

Zur Kenntnis der indigobildenden Substanzen im Urin.

2. Über die Zersetzung der Indoxylschwefelsäure im Urin durch Bakterien und die Entstehung der sogenannten Indigurie.

Von

G. Hoppe-Seyler, Kiel.

(Der Redaktion zugegangen am 19. April 1916.)

Der Urin eines Mannes, der wegen Choleradiarrhöe im Städtischen Krankenhause in Kiel zur Aufnahme kam, enthielt reichliche Mengen Indoxyl und demgemäß von Ätherschwefelsäure. Es waren im Stuhlgang die Bacillen der Cholera asiatica vorhanden. Diese starke Indoxyl- und Ätherschwefelsäureausscheidung, wie ich sie schon früher bei Cholera geschildert hatte,¹⁾ ist auf die durch die Cholerabacillen erzeugte starke Indolbildung im Darm, die ja auch der für ihre Kulturen charakteristischen Indol- und Nitritbildung und der sogenannten Cholerarot-(Nitrosoindol-)Reaktion entspricht, zurückzuführen. Der Urin war klar, gelblich, enthielt weder Eiweiß noch Zucker. Die 24stündige Menge war 1800 ccm, das spezifische Gewicht 1012. Die Menge der Ätherschwefelsäure war 0,0235% SO_4H_2 , die Gesamttagesmenge 0,423 g. Ein Teil des Urins war in einer verkorkten Flasche aufbewahrt worden ohne irgendwelchen Zusatz. Als ich diesen Urin nach einigen Wochen wieder untersuchte, war er stark zersetzt, übelriechend und hatte am Boden neben weißlichen Massen (Phosphaten usw.) ein reichliches, bläulich gefärbtes Sediment abgeschieden. Die Flüssigkeit selbst war bläulich-grün verfärbt und reagierte stark alkalisch. Der Urin, dessen Menge 215 ccm betrug, wurde durch ein gewogenes Filter filtriert. Das Filtrat war noch etwas grünlich verfärbt. Davon wurden 50 ccm zur Schwefelsäurebestimmung verwendet.

¹⁾ Berl. Klin. Wochenschr., 1892, Nr. 43.

Das Ergebnis war:

Menge der Sulfat-Schwefelsäure 0,0474 g

» » Ätherschwefelsäure 0,0044 »

Der frische Urin hatte in 50 ccm ergeben:

Menge der Sulfat-Schwefelsäure 0,0398 g

» » Ätherschwefelsäure 0,0117 »

Vergleicht man nun diese Zahlen, so ergibt sich, daß die Sulfat-Schwefelsäure durch die Zersetzung um 0,0076 in 50 ccm zugenommen hatte, die Ätherschwefelsäure dagegen eine Abnahme von 0,0073 in 50 ccm zeigte. Es entspricht also die Zunahme der Sulfat-Schwefelsäure fast genau der Abnahme der Ätherschwefelsäuremenge. Es muß also bei der Bildung des Indigos im Urin die Ätherschwefelsäure zersetzt worden sein.

Der beim Abfiltrieren des blau gefärbten Niederschlags auf dem Filter erhaltene Rückstand wurde nun mit verdünnter Salzsäure und darauf mit Wasser ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Der Rückstand wog danach 0,054 g.

Bei der Indigoblaubildung aus Indoxylschwefelsäure ist das Verhältnis des Indigoblaus zur Schwefelsäure wie 131 zu 98 = 1,32. Die zersetzte Menge Ätherschwefelsäure betrug 0,0147 g in 100 ccm oder in 215 ccm 0,0316 g. Dieser Menge würden 0,0417 Indigo entsprechen, während im ganzen 0,054 ausgeschieden wurden. Danach ist anzunehmen, daß der größte Teil des gebildeten Indigos der zersetzten Ätherschwefelsäure entspricht.

Es fragte sich nun, wodurch diese Zersetzung der Indoxylschwefelsäure und die Bildung von Indigo verursacht war.

Es wurden daher von reichlich indoxylhaltigem Urin eines an Darmtuberkulose leidenden Knaben:

1. 100 ccm ohne Zusatz,
2. 100 ccm mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht;
3. 100 ccm mit einigen Tropfen eines reichlich Bakterien haltenden Urins von einem Kranken mit Cystitis,
4. 100 ccm ebenso und noch mit Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt, in offenem Erlenmeyer-Kolben in den Brutschrank gesetzt.

Der Urin ergab frisch:

0,126 Sulfat-, 0,0282 g Ätherschwefelsäure, zusammen 0,154 SO_4H_2 in
100 ccm

In allen Urinportionen bildete sich nach einigen Tagen ein bräunlicher Niederschlag aus, aber kein blauer Farbstoff. In Probe 2 wurde nach vier Tagen die Ätherschwefelsäure bestimmt. Sie betrug 0,0272 ‰. Es war also nur eine ganz geringe Menge erst zersetzt.

Die Probe 4 ergab bald reichliche Entwicklung von Kokken und Bacillen verschiedener Art und

0,152 Sulfat-, 0,0078 g Ätherschwefelsäure, zusammen 0,159 g in 100 ccm, also starke Zersetzung der letzteren. Die Indigoprobe war negativ.

Die Probe 1 zersetzte sich sehr langsam, nach 14 Tagen war der ursprünglich saure Urin aber stark alkalisch geworden, roch nach Ammoniak, enthielt reichlich Bakterien und gab keine Indigoprobe mehr. Die Schwefelsäurebestimmung ergab:

0,1578 Sulfat-, 0,0064 Ätherschwefelsäure, zusammen 0,1642 SO_4H_2 in
100 ccm.

Es war also auch hier unter Verschwinden der Indoxylreaktion zu Zersetzung der Ätherschwefelsäure gekommen. Daß die Gesamtwerte für Schwefelsäure zunahmen, liegt an der Verdunstung von Wasser, wenn diese auch durch Auffüllen mit Wasser zu verhindern gesucht wurde.

Es zeigte sich also, daß unter der Einwirkung von Bakterien besonders in alkalischem Urin die Indoxylschwefelsäure zersetzt wird.

Herr Prosektor Dr. Emmerich hat mich nun in dankenswerter Weise unterstützt, in dem er die Impfung der Urinproben mit Reinkulturen übernahm.

Um zugleich Indigobildung wie in dem Choleraurin herbeizuführen, wurde reichlich Indoxyl enthaltender Urin mit einem nitritbildenden Bakterium geimpft, da es möglich war, daß das gebildete Nitrit die Oxydation bewirkte. Cholera bacillen bilden ja Nitrit aus Nitraten. Es wurde nun ein von einer Fleischvergiftung herrührender nitritbildender Stamm, den wir Herrn Privatdozent Dr. Bitter verdanken, gewählt. Es trat aber nur ein bräunlicher Niederschlag, kein Indigo auf.

Da nun in Urinen, die von Leuten mit Cystitis und Pyelitis herrührten, Ausscheidung von Indigo beim Stehenlassen oder auch schon in den Harnwegen beobachtet ist, Colibacillen aber die häufigste Ursache derartiger Erkrankungen sind, so stellte ich Versuche mit Colistämmen an.

Der Urin desselben Kranken wurde in sterile Röhrchen gebracht und geimpft:

1. mit dem Colistamm der Prosektur des Krankenhauses,
2. mit einem bei Darmkatarrh aus dem Stuhl gezüchteten,
3. mit einem aus einer entzündeten Gallenblase erhaltenen Colistamm.

Die Röhrchen 1 und 2 zeigten bei ruhigem Stehen im Brutschrank nach 10 Tagen den oberen Teil der Flüssigkeit bräunlich violett verfärbt, den unteren noch gelblich, Röhrchen 3 die ganze Flüssigkeit gelblich.

Filtriert ergab

1 reichlich blauen Rückstand auf dem Filter, der sich mit blauer Farbe in Chloroform löste, im Filtrat nur geringe Indoxylreaktion,

2 weniger blauen Rückstand, im Filtrat auch nur geringe Indoxylreaktion,

3 keinen Indigo im Rückstand, reichliche Indoxylprobe im Filtrat.

Daraus ging hervor, daß Colibacillen die Indoxylschwefelsäure zerlegen und Indigo bilden können, daß dies aber nicht alle Stämme tun, sondern einzelne diese Eigenschaft nicht besitzen.

Es wurde nun der ziemlich konzentrierte Urin eines Mannes mit Magencarcinom, der sehr reichlich Indoxyl enthielt und daher eine tiefblaue Farbe bei der Probe mit Salzsäure und Chlorkalklösung gab, mit dem Colistamm 1 geimpft. Der Urin enthielt frisch:

0,061 g Ätherschwefelsäure in 100 ccm.

Nach 4 tägigem Verweilen im Brutschrank hatte sich nur ein etwas schwärzlicher Niederschlag gebildet. Indoxyl war noch reichlich nachweisbar. Die Bestimmung der Ätherschwefelsäure ergab:

0,075 in 100 ccm.

- Der Urin reagierte noch sauer, er roch nicht zersetzt. Der Rest wurde nun auf die Hälfte mit Wasser verdünnt, mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht und wieder mit demselben Colistamm 1 geimpft. Nach kurzer Zeit zersetzte der Urin sich und bildete einen bräunlichen Niederschlag, aber keinen deutlichen Indigo, im Filtrat war keine Indoxylreaktion mehr vorhanden.

Die Bestimmung der Ätherschwefelsäure ergab nun
0,0201 g in 100 ccm des ursprünglichen Urins.

Es war also nun ein großer Teil der Indoxylschwefelsäure zersetzt. Doch war es nicht zur Oxydation zu Indigo, sondern zu Derivaten desselben, Indirubin usw. gekommen.

Aus diesem Versuch schien hervorzugehen, daß dieser Urin in unverdünntem, saurem Zustand keinen günstigen Nährboden für Bakterien darstellte. Er enthielt auch wohl frisch gelassen keine Bakterien. So konnte an ihm nachgewiesen werden, ob in sterilem Zustande eine Zersetzung etwa unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs stattfinden könnte.

Daher wurde am 29. Dezember 1915 eine größere Menge mit ausgekochtem Katheter in einen sterilen Erlenmeyer-Kolben entleert, dieser mit Wattepfropf versehen, in den Brutschrank gestellt.

Der Urin war rötlich gefärbt, gab sehr starke Indoxylprobe, reagierte sauer.

Er enthält frisch

0,0632 g Ätherschwefelsäure in 100 ccm.

Am 15. Januar 1916 wird eine Probe entnommen. Sie ist klar, nur dunkler gefärbt, gibt noch ebenso starke Indoxylreaktion und enthält

0,0608 g Ätherschwefelsäure in 100 ccm.

Es wird nun ein Teil mit derselben Menge Wasser verdünnt, mit kohlen-saurem Natrium alkalisch gemacht, mit Colistamm 1 geimpft und weiter im Brutschrank stehen gelassen. Am 12. Februar ist die Flüssigkeit trübe, gibt keine Indoxylreaktion und enthält

0,0176 Ätherschwefelsäure in 100 ccm des ursprünglichen Urins.

Es ist also nun eine starke Zersetzung der Indoxylschwefelsäure durch die Colibacillen eingetreten. Der übrige Urin, der öfters durch Ausgießen von Proben ausgiebig mit Luft in Verbindung gebracht ist, bleibt bis zum 15. Februar noch im Brutschrank stehen. Er enthält noch ebenso reichlich Indoxyl, ist klar und erweist sich steril.

Er enthält

0,0688 Ätherschwefelsäure in 100 ccm.

Es ist also eine Spaltung der Indoxylschwefelsäure bei 7wöchentlichem Verweilen im Brutschrank, luftdurchlässigem Watteverschluß, öfterem Umschütteln, beim Ausgießen von Proben nicht eingetreten. Der Urin wird nun noch mit Colibacillen geimpft, doch bleibt er steril, die Bacillen können in ihm sich nicht entwickeln.

Da sich auch im verdünnten alkalisch gemachten Urin dieses Kranken durch Colibacillen nur Zersetzung der Ätherschwefelsäure, aber keine Indigobildung erzielen ließ, wurde noch ein Versuch mit dem Urin des Kranken mit Darmtuberkulose gemacht. Dieser enthielt zwar weniger Indoxyl, war aber weniger konzentriert und zersetzte sich leichter.

Am 25. Januar 1916 enthält dieser Urin

0,0168 Ätherschwefelsäure in 100 ccm.

Ein Teil wird mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, alkalisch gemacht und mit dem Colistamm 1 geimpft, in den Brutschrank gestellt.

Am 4. Februar ist der Urin trübe und gibt beim Filtrieren einen blauen Rückstand, der in Chloroform sich in blauer Farbe auflöst.

Das Filtrat gibt keine Indigoreaktion mehr, färbt sich beim Kochen mit Salzsäure nicht dunkel und gibt dann kaum eine Trübung beim Versetzen mit Chlorbaryum.

Die Ätherschwefelsäurebestimmung ergibt nur einen Rückstand von 0,0003, der der Asche des Filtrierpapiers entspricht. Es ist also die gesamte Ätherschwefelsäure einschließlich der Indoxylschwefelsäure unter Bildung von Indigo durch die Einwirkung der Colibacillen zersetzt worden.

Daß die Colibacillen in konzentrierteren, an Ätherschwefelsäuren reicheren Urinen sich nicht entwickeln, die Urine steril bleiben, liegt wohl daran, daß die aus Glukuronsäureverbindungen sich abspaltenden aromatischen Substanzen dies verhindern. Namentlich kommt da Phenol in Betracht. So ergaben die zu diesen Untersuchungen verwandten Urine auch beim Destillieren mit Salzsäure ein Destillat, welches reichlich Phenol enthielt und demgemäß einen starken Niederschlag mit Bromwasser gab.

Das indoxylschwefelsaure Kalium ist nun, wie Baumann und Brieger¹⁾ angeben, in alkalischer Lösung z. B. Natronlauge sehr widerstandsfähig, zersetzt sich aber leicht in saurer Lösung z. B. nach Zusatz von etwas Salzsäure. Doch tritt beim Eindampfen sauer reagierenden Urins, wie ich mich oft überzeugen konnte, wenn dieser nicht durch Bakterien zersetzt war, keine Zerlegung ein.

Stanford²⁾ hat nun, weil er fand, daß indoxylhaltiger Urin beim Stehen an der Luft oft schon nach einigen Stunden keine Indigoprobe mehr gibt, den Schluß gezogen, daß die indigobildende Substanz nicht Indoxylschwefelsäure sein könnte, zumal er sie aus Menschenurin nicht isolieren konnte. Auch die Existenz der Indoxylglukuronsäure erkennt er nicht an. Er glaubt nicht an bakterielle Zersetzung, da manchmal trotz Anwesenheit von Bakterien im Urin die Indigoreaktion erhalten blieb, sie andererseits im angeblich sterilen Urin rasch verschwand. Er meint also, «daß die indigoliefernden Substanzen nicht immer dieselben sind, sondern ein Gemisch von nahe verwandten Verbindungen der Indigogruppe darstellen». Hätte Stanford in einem einzigen Urin die Ätherschwefelsäure vor und nach dem Verschwinden der Indigoreaktion bestimmt, so wäre er nicht zu dieser irrtümlichen Anschauung gekommen. Er hätte ferner bei genauem Studium der Literatur das Vorkommen von Indoxylglukuronsäure im Urin nicht bestreiten können. Wie ich in meiner ersten Mitteilung³⁾ gezeigt habe,

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 3, S. 254.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 87, S. 188, 1913.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 97, S. 171.

kann man indoxylschwefelsaures Kalium nach meiner Methode aus menschlichem Urin darstellen und die oben geschilderten Versuche zeigen, daß das Verschwinden der Indigoreaktion auf Zerlegung der Indoxylschwefelsäure durch Bakterien beruht. Da Stanford Urin von allerhand Geisteskranken zu seinen Versuchen benutzt hat, so ist noch zu berücksichtigen, daß bei diesen häufig Cystitis infolge Eindringens von Bakterien, besonders Colibacillen in die Harnwege besteht, und daher der Urin schon mit Bakterien durchsetzt gelassen wird, also sehr rasch sich zersetzen kann. Da Geisteskranke vielfach mit Medikamenten behandelt werden, so ist es nicht ausgeschlossen, daß diese zum Teil in den Urin übergegangen waren und besonders bei dem Versuch der Isolierung der Indoxylverbindungen störend wirkten, namentlich da ein Gemisch von allen möglichen Urinen von verschiedenem Indoxylgehalt in großen Quantitäten verarbeitet wurde. Stanfords Schlüsse sind also als unbegründet zurückzuweisen.

Die von mir ausgeführten Versuche geben endlich auch Aufschluß über das Wesen der sogenannten Indigurie, wobei ein oft bläulich oder grünlich gefärbter Urin entleert wird, der ein Sediment von Indigo absetzt. Gewöhnlich erfolgt diese Indigoausscheidung erst bei der nachträglichen Zersetzung des Urins, wenn er einige Zeit im Glase stehen bleibt. Auch indigohaltige Konkreme haben sich bei Zersetzung von indoxylreichem Urin in den Harnwegen gebildet.

Schon früh erwähnt wird von O. Wyss¹⁾ u. a. die Blaufärbung des Choleraurins beim Stehen infolge Indigobildung.

Ord²⁾ beschreibt einen hauptsächlich aus Indigo und phosphorsaurem Kalk bestehenden Stein, der aus dem Nierenbecken einer Frau stammte, bei der die andere Niere durch Sarkom zerstört war.

Auch Chiari³⁾ schildert indigohaltige Konkreme, die in Nierenkelchen sich fanden und nach Hofmeister einen Phosphatstein als Kern, darum herum eine Schicht von eiweiß-

¹⁾ Archiv d. Heilkunde, Bd. 9, S. 236, 1868.

²⁾ Berl. klin. Wochenschr., 1878, Nr. 25.

³⁾ Prager med. Wochenschr., 1888, Nr. 50.

artiger Grundsubstanz mit phosphorsauren Erden und feinen Nadeln und Körnern von dunkelblauer und roter Farbe, die Indigoblau und «Urorubin» enthielten, zeigten. Kahler¹⁾ schildert bei einer 76jährigen Frau intermittierende Ausscheidung von Indigoblau im Urin, der dann infolge Zersetzung des Harnstoffs alkalisch reagierte. Bogdanow-Beresowsky²⁾ fand bei einem Fall mit eiternder Fistel am Kreuzbein in dem zeitweise dunkel kirschfarbenen trüben Urin Indigokrystalle. Der Urin gab die Jaffésche Probe dann nicht; sie war aber reichlich vorhanden, wenn der Urin normal gefärbt war. Wolf³⁾ beschreibt starke Indigurie bei Ileus und Perforationsperitonitis. Wang⁴⁾ beobachtete bei einem 7¹/₂jährigen Mädchen mit sehr starkem Indoxylgehalt des Urins bräunlich violette Farbe desselben und beim Filtrieren blauen Rückstand, der in Chloroform gelöst Indigokrystalle ausschied. Bei der Sektion fanden sich violette Konglomerate in Rundzelleninfiltraten der linken Niere. Reale⁵⁾ beschreibt Indigurie (Glaukurie) bei einem Mädchen und führt sie auf Zersetzung von Indoxylglukuronsäure zurück. Auch Traumann⁶⁾ und Sommerfeld⁷⁾ veröffentlichen Fälle von Indigurie bei Kindern.

Wenn man die aus der Literatur bekannten Fälle und meine Versuche zusammenhält, so kommt man zu dem Resultat, daß die Ausscheidung von Indigo als Sediment im Urin und die grüne oder blaue Farbe desselben zurückzuführen sind auf bakterielle Zersetzung eines stark indoxylhaltigen Urins, und zwar wird diese Zersetzung herbeigeführt besonders durch gewisse Colibacillen. Da Colibacillen durch die Blutbahn besonders bei Darmstörungen leicht in die Nieren und Harnwege gelangen können, so wird beim Stehen der Urin sich rasch zersetzen, und es werden dabei auch die Indoxylverbindungen

¹⁾ Ebenda.

²⁾ Petersb. med. Wochenschr., 1897, Beil. S. 50.

³⁾ Diss. Berlin 1887.

⁴⁾ Salkowski-Festschrift, S. 397.

⁵⁾ La nuova rivista clinico-therapeutica, Bd. 5, S. 121, 1902.

⁶⁾ Deutsche med. Wochenschr., Bd. 36, S. 796, 1910.

⁷⁾ Münchn. med. Wochenschr., Bd. 58, S. 2793, 1911.

zerlegt, das Indoxyl an der Luft aber zu Indigo oxydiert werden. Daß der Sauerstoff dabei mitwirkt, zeigt das Auftreten der Verfärbung zuerst in den oberen Teilen der Flüssigkeit. Bei Retention des Colibacillen haltenden Urins im Nierenbecken kann es dann schon dort zu Indigoausscheidung und Konkrementbildung kommen.

Ist der Urin stärker konzentriert, so wird die Zersetzung nicht so leicht eintreten, da dann die Colibacillen sich nicht gut entwickeln können. Nicht alle Colibacillen haben diese Eigenschaft. Andere Bakterien können vielleicht ebenso wirken, doch sind die Colibacillen wohl am häufigsten im Urin vorhanden.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes:

1. Indoxylhaltiger Urin wird durch Bakterien, hauptsächlich manche Colibacillen, in der Weise verändert, daß die Indoxylschwefelsäure gespalten wird und nun aus dem abgespaltenen Indoxyl sich Indigo oder mehr bräunliche Farbstoffe bilden.

2. Die Bestimmung der Ätherschwefelsäure ergibt dabei demgemäß eine entsprechende Verringerung, die bis zu ihrem vollkommenen Verschwinden sich steigern kann. Zugleich wird wohl auch die Indoxylglukuronsäure gespalten.

3. Abnahme der Ätherschwefelsäure unter zugleich erfolgender Indigoausscheidung spricht dafür, daß die indigobildenden Substanzen (Harnindikan) hauptsächlich aus indoxylschwefelsaurem Kalium bestehen.

4. Bei der Bildung von Indigo wirkt die Anwesenheit von Luftsauerstoff (oder anderen oxydierenden Substanzen) mit.

5. Konzentrierte an aromatischen Verbindungen (Ätherschwefelsäure und Glukuronsäure) reiche Urine bleiben oft auch beim Stehen an der Luft steril und zersetzen sich nicht, Colibacillen, die dann zugesetzt werden, entwickeln sich nicht, sondern gehen zugrunde.

6. Bei der Bestimmung der Menge der Ätherschwefelsäure und des Indoxyls muß bakterielle Zersetzung des Urin vermieden, der Urin also möglichst frisch untersucht oder, wenn dies nicht möglich ist, steril aufbewahrt werden.
