lipoidwirkung ergaben die *Proteinfraktionen*, vor allem der erste und zweite Natriumcarbonatextrakt, regelmäßig die stärksten Hautreaktionen. Eine Ausnahme macht Aufarbeitung III, bei der überhaupt keine Fraktion wirksam war. Die meisten Proteinfraktionen wurden in Verdünnungen getestet, die etwa der einer Bakterienaufschwemmung von 25 mg Bakterientrockengewicht pro cm³ äquivalent waren ($Q = 1$ oder 2) und ergaben quantitativ auch ungefähr dasselbe Reaktionsbild wie diese Aufschwemmungen. Konzentriertere Präparate zeigten zwar stärkere Reaktionen, jedoch nahm die Wirksamkeit nicht in dem Maße zu, wie nach der Anreicherung zu erwarten gewesen wäre.

Die *Glykolipoide* mit ihren meistens negativen, hie und da schwach positiven Reaktionen weisen ein bedeutend unklareres Bild auf. Sie wurden z. T. in 500–1000facher Anreicherung untersucht, ergaben aber selbst dann nicht immer eine Reaktion. Jedenfalls scheinen sie für die Wirkung, die die Bakterien auf die Haut ausüben, von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Ebenfalls noch nicht abgeklärt ist die Wirkung der *Bakterienlipoide*. Die erste Prüfung derselben (Aufarbeitung VII) führte zu einem aus dem üblichen Rahmen herausfallenden Reaktionsbild von ausgesprochenem toxischen Charakter (scharfrandige Begrenzung der Reaktion auf das Kontaktfeld, Blasenbildung und Rötungshof). In den folgenden Untersuchungen ergaben die Lipoidfraktionen überhaupt keine Wirkung (Aufarbeitung IXa und IXb). Auf die großen Unterschiede in den Ausbeuten wiesen wir bereits hin (Aufarbeitung VII: 13,5%, Aufarbeitung IXa und IXb: 3 bzw. 5%). Es ist zu bemerken, daß die Bakterien der Aufarbeitung VII ausnahmsweise unter Durchlüftung der Bouillon mit CO₂-haltigem Sauerstoff (5% CO₂) gezüchtet wurden, während in allen übrigen Fällen reiner Sauerstoff zur Anwendung gelangte. Wir ließen dieses Verfahren infolge der bedeutend schlechteren Ausbeuten an Bakterien da-

mals wieder fallen. Ob die Toxizität der Lipoide damit in Beziehung steht, muß noch abgeklärt werden.

Schlußbetrachtungen.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die epicutan wirksamen Stoffe der Staphylokokken und ihrer Bouillonfiltrate in der Gruppe der Proteine enthalten sind, und zwar, soweit die Aufarbeitung der Bouillonfiltrate darüber Aufschluß gibt, in der Gruppe der Albumine. Ob sie mit den Exotoxinen der Bakterien, die ebenfalls Eiweißcharakter haben, identisch sind, läßt sich vorerst nicht entscheiden und ebensowenig die Frage, ob zwischen den exobazillären und den endobazillären wirksamen Stoffen Identität besteht. Die in 2 Fällen auf Hämolyse untersuchte Proteinfraction ergab auch in der den Verhältnissen in der Ausgangsbouillon entsprechenden Konzentration ($Q = 1$ und 2) keine Hämolyse, was angesichts des sehr geringen hämolytischen Titors des Ausgangsmaterials nicht viel besagt.

Die fehlende oder sehr geringe Wirksamkeit der Glykolipoide ist insofern bemerkenswert, als diese Körper nach *Boivin* und *Mesrobianu*, *Raistrick* und *Topley*, *Dealfield* u. a. bei manchen Mikroben (Diphtheriebazillen, Bazillen der Salmonellagruppe) antigenen Charakter besitzen, wobei die Polysaccharidkomponente für die Spezifität der Gegeneinstellung verantwortlich ist.

Es ergibt sich daraus ein gewisser Widerspruch zu unserer früheren Auffassung, indem *Robert* aus seinen Untersuchungen folgert, daß das wirksame Prinzip nicht in der Eiweißfraction, sondern in der Alkoholfraction zu suchen ist und daß es sich wahrscheinlich wie bei Trichophytin und Tuberkulin um die Kohlenhydratfraction handelt. Diese Auffassung stützt sich auf das Ergebnis der Testungen, indem die alkoholunlösliche, wasserlösliche Fraction in 65% der Fälle (54 von 83), die durch Ammonsulfat gefällte Gesamtproteinfraction nur in 16,9% der Fälle (14 von 83) eine positive Reaktion ergeben hat.

Eine Erklärung dieser Diskrepanz ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß bei der Wiederauflösung der Alkoholfällung in physiologischer Kochsalzlösung nicht nur die Glykolipoide und Polysaccharide, sondern, wie wir uns jetzt überzeugt haben, auch die Eiweißkörper wieder in Lösung gehen.

Auf die Histologie der Reaktion wird in einer späteren Mitteilung eingetreten werden, zumal hier, wie schon im Bild der natürlichen parasitären Ekzeme, toxische und allergische Komponenten sich kombinieren (oberflächliche Cytonekrose, tieferliegende Spongiose), was eine erhebliche Erschwerung der Interpretation bedeutet.

Zusammenfassung

Es wurden die Bouillonfiltrate und die vom Nährboden befreiten Bakterienleiber von hautwirksamen Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*), welche aus Ekzemherden gezüchtet worden waren, chemisch aufgearbeitet.

Es wurde festgestellt, daß das epicutan wirksame Prinzip sowohl im Bouillonfiltrat als auch in den Bakterienleibern enthalten ist und der Proteinfraction angehört. Bei fraktionierter Aussalzung findet es sich in der Gruppe der Albumine (nur bei den Eiweißkörpern des Bouillonfiltrates durchgeführt).

Erhitzen hat eine Abschwächung der Wirkung, Formolisierung eher eine Verstärkung zur Folge. Durch fermentative oder Salzsäurehydrolyse geht die Wirkung verloren.

Die Glykolipoide reagierten selbst in Konzentrationen, welche wesentlich höher waren als im Ausgangsmaterial, nicht oder nur sehr schwach. Widersprechende Befunde ergaben die Lipide, die z. T. ausgesprochen toxische, z. T. überhaupt keine Wirkung zeigten.

Résumé

Après avoir cultivé, à partir de foyers eczémateux, des souches de staphylocoques (*aureus*) épidermo-pathogènes, on a étudié chimiquement les filtrats de bouillon ainsi que les corps bactériens débarrassés de leur milieu de culture.

On a pu déterminer que le principe épicutané se retrouve aussi bien dans le filtrat de bouillon que dans le corps des bactéries, et qu'il est contenu dans la fraction protéinique. Par salage fractionné, on le sépare du groupe des albumines (cette opération n'a été effectuée qu'avec les protéines du filtrat de bouillon).

Son action diminue par chauffage, alors que l'emploi du formol en exalte la virulence. Il est inactivé par hydrolyse enzymatique ou chlorhydrique.

Les glycolipoïdes n'ont pas réagi, ou seulement faiblement, même à une concentration sensiblement augmentée. Les lipoides donnent des résultats contradictoires: leur action est parfois très toxique, parfois nulle.

Riassunto

Dopo aver coltivato, partendo da focolai eczematosi, dei ceppi di stafilococco (*aureo*) patogeni per via epidermica, si è studiato chimicamente i filtrati del brodo di coltura e i corpi batterici allontanati dal loro ambiente di coltura. Si è potuto determinare che il principio epicutaneo si trova tanto nel filtrato del brodo di coltura che nei corpi batterici, e che

egli è contenuto nella frazione proteica. Per precipitazione frazionata con sali, la si separa dal gruppo delle albumine (questa operazione non è stata effettuata che con le proteine del filtrato del brodo di coltura). La sua azione diminuisce dopo riscaldamento, mentre il formolo ne esalta la virulenza. Esso è reso inattivo dalla idrolisi enzimatica o cloridrica. I glicolipidi o non hanno reagito o hanno reagito soltanto in maniera debole, anche a una concentrazione sensibilmente aumentata. I lipidi danno dei risultati contraddittori; talvolta la loro azione è molto tossica, talvolta nulla.

Summary

The bacteria of dermatogenic staphylococci (*staphylococcus aureus*), grown from eczematous foci, were freed from culture medium and both they and the bouillon filtrate processed chemically.

It was found that the dermatogenic principle is contained both in the bouillon filtrate and in the bacteria and that it is connected with the protein fraction. On fractionally salting out, it is found in the albumin group (only carried out on the protein bodies of the bouillon filtrate).

Heating caused a weakening of the action, while formolisation tended to strengthen it. Enzymatic or hydrochloric acid hydrolysis destroyed the effect.

The glycolipoids themselves, even in concentrations considerably higher than in the starting material, reacted either not at all or only very weakly. Contradictory results were given by the lipoids, which showed partly pronounced toxic effects, partly no action at all.

Bender, Bockhart und Gerlach: Mh. f. prakt. Dermat. 33, 1901, 1901. – Boivin, A., und Mesrobianu, L.: Revue d'Immunologie, 1935, 1, 553; 1936, 2, 113. – Delafield, M. E.: J. Path. Bact. 34, 177 (1931); 35, 53 (1932); Brit. J. exp. Path. 15, 130 (1934). – Miescher, G.: Arch. f. Dermat. und Syph. 173, 117 (1935); IX. Congr. internat. dermat. Budapest 1935, II. – Raistrick und Topley: Brit. J. exp. Path. 15, 113 (1934). – Robert, P.: Arch. f. Dermat. und Syph. 173, 267 (1935); 173, 530 (1937). – Storck, H.: Dermatologica 96, 177, 1948.