

Sonderabdruck aus dem
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

I. Abteilung. Originale.

1937. Bd. 139.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Printed in Germany.



Nachdruck verboten.

[Aus der Medizinischen Klinik (Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rusznyák)
der kgl. ungarischen Franz-Joseph-Universität in Szeged.]

Ueber die Wirkung harter Röntgenstrahlen auf Typhusbazillen.

Von **Erich Forfota** und **Arthur Hámori**.

In Folgendem soll über Bestrahlungsversuche berichtet werden, welche wir mit ungefilterter, harter Röntgenstrahlung an *Bacillus typhi* abd. unternahmen. Den Anlaß zu diesen Versuchen ergaben Strahlenresistenzversuche, welche wir vor einiger Zeit mit dem in mancher Beziehung noch ungeklärten Virus der übertragbaren Hühnerleukose (Ellermann, Jármai) unternommen haben¹⁾. In diesen Versuchen übte die Dosis von 200 HED. (!) Röntgenstrahlen auf Infektiosität und Virulenz des Erythroleukosevirus keine irgendwie nachweisbare Wirkung aus, während eine 24 Std. alte Schrägagarkultur von Typhusbazillen schon durch bedeutend kleinere Strahlenmengen schwer geschädigt wurde. Die Bestrahlung von Typhusbazillen sollte uns in diesen Versuchen nur zur Kontrolle dienen, die Versuchsanordnung war nicht dazu geeignet, ein genaueres Bild über Röntgenresistenz und über vielleicht nachweisbare biologische Schädigung der Typhusbazillen zu bieten. Die aber auch mittels grob orientierender Methodik nachweisbar starke Schädigung von Typhuskulturen durch, allerdings sehr große Röntgenstrahlenmengen, ließ es wünschenswert erscheinen, dieser Frage in quantitativer und qualitativer Hinsicht weiter nachzugehen.

- 1) Röntgentherapeutische Versuche an erythroleukotischen Hühnern. E. Forfota. Strahlentherapie. (Im Druck.)
- 2) Versuche zur Bestimmung der Röntgenresistenz des Virus der übertragbaren Hühnerleukose. E. Forfota. Erscheint in Strahlentherapie.
- 3) Röntgensugarak hatása az átoltható tyúkleukosis (erythroleukosis) kórképére és vírusára. E. Forfota. Állatorvosi Lapok. 1936, 20 (ungarisch).

Es ist wohl überflüssig an dieser Stelle auf die früher in großer Anzahl erschienenen Mitteilungen über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Bakterien näher einzugehen. Diese Frage scheint zu einem gewissen Abschluß gekommen zu sein, eine ausführliche Darstellung auch der älteren Arbeiten findet sich bei Klövekorn. — Die Hoffnung in den Röntgenstrahlen ein praktisches wertvolles Mittel zur Abtötung von pathogenen Bakterien zu finden, hat sich nicht bewährt, denn so sehr die Versuchsergebnisse der verschiedenen Autoren diesbezüglich auch differieren, im Endergebnisse stimmt man heute darin überein, daß die direkte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Bakterien keine große ist und jedenfalls dazu nicht genügt, um praktische Erfolge erwarten zu können. Es liegt dies vermutlich daran, daß die Röntgenstrahlung zu hart, d. h. zu durchdringungsfähig ist und deshalb in der Bakterienzelle viel zu wenig Energie absorbiert wird. Neben diesem Umstand scheinen Unterschiede der Wirkung von Röntgenstrahlen auf verschiedene Arten und Stämme von Mikroben von untergeordneter Bedeutung.

Die durch Röntgenstrahlen erzeugte Sekundärstrahlung von Schwermetallen dagegen, von sehr geringer Durchdringungsfähigkeit, erwies sich z. B. in den Versuchen von Guthmann bedeutend wirkungsvoller. Es gelang, durch verhältnismäßig sehr kurze Belichtungszeiten, an *Bacillus typhi muris* beachtenswerte Erfolge zu erzielen und eine mathematisch faßbare Gesetzmäßigkeit zwischen Röntgenstrahlendosis und biologischem Effekte nachzuweisen. Demnach erfolgt die Bakterienkolonienabnahme nach Röntgenbestrahlung nach einem Exponentialgesetz. Dies bedeutet, daß bei Belichtung einer Bakterienkultur eine Steigerung der Dosis anfänglich einen starken Erfolg — kenntlich an einer großen Steigerung der Prozentzahlen an abgetöteten Keimen — zur Folge hat, eine gleich große Steigerung der Dosis zu einem späteren Zeitpunkte aber zu einer unverhältnismäßig geringeren Erhöhung der Wirkung führt. „Während also anfänglich eine Dosissteigerung einen sehr starken Effekt hat, ist dieser bei größeren Dosen anteilmäßig viel geringer“ (Guthmann).

Eine andere Frage, welche in früheren Arbeiten diskutiert wurde, ist, ob durch Röntgenbestrahlung von gewissen Mikroorganismen biologische Varianten des Stammes erzielt werden können, ob also mittels Röntgenbelichtung eine Aenderung der morphologischen und biologischen Eigenschaften von Bakterien erfolgen könne? Für diese Annahme sprechen einige Beobachtungen, so unter anderem z. B. die Versuchsergebnisse von Klövekorn, welcher nach Röntgenbestrahlung von *Staphylokokkus* eine Aenderung der biologischen Eigenschaften dieser Kulturen, wie Farbstoffverlust und Auszackung des Kolonienrandes beobachtete.

Eine dritte prinzipielle Frage hat T. S. Meyer in einer Mitteilung „Ueber Gewöhnungserscheinungen an Röntgenstrahlen bei *Bac. prodigiosus*“ angeschnitten. Er berichtete darüber, daß eine einmal bestrahlte und dadurch geschädigte, sonst aber normales Wachstum zeigende Kultur von *Bac. prodigiosus* durch erneute Bestrahlung weniger geschädigt würde, als eine noch nicht vorbestrahlte Kultur desselben Stammes. Bei Fortsetzung der Bestrahlungen wurde die Resistenz immer deutlicher. Er glaubt daher an die Möglichkeit einer, durch erlittene Bestrahlungen entstehenden „Strahlenfestigkeit“, welche er mit der „Arzneifestigkeit“ gewisser Bakterienstämme vergleicht.

Uns interessierte aus gewissen Gründen die Wirkung genau derselben, harten Röntgenstrahlung, welche wir in den schon erwähnten Resistenzversuchen bei Bestrahlung des ultrafiltrierbaren Leukoseagens anwandten. Wir mußten also schon im voraus damit rechnen, daß unsere Versuchsanordnung

vom Standpunkte des Tötungseffektes aus nicht ökonomisch sein werde, da diese Strahlung vermutlich nur in überaus geringem Maße in der Bakterienzelle absorbiert wird und deshalb sehr große Strahlenmengen erforderlich sein werden, ehe eine Wirkung nachzuweisen ist. — Wir benutzten eine Metwahröhre mit Wasserkühlung, ohne Filter aus 20 cm Fokusabstand, welche unter 150 KV. (eff.) Röhrenspannung mit 4 MA. Stromstärke betrieben wurde. Die Dosis von 550 r. gleich einer HED., wurde unter diesen Umständen in 1,8 Min. erreicht (Ionognom).

Die Resistenz von Typhusbazillen dieser Strahlung gegenüber prüften wir auf folgende Weise:

Eine 24 Std. alte Schrägagarkultur unseres Typhusstammes von reinem H-Typus, wurde in 20 ccm einer sterilen, physiologischen Kochsalzlösung emulgiert. Die Emulsion wurde in eine flache Petrischale gegossen, wo sie eine ca. 3 mm hohe Schicht bildete und auf einen flachen Holzklötz so unter die Röhre gebracht, daß der Tubus der Röhre die ganze Schale gut überdeckte. Es gelang uns dadurch, wie das die Züchtungsversuche später bewiesen, trotz stundenlanger Bestrahlungen eine Sekundärinfektion aus der Luft zu verhindern. Die Emulsion von Typhusbazillen wurde offen, bei Zimmertemperatur bestrahlt. In Vorversuchen konnten wir uns auch nach stundenlanger Belichtung davon überzeugen, daß die Temperatur unter dem Tubus bei dieser Anordnung nicht bis über 32—35° C anstieg.

Die keimabtötende Wirkung der Röntgenbestrahlung wurde in quantitativer Hinsicht dadurch nachgewiesen, daß wir vor Beginn der Versuche und im Verlaufe derselben Keimzählungen unternahmen. Nach Ablauf von gewissen Bestrahlungszeiten, welche gewissen Strahlendosen entsprachen, wurde die Belichtung kurz unterbrochen und nach guter Homogenisierung der Emulsion daraus eine Probe entnommen, in welcher wir, mittels Züchtung, die Zahl der noch überlebenden Keime bestimmten.

Es wurde immer 0,1 ccm der Emulsion verarbeitet, indem wir daraus von 10- bis zu 1millionfacher Verdünnung ansteigend Verdünnungen anfertigten und die Nährböden jeweils mit 0,1 ccm der verschiedenen Verdünnungen beschickten. Aus jeder Verdünnung wurden nach jeder Bestrahlungsdosis immer gleichzeitig 2 Agarplatten gegossen. Nach 24 Std. Brutschrank wurde dann auf den Platten die Zahl der angegangenen Kolonien bestimmt und auf die ganze, ursprüngliche Schrägagarplatte berechnet. — Wir arbeiteten also in jeder Versuchsreihe mit mehrfachen genauen Kontrollen, was auch dadurch noch gesichert wurde, daß bei den Berechnungen immer nur jene Platten verwertet wurden, auf welchen die Kolonien die gleichmäßigste Verteilung zeigten und bei größter Verdünnung mehr als 30, aber weniger als 300 Kolonien zur Entwicklung kamen. — Die Zahl sämtlicher Keime der ursprünglichen, unbestrahlten Schrägagarplatte wurde mit 24 Milliarden angenommen.

Die abtötende Wirkung der ansteigenden Röntgenstrahlendosen ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Tabelle I.

Verabreichte Strahlendosis in HED.	0	15	30	60	90	120
Gesamtzahl der überlebenden Keime auf die ganze Schrägagarplatte berechnet	$2,4 \times 10^{10}$	8×10^9	7×10^8	$1,5 \times 10^6$	1×10^6	2×10^4

Nach einer Dosis von 150 bzw. von 200 HED. wuchsen einige spärliche Kolonien nur auf jenen Platten, welche wir mit 0,1 ccm der unverdünnten Emulsion beschickten, und nach Einwirkung von 250 HED. Röntgenstrahlen-

dosis konnten überlebende Keime mit Hilfe von Züchtungsversuchen überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß auch harte Röntgenstrahlung eine tödende Wirkung auf Bakterien ausübt, der Satz von Guthmann, nach welchem: „Belichtet man Bakterien mit Röntgenstrahlen von 180 KV. ohne Filterung, so kann man fast beliebig große Dosen verabfolgen, ohne daß eine Verminderung der Keimzahl statthat“, zumindest also nur bedingt richtig ist, denn wenn tatsächlich Riesendosen angewandt werden, so ist die keimabtötende Wirkung, welche bis zur völligen Sterilisation der Kulturen führen kann, genau so, nur nach bedeutend größeren Dosen nachzuweisen, wie nach Einwirkung von langweiliger, weicher Strahlung. Prinzipiell bestehen hier unserer Meinung nach keine Unterschiede, ja vermutlich sind es nämlich auch genau dieselben Wellenlängen, welche in dem einen Versuche, weil in großer Menge vorhanden, nach kürzerer Zeit und kleineren Dosen, in dem anderen aber nach viel längerer Belichtung und enormen Strahlendosen, zu dem gleichen Erfolge führen. Letzteres Verfahren ist eben wahrscheinlich nur unökonomisch, weil bei größeren Röhrensparnungen verhältnismäßig viel weniger an wirkungsvollen, im Bakterienkörper tatsächlich zur Absorption gelangenden weichen Strahlen emittiert wird.

An nachweisbarer Aenderung der biologischen Eigenschaften unseres Stammes infolge der Röntgenbestrahlungen war die Ausbeute sehr gering. Die morphologischen Eigenschaften der einzelnen Bakterien und der Kolonien zeigten keine Aenderung, eine R-Variante wurde nicht beobachtet und auch das Verhalten des Stammes bezüglich der Vergärung von Dextrose, Laktose, Mannit, Maltose und Saccharose blieb unverändert, ebenso bezüglich der Milcherinnung und der Indolbildung. Als einzigen Unterschied den Eigenschaften des Stammes vor der Bestrahlung gegenüber, sahen wir eine Aenderung seiner Agglutination, bzw. seiner Antigenstruktur nach den Bestrahlungen eintreten.

Die Rezeptoranalyse wurde so vorgenommen, daß wir 24 Std. nach der Bestrahlung je eine Kolonie von den, mit verschiedenen großen Dosen behandelten Bakterien beschickten Agarplatten weiter impften und hernach die Agglutination gesondert mit einem H- bzw. mit einem O-Serum unternahmen. Wir konnten beobachten, daß während H-Serum den Stamm ursprünglich nach dem reinen H-Typus in 32000facher Verdünnung agglutinierte, der Agglutinationstiter desselben Stammes nach Einwirkung von 200 HED. bis auf 1:8000 sank und die Bakterien teilweise in kompakten Schollen ausfielen. Mit einem O-Serum von einem Titer von 1:4000 dagegen fanden wir im Verhalten der Agglutination vor und nach der Bestrahlung, keinen Unterschied.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen ist das Geißelantigen Röntgenstrahlen gegenüber empfindlicher als das Somaantigen, und eine Strahlendosis von 200 HED. ist imstande, eine Minusvariante des ersteren zu erzeugen: wir konnten uns dabei aber davon überzeugen, daß infolge dieser Aenderung der Antigenstruktur die Beweglichkeit des Stammes nicht verloren ging. Aehnliches fanden wir auch in Versuchen mit einem anderen Stamme, wo nach 200 HED. Röntgenstrahlen der Titer der Agglutination des Typus-H von 1:16000 bis auf 1:2000 sank.

Es interessierte noch die Frage, ob wiederholte Strahleninsulte tatsächlich zu einer „Strahlenfestigkeit“ führen können? Wir wählten eine Kolonie, welche 200 HED. noch überlebt hatte und im weiteren normales Wachstum aufwies, und setzten den aus ihr gezüchteten Stamm später wiederholt denselben Strahlendosen aus. Im zweiten Versuche konnten wir beobachten, daß einige Keime nun tatsächlich auch die Dosis von 250 HED. lebend überstanden. Das biologische Verhalten dieser überlebenden Keime wies keine neuere Aenderung

auf. Diese, freilich nur einmalige Beobachtung spricht also nicht gegen die Annahme, daß es etwa eine Art von „Strahlenfestigkeit“ geben kann, doch ist dieser vereinzelte Befund an sich jedenfalls nicht dazu geeignet, um zu dieser Frage irgend Stellung nehmen zu können.

Zusammenfassung.

Durch Bestrahlungsversuche an *Bacillus typhi* abd. konnte der Nachweis dafür erbracht werden, daß auch harte Röntgenstrahlung, falls in genügend großer Dosis angewandt, auf Keime eine abtötende Wirkung ausübt. Die Wirkung ist schon nach einer Dosis von 15 HED. gut ausgesprochen, und eine Dosis von 250 HED. vernichtet alle Keime.

An einem Stamme, welcher aus Keimen, die eine Röntgenstrahlendosis von 200 HED. noch überlebt hatten, gezüchtet wurde, konnte nach der Bestrahlung das Entstehen einer Minusvariante des Geißelantigens beobachtet werden, während sich das Somaantigen unverändert hielt. Es scheint diese Beobachtung dafür zu sprechen, daß die Antigenstruktur von Typhusbazillen unter dem Einfluß der Röntgenbestrahlungen gewisser Veränderungen fähig ist.

Schrifttum.

Guthmann, H., *Strahlenther.* **25**, 280. — Meyer, P. H., *Klin. Wschr.* **1923**, 297. — Klövekorn u. Gaertner, *Strahlenther.* **23**, 148. — Klövekorn, *Ebenda* **20**, 354. (Hier auch ausführliche Literatur dieses Themas.)
