

Kinder- und Infektionsklinik der Medizinischen Akademie
in Düsseldorf.

Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Schloßmann.

Beitrag zur
Giftbildung von Diphtheriebacillen
verschiedener Herkunft in
synthetischen Nährböden.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines
doctor medicinae

durch die

Medizinische Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität
in Münster

in Gemeinschaft mit der
Medizinischen Akademie
in Düsseldorf

vorgelegt von

Hans Lindemann

aus Düsseldorf.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Akademie in
Düsseldorf und der medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität in Münster.

gez. Krauss
Rektor der Medizi-
nischen Akademie
Düsseldorf

gez. Vogt
Dekan der Medizi-
nischen Fakultät
Münster.

gez. Hottinger
1. Berichterstatter
gez. Vogt
2. Berichterstatter

ISBN 978-3-662-27821-5 ISBN 978-3-662-29321-8 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-29321-8

(Aus der Kinder- und Infektionsklinik der Medizinischen Akademie in Düsseldorf.
Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. *Schlossmann*.)

Das Problem der toxischen Diphtherie.

I. Mitteilung.

Beitrag zur Giftbildung von Diphtheriebacillen verschiedener Herkunft in synthetischen Nährböden.

Von
Hans Lindemann.

Seit 2 Jahren nimmt in Düsseldorf und Umgebung die Diphtherie-epidemie an Umfang zu. Innerhalb dieser Endemie treten schwere, toxische, sogenannte maligne Diphtheriefälle auf. Es wurden in der Infektionsabteilung der allgemeinen städtischen Krankenanstalten in Düsseldorf innerhalb dieses Zeitraums mehr als hundert solcher Fälle aufgenommen. Auch in anderen Gegenden, z. B. in Paris und Berlin, wurde seinerzeit eine starke Häufung der malignen Diphtheriefälle beobachtet. Man hat in Düsseldorf wie anderenorts ein Versagen der üblichen Serumtherapie beobachtet, denn die Letalität betrug, trotz enormer Serumdosen (60—140000 J. E.), wie in der Vorserumzeit etwa 50% und mehr. Der ungewöhnlich maligne Charakter dieser Fälle hat Veranlassung zu einer ziemlich ausgedehnten Literatur über die Klinik und die Besonderheiten derartiger bösartiger Diphtherieformen gegeben (*Königsberger, Hottinger* usw.), doch haben uns diese klinischen Beobachtungen nicht zu wesentlich neuen Kenntnissen über die Ursache der Erkrankung und ihrer Pathogenese geführt.

Man hat über das Zustandekommen der toxischen Diphtherie verschiedene Theorien aufgestellt, von denen jede ihren Vertreter gefunden hat (*Knauer, Langer* usw.).

Einige Autoren betrachten die Widerstandslosigkeit des befallenen Organismus als ausschlaggebende Ursache, andere die Virulenz der Bakterien. Wieder andere sehen in speziellen Giftbildungsverhältnissen besonderer Diphtheriestämme den Grund für die Entstehung der toxischen Diphtherie.

Die eigentliche Antwort auf die Frage, worauf im Grunde die besondere Bösartigkeit der Epidemie zurückzuführen sei, steht noch aus. Es ist daher in unserer Klinik das Problem in letzter Zeit in Angriff

genommen worden (*Grüneberg, Heissen* usw.). Mir fiel auf Veranlassung von Dozent Dr. *Hottinger* die Aufgabe zu, zu prüfen, ob sich *Unterschiede in der Giftproduktion zwischen den frisch isolierten Diphtheriebacillen von Patienten mit gewöhnlicher Diphtherie gegenüber solchen von Fällen mit toxischer Diphtherie* auffinden lassen. Sollten sich derartige Differenzen in der Toxinbildung beobachten lassen, so würde sich daran eine zweite Fragestellung anschließen:

Lassen sich Hinweise dafür erbringen, daß bestimmte Nährböden, bzw. gewisse Bestandteile derselben, für die stärkere oder geringere Giftbildung verantwortlich gemacht werden können, wie dies schon *Walbum* u. a. vermutet und durch interessante Experimente wahrscheinlich gemacht haben?

Zunächst handelte es sich darum, eine geeignete Arbeitsmethode zu ermitteln, d. h. einen Giftnachweis zu suchen, der es uns gestattete, geringe Giftmengen mit möglichst großer Genauigkeit nachzuweisen, sozusagen eine quantitative Methode der Toxinbestimmung zu finden.

Wir prüften zunächst verschiedene Verfahren, die zum Toxinnachweis gebraucht werden, auf ihre Empfindlichkeit und wandten insbesondere unsere Aufmerksamkeit der Frage zu, ob auch noch ganz geringe Giftmengen damit nachgewiesen werden können, und ob sie zu deren quantitativer Bestimmung geeignet seien:

1. Die Flockungsmethode von *G. Ramon*.
2. Die Ringpräcipitationsmethode von *Hoer-Zipp-Tschertkow* und
3. die Intracutanmethode von *Römer*.

Als Testgift stand uns ein Toxin Op. Nr. 492 aus dem Staatlichen Seruminstitut zu Frankfurt a. M. zur Verfügung.

1. Bei der Methode von *Ramon* werden konstante Mengen Toxin mit steigenden Mengen von Diphtherieheils serum vermischt. In diesen Gemischen, die zur Beschleunigung der Reaktion — die jedoch auch bei Zimmertemperatur eintritt — in den Brutschrank gestellt werden (Temp. 38°), kommt es nach einiger Zeit bei geeigneten Mischungsverhältnissen zur Trübung und schließlich zum Ausfall größerer Flocken. Eine deutliche Flockung tritt zuerst in dem Reagenzröhrchen ein, in dem sich Toxin und Antitoxin gerade neutralisieren. Aus dieser Initialflockung („floculation initiale“ nach *Ramon*) ergibt sich der Flockungswert Lf (Lf = limite of flocculation nach *Glenny* und *Okell*). Dieser ist für das einzelne Gift konstant und gibt die Toxinmenge in Kubikzentimeter an, die nach Mischung mit einer *Ehrlichschen* Antitoxineinheit die größte Flockungsgeschwindigkeit zeigt. Der Lf-wert unseres Testtoxins war uns mit 0,08—0,1 ccm angezeigt. Unsere Versuche bestätigten diese Zahl annähernd, wie aus Tab. Ia und b hervorgeht. Unser ursprünglich 650faches Heils serum brachten wir durch Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Gehalt von

65 A.E. pro Kubikzentimeter. Die Ausführung des Versuches ergibt sich aus folgenden Tab. 1a und b.

Tabelle 1a.

Toxin + Serumverdünnung 1 : 10		Reaktion
1 ccm	0,10 ccm = 6,5 A.E.	—
1 „	0,12 „ = 7,8 „	—
1 „	0,14 „ = 9,1 „	Initialflockung
1 „	0,16 „ = 10,4 „	Flockung
1 „	0,18 „ = 11,7 „	„
1 „	0,20 „ = 13,0 „	„
1 „	0,30 „ = 19,5 „	Starke diffuse Trübung

9,1 A.E. neutralisieren 1 ccm Toxin.

1,0 A.E. neutralisiert also 0,11 ccm Toxin: Lf = 0,11.

Tabelle 1b.

Toxin + Serumverdünnung 1 : 10		Reaktion
1 ccm	0,11 ccm = 7,1 A.E.	—
1 „	0,12 „ = 7,8 „	Initialflockung
1 „	0,13 „ = 8,45 „	Flockung
1 „	0,14 „ = 9,1 „	„
1 „	0,15 „ = 9,75 „	„
1 „	0,16 „ = 10,4 „	„
1 „	0,17 „ = 11,05 „	„
1 „	0,18 „ = 11,7 „	„
1 „	0,20 „ = 13,0 „	„
1 „	0,22 „ = 14,3 „	„

7,8 A.E. neutralisieren 1 ccm Toxin;

1,0 A.E. neutralisiert also 0,12 ccm Toxin: Lf = 0,12.

Zur Ausführung des Flockungsversuchs geringere Mengen als 1 ccm Toxinbouillon zu nehmen, ist schon deshalb nicht zweckmäßig, weil sonst die Flockung zu geringgradig ist, um beobachtet werden zu können. Wir sehen aus Tab. 1a und 1b, daß wir mindestens 9,1 bzw. 7,8 A.E. gebrauchen um 1 ccm unseres Testtoxins zu neutralisieren. Wenn wir bedenken, daß 1 A.E. bereits imstande ist, 100 D. l. m. (Dosis letalis minima für 250 g lebendes Meerschweinchen) abzusättigen, so sehen wir allein an den gewaltigen Zahlen, daß die Methode von *Ramon* für einen quantitativen Nachweis von Toxin in geringen Mengen nicht in Frage kommen könnte. So konnte also die Flockungsreaktion uns nicht dazu dienen, das Toxinbildungsvermögen unserer Bakterienstämme zu prüfen.

Wie außerdem verschiedene andere Forscher (*H. Schmidt*, *Th. Madsen* und *S. Schmidt*) nachwiesen, besteht überhaupt kein bestimmtes

Verhältnis zwischen der Toxizität eines Giftes und seiner Flockungsfähigkeit. Das Flockungsverfahren mißt vielmehr das Antitoxinbindungsvermögen eines Giftes und ist, da antigenes Vermögen und Toxizität bekanntlich ganz verschiedene Dinge sind, für unsere Fragestellung auch aus diesem Grunde nicht zu verwenden.

Wie *Ehrlich* annahm, besteht das Diphtheriegift in der Hauptsache aus drei verschiedenen Komponenten: Dem Toxon, Toxin und Toxoid. Unter Toxin versteht er das Diphtheriegift, das antigenes Vermögen hat und zugleich Giftwirkung ausübt. Toxoid ist ein dergestalt verändertes Gift, daß es nur noch antigen wirkt, aber nicht mehr die eigentliche Giftwirkung entfaltet. Toxon wäre ein mehr neurotropes Gift. Toxin und Toxoid binden Antitoxin gleich gut. Toxon bindet Antitoxin in schwächerem Maße und seine Giftwirkung ist langsamer als die des Toxins und, wie gesagt, eine mehr neurotrope.

H. Schmidt und *W. Scholz* allerdings vereinigen die Begriffe Toxon, Toxin und Toxoid unter einem Gesichtspunkt und fassen, von der Anschauung *Ehrlichs* ausgehend, „das Diphtheriegift als einen einheitlichen Stoff auf, der aber infolge stetiger Dispersitätsänderungen in verschiedenem physikalischen Zustand vorkommt. Zunächst bildet sich durch einen enzymatischen Prozeß aus den Albumosen des Nährbodens hochdisperses Toxon, das unter Dispersitätsabnahme in Toxin und schließlich in Toxoid übergeht. Die typische Diphtheriegiftwirkung ist an eine gewisse Dispersität gebunden gedacht. Die unter Dispersitätsabnahme spontan eintretende Giftabschwächung ist reversibel“. Für diese beiden Autoren ist deshalb: „Der Flockungswert (*Lf*) eines Diftes der einzige meßbare Giftwert, der alle im Gift enthaltenen Komponenten berücksichtigt“.

2. Bei der Präcipitationsmethode von *Hoen-Zipp-Tschertkow* werden abgestufte Serumverdünnungen mit unverdünntem Toxin überschichtet. Um das Serum spezifisch schwerer zu machen, wird es mit 5proz. NaCl-Lösung verdünnt. Es erhält außerdem noch einen 20proz. Zusatz von Normalpferdeserum, der eine zu schnelle Diffusion verhindern soll. Dieses Normalserum muß natürlich auf Abwesenheit von Antitoxin geprüft sein. Die Ausführung geschieht bei Zimmertemperatur. Die Menge des überschichteten Toxins wird nicht berücksichtigt, da nach Angabe der Verfasser von wesentlicher Bedeutung nur die Konzentration von Serum und Toxin an der Berührungsgrenze ist. Damit wäre die Möglichkeit quantitativer Bestimmungen gegeben.

Es erscheint nach 10—30 Minuten, bei stärkeren Serumverdünnungen bis zu 6 Stunden, an der Berührungsgrenze der beiden Medien ein dünner, intensiv trüber Ring, der sich im Laufe von 2—3 Stunden vergrößert, dabei streng abgegrenzt bleibt. Die geringste Menge von Antitoxineinheiten in 1 ccm, die nach Ablauf von 6 Stunden einen

Präcipitationsring erzeugt, wird mit Lp bezeichnet. Dieser Lp-Wert entspricht nach vergleichenden Tierversuchen der Verfasser aber nicht der Dosis letalis minima.

Das Phänomen der Ringbildung zeigt also wahrscheinlich *nicht* die Toxizität des Diphtheriegiftes an, sondern — wie die Flockungsmethode — viel eher einen bestimmten Kolloidzustand des Giftes oder dessen antigenes Vermögen.

Unsere eigenen Versuche, die vor allem die bei dieser Methode erreichbaren Grenzwerte feststellen sollten, ergaben unter gleichen Bedingungen mehrfach gänzlich verschiedene Ergebnisse. Wir führen als Beispiel 2 Tabellen (2a und 2b) an.

Tabelle 2a. Serumverdünnung mit 5proz. NaCl und 20% Zusatz von Normalserum in A.E. berechnet:

Toxin +	325	32,5	3,25	1,62	0,81	0,54	0,4	0,32
	Deutliche Ringbildung nach 30 Minuten.							Andeutung eines schwachen Ringes
Toxin + Normalserum (zur Kontrolle),	unverdünnt (100%),		verdünnt mit 5proz. NaCl (40%),					
	keine Ringbildung		keine Ringbildung.					

Tabelle 2b. Serumverdünnung mit 5proz. NaCl und 20% Zusatz von Normalserum in A.E. berechnet:

Toxin +	32,5	3,25	1,62	0,81	0,4	0,32	0,2	0,16
	—	nach 6 Std. breiter Ring	—	—	—	—	—	—
Toxin + Normalserum (zur Kontrolle)	(100%)		(40%)					
	—	—	—					

Während wir, wie Tab. 2a zeigt, einmal zuverlässige Ringbildung erhielten bis zu einer Serumverdünnung von 0,4 A.E., stellte sich ein anderes Mal (Tab. 2b) nur bei einem A.E.-Wert von 3,25 eine Reaktion ein. Verschiedene in gleicher Weise angesetzte Versuche schlugen ganz fehl, so daß wir diese Methode schon wegen ihrer Unzuverlässigkeit als ungeeignet aufgaben, ganz abgesehen von den komplizierten, unübersichtlichen Verhältnissen, die wir durch die Vermischung von Antitoxin, Normalserum und 5proz. Kochsalzlösung schaffen.

Auch die abgeänderte Ringpräcipitationsmethode, die von *Hoen-Zipp-Tschertkow* in einer weiteren Arbeit angegeben wurde, erwies sich als für unsere Zwecke ungeeignet. In diesem Falle wird auf ein und dasselbe Diphtherieheilserum von bekanntem Antitoxingehalt, etwa 100 A.E., mit verschiedenen Toxinverdünnungen, beispielsweise von 1 : 5 bis 1 : 15, überschichtet. Das Toxin wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, das Di-Serum mit 5proz. NaCl-Lösung und Normalserumzusatz von 20% zubereitet.

„Je höher die antigenen Eigenschaften des Di-Toxins sind, um so größer ist auch dessen endgültiger Verdünnungsgrad, der eine Ring-precipitation erzeugen kann.“ Die Verfasser erhielten bereits bei Toxinverdünnungen von 1 : 15 keine Reaktion mehr.

Auch dieses Verfahren kam für unsere Untersuchungen nicht in Betracht.

3. „Die Methode nach *Römer* beruht darauf, daß die intracutane Einverleibung kleiner Mengen von Diphtherietoxin beim Meerschweinchen charakteristische Reaktionen auslöst, die nach 2—4 mal 24 Stunden ihren Höhepunkt erreichen und je nach der Giftmenge alle Stadien von einfacher Rötung über Infiltration bis zur Nekrose aufweisen. Die kleinste Giftdosis, welche intracutan eben noch Nekrose hervorruft (,D. n. m.‘ = Dosis necrosis minima), beträgt etwa $\frac{1}{250}$ — $\frac{1}{500}$ der letalen Dose bei subcutaner Injektion.“ (*Hammerschmidt*.)

Um möglichst gut sichtbare Reaktionen zu erhalten, verwandten wir meist helle Tiere. Am Tage vor der Toxininjektion wurden sie auf einer genügend großen Fläche der Bauchhaut geschoren und dann mit Hilfe eines Depilatoriums (*Beiersdorf*) ganz glatt enthaart. Wir setzten gewöhnlich pro Tier 3—4 Intrakutanquaddeln, injizierten hierbei in jede Quaddel 0,2 ccm.

Die Reaktionen wurden nach dem Beispiel von *E. Neumann* folgendermaßen unterschieden:

Infiltrat:	i = linsengroß, J = bohngroß, J! = pflaumenkerngroß.
Farbe:	r = hellrot, R = dunkelrot, bl r = bläulichrot, Bl R = dunkelblaurot.
Nekrose:	n = hirsekorngroß, N = linsengroß, N! = bohngroß.
Schorf:	s = kleiner Schorf, S = großer Schorf.

Wir erhielten mit unserem Testgift sehr starke Reaktionen und sogar noch bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 eine deutliche Rötung. Dieser Wert entspricht einer Giftmenge (auf unverdünnte Toxinbouillon bezogen) von 0,00002 ccm in einer Quaddel von 0,2 ccm Inhalt. *Mit dieser Methode waren wir also in der Lage, selbst äußerst geringe Mengen von Diphtherietoxin nachzuweisen.* Wir entschlossen uns daher, trotz der hohen Kosten, die *Römersche* Methode als das Vorgehen der Wahl für unsere Versuche aufzunehmen, und haben damit alle unsere Fragen bearbeitet.

Bei allen bisherigen Untersuchungen über die Giftbildung der Diphtheriebacillen ist ein Bacillenmaterial verwendet worden, das nach

dem zuerst von *Löffler* angegebenen Verfahren in Bouillon gezüchtet worden war (*Schick, Gins, Neisser, Walbum, Schmidt* u. a.). Man hat dabei viel Erfahrungen über die Toxin-Produktion bei der Kultur in Bouillon gesammelt; die wichtigsten waren: 1. die Beobachtung, daß nur einzelne Stämme von Diphtheriebacillen regelmäßig Toxin produzieren, 2. daß die Giftbildung ein und desselben Stammes stark schwankt und 3. daß die beste Ausbeute an Toxin in einer Bouillon erhalten wird, wenn 1% Pepton, das viel höhere Peptide enthält, zugesetzt wurde (*Walbum, Schmidt* u. a.).

Bedenkt man nun, welch kompliziertes Gemisch von chemisch nur teilweise bekannten Substanzen eine Bouillon darstellt, so leuchtet ohne weiteres ein, was für unübersichtliche Verhältnisse durch das Züchten der Bakterien auf solchen Substraten entstehen. Die aussichtsreichste Methode, Näheres über die Giftbildung der Bakterien zu erfahren, schien uns ein Versuch, dieselben in chemisch wohl definierten, stets genau reproduzierbaren Substraten von einfacher, genau bekannter Zusammensetzung wachsen und Toxin bilden zu lassen.

Nur so können wir erfahren, welche Bestandteile des Nährbodens wichtig für das Wachstum und die Toxinbildung sind, welche belanglos, welche hemmend wirken. Und nur so konnten wir hoffen, feinere Unterschiede aufzudecken zwischen „toxischen Stämmen“, d. h. solchen, die von Patienten mit toxischer Diphtherie herstammten, und gewöhnlichen Di-Stämmen, die aus Rachenabstrichen von leicht- und mittelschwer Erkrankten reingezüchtet waren.

Die grundlegenden, sehr interessanten Arbeiten *Brauns* wiesen uns den Weg, wie man Bakterien unter ganz übersichtlichen Züchtungsbedingungen untersuchen kann.

Braun und seine Mitarbeiter studieren seit Jahren den Verwendungsstoffwechsel pathog. Mikroorganismen nach einer ganz neuen, aufschlußreichen Arbeitsmethode. Diese Forscher untersuchten systematisch, welche chemischen Körper den Bakterien zur Verfügung gestellt werden müssen, damit sie leben können. Es gelang ihnen, für eine große Reihe von Mikroorganismen einige einfache Bausteine zu ermitteln, mit deren Hilfe sie ihre Leibessubstanz zu synthetisieren vermögen.

Auch für die Diphtheriebacillen hat *Braun* einen synthetischen Nährboden zusammengestellt, in dem bei „anspruchlosen Stämmen“ gutes Wachstum und auch gelegentlich, allerdings sehr geringe, Toxinbildung beobachtet worden war.

Durch diese Arbeiten *Brauns* war die Grundlage für unsere Experimente geschaffen. Wir richteten uns in der Technik der Gewinnung und Züchtung der Stämme ganz nach seinen Angaben (*Abderhalden, Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. XII, Teil-Lief. 332*). Wir ver-

danken es der Freundlichkeit Prof. *Brauns*, daß wir uns in seinem Frankfurter Laboratorium mit seinen Methoden vertraut machen durften, und wir möchten ihm auch an dieser Stelle unseren aufrichtigen Dank aussprechen für sein lebhaftes Interesse an unserer Arbeit und die große Förderung, die unsere Untersuchungen durch ihn erfahren haben.

Unsere Diphtheriestämme gewannen wir aus Rachenabstrichen, die wir auf Löfflerplatten weiterverimpften, bis wir Reinkulturen erhielten. Im allgemeinen genügten hierzu 3—4 Passagen. Die reingezüchteten Stämme brachten wir auf Schrägagar, stellten sie für etwa 2 Tage in den Brutschrank (Temp. 37° C.) und bewahrten sie weiterhin bei Zimmertemperatur im Dunkeln auf. Dies bedingte ein sehr langsames Wachstum, und unsere „Stammkulturen“ konnten so gut 3—4 Wochen lebensfähig erhalten werden.

Bei Bedarf verimpften wir eine Öse unserer Stammkulturen wieder auf Löfflerplatten und kontrollierten im mikroskopischen Präparat, das nach *Neisser* gefärbt wurde, ob die Stämme nicht verunreinigt waren. Verunreinigte Kulturen wurden durch mehrfache Passagen auf Löfflerplatten wieder gesäubert, während wir die reinen Stämme auf gewöhnliche Agarplatten ausstrichen und sie im Laufe von 8 Tagen noch 1—2mal auf diesem Nährboden weiterverimpften. Durch die Züchtung auf Agar = Agar glaubten wir unsere Diphtheriebakterien an schlechtere Ernährungsbedingungen gewöhnen zu können.

Für unsere Versuche benutzten wir den flüssigen, synthetischen Nährboden, der von *Braun-H. Schmidt* angegeben ist und sich folgendermaßen zusammensetzt:

Lösung I.

Chemisch reine Asparaginsäure	0,5 g
n-NaOH	3,758 cem
Aqua bidest.	ad 50 cem

Lösung II.

Na ₂ SO ₄	0,5 g
MgCl ₂	0,005 g
Natriumacetat	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,022 g
K ₂ HPO ₄	0,26 g
Aqua bidest.	ad 50 cem

Zu 100 cem Lösung I—II kommt ein Zusatz von 0,003 g Cystin. Die Nährflüssigkeit, die völlig klar werden muß, wird 15—20 Minuten bei 100° sterilisiert und dann auf eine H-Ionenkonzentration von $p_H = 7,6$ geprüft und eingestellt.

Wir verteilen die Nährflüssigkeit auf flache Kölbchen, die durch ihre besonders breite Grundfläche (Durchmesser etwa 9 cm) einen ausreichenden Sauerstoffaustausch gewährleisten. Die Gefäße, die zu etwa $\frac{1}{3}$ ihres Volumens angefüllt wurden, beschickten wir mit

2—3 Ösen Bakterienmaterial von der Agarplatte, schüttelten sie gut durch und brachten sie in den Brutschrank (Temp. 37°).

Nach 2—3 Tagen zeigte sich in einigen Kölbchen meist schon eine beginnende Trübung, ein Zeichen, daß hier das Wachstum besonders gut war. Die Trübung nahm im Verlaufe der nächsten Tage stetig zu und erreichte nach etwa 6—8 Tagen ihren Höhepunkt. Es zeigte sich, daß einige Stämme die Nährflüssigkeit diffus trübten, während andere dauernd in feinkörnige Klumpen geballt wuchsen. Dieser Formunterschied im Wachstum, auf den auch *Braun* hinweist, blieb für die betreffenden Bakterienstämme charakteristisch. Wir fanden, daß von unseren 30 Bakterienstämmen nur etwa die Hälfte auf synthetischem Nährboden gedieh, während der Rest selbst nach 2—3 Wochen makroskopisch noch keinerlei Wachstum zeigte. Auch ein Ausstrich auf Löfflerplatte bewies hier, daß keine lebenden Bakterien mehr vorhanden waren.

Wir erhielten schließlich 11 bewährte Stämme, die wir auf synthetischem Nährboden weiterverimpften, indem wir in jedes der neuen Kölbchen mit Capillarpipette 5 Tropfen der alten Lösung einbrachten. Durch Aussaat auf Löffler- oder Agarplatten und Untersuchung im gefärbten Präparat wurden die Kulturen von Zeit zu Zeit auf ihre Reinheit geprüft.

Da wir insbesondere die Giftbildung unserer Stämme studieren wollten, verimpften wir unsere Kulturen gleichzeitig auf synthetischen Nährboden, der noch einen Zusatz von 1% Pepton (*Roche*) erhalten hatte.

Nach Ansicht verschiedener Autoren ist zur Giftbildung die Anwesenheit von Eiweißsubstanzen in irgendeiner für die Diphtheriebacillen assimilierbaren Form notwendig. Auch *Dernby* und *Walbum* vertreten die Meinung, daß das Vorhandensein von höheren Peptiden eine unerläßliche Bedingung für die Toxinbildung ist. Nach ihrer Theorie „scheint das Toxin selbst durch einen enzymatischen Prozeß gebildet zu sein, d. h. aus einem intermediären Spaltprodukt zu bestehen, welches wohl am ehesten von albumoseartigem Charakter ist“ (vgl. *Walbum*).

Folgendes Protokoll (Tab. 3) gibt auszugsweise einen Überblick über den Verlauf des Versuchs, wie er von uns angesetzt und durchgeführt wurde:

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, überschichteten wir die Braunpepton-Kulturen bereits nach zweitägigem Aufenthalt im Brutschrank zur Abtötung der Bacillen mit Toluol, da zu diesem Zeitpunkt die Nährflüssigkeit schon intensiv getrübt war. Die Braunkulturen ohne Peptonzusatz zeigten im Gegensatz hierzu zum Teil erst eine leichte Opaleszenz. Wir ließen sie deshalb noch 4 Tage länger im Brutschrank, um sie dann ebenfalls mit Toluol zu überschichten. Die überschichteten Kulturen wurden täglich durchgeschüttelt. 5—6 Tage nach dem Überschichten entnahmen wir mittels Capillarpipette eine Probe der Nähr-

flüssigkeit, um sie auf Löfflerplatten auszustreichen. Hierbei mußte vermieden werden, daß Toluol mit auf die Platten geriet.

Die Kulturen, die noch Wachstum zeigten, schieden aus. Hierauf spritzten wir die Braun-Pepton-Kulturen im Intrakutanversuch am Meerschweinchen in Verdünnungen $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$ und $\frac{1}{10000}$. Die Braunkulturen injizierten wir erst 14 Tage später, spritzten hierbei aber zwei Braun-Pepton-Kulturen, die gute Reaktionen gezeigt hatten, zur Kontrolle mit.

Tab. 4 ergibt das Resultat dieser ersten Versuchsserie:

Auf Braunnährboden mit Peptonzusatz hatten von 6 Bakterienstämmen, die wir von klinisch besonders bösartigen (toxischen) Diphtheriefällen gewonnen hatten, 4 (also $\frac{2}{3}$) sehr gut Gift gebildet, was in den starken örtlichen Reaktionen zum Ausdruck kam. Demgegenüber standen 3 Kulturen, die von nicht toxischen Diphtherien stammten. Hiervon hatte eine (B 1617, von einem Bacillenträger herrührend) kein Gift gebildet, während die beiden anderen gleich starke Reaktionen verursachten wie die „toxischen“ Stämme. Auch im Aussehen der Reaktionen zeigte sich kein Unterschied. Auf 2 Giftbildner entfiel also in jeder Gruppe ein Versager.

Tab. 5 zeigt, daß die Giftbildung auf Braunnährboden ohne Peptonzusatz äußerst gering, fast null, war. Nur bei zwei Tieren erhielten wir schwache Reaktionen. Die zur

Tabelle 3. Schema unserer Versuchsanordnung an Hand von 3 Beispielen.

Stamm Nr.	Herkunft	Datum der Überimpfung auf				Resultat	Tollnbehandlung am	Auf Löffler (Kontrolle) am	Resultat
		synthetischen Nährboden	synthet. Nährboden + 1% Pepton	Agar (Kontrolle)					
1 617	Bacillenträger	16. XII. 1930	—	18. XII. 1930	rein	23. XII. 1930	29. XII. 1930	steril	
22 618	gewöhnliche Rachen-diphtherie	—	16. XII. 1930	18. XII. 1930	„	18. XII. 1930	23. XII. 1930	„	
		16. XII. 1930	—	18. XII. 1930	„	23. XII. 1930	29. XII. 1930	unrein, keine Di-Bacillen	
11 641	toxische Diphtherie	—	16. XII. 1930	18. XII. 1930	verunreinigt!	<i>nicht verwendet</i>		<i>nicht verwendet!</i>	
		16. XII. 1930	—	18. XII. 1930	rein	23. XII. 1930	29. XII. 1930	steril	
		—	16. XII. 1930	18. XII. 1930	„	18. XII. 1930	23. XII. 1930	„	

Tabelle 4. Verdünnungen $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10000}$ pro Quaddel 0,2 ccm.

Kultur Nr.	Meerschweinchen Nr.	Giftmenge (auf ccm unverd. Nährflüssigkeit berechnet)	Reaktion am				
			1.	2.	3.	4.	
			Tage post inject.				
B 1 617	182	—	—	—	—	—	Kontrollinjektion mit 0,2 ccm unbeimpftem Nährboden
		—	—	—	—	—	
		0,02	—	—	—	—	
		0,002	—	—	—	—	
B 1617	294	—	—	—	—	—	Kontrollinjektion mit 0,2 ccm unbeimpftem Nährboden
		—	—	—	—	—	
		0,0002	—	—	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	
D 7205	178	0,02	blr J!	n	N	S	
		0,002	blr i	blr i	blr I	ri	
	220	0,0002	ri	—	—	—	
		0,00002	ri	—	—	—	
D 7325	190	0,02	blr J!	N!	S	S	
		0,002	blr J	—	—	—	
	203	0,0002	—	ri	—	—	
		0,00002	—	ri	—	—	
T 6679	60	0,02	blr J!	n	N	S	
		0,002	blr J	blr J	blr J	blr i	
	110	0,0002	ri	r J	—	—	
		0,00002	ri	—	—	—	
T 10 122	196	0,02	blr J!	N!	N!	S	
		0,002	ri	r J	r J	—	
	238	0,0002	—	—	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	
T 11 641	172	0,02	blr J!	n	n	s	
		0,002	ri	blr J	blr J	—	
	268	0,0002	—	—	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	
T 11 733	290	0,02	blr J!	N!	S	S	
		0,002	—	—	—	—	
	274	0,0002	—	r J	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	
T 13 308	228	0,02	—	ri	—	—	
		0,002	—	—	—	—	
	58	0,0002	—	—	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	
T 13 762	265	0,02	—	—	—	—	
		0,002	—	—	—	—	
	142	0,0002	—	—	—	—	
		0,00002	—	—	—	—	

Legende: B = Stamm von Bacillenträger; D = Stamm von gewöhnlicher Rachendiphtherie; T = Stamm von toxischer Diphtherie.

Tabelle 5.

Verdünnungen $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$. Kontrolle, dazu Peptonkultur D 7205 und T 11641.

Kultur Nr.	Meerschweinchen Nr.	Giftmenge (auf com unverd. Nährflüssigkeit berechnet)	Reaktion am								
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	
			Tage								
B 1617	146	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D 7205	261	0,02	—	ri	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	r	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	ri	—	—	—	—	—	—	—
D 7318	131	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D 7325	296	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T 6679	295	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T 10 122	286	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T 11 641	108	0,02	ri	ri	—	—	—	—	—	—	—
		0,002	r	—	—	—	—	—	—	—	—
		0,0002	r	—	—	—	—	—	—	—	—
D 7205 (1% Pepton- zusatz)	217	0,02	ri	blr	JN	S	} Kontrolle, vgl. Tab. 4	desgl.	vernarbt	—	—
		0,002	ri	blr	Jn	s					
		0,0002	—	—	—	—					
T 11 641 (1% Pepton- zusatz)	225	0,02	ri	blr	JN	S	desgl.	vernarbt	—	—	—
		0,002	ri	ri	—	—					
		0,0002	—	—	—	—					

Kontrolle mitgespritzten peptonhaltigen Kulturmedien dagegen wirken wieder prompt. Auch bei den Kulturen auf Braunnährboden ohne Peptonzusatz ergab sich kein Unterschied zwischen den Stämmen von toxischer und nichttoxischer Diphtherie, denn auch die „toxischen Stämme“ bildeten in dem eiweißfreien Milieu kein Gift.

Die hier mitgeteilten Versuchsreihen scheinen die eingangs von uns gestellten Fragen in durchaus eindeutiger Weise zu beantworten und sind auch in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die von den verschiedensten Seiten bisher über das Wesen der Toxinbildung gemacht wurden.

Aus unseren Experimenten geht hervor, daß sich kein Unterschied bezüglich der Giftbildung zeigte zwischen den Bacillen von Patienten

mit toxischer Diphtherie und solchen Stämmen, die aus Abstrichen von banaler Rachen- oder Nasendiphtherie reingezüchtet worden waren.

Sowohl die „toxischen“ wie auch die „gewöhnlichen“ Stämme bildeten, auf synthetischem, *eivweißfreiem* Nährboden nach den Methoden von *Braun* gezüchtet, kein oder nur äußerst wenig Toxin. Wurde diesem Nährmedium 1% Pepton zugesetzt, so beobachteten wir, daß etwa $\frac{2}{3}$ der „toxischen“ Stämme und auch $\frac{2}{3}$ der „gewöhnlichen“ Stämme reichlich Gift produzierten. Soweit unsere Methode eine quantitative Schätzung zuläßt, hatten alle Stämme bei Peptonzusatz ungefähr gleiche Toxinmengen gebildet.

Somit sank die Hypothese einer besonders reichlichen Giftbildung bei toxischen Stämmen in ein Nichts zusammen. Der schwere Verlauf der toxischen Diphtherie könnte nun aber nicht nur dadurch erklärt werden, daß hier große Giftmengen vorhanden sind, sondern auch durch die Annahme, daß das Toxin dieser Stämme qualitativ verändert ist. Diese Anschauung verliert aber sofort an Wahrscheinlichkeit, wenn wir die Resultate betrachten, die *Schmidt* in seinen Experimenten gewann. Dieser Autor konnte nachweisen, daß das Toxin toxischer Stämme ebenso gut und genau durch das antitoxische Serum der Behringwerke neutralisiert wird, wie das Diphtheriegift der Marburger Standardstämme. Läge bei der toxischen Diphtherie wirklich eine andere Giftsubstanz vor, so könnte dies nicht der Fall sein.

Nun gibt es noch eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Bösartigkeit der toxischen Fälle: Es könnte die Geschwindigkeit der Neutralisation von Toxin und Antitoxin geringer sein als bei den üblichen bisher bekannten und zur Serumbereitung verwandten Stämme. *Madsen* hat versucht, einen derartigen qualitativen Unterschied in den von verschiedenen Bakterienstämmen herrührenden Giften nachzuweisen. In der Tat ist es ihm auch gelungen, einige Anhaltspunkte dafür zu finden, daß Unterschiede in der Neutralisationsgeschwindigkeit vorliegen.

Schließlich können wir auch noch mit *Langer* die Möglichkeit ins Auge fassen, daß die Geschwindigkeit der Fixation der Diphtherietoxine verschiedener Herkunft im tierischen Organismus nicht immer gleich groß sein muß. Ein solches Verhalten, das ebenfalls auf qualitative Verschiedenheit der Gifte hinweist, könnte das Versagen der Serumtherapie bei toxischen Fällen erklären.

Langers Untersuchungen beantworten uns diese Frage nicht einwandfrei, da seine Versuchsbedingungen unübersichtlich waren. Er verwandte nämlich lebende Bacillen + Nährmedium (Bouillon), prüfte also Virulenz und Toxizität seiner Kulturen gleichzeitig.

Wir haben selbst Versuche über die Virulenz verschiedener Stämme gemacht, wobei lebende Bacillen ohne deren Toxine verwandt wurden, und haben gewisse Beobachtungen gemacht, die die *Langerschen* An-

schauungen bis zu einem gewissen Grade zu stützen vermögen (vgl. *Heissen*).

Bei den hier vorliegenden Versuchen konnten wir jedoch keine Beobachtungen machen, die mit der Theorie einer qualitativen Differenz der Diphtheriegifte verschiedener Herkunft in Einklang zu bringen wären.

Wir sahen weder Differenzen in der Geschwindigkeit, mit der eine Hautreaktion auftrat, noch wesentliche und grundsätzliche Unterschiede in der Art des Ablaufes der Hautinfiltrate und Nekrosen.

Zwar haben unsere Versuche keine Aufschlüsse über qualitative und quantitative Differenzen zwischen „toxischen“ und nicht toxischen Stämmen ergeben, doch haben sie uns über die Zusammenhänge zwischen Giftbildung und Nährsubstrat orientiert. Bei unserem einfachen und übersichtlichen Kulturverfahren zeigte sich einwandfrei, daß gewisse Ernährungsfaktoren von ausschlaggebender Bedeutung für die Toxinbildung sind. Ein geringer Peptonzusatz zu einem aus Salzen und 2 Aminosäuren bestehenden Nährmedium fördert die Giftbildung ganz außerordentlich.

Diese Versuche sprächen dafür, daß die Giftbildung nicht von der Eigenart des verwandten Stammes, sondern nur von seiner Ernährung abhängt. Ziehen wir die letzte Konsequenz aus dieser Anschauung, daß die Ernährungsbedingungen für die Toxinbildung ausschlaggebend sind, so wird das entscheidende Moment nicht mehr im Diphtheriestamm liegen, sondern im Medium, in dem er wächst. So kommt es nicht mehr auf den Diphtheriebacillus an, sondern auf sein Substrat, den Patienten, ob eine Diphtherie toxisch wird oder nicht. Damit nähern wir uns den Ansichten *Koschates*, der die toxische Diphtherie auf konstitutionelle Momente zurückführt.

In der demnächst hier folgenden Arbeit von *Grüneberg* wird klargelegt, weshalb wir diesen Standpunkt ablehnen müssen.

Die Studien über die Giftbildung der Diphtheriebacillen in Abhängigkeit von ihrer Ernährung wurden in der Weise fortgesetzt, daß an Stelle des Peptonzusatzes hydrolysiertes Pepton, das keine Biuretreaktion, keine Fällung mit Essigsäure, Salpetersäure usw. mehr gab, zugefügt wurde.

Wir züchteten 3 Stämme auf gewöhnlichem Nährboden nach *Braun* und auf solchem mit 1% hydrolysiertem Pepton. Bei letzterem war das Wachstum sehr gut, doch fanden wir, ebenso wie bei Braunböden ohne Zusatz, gar keine Toxinbildung.

Durch diesen Versuch wurde der Beweis erbracht, daß bei genügender Zufuhr von Aminosäuren wohl ein reichliches Wachstum gewährleistet wird, daß jedoch das Toxin nur entsteht, wenn hochmolekulare Polypeptide wie die des Peptons vorhanden sind.

Zur Deutung dieses Versuchs brauche ich nur auf die bekannte Theorie von *Walbum* über die chemische Natur des Diphtherietoxins hinzuweisen, die er in Zusammenhang mit seinen Beobachtungen über die vermehrte Toxinbildung bei Peptonzusatz ausgesprochen hat.

Unsere Ernährungsversuche bestätigten uns die *Walbumsche* Auffassung, daß der wichtigste Faktor für das Zustandekommen der Toxinbildung ein exogener ist. Gleichzeitig glaubten wir folgern zu dürfen, daß die Dauer der Bebrütung ohne Einfluß auf die Giftbildung ist, also nicht etwa durch freiwerdendes Bacilleneiweiß in älteren Kulturen die Giftbildung vermehrt werde.

Ein letzter Versuch ließ uns dagegen Zweifel an der Richtigkeit unserer Anschauungen aufkommen, da sich hier deutlich endogene Einflüsse neben dem exogenen Ernährungsfaktor geltend machten:

Wir versuchten nämlich, mit denselben 3 Stämmen, die wir bei den Experimenten mit hydrolysiertem Pepton verwandt hatten, in Medien mit Peptonzusatz erneut Toxinbildung hervorzurufen. Dies gelang zwar, jedoch in quantitativ viel geringerem Maße als bei der ersten Versuchsreihe mit Peptonzusatz 3 Monate vorher (vgl. Tab. 4). Worauf diese endogen bedingte Hemmung in der Toxinbildung zurückzuführen war, konnte noch nicht ermittelt werden. Vielleicht waren die Stämme überaltert (vgl. *Langer*).

Da die Protokolle der eben geschilderten Versuche nichts grundsätzlich Neues gegenüber den ersten Experimenten bringen, verzichten wir auf ihre Wiedergabe. Doch glauben wir, unsere Erfahrungen mitteilen zu müssen, da aus diesen letzten Experimenten zu ersehen ist, wie kompliziert die Verhältnisse liegen, und daß wir nicht ohne weiteres aus unseren ersten Versuchen den Schluß ziehen dürfen, daß das Toxinbildungsvermögen der Diphtheriebacillen ausschließlich von ihrer Ernährung abhängig ist. Es wird im Gegenteil noch vieler Versuche bedürfen, ehe die Frage, ob und in welchem Maße die Toxinbildung durch endogene oder exogene Faktoren beeinflußt wird, ganz geklärt ist.

Wie die folgende Zusammenfassung ergibt, konnten jedoch einige Fragen des Problemkomplexes, dem wir in dieser Arbeit näher zu kommen suchten, eindeutig beantwortet werden.

Zusammenfassung.

1. Auf einem synthetischen, flüssigen Nährboden, der nach den Angaben *Brauns* Salze, Cystin und Asparaginsäure enthält, konnte die Hälfte unserer rein gezüchteten Diphtheriestämme verschiedener Herkunft wachsen.

2. Die Giftbildung in solchen Medien blieb aus oder war verschwindend gering.

3. Durch Zusatz von 1% Pepton zum *Braunschen* Nährboden konnte etwa $\frac{2}{3}$ der geprüften Stämme zur Giftbildung gebracht werden, nicht aber durch Zusatz von hydrolysiertem Pepton.

4. Es wurde festgestellt, daß Wachstum und Toxinbildung nicht parallel gehen, da häufig abundantes Wachstum ohne Giftproduktion auf synthetischem Nährboden ohne Peptonzusatz auftrat.

5. Wir züchteten Stämme, die von Patienten mit toxischer Diphtherie und solche, die von Patienten mit banaler Rachen- und Nasendiphtherie herstammten. Auf synthetischen Nährböden war kein Unterschied in der Menge des gebildeten Giftes zwischen toxischen und gewöhnlichen Stämmen zu beobachten. Soweit der Meerschweinchenversuch Rückschlüsse zuläßt, glauben wir auch keine Anhaltspunkte für qualitative Unterschiede im Toxin dieser Stämme finden zu können.

6. Es scheint nach unseren Versuchen, daß Diphtheriestämme mit dem Alter ihr toxisches Vermögen verlieren können.

Literaturverzeichnis.

- Braun, H.*, u. *F. Mündel*, Zur Ernährungsphysiologie der Diphtheriebacillen. I. Die Nahrungsbedürfnisse der Diphtheriebacillen in synthetischen Nährböden in quantitativer Hinsicht. Zbl. Bakter. I Orig. **112** (1929). — *Braun, H.*, *K. Hofmeier* u. *F. Mündel*, II. Die Nahrungsbedürfnisse der Diphtheriebacillen in synthetischen Nährböden in qualitativer Hinsicht. Zbl. Bakter. I Orig. **113** (1929). — *Braun, H.*, Methoden zur Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels pathogener Bakterien. In *Aberhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. XII, Liefg. 332. Urban & Schwarzenberg 1930. — *Gins, H. A.*, Diphtherie. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, hrsg. von W. Kolle und A. v. Wassermann **5**, 451. 3. Aufl. Jena: Fischer 1928. — *Hammerschmidt, J.*, Serologische Untersuchungstechnik. Jena: Fischer 1926. — *Hoehn, E.*, *W. Zipp* u. *L. Tschertkow*, Die Wertbestimmung des Diphtherieheilserums mittels der Präcipitationsmethode. Z. Immun.forschg **45**, 387 (1926) — Studien über das Wesen des „Lp“ des Diphtherietoxins. Z. Immun.forschg **48**, 191 — Über die Bestimmung der Eigenschaften des Diphtherietoxins und Anatoxins mittels der Präcipitationsmethode. Z. Immun.forschg **51**, 349. — *Hoehn, E.-L. Tschertkow*, Kann die Beschleunigung des Reaktionsverlaufes der Flockulation nach Ramon für eine Auswertung der antigenen Eigenschaften von Diphtherietoxoiden verwendet werden? Z. Immun.forschg **57**, 337. — *Koschate*, Klin. Wschr. **10**, 62 (1931). — *Langer*, Verh. dtsh. Ges. Kinderheilk., Wiesbaden **1930**, 171. — *Madsen, Th.*, u. *S. Schmidt*, Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Diphtherietoxin und Antitoxin und ihre Bedeutung für die Heilkraft des antidiphtherischen Serums. Z. Immun.forschg **65**, 357 (1930). — *Neisser, M.*, u. *H. A. Gins*, Über Diphtherie. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, hrsg. von W. Kolle und A. v. Wassermann **5**, 931. 2. Aufl. Jena: Fischer 1913. — *Neumann, E.*, Experimentelle Beiträge zur Frage des Diphtherietoxin-Nachweises im menschlichen Blutserum. Jb. Kinderheilk. **125**, 311. Berlin: Karger 1929. — *Pick, E. P.*, u. *F. Silberstein*, Biochemie der Antigene und Antikörper. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, hrsg. von W. Kolle und A. v. Wassermann **2**, 317. 3. Aufl. Jena: Fischer 1928. — *Ramon, G.*, Contribution à l'étude du mécanisme de la floculation dans les mélanges de toxine diphtérique et du sérum antidiphtérique. Zbl. Bakter. II Ref. **97**, 340 — Floculation dans un

mélange neutre de toxine-antitoxine diphtérique. Zbl. Bakter. II Ref. **75**, 441 — Sur une technique de titrage in vitro du serum antidiphthérique. Zbl. Bakter. II Ref. **75**, 442 — A propos du titrage in vitro du sérum antidiphthérique par la floculation. Zbl. Bakter. II Ref. **75**, 443 — Sur la concentration du sérum antidiphthérique et l'isolement de l'antitoxine. C. r. Soc. Biol. Paris **88**, 167 (1923) — Pouvoir floculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique. C. r. Soc. Biol. Paris **89**, 2 (1923). — *Schick, B.*, Die Diphtherie. Handbuch der Kinderheilkunde, hrsg. von M. v. Pfaundler und A. Schlossmann **2**, 1. 4. Aufl. Leipzig: Vogel 1931. — *Schmidt, H.*, Zur Kenntnis der Natur der Diphtherie-Toxin-Antitoxinflockung. Z. Immun.forschg **48**, 217 (1926). — *Schmidt, H.*, u. *W. Scholz*, Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie-Toxin-Antitoxingemischen. I. Die Beziehung zwischen der Neutralisation in vivo (Lo) und der Neutralisation in vitro (Lf) bei Diphtheriegiften. Arch. f. Hyg. **95**, 308 (1925) — II. Über den Einfluß der Temperatur und des Lagerens auf Diphtherie-Toxin-Antitoxingemische. Arch. f. Hyg. S. 339 — III. Die Beziehung der direkten Giftwirkung des Diphtherietoxins zu seiner Bindungsfähigkeit mit Antitoxin. Zugleich ein Beitrag zur Vorstellung über die Natur des Diphtherietoxins. Arch. f. Hyg. **96**, 172 — IV. Die Bedeutung der Zone bei der Ausflockung von Diphtherie-Toxin-Antitoxingemischen. Arch. f. Hyg. S. 185. — V. Die immunisierende Wirkung der bei der Diphtherie-Toxin-Antitoxinbindung auftretenden Flocken. Arch. f. Hyg. S. 251 — VI. Zur Kenntnis des Flockungsvorganges in Diphtherie-Toxin-Antitoxingemischen. Arch. f. Hyg. S. 294. — *Walbum, L. E.*, Toxine und Antitoxine. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, hrsg. von W. Kolle und A. v. Wassermann **2**, 513. 3. Aufl. Jena: Fischer 1928.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Privatdozent Dr. A. Hottinger, Oberarzt der Akademischen Infektionsklinik in Düsseldorf, für die Anregung zu dieser Arbeit und seine außerordentlich liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Herrn Dr. F. Grüneberg und Fräul. M. Loeff bin ich für die freundliche Hilfe bei der Ausführung der Versuche zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Ich wurde am 11. Mai 1907 zu Biebrich am Rhein geboren als Sohn des Kaufmanns Walter Lindemann und seiner Frau Anna, geborene Schramm. Ich besuchte in Dortmund vier Jahre lang die Volksschule und dann das Hindenburgrealgymnasium bis Untertertia. Seit 1921 wohnen wir in Düsseldorf. Hier bestand ich 1926 am Realgymnasium an der Rethelstraße die Reifeprüfung. Meine vorklinischen Studiensemester verbrachte ich in Freiburg und Bonn. In Bonn legte ich im März 1928 die ärztliche Vorprüfung ab. Die klinische Medizin studierte ich ein Semester in Bonn und fünf Semester in Düsseldorf. Hier bestand ich am 28. Mai 1931 mein Staatsexamen.

Ich gebe die eidesstattliche Versicherung ab, daß ich vorliegende Arbeit ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.