

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 108 (1966)

Heft: 6

Artikel: Zur Differentialdiagnose zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand mit Hilfe der Immunofluoreszenz

Autor: Martig, J.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-591672>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 10.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

täten bei einem Schwein. Dtsch. tierärztl. Wschr. 63, 89 (1956). – Spence J.B., Stevens A.J. and Saunders C.N.: Cerebrocortical Necrosis in Sheep and Cattle. The Clinical Syndrome. Vet. Rec. 73, 28 (1961). – Terlecki S. and Markson L.M.: Cerebrocortical Necrosis in Cattle and Sheep. Vet. Rec. 73, 23 (1961). – Yamagiva and Tajima: Neuro-histologische Studie über die Encephalomalacia bei Haustieren. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University I, No. 2, 145 (1952). – Zlotnik I., Nisbet D.I. and Campbell J.A.: Polio-Encephalomalacia associated with myocardial degeneration in a group of housed sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. J. comp. Path. 73, 39 (1963). – Zülch K.J. and Behrend R.C.H.: The pathogenesis and topography of anoxia, hypoxia and ischemia of the brain in man. In: Cerebral Anoxia and the Electroencephalogram by H. Gastaut and J.S. Meyer. Verlag Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (USA) 1961.

Anschrift des Verfassers: Doz. Dr. J. von Sandersleben, Vet.-Pathologisches Institut der Justus Liebig-Universität, 63 Gießen, Frankfurterstraße 94.

Aus dem Veterinärbakteriologischen Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. H. Fey

Zur Differentialdiagnose zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand mit Hilfe der Immunofluoreszenz

Von J. Martig

Einleitung

Seit der Beschreibung des Pararauschbrandes und dessen Erreger, *V. septique* – heute allgemein *Cl. septicum* genannt – durch Pasteur im Jahre 1877 und des Rauschbrandes und seines Erregers *B. chauvoei* – *Cl. fesci* – durch Arloing, Cornevin und Thomas im Jahre 1887 (zit. in M. Weinberg, R. Nativelle und A. Prevot, 1937), bereitete die Differentialdiagnose zwischen diesen beiden Krankheiten den diagnostischen Laboratorien große Schwierigkeiten. Immer wieder wurde von den Spezialisten der Anaerobenzüchtung die Dualität der beiden Keime in Frage gestellt. So neigt zum Beispiel Weinberg (1937) in der Monographie «Les microbes anaerobes» nach ausführlicher Beschreibung der beiden Keime eher zur Ansicht, daß es sich bei *Cl. fesci* um einen speziell an das Rind adaptierten Typ von *Cl. septicum* handle.

Im folgenden gebe ich eine kurze vergleichende Beschreibung des Rauschbrandes und Pararauschbrandes, wobei ich mich hauptsächlich auf Weinberg, Nativelle und Prevot und L.D.S. Smith stütze:

Der Rauschbrand ist eine typische Weidekrankheit, die vor allem Rinder im Alter zwischen 4 Monaten und 4 Jahren befällt. Weniger häufig erkranken

Schafe und Ziegen. Wenn nicht im Frühstadium eine Therapie eingeleitet werden kann, führt die Krankheit meist zu einem mehr oder weniger streng lokalisierten Gasödem, mit rascher Verschlechterung des Allgemeinbefindens und innerhalb von 12–55 Stunden zum Tode durch Sepsis oder Toxämie. Der Rauschbranderreger kommt in gewissen Weidegebieten im Boden vor und hat dank seiner Versporung eine hohe Tenazität. Aus diesem Grunde sind Weiden, auf denen einmal ein Tier an Rauschbrand gefallen ist, über Jahrzehnte hinaus potentielle Infektionsquellen. Eine Übertragung von Tier zu Tier findet nicht statt. Die aktive Immunisierung, die in verschiedenen Modifikationen angewendet wird, bietet im allgemeinen einen guten Impfschutz für die ganze Weidezeit. Bei frühzeitiger und massiver Behandlung mit Antibiotika (eventuell zusammen mit Serum) kann die Krankheit erfolgreich bekämpft werden (Mathois und Stöckl, 1964). Als Infektionsweg wird allgemein der buccale (im Zusammenhang mit Zahnwechsel) angenommen. Die Rauschbrandkarbunkel stehen in den meisten Fällen nicht im Zusammenhang mit einer Hautwunde und können irgendwo in der quergestreiften Muskulatur auftreten. Die experimentelle buccale Infektion ist jedoch bis heute meines Wissens nie gelungen.

Der *Pararauschbrand* oder das *maligne Ödem*, wie es auch genannt wird, befällt sämtliche Haussäugetiere und ist auch, besonders auf Schlachtfeldern, ein gefürchteter Wundinfektionserreger des Menschen. Im allgemeinen ist der Pararauschbrand eine sekundäre Wundinfektion von akzidentellen oder künstlich gesetzten Wunden, begleitet von einem starken, sich rasch ausbreitenden Ödem, im spätern Stadium mit Gasbildung verbunden. Beim Rind ist er eine gefürchtete Komplikation nach Schweregeburten, weil sich der obligate Anärobier im traumatisierten und deshalb schlecht durchbluteten Cervical- und Vaginalgewebe besonders häufig festsetzt. Daraus ergibt sich die Bezeichnung Geburtsrauschbrand. In gewissen Gebieten (nicht in der Schweiz) tritt Pararauschbrand beim Schaf als Labmagen-Rauschbrand auf, Bradsot genannt, und ist dann, wie der Rauschbrand des Rindes, eine Weiderkrankung. Die Tiere sterben meist an Sepsis oder Toxämie. Eine Behandlung ist wegen des meist perakuten Verlaufes erfolglos. Der Pararauschbranderreger, *Cl. septicum*, kommt im Boden vor, ist aber auch normaler Darmbewohner von Herbivoren und kann deshalb agonal oder postmortal in den Körper auswandern. Der Nachweis von *Cl. septicum* aus gestorbenen oder in extremis geschlachteten Tieren ist aus diesem Grunde immer sehr vorsichtig zu beurteilen. Eine Vakzination ist wirksam. Meistens werden die Bergrinder vor der Weidezeit mit einer Rauschbrand/Pararauschbrand-Mischvakzine geimpft. In Beständen, wo Pararauschbrand als Stallinfektion immer wieder auftritt, werden sämtliche Tiere periodisch geimpft.

Nach Kenntnis dieser Tatsachen, insbesondere des verschiedenen epidemiologischen Verhaltens von Rauschbrand und Pararauschbrand, erwies es sich als sinnvoll, wohl den Rauschbrand, nicht aber den Pararauschbrand als anzeigepflichtige Seuche zu erklären. Mit der Anzeigepflicht verbunden

wird eine obligatorische Impfung der gefährdeten Bergrinder mit Entschädigung der nachgewiesenermaßen an Rauschbrand gestorbenen und geimpften Rinder. Es liegt somit im Interesse des behandelnden Tierarztes, der Instanzen der Tierseuchenpolizei und des Besitzers, wenn die Diagnose Rauschbrand eindeutig und möglichst rasch gestellt werden kann; insbesondere ist es natürlich von großer Bedeutung zu wissen, ob nicht etwa eine Mischinfektion von *Cl. fesci* und *Cl. septicum* besteht, die deshalb häufig nicht erkannt wird, weil *Cl. septicum* im Kadaver und in der Kultur rasch wächst und dadurch *Cl. fesci* dominiert und wegen des Rasenwachstums überdeckt. Weinberg schätzt, daß bei 13–17% der Fälle eine Mischinfektion besteht.

Bakteriologie

Mit den klassischen Methoden der Pathologie und Bakteriologie ist die Differentialdiagnose zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand oft sehr schwierig zu stellen. Pathologisch-anatomisch unterscheiden sich Gasödeme, die durch die beiden Keime verursacht wurden, nicht deutlich. Es bestehen für keine der beiden Infektionen pathognomonische Veränderungen, und das Sektionsbild ist in vielen Fällen bereits durch postmortale Fäulnis verwischt.

Cl. fesci und *Cl. septicum* sind einander morphologisch und kulturell nahe verwandt. Beides sind anaerobe Sporenbildner, grampositive, sehr rasch gramfärbbar werdende, relativ plumpe Stäbchen. *Cl. fesci* ist ein 3–8 μ langes, etwa 1 μ dickes Stäbchen mit zentraler bis subterminaler Sporenlagerung. *Cl. septicum* ist eher etwas feiner, die Sporenlagerung ist auch zentral bis subterminal. Bei beiden Arten, besonders aber bei *Cl. fesci*, kommen Involutionsformen vor, die wie Ballone, Zitronen oder Weberschiffchen aussehen können (Meyn, 1934; Weinberg, Nativelle und Prevot, 1937; Fey, 1965). Auf Leberabklatschpräparaten und Präparaten von Peritonealflüssigkeit reihen sich *Cl. septicum*-Stäbchen zu langen Fäden zusammen, während bei *Cl. fesci* sich nie mehr als 4–5 Stäbchen zu einer Kette zusammenlagern. Verschiedene Autoren haben *Cl. septicum*-Stämme gefunden, die keine Fäden bildeten. Immerhin gilt als deutlicher Hinweis für eine *Cl. septicum*-Infektion, wenn man auf Leberabklatschpräparaten lange Fäden findet. Eine Mischinfektion mit *Cl. fesci* ist damit natürlich nicht ausgeschlossen. Mit Hilfe der anaeroben Technik nach Fey (1958) gelingt es im allgemeinen, *Cl. fesci* oder *Cl. septicum* reinzuzüchten und biochemisch zu differenzieren. *Cl. fesci* wächst auf dem 2%igen Trypticase-Soy-Agar, dem 10% Schafblut beigemischt wird, als eine feine, oft erst nach 48 Stunden gut sichtbare Kolonie mit einer scharfen Hämolyse, während *Cl. septicum* einen hämolytischen Rasen bildet. Da aber andere pathogene und apathogene Clostridien ähnliche Kolonien bilden und die Wachstumsform von verschiedenen ökologischen Faktoren abhängt (besonders Feuchtigkeit der Platten), kann eine sichere Diagnose anhand der Kolonieförmigkeit nicht gestellt werden. Batty und Walker (1965) beschrieben Kolonieförmigkeiten von *Cl. fesci*, *Cl. septicum* und anderen Clostridien in Abhängigkeit von Agarkonzentration und Bebrütungsdauer und zeigten, daß *Cl. septicum* auf 1,8% Agar einen Rasen bildet, während es auf 3%igem Agar als kleine Kolonie wächst, die derjenigen von *Cl. fesci* sehr ähnlich ist. Über die Möglichkeit der Reinzüchtung von *Cl. fesci* aus einer Mischinfektion von *Cl. fesci* und *Cl. septicum* wird im experimentellen Teil der Arbeit berichtet.

In bezug auf biochemische Reaktionen sind sich die beiden Stämme ebenfalls sehr ähnlich. *Cl. fesci* vergärt Glukose, Maltose, Saccharose, Laktose, nicht aber Salicin. *Cl. septicum* vergärt Glukose, Maltose, Laktose und Salicin, nicht aber Saccharose. Auch hier gibt es Abweichungen, indem gewisse *Cl. fesci*-Stämme Saccharose nicht, andere dagegen aber Salicin vergären. Ebenso gibt es *Cl. septicum*-Stämme, die Salicin

nicht vergären und solche, die Saccharose fermentieren. Alle andern Reaktionen sind für beide Stämme gleich: Bildung von Nitrat, Verflüssigung von Ferrochloridgelatine ohne H_2S -Bildung, negative Indolreaktionen und Nicht-Verflüssigung von Löffler-Serum. Die von M. Bernard (zit. in Zschokke und Saxer, 1934, und Fey, 1958) eingeführte Methode des Nachweises von löslichem Hämolyisin, die von Zschokke und Saxer und Fey modifiziert wurde, soll eine eindeutig positive Reaktion für *Cl. fesci* und eine negative für *Cl. septicum* ergeben. Auch hier verweise ich auf meine eigenen Untersuchungen. Als weitere Methode der Differenzierung zwischen *Cl. septicum* und *Cl. fesci* wird der Äsculintest angewendet (Dahme, 1944): zu Leberbouillon wird 0,1 ml Äsculin beigesetzt. Nach 24stündiger Bebrütung mit *Cl. septicum* färbt sich das Medium bei Zugabe von Eisencitratlösung schwarz, behält dagegen seine bläulich fluoreszierende Farbe, wenn *Cl. fesci* gezüchtet wurde. (Dieser Test wird an unserem Institut nicht verwendet. Angaben über seine Zuverlässigkeit konnte ich in der Literatur nicht finden.)

Der direkte Tierversuch, meist am Meerschweinchen ausgeführt, erleichtert wohl die Reinzüchtung eines pathogenen Anaerobiers aus kontaminiertem Material, hilft aber nicht weiter bei der Differenzierung zwischen Rauschbrand und Pararauschbrand, weil die Sektionsbilder der beiden Infektionen einander sehr ähnlich sind. Nach Bürki (1951) eignet sich der syrische Goldhamster ebensogut, ohne aber besondere Vorteile gegenüber dem Meerschweinchen zu haben. Weidmüller (1952) kommt nach Aufzählung verschiedener kultureller und anderer nicht befriedigender Methoden der Differenzierung von *Cl. fesci* und *Cl. septicum* zum Schluß, daß auch Tierversuche mit dem syrischen Goldhamster sich nicht eignen, starben ihm doch nur 3 von 10 Tieren, die er mit *Cl. fesci* infizierte. Andere Versuchstiere wie Maus, Hund, Katze, Huhn und Ente sollen eine natürliche Immunität gegen *Cl. fesci* besitzen, während die Ratte nur lokale Veränderungen macht, die wieder abheilen (Weinberg, Nativelle und Prevot, 1937). Der Schutzversuch hilft uns zur Differenzierung auch nicht weiter, da die meisten *Cl. septicum* Antiseren auch gegen eine Infektion von *Cl. fesci* schützen, nicht aber umgekehrt (Fey, 1958).

Serologie

Schon früh wurden serologische Untersuchungen an *Cl. fesci* und *Cl. septicum* durchgeführt, besonders in bezug auf Kreuzreaktionen zwischen den beiden Arten. Leclainche und Vallée (zit. in Weinberg, Nativelle und Prevot, 1937) und nach ihnen viele andere Autoren fanden beim Vergleich homologer und heterologer Agglutinationen von *Cl. fesci* und *Cl. septicum* signifikante Titerunterschiede. Verschiedene Untersucher stellten überhaupt keine Kreuzreaktionen zwischen den beiden Arten fest. Andere Autoren, wie Kojuma, Zeller und Wagener (zit. in Weinberg, Nativelle und Prevot, 1937) konnten *Cl. fesci* und *Cl. septicum* serologisch nicht unterscheiden. Diese widersprüchlichen Resultate und die etwas komplizierte Methode der Antigenherstellung für die Agglutination der Anaerobier, wie sie zum Beispiel bei Robertson (1919) beschrieben ist, sind wohl die Gründe, warum diese Technik in der Rauschbranddiagnostik keinen Eingang fand. Wie weiter unten gezeigt werden soll, scheinen die neueren Untersuchungen von Moussa (1959) sowie Batty und Walker (1963) den erstgenannten Autoren rechtzugeben.

In Fortsetzung der Arbeiten von Robertson (1919) sowie von Robertson und Felix (zit. in Henderson, 1932) veröffentlichte Henderson (1932, 1934) verschiedene Arbeiten über die Serologie von *Cl. fesci* und *Cl. septicum*. Er führte Agglutinationen mit O- und H-Seren aus und machte gleichzeitig Schutzversuche durch Vakzination von Meerschweinchen mit verschiedenen Stämmen. Die Resultate der Agglutination überprüfte er durch Absorptionsversuche. Er fand ein für bovine und ovine Stämme gemeinsames O-Antigen für *Cl. fesci* sowie 3 H-Antigene, die sich verschieden auf einzelne Stämme verteilten. Seine *Cl. septicum*-Stämme konnte er mittels des Schutz-

versuches und auf Grund der O-Antigene in 3 Gruppen einteilen, wobei ein O-Antigen allen Gruppen gemeinsam war. In Weiterführung der Arbeiten von Robertson und Henderson untersuchte Moussa (1959) die Antigene von *Cl. septicum* und *Cl. fesceri* mit Hilfe der Agglutination, wandte aber eine etwas andere Technik an als die obgenannten Autoren. Er stellte durch i/v-Injektion von speziell vorbehandelten Kulturen Antiseren gegen Geißeln (H), gegen das somatische Antigen (O) und gegen das Sporenantigen (S) her. Mit diesen Antiseren agglutinierte er 37 *Cl. septicum*-Stämme und 38 *Cl. fesceri*-Stämme und stellte folgendes fest:

1. *Cl. septicum* und *Cl. fesceri* besitzen ein einziges, beiden gemeinsames S-Antigen.
2. Bei *Cl. septicum* kommen 2 O-Antigene und 5 H-Antigene vor, die 6 serologisch unterscheidbare Gruppen mit verschiedenem Antigenmuster ergeben.
3. *Cl. fesceri* besitzt 1 O-Antigen und 2 H-Antigene; es gibt also 2 durch H-Antigene unterscheidbare Gruppen von *Cl. fesceri*.
4. Die O- und H-Antigene von *Cl. fesceri* und *Cl. septicum* sind voneinander verschieden.

In zwei Arbeiten untersuchten Ellener und Mitarbeiter (1963) die löslichen Antigene verschiedener menschenpathogener Clostridien mit Hilfe der Agar-Gel-Präzipitation. Sie konnten dabei zeigen, daß *Cl. septicum* mit *Cl. novyi* A und B, *Cl. bifermentans*, *Cl. sordellii*, *Cl. histolyticum*, *Cl. tetani*, *Cl. fallax*, *B. cereus* var. *mycoides* und *B. anthracis* gemeinsame Antigene hat und daß zwei Antigene für *Cl. septicum* spezifisch sind. Sie untersuchten auch 4 *Cl. septicum*-Stämme und ermittelten 19 Antigene, von denen 3 allen 4 Stämmen gemeinsam waren. Die restlichen 6 verteilten sich auf die 4 Stämme und waren teilweise 2 oder 3 Stämmen gemeinsam. Es sei darauf hingewiesen, daß hier von frischen Kulturen lösliches Antigen hergestellt worden war. Wir wissen also nicht, ob es sich um H-, O- oder S-Antigene oder um Toxine handelt. Ein direkter Vergleich mit den Resultaten von Moussa scheint deshalb nicht zulässig. Lösliche Antigene von *Cl. fesceri* wurden nicht untersucht. In der Diskussion stellen die Autoren fest, daß es trotz der vielen Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Clostridien in gewissen Fällen möglich sein sollte, durch Absorption speziesspezifische oder gattung-spezifische Seren herzustellen, die dann für die Immunofluoreszenz gebraucht werden könnten.

Immunofluoreszenz

Batty und Walker berichteten 1963 zum erstenmal von der erfolgreichen Anwendung der Immunofluoreszenz für die Differentialdiagnose zwischen *Cl. septicum* und *Cl. fesceri*. Die Methode der Immunofluoreszenz wurde 1941 von Coons (zit. in Batty und Walker, 1963; Fey, 1965) eingeführt. Batty und Walker stellten für ihre Untersuchungen anti-O-Seren von *Cl. septicum* und *Cl. fesceri* her. Wie Moussa fanden sie bei *Cl. septicum* 2 O-Gruppen und stellten von beiden verschiedenen O-Antigenen ein Antiserum her. Die Antiseren von *Cl. septicum* markierten sie mit dem wohl am meisten angewandten und von Riggs (1958) eingeführten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). FITC leuchtet im UV-Licht intensiv grün auf. Das Antiserum gegen *Cl. fesceri* wurde mit Lissamin Rhodamin B 200 (LR B200) markiert. LR B200 eignet sich ebenfalls sehr gut zur Markierung von Seren (Chadwick and Mc Entegart, 1958) und leuchtet im UV-Licht rot, ist aber weniger intensiv als FITC. Durch Überschichtung beider Seren über Ausstriche von mischinfiziertem Material konnten die Autoren die beiden Keime nebeneinander nachweisen. Eine Kreuzreaktion zwischen *Cl. fesceri* und *Cl. septicum* oder *Cl. septicum* und *Cl. fesceri* mit andern Clostridien, *Sc*, *Staph*, *E. coli* wurde nicht festgestellt. Des weitern markierten sie Antiseren gegen die 3 verschiedenen Serotypen von *Cl. novyi* und wiesen damit den auf festen Nährböden schlecht wachsenden Keim im Gewebe nach (Batty, Walker, 1963). Auch für den Nachweis von *Cl. tetani* wen-

deten sie die Immunofluoreszenz-Methode mit Erfolg an und empfahlen sie vor allem zur Prüfung von Antiseptica und von Material aus akzidentellen und künstlichen Wunden (Walker und Batty, 1963). Walker und Batty (1964, 1965) untersuchten die Sporulierung und Keimung von *Cl. sporogenes* und *B. cereus*, indem sie gegen das vegetative Antigen und gegen das Sporenantigen ein Antiserum herstellten und das eine mit FITC, das andere aber mit RL B200 markierten. Klotz (1965) versuchte die Methode der Immunofluoreszenz zum Nachweis von *Cl. welchii* in Lebensmitteln. Die an sich gut funktionierende Methode scheitert bei *Cl. welchii* an der sehr großen serologischen Heterogenität der Stämme. Mit 4 Pools aus 56 verschiedenen Typenseren (gegen das Kapselantigen) konnte er von 79 untersuchten Stämmen nur 34 typisieren. Allerdings gehörten 21 dieser Stämme zu den 13 häufigsten Typen, die Lebensmittelvergiftungen verursachen. Es sei in bezug auf die vorliegende Arbeit speziell hervor gehoben, daß *Cl. septicum* von verschiedenen Clostridienarten die einzige war, die eine Kreuzreaktion mit *Cl. welchii* aufwies.

Seit einem Jahr wird die Methode der Immunofluoreszenz, wie sie von Batty und Walker beschrieben wurde, in England in mehreren Untersuchungsstationen für die Routine-Diagnostik mit Erfolg angewendet. Gearbeitet wird mit den von der Firma Burrough's Wellcome Co. hergestellten Seren (persönliche Mitteilung Batty).

Eigene Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit soll über die Resultate berichtet werden, die mit der vergleichsweisen Verwendung der Immunofluoreszenzmethode und der klassischen bakteriologischen Technik zur Differenzierung von *Cl. fesceri* und *Cl. septicum* gewonnen wurden. Hierzu stand mir diagnostisches Material aus unserem Institut und weiteren Laboratorien zur Verfügung¹. Des weiteren werden Untersuchungen beschrieben, mit denen ich abklären wollte, ob es möglich sei, verschiedene Serotypen von *Cl. septicum* bei unseren Stämmen zu unterscheiden, dies besonders im Hinblick auf Herstellung von eigenen fluoreszierenden Seren gegen *Cl. septicum* und *Cl. fesceri*.

Technik

Mikroskopische Präparate für die Immunofluoreszenz

Für die Herstellung und Markierung der Präparate verwenden wir an unserem Institut im Prinzip die Methode, wie sie von Batty und Walker (1964) angegeben wird. Wenn möglich wird von den verdächtigen Muskelstücken durch Pressen bei einer frischen Schnittfläche Muskelsaft gewonnen. Davon gibt man einen Tropfen auf einen Objektträger und streicht ihn mit einem dazu schräg gestellten Deckglas aus, so daß ein ganz dünner Ausstrich entsteht, der luftgetrocknet und dann 15 Minuten in Aceton fixiert wird. Bei den Muskeln, von denen wir keinen Saft gewinnen können und von Organen machen wir ein Abklatschpräparat einer frischen Schnittfläche oder der Oberfläche (Leber). Von flüssigen Kulturen (zum Beispiel Tarozzi-Bouillon) lassen sich gute Ausstriche machen, nicht aber von der halbflüssigen Thioglycolat-Leberbouillon; der beigemengte Agar ergibt einen unregelmäßigen und zu dicken Ausstrich. Dagegen läßt sich eine NaCl-Suspension von auf festen Nährböden gewachsenen Kulturen gut ausstreichen und ergibt gute Präparate. Den fixierten Ausstrich überschichtet man mit

¹ An dieser Stelle danke ich den Herren Dr. G. Hunyady und Dr. H. Walzl, Laboratorium Gräub AG., Bern, Dr. G. Kilchsperger und Dr. M. Herzog, Veterinaria AG., Zürich, Dr. C. Riggenbach, Institut Galli-Vallerio, Lausanne, und Dr. R. Schweizer, Bakteriologisches Institut, St. Gallen, für die Überlassung von verdächtigem Material.

dem entsprechenden markierten Serum und beläßt ihn 30 Minuten in der feuchten Kammer. Das nichtgebundene Serum wird dann mit 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,5 zuerst durch Abspülen mit der Spritzflasche, dann durch zweimaliges Baden von je 5 Minuten entfernt. Auf den wieder trockenen Ausstrich gibt man einen Tropfen von gepuffertem Glyzerin (0,9 ml Glyzerin + 0,1 ml 0,1 m NaCl Phosphatpuffer pH 7,5). Das Deckglas kann zum Schutz gegen Austrocknung mit Nagellack am Objektträger angeklebt werden. Bei der indirekten Methode überschichtet man den fixierten Ausstrich 30 Minuten mit dem gewünschten nichtmarkierten Kaninchen-Antiserum, wäscht zweimal mit Puffer und überschichtet dann ein zweites Mal 30 Minuten mit einem markierten anti-Kaninchenserum. Diese Methode ist im Gebrauch etwas komplizierter, hat aber den Vorteil, daß ein einziges markiertes Serum für Kaninchen-Antiseren mit verschiedenen Spezifitäten verwendet werden kann. Auch soll die Fluoreszenz bei dieser Methode noch brillanter sein.

Noch nicht markierte Ausstriche, die fixiert oder unfixiert bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, ergeben, wenn sie nach 3–4 Wochen überschichtet werden, Präparate, bei denen die Bakterien schlecht gezeichnet sind und eine verringerte Fluoreszenz aufweisen. Fixierte Präparate, die bei -20°C aufbewahrt werden, ergeben noch nach 10 Wochen Präparate, die sich in keiner Weise von frisch hergestellten unterscheiden. Markierte Präparate können etwa 3 Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, wenn sie vor Austrocknung geschützt sind (Nagellack). Nach dieser Zeit wird die Fluoreszenz schwächer.

Optik

Für alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wird die folgende optische Einrichtung verwendet: Mikroskop «Wild» M 11 Monokular 15xK mit Objektiv «Wild» Fluotar HI 50 1,0 und Kondensor Apl. nA 1,30 mit vorgeschaltetem Blaufilter. Das Licht wird mit einem durch zwei Präzisionsschrauben verstellbaren Planspiegel reflektiert. Als Immersionsöl verwenden wir Paraffinöl und geben dies zwischen Kondensor und Präparat sowie zwischen Präparat und Objektiv. Lichtquelle: Universal-Mikroskopierlampe «Wild» mit Hg-Dampf-Hochdruck-Brenner HBO200 «Osram», dazu Kollektor mit UV-Filter, 2 Wärmeschutz- und Graufilter 10% sowie Blau- und Gelbfilter. Da ein gleichmäßiges optimales Licht von großer Wichtigkeit ist, kühlen wir das Mikroskop immer vor Gebrauch.

Markieren der Seren

Für die Markierung der Seren verwenden wir am Institut die Methode von Thomson (1961). Zuerst wird das Serum-Gammaglobulin ausgefällt: zu 6 ml Serum gibt man 4 ml gesättigtes Ammoniumsulfat (= 0,4 Sättigung), beläßt dies über Nacht bei 4°C , zentrifugiert anderntags scharf und wäscht das Sediment zweimal mit etwa 8 ml 40%igem Ammoniumsulfat. Nach nochmaligem Zentrifugieren nimmt man das Sediment mit 2 ml Aqua dest. auf und dialysiert bei 4°C gegen etwa 5 l NaCl (Vesking-Dialyse-Schlauch «Kirchner»). Nach Dialyse über Nacht gibt man einen Tropfen des dialysierten Serums in 1%ige Bariumchloridlösung, um zu prüfen, ob alles Ammoniumsulfat weg-dialysiert wurde (bei Anwesenheit von Ammoniumsulfat fällt dieses als trübes Ammoniumchlorid aus).

Mit Hilfe der Biuret-Probe wird der Eiweißgehalt bestimmt: Kontrollserum Labtrol (Merz und Dade, Bern). Colorimetrie bei 530 Å. Das Serum wird dann mit physiologischem NaCl auf 1 g % Eiweiß eingestellt.

Zu 2 ml des eingestellten Serums gibt man 0,2 ml Carbonatpuffer pH 9,0 und kühlt bei 4°C . Pro mg Eiweiß werden 0,05 mg Fluoreszeinisothiocyanat (Sylvana Company¹) langsam beigegeben (das heißt pro 2 ml à 1 g % = 1 mg). Mischen bei 4°C mit

¹ Arnel Products Co., 1170 Broadway, New York 1, NY, USA.

Magnetrührer über Nacht. Anderntags zentrifugiert man kurz, um nicht gelöste FITC-Partikelchen abzutrennen. Das ungebundene FITC wird vom markierten Serum mit Sephadex G 50 in einer Säule von 15 mm Durchmesser und 27 cm Länge abgetrennt. Das rascher wandernde Konjugat wird aufgefangen. Dann spült man die Säule mit 0,1 m NaCl Phosphatpuffer pH 7,5 gut durch, bis der unten austropfende Puffer keine Färbung mehr zeigt (etwa 1,5 l Spülflüssigkeit).

Um die unspezifische Markierung von Gewebe durch markierte Aggregate zu verhindern, absorbiert man das Serum durch Gewebspulver aus Schweinenieren. Pro ml Konjugat braucht man etwa 50 mg Nierenpulver; dieses netzt man zuerst mit Phosphatpuffer an, zentrifugiert und gießt überstehenden Puffer weg. Nach Zugabe des Konjugats schüttelt man während einer Stunde bei 4°C (Kühlung nicht notwendig, aber sie verringert Kontamination); darauf zentrifugiert man scharf und gibt dem wiedergewonnenen Serum Merthiolat 1 : 10 000 bei. Durch das Annetzen des Pulvers vor der Absorption werden die Serumverluste stark verringert.

Für die oben beschriebene Absorption sowie für die Herstellung von Gewebepulver verwenden wir die Methode von Schneider (1964): Niere mit NaCl und Homogenisator zu dicker Suspension verarbeiten. Filtration durch mehrere Lagen Gaze, Vermischen mit 4facher Menge Aceton, Zentrifugieren und Sediment mit Leitungswasser waschen, bis das Überstehende hämoglobinfrei ist. Das Sediment wird dann mehrmals in Aceton aufgenommen und wieder zentrifugiert, bis es völlig wasserfrei ist (trocknet zu weißem Pulver, wenn es zwischen Fingerkuppen zerrieben wird). Trocknen im Brutschrank über Nacht. Aufbewahren bei 4°C.

Für die Isolierung, Reinzüchtung und Differenzierung von *Cl. septicum* und *Cl. fesci* sowie andern anaeroben, grampositiven Stäbchen, arbeite ich nach der Technik, die von Fey (1958) beschrieben wurde und die auch an unserem Institut routinemäßig angewendet wird. Zur Verhinderung des Schwärmens von *Cl. septicum* gebrauche ich in Einzelfällen Blutagar mit 3% Agar. 1964 beschrieb Fey ein verbessertes metallenes Modell seines Anaerobentopfes, der für meine Versuche ebenfalls Verwendung fand.

Untersuchungsgang

Alles verdächtige Material wurde wie folgt untersucht:

Direktkultur von Muskulatur und Organen auf Blutagar anaerob und aerob, Blauagar (Gramnegative Fäulniskeime), halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon mit 5% Serum.

Direktausstriche von Muskulatur und Organen: Grampräparate, Präparate für Immunofluoreszenz.

Für die Untersuchungen am diagnostischen Material brauchte ich ausschließlich die Seren der Firma Burrough's Wellcome Co., bei der das *Cl. septicum*-Serum mit FITC, das *Cl. fesci*-Serum mit LR B200 markiert ist. Von beiden Seren wird ein Tropfen auf den gleichen Objektträger gegeben.

Kontrolle der Kultur am andern Tag. Von verdächtigen Kulturen auf anaeroben Platten werden sofort Einzelkolonien, respektive Rasenstückchen (*Cl. septicum*) abgestochen und in halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon mit 5% Serum respektive gewöhnliche halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon verbracht. Platten, die für *Cl. fesci* verdächtige Kolonien oder kein Wachstum zeigen, werden 48 Stunden bebrütet. Die trüben halbflüssigen Kulturen werden ausgestrichen (Gramfärbung), auf Blutagar anaerob um-

gezüchtet, wenn darin Keime vermutet werden, die nicht schon in der Direktkultur nachgewiesen werden konnten. Eine Reinzüchtung von anaerober Platte auf anaerobe Platte direkt ist meist erfolglos; deshalb müssen Einzelkolonien abgestochen und in halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon verbracht werden. Diese Kultur im halbflüssigen Medium wird durch Umzüchtung auf Reinheit geprüft. Die anaerobe Platte soll eine Kultur mit einheitlichen Kolonien ergeben, die aerob bebrütete Platte soll dagegen steril bleiben. Die Kolonieform, Größe, das Vorhandensein und die Art der Hämolyse sind Merkmale für das Differenzierungsschema.

Bestimmung der Serophilie

Von einer Blutplatte werden zwei Kolonien abgestochen. Die eine wird auf eine halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon, die andere auf eine halbflüssige Thioglycolat-Leberbouillon mit 5% Serum überimpft. Trübung und Gasbildung der beiden Röhren wird nach Bebrütung über Nacht beurteilt.

Nachweis des löslichen Hämolysins nach Bernard

(zit. in Zschokke und Saxer, 1936)

Es werden in der Literatur zwei Methoden beschrieben:

1. Nachweis des löslichen Hämolysins nach Fey (1958): 2 ml 5% Schaferythrocytensuspension werden mit 0,2 ml frischer Kultur vermischt. Im positiven Fall soll nach 15–60 Minuten bei 37° Hämolyse entstehen.

2. Nachweismethode nach Zschokke und Saxer (1936): 1,5 ml gut gewachsene Leberbouillonkultur (stark trübe Kulturen müssen zentrifugiert werden) werden zu 3 ml einer 2 % Vollblut-Aufschwemmung gegeben. Hämolyse soll im positiven Fall bei Zimmertemperatur innert weniger Minuten bis höchstens einer Stunde entstehen.

Keimzählung

Direkte Methode:

Eine Über-Nacht-Kultur wird in der Petroff-Hauser-Kammer ausgezählt. Es werden 100 Felder gezählt und die Dispersion nach der Methode der kleinsten Quadrate (Gauss zit. in von Muralt, 1948) berechnet.

Indirekte Methode:

Von gleicher Kultur wird eine Verdünnungsreihe in 10er Potenzen in halbflüssigem Pepton-NaCl hergestellt. Von jeder Verdünnung werden zwei Marinoschalen mit 0,1 ml und zwei mit 1 ml gegossen und nach 48stündiger Bebrütung ausgezählt. Zur bessern Beurteilung der Kultur (im Hinblick auf Mischkulturen) wird hier ein Leberagar mit 5% Blutzusatz verwendet.

Tierversuche

Meerschweinchen:

Verschieden große Mengen von halbflüssiger Über-Nacht-Kultur werden Meerschweinchen s.c. in die Achselgegend injiziert. Bei Mischinfektionen werden die beiden Stämme an verschiedenen Seiten injiziert. Auswertung: Kultur und Fluoreszenzmikroskopie von Injektionsstellen, Herzblut und Leber.

Mäuse:

Injektion von kleinen Mengen i.m. in Glutaeus-Muskelpaket. Auswertung wie beim Meerschweinchen.

Schutzversuche:

Als Schutzserum wird das von der Firma Burrough's Wellcome Co. herausgegebene «Anti-Cl. septicum diagnostic serum» verwendet. Das Versuchstier muß 24 Stunden vor der Infektion mit dem Serum behandelt werden. Nach meiner Erfahrung richtet sich die Dosierung nach der Virulenz des Stammes und nach der Tierart und muß in einem Vorversuch bestimmt werden.

Serologische Untersuchungen

Nach Erprobung verschiedener Methoden für die Antigenherstellung und für die Durchführung der Agglutination brauchte ich die folgende Methode, die im Prinzip derjenigen von Moussa (1959) entspricht.

Herstellung des O-Antigens:

Nährmedium: Flüssige Thioglycolatbouillon (Trypticase-Soy-Bouillon + 0,1% Na-Thioglycolat), die kurz vor Gebrauch während 20 Minuten im Dampf erhitzt wird, damit der Sauerstoff ausgetrieben wird. Für Cl. fesci wird noch 5% steriles Pferdeserum beigegeben. Von einer Vorkultur (18–24 Stunden) wird die gewünschte Menge des Nährmediums beimpft. Nach 16–20 Stunden Bebrütung zentrifugiert man scharf, gießt das Überstehende ab und wäscht dreimal mit NaCl. Das Sediment nimmt man dann mit etwa $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Menge Aqua dest. auf und gibt 0,2% Formalin dazu (aus 10%iger Lösung). Aufbewahrung über Nacht bei Zimmertemperatur. Am nächsten Tag kocht man das Antigen während einer Stunde im strömenden Dampf. Für die Agglutination wird das Antigen je nach Dichte 3–8 mal verdünnt. Eine genaue Einstellung der Dichte mit einem Kolorimeter erwies sich für meine Versuche als nicht notwendig. Diese relativ komplizierte Methode der Antigenherstellung muß strikte innegehalten werden, da sonst das Antigen instabil wird. Schon Henderson (1932) hatte nach Erprobung verschiedener Methoden eine ähnliche Technik empfohlen, damit Autoagglutinationen vermieden werden können.

Kaninchen-Immunisierung:

In Abständen von 2–3 Tagen werden den Kaninchen 2 ml des unverdünnten Antigens i.v. injiziert. 4 Tage nach der 6. Injektion erste Probeentnahme. Falls diese befriedigend ausfällt, wird das Kaninchen nach weiteren 4–6 Tagen entblutet.

Agglutinationen:

1. Ablesung nach 4 Stunden Inkubation bei 37° C (im Wasserbad), 2. Ablesung nach 14–18 Stunden bei 4° C. Die zweite Ablesung, die wie die erste mit bloßem Auge gemacht wird, ergibt im allgemeinen einen um eine Stufe erhöhten Titer. Dieser wird als Endtiter angesehen.

Ergebnisse*Untersuchungen von diagnostischem Material*

In den beiden Sommern 1964/65 untersuchte ich von 92 Fällen verdächtiges Material in der oben beschriebenen Weise fluoreszenzmikroskopisch

und kulturell. Dabei diagnostizierte ich in 20 Fällen mit Hilfe der Immunofluoreszenz *Cl. fesci*. Von diesen 20 Fällen ergab die Kultur 17 mal ein positives Resultat, wobei allerdings zu bemerken ist, daß die Isolierung nur in 11 Fällen direkt gelang, während für die restlichen 6 ein Meerschweinchenversuch nötig war. In einem der 3 Fälle, bei denen die Diagnose Rauschbrand mit der Kultur nicht bestätigt werden konnte, verlief auch der Meerschweinchenversuch negativ, weil eine massive *Cl. welchii*-Infektion vorlag. Es gelang mir auch nicht, das Meerschweinchen gegen *Cl. welchii* mit Serum zu schützen. Im zweiten Fall wurde aus äußern Umständen kein Tierversuch durchgeführt. Ein getrocknetes Muskelstück, das mir zur Untersuchung eingeschickt worden war, ergab ein schlechtes fluoreszenzmikroskopisches Bild mit schwach rot leuchtenden Stäbchen. Kulturell konnte auch über das Meerschweinchen *Cl. fesci* nicht isoliert werden, so daß dieser Fall ungeklärt bleibt.

In 30 Fällen konnte ich fluoreszenzmikroskopisch und kulturell *Cl. septicum* nachweisen, wobei dreimal eine Isolierung nur über den Meerschweinchenversuch möglich war. Einmal wurde die Diagnose nur fluoreszenzmikroskopisch gestellt, da das Material für den Tierversuch nicht mehr vorhanden war. In 41 der 92 Untersuchungen konnte weder mit Immunofluoreszenz noch mit Kultur Rauschbrand oder Pararauschbrand nachgewiesen werden.

Die Isolierung, besonders von *Cl. fesci*, gelegentlich aber auch von *Cl. septicum*, bereitete oft sehr große Schwierigkeiten, wie schon die relativ große Anzahl der Tierversuche zeigt. Allerdings muß gesagt werden, daß gerade das Rauschbrandmaterial erst zu uns kam, nachdem es schon in einem andern Institut untersucht worden war. Die fluoreszenzmikroskopische Diagnose war andererseits bei der ersten Untersuchung auch nicht immer eindeutig und mußte oft wiederholt werden. Störend war manchmal eine starke Eigenfluoreszenz von Stäbchen, die eine schwach grüne Fluoreszenz vortäuschte. Hier zeigte es sich, daß besonders der Anfänger immer eine positive Kontrolle zur Hand haben sollte, um zweifelhafte Befunde damit vergleichen zu können.

Bei der Untersuchung des oft sehr fauligen und makroskopisch häufig gasbrandverdächtigen Materials konnte ich keine Kreuzreaktionen mit andern Stäbchen oder Kokken feststellen. Hingegen stellte ich in einem Präparat Hefezellen fest, die sich mit dem *Cl. septicum*-Serum grün färbten. Eine experimentelle Wiederholung dieser Markierung von Hefen gelang mir mit einem Stamm von *Candida albicans* und einem Stamm von *Torulopsis glabrata*. Umgekehrt konnte ich mit der indirekten Methode auch *Cl. septicum* mit einem Anti-*Candida*-Serum markieren. Die Fluoreszenz war hier aber deutlich schlechter als bei der homologen Reaktion. Ob hier tatsächlich eine serologische Kreuzreaktion zwischen *Cl. septicum* und den beiden Hefearten besteht, müßte noch anhand von Absorptionsversuchen und mit klassischen serologischen Methoden abgeklärt werden.

Tabelle 1 Diagnostische Untersuchungen an gasbrandverdächtigem Material mit Hilfe von Kultur und Immunofluoreszenz.

Sommer	Fälle	Cl. fes.		Cl. sept.		negativ	
		K (TV)	Fl	K (TV)	Fl	K	Fl
1964	56	10 (6)	13	13 (3)	14	33	29
1965	36	7	7	17	17	12	12
1964/65	92	17 (6)	20	30 (3)	31	45	41

K = Kultur, Fl = Fluoreszenz, TV = Tierversuch

Die Methode zur Reinzüchtigung und Differenzierung von Anaerobiern nach Fey (1958), wie sie im Kapitel Technik beschrieben wurde, hat sich erneut für die tägliche Diagnostik als sehr gut brauchbar erwiesen. Der Umstand, daß in der zweiten Versuchshälfte (Sommer 1965) auf den Tierversuch für die Isolierung verzichtet werden konnte, zeigt deutlich, daß praktische Erfahrung und Übung sowie genaue Berücksichtigung der besonderen Ansprüche der heiklen Anaerobier von großer Wichtigkeit sind.

Die Befunde von Zschokke und Saxer (1936) und von Fey (1958), wonach *Cl. fesceri* lösliches Hämolyysin bildet, *Cl. septicum* aber nicht, haben sich bei meinen Untersuchungen an 23 der *Cl. septicum*- und 14 der *Cl. fesceri*-Stämmen nicht bestätigt. Das kulturelle Verhalten, die biochemischen Reaktionen sowie die Immunofluoreszenz sprachen bei allen diesen Stämmen eindeutig für *Cl. septicum* oder *Cl. fesceri*. Die Resultate sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 2 Hämolyseversuche nach Zschokke und Saxer.

	positiv			negativ
	Hämolyse nach 8–15 Min.	Hämolyse nach 15–25 Min.	Hämolyse nach 60 Min.	keine Hämolyse
Cl. septicum Cl. fesceri	– 10 Stämme	12 Stämme 1 Stamm	8 Stämme 2 Stämme	3 Stämme 1 Stamm

Die Tabelle zeigt, daß bei *Cl. fesceri* die Hämolyse im allgemeinen schneller eintrat und daß nur ein Stamm keine Hämolyse zeigte. Die *Cl. septicum*-Stämme zeigten eine etwas verzögerte Hämolyse; die meisten waren aber nach einer Stunde auch positiv. Diese Überschneidungen und geringen zeitlichen Differenzen ermöglichten in unserer Hand im Einzelfall eine sichere Diagnose nicht.

Tabelle 3 Hämolyseversuche nach Fey

	Vollst. Hämolyse nach 60 Min.	Unvollst. Hämolyse nach 60 Min.	Keine Hämolyse nach 60 Min.
Cl. septicum	—	10 Stämme	13 Stämme
Cl. fesceri	3 Stämme	6 Stämme	5 Stämme

Auch diese Tabelle zeigt eine erhöhte Tendenz von *Cl. fesceri* zu Hämolyse, doch blieben 5 Proben vollständig negativ. Fast die Hälfte der Stämme von *Cl. septicum* zeigten nach einer Stunde ebenfalls eine leichte Hämolyse. Ein sicherer Entscheid ist auch mit dieser Methode im Einzelfall nicht möglich. Der Gebrauch von halbflüssiger Thioglycolat-Bouillon an Stelle von flüssiger Leberbouillon beeinflusste das Resultat nicht.

Die Untersuchung auf Serophilie mit der oben beschriebenen Methode ergab für *Cl. septicum* und *Cl. fesceri* keine wesentlichen Unterschiede. Beide Stämme konnten in der halbflüssigen Leberthioglycolat-Bouillon gezüchtet werden. Serumzusatz bewirkte nur bei einzelnen *Cl. fesceri*-Stämmen ein merklich stärkeres Wachstum, während er bei den meisten *Cl. fesceri*- und *Cl. septicum*-Stämmen keinen Einfluß ausübte. Allerdings handelte es sich bei allen untersuchten Stämmen um solche, die schon mehrmals umgezüchtet worden waren. Zudem ist Leberthioglycolat-Bouillon ein reiches Nährmedium. Bei Verwendung von Trypticase-Soy-Bouillon mit Zusatz von 0,1% Na-Thioglycolat wuchs *Cl. septicum* immer noch sehr gut, während eine Kultur mit *Cl. fesceri* ohne Serumzusatz nicht anging. In diesem Sinne ist also eine strikte Serophilie vorhanden. Zweifellos ist die Serophilie von *Cl. fesceri* für die Primärisolierung von Bedeutung.

Wie ich weiter oben erwähnt habe, erheischt auch die Beurteilung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten Übung und Erfahrung. Auch gute Absorption der Seren und gutes Waschen der Ausstriche kann nicht verhindern, daß Gewebeteile unspezifisch gefärbt werden. Die leicht bläuliche Eigenfluoreszenz von andern Stäbchen oder Gewebeteilen kann ebenfalls störend wirken. Die deutliche Morphologie (gut gezeichnetes Stäbchen) und die Intensität der Fluoreszenz geben den Ausschlag für einen positiven Befund. Die orange Farbe des LR B200, mit dem das *Cl. fesceri*-Antiserum markiert ist, bietet einen guten Kontrast gegenüber dem grünen FITC, ist aber bedeutend weniger intensiv als dieses. Es sei noch einmal betont, daß immer die Möglichkeit bestehen sollte, das fragliche Präparat mit einer positiven Kontrolle zu vergleichen. Besonders bei Präparaten, die mit Muskelsaft hergestellt wurden und deshalb wenig Eigenfluoreszenz aufweisen, ist es manchmal schwierig, die richtige optische Ebene zu finden. Ein Ausstrich soll aber erst als negativ erklärt werden, wenn man sich anhand von leicht bläulich schimmernden Gewebefetzen oder Bakterien vergewissern konnte, daß man die richtige Schicht betrachtet hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Immunofluoreszenz der klassischen Methode überlegen ist, weil mit ihr wenige Stunden nach Eintreffen des Materials eine sichere Diagnose gestellt werden kann.

Tierversuche

Bei den Untersuchungen von diagnostischem Material während zweier Sommer konnte ich weder mit Immunofluoreszenz noch mit der klassischen Methode eine Mischinfektion von *Cl. septicum* mit *Cl. fesci* feststellen. Da es eine Hauptaufgabe dieser Arbeit war, abzuklären, ob die neue Methode bei der Identifizierung solcher Mischinfektionen wesentliche Vorteile gegenüber der Kultur hat, infizierte ich noch Versuchstiere mit verschiedenen Mischungsverhältnissen der beiden Erreger. Dabei arbeitete ich ausschließlich mit je einem selbst isolierten Stamm.

Ein Vorversuch ergab, daß sich für diese Versuche Mäuse nicht eignen: während von 6 mit 0,1 ml lebender 16-Stunden-*Cl. septicum*-Kultur i.m. infizierten Mäusen über Nacht alle starben, überlebten alle 6 Mäuse die Infektion mit *Cl. fesci* länger als 3 Tage. Von 6 Mäusen, die die doppelte Menge von *Cl. fesci* bekamen, starb eine über Nacht und eine zweite nach 24 Stunden. Die übrigen 4 Tiere überlebten.

Ich entschied mich deshalb für das Meerschweinchen als Versuchstier und wollte die LD_{50} beider Stämme für diese Tiere bestimmen.

Von einer 16-Stunden-Kultur machte ich eine direkte Keimzählung und stellte logarithmische Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-6} her. Mit den Verdünnungen machte ich die indirekte Keimzählung auf Gußagarplatten (Blutagar) und infizierte zugleich von jeder Verdünnung 2 Meerschweinchen mit 1 ml s/c.

Der Vergleich von direkter und indirekter Keimzahl ergab für *Cl. septicum* eine um eine 10er-Potenz höhere Keimzahl mit der Zählung in der Kammer. Bei *Cl. fesci* betrug der Unterschied sogar 2 10er-Potenzen. Die Methode der Keimzählung mit Gußagarplatten ist demnach zu ungenau; offenbar sterben bei Verdünnung und Kultur zu viele Keime ab.

Beim Infektionsversuch mit *Cl. septicum* töteten die unverdünnte sowie die 10^{-1} verdünnte Kultur beide Meerschweinchen. Bei einer Verdünnung von 10^{-2} überlebten beide Meerschweinchen, während bei der nachfolgenden Verdünnung wieder beide Tiere starben. Kulturen, die 10^{-4} oder noch mehr verdünnt waren, töteten die Meerschweinchen nicht mehr. Dieser Versuch besagt lediglich, daß die LD_{50} im Bereich 10^{-2} bis 10^{-3} liegt. Für eine exakte Bestimmung der LD_{50} müßten größere Tiergruppen pro Verdünnung infiziert werden, was sich für unsere Fragestellung nicht lohnte.

Beim Infektionsversuch mit *Cl. fesci* starben nur diejenigen Meerschweinchen, die mit unverdünnter Kultur infiziert worden waren. Alle andern Tiere überlebten.

Experimentelle Mischinfektionen:

Die Schwierigkeit einer relativ genauen Zählung der injizierten Keime sowie die geringe Virulenz des verwendeten *Cl. fesci*-Stammes veranlaßten mich, für meine Mischinfektionen ganz einfache Mischverhältnisse der beiden Stämme anzuwenden.

In einem *ersten Versuch* infizierte ich wieder 6 Meerschweinchen im Gewicht von 610–650 g mit gleichen Mengen einer 16 Stunden-Kultur, und zwar 3 mit je 0,5 ml und 3 mit je 1,0 ml. *Cl. fesci* wurde in der linken, *Cl. septicum* in der rechten Achselhöhle s.c. injiziert: alle Tiere starben über Nacht. Von jedem Tier machte ich einen Fluoreszenz-Ausstrich aus der Injektionsstelle links und rechts sowie von Herzblut und Leberoberfläche. Von beiden Injektionsstellen, Herzblut und Leber, wurde auch je eine Kultur auf gewöhnlicher Blutplatte anaerob angelegt.

Die Ergebnisse der Immunofluoreszenz waren bei allen 6 Tieren grundsätzlich

gleich. Es bestanden lediglich quantitative Unterschiede im Verhältnis der beiden Keime zueinander.

Injektionsstelle links (Cl. fescari):	++	Cl. septicum
	+	Cl. fescari
Injektionsstelle rechts (Cl. septicum):	+++	Cl. septicum
		vereinzelte Cl. fescari-Stäbchen
Leberabklatsch:	+++	Cl. septicum z.T. in Fäden
	+	Cl. fescari
Herzblut:	++	Cl. septicum
	++	Cl. fescari

Es sei noch beigefügt, daß bei der Injektionsstelle rechts, wo die intensiver leuchtenden grünen Cl. septicum-Stäbchen in starker Überzahl vorhanden sind, die schwach leuchtenden Cl. fescari-Stäbchen schwer zu entdecken sind. Ein unvoreingenommener Betrachter hätte deren Vorhandensein eventuell übersehen.

Auch die Ergebnisse der Kultur waren für alle 6 Tiere gleich. Die Blutplatten von den Injektionsstellen links und rechts, Herz und Leber, waren alle mit dem für Cl. septicum typischen feinen hämolytischen Rasen überwuchert. Einzelne für Cl. fescari verdächtig aussehende Kulturen konnten trotz großem Aufwand nicht isoliert werden.

In einem *zweiten Versuch* wurde das Mischverhältnis bei der Infektion zu Gunsten von Cl. fescari verschoben: 3 Tieren wurden 0,8 ml Cl. fescari-Kultur und 0,2 ml Cl. septicum-Kultur (4:1) und 3 Tieren 1,0 ml Cl. fescari und 0,5 Cl. septicum (2:1) injiziert.

Das Ergebnis dieses Versuches entsprach demjenigen des ersten: fluoreszenzmikroskopisch konnte Cl. fescari neben Cl. septicum in der linken Injektionsstelle und auf dem Leberabklatschpräparat sowie in Herzblut nachgewiesen werden (1 Leberabklatschpräparat enthielt kein Cl. fescari). In den Präparaten der rechten Injektionsstelle (das heißt derjenigen bei der Cl. septicum injiziert wurde) konnte Cl. fescari in diesem Versuch nur bei einem Tier nachgewiesen werden. Sämtliche Kulturen auf Blutagar anaerob waren von Cl. septicum überwuchert.

Diese beiden Versuche zeigen deutlich die Überlegenheit der Immunofluoreszenz gegenüber der Kultur. Ohne diese neue Methode wäre bei keinem der 12 Meerschweinchen die Mischinfektion erkannt worden.

Züchtet man Cl. septicum auf einer getrockneten Blutplatte, die 3% Agar enthält, so wächst es als hämolytische Kolonie mit feinen geschlungenen Ausläufern, die nach 48 Stunden einen groben Rasen um die Kolonie bilden. Cl. fescari wächst auf diesem Agar als sehr feine erhabene hämolytische Kolonie, die erst nach 48 Stunden gut erkennbar ist.

In einem *Vorversuch* wollte ich feststellen, ob Cl. fescari aus Mischkulturen mit Cl. septicum auf diesem 3% Agar isoliert werden kann: ich stellte Kulturmischungen im Verhältnis Cl. fescari zu Cl. septicum 1:1, 2:1, 1:2, her, indem ich einmal die beiden Inocula auf die gleiche Platte mit Einzelkolonien überimpfte und einmal die Inocula in einem Reagenzröhrchen mischte und dann auf die Platte mit Einzelkolonien ausstrich. Von jeder Variante stellte ich gleichzeitig 3 Platten her. Nach 48stündiger anaerober Bebrütung konnte ich von den insgesamt 18 Blutplatten nur 4 als Cl. fescari-verdächtig scheinende Kolonien abstechen. Eine einzige Kolonie erwies sich nach verschiedenen Reinzüchtungen als Cl. fescari. Alle Platten, bei denen die Inocula vor dem Überimpfen vermischt worden waren, waren mit Cl. septicum überwuchert. Bei den andern Platten konnten wohl nach 24 Stunden vereinzelt Cl. fescari-verdächtige Kolonien erkannt werden, aber sie waren für eine Umzüchtung noch zu klein. Nach 48 Stunden erwiesen sie sich dann meistens als Cl. septicum-Kolonien, die am Vortag noch nicht geschwärmt hatten, oder sie waren von einer Cl. septicum-Kolonie überwuchert worden.

In einem *Tierversuch* wurden dann wieder je 3 Meerschweinchen im Verhältnis Cl. fescari zu Cl. septicum 3:1, 1:1, 1:3 infiziert, beide Injektionsstellen, Herz und Leber,

fluoreszenzmikroskopisch und mit Kultur auf Blutagar 3% (je eine halbe Platte) untersucht: mit Immunofluoreszenz konnten *Cl. fesci* und *Cl. septicum* mit gleichem Erfolg wie bei den vorhergehenden Tierversuchen nachgewiesen werden. Eine Isolierung von *Cl. fesci* gelang mit der Kultur zweimal; einmal aus der Leber eines Tieres, das im Verhältnis 3:1 infiziert worden war und einmal aus dem Herz eines Tieres, das im Verhältnis 1:3 infiziert worden war.

Auch hier zeigte sich die Immunofluoreszenz der Kultur deutlich überlegen. Immerhin gelang die Isolierung von *Cl. fesci* aus einer Mischinfektion in 2 von 9 Fällen, und zwar unabhängig vom Mischverhältnis.

Serologie von Cl. septicum und Cl. fesci

Im Hinblick auf eine selbständige Herstellung von fluoreszierenden Antiseren für die Diagnostik untersuchte ich mit Agglutination, ob sich meine *Cl. septicum*-Stämme auf Grund verschiedener O-Antigene ebenfalls in serologische Gruppen einteilen lassen, wie das von Moussa gezeigt wurde. Weiter wollte ich prüfen, ob irgend eine Kreuzreaktion zwischen *Cl. septicum* und *Cl. fesci* besteht. Ich beschränkte mich auf die Untersuchung der O-Antigene.

Cl. septicum: Es wurden insgesamt 60 Stämme untersucht. Davon waren 19 von mir selbst isolierte Stämme; die 41 andern stammen aus der Sammlung unseres Instituts, die im lyophilisierten Zustand aufbewahrt worden waren und aus verschiedenen Gegenden der Schweiz kommen. Nacheinander stellte ich gegen 4 dieser Stämme Antiseren an Kaninchen her, nachdem ich sie nochmals biochemisch und mit Tierversuch geprüft hatte. Alle 60 Stämme wurden gegen die 4 Antiseren agglutiniert. Tabelle 4 gibt eine Zusammenstellung dieser Resultate.

Tabelle 4 Resultate der Agglutinationen

Antigen	Antiserum				Anzahl der Stämme, die in gleicher Weise reagierten
	M 19 IV ¹	M 60 II	A 32 II	A 167 I	
M 19	<u>1/160</u> ²	—	1/80	—	17
M 60	—	<u>1/1280</u>	—	—	25
A 32	—	—	<u>1/1280</u>	—	7
A 167	—	—	80	<u>320</u>	7

¹ Die römischen Zahlen bezeichnen das Kaninchen, da von jedem Typ mehrere Kaninchen immunisiert wurden.

² Die homologen Endtiter wurden unterstrichen.

Es fällt auf, daß nicht alle Seren einen gleich hohen homologen Titer erreichten. Die Titer, die ein Stamm mit verschiedenen Seren erreichte, können also nur unter Berücksichtigung dieser Tatsache miteinander verglichen werden. Die Stämme wurden den gleichen serologischen Gruppen zugeteilt, wenn ihre Titer der homologen und heterologen Reaktionen gleich oder eine Stufe höher oder tiefer waren als die in der Tabelle angegebenen. Ausnahmen machten zwei Stämme des Typs A 32. Sie agglutinierten nur 1:320, respektive 1:160. Mit andern Seren agglutinierten sie nicht. Ein Stamm des Typs M 60 agglutinierte nur 1:320 mit M 60 II und sonst mit keinem der 3 andern Seren.

Dieser Versuch zeigt, daß die 60 untersuchten Stämme in 4 serologische Gruppen eingeteilt werden können, die untereinander zum Teil Kreuzreaktionen aufweisen. Es scheinen also mehrere Antigene vorhanden zu sein, die verschieden stark auf die ein-

zelen Stämme verteilt sind. Nur Absorptionsversuche würden erlauben, Antigenformeln für die einzelnen Stämme aufzustellen. In bezug auf die Immunofluoreszenz ist der wichtigste Befund der, daß jeder der 60 untersuchten Stämme eine mehr oder weniger starke Reaktion zeigte, entweder mit dem Antiserum M 60 II oder mit A 32 II. Theoretisch sollte also jeder Stamm fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können, wenn er mit einem Gemisch der beiden markierten Seren überschichtet wird.

Ich wollte noch prüfen, ob sich die Befunde der Agglutination mit der Immunofluoreszenz bestätigen lassen. Zu diesem Zwecke markierte ich von jedem Serum einige ml mit FITC und absorbierte sie mit Gewebepulver. Ich stellte dann Ausstriche aus flüssigen Kulturen der 4 Antigene auf Objektträger her und überschichtete sie mit homologen und heterologen Seren. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5 Resultate der Immunofluoreszenz

Antigen	Antiserum			
	M 19 IV	M 60 II	A 32 II	A 167 I
M 19	±	±	—	—
M 60	—	+	—	—
A 32	—	—	+	—
A 167	—	—	±	+

+ = sehr schöne Fluoreszenz mit einer guten Zeichnung der Stäbchen.

± = eine gegenüber der mit + bezeichneten abgeschwächte Fluoreszenz, die aber noch als positiv bewertet werden kann.

— = keine oder eine schwache Fluoreszenz, die als negativ bewertet werden muß.

Die homologen Reaktionen wurden eingerahmt.

Bei der vergleichenden Verwertung dieser Ausstriche tauchten Schwierigkeiten in der Beurteilung der fluoreszenzmikroskopischen Ausstriche auf. Die Intensität der Fluoreszenz ist sehr schwierig zu beurteilen, da die Ausstriche nicht homogen sind. Viele leuchtende Stäbchen erwecken eher den Eindruck einer brillanteren Fluoreszenz als wenige; deshalb achtete ich immer darauf, ob die Stäbchen eine deutliche und scharfe Zeichnung aufwiesen. Die Beurteilung bleibt aber sehr subjektiv. Eine gewisse Objektivierung könnte erreicht werden mit der Methode, wie sie von Brooks und Mitarbeiter (1965) im Zusammenhang mit der Bestimmung der unspezifischen Fluoreszenz beschrieben wurde: Messung der Intensität mit Fotometer einer Anzahl mikroskopischer Felder bei gleichzeitiger Zählung der Keime. Das setzt voraus, daß die unspezifische Fluoreszenz für alle Ausstriche und Seren gleich sei, was bei Ausstrichen von Kulturen mehr oder weniger erreicht werden könnte, denn der unspezifische background wird colorimetrisch zur spezifischen Färbung gerechnet. Immerhin war der Unterschied zwischen den mit negativ und den mit positiv bezeichneten Reaktionen deutlich. Auch hier könnte ein Absorptionsversuch mit den heterologen Antigenen die Situation klären.

Es zeigte sich, daß sich M 60 II und A 32 II mit der Immunofluoreszenz deutlich unterscheiden lassen. M 19 ergab eine undeutliche homologe Reaktion. Die Reaktion des Antigens M 19 war in bezug auf Intensität der Fluoreszenz mit dem Serum M 60 II gleich stark wie diejenige mit dem homologen Serum. Dieser Befund widerspricht demjenigen des Agglutinationsversuchs, wo M 60 II mit keinem der 3 andern Antigene eine Kreuzreaktion zeigte. Der homologe Titer des Serums M 19 IV ist offenbar zu niedrig, das Serum also ungeeignet zur Markierung. Das Serum A 167 I zeigte eine deutliche homologe Reaktion und keine mit den Ausstrichen der 3 andern Antigene. Ausstriche

von A 167 wurden aber auch vom A 32 II-Serum, wenn auch bedeutend schwächer, markiert.

Da mir die 2 Stämme, mit welchen die Seren der Firma Burrough's Wellcome Co. hergestellt worden waren, für vergleichende Versuche nicht zur Verfügung standen, verglich ich das Wellcome-Serum, das ja ein Gemisch von 2 Seren darstellt, mit verschiedenen Gemischen eigener Seren. Die Resultate dieses Versuchs sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6 Vergleich von Gemischen selbsthergestellter Seren mit dem Serum von Wellcome.

Antigen	Antiserum		
	A 32 II + M 60 II	A 32 II + M 60 II + A 167 I	Anti-Cl.sept. Wellcome
M 19	±	±	+
M 60	+	+	+
A 32	+	+	±
A 167	—	+	+

Die Bedeutung der Zeichen siehe Erklärung Tabelle 5.

Ein Serumgemisch A 32 II + M 60 II ergab schöne positive Reaktionen mit den beiden homologen Stämmen; mit dem Stamm M 19 war die Reaktion schwach positiv. Der Ausstrich von A 167 zeigte keine Fluoreszenz. Ein Serumgemisch mit A 32 II + M 60 II und A 167 I ergab schöne positive Reaktionen mit den homologen Stämmen, während diejenigen mit M 19 wieder schwach waren. Demgegenüber gab eine Markierung mit dem käuflichen Serum eine schöne positive Reaktion mit den Antigenen M 19, M 60 und A 167, während diejenige mit A 32 etwas abgeschwächt war. Alle 4 von mir als getrennte Serotypen beschriebenen Stämme konnten demnach mit dem käuflichen Serum nachgewiesen werden.

Kreuzreaktionen: Zur Untersuchung von Kreuzreaktionen zwischen Cl. septicum und Cl. fesceri agglutinierte ich sämtliche 60 Cl. septicum-Stämme mit dem Anti-Cl. fesceri-Serum und die 10 Cl. fesceri-Stämme gegen die 4 von mir hergestellten Anti-Cl. septicum-Seren. Bei keinem dieser Versuche stellte ich eine positive Agglutination fest.

Die entsprechenden Untersuchungen mit der Immunofluoreszenz ergaben gleiche Resultate. Cl. fesceri-Stämme mit dem homologen Antiserum überschichtet ergab eine brillante Fluoreszenz mit schöner Zeichnung der Stäbchen. Überschichtete ich anti-Cl. fesceri-Serum über Ausstriche der 4 Cl. septicum-Typen oder aber die 4 Cl. septicum-Seren über Cl. fesceri-Ausstriche, so ergab sich keine oder nur eine ganz geringe Fluoreszenz. Eine Unterscheidung von Cl. fesceri und Cl. septicum war also mit Agglutination und Immunofluoreszenz möglich.

Diskussion

Die beschriebenen Tierversuche und die Untersuchungen am diagnostischen Material zeigen deutlich, daß die Immunofluoreszenz den klassischen Methoden der Isolierung, Reinzüchtung und Differenzierung von Anaerobiern bei der Differenzialdiagnose zwischen einer Rauschbrand- und einer Pararauschbrand-Infektion stark überlegen ist. Mit Hilfe der Methode der fluoreszierenden Antikörper kann eine Rauschbrand- respektive Para-

rauschbrand-Infektion, eine Stunde nachdem das Material eingetroffen ist, mit Sicherheit nachgewiesen werden, während mit der Kultur eine sichere Diagnose im günstigsten Falle erst nach einer Woche möglich ist. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die fluoreszenzmikroskopischen Befunde immer anhand von positiven Kontrollen überprüft werden müssen. Auf eine Isolierung und Differenzierung des Keimes sollte meines Erachtens auch bei gestellter Diagnose nicht verzichtet werden, einmal um den fluoreszenzmikroskopischen Befund zu untermauern, aber auch, weil es für den Bakteriologen immer erfreulicher ist, wenn ihm der pathogene Keim zur Verfügung steht (Vergleich mit andern Keimen, Vakzination).

Während der Nachweis von *Cl. fesceri* gleichbedeutend ist mit der Diagnose Rauschbrand, sagt derjenige von *Cl. septicum* noch nichts aus. Wie auch Batty hervorhebt (persönliche Mitteilung), kann mit Hilfe von verschiedenen Ausstrichen die quantitative Verteilung von *Cl. septicum* im Kadaver nachgewiesen werden – und dies ist ja gerade ein weiterer Vorteil der Immunofluoreszenz gegenüber der Kultur – aber wir wissen letzten Endes doch nicht, ob es sich um eine agonale oder postmortale Aussaat von *Cl. septicum*-Keimen oder um eine intravitale Infektion gehandelt hat. Die Diagnose Pararauschbrand muß letzten Endes anhand des pathologisch-anatomischen und klinischen Befundes zusammen mit dem bakteriologischen Befund gestellt werden.

Eine Kreuzreaktion mit andern Bakterien auch aus sehr fauligem Material wurde nicht festgestellt. Die erwähnte Markierung von zwei Hefearten durch das *Cl. septicum*-Serum stört wegen der stark verringerten Fluoreszenz und der andern Morphologie für die Diagnostik nicht. Ob die gemeinsamen löslichen Antigene von *Cl. septicum* und andern Clostridien, die Ellener und Mitarbeiter (1963) nachgewiesen haben, an den Zelleib gebundene Antigene sind und deshalb bei Immunofluoreszenz Kreuzreaktionen machen, müßte anhand von Versuchen mit denselben Stämmen untersucht werden. Ebenfalls sollte die von Klotz (1965) beschriebene Kreuzreaktion *Cl. septicum*/*Cl. welchii* mit den von ihm benutzten Stämmen und anderen weiteruntersucht werden. Auf alle Fälle scheinen Clostridien ganz allgemein ein sehr vielseitiges Antigenmuster zu besitzen, und Kreuzreaktionen scheinen deshalb theoretisch durchaus möglich. Auch aus diesem Grunde ist es wertvoll, alle fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Keime zu isolieren und biochemisch zu differenzieren.

Die Methoden zur Isolierung, Reinzüchtung und Differenzierung nach Fey (1958) benötigen einen gewissen Aufwand an Zeit und Material, führen aber bei geübter Technik sicher zum Ziel. Einzig beim Nachweis des löslichen Hämolytins von *Cl. fesceri* und *Cl. septicum* erhielt ich abweichende Resultate. Da ich die beschriebene Technik meines Wissens genau angewandt habe, muß ich annehmen, daß für einzelne Stämme von *Cl. fesceri* und *septicum* die allgemeine Regel nicht stimmt, wonach der erstere Keim lösliches Hämolytin bildet, der letztere nicht.

Die Tierversuche haben besonders schön gezeigt, daß eine Mischinfektion beider Keime mit den klassischen kulturellen Methoden nicht, oder nur schwer erkannt wird, während sie mit Hilfe der Immunofluoreszenz leicht diagnostiziert werden kann. Obschon beim untersuchten Material keine Mischinfektion nachgewiesen wurde, ist die Möglichkeit einer solchen in praxi nicht von der Hand zu weisen, wenn man berücksichtigt, daß *Cl. septicum* ein normaler Darmbewohner ist und kurze Zeit post mortem unter Umständen überall im Kadaver nachgewiesen werden kann.

Die serologischen Untersuchungen von *Cl. fesci* und *Cl. septicum* ergaben eindeutig, daß die beiden Keime serologisch voneinander unterschieden werden können. Während bei der Agglutination keine Kreuzreaktionen zutage traten, konnte mit der Immunofluoreszenz eine sehr geringgradige kreuzweise Reaktion festgestellt werden. Mit Hilfe von Absorptionsversuchen müßte noch abgeklärt werden, ob es sich hier tatsächlich um Antigen-Antikörper-Reaktionen handelt. Für die praktische Anwendung sind sie aber nicht von Bedeutung, wenn eine positive Kontrolle mitgeführt wird. Die oben erwähnte «Kreuzreaktion» wurde nur bei den selbsthergestellten, nicht aber bei den käuflichen Seren festgestellt.

Eine Abklärung der serologischen Gruppierung von *Cl. septicum* gelang nicht restlos. Die Befunde der Immunofluoreszenz stimmten nur teilweise mit denjenigen der Agglutinationsversuche überein. Mit Absorptionsversuchen und teilweise mit Immunseren von höherem Titer könnte man wohl genauere Resultate erzielen. Der praktische Zweck dieser Untersuchungen war es jedoch abzuklären, ob es möglich sei, mit selbsthergestellten und markierten Seren weiterzuarbeiten. Das Serum von Batty und Walker (Wellcome), das ja ein Gemisch von zwei Typenseren darstellt, enthält offenbar Antikörper gegen alle meine 4 Serotypen, wobei lediglich 1 Typ etwas schlechter markiert wird als mit dem eigenen Serum. Ob die von Batty und Walker verwendeten Stämme in bezug auf ihr Antigenmuster vielseitiger sind oder ob die genannten Autoren höhere Serumtiter erreichten, kann ich nicht entscheiden. Eine parallele Untersuchung aller *Cl. septicum*-Stämme und von diagnostischem Material mit meinem 3-Serum-Pool und dem Wellcome-Serum, würde erst zeigen, ob meine Seren für die tägliche Diagnostik gebraucht werden können oder sich sogar für den Nachweis gewisser Stämme besser eignen würden.

Zusammenfassung

Bei der vergleichenden Untersuchung von gasbrandverdächtigem Material (92 Fälle) und künstlich infizierten Meerschweinchen auf *Cl. fesci* und *Cl. septicum* erwies sich die Methode der direkten Immunofluoreszenz gegenüber der Kultur klar überlegen. Es wurden keine Kreuzreaktionen zwischen *Cl. fesci* und *Cl. septicum* und Fäulniskeimen festgestellt.

Auf Grund der O-Antigene konnten *Cl. fesci* und *Cl. septicum* mit Agglutination und Immunofluoreszenz eindeutig voneinander unterschieden werden. Es wurden 4

verschiedene O-Gruppen von *Cl. septicum* mit Agglutination festgestellt. Nur zwei dieser 4 Untergruppen konnten mit der Methode der fluoreszierenden Antikörper eindeutig unterschieden werden. Wir arbeiten mit einem Gemisch von drei Seren, die mit Fluoresceinisothiocyanat markiert werden.

Résumé

Lors d'essais comparatifs de matériel suspect de gangrène gazeuse (92 cas) avec des cobayes infectés artificiellement par *Cl. fesceri* et *Cl. septicum*, la méthode de l'immunofluorescence directe s'est révélée supérieure à la culture. Il n'y a pas eu d'interaction entre *Cl. fesceri* et *Cl. septicum* et les germes de la putréfaction.

Grâce à l'antigène O, *Cl. fesceri* et *Cl. septicum* ont pu être différenciés l'un de l'autre avec sûreté par l'agglutination et l'immunofluorescence. L'auteur a constaté l'existence de quatre groupes différents d'antigènes O, de *Cl. septicum* avec agglutination. Mais seulement deux de ces quatre sous-groupes ont pu être nettement différenciés par la méthode des anticorps fluorescents. Nous travaillons avec un mélange de trois sérums marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Riassunto

Nell'esame comparativo del materiale gangrenoso sospetto (92 casi) ed in cavie artificialmente infettate con *Cl. fesceri* e *Cl. septicum*, il metodo della immunofluorescenza diretta si è dimostrato nettamente superiore alla cultura. Non si constatò nessuna reazione crociata fra *Cl. fesceri* e *Cl. septicum* ed i germi della putrefazione.

Grazie all'antigene O, il *Cl. fesceri* ed il *Cl. septicum* poterono esser chiaramente differenziati con l'agglutinazione e l'immunofluorescenza. Furono individuati 4 gruppi O di *Cl. septicum* per mezzo dell'agglutinazione. Solo 2 di questi 4 sottogruppi con il metodo degli anticorpi fluorescenti poterono esser differenziati in modo sicuro. Lavoriamo con un miscuglio di 3 sieri marcati con isotiocianato di fluorescina.

Summary

In the comparative examination of material suspected of gas oedema (92 cases) and artificially infected guinea-pigs for *cl. fesceri* and *cl. septicum*, the method of direct immunofluorescence proved definitely superior to that of culture. No cross reaction was found between *cl. fesceri* and *cl. septicum* and germs of putrefaction.

On the basis of O-antigens, *cl. fesceri* and *cl. septicum* could be clearly differentiated by agglutination and immunofluorescence. Four different O-groups of *cl. septicum* were found by agglutination. Only two of these four sub-groups could be clearly distinguished by means of fluorescing antibodies. We work with a mixture of three sera marked with fluoresceinisothiocyanate.

Literatur

Batty I. and Walker P. D.: Differentiation of *Cl. septicum* and *Cl. chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. *J. Path. Bact.* 85 (2), 517-521 (1963). – Batty I. and Walker P. D.: Fluorescent labelled clostridial antisera as specific stains. *Bull. Off. Int. Epiz.* 59 (9-10), 1499-1513 (1963). – Batty I. and Walker P. D.: Colonial morphology and fluorescent labelled antibody staining in the identification of species of the genus *Clostridium*. *J. appl. Bact.* 28 (1), 112-118 (1965). – Brooks J. B., Lewis V. J. and Pittman B.: Separation of fluorescent antibody conjugates into 7 S and 19 S Globulin components by gelfiltration. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 119, 748-751 (1965). – Bürki F.: Der Goldhamster als Versuchstier in der mikrobiologischen Laboratoriumspraxis. *Z. Hygiene* 133, 160-168 (1951). – Chadwick C. S., McEntegart M. G. and Nairn R. C.: Fluorescent protein-tracers. A trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein. *Immunology* 1, 315-327 (1958).

– Dahme H.: Lehrbuch der Veterinär-Mikrobiologie. Berlin 1940. – Ellener P. D. and Green S. S.: Serology of the soluble antigens of the pathogenic Clostridia. *J. Bact.* 86 (5), 1084–1097 (1963). – Ellener P. D. and Green S. S.: Serological grouping of the pathogenic Clostridia. *J. Bact.* 86 (5), 1098–1100 (1963). – Fey H.: Anaerobentechnik. Röntgen- und Laboratoriumstechnik 11 (1), 2–10 und (3), 33–42 (1958). – Fey H.: Ein neuer Anaerobentopf. *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene* 193, 114–116 (1964). – Fey H.: Fluoreszenzmikroskopische Identifizierung von abnorm wachsenden Rauschbrand-Clostridien. *Path. Microbiol.* 28, 225–228 (1965). – Fey H.: La microscopie à fluorescence. *Rev. méd. Suisse romande* 85 (10), 768–775 (1965). – Henderson D. W.: Studies on Clostridium chauvoei. I. The analysis of the «H» and «O» antigens of Cl. chauvoei. II. Active immunization with pure «O» antigen. *Brit. Exp. Path.* 13, 412–427 (1932). – Henderson D. W.: Experiments with the «O» antigen of Clostridium oedematis maligni (Vibrio septique). *Brit. Exp. Path.* 15, 166–175 (1934). – Klotz A. W.: Application of FA techniques to detection of Cl. perfringens. *Public Health Reports* 80 (4), 305–312 (1965). – Mathois H. und Stöckl W.: Über die Behandlung von Cl. chauvoei und Cl. septicum Infektionen bei künstlich infizierten Schafen. *Wiener Tierärztl. Monatsschr.* 51 (6), 293–399 (1964). – Meyn A.: Zur Morphologie und Biologie des Rauschbrandbazillus. *Habilitationsschrift Leipzig* 1934. – Moussa R. S.: Antigenic formulae for Cl. septicum and Cl. chauvoei. *J. Path. Bact.* 77, 341–350 (1959). – v. Muralt A.: Praktische Physiologie. Berlin und Heidelberg 1948. – Riggs J. L., Seiwald Ph. D., Burkhalter J. H., Downs C. M. and Metcalf T. G.: Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum. *American J. Path.* 34, 1081–1097 (1958). – Robertson, Muriel M. A.: Serological groupings of vibrio septique and their relation to the production of toxin. *J. Path. Bact.* 23, 153–170 (1919). – Schneider L. G.: Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. 1. Mitteilung: die fluoreszierende Antikörperteknik. *Zentralblatt f. Veterinärmedizin, Reihe B* 11 (3), 207–230 (1964). – Smith L.D.S.: Introduction to the pathogenic anaerobes. The University of Chicago Comitee on publications in Biol. and Med. 1954. – Thomason M. B., Cherry W. B., Davis B. R. and Pomaes-Lebron A.: Rapid presumptive identification of enteropathogenic E. coli in faecal smears by fluorescent antibody. 1. Preparation of testing reagents. *Bull. Org. mond. Santé* 25, 137–152 (1961). – Walker P. D. and Batty I.: Fluorescent studies in the genus Clostridium. I. The location of antigens on the surface of Cl. sporogenes during sporulation and germination. *J. appl. Bact.* 27 (1), 137–139 (1964). – Walker P. D. and Batty I.: Surface antigenic changes in Bacillus cereus during germination and sporulation as shown by FA staining. *J. appl. Bact.* 28 (1), 194–196 (1965). – Weidmüller H.: Über die Eignung des syrischen Goldhamsters (Mesocricetus auratus) als Versuchstier für die Rauschbrand-Pararouschbrand Differenzierung. *Deutsche Tierärztl. Wochenschr.* 59 (7/8), 52–54 (1962). – Weinberg M., Nativelle R. and Prevot A.: Les Microbes anaerobes. Paris 1937. – Zschokke W. und Saxer E.: Über die Verwendbarkeit des Hämolyse-Reagenzglasversuches in der Rauschbranddiagnostik. *Schweiz. Arch. f. Tierheilk.* 68 (3), 113–123 (1936).