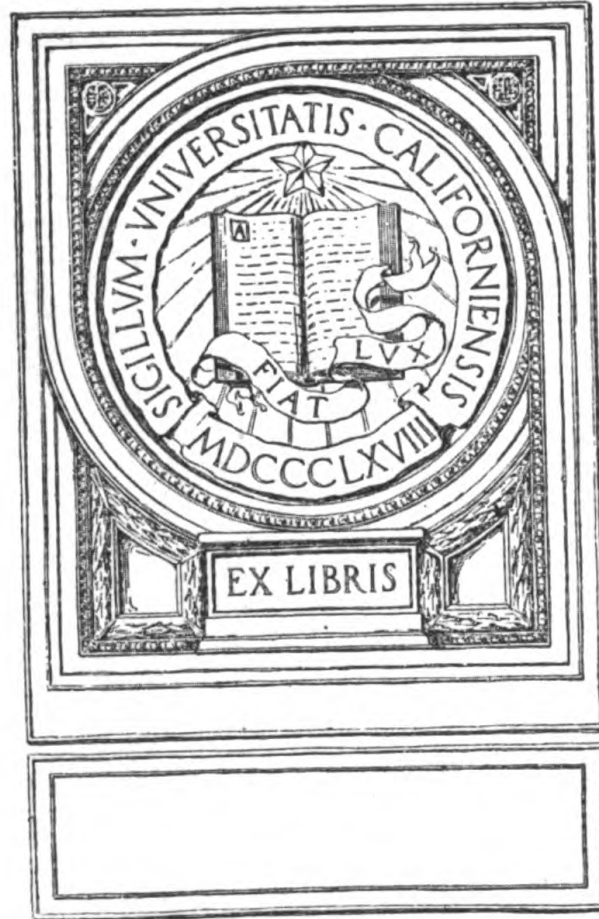


UC-NRLF



B 3 208 392

MEDICAL SCHOOL
LIBRARY



[Handwritten signature]

Zeitschrift
für
Immunitätsforschung
und experimentelle Therapie
I. Teil: Originale

unter Mitwirkung von

H. Apolant, Frankfurt a. M., **M. Ascoli**, Catania, **V. Babes**, Bukarest, **O. Ball**, Prag,
E. F. Bashford, London, **E. v. Behring**, Marburg, **S. Belfanti**, Mailand, **A. Besredka**,
Paris, **J. Bordet**, Brüssel, **A. Breinl**, Liverpool, **L. Brieger**, Berlin, **A. Calmette**, Lille,
A. Diendoné, München, **R. Doerr**, Wien, **M. Dorset**, Washington, **E. v. Dungern**,
Heidelberg, **P. Ehrlich**, Frankfurt a. M., **S. Flexner**, New York, **U. Friedemann**,
Berlin, **P. Frosch**, Berlin, **G. Gaffky**, Berlin, **M. von Gruber**, München, **M. Hahn**,
Freiburg i. B., **A. Heffter**, Berlin, **L. Hektoen**, Chicago, **M. Jacoby**, Berlin, **C. O.**
Jensen, Kopenhagen, **S. Kitasato**, Tokio, **W. Kolle**, Bern, **W. Kruse**, Bonn, **K. Land-**
steiner, Wien, **C. Levaditi**, Paris, **L. von Liebermann**, Budapest, **F. Loeffler**, Greifs-
wald, **Th. Madsen**, Kopenhagen, **C. J. Martin**, London, **E. Metschnikoff**, Paris, **L.**
Michaëlis, Berlin, **R. Muir**, Glasgow, **C. Moreschi**, Pavia, **P. Th. Müller**, Graz,
M. Neisser, Frankfurt a. M., **F. Neufeld**, Berlin, **F. Nuttall**, Cambridge, **R. Oster-**
tag, Berlin, **R. Paltauf**, Wien, **A. Pettersson**, Stockholm, **R. Pfeiffer**, Breslau, **E. P.**
Plek, Wien, **P. Römer**, Marburg, **C. J. Salomonsen**, Kopenhagen, **A. Schattensfroh**,
Wien, **Cl. Schilling**, Berlin, **Th. Smith**, Boston, **G. Sobernheim**, Berlin, **V. C. Vaughan**,
Ann Arbor, **A. v. Wassermann**, Berlin, **W. Welehardt**, Erlangen, **A. Wladimiroff**,
St. Petersburg, **A. E. Wright**, London, **D. Zabolotny**, St. Petersburg

herausgegeben von

E. FRIEDBERGER **R. KRAUS** **H. SACHS** **P. UHLENHUTH**
(Berlin.) (Buenos Aires.) (Frankfurt a. M.) (Straßburg i. E.)

Neunzehnter Band.

Mit 1 Figur und 30 Kurven im Text.



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1913

Alle Rechte vorbehalten.

AD 70 V1111
500 .A000M

Inhaltsverzeichnis.

Heft 1. (Ausgegeben am 5. August 1913.)

	Seite
Abelin, S., und Stiner, O., Die Einwirkung des ultravioletten Lichtes auf das Komplement des Meerschweinchenserums. [Aus dem Universitäts-Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle)]	1
Rosenthal, Eugen, und Bamberger, Ladislaus, Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Platinkatalyse durch Bakterienfiltrate. [Aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung des St.-Rochus-Spitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest (Oberarzt: Prof. Stephan von Tóth).] Mit 6 Kurven im Text	9
Tsurumi, M., Ueber die Präzipitation und Komplementbindung mit Cuorin bei Lepra und die Beziehungen von Cuorin und Lecithin zu Lepraseren bei den Reaktionen. [Aus dem Kaiserl. Japan. Institut für Infektionskrankheiten zu Tokio (Direktor: Prof. Dr. Kitasato)]	19
Dold, H., und Hanau, A., Ueber die Beziehung des Anaphylatoxins zu den Endotoxinen. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	31
Horowitz, L., Zur Frage über Cholera-Toxine und -Antitoxine. [Aus der bakteriologischen Abteilung des städtischen Untersuchungsamtes in St. Petersburg (Leiter: Dr. Jakowlew) und aus dem hygienischen Laboratorium des weiblichen medizinischen Instituts (Vorstand: Prof. Chlopin)]	44
Kolle, W., Hartoch, O., Rothermundt, M., und Schürmann, W., Chemotherapeutische Experimentalstudien bei Trypanosomeninfektionen. [Aus dem Universitäts-Institut für Hygiene und Bakteriologie in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle)]	66
de Aric, Marcel-V. Le Fèvre, De l'action de l'argent colloïdal sur la phagocytose. [Travail du Laboratoire de thérapeutique de l'Université de Bruxelles.] Avec 6 tracés dans le texte	98

Heft 2. (Ausgegeben am 30. August 1913.)

	Seite
Schlossberger, H. , Beiträge zur Serodiagnose der Syphilis mittels der Wassermannschen Reaktion. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)]	115
Rhein, M. , Ueber die biologische Differenzierung normaler Tierharn mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität Straßburg (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. P. Uhlenhuth)]	143
Tugendreich, J. , und Russo, C. , Ueber die Wirkung von Chinaalkaloiden auf Pneumokokkenkulturen. [Aus der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin] .	156
Gózony, Ludwig , Ueber serologische Unterschiede zwischen mütterlichem und fötalem Serum. [Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Budapest (Direktor: Prof. Dr. H. Preisz)] . .	172
Meyer, Kurt , Ueber das Verhalten des Serumantitrypsins bei der Anaphylaxie. [Aus dem Serobakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin]	179
Bail, Oskar , und Margulies, Alexander , Untersuchungen über die Absorption von Schafbluthämolytinen durch Meerschweinchenorgane. [Aus dem Hygienischen Institute der Deutschen Universität Prag]	185
Fukuhara, Y. , und Ando, J. , Ueber Bakteriengifte, insbesondere die Bakterienleibesgifte. II. Mitteilung. Immunisierender Effekt der verschiedenen Giftpräparate. [Aus dem Pathologisch-bakteriologischen Institut in der Mediz. Akademie zu Osaka, Japan; Direktor: Prof. A. Sata (Abteilung für Bakteriologie, Leiter: Prof. Dr. Y. Fukuhara)]	207
Nathan, Ernst , Ueber die Wirkung kolloidaler Kieselsäure auf die roten Blutkörperchen. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)]	216

Heft 3. (Ausgegeben am 18. September 1913.)

Sachs, H. , und Nathan, E. , Immunisierungsversuche mit gekochtem Hammelblut nebst Bemerkungen über Antiserumanaphylaxie. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)] . .	235
Doerr, R. , und Pick, R. , Die primäre Toxizität der Antisera. 2. Mitteilung. [Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militärsanitätskomitees in Wien]	251

	Seite
Signorelli, Ernesto , Ueber den Einfluß des Phenols auf die Wassermannsche Syphilisreaktion. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)]	293
Levy, E., und Dold, H. , Ueber Immunisierung mit desanaphylatoxierten Bakterien. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg und der bakteriologischen Anstalt für Elsaß]	306
Meyer, Kurt , Ueber Lipoidpräzipitine. Ueber antigene Eigenschaften von Lipoiden. VII. Mitteilung. [Aus dem Serobakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin]	313
Zunz, Edgard , Recherches sur l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps par l'acide silicique. [Travail de l'Institut de thérapeutique de l'Université de Bruxelles]	326
Aoki, K. , Ueber die Komplementbindungsreaktion und die hämolysenhemmende Wirkung des Serums bei Bacillenträgerkaninchen. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	354
Loewe, S. , Kurze Bemerkungen über die Adsorption von Tetanustoxin, anschließend an die Arbeit von E. Wolff: „Ueber das Verhalten der Leukocyten in toxin- und toxin-antitoxinhaltigen Lösungen“	362

Heft 4. (Ausgegeben am 18. Oktober 1913.)

Gutmann, L. H. , Ueber die Blutveränderungen bei der Vergiftung mit Organextrakten. [Aus dem Institut für experimentelle Medizin zu St. Petersburg (Abt. A. A. Wladimiroff)]	367
Schmidt, P., und Liebers, M. , Zur Schüttelinaktivierung des hämolytischen Komplements. [Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig (Vorstand: Geh. Rat Prof. Dr. Franz Hofmann)]	373
Bessemans, A. , Contribution à l'étude de diverses alexines. [Institut de Bactériologie de Louvain (Directeur: Prof. J. Denys). Laboratoire du Prof. R. Bruynoghe]	380
Friedberger, E., Gröber, A., Galambos, Arnold, Kumagai, T., Tasawa, H., und Simmel, Hans , Weitere Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit des anaphylaktischen Prozesses. (Ueber Anaphylaxie. XLIII.—XLVII. Mitteilung.) [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger).] — Einleitung. — I. Der Einfluß der Trepanation und der Vagusdurchschneidung auf die Anaphylaxie bei präparierten Meer-	

VI

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
schweinchen. Von E. Friedberger und A. Gröber. — II. Ueber die therapeutische Beeinflussung der Anaphylaxie durch Atropin und Adrenalin sowie über weitere Versuche über den Einfluß der Vagusdurchschneidung. Von Arnold Galambos. — III. Ueber den Einfluß der Körpertemperatur präparierter Meerschweinchen auf die Ueberempfindlichkeit bei der Reinjektion. Von E. Friedberger und T. Kumagai. — IV. Ueber den Einfluß des Volums der Reinjektionsflüssigkeit auf den anaphylaktischen Shock. Von H. Tasawa. — V. Ueber Anaphylaxie bei neugeborenen Meerschweinchen. Von E. Friedberger und Hans Simmel . .	427
Wolff, Ernst , Antwort auf die „Kurzen Bemerkungen über die Adsorption von Tetanustoxin“	467
Pfeiffer, Hermann , Ueber das Verhalten des „Serumantitrypsins“ bei der Anaphylaxie und Hämolysingiftung. Bemerkungen zu der Arbeit K. Meyers in Band 19, Heft 2 dieser Zeitschrift . .	470
Rosenthal, Eugen , Ueber die sogenannte antitryptische Wirkung des Blutserums. Erwiderung auf K. Meyers Aufsatz, diese Zeitschrift, Bd. 19, Heft 2	477
Meyer, Kurt , Ueber das Serumantitrypsin und sein Verhalten bei der Anaphylaxie. Entgegnung auf die Bemerkungen von H. Pfeiffer und E. Rosenthal	485
Moreschi, C., und Vallardi, C. , Ueber die Teilnahme der Normalambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung in vitro. Bemerkungen zu der Arbeit von E. Friedberger in Bd. 18, Heft 3 dieser Zeitschrift	493
Friedberger, E., und Cederberg, O. A. , Erwiderung zu vorstehenden Bemerkungen von C. Moreschi und C. Vallardi	497
Heft 5. (Ausgegeben am 1. November 1913.)	
Leredde et Rubinstein , Réaction de fixation du complément et pouvoir hémolytique des sérums humains. Procédé de Wassermann et procédé de Hecht-Weinberg. [Laboratoire de l'Établissement Dermatologie de Paris.] Avec 3 courbes dans le texte	499
Tsurumi, M., und Kohda, K. , Ueber die Bildungsstätte des komplementbindenden Antikörpers. [Aus dem Kaiserl. Japan. Institut für Infektionskrankheiten zu Tokio (Direktor: Prof. Dr. S. Kitasato).] Mit 1 Kurve im Text	519
Weichardt, W., und Schwenk, E. , Weitere Versuche über die Entgiftung von Eiweißspaltprodukten von Kenotoxincharakter. [Aus dem Chemischen Laboratorium der Kgl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen.] Mit 1 Figur und 7 Kurven im Text	528
Wulff, Ove , Phagocytosestudien. [Aus Statens Seruminstitut, Kopenhagen Direktor: Dr. Th. Madsen]]	549

	Seite
Rados, Andreas , Ueber das Auftreten von komplementbindenden Antikörpern nach Vorbehandlung mit arteigenen Gewebezellen, nebst Bemerkungen über die anaphylaktische Entstehung der sympathischen Ophthalmie. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	579
Wells, Gideon H. , Nucleo-Proteins as Antigens. [From the Pathological Laboratory of the University of Chicago]	599
Pfeiffer, Hermann , Zur Toxizität heterologer Normalsera. Ergänzung zu der in Bd. 19, Heft 3 dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit von R. Doerr und R. Pick	611
Doerr, R., und Pick, R. , Zur Toxizität heterologer Normalsera. Erwiderung auf die vorstehende Notiz von H. Pfeiffer	612
Moreschi, C., und Vallardi, C. , Erwiderung zu den Bemerkungen von Friedberger und Cederberg. Diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, Heft 4	614
Heft 6. (Ausgegeben am 12. November 1913.)	
Leschly, W., und Boas, Harald , Untersuchungen über eine Modifikation der Herman-Perutzschen Reaktion (Ellermann: Methode 14). [Aus Statens Seruminstitut (Direktor: Dr. med. Th. Madsen) und Rudolph Berghs Hospital (Oberarzt: Prof. Dr. med. E. Pontoppidan)]	615
Moreschi, C., und Golgi, A. , Ueber die Beziehungen zwischen Anaphylaxie und Fieber	623
Ganslmayer, Hans , Ueber Rotlaufimmunität. II. Mitteilung. Die künstliche Erzeugung des Schweinerotlaufs. [Aus der Impfstoffgewinnungsanstalt des k. k. Ackerbauministeriums Wien-Mödling.] Mit 7 Kurven im Text	637
Thiele, F. H., and Embleton, Dennis , Pathogenicity and Virulence of Bacteria. [From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital, Medical School, London (Dr. F. H. Thiele)].	643
Thiele, F. H., and Embleton, Dennis , Bacterial "Endotoxin". [From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital, Medical School, London (Dr. F. H. Thiele)].	666
Distaso, A. , Versuche, die menschliche Darmflora durch Zufuhr fremder Mikroben umzuwandeln. I. Ueber das Schicksal der per os eingeführten Bakterien. [Royal Institute of Public Health, London]	687
Rossi, O. , Einige Bemerkungen über die Arbeit von O. Stiner: „Ueber die Modifikationen der Wassermannschen Reaktion nach Mintz und Rossi“. (Diese Zeitschrift, Bd. 18, Heft 4, p. 378)	696

Autorenverzeichnis.

- Abelin und Stiner 1.
de Aric, Marcel-V. Le Fèvre 98.
Aoki, K. 354.
Bail und Margulies 185.
Bessemans, A. 380.
Distaso, A. 687.
Doerr, R., und Pick, R. 251, 612.
Dold und Hanau 31.
Friedberger und Cederberg 497.
Friedberger und Gröber 429.
Friedberger und Kumagai 445.
Friedberger und Simmel 460.
Fukuhara und Ando 207.
Galambos, A. 437.
Ganslmayer, H. 637.
Gózony, L. 172.
Gutmann, L. H. 367.
Horowitz, L. 44.
Kolle, Hartoch, Rothermundt und Schürmann 66.
Leredde und Rubinstein 499.
Levy, E., und Dold, H. 300.
Leschly, W., und Boas, H. 615.
Loewe, S. 362.
Meyer, K. 179, 313, 485.
Moreschi und Golgi 623.
Moreschi und Vallardi 493, 614.
Nathan, E. 216.
Pfeiffer, H. 470, 611.
Rados, A. 579.
Rhein, M. 143.
Rosenthal, E. 477.
Rosenthal, E., und Bamberger, L. 9.
Rossi, O. 696.
Sachs, H., und Nathan, E. 235.
Schlossberger, H. 115.
Schmidt, P., und Liebers, M. 373.
Signorelli, E. 293.
Tasawa, H. 458.
Thiele, F. H., und Embleton, D. 643, 666.
Tsurumi, M. 19.
Tsurumi und Kohda 519.
Tugendreich und Russa 156.
Weichardt, W., und Schwenk, E. 528.
Wells, Gideon H. 599.
Wolff, Ernst 467.
Wulff, Ove 549.
Zunz, E. 326.
-

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XIX. No. 1

Nachdruck verboten.

[Aus dem Universitäts-Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle).]

Die Einwirkung des ultravioletten Lichtes auf das Komplement des Meerschweinchenserums.

Von Dr. **S. Abelin** und Dr. **O. Stiner**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. Mai 1913.)

Die ultravioletten Strahlen sind zuerst aufgefallen durch die chemischen Wirkungen, welche sie auszuüben imstande sind. So z. B. werden die Metallsalze von ihnen reduziert. Auf dieser Reduktion beruhen die photographischen Prozesse; denn im wesentlichen sind es die kurzwelligen Strahlen, welche die photographische Wirkung hervorbringen.

Unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes finden molekulare Umlagerungen statt. So z. B. wird der giftige gelbe Phosphor in den ungiftigen roten umgewandelt; bei Gegenwart verschiedener organischer Substanzen entsteht aus Sauerstoff Ozon. Das Chlorophyll der grünen Pflanzen zerlegt unter dem Einflusse dieses Lichtes die Kohlensäure usw.

Ferner ist auch seit langem bekannt, daß die ultravioletten Strahlen des Sonnenlichts imstande sind, eine energische Wirkung auf die tierische und pflanzliche Zelle auszuüben.

Um die interessanten Eigenschaften der ultravioletten Strahlen näher zu studieren, konnte man sich mit dem Sonnenlicht nicht begnügen, da das ultraviolette Licht der Sonne durch die Absorption, die es von der Atmosphäre zum größten Teil erleidet, für experimentelle Zwecke viel zu schwach ist. Man mußte deshalb nach stärkeren und konstanten Quellen dieses Lichtes suchen. Eine solche Quelle wurde in der Quecksilberdampf Lampe gefunden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß das Licht des Quecksilberdampfes sehr reich an ultravioletten Strahlen ist. Da aber diese Strahlen von Glas fast gänzlich zurückgehalten werden, stellt man jetzt solche Lampen aus

Quarz her, welcher für ultraviolettes Licht durchlässig ist. Auf diese Weise ist die sogenannte Quecksilberdampfquarzlampe entstanden, welche die beste bis jetzt gefundene Quelle des ultravioletten Lichtes darstellt. Die verschiedenen Systeme der Quecksilberdampfquarzlampen sind aus der einschlägigen Literatur bekannt. — Unsere Versuche wurden mit einem „Unterwasserbrenner“-System Nogier-Triquet M 5, ausgeführt, wie sie von der Société Lacarrière in Boulogne s/Seine hergestellt werden. — Mit Hilfe dieser Lampen konnte man die chemischen und biologischen Eigenschaften der ultravioletten Strahlen eingehend studieren. Im allgemeinen wirken sie zerstörend ein. Sie vermögen die meisten organischen Körper zu zerlegen, wie Zuckerarten, Alkohole, Ketone u. a.

Von praktischer Bedeutung ist die von den Strahlen entfaltete außerordentliche bakterizide Kraft¹⁾. In sehr kurzer Zeit werden die meisten Bakterienarten durch das ultraviolette Licht abgetötet.

Die Wirkung der ultravioletten Strahlen erstreckt sich nicht nur auf die lebende Zelle, sondern auch auf die Produkte derselben. So z. B. konnte Hertel²⁾ die Zerstörung der von Zellen gelieferten Fermente und die Abschwächung des Diphtherietoxins, Baroni und Jonesco Mihaiesti³⁾ sogar die vollständige Zerstörung dieses Toxins unter Einwirkung von ultraviolettem Licht feststellen.

Die beiden letzten Autoren haben ferner nachgewiesen, daß verschiedene Sera, sei es von normalen oder vorbehandelten Tieren, nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ihre spezifischen Eigenschaften einbüßen. Das Choleraserum verliert seine bakteriolytische und agglutinierende Kraft auf die Cholerabacillen. Desgleichen das Typhuserum. Das Antidiphtherieserum verliert seine Schutzkraft gegen das Toxin.

Wie Cernovodeanu und Henri⁴⁾ nachgewiesen haben, kann man auch mit Hilfe der ultravioletten Strahlen das Tetanustoxin abschwächen und das Kochsche Tuberkulin soweit schädigen, daß es nicht mehr imstande ist, bei tuberkulösen Meerschweinchen irgendwelche Reaktion hervorzurufen.

1) Th. Nogier et Thévenot, Congrès pour l'avancement des sciences, Clermont 1908.

2) Hertel, Zeitschr. f. allg. Physiol., Bd. 4, 1904; Bd. 5, 1905.

3) V. Baroni et Jonesco Mihaiesti, C. R. Soc. Biol., T. 68, 1910; T. 69, 1910.

4) Cernovodeanu et Henri, C. R. Ac. Sc., T. 149, 1909, et T. 150, 1910.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Flüssigkeiten spielt ein Faktor die wichtigste Rolle, nämlich die Durchlässigkeit der bestrahlten Flüssigkeiten für das ultraviolette Licht. Diese Eigenschaft besitzen alle sogenannten kolloidalen Lösungen nicht. Sie absorbieren das ultraviolette Licht fast vollständig. Wenn man daher auf solche Lösungen ultraviolettes Licht einwirken lassen will, muß man sie in möglichst dünnen Schichten, oder noch besser in verdünnter Form zur Anwendung bringen (weil man dadurch die Menge der suspendierten Teilchen vermindert), dabei die Dauer der Bestrahlung verlängern. Je verdünnter die betreffende Lösung ist, um so schneller geht die Einwirkung des Lichtes vor sich. Sehr deutlich konnten wir diese Tatsachen bei unseren Versuchen mit Meerschweinchenserum konstatieren.

Es schien uns nämlich von besonderem Interesse, die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf einen so labilen Körper, wie das Komplement, festzustellen, dessen Natur, trotz zahlreichen Untersuchungen, noch vollständig unklar ist. Es ist bekannt, daß das Komplement beim Erhitzen des Serums auf 56° schon in $\frac{1}{2}$ Stunde unwirksam wird. Bei 37° im Brutschrank wird es in einigen Stunden zerstört; noch rascher, wenn das Serum bei dieser Temperatur geschüttelt wird. Bei Zimmertemperatur geht es in ca. 48 Stunden zugrunde.

Zu unseren Komplementversuchen haben wir das Meerschweinchenserum aus dem Grunde gewählt, weil es bekanntlich in reichlicher Menge die zur Hämolyse und Bakteriolyse notwendigen Stoffe konstant aufweist, wie sonst kein anderes normales Tiereserum.

Zuerst wurden die Versuche auf folgende Weise angestellt: das Blut wurde durch Entbluten der Tiere (aus der Carotis) erhalten, zentrifugiert, darauf das Serum abgehoben. Aus dem Serum wurden 2- und 2,5-proz. Lösungen (in physiologischer Kochsalzlösung) hergestellt. Mit solcher Serumlösung wurde der ganze Kasten, in dem sich die Lampe befindet, gefüllt, so daß die Lampe vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht war. Die Dauer der Bestrahlung erstreckte sich von 5 Sekunden an bis zu einer Stunde. Nach den entsprechenden Zeiten der Bestrahlung: 5 Sekunden, 15 Sekunden, 1 Minute usw. wurde eine kleine Quantität der Serumlösung entnommen und untersucht, d. h. mit Hammelblutkörperchen und dem darauf eingestellten hämolytischen Kaninchenserum austitriert. Das Gestell mit den Röhrchen kam in den Brutschrank (37° C) und das Resultat wurde nach einer halben Stunde und einer Stunde abgelesen.

Dabei wurde immer ein Teil derselben Serumlösung unbestrahlt gelassen und als Kontrolle gleichzeitig mit der bestrahlten ausgetitriert. Die Resultate dieser Versuche sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Tabelle I.

2,5-proz. Serumlösung	Dauer der Bestrahlung	Dosen des titrierten Serums ¹⁾																																																																																																																			
		0,1	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,007	0,006		0,005																																																																																																								
Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1/2 Std. bei 37° C																																																																																																								
Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	30 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	60 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1 Stunde bei 37° C	Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	30 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	60 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1 Stunde bei 37° C																																																																																																								
Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	30 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	60 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									

Tabelle II.

2-proz. Serumlösung	Dauer der Bestrahlung	Dosen des titrierten Serums																																																																																																																			
		0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,007		0,006	0,005																																																																																																							
Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1/2 Std. bei 37° C																																																																																																								
Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	30 "	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	60 "	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1 Stunde bei 37° C	Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	30 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	"	60 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
Unbestrahlt	—	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	} Resultate nach 1 Stunde bei 37° C																																																																																																								
Bestrahlt	5 Sek.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	1 Min.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	5 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	15 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	30 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									
"	60 "	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+																																																																																																									

Zeichenerklärung: 0 = komplette, 0 = inkomplette Hämolyse, + = deutliche komplette, ++ = starke komplette Hemmung.

1) Diese Dosen bedeuten die Quantitäten des unverdünnten Serums, die in jedem Reagenzglas enthalten sind.

Aus diesen Versuchen geht folgendes hervor: Trotzdem das bestrahlte Meerschweinchenserum in bedeutender Verdünnung verwendet worden ist (2 Proz.) und trotzdem die Dauer der Bestrahlung eine ziemlich lange war (bis zu 1 Stunde), ließ sich keine völlige Zerstörung des Komplementes bei Benutzung des den Strahlen ausgesetzten Serums nachweisen. Es ließ sich höchstens eine Verlangsamung, nicht aber eine vollständige Aufhebung der Hämolyse feststellen.

Die Verzögerung der Hämolyse ist um so deutlicher, je länger das Serum bestrahlt wird.

Um einwandfrei zu beweisen, daß das Komplement wirklich nicht geschädigt war, wurde es zur Wassermannschen Reaktion mit einigen Normalseren verwendet, die negativ ausfiel.

Es wird also unter diesen Bedingungen das Komplement nicht zerstört. Die weiteren Versuche haben wir in ganz anderer Weise angestellt. Die zu untersuchenden Komplementlösungen wurden in kleine, speziell dafür verfertigte Quarzgläschen eingefüllt. Die Dicke der Flüssigkeitsschicht in den Gläschen ist = 5,5 mm. Diese Gläschen wurden in einer Entfernung von 4 cm von der Lampe befestigt, der ganze Kasten mit Wasser gefüllt und die Bestrahlung dann vorgenommen. Die Dauer der Bestrahlung erstreckte sich bis zu $\frac{1}{2}$ Stunde.

Während der ganzen Bestrahlungszeit wurde frisches Wasser durch den Apparat geleitet, das, zwischen der Lichtquelle und den die Serumverdünnung enthaltenden Gläschen durchfließend, eine Temperaturerhöhung verhinderte. Auf diese Weise konnte die Bestrahlung bei einer Temperatur von ca. 10° C (Temperatur des strömenden Leitungswassers) vor sich gehen. Eine Schädigung des Komplementes durch Wärmewirkung war auf diese Weise ausgeschlossen. Das so bestrahlte Serum wurde dann, wie vorher angegeben, aus titriert. Die Resultate sind aus Tabelle III (siehe p. 6) ersichtlich.

Die Resultate unserer Untersuchungen ergeben also folgendes: Trotz der geringen Dicke der bestrahlten Schicht wird das Komplement im konzentrierten Serum bei $\frac{1}{2}$ -stündiger

Tabelle III.

Prozentgeh. d. Serum verd.		Nach 1 Stunde bei 37° C										Agarplatten	
		Dosen des titrierten Serums											
		0,3	0,25	0,2	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02		0,01
2	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	steril
5	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	steril
10	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	steril
20	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	steril
25	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	steril
30	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	L	L	L	+	+	##	##	##	##	##	##	steril
35	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	0	0	0	L	L	+	+	##	##	##	##	23 Kolonien
40	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	0	0	0	0	L	L	+	##	##	##	##	8 Kolonien
50	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	0	0	0	0	0	0	L	L	+	+	##	14 Kolonien
100	Unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	überdeckt durch Coli
	Bestrahlt 1/2 Std.	0	0	0	0	0	0	0	L	+	##	##	viel weniger Kolonien

Bestrahlung nicht vollständig zerstört, sondern nur in geringem Grade abgeschwächt. Dagegen wird das Komplement schon in einer 40-proz. Lösung nach einer 1/2-stündigen Bestrahlung bedeutend geschädigt, in einer 25-proz. Lösung sogar vollständig zerstört.

Es war anzunehmen, daß bei hohen Konzentrationen des Serums die Vernichtung der Wirksamkeit des Komplements nicht erfolgte, weil die Flüssigkeit für das ultraviolette Licht undurchlässig war. Um die Durchlässigkeit der Serumverdünnungen zu kontrollieren, wurden ihnen bei einem Teil der Versuche Colibacillen (24-stündige Kultur) zugesetzt, von denen festgestellt ist, daß sie in klaren Flüssigkeiten durch die ultravioletten Strahlen rasch abgetötet werden. Wir konnten bei dieser Versuchsanordnung beobachten, daß die Zerstörung des Komplements der Abtötung der Bakterien stets parallel ging (s. Tabelle III).

Die aus den bestrahlten sowie unbestrahlten Kontrolllösungen gegossenen Agarplatten blieben 24 Stunden im Brut-

schränk. Aus der Zahl der gewachsenen Keime auf den Platten konnte man die Intensität der Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf die Serumlösungen feststellen (s. Tabelle III).

Wie schon oben erwähnt, wird das Komplement von den ultravioletten Strahlen auch sogar in ziemlich konzentrierten Serumlösungen (bis 25-proz.) vollständig zerstört, wenn dieselben in einer ca. 6 mm dicken Schicht bestrahlt werden. Parallel dazu geht auch die vollständige Abtötung der in die Serumlösungen zugesetzten Colibacillen. Je höher wir mit den Serumkonzentrationen steigen, um so weniger wird das Komplement geschädigt. Dementsprechend werden auch nicht alle zugesetzten Keime abgetötet, wohl aber der größte Teil derselben.

Weitere Versuche haben gezeigt, daß in einer 10-proz. Serumlösung das Komplement schon nach 5 Minuten und in einer 1-proz. sogar nach 1 Minute Bestrahlung seiner Wirksamkeit beraubt wird.

Im unverdünnten Serum konnte das Komplement vollständig unwirksam gemacht werden, wenn es in einer 2 mm dicken Schicht 15 Minuten lang bestrahlt wurde. Dies zeigt deutlich, daß die Dicke der bestrahlten Schicht ein wesentliches Moment für die Durchlässigkeit des ultravioletten Lichtes ist. Während in einer 2 mm-Schicht sogar in konzentriertem Serum das Komplement abgetötet wird, bleibt es in einer 2-proz. Lösung bei einer 6 cm-Schicht vollkommen unverändert (siehe Tabellen I und II).

Das Ausbleiben der Komplementzerstörung bei den in Tabelle I und II beschriebenen Versuchen könnte man sich damit erklären, daß bei der ziemlich bedeutenden Dicke (6 cm) der kolloidalen Serumlösung die ultravioletten Strahlen zum größten Teil von den nächstliegenden Schichten absorbiert werden und an die entfernteren gar nicht gelangen.

Daß diese Annahme richtig ist, zeigt folgender Versuch: Der ganze Kasten wurde mit einer 1-proz. Serumlösung gefüllt; zugleich auch ein Quarzglaschen mit einer 5-proz. Serumlösung an die Lampe, wie oben beschrieben, angebracht, und die Bestrahlung eine Stunde vorgenommen. Das Komplement des im Glaschen sich befindenden Serums

blieb unbeschädigt, während sonst, wie unsere Versuche festgestellt haben, das Komplement in einer 5-proz. Serumverdünnung schon nach 5 Minuten Bestrahlung zerstört wird. Während also die ultravioletten Strahlen die 6 cm dicke Wasserschicht ohne weiteres passiert haben, stellte für sie eine ebenso dicke 1-proz. kolloidale Lösung ein Hindernis dar.

Zusammenfassung.

1) Das ultraviolette Licht wirkt auf das Meerschweinchenkomplement schädigend ein.

2) Das in dicken Schichten bestrahlte Serum verliert sogar in starken Verdünnungen, auch bei länger dauernder Bestrahlung, seinen Komplementgehalt nicht. Es läßt sich aber eine Verlangsamung der Hämolyse bei Benutzung des den ultravioletten Strahlen ausgesetzten Komplements beobachten.

3) Das Komplement des in dünnen Schichten (ca. 6 mm) bestrahlten Meerschweinchenserums wird nach einer halben Stunde vollständig zerstört bis zu einer Verdünnung von 25 Proz. (75 Teile 0,8-proz. NaCl-Lösung + 25 Teile Serum).

4) In noch dünneren Schichten bestrahlt wird das Meerschweinchenserum auch in stärkeren Konzentrationen seines Komplementes beraubt. In einer 2 mm dicken Schicht geht das Komplement selbst in unverdünntem Serum nach 10 bis 15 Minuten Bestrahlung zugrunde.

5) Bei Serumverdünnungen bis zu 10 Proz. genügt eine Bestrahlung von 5 Minuten und bei 1 Proz. sogar 1 Minute, um das Komplement vollständig seiner Wirksamkeit zu berauben.

Nachdruck verboten.

[Aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung des St.-Rochusspitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest (Oberarzt: Professor Stephan von Tóth)].

Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Platinkatalyse durch Bakterienfiltrate.

Von **Eugen Rosenthal** und **Ladislaus Bamberger**.

Mit 6 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Juni 1913.)

Der Zweck der weiter unten näher zu besprechenden Versuche war, folgende Fragen zu untersuchen:

- 1) Besitzen Bakterienleiber oder Bakterienfiltrate H_2O_2 zersetzende Wirkung?
- 2) Beeinflussen Bakterienfiltrate die H_2O_2 zersetzende Wirkung der Blutkatalase?
- 3) Wie verhält sich die Zersetzung des H_2O_2 durch kolloidales Platin bei Gegenwart von Bakterienfiltraten?
- 4) Ist die Beeinflussung durch die Bakterienfiltrate mit der Virulenz der entsprechenden Mikroorganismen in Verbindung?

Die von uns verwendete Versuchseinrichtung gestalteten wir nach vielfachen Vorversuchen derart, daß wir zunächst eine Reihe von Gläsern (von 150 ccm Inhalt) mit 25 ccm $n/_{20}$ H_2O_2 -Lösung versetzten. In das erste Glas kam außer dieser Wasserstoffsperoxydlösung nichts mehr, das zweite wurde mit einer entsprechenden Menge kolloidalen Platins, bzw. Blutaufschwemmung versetzt. — In ein drittes Glas kam außerdem sterile Bouillon, in das vierte an Stelle dieser reinen Bouillon dieselbe Menge des zu prüfenden Bakterienfiltrates, und schließlich kam in ein fünftes und sechstes Glas reine Bouillon bzw. Bakterienfiltrat ohne Zusatz von kolloidalem Platin oder einer Blutaufschwemmung. Die sechs Gläser waren somit folgendermaßen eingestellt:

- 1) 25 ccm H_2O_2 (ohne jeden weiteren Zusatz).
- 2) 25 „ H_2O_2 + Blutaufschwemmung oder kolloidales Platin.
- 3) 25 „ H_2O_2 + Blutaufschwemmung oder kolloidales Platin + reine Nährbouillon.
- 4) 25 „ H_2O_2 + Blutaufschwemmung oder kolloidales Platin + Bakterienfiltrat.
- 5) 25 „ H_2O_2 + reine Nährbouillon (ohne Katalase).
- 6) 25 „ H_2O_2 + Bakterienfiltrat „ „
- 7) 25 „ H_2O_2 + Bakterienaufschwemmung (ohne Katalase)

Die Versuchszeit betrug bei dieser Einrichtung und bei Zimmertemperatur ($17,5^\circ \text{C}$) 24 Stunden, wonach alle 6 Gläser mit verdünnter Schwefelsäure ausgesäuert und mit $n/_{30}$ KMnO_4 titriert wurden. Versuch 1 gibt jene Menge der $n/_{30}$ Wasserstoffsperoxydlösung an, welche den weiteren Berechnungen zugrunde liegt, und wurde daher bei jedem Versuch bestimmt. Das Ergebnis der Titration beim zweiten Glas zeigt die von der Katalase des Blutes oder vom kolloidalen Platin zersetzte Menge des Wasserstoffsperoxyds an. Glas 4 ist eingestellt, um den Einfluß des Bakterienfiltrates auf die Katalasewirkung erkennen zu lassen, während Versuch 3 zur Kontrolle dient, ob eine derartige Wirkung auch nicht etwa der reinen Nährbouillon eigen ist. Versuch 6 ist zum Nachweis der selbständigen katalytischen Wirkung des Bakterienfiltrates eingestellt, Versuch 5 ist die entsprechende Kontrolle. Schließlich wurde im Versuch 7 die Bakterienemulsion auf ihre katalytische Wirkung untersucht.

Wurden Bakterienfiltrate aus Kulturen hergestellt, bei welchen die quantitativen Verhältnisse nicht berücksichtigt wurden, so erhält man keine Werte, welche sich miteinander vergleichen lassen; dies zeigten bereits unsere ersten Versuche (mit einem avirulenten Stamm des *B. coli*). Aus diesem Grunde waren wir bestrebt, unsere Methode quantitativ zu gestalten: dies gelang uns mit Hilfe des „Bakteriometers“, welchen vor kurzem einer von uns vorzuschlagen Gelegenheit hatte¹⁾.

Das Instrument besteht im wesentlichen aus einem Zentrifugenrohr, welches etwa im unteren Drittel in eine Kapillare übergeht; an letzterer ist eine entsprechende Skala angebracht. Durch Zentrifugieren der stets gleichen Menge einer Bakterienaufschwemmung erhält man — entsprechend einer größeren oder kleineren Bakterienmenge — eine mehr oder weniger hohe Bakteriensäule in der Kapillare abgesetzt, deren Höhe an der erwähnten Skala abzulesen ist.

1) E. Rosenthal, Berlin. klin. Wochenschr., 1913. Das Instrument kann von der Firma F. & M. Lautenschläger, Berlin, bezogen werden.

Bei unseren Versuchen gingen wir so vor, daß wir zunächst jene Menge der Bakterienaufschwemmung bestimmten, welche eine 5 mm hohe Säule in der bewußten Kapillare liefert; diese Menge verdünnten wir 100-fach, und 1 ccm dieser Verdünnung verimpften wir auf genau 200 ccm Nährbouillon. Nach tüchtigem Durchschütteln werden von dieser Kultur täglich 10 ccm steril entnommen, zunächst zentrifugiert (das Zentrifugat wurde dann zu Versuch 7 verwendet) und dann durch Berkefeld-Filter filtriert. — Auf diese Weise gelang es quantitativ zu arbeiten, wie dies bereits auch frühere Erfahrungen zeigten ¹⁾).

1. Mit der Frage, ob Bakterienleiber und Bakterienfiltrate eine Katalase besitzen, beschäftigten sich vor uns D. und M. Rywosch ²⁾ und A. Jorns ³⁾. Zunächst fanden D. und M. Rywosch eine relativ starke Katalyse bei *Staphylococcus aureus*; ein Stamm von *Staphylococcus albus* wies aber nur etwa ein Drittel des Zersetzungsvermögens, welches der erste *Staphylokokkenstamm* entfaltete, auf. Auch *B. coli*, *paratyphi* und *typhi* wurden untersucht: es ergab sich bei letzteren im Vergleich zum *Staphylococcus aureus* eine Katalyse, welche etwa $\frac{1}{20}$ desselben beträgt. Jorns fand, daß nicht nur die Bakterienleiber eine Katalase enthalten, sondern daß ein H_2O_2 zersetzendes, thermolabiles Ferment auch an die Bouillon abgegeben wird: in diesem Sinne unterscheidet er, ebenso wie Loew ⁴⁾, eine Endo- oder α -Katalase gegenüber einer Ekto- oder β -Katalase.

Bezüglich dieser letzteren möchten wir zunächst bemerken, daß wir diese Endokatalase bei den von uns untersuchten Stämmen von *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *B. coli* kein einziges Mal fanden, namentlich konnten wir eine solche Wirkung selbst nach Verlauf von 10—14 Tagen im Filtrat nicht nachweisen. Auch eine sogenannte Ektokatalase

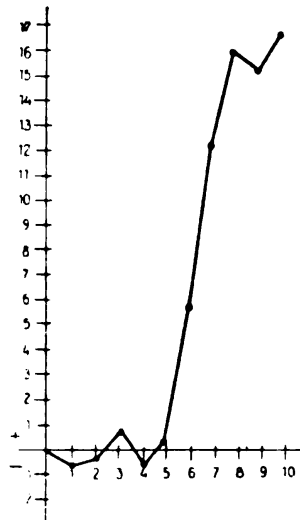
1) E. Rosenthal, Archiv f. Hygiene, 1913; Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., 1913.

2) D. u. Marie Rywosch, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44.

3) A. Jorns, Arch. f. Hygiene, Bd. 67.

4) Zit. bei Jorns.

fanden wir nur ganz vereinzelt: in einem solchen Fall schwankte die Zersetzungskurve in den ersten fünf Tagen



Kurve 1.

um die Nulllinie, und stieg dann vom 6. Tag an plötzlich in die Höhe, so daß am 10. Tag beinahe 19 ccm H_2O_2 zersetzt wurden (s. Kurve 1). — Somit können wir die Angaben von D. und M. Rywosch, sowie diejenigen von Jorns nicht bestätigen und mußten daher davon absehen, diese Eigenschaft der Mikroorganismen in irgendeiner praktischen Richtung zu verwerten.

2. Die Beeinflussung der Blutkatalase durch Bakterienfiltrate war ein weiterer Zweck unserer Untersuchungen; es gelang zuerst Weichardt, Eiweißspaltprodukte dadurch nachzuweisen, daß er ihre Einwirkung auf Katalysatoren studierte. Er fand mit seinen Mitarbeitern, daß Diphtherie- und Tetanustoxin, ferner verschiedene Eiweißspaltprodukte und unbekannte Gemische in Exkreten kolloidales Osmium lähmen. Ein organischer Katalysator (Hämoglobin) wird so beeinflusst, daß er durch geringe Mengen der genannten Stoffe angeregt, durch größere gelähmt wird.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir eine 0,4 Proz. Blutkörperchen enthaltende Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung. Das Blut wurde zu diesem Zwecke steril aus der Nabelschnur entnommen (dies war somit fötales Blut), defibriert, zentrifugiert und vor Gebrauch mit physiologischer NaCl-Lösung dreimal gewaschen. Auf Grund von Versuchen, welche wir weiter unten besprechen werden, nahmen wir diese Versuche in der Vermutung auf, daß Bakterienfiltrate die Blutkatalase in einem negativen Sinn beeinflussen werden, somit diese in ihrer Wirkung hemmen werden. Um so mehr überraschte uns eine konstante aber andersartige Beeinflussung der Blutkatalase; das Resultat eines solchen Versuches ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

		Menge der verbrauchten $n/10$ $KMnO_4$ - Lösung in ccm	Die zersetzte Menge der $n/10$ H_2O_2 beträgt somit in ccm
1	30 ccm $n/10$ H_2O	29,5	0,5
2	" " + 1 ccm 4 ‰ Blutaufschw.	13,8	15,7
3	" " + Blutaufschw. + 0,5 ccm reine " " Bouillon	12,2	17,3
4	" " + Blutaufschw. + 1,0 ccm reine " " Bouillon	10,3	19,20
5	" " + Blutaufschw. + 0,5 ccm " " Streptokokkenfiltrat	11,2	18,3
6	" " + Blutaufschw. + 1,0 ccm " " Streptokokkenfiltrat	8,1	21,4
7	" " + 1 ccm reine Bouillon	29,6	0,4
8	" " + 1 ccm Streptokokkenfiltrat	29,8	0,2

Die Versuche zeigen zunächst, daß reine Nährbouillon die Katalasewirkung des Blutes verstärkt: die Förderung der Katalase scheint den Mengen der Bouillon zu entsprechen, da 1,0 ccm reine Bouillon die Katalase stärker förderte als 0,5 ccm derselben. — Ein Bakterienfiltrat (in diesem Falle einer 8-tägigen Streptokokkenkultur) förderte die Katalasewirkung im gleichen Sinne; somit besteht zwischen der Wirkung der reinen, sterilen Nährbouillon und des Bakterienfiltrates nur ein quantitativer Unterschied. — Es kann sich beim Bakterienfiltrat nicht etwa um eine Addition der Katalasewirkung des Blutes und des Filtrates handeln, denn wie Versuch 8 zeigt, zersetzt das Bakterienfiltrat allein kein Wasserstoffsperoxyd und bei der sterilen Nährbouillon könnte hiervon noch um so weniger die Rede sein, da doch diese eine wiederholt sterilisierte Lösung vorstellt, welche irgendeinen fermentartigen Aktivator der Blutkatalase kaum enthalten kann. — Wir haben somit mit einer Wirkung zu tun, welche darin besteht, daß sterile, reine Bouillon allein Wasserstoffsperoxyd ebensowenig angreift wie ein Bakterienfiltrat; beide Substanzen besitzen aber die Fähigkeit, die Wirkung der Blutkatalase zu verstärken: allem Anschein nach dürfte es sich hierbei um die aktivierende Wirkung bestimmter thermostabiler Körper handeln, welche in der sterilen Bouillon vorhanden, und im Bouillonfiltrat in größerer Menge vorzufinden sind; dies könnten Eiweißabbauprodukte, namentlich

Aminosäuren sein, von welchen es einerseits bekannt ist, daß sie imstande sind, gewisse Fermentfunktionen zu fördern, und wir von ihnen andererseits wissen, daß sie in einem Bakterienfiltrat im Vergleich zu einer unbeimpften reinen Bouillonlösung in größerer Menge vorhanden sind ¹⁾.

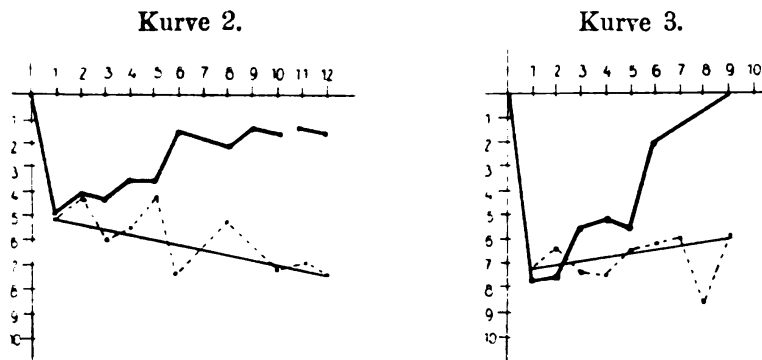
3. Bei den Versuchen mit der Blutkatalase konnten indessen die Versuche nur innerhalb einer Versuchsreihe verglichen werden, welche mit derselben Katalase ausgeführt wurden. Bereiteten wir in einem späteren Zeitpunkt in der oben beschriebenen Weise weitere Mengen Blutkatalase zu unseren Versuchen, so bekamen wir Aufschwemmungen von ganz verschiedener Wirksamkeit: Einflüsse von hemmender oder in diesem Falle fördernder Art wirkten auf die verschiedenen Fermentmengen in verschiedener Weise, so daß wir durch diese Versuche zu keinen brauchbaren, namentlich aber vergleichbaren Resultaten kamen.

Aus diesem Grunde waren wir bestrebt, in unser System eine H_2O_2 zersetzende Substanz von womöglich konstanter Wirksamkeit einzuschalten: dieser Forderung entsprach bestens das kolloidale Platin. Wir bedienten uns hierbei des von den Laboratoires Clin, Paris, erzeugten Präparates, des Elektroplatinols, welches von 25 ccm H_2O_2 -Lösung etwa 20 ccm zersetzte ²⁾. — Diese Versuche wurden in der eingangs besprochenen Anordnung ausgeführt: hierbei ergab sich, daß im Gegensatz zu den Versuchen mit der Blutkatalase, reine Bouillon und Bakterienfiltrate die katalytische Wirkung des kolloidalen Platins hemmend beeinflussen. — Zwischen der hemmenden Wirkung der reinen Bouillon und des Bakterienfiltrates besteht nun ein gewaltiger Unterschied: während die Hemmung der Bouillon innerhalb bestimmter Grenzen gleich bleibt, erfährt die Intensität der Hemmungskraft beim Bakterienfiltrat eine gleichmäßige Abnahme, so daß am Ende des Versuches die Hemmung gleich, oder beinahe Null war (s. Kurve 2 und 3). Beide

1) Unsere diesbezüglichen Untersuchungen wurden mit der Formoltitration nach Henriquez-Sørensen ausgeführt, sie sollen demnächst veröffentlicht werden.

2) Der maximale Fehler betrug ± 1 ccm.

hier abgebildete Kurven beziehen sich auf zwei avirulente Coli-Stämme und zeigen das soeben besprochene Verhalten. — Ueber die Ursache der Hemmung lag bei Betrachtung dieser Versuchsergebnisse die Annahme außerordentlich nahe, daß die Hemmung durch die Eiweißkörper der Bouillon hervorgerufen wird: analoge Erscheinungen sind ja bekannt (z. B. Hemmung der Immuhämolyse).



Kurve 2 und 3. Die dick ausgezogene Linie entspricht dem untersuchten Bakterienfiltrat, die dünn ausgezogene der sterilen unbeimpften Bouillon. (Die hierbei erhaltenen Werte unterliegen ungesetzmäßigen Schwankungen, welche mit unterbrochener Linie gezeichnet sind.)

Es ist nun möglich, daß die Hemmung in dem Maße abnimmt, in welchem hemmende Eiweißkörper gespalten werden: genaue Zahlen, durch welche wir einen solchen Parallelismus beweisen könnten, stehen uns heute über diesen Punkt noch nicht zur Verfügung. Diese unsere Annahme scheint indessen die Tatsache zu stützen, daß Bouillon ihre Hemmungskraft verliert, wenn man sie enteiweißt.

4. Wie bereits weiter oben angedeutet, untersuchten wir schließlich die Frage, ob die Beeinflussung der Platinkatalyse durch Bakterienfiltrate mit der Virulenz der betreffenden Kulturen zusammenhängt. Zu diesem Zweck wurde je ein Streptokokken-, Staphylokokken- und Coli-Stamm im avirulenten und virulenten Zustand untersucht. — Der Streptokokkenstamm rührte von einem Fall puerperaler Sepsis her, welcher die Patientin etwa 6 Wochen nach Beginn der Krankheit erlag; der Stamm wurde durch 5 Wochen auf künstlichem Nährboden gezüchtet. Die Virulenzsteigerung dieser nunmehr avirulenten Mikroorganismen wurde durch Tierpassage erzielt;

bei den ersten Impfungen mit demselben tötete 1 ccm der Verdünnung 1:100¹⁾ Mäuse in 7 bzw. 6 Tagen; innerhalb 14 Tagen stieg die Virulenz des Stammes so stark, daß die obige Menge eine Maus innerhalb 24 Stunden tötete. In weiteren 5 Tagen stieg die Virulenz noch weiter, indem 1 ccm der 200-, 300- und 500-fachen Verdünnung¹⁾ innerhalb 24 bis 48 Stunden Mäuse zu töten imstande war. Ein Staphylococcusstamm rührte von einer Furunkulosis her und wurde durch 4 Wochen auf künstlichem Nährboden gezüchtet. Die Virulenzsteigerung erfolgte durch Tierpassage an Kaninchen. Durch dieselbe tötete 1 ccm der Verdünnung 1:100¹⁾ ein Kaninchen in 2 Tagen, während dieselbe Menge vor der Tierpassage in 9 Tagen ein Kaninchen zu töten imstande war. — Ein Coli-Stamm wurde aus der Bauchhöhle einer an tödlicher Coli-Peritonitis verstorbenen Patientin gezüchtet: der Stamm wurde durch 8 Monate auf künstlichem Nährboden gezüchtet. Zu dieser Zeit war der Stamm ziemlich avirulent: 1 ccm der 100-fachen Verdünnung tötete ein Meerschweinchen in 5 Tagen. Durch wiederholte Tierpassage gelang es die Virulenz soweit zu steigern, daß 1 ccm der Verdünnung 1:700 das Tier in 48 Stunden tötete.

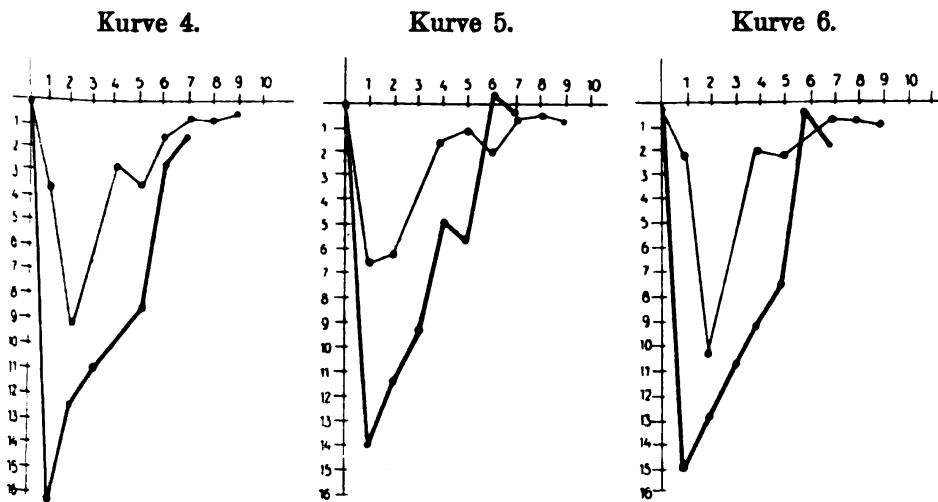
Durch die Züchtung von Mikroorganismen auf künstlichem Nährboden einerseits, und durch wiederholte Tierpassage andererseits hatten wir zu unseren Versuchen virulente und avirulente Kulturen zur Verfügung. Um quantitativ gleiche Verhältnisse herzustellen, sind wir in einer Weise vorgegangen, welche wir bereits weiter oben eingehend erörtert haben.

Unsere bei diesen Versuchen erhaltenen Resultate sind in den folgenden 3 Kurven zusammengestellt.

Zunächst sehen wir, daß bei den drei Filtraten, welche den avirulenten Mikroorganismen entsprechen, das Maximum der Hemmung erst am 2. Versuchstag erreicht wird; ferner ist die Hemmung bei den virulenten Keimen eine viel stärkere, etwa doppelt so stark wie bei den avirulenten Kulturen. — Daß bei den Filtraten aus virulenten Kulturen in den ersten

1) Immer auf jene Menge bezogen, welche im Bakteriometer eine 5 mm hohe Säule liefert.

Tagen die Hemmung die der reinen Bouillon übertrifft, läßt sich natürlich nicht wie bei den avirulenten Stämmen auf den Eiweißgehalt des Filtrates zurückführen. Unserer Ansicht nach dürfte es sich hier um eine toxische Wirkung handeln, welche seitens der virulenten Mikroorganismen gegenüber der H_2O_2 zersetzenden Wirkung des kolloidalen Platins entfaltet



Kurve 4—6. Die dünn ausgezogene Linie entspricht der avirulenten, die dick gezeichnete der virulenten Kultur; die Werte für sterile unimpfte Bouillon sind hier nicht eingezeichnet und schwanken um 8.

wird. Daß dies tatsächlich möglich ist, beweisen die bekannten Versuche Weichardts¹⁾, in welchen kolloidales Platin sowie die Guajakolydase durch Stoffe toxischen Charakters, wie Extrakte von malignen Tumoren, in der Ausatemluft enthaltenen Eiweißspaltprodukten („Kenotoxin“) vergiftet werden konnten. Im Anschluß an Erfahrungen von Blumenthal und Brahn²⁾ über den herabgesetzten Katalasegehalt der Leber bei Krebskranken (namentlich bei Tumoren des Magens) hatte etwa vor einem Jahr einer von uns³⁾ Ge-

1) W. Weichardt und Müller, Centralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffwechsels, 1911, No. 9. — Weichardt und Kelber, Münch. med. Wochenschr., 1912, No. 35. — Weichardt und Stötter, Arch. f. Hyg., Bd. 75, p. 265.

2) Blumenthal und Brahn, Zeitschr. f. Krebsf., Bd. 8, p. 436. — Sitzungsbericht der preußischen Akademie, Bd. 34, 1910.

3) E. Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 48.

legenheit, eine Beeinflussung im negativen Sinne der Leber- und Blutkatalase bei Mäusetumoren bestimmter Lokalisation nachzuweisen. Unsere Resultate haben mit den Versuchsergebnissen Weichardts noch einen weiteren Punkt gemeinsam: die vermutlich geringen Toxinmengen der avirulenten Kulturen ergaben eine Anregung, größere Giftmengen (der virulenten Stämme) wirkten hemmend auf die Platinkatalyse: dies ist eine Erscheinung, welche namentlich in den Versuchen Weichardts mit der Ausatemluft mit ganz besonderer Deutlichkeit hervortritt. Es scheint somit eine Regel von mehr allgemeiner Gültigkeit zu sein, daß bei der Einwirkung von toxischen Substanzen auf Fermente oder fermentähnliche Wirkungen geringe Mengen fördernd, große Mengen hemmend wirken.

Zusammenfassung.

1) Eine selbständige H_2O_2 zersetzende Wirkung von Bakterienleibern und Bakterienfiltraten konnten wir nur vereinzelt beobachten.

2) Reine, unbeimpfte, sterile Bouillon fördert die Wirkung der Blutkatalase; die gleiche Wirkung entfalten Bakterienfiltrate, nur ist ihnen eine mehr intensive Wirkung eigen.

3) Die durch kolloidales Platin erzeugte Katalyse des Wasserstoffsperoxyds wird durch reine Bouillon gehemmt; Filtrate avirulenter Kulturen weisen eine weniger intensive Hemmung auf als die reine Bouillon.

4) Demgegenüber entfalten Filtrate virulenter Keime eine noch viel stärkere Hemmung der Platinkatalyse, als sie bei avirulenten Kulturen bzw. reiner Bouillon beobachtet werden kann.

Unsere Anschauungen über die möglichen Ursachen dieser Tatsachen finden sich weiter oben besprochen.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Kaiserl. Japan. Institut für Infektionskrankheiten zu
Tokio (Direktor: Prof. Dr. Kitasato).]

**Ueber die Präzipitation und Komplementbindung mit
Cuorin bei Lepra und die Beziehungen von Cuorin und
Lecithin zu Lepraseren bei den Reaktionen.**

Von Dr. M. Tsurumi.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. Juni 1913.)

Kitasato hat bereits bewiesen, daß die Komplementbindung mit Cuorin (1, 2), einem Lipoid wie Lecithin, bei Lepra möglich ist, während die Präzipitinreaktion mit jenem bei Syphilis durch Teruchi und Toyoda (2, 3, 4), bei Lepra durch Mitsuda (5) festgestellt worden ist. Die darüber erschienenen Veröffentlichungen gaben mir Veranlassung, die Komplementbindung und die Präzipitation mit Cuorin bei Leprösen einer Prüfung zu unterwerfen und auch gleichzeitig die Beziehungen von Cuorin und Lecithin zu Lepraseren bei den Reaktionen näher zu beleuchten.

1906 ist es Ernst Eitner (6, 7) zuerst gelungen, das Komplementbindungsverfahren bei Lepra mit wässrigem Extrakt des leprösen Materials auszuführen. Danach haben aber Wechselmann, Meier, Slatineanu und Danielopolu erwiesen, daß nicht nur der obengenannte Extrakt, sondern auch die wässerigen und alkoholischen Extrakte (8, 9, 10) der syphilitischen Fötusleber als Antigen der Reaktion bei Lepra verwendet werden können. Durch Ernst Eitner wurde sogar festgestellt, daß mittels Lecithins (8) und des aus normal gesundem Meerschweinchenherz hergestellten alkoholischen Extraktes (6) die Reaktion herbeigeführt werden kann.

Demnach kann man mit Recht behaupten, daß das Antigen der Wassermannschen Reaktion bis zu einem gewissen Grade das Antigen der Komplementbindung bei Lepra ersetzen kann. Andererseits ist klar ersichtlich, wie oben erwähnt, daß die Präzipitation mit Cuorin bei Syphilis diagnostisch verwendbar ist, während diese Reaktion auch bei Lepra stattfinden kann.

2*

Für die Beurteilung der beiden Reaktionen können die Ergebnisse von 36 untersuchten Lepraseren herangezogen werden, von denen 23 Knotenlepra, die übrigen 13 Nervenlepra sind.

Was den Zeitpunkt des Krankheitsausbruches und den nachherigen Verlauf anbetrifft, so ist mit großen Verschiedenheiten zu rechnen.

NB. Wenn auch nach klinischer Auffassung für die Formen der Lepra eine Dreiteilung angewandt wird, nämlich Nerven- und Knotenlepra sowie gemischte Form, bin ich doch von dieser Einteilung abgewichen und ich habe sie, wie Hansen es vorschlägt, in zwei Typen eingeteilt, nämlich in die Knotenlepra und die Nervenlepra; der eine Typus stellt die Knotenlepra dar, zu der ich die aus der Dreiteilung bekannte „gemischte Form“ zähle, während unter dem anderen Typus die Nervenlepra zu verstehen ist.

I. Präzipitation.

Die zweckmäßige Konzentration der Cuorinsuspension ist bei Lepra 0,1 Proz., dagegen gebrauchte Teruuchi bei Syphilis eine 0,3-proz. Cuorinsuspension.

Tabelle I.

Cuorin- suspension	Verdünnung des Serums (Hosono)					
	10×	20×	40×	80×	160×	320×
0,3 %	+++	+++	+++	++	++	—
0,1 %	+++	+++	+++	+++	+++	+

Das Resultat des Versuches wurde nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutofen verzeichnet. Natürlich übt die Verweildauer im Brutschrank einen großen Einfluß auf das Resultat aus. Obschon Teruuchi und Tachikawa (3, 11) behaupten, daß das Resultat der Reaktion bei Syphilis schon nach 2-stündigem Verweilen im Brutofen abgelesen werden muß, war im vorliegenden Falle ein 24-stündiges Verweilen in demselben nötig, weil im allgemeinen während einer kurzfristigen Beobachtung, wie im ersteren Falle, die Sera negativ reagierten; das Resultat fiel aber nach 24-stündiger Dauer positiv aus. Native und inaktivierte Sera verhalten sich für die Reaktion ganz gleichartig. Besonders muß hier erwähnt werden, daß die Cuorinsuspension immer frisch bereitet werden muß, da sich das Cuorin an der Luft leicht verändert.

Tabelle II.
A. Knotenlepra.

Name				Verdünnung des Serums					
				10×	20×	40×	80×	160×	320×
1. Hosono	32-j.	m.	S.	+++	+++	+++	+++	+++	+
2. Tominaga	19-j.	m.	l.	+++	+++	+++	++	+	—
3. Hanakami	26-j.	m.	m. S.	+++	++	±	—	—	—
4. Iso	41-j.	m.	S.	+	+	+	—	—	—
5. Ikeda	30-j.	m.	m. S.	++	+	+	—	—	—
6. Katamowo	32-j.	m.	m. S.	—	—	—	—	—	—
7. Inagaki	23-j.	m.	m. S.	+	+	+	—	—	—
8. Goto	—	m.	l.	++	+	+	±	—	—
9. Nakajima	20-j.	m.	m. S.	++	++	+	+	—	—
10. Endo	22-j.	m.	l.	+++	+++	+++	+++	+	—
11. Hagiwara	33-j.	m.	m. S.	++	++	+	—	—	—
12. Nishina	21-j.	m.	m. S.	+	+	—	—	—	—
13. Yamaguchi	—	w.	m. S.	—	—	—	—	—	—
14. Fuguno	31-j.	m.	S.	—	—	—	—	—	—
15. Sugihara	21-j.	m.	m. S.	+++	++	+	+	—	—
16. Tsuyuki	11-j.	m.	m. S.	++	+	+	—	—	—
17. Hibino	26-j.	m.	m. S.	++	+	—	—	—	—
18. Miyakawa	22-j.	m.	l.	+++	+++	+	—	—	—
19. Yamaguchi	31-j.	m.	m. S.	+	+	—	—	—	—
20. Okawa	24-j.	m.	m. S.	+++	+++	+	—	—	—
21. Yenouye	22-j.	m.	m. S.	+++	+++	+	—	—	—
22. Matsumoto	17-j.	w.	m. S.	+++	+++	+++	+	—	—
23. Osaki	17-j.	w.	m. S.	+++	+++	+++	++	+	—

Tabelle III.
B. Nervenlepra.

Name				Verdünnung des Serums					
				10×	20×	40×	80×	160×	320×
24. Yamaguchi	22-j.	m.	l.	—	—	—	—	—	—
25. Jyeda	38-j.	m.	S.	—	—	—	—	—	—
26. Yuwata	23-j.	m.	l.	—	—	—	—	—	—
27. Awoyama	35-j.	m.	m. S.	+	+	+	—	—	—
28. Supesawa	22-j.	m.	m. S.	—	—	—	—	—	—
29. Kaibe	35-j.	m.	m. S.	++	++	+	+	—	—
30. Sugiuchi	58-j.	m.	m. S.	—	—	—	—	—	—
31. Watanabe	28-j.	m.	m. S.	+++	++	—	—	—	—
32. Shimitsu	31-j.	m.	m. S.	++	++	++	+	—	—
33. Okuyama	30-j.	m.	l.	—	—	—	—	—	—
34. Samma	31-j.	m.	m. S.	+	+	+	—	—	—
35. Nomura	34-j.	w.	m. S.	+++	+++	++	++	—	—
36. Asaba	26-j.	m.	l.	+++	+	—	—	—	—

Zeichenerklärung: +++ Reaktion sehr deutlich, ++ Reaktion ziemlich deutlich, + Reaktion positiv, ± Reaktion Spur, — Reaktion negativ, l. leichter, S. schwerer, m. S. mittelschwerer Fall.

Unter den 36 untersuchten Fällen fielen 27, also 75 Proz., positiv, die übrigen negativ aus; genauer gesagt, unter den

23 Kranken mit Knotenlepra waren 20, die positiv, 3, die negativ reagierten; unter den 13 Fällen von Nervenlepra fielen 7 positiv, die übrigen 6 negativ aus. Es ergibt sich demnach, daß die Präzipitation mit Cuorin bei Lepra in den meisten Fällen, besonders aber bei Knotenlepra, positiv reagiert und daß die Reaktion von dem Grade der Krankheit unabhängig ist.

II. Komplementbindung.

Die Sera, welche für die Reaktion zur Verfügung standen, wurden natürlich inaktiviert. Die Antigendosis betrug 0,1 ccm der frisch bereiteten 0,1-proz. Cuorinsuspension, da beim doppelten Quantum des Antigens keine Selbsthemmung stattfand. Der Titer des Hämolytins erreichte 0,001, also 0,001 ccm desselben rief die komplette Lösung hervor. Die Komplementmenge betrug 0,5 ccm des 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums. Die Resultate des Versuches wurden wie folgt eingeteilt:

H = komplette Hemmung, f. k. H = fast komplette Hemmung, K = große Kuppe, k = kleine Kuppe, L = Lösung.

Tabelle IV.
A. Knotenlepra.

Name	Serum							
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1. Hosono	H	H	H	H	H	H	K	L
2. Tominaga	"	"	"	"	"	f. k. H	"	"
3. Hanakami	"	"	f. k. H	k	L	L	L	"
4. Iso	"	"	dgl.	"	"	"	"	"
5. Ikeda	"	f. k. H	k	L	"	"	"	"
6. Kawamoto	L	L	L	"	"	"	"	"
7. Inagaki	H	H	f. k. H	k	"	"	"	"
8. Goto	"	"	H	H	f. k. H	K	"	"
9. Nakashima	"	"	"	"	H	"	"	"
10. Endo	"	"	"	"	K	L	"	"
11. Hagiwara	"	"	"	"	f. k. H	K	"	"
12. Nishina	L	L	L	L	L	L	"	"
13. Yamaguchi	"	"	"	"	"	"	"	"
14. Fuguno	"	"	"	"	"	"	"	"
15. Sugihara	H	H	K	"	"	"	"	"
16. Tsuyuki	"	"	H	k	"	"	"	"
17. Hibino	"	"	L	L	"	"	"	"
18. Miyakawa	"	f. k. H	K	k	"	"	"	"
19. Yamaguchi	K	k	L	L	"	"	"	"
20. Okawa	H	H	f. k. H	K	k	"	"	"
21. Yenouye	"	"	H	"	"	"	"	"
22. Matsumoto	"	"	"	"	L	"	"	"
23. Osaki	"	"	"	H	K	k	"	"

Tabelle V.
B. Nervenlepra.

Name	Serum							
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
24. Yamaguchi	L	L	L	L	L	L	L	L
25. Jyeda	"	"	"	"	"	"	"	"
26. Yuwata	"	"	"	"	"	"	"	"
27. Awoyama	H	H	f. k. H	"	"	"	"	"
28. Sugawara	L	L	L	"	"	"	"	"
29. Kaibe	H	H	K	"	"	"	"	"
30. Sugiuchi	L	L	L	"	"	"	"	"
31. Watanabe	K	k	L	"	"	"	"	"
32. Shimitsu	H	H	f. k. H	K	"	"	"	"
33. Okuyama	L	L	L	L	"	"	"	"
34. Samma	H	H	f. k. H	K	k	"	"	"
35. Nomura	"	H	H	H	K	"	"	"
36. Asaha	"	K	L	L	L	"	"	"

Das Resultat des Komplementbindungsverfahrens mit Cuorin bei Lepra deckte sich, wie die Tabelle zeigt, mit demjenigen der Präzipitinreaktion, abgesehen von nur einem Fall von Knotenlepra (Nishina). Also kann man behaupten, daß die Komplementbindung mit Cuorin in den meisten Fällen der Lepra, besonders bei Knotenlepra, positiv ausfiel und daß die betreffende Reaktion sich nicht den Krankheitszuständen proportional verhält.

III. Die Komplementbindung und die Präzipitation mit dem Pleuraexsudat und der Herzbeutel Flüssigkeit sowie Galle einer Lepraleiche (Knotenlepra).

Tabelle VI.
A. Komplementbindung

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
Galle	L	L	L	L	L	L
Herzbeutel Flüssigkeit	H	H	K	L	"	"
Pleuraexsudat	H	H	"	k	"	"

Tabelle VII.
B. Präzipitation.

Serum	10×	20×	40×	80×	160×	320×
Galle	—	—	—	—	—	—
Herzbeutel Flüssigkeit	+	+	—	—	—	—
Pleuraexsudat	+	+	—	—	—	—

Wie oben zu ersehen ist, ließen sich der komplementbindende Antikörper und die Präzipitation gegen Cuorin in der Herzbeutelflüssigkeit und im Pleuraexsudat einer Lepra-Leiche nachweisen, aber die beiden Antikörper fehlten ganz in der Galle derselben Leiche.

IV. Die Beziehungen des komplementbindenden Antikörpers zur Präzipitation gegen Cuorin.

Wie aus den obigen Versuchen hervorgeht, laufen die beiden Reaktionen einander parallel, abgesehen von dem genannten Fall von Knotenlepra (Nishina). Gleiches gilt auch für die Höhlenflüssigkeiten.

Tabelle VIII.
Präzipitation (Serum Hosono).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
0,1-proz. Cuorin-suspension	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Resultat	+++	+++	+++	++	+	—

Um diese Beziehungen näher zu beleuchten, nahm ich mir vor, den komplementbindenden Antikörper in den überstehenden Flüssigkeiten und den Niederschlägen aufzusuchen, welche durch die Präzipitation mit Cuorin entstanden sind.

Nach 24-stündigem Verweilen im Brutschrank wurde jedes Röhrchen zentrifugiert. Die Abgüsse wurden der Reihe nach $F_1, F_2, F_3 \dots$ und die Niederschläge $P_1, P_2, P_3 \dots$ benannt. Dann wurde der komplementbindende Antikörper in den Abgüssen und den Niederschlägen aufgesucht. Dabei habe ich Cuorin als Antigen nicht hinzugefügt, weil ich vermutete, daß es in den eben genannten Abgüssen oder Niederschlägen vorhanden sein muß.

Tabelle IX.
A. Komplementbindung mit den Niederschlägen.

Präzipitat	P_1 (entspr. Ser. 0,1)	P_2 (entspr. Ser. 0,05)	P_3 (entspr. Ser. 0,025)	P_4 (entspr. Ser. 0,01)	P_5 (entspr. Ser. 0,005)	P_6 (entspr. Ser. 0,0025)
Komplement	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Resultat	H	H	H	H	K	L

Wie die Tabelle zeigt, fiel die Reaktion mit den Niederschlägen ganz positiv aus. Daß die Komplementbindung mit den Niederschlägen positiv ausfiel, muß man einer von den

hier genannten drei Möglichkeiten zuschreiben: 1) daß der Niederschlag selbst sui generis das Komplement in sich absorbiert, 2) daß der spezifische Antikörper im Niederschlage enthalten ist, oder 3) daß die beiden vorgenannten Möglichkeiten zusammentreffen. Es muß aber erwähnt werden, daß das bei Verwendung des Originalserums erzielte Resultat sich mit dem bei den genannten Niederschlägen gefundenen quantitativ fast deckte. Noch ehe hieraus eine Schlußfolgerung gezogen wird, ist es nötig, auf den nächsten Versuch näher einzugehen.

Tabelle X.

B. Komplementbindung mit den Abgüssen.

Abguß	F ₁ (entspr. Ser. 0,1)	F ₂ (entspr. Ser. 0,05)	F ₃ (entspr. Ser. 0,025)	F ₄ (entspr. Ser. 0,01)	F ₅ (entspr. Ser. 0,005)	F ₆ (entspr. S. 0,0025)
Komplement	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hämolytisches System.						
Resultat	L	L	L	L	L	L

Der Abguß enthielt den Antikörper also nicht, während das überschüssige Cuorin noch in demselben vorhanden war, aber weder die Selbsthämolyse noch die Selbsthemmung herbeiführte. Daraus erklärt sich das Verschwinden des Antikörpers im Serum.

Daß der Versuch mit dem Niederschlage positiv ausfiel, muß ich darauf zurückführen, daß der komplementbindende Antikörper bei der Reaktion ins Präzipitat überging, obschon man annehmen könnte, daß das Präzipitat an und für sich das Komplement mechanisch absorbiert. Es kann aber hier nicht entschieden werden, ob der Antikörper entweder selbst mechanisch ins Präzipitat übergeht oder unter einem etwa chemisch veränderten Zustand in demselben sich befindet.

Im obigen Versuche war aber die Quantität des angewandten Cuorins zu groß. Wenn man nun noch geringere Mengen von Cuorin als beim vorigen Falle zur Präzipitation verwendet und nach der Reaktion mit den Abgüssen sowie den Niederschlägen die Komplementbindung ausführt, so kann man den Antikörper nicht nur in den Niederschlägen, sondern auch in den Abgüssen nachweisen.

Tabelle XI.
Präzipitation (Serum Hosono).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
0,1-proz. Cuorin-suspension	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Resultat	++	++	++	++	—	—

Durch Zentrifugieren trennte ich die Niederschläge P_1 , P_2 , P_3 . . . von den Abgüssen F_1 , F_2 , F_3 . . ., dann führte ich die Komplementbindung mit den letzteren sowohl als auch den Niederschlägen aus, deren Ergebnis hier folgt:

Tabelle XII.

A. Komplementbindung mit den Niederschlägen.

Niederschläge	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6
Komplement	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hämolytisches System.						
Resultat	H	k	L	L	L	L

Tabelle XIII.

B. Komplementbindung mit den Abgüssen.

Ueberstehende Flüssigkeiten	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6
Antigen 0,1-proz. Cuorin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Komplement	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hämolytisches System.						
Resultat	H	L	L	L	L	L

In dem Falle, wo eine geringere Menge von Cuorin als beim vorigen zur Verwendung kam, fiel auch die Komplementbindung mit dem Abguß positiv aus, während dabei diese Reaktion mit dem Niederschlage natürlich positiv verlief. Daraus geht deutlich hervor, daß der überschüssige komplementbindende Antikörper in dem Abguß vorhanden ist.

Es ergibt sich also, daß die Bindung zwischen dem Antikörper und Cuorin in einer bestimmten Proportion stattfindet.

Nach den obigen Versuchen kann man mit Recht behaupten, daß der komplementbindende Antikörper und die Präzipitine gegen Cuorin bei Lepra in ganz innigem Zusammenhang stehen.

V. Der Einfluß von Hitze auf den komplementbindenden Antikörper und die Präzipitine.

Wie schon erwähnt, übt es keinen Einfluß auf die Präzipitinreaktion aus, ob das Lepraserum inaktiviert ist oder nicht; doch ändert sich das Verhältnis, wenn das Serum auf 63° C 30 Minuten lang erhitzt wird.

Tabelle XIV.

Serum Okawa (auf 56° C 30 Minuten lang erhitzt).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
Komplementbindung	H	H	f. k. H	K	K	L
Serum	10×	20×	40×	80×	160×	320×
Präzipitation	+++	+++	+	—	—	—

Tabelle XV.

Serum Okawa (auf 63° C 30 Minuten lang erhitzt).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
Komplementbindung	L	L	L	L	L	L
Serum	10×	20×	40×	80×	160×	320×
Präzipitation	—	—	—	—	—	—

Wie die Tabellen zeigen, fielen die beiden Reaktionen ganz negativ aus, welche durch die in soeben beschriebener Weise behandelten Seren zustande kamen. Das Ergebnis zeigt also, daß der komplementbindende Antikörper und die Präzipitine sich verändern, wenn sie 30 Minuten lang auf 63° C erhitzt werden. Man darf demnach schließen, daß die beiden Antikörper fast immer unter gleichen Bedingungen beeinflußt werden, und daß der komplementbindende Antikörper bei der Präzipitation ins Präzipitat übergeht.

Daß zwischen den durch Immunisierung entstandenen komplementbindenden Substanzen und den Präzipitinen Beziehungen bestehen sollen, ist schon von vielen Autoren behauptet worden. Die meisten Autoren sind sich aber darin

einig, daß die beiden Antikörper nicht identisch sind, während manche Autoren andere Meinung haben. In meinem Falle stehen aber die beiden Antikörper, wie oben erwähnt, in ganz innigem Zusammenhang, obschon man den komplementbindenden Antikörper mit den Präzipitinen nicht identifizieren kann. Ferner muß nun noch beachtet werden, daß die beiden Antikörper nicht immunisatorischen Ursprungs sind.

VI. Die Beziehungen von Cuorin und Lecithin zu Lepraseren bei den Reaktionen.

Es ist bekannt, daß Lecithin sowohl für die Wassermannsche Reaktion als auch für die Komplementbindung bei Lepra als Antigen verwendbar ist, während die Präzipitinreaktion mit Lecithin bei derselben Erkrankung möglich ist. Ueber die Beziehungen von Cuorin zu Lepraseren ist schon geschrieben worden. Es dürfte deshalb von Interesse sein, zu untersuchen, wie sich Cuorin und Lecithin zu Lepraseren verhalten.

Tabelle XVI.

A. Komplementbindung (Knotenlepra Iyeda).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Cuorin	L	L	L	L	L
Lecithin	H	H	K	L	L

Tabelle XVII.

B. Präzipitation (Knotenlepra Iyeda).

Serum	10×	20×	40×	80×	160×
Cuorin	—	—	—	—	—
Lecithin	+++	+++	+++	++	—

Tabelle XVIII.

A. Komplementbindung (Nervenlepra Okuyama).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Cuorin	L	L	L	L	L
Lecithin	L	L	L	L	L

Tabelle XIX.

B. Präzipitation (Nervenlepra Okuyama).

Serum	10×	20×	40×	80×	160×
Cuorin	—	—	—	—	—
Lecithin	—	—	—	—	—

Tabelle XX.

A. Komplementbindung (Nervenlepra Miyakawa).

Serum	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Cuorin	H	H	K	K	L
Lecithin	L	L	L	L	L

Tabelle XXI.

B. Präzipitation (Nervenlepra Miyakawa).

Serum	10×	20×	40×	80×	160×
Cuorin	+++	+++	+	—	—
Lecithin	—	—	—	—	—

Nach den obigen 3 Fällen kann man annehmen, daß Cuorin und Lecithin bei den Reaktionen in keinem Zusammenhang zueinander stehen, genauer gesagt, der komplementbindende Antikörper gegen Cuorin bei Lepra und der Antikörper gegen Lecithin ist ganz verschieden; das gleiche gilt ebenfalls für die Präzipitine.

Zusammenfassung.

- 1) In den meisten Fällen von Lepra, besonders von Knotenlepra, fällt die Präzipitinreaktion mit Cuorin positiv aus.
- 2) Diese Reaktion steht nicht mit der Schwere der Krankheitszustände in einem proportionalen Verhältnis.
- 3) Die Komplementbindung mit Cuorin als Antigen bei Lepra fiel in den meisten Fällen, besonders bei Knotenlepra, positiv aus.
- 4) Diese Reaktion ist von dem Charakter der Krankheit unabhängig.

30 Tsurumi, Präzipitation und Komplementbindung mit Cuorin etc.

5) In der Herzbeutel Flüssigkeit und im Pleuralexsudat einer Lepraleiche ließen sich beide Antikörper nachweisen; sie fehlten aber in der Galle.

6) Von den 36 untersuchten Lepraseren deckten sich die Resultate der Komplementbindung mit denen der Präzipitation, abgesehen von einem Fall der Knotenlepra (Nishina).

7) Der komplementbindende Antikörper gegen Cuorin bei Lepra geht bei der Präzipitation ins Präzipitat über.

8) Der komplementbindende Antikörper und die Präzipitine gegen Cuorin verändern sich wesentlich, wenn sie 30 Minuten lang auf 63° erhitzt werden.

9) Also stehen beide Antikörper in ganz innigem Zusammenhange.

10) Es besteht keine Beziehung zwischen Cuorin und Lecithin bei den Reaktionen, also sind die Präzipitine und der komplementbindende Antikörper gegen Cuorin bei Lepra von denen gegen Lecithin ganz verschieden.

Am Schlusse dieser Abhandlung möchte ich nicht unterlassen, den Herren Prof. Kitasato und Shibayama meinen aufrichtigen Dank für die hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit auszusprechen.

Literatur.

- 1) Erlandsen, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 51, 1906.
- 2) Teruuchi und Toyoda, Saikingakuzassi, 1909, No. 162.
- 3) — — Ebenda, 1910, No. 171.
- 4) — — Ebenda, 1910, No. 177.
- 5) Mitsuda, Tokioijishinshi.
- 6) Eitner, Ernst, Wien. klin. Wochenschr., 1906, No. 51.
- 7) — Ebenda, 1908, No. 20.
- 8) Wechselmann und Meier, G., Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 31.
- 9) Slatineau et Danielopolu, Compt. rend. Soc. de Biol., 1908.
- 10) — — Ibid.
- 11) Tachikawa, Saikingakuzassi, 1911. No. 186.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Ueber die Beziehung des Anaphylatoxins zu den Endotoxinen.

Von **H. Dold** und **A. Hanau**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Juni 1913.)

Die Entdeckung des Bakterienanaphylatoxins durch Friedberger hat unsere bisherigen Anschauungen über Bakteriengifte ins Wanken gebracht und die Notwendigkeit einer erneuten Prüfung dieser Anschauungen ergeben. Besonders die Existenz der präformierten, an den Bakterienleib gebundenen Gifte, der Endotoxine R. Pfeiffers, war zweifelhaft geworden, nachdem man erfahren hatte, daß alle Bakterien, tote wie lebende, beim Kontakt mit komplementhaltigen Körpersäften (in vitro und in vivo) ein stark wirkendes Gift liefern. Daraus schien hervorzugehen, daß die Giftwirkung der Bakterienleiber nicht auf einem präformierten, sondern auf einem erst durch Kontakt mit den Körpersäften entstehenden Gifte beruht.

Friedberger sah sich auch, in konsequentem Verfolg seiner Anschauung über das Anaphylatoxin, veranlaßt, die Existenz intracellulärer präformierter Bakteriengifte, der Endotoxine, in Abrede zu stellen und die Endotoxine als Muttersubstanz des Anaphylatoxins zu betrachten.

Friedberger¹⁾ stützt seine Anschauung hauptsächlich auf seine mit Kumagai angestellten Versuche. Sie fanden, daß Aufschwemmungen und Schüttelextrakte von Dysenteriebacillen (Shiga-Kruse) auf den isolierten Darm keinen schädigenden Einfluß ausübte, während eine toxische Wirkung sich zeigte, sobald diese Aufschwemmungen bzw. Extrakte mit normalem Meerschweinchenserum digeriert wurden. Die Autoren schließen daraus, daß die Bakterienleibessubstanzen

1) Mikrobiologentag Berlin 1912.

an sich ungiftig sind und daß Endotoxine nicht existieren. Uns erscheint dieser Schluß nicht zwingend. Die Experimente von Friedberger und Kumagai zeigen unseres Erachtens nur, daß die Dysenteriebacillen keine primär giftig wirkenden Substanzen (keine „Ektotoxine“) an indifferente Lösungsmittel, wie destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung abgeben; sie widerlegen nicht die Annahme von Endotoxinen, d. h. von Giften, welche an die Leibessubstanzen fest gebunden und von diesen nur durch die Körpersäfte frei zu machen sind. Auch die Versuche Friedbergers¹⁾ mit Mita, in denen gezeigt wird, daß eine und dieselbe Bakterienmenge beim normalen Tier ungiftig, beim präparierten Tier akut giftig und beim antianaphylaktischen Tier wieder ungiftig sich erweist, können uns von der Notwendigkeit, die Endotoxine zu streichen, nicht überzeugen und lassen, wie wir weiter unten zeigen werden, noch eine andere Deutung zu, als sie Friedberger gibt.

Neufeld und Dold gingen in ihren Folgerungen nicht so weit. Sie betrachteten zwar die Entdeckung des Anaphylatoxins als einen wesentlichen Fortschritt für das Verständnis der Infektionsvorgänge, konnten aber in dem vorliegenden Tatsachenmaterial noch keinen zwingenden Grund dafür erblicken, die Existenz der echten Toxine (Diphtherietoxin, Tetanustoxin) sowie der Endotoxine zu leugnen.

Neuerdings hat auch Zinsser²⁾ sich mit dieser Frage beschäftigt. Er kommt zu dem Ergebnis, daß beim Typhusbacillus für die Wirkung eines besonderen Endotoxins kein strikter Beweis vorliege.

R. Pfeiffer und Bessau vertreten einen anderen Standpunkt. Sie unterscheiden drei verschiedene Bakteriengifte: 1) die Ektotoxine (kurzweg Toxine), welche spezifische, nach dem Gesetz der Multipla neutralisierende Antikörper erzeugen; 2) die Endotoxine oder intracellulären Gifte, die ebenfalls spezifische Antikörper erzeugen; diese entgiften das giftige Antigen nicht durch einfache Neutralisation, sondern durch einen Abbau des Endotoxins; sie besitzen Ambozeptor-

1) Diese Zeitschr., Bd. 10, 1911 (XX. Mitteilung).

2) Journ. of exper. Med., 1913, No. 2.

typus und bedürfen zu ihrer Wirkung des im Tierkörper vorhandenen Komplements. Die Entgiftung erfolgt nicht nach dem Gesetz der Multipla. Sowohl Ekto- als Endotoxine erzeugen also eine spezifische Immunität, deren Mechanismus aber verschieden ist; 3) das Anaphylatoxin, durch dessen Einwirkung der Körper in einen Zustand verminderter Reaktionsfähigkeit (aspezifischer Resistenz) versetzt wird.

Die Gegensätze dieser Anschauungen haben bis jetzt noch keine befriedigende Lösung gefunden. Man hat gegen die Annahme einer Identität der Anaphylatoxin- und Endotoxinwirkung angeführt, daß man gegen die Endotoxine Antikörper (Antiendotoxine) erzeugen kann (Besredka), während man gegen das Anaphylatoxin nicht immunisieren kann. Diese Argumentation wäre richtig; wenn es sich beim Anaphylatoxin und Endotoxin um gleichartige Substanzen und Begriffe handeln würde. Dies ist jedoch nicht der Fall. Beim Anaphylatoxin handelt es sich vorderhand noch um eine unfaßbare Substanz, von der wir nur die Wirkung kennen; beim Endotoxin dagegen haben wir die Substanz wenigstens in ihrem Substrat, dem Bakterienprotoplasma, in Händen. Man kann die giftige Substanz von ihrem Substrat nicht trennen; das Substrat wird vielfach mit der giftigen Substanz selbst identifiziert, die Bakterienleiber mit den Endotoxinen.

Das Endotoxin fungiert in der Literatur als Doppelbegriff:

1) als eine an den Bakterienleib gebundene giftige Substanz bzw. als die Leibessubstanz der Bakterien selbst,

2) als eine von diesen Bakterienleibern im tierischen Organismus ausgeübte Giftwirkung.

Aus der unklaren Formulierung dessen, was die Autoren im einzelnen Fall unter „Endotoxin“ verstanden haben wollen, ob sie die giftige Substanz, d. h. die Bakterienleiber, oder ob sie die beobachtete Giftwirkung meinen, sind viele Unstimmigkeiten und scheinbare Gegensätze entstanden. So ist auch der oben erwähnte scheinbare Gegensatz zwischen Anaphylatoxin und Endotoxin bezüglich ihres immunisatorischen Verhaltens, den neuerdings auch Doerr wieder hervorhebt,

zu verstehen. Wenn man das Anaphylatoxin mit Friedberger als ein durch fermentativen Eiweißabbau entstehendes flüchtiges Zwischenprodukt auffaßt, so leuchtet ein, daß man gegen diese Substanz nicht immunisieren kann, während es andererseits ganz in der Ordnung ist, daß man gegen „Endotoxine“, d. h. gegen tote Bakterienleiber, Antikörper erzeugen kann, die unter anderem auch gegen die von diesen Bakterienleibern ausgeübte Giftwirkung gerichtet sind und z. B. durch einen beschleunigten fermentativen Abbau des Bakterien-eiweißes die Giftwirkung verkleinern.

Wie die Dinge bisher liegen, war es nicht möglich, eine Anaphylatoxinwirkung beim Endotoxinversuch auszuschließen. Denn wie wir wissen, ist stets Gelegenheit zur Anaphylatoxinwirkung gegeben, wenn Bakterieneiweiß mit den komplementhaltigen Säften des Körpers in Berührung kommt, und zum Nachweis der Endotoxinwirkung müssen die Endotoxine, d. h. Bakterienleibessubstanzen, einem tierischen Organismus einverleibt werden. Man konnte also die Existenz präformierter Endotoxine, streng genommen, weder bestreiten noch beweisen.

Günstiger liegen die Verhältnisse, wenn man mit Bakterienmaterial arbeitet, das seiner Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung beraubt worden ist. Wie der eine von uns (Dold) in Gemeinschaft mit Levy und später mit Aoki gezeigt hat, ist es möglich, durch wiederholtes Digerieren derselben Bakterienmasse diese so zu verändern, daß sie die Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung nicht mehr besitzt.

Stellt man nun mit solchen „desanaphylatoxierten“ Bakterien den Endotoxinversuch an, so kommt für eine etwaige Giftwirkung das Anaphylatoxin nicht mehr in Frage und es bleibt nur die Annahme eines präformierten Giftes, eines Endotoxins, als Ursache der Giftwirkung.

Solche Versuche haben wir mit Cholera- und Typhusbacillen angestellt und sind dabei in folgender Weise vorgegangen:

Gleiche Mengen von 18-stündigen Cholera- bzw. Typhuskulturen wurden einerseits mit physiologischer Kochsalzlösung, andererseits mit frischem Meerschweinchenserum abgeschwemmt.

Die „Serumbakterien“ wurden dann nach der früher angegebenen Methode (cf. Dold und Aoki, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 18, 1913, Heft 2) teils mit, teils ohne Zuhilfenahme von spezifischem Serum desanaphylatoxiert, während die „Kontrollbakterien“ analog mit 0,85-proz. NaCl-Lösung behandelt wurden, d. h. ebenso oft und ebenso lange mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und gewaschen wurden. Der Unterschied zwischen den „Serumbakterien“ und den „Kontrollbakterien“ bestand nur darin, daß die ersteren mit Serum, die letzteren mit 0,85-proz. NaCl-Lösung behandelt wurden.

Sobald die „Serumbakterien“ desanaphylatoxiert waren, d. h. in drei aufeinanderfolgenden Versuchen kein Anaphylatoxin mehr geliefert hatten, wurden sie vom Serum befreit und in 0,85-proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Analog wurden die Kontrollbakterien auscentrifugiert und in derselben Menge 0,85-proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Die Aufschwemmungen wurden hierauf noch $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt.

Steigende, aber korrespondierende Mengen der „Serumbakterien“ und der „Kontrollbakterien“ wurden nun Meerschweinchen von gleichem Gewicht intraperitoneal eingespritzt und ihre Wirkung beobachtet.

Die Einzelheiten sind aus den folgenden Protokollen und Tabellen ersichtlich. Für die Versuche wurde ein wenig virulenter Cholera- und Typhusstamm unserer Sammlung benutzt.

1. Versuch.

Je 6 Schrägagarkulturen von *V. Cholerae* (18-stündig) wurden nach $\frac{1}{2}$ -stündigem Erhitzen auf 56° C und nach erfolgter Abkühlung mit 20 cem 0,85-proz. steriler Kochsalzlösung bzw. 20 cem frischem Meerschweinchen-serum abgeschwemmt. Nachdem die „Serum“bakterien ebenso wie die Kontrollbakterien 24 Stunden im Eisschrank gehalten waren, wurden sie abcentrifugiert. Der Serumabguß wurde auf seine Giftigkeit im Anaphylatoxinversuch geprüft. Das alte Serum bzw. die alte Kochsalzlösung wurden dann durch dieselbe Menge frischen Serums bzw. frischer Kochsalzlösung ersetzt, wiederum 24 Stunden im Eisschrank inkubiert, abcentrifugiert usw., bis schließlich der Serumabguß im Anaphylatoxinversuch nicht mehr giftig war.

Hierzu waren 9 Serumwechsel notwendig. Es sei nochmals betont, daß die Kontrollbakterien ebenso oft und ebenso

lange mit der gleichen Menge 0,85-proz. Kochsalzlösung vorbehandelt wurden.

Nachdem also die Serumbakterien desanaphylatoxiert waren, wurden Serumbakterien und Kontrollbakterien zentrifugiert und in je 6 ccm 0,85-proz. steriler Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Beide Aufschwemmungen wurden, um sie sicher zu sterilisieren, nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° C erhitzt und dann 4 Meerschweinchen von gleichem Gewicht (300 g) intraperitoneal injiziert. Je 2 Meerschweinchen erhielten 2 und 4 ccm der Serum- bzw. Kontrollbakterien.

Tabelle I. Cholera bacillen.

No.	Gewicht des Meerschweinchens in g	Menge des injizierten Bakterienmaterials	Wirkung
Gewöhnliches Bakterienmaterial	1	ca. 300	2 ccm Aufschwemmung (= 2 Kulturen)
	2	„ 300	4 ccm Aufschwemmung (= 4 Kulturen)
Desanaphylatoxiertes Bakterienmaterial	3	ca. 300	2 ccm Aufschwemmung (= 2 Kulturen)
	4	„ 300	4 ccm Aufschwemmung (= 4 Kulturen)

Man ersieht aus Tabelle I, daß das desanaphylatoxierte Bakterienmaterial weniger giftig ist als das gewöhnliche, mit Kochsalzlösung ebenso oft und lange vorbehandelte Bakterienmaterial.

2. Versuch.

21 Schrägagarkulturen von *V. cholerae* (18-stündig) wurden durch $\frac{1}{2}$ -stündiges Erhitzen auf 56° C abgetötet. Hierauf wurden 10 Kulturen mit 30 ccm steriler 0,85-proz. Kochsalzlösung und 11 Kulturen mit 33 ccm Kochsalzlösung abgeschwemmt. Zu den 11 Kulturenaufschwemmungen wurden 4 ccm frischen Meerschweinchenserums und 3 Tropfen eines 1:10 verdünnten Immunserums (Titer 0,0002) gegeben.

Nach 4-stündigem Aufenthalt im Brutschrank und 20-stündigem im Eisschrank war die Granulabildung noch nicht komplett. Die Granula wurden abzentrifugiert, ebenso die Kontrollbakterien, und mit 30 ccm frischen Meerschweinchenserums bzw. Kochsalzlösung versetzt. Nach 24-stündigem Verweilen im Eisschrank erwies sich der Serumabguß der abzentrifugierten „Serumbakterien“ im Anaphylatoxinversuch noch giftig.

1) Das Peritonealexsudat erwies sich als steril.

Es wurde darum ein neuer Serumwechsel und bei den Kontrollbakterien ein neuer Kochsalzlösungswchsel vorgenommen und nochmals 24 Stunden im Eisschrank digeriert. Der Serumabguß erwies sich nunmehr im Anaphylatoxinversuch ungiftig. Die „Serum“- und „Kontroll“-Bakterien wurden sodann auszentrifugiert, in 10 bzw. 11 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach 1/2-stündiger Erhitzung auf 56° Meerschweinchen von gleichem Gewicht intraperitoneal injiziert.

Tabelle II. Cholerabacillen.

No.	Gewicht des Meerschw. in g	Menge des injizierten Bakterienmaterials	Wirkung
Gewöhnliches Bakterienmaterial	1	ca. 300 2 ccm (= 2 Kulturen)	krank, erholt sich
	2	„ 300 3 ccm (= 3 Kulturen)	krank, erholt sich
	3	„ 300 5 ccm (= 5 Kulturen)	krank, † nach 18 Std. ¹⁾
Desanaphylatoxiertes Bakterienmaterial	4	ca. 300 2 ccm (= 2 Kulturen)	0
	5	„ 300 3 ccm (= 3 Kulturen)	leicht krank, erholt sich
	6	„ 300 6 ccm (= 6 Kulturen)	krank, erholt sich

Die Tabelle II zeigt, daß das desanaphylatoxierte Bakterienmaterial weniger giftig ist als das gewöhnliche, ebenso oft und lange mit der entsprechenden Menge 0,85-proz. Kochsalzlösung vorbehandelte Bakterienmaterial.

3. Versuch.

Dieser Versuch wurde analog dem vorhergehenden angestellt. Es wurden im ganzen 50 Schrägagarkulturen (24-stündig) verwendet, und zwar wurden 2 Portionen à 15 und 35 Röhren-Kulturmasse gemacht. 15 Kulturen wurden als Kontrollbakterien mit 0,85-proz. steriler Kochsalzlösung behandelt, während die von 35 Kulturen stammende Bakterienmasse unter Verwendung von spezifischem Serum und Komplement in Granula verwandelt wurde (35 Kulturen in 45 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt, hierzu 10 Tropfen 1:10 verdünntes Immunsrum [Titer 0,0002] und 5 ccm Komplement). Die Anaphylatoxinbildung hörte erst nach dem zweiten Serumwechsel auf.

Das Ergebnis des Versuches geht aus der Tabelle III hervor:

1) Das Peritonealexsudat erwies sich bei der kulturellen Untersuchung steril.

Tabelle III. Cholera bacillen.

No.	Gewicht des Meerschw. in g	Menge des injizierten Bakterienmaterials	Wirkung
Gewöhnliches Bakterienmaterial	1	ca. 300 4 ccm (= 4 Kulturen)	† nach 12 Std. 30 Min. ¹⁾
	2	„ 300 5 ccm (= 5 Kulturen)	† nach 9 Std. 40 Min. ¹⁾
	3	„ 300 6 ccm (= 6 Kulturen)	† nach 9 Std. ¹⁾
Desanaphylatoxiertes Bakterienmaterial	4	ca. 300 5 ccm (= 5 Kulturen)	krank, erholt sich
	5	„ 300 6 ccm (= 6 Kulturen)	krank, erholt sich
	6	„ 300 7 ccm (= 7 Kulturen)	† nach 12 Std. 15 Min. ¹⁾
	7	„ 300 8 ccm (= 8 Kulturen)	† nach 11 Std. 35 Min. ¹⁾
	8	„ 300 9 ccm (= 9 Kulturen)	† nach 9 Std. 10 Min. ¹⁾

Es zeigte sich auch hier wieder, daß das desanaphylatoxierte Bakterienmaterial zwar nicht ungiftig, aber doch viel weniger giftig ist als das Kontrollmaterial, das ebenso oft und ebenso lange mit der entsprechenden Menge 0,85-proz. Kochlösung vorbehandelt war.

Nachdem die Versuche mit Cholera bacillen eindeutig ergeben hatten, daß das zur Anaphylatoxinbildung befähigte Bakterienmaterial viel weniger giftig war als das gewöhnliche Kontrollmaterial, suchten wir festzustellen, ob dasselbe für den Typhus bacillus zutrifft.

4. Versuch.

Es wurden im ganzen 39 Schrägagarkulturen (18-stündige) durch $\frac{1}{2}$ -stündiges Erhitzen auf 56° C abgetötet und wieder abgekühlt. 15 Kulturen wurden hierauf mit 30 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung, 24 Kulturen mit 48 ccm frischen Meerschweinchenserums abgeschwemmt und 24 Stunden im Eisschrank digeriert. Der Serumabguß erwies sich nach dem Abzentrifugieren der Bakterien im Anaphylatoxinversuch giftig, weswegen frischer Serumwechsel vorgenommen wurde. Es waren im ganzen 11 Serumwechsel notwendig, um zu erreichen, daß die Bakterien kein Anaphylatoxin mehr lieferten. Die Kontrollbakterien wurden mit der entsprechenden Menge Kochsalzlösung ebenso oft und lange gewaschen.

1) Bei der Sektion ergab die kulturelle Untersuchung des Peritonealexsudates in allen Fällen Sterilität.

Schließlich wurden die 24 Kulturen entsprechende Masse desanaphylatoxierter Bakterien in 24 ccm, die 15 Kulturen entsprechende Masse Kontrollbakterien in 15 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, nochmals durch $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen auf 56° C sterilisiert und Meerschweinchen von gleichem Gewicht intraperitoneal eingespritzt (Tabelle IV).

Tabelle IV. Typhusbacillen.

No.	Gewicht des Meerschw. in g	Menge des injizierten Bakterienmaterials	Wirkung
Gewöhnliches Bakterienmaterial	1	ca. 300 3 ccm (= 3 Kulturen)	krank, erholt sich
	2	„ 300 5 ccm (= 5 Kulturen)	† nach 19 Std. ¹⁾
	3	„ 300 7 ccm (= 7 Kulturen)	† nach 18 Std. ¹⁾
Desanaphylatoxiertes Bakterienmaterial	4	ca. 300 3 ccm (= 3 Kulturen)	0
	5	„ 300 5 ccm (= 5 Kulturen)	leicht krank, erholt sich
	6	„ 300 7 ccm (= 7 Kulturen)	leicht krank, erholt sich
	7	„ 300 9 ccm (= 9 Kulturen)	† nach 21 Std. ¹⁾

Auch hier hatten wir dasselbe Resultat. Das desanaphylatoxierte Bakterienmaterial erwies sich viel weniger giftig als das Kontrollmaterial, welches ebenso oft und lange mit korrespondierenden Mengen steriler 0,85-proz. Kochsalzlösung vorbehandelt worden war.

In Tabelle V sind die Ergebnisse der Uebersicht halber nochmals zusammengestellt.

Tabelle V.

Desanaphylatoxiertes Material		Gewöhnliches Material	
Bakterienmenge	Wirkung	Bakterienmenge	Wirkung
a) Cholera-bacillen.			
2 Kulturen	0	2 Kulturen	0
3 „	0	3 „	0
4 „	0	4 „	†
5 „	0	5 „	†
6 „	0	6 „	†
7 „	†	—	—
8 „	†	—	—
9 „	†	—	—

1) Die Peritonealexsudate wurden in allen Fällen bei der kulturellen Untersuchung steril befunden.

Desanaphylatoxiertes Material		Gewöhnliches Material	
Bakterienmenge	Wirkung	Bakterienmenge	Wirkung
b) Typhusbacillen.			
3 Kulturen	0	3 Kulturen	0
5 „	0	5 „	†
7 „	0	7 „	†
9 „	†	— „	—

Man ersieht aus dieser Tabelle, daß in unseren Versuchen die Dosis letalis bei dem gewöhnlichen Cholera- bzw. Typhusbacillenmaterial (Kontrollen) 4 bzw. 5 Kulturen, dagegen bei dem desanaphylatoxierten Cholera- bzw. Typhusbacillenmaterial 7 bzw. 9 Kulturen betrug.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht demnach hervor, daß die „desanaphylatoxierten“ Bakterien zwar kein Anaphylatoxin mehr lieferten, aber trotzdem nicht ganz giftfrei waren. Sie erweisen sich bei intraperitonealer Verimpfung allerdings wesentlich weniger giftig als die gewöhnlichen Kontrollbakterien. Das Giftigkeitsverhältnis der desanaphylatoxierten Bakterien zu den gewöhnlichen Kontrollbakterien war annähernd 1:2.

Es war bisher nur gezeigt worden, daß die sogenannten desanaphylatoxierten Bakterien beim Anaphylatoxinversuch *in vitro* kein Gift mehr liefern. Die Möglichkeit, daß solches Bakterienmaterial trotzdem noch *in vivo* Anaphylatoxin liefern könnte, war *a priori* nicht von der Hand zu weisen¹⁾.

Es war darum noch nötig, zu untersuchen, wie sich solches Bakterienmaterial, das *in vitro* kein Anaphylatoxin mehr liefert, verhält, wenn man es Meerschweinchen in die Bauchhöhle bringt.

Bekanntlich hat Friedberger gezeigt, daß das Anaphylatoxin auch *in vivo* (in der Bauchhöhle von Meerschweinchen) gebildet wird und dort nachgewiesen werden kann. Wir haben uns nun zunächst wieder desanaphylatoxierte, d. h. *in vitro* kein Anaphylatoxin mehr liefernde Bakterien (Cholera-

1) Cfr. Vortrag Dold und Aoki, Mikrobiologenversammlung, April 1913, Berlin.

bacillen) hergestellt. Wir behandelten zunächst die Bacillen einmal mit spezifischem Serum und Komplement, wobei wir aber einen Ueberschuß von spezifischem Serum vermieden. In der Tat waren auch die Bacillen nach dieser Behandlung mit spezifischem Serum und Komplement noch nicht desanaphylotoxiert. Es bedurfte noch einer 2maligen Behandlung mit frischem Meerschweinchenserum (Komplement), bis die Bakterien kein Anaphylatoxin mehr lieferten. Spezifisches Serum wurde dabei nicht mehr verwendet.

Nachdem die Bakterien *in vitro* zweimal kein Anaphylatoxin mehr geliefert hatten, wurden Aufschwemmungen dieser Bakterien 5 normalen Meerschweinchen von 300 g Gewicht intraperitoneal einverleibt, und zwar erhielt jedes Tier 1 ccm Bakterienaufschwemmung, d. h. die einer halben Schrägagar-kultur entsprechende Bakterienmenge. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Tiere getötet, das ganze Peritonealexsudat, mit ca. 1 ccm steriler 0,85-proz. Kochsalzlösung ausgespült, entnommen und (in Mengen von 3—5 ccm) normalen Meerschweinchen von 200 g Gewicht intravenös injiziert. Es wurde vor allem Wert darauf gelegt, daß auch eine eventuelle sofortige Giftbildung dem Nachweis nicht entgehe und darum das 1. Tier sofort nach der Einspritzung des Bakterienmaterials getötet, so daß die Prüfung des Peritonealexsudates schon nach ca. 2 Minuten erfolgen konnte. Das Ergebnis dieser Versuche ist aus Tabelle VI ersichtlich. In keiner der zu verschiedenen Zeitintervallen (ca. 2 Minuten, 20 Minuten, 45 Minuten, 1½, Stunden, 3 Stunden) entnommenen Peritonealflüssigkeit konnte Anaphylatoxin nachgewiesen werden. Das Bakterienmaterial erwies sich also auch im *Vivo*-Versuch als desanaphylotoxiert.

Tabelle VI.

Meerschw. No.	Intraperitoneale Injektion von desanaphylotoxierten Cholerabakterien	Entnahme des Peritonealexsudats u. Prüfung nach	Wirkung
1	1 ccm Bakt. - Aufschwemmung (= 1/2 Agarkultur)	ca. 2 Minuten	0
2	„ dgl.	ca. 20 Minuten	0
3	„	ca. 45 Minuten	0
4	„	ca. 1½ Stunden	0
5	„	ca. 3 Stunden	0

Was nun die Beurteilung unserer Versuchsergebnisse anlangt, so könnte man versucht sein, die tödliche Wirkung des desanaphylatoxierten Bakterienmaterials doch auf eine Anaphylatoxinvergiftung zurückzuführen und anzunehmen, daß das desanaphylatoxierte Material zwar keine akut tödliche Giftosis mehr liefert, aber doch noch kleine Anaphylatoxinsmengen, welche eine kumulative Giftwirkung entfalten. Gegen die Annahme einer solchen Kumulation des Giftes spricht aber 1) die allgemein beobachtete Flüchtigkeit des Giftes, die besonders im lebenden Organismus zur Geltung kommt, und 2) der Umstand, daß wir vielfach unsere Bakterien mit Hilfe von spezifischem Serum desanaphylatoxiert haben; bei Verwendung von spezifischem Serum findet aber, wie besonders die Untersuchungen Friedbergers zeigten, ein noch rascherer Abbau des Giftes statt.

Daß die Kumulation bei der Anaphylatoxinvergiftung in vivo keine große Rolle spielen dürfte, geht auch noch aus folgender Ueberlegung hervor: Wenn man bedenkt, daß 1 Oese Cholerabacillen in vitro eine, ja vielleicht mehrere letale Dosen Anaphylatoxin liefern kann, so muß es auffallen, daß in unseren Versuchen (cfr. Tabelle V) bis zu drei Kulturen gewöhnlichen Bakterienmaterials (das also sicher Anaphylatoxin lieferte) von den Versuchstieren vertragen wurden. Man kann sich dies nur dadurch erklären, daß das Anaphylatoxin in vivo rasch abgebaut wird und keine Neigung zur Kumulation zeigt.

Die Ergebnisse unserer Versuche können unseres Erachtens nur so gedeutet werden, daß die beim gewöhnlichen Endotoxinversuch (intraperitoneale Verimpfung von toten Bakterienleibern) auftretende Giftwirkung sich aus zwei Komponenten zusammensetzt. Eine davon ist Anaphylatoxinwirkung; sie kommt bei Verwendung von desanaphylatoxiertem Bakterienmaterial in Wegfall. Die andere Komponente dürfte vorderhand noch als echte Endotoxinwirkung zu bezeichnen sein.

Wir haben oben die Versuche Friedbergers und Mitas erwähnt, die zeigten, daß eine und dieselbe Bakterienmenge beim normalen Tier ungiftig, bei präparierten Tier

akut giftig und beim antianaphylaktischen Tier wieder ungiftig sein kann. Diese Ergebnisse kollidieren unseres Erachtens nicht mit der Annahme von Endotoxinen. Man könnte sie auf Grund unserer Versuche folgendermaßen deuten: Die Endotoxinkomponente war in allen drei Fällen dieselbe, nämlich untötlich bzw. untergiftig. Die Giftigkeit war durch die Anaphylatoxinkomponente bedingt, die beim normalen Tier klein, beim präparierten groß und beim anti-anaphylaktischen wieder klein war.

Es behalten demnach die Endotoxine R. Pfeifers neben dem Bakterienanaphylatoxin Friedbergers ihre Existenzberechtigung.

Zusammenfassung.

Desanaphylatoxierte Bakterien (Cholerabacillen), d. h. Bakterien, welche durch wiederholte Vorbehandlung mit frischem Meerschweinchenserum ihrer Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung *in vitro* beraubt worden waren, lieferten auch *in vivo* (in der Bauchhöhle der Meerschweinchen) kein Anaphylatoxin mehr. Solches Bakterienmaterial (Typhusbacillen und Cholerabacillen) erwies sich aber bei intraperitonealer Verimpfung keineswegs als „entgiftet“; es war nur beträchtlich weniger giftig als das Kontrollmaterial, welches in der gleichen Weise statt mit Serum mit physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt worden war.

Wir schließen daraus, daß die beim gewöhnlichen Endotoxinversuch (intraperitoneale Verimpfung von toten Bakterienleibern) auftretende Giftwirkung aus zwei Komponenten sich zusammensetzt: aus einer Anaphylatoxinwirkung und der eigentlichen Endotoxinwirkung.

Nachdruck verboten.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des städtischen Untersuchungsamtes in St. Petersburg (Leiter: Dr. Jakowlew) und aus dem hygienischen Laboratorium des weiblichen medizinischen Instituts (Vorstand: Prof. Chlopin).]

Zur Frage über Cholera-Toxine und -Antitoxine.

Von Dr. med. **L. Horowitz,**

Assistentin des städtischen Untersuchungsamtes.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Juni 1913.)

Die Frage über die echte Natur der Choleraintoxikation ist bekanntlich noch nicht völlig aufgeklärt und wird von verschiedenen Forschern auf verschiedene Weise beantwortet.

Die Theorie, welche die Choleragifte für nichtspezifische chemische Körper hält, hat nur wenige Anhänger. Daß Nitritproduktion allein, so wichtig sie auch sein mag, nicht [trotz Emmerichs (1, 2, 3, 4) geistreichen Ansichten] genügt, um alles im Cholera-vorgange zu erklären, liegt auf der Hand; es bleibt immer die Tatsache übrig, daß tote Cholera-vibrionen im Tierkörper auch eine spezifische toxische Wirkung entfalten.

Nach Ruata (5) sei die schädigende Wirkung der Cholera-vibrionenkulturen an Ammoniakbildung gebunden; Huntemüller (6) schreibt sie hauptsächlich der hämolytischen Wirkung zu usw.

Es ist kaum zu bezweifeln, daß verschiedene vitale Funktionen der Cholera-vibrionen, wie Nitritproduktion, hämolytische Wirkung usw., eine gewisse Rolle im Krankheitsvorgange zu spielen vermögen; nichtsdestoweniger leuchtet es aus allen Immunitätserscheinungen hervor, daß wir es bei der Choleraerkrankung mit einer spezifischen Intoxikation zu tun haben. Die Natur dieser spezifischen Toxine ist bekanntlich auf verschiedene Weise erklärt worden. Pfeiffer (7, 8, 9, 10, 11, 12), der Begründer der Endotoxinlehre, kommt auf Grund seiner zahlreichen Untersuchungen zu dem Schluß, daß Cholera-vibrionen keine echten resp. löslichen Toxine ausscheiden, sondern giftige Substanzen in der Bakterienzelle selbst enthalten und sie nur dann ins Nährsubstrat abgeben, wenn die Zelle zugrunde geht. Kolle (13, 14, 15), Hahn (13), McFadyen (17), Gamaleia (18), Krawkow (19), Burgers (20), Carrière und Tomarkin (21), Wassermann (22), Schurupow (23), Galeotti (24), Strong (25) u. a. sind auch dieser Meinung geneigt. Dagegen halten es Metschnikoff, Roux und Taurelli-Salimbeni (26), Ransom (27), Brau und Denier (28), Westbrook (29), Kraus mit seinen Schülern (30, 31, 32, 33, 34) u. a. für möglich, unter gewissen Bedingungen echte Cholera-toxine zu gewinnen.

Hier sei erwähnt, daß Salimbeni in seinen späteren Untersuchungen (35, 36) Choleratoxine durch Autolyse der Vibriozellen herstellte — folglich hatte er in diesem Falle wiederum mit Endotoxinen zu tun.

Diese Widersprüche sind leicht zu fassen, wenn man alle Schwierigkeiten im Auge behält, auf welche derartige Untersuchungen stoßen.

Erstens ist es unmöglich, lösliche Produkte der Lebenstätigkeit der Bakterien und deren Zellprodukte in Nährmedien voneinander zu trennen; es folgt daraus, daß die Giftigkeit der Filtrate keineswegs genügt, um die Produktion der echten Toxine nachzuweisen.

Zweitens ist bis jetzt kein sicherer Beweis geliefert, daß die antigene Wirkung ausschließlich den echten Toxinen eigen ist, den Endotoxinen aber völlig fehlt; es ist also nicht ausgeschlossen, daß es bei zweckmäßiger Gewinnungsmethode der Endotoxine (resp. bei möglichst schonendem Eingriffe in Bakterienzellen) möglich wäre, deren antigene Eigenschaft zutage zu bringen. Es ist damit gesagt, daß die An- oder Abwesenheit der antigenen Wirkung die Frage über die Art der bis jetzt hergestellten Toxine noch nicht definitiv entscheidet.

Endlich spricht die toxinzerstörende Wirkung eines Immunserums nicht immer zugunsten seiner antitoxischen (im gewöhnlichen Sinne dieses Wortes) Wirkung: Pfeiffer und Bessau (38) namentlich haben für verschiedene Sera, die als antitoxisch galten [von Besredka (39), von Mc Fadyen] nachgewiesen, daß ihre Wirkungsweise grundverschieden von der echt antitoxischen ist und deshalb keinen sicheren Beweis der antigenen Wirkung der Endotoxine erbringt.

Als wir nach der Choleraepidemie von 1909—1910 Untersuchungen über Choleratoxine unternahmen, bestrebten wir uns anfangs, die günstigsten Bedingungen für die Bildung löslicher Toxine (falls Choleravibrionen solche ausscheiden) zu finden.

Für diese Untersuchungen verwendeten wir einen aus den Reisstühlen eines Choleraerkrankten gezüchteten Stamm, der normale Morphologie und eine endständige Geißel hatte, Gelatine verflüssigte und eine intensive Nitrosoindolreaktion ergab. Seine hämolytische Wirkung war deutlich ausgeprägt (eine Eigenschaft, die wir stets für frisch aus den Faeces gezüchtete Cholerastämme beobachteten). Das Choleraserum agglutinierte ihn bis zur Titergrenze (1 : 10 000); der Pfeiffersche Versuch ebenso wie die Reaktion der Komplementablenkung fiel für ihn positiv aus. 1 Oese lebender Agarkultur tötete bei intraperitonealer Einführung ein Meerschweinchen von 200 g binnen 24 Stunden.

Die Toxizität der bei 60° getöteten Kultur war nur wenig ausgeprägt — 1 Agarkultur genügte meistens nicht, um ein Meerschweinchen bei intraperitonealer Einführung zu töten; nach der Einführung von 1 $\frac{1}{2}$ —2 durch Erhitzung getöteten Agarkulturen starben die Tiere regelmäßig binnen 12 bis 24 Stunden und die Sektion ergab eine starke Hyperämie der Bauchhöhle und die Bildung eines serösen oder bluthaltigen Exsudats in ver-

schiedener Menge, das sich fast immer als steril erwies. Dasselbe Resultat ließ sich beobachten, wenn man statt der erhitzten Kulturen die durch Trocknung getöteten verwendete, auch dann, wenn sie nicht in die Bauchhöhle, sondern subkutan injiziert wurden, in diesem Falle war eine größere Dosis nötig.

Um toxische Filtrate zu bekommen, züchteten wir denselben Cholerastamm in verschiedenen flüssigen Nährmedien, nämlich Bouillon, Bouillon mit Pferdeserum, Bouillon mit 1 Proz. Glukose versetzt, im flüssigen Dünndarminhalt eines Hundes, den man aus der Darmfistel nach der Fütterung mit Kasein bekam usw. Das letzte Nährmedium war wegen der Voraussetzung gewählt, daß der Darminhalt über die Entwicklung des Cholera vibrio die günstigste Wirkung ausüben soll.

Die Filtrate der Bouillonkulturen erwiesen sich sogar nach einer Woche als sehr giftarm, die minimale letale Dosis war nicht weniger als 6 ccm.

In unserem aus dem Darminhalt hergestellten Nährboden (2 Proz. Gehalt von getrocknetem Pulver, Zusatz von Natriumbikarbonat in solcher Menge, daß bei Titrierung 10 ccm 2 ccm $\frac{1}{10}$ NaOH-Lösung entsprachen) entwickelten sich die Cholera vibrien recht gut während 48 Stunden, später gingen sie allmählich zugrunde. So enthielt 1 ccm nach 24 Stunden 7200 Millionen lebensfähige Individuen, nach 48 Stunden 11 700 Millionen, nach 72 Stunden nur 36 Millionen. Nach 12 Tagen lassen sich in Präparaten unter den typischen manche Involutionsformen, wie große sphärische und vakuolierte Formen, erblicken; trotzdem ergibt die Aussaat auf Agar die Reinkultur mit typischer Morphologie.

Nach 5—6 Tagen werden diese Involutionsformen zahlreicher und in diesem Augenblick gibt die Aussaat auf Agar die Reinkultur, deren Morphologie merklich von der typischen abweicht — die Vibrien sind dünn, länglich, schwach gekrümmt (überhaupt den inagglutinablen Vibrien ähnlich, die wir öfters im Stuhle der genesenden Cholerakranken finden), ihre spezifische Agglutinabilität aber bleibt unverändert. Diese Mutation läßt sich in einer Reihe von Züchtungen auf Agar beobachten (8 binnen 2 Monaten) und später gewinnt der Cholerastamm allmählich seine typische Morphologie wieder.

Wird die Darminhaltmediumkultur nach 2 Tagen, wenn ihre Vitalität das Maximum erreicht, durch die Kerze filtriert, so erweist sich das Filtrat in der Dosis von 4 ccm als unschädlich. Nach 6, 5 und sogar nach 3 Tagen, wenn die Vibrionen massenhaft zugrunde gehen, steigt die Toxizität des Filtrates, so daß 4 ccm regelmäßig das Meerschweinchen töten — das Krankheitsbild und die Ergebnisse der Sektion sind genau denen ähnlich, die man bei der Intoxikation durch tote Vibrionen beobachtet.

Man gewinnt also den Eindruck, daß die Toxizität der Filtrate nicht von der Vitalität der Kultur, sondern im Gegenteil von der Intensität des Absterbens der Choleravibrioellen abhängt.

Es ist bemerkenswert, daß solche toxische Filtrate keine Spur von Biuretreaktion zeigten (ebenso wie das Nährmedium selbst) — es scheint daraus zu folgen, daß diese Toxine nicht zu den proteinartigen oder peptonartigen Körpern gehören, sondern vielmehr Produkte tieferen Abbaues vorstellen. Westbrook hat bekanntlich dieselbe Beobachtung gemacht. In einigen Fällen gelang es uns, die Toxizität solcher Filtrate derartig zu steigern, daß 2 ccm genügten, um das Meerschweinchen zu töten: nämlich, wenn wir den Choleravibrio mit *Sarcina lutea* zusammen züchteten.

Die Filtrate der Kulturen in Bouillon mit 1 Proz. Gehalt von Glukose erwiesen sich als die giftigsten.

In diesem Nährboden geht die Entwicklung der Choleravibrionen binnen 10—12 Stunden ziemlich gut, so daß die Flüssigkeit getrübt wird (1 ccm, der 100 Keime enthält, ergibt nach 10 Stunden bei 37° schon 2 000 000), aber schon am Ende des 1. Tages geht das Absterben so rasch, daß am 3. Tage die Kultur in toto sich als völlig steril erweist.

Diese Autosterilisation der Kultur wird auch dann erzielt, wenn das Nährmedium mit sehr großen Mengen von Vibrionen beschickt ist, wenn z. B. 4 Agarkulturen in 10 ccm Bouillon mit Glukose aufgeschwemmt werden: schon nach 2 Tagen ergibt die Aussaat von 1 ccm und mehr kein Wachstum.

Die Wirkung kleiner Glukosemengen auf die Vitalität der Bakterien wurde schon von Th. Smith (40) und später von Levy und Blumen-

thal (41) u. a. hervorgehoben. Nach Hellströms (42) Untersuchungen stirbt der Choleravibrio in Bouillon mit 0,1 Proz. Glukosegehalt so rasch ab, daß eine Oese, die 30240 Keime enthielt, sich nach 48 Stunden als steril erwies; das Nährmedium, das anfangs alkalisch war (10 ccm entsprachen 0,2 ccm $\frac{1}{10}$ -n. NaOH), wird dabei sauer (10 ccm entsprechen 1,1 ccm $\frac{1}{10}$ -n. HCl). Unter anderen geprüften Bakterienarten erwiesen sich die Cholera-vibrien am wenigsten gegen die Säurewirkung widerstandsfähig, was in vollem Einklange mit ihrer Vorliebe für stark alkalische Nährmedien steht.

Nach Gosio (43) ist die Fähigkeit des Choleravibrio, Glukose mit Säurebildung zu vergären, ziemlich ausgeprägt.

In unseren Versuchen ergab die Kultur auch die rasche Steigerung des Säuregehalts — nach 24 Stunden entsprach der Säuregehalt in 10 ccm 2 ccm $\frac{1}{10}$ -n. HCl (10 ccm sterilen Nährmediums entsprachen 0,5 ccm $\frac{1}{10}$ -n. NaOH); nach dem Absterben der Vibrien konnten wir während 3 Wochen keine weitere Zunahme der Säuremenge beobachten. Es handelt sich also in diesem Falle um die Säurebildung, die durch die Lebenstätigkeit der Vibrien bedingt wird. Das massenhafte Absterben der Vibrien scheint eine direkte Folge dieser Säurebildung zu sein (tatsächlich liegen die Verhältnisse in Bouillon mit demselben Säuregehalt ganz ähnlich), es ist dabei höchst wahrscheinlich, daß kleine Mengen der Säure in statu nascendi einen relativ milden Eingriff vorstellen, der den Abbau der Zellen und den Austritt ihrer toxischen Bestandteile begünstigt, ohne sie dabei bedeutend zu schädigen.

Nach 1—2 Tagen des Verweilens in Bouillon mit 1 Proz. Glukose erleiden die Choleravibrien einige Aenderungen in ihrer Struktur — die inneren Teile der Zellen bleiben nämlich ungefärbt, als ob das Innere der Zelle leer wäre; später werden sie immer dünner, kürzer und blasser (in gefärbten Präparaten), so daß das Bild dem Anfangsstadium der Bakteriolyse etwas ähnlich ist; die Agglutinabilität aber bleibt normal.

Die sterilen Filtrate solcher 3- und sogar 2-tägigen Kulturen erwiesen sich als giftig, so daß 1 ccm ein Meerschweinchen bei intraperitonealer Einführung regelmäßig binnen 12 bis 18 Stunden tötete.

In einigen Fällen wurde derselbe Effekt mit $\frac{1}{2}$ ccm erzielt. Die relativ hohe Toxizität dieser Filtrate scheint einen neuen Beweis zu bringen, daß es sich hier um toxische Zerfallsprodukte der Bakterienleiber resp. um Endotoxine handelt.

Wir haben auch verschiedene andere Filtrate auf Toxingehalt geprüft, namentlich das Filtrat der bis 60° erhitzten Aufschwemmung der Agarkulturen, ferner die Filtrate der Aufschwemmungen in destilliertem Wasser, in der physiologischen Kochsalzlösung, in Wasser mit 5 Proz. Glukose, in der oben erwähnten sauren Bouillon.

Bei der Erhitzung bis 60° während 2 Stunden wird auch eine gewisse Menge von Endotoxinen aus den Vibriozellen ausgelaugt und in der Aufschwemmungsflüssigkeit gelöst. Pfeiffer hat tatsächlich schon im Jahre 1893 gezeigt, daß die Filtrate der vorher erhitzten Bouillonkulturen toxischer werden.

Diese Erhitzungsmethode erweist sich jedoch für die Gewinnung der Endotoxine als weniger vorteilhaft — um eine tödliche Dosis des gelösten Toxins zu gewinnen, mußten wir nicht weniger als 5 Agarkulturen derartig verarbeiten. Es scheint also, daß in diesen Verhältnissen der größte Teil des Endotoxins an den Bakterienleibern haftet — umgekehrt bei dem Absterben der Vibrionen in Glukosebouillon scheint der größte Teil der Endotoxine in die Lösung überzugehen, so daß ein Quantum des sterilen Filtrats sich immer als giftiger erweist, als die Menge toter Vibrionen, die in demselben Quantum aufgeschwemmt ist — die Meerschweinchen, die z. B. $\frac{1}{2}$ ccm der autosterilisierten Glukosebouillonkultur erhalten, bleiben gewöhnlich am Leben, während die Tiere, denen 1 ccm des Filtrats einverleibt wird, regelmäßig zugrunde gehen.

Die anderen oben erwähnten Flüssigkeiten erwiesen sich als weniger für die Endotoxingewinnung passend; die Giftigkeit dieser Filtrate war sogar nach 7—10-tägiger Autolyse bei 37° immer niedriger als die der Glukosebouillonfiltrate.

Es ist bemerkenswert, daß die Ausbeute der Endotoxine in saurer Bouillon auch weniger bedeutend war als in Glukosebouillon. Es soll daran liegen, daß die Säure in statu nascendi, die in Glukosebouillon allmählich von der Vibrionentätigkeit selbst gebildet wird, die Endotoxine in milderer schonender Weise (im Gegensatz zur präformierten Säure oder der Erhitzung), ohne sie abzuschwächen, auslaugt. Ferner ist zu bemerken, daß in den oben erwähnten Flüssigkeiten, wie Wasser, wässrige Glukose oder NaCl-Lösungen, saurer Bouillon usw. die Vermehrung der eingeführten Choleravibrionen nicht eintritt resp. die totale Menge des Giftes bleibt telle quelle;

in Glukosebouillon dagegen geht die Vermehrung in den ersten Stunden ziemlich gut vor sich, so daß die totale Menge und damit die Menge der ausgelaugten Endotoxine bedeutend steigt.

Die gelösten Toxine solcher Filtrate erweisen sich in ihrem Verhalten gegen verschiedene Einwirkungen als völlig mit den Toxinen toter Cholera-vibrionen identisch.

Im Gegensatz zu den echten Toxinen wie diphtheritische usw., sind sie thermostabil. 1-stündiges Erhitzen bis 60° zerstört sie nicht, ebenso wie das Kochen während 15 bis 20 Minuten. Hier soll daran erinnert werden, daß die von Metschnikoff, auch von Brau und Denier dargestellten Cholera-toxine auch thermostabil waren.

Nach der Einwirkung von 100° während 1 Stunde wird die tödliche Dosis des gelösten Toxins (ebenso wie die entsprechende Dosis toter Vibrionen) unschädlich.

3-wöchentliches Verweilen bei Zimmertemperatur schwächt diese Toxine nicht ab.

Die tödliche Dosis des gelösten Toxins erweist sich für die mit toten Cholera-vibrionen immunisierten Meerschweinchen als unschädlich. [Um Irrtumsquellen zu vermeiden, die von Issaïew (44) hervorgehoben wurden, führten wir die Vaccine intraperitoneal, die gelösten Toxine subkutan ein oder vice versa, in anderen Versuchen wurde zweimal die intraperitoneale Einverleibung nach einem Zeitraum von 2—4 Wochen ausgeführt.] Umgekehrt vertrugen die mittels gelösten Toxinen immunisierten Meerschweinchen die tödliche Dosis toter Cholera-vibrionen ganz glatt.

Alle diese Tatsachen weisen darauf hin, daß diese toxischen Filtrate nichts anderes als Endotoxinlösungen sind.

Aus dem obigen ist ersichtlich, daß diese Endotoxinlösungen in stande sind, immunisatorisch zu wirken.

Um ihre antigene Wirkung genau zu prüfen, haben wir mit diesen sterilen toxischen Filtraten Kaninchen immunisiert.

Da zwei Immunisierungsversuche ganz ähnlich verliefen, führen wir, um Wiederholungen zu vermeiden, nur den ersten Versuch ausführlich an.

2. XII. Es wird *intra venam* $\frac{1}{2}$ ccm des Filtrats einer 5-tägigen Glukosebouillonkultur eingeführt. Gewicht des Tieres 1640 g.
12. XII. Gewicht 1590 g, Einführung von 1 ccm. Agglutinationstiter des Serums 1:10.
14. XII. Gewicht 1690 g, Einführung von 1 ccm.
16. XII. Gewicht 1730 g, 1 ccm. Agglutinationstiter 1:100.
18. XII. Gewicht 1760 g, 1 ccm. Agglutinationstiter 1:200.
21. XII. Gewicht 1700 g, 1 ccm. Agglutinationstiter 1:200.
26. XII. Gewicht 1700 g, 2 ccm.
28. XII. Gewicht 1750 g, 2 ccm. Agglutinationstiter 1:200.
30. XII. Gewicht 1750 g, 2 ccm. Agglutinationstiter 1:200.
3. I. Das Tier wird getötet.

Die Prüfung dieses Serums, das wir als Serum f bezeichnen, ergibt, daß es sehr arm an antiinfektiösen Immunkörpern ist. Der Agglutinationstiter steigt nicht über 1:200; 0,1 ccm ist nicht imstande, eine Oese lebender Cholera-vibrionen in Pfeiffers Versuch zu lösen.

Trotzdem besitzt dieses Serum eine gewisse, nicht unerhebliche toxinzerstörende Eigenschaft. Die Meerschweinchen, die eine tödliche Dosis des toxischen Filtrates mit 0,02 ccm Serum f erhalten, bleiben am Leben, während Kontrolltiere, denen dieselbe Dosis des Toxins mit 1,0 ccm Normalkaninchenserum einverleibt wird, in der Nacht zugrunde gehen.

Der niedrige Agglutinationstiter dieses Serums berechtigt den Schluß zu ziehen, daß das toxische Filtrat nur sehr geringe Mengen von Rezeptoren enthält. Es kann daran liegen, daß die Rezeptoren an der Zelle fester als deren toxische Bestandteile haften und bei diesen Bedingungen nicht abgespalten werden; es mag auch sein, daß sie, wenn auch gelöst, nicht durch den Filter gehen.

Die Untersuchungen von Bertarelli (45), der nachweisen konnte, daß die Flüssigkeit die Produkte der Autolyse von Cholera-vibrionen enthält und nur geringe agglutinogene Eigenschaften besitzt, sprechen aber zu gunsten der ersteren Hypothese.

Es soll aber hinzugefügt werden, daß eine tödliche Dosis der toten Cholera-vibrionen sogar durch 0,2 ccm Serum nicht entgiftet wurde. Nach dem Tode des Tieres erwies es sich, daß das Peritonealexsudat sehr zahlreiche gut erhaltene tote Vibrionen enthielt.

Es lohnt sich, diese Ergebnisse mit denen zu vergleichen, die sich bei der Prüfung des durch Immunisierung mit er-

hitzten Vibrionen gewonnenen Serums (Serum M) beobachten lassen.

Nach fünf Inokulationen (im ganzen drei Agarkulturen binnen 2 Wochen) ist der Agglutinationstiter 1:20 000, der bakteriolytische Titer 0,0001 mg.

Die toxinzerstörende Wirkung dieses Serums ist weniger ausgeprägt als die des Serums f, obgleich sein bakteriolytischer Titer mehr als tausendfach höher ist. Um eine tödliche Dosis des toxischen Filtrates zu entgiften, ist es nötig, 0,2 ccm zu verwenden. Dieselbe Serumdosis macht auch eine tödliche Dosis der toten Vibrionen unschädlich.

Ein anderer Immunisierungsversuch mit toxischen Filtraten ergab völlig übereinstimmende Resultate. Um das Serum herzustellen, das neben toxinschädigenden auch antiinfektiöse Antikörper enthielt, haben wir als Vaccine die 2—8-tägige Glukosebouillonkultur in toto verwendet resp. die Flüssigkeit, die neben den ausgelaugten gelösten Endotoxinen auch abgestorbene Vibrionen enthielt und dabei sich immer als absolut steril erwies.

2. I. Ein Kaninchen (Gewicht 1550 g) bekommt intravenös 1 ccm der 4-tägigen Kultur.
6. I. Gewicht 1470 g, 2 ccm der 8-tägigen Kultur. Das Serum agglutiniert den homologen Cholerastamm 1:1000.
10. I. Gewicht 1462 g, 2 ccm der 3-tägigen Kultur. Der Agglutinationstiter ist 1:2000.
12. I. Gewicht 1420 g, 2 ccm der 5-tägigen Kultur. Der Agglutinationstiter ist 1:10 000.
16. I. 2 ccm der 2-tägigen Kultur. Der Agglutinationstiter ist 1:20 000.
20. I. Gewicht 1430 g, 2 ccm der 3-tägigen Kultur. Der Agglutinationstiter ist 1:20 000.
22. I. Gewicht 1430 g, 3 ccm der 5-tägigen Kultur. Der Agglutinationstiter ist 1:20 000.
24. I. Gewicht 1380 g, 2 ccm der 7-tägigen Kultur.
26. I. Gewicht 1380 g, 2 ccm der 3-tägigen Kultur.
30. I. Das Tier wird getötet.

Die Prüfung dieses Serums, das wir als Serum t bezeichnen, ergibt folgende Resultate:

Der Agglutinationstiter ist 1:20 000.

0,0001 mg genügt, um eine Oese lebender Choleravibrionen im Pfeifferschen Versuch zu lösen (niedrigere Mengen von Serum wurden nicht geprüft).

Um die toxinschädigende Wirkung dieses Serums zu bewerten, bestreben wir uns, folgende Fragen zu beantworten:

1) Werden die gelösten Cholera-toxine durch dieses Serum wirksamer entgiftet als durch normales Kaninchenserum oder durch Immunserum?

2) Werden durch dieses Serum Toxine der toten Cholera-vibrionen entgiftet?

3) Falls dieses Serum die toxinzerstörende Wirkung wirklich besitzt, wirkt sie nach dem Gesetze der Multipla oder nicht?

4) Wirkt dieses Serum in derselben Weise, wenn es unabhängig von Toxinen einverleibt wird oder nicht?

5) Wirkt es als Heilserum resp. vermag es die vorgeschrittene Cholera-intoxikation im Tierkörper zu bekämpfen?

1) Die erste Frage wird im positiven Sinne beantwortet.

0,01 ccm Serum macht eine tödliche Dosis unseres Toxins völlig unschädlich, wenn beide Flüssigkeiten zusammen eingeführt werden (dabei wird immer deutliche Präzipitation beobachtet). Normales Kaninchenserum, sogar in der Dosis von 1 ccm, übt keine toxinschädigende Wirkung aus, das Serum M erweist sich in denselben Verhältnissen nur in der Dosis von 0,2 ccm als wirksam.

Hier wäre darauf hinzuweisen, daß die toxinschädigende Wirkung des Serums t sich als bedeutender erweist als die des Serums f. Es ist wahrscheinlich, daß dieser Unterschied von der größeren Giftigkeit des Antigens selbst bedingt wird. Bei der Filtrierung sollen tatsächlich gewisse Mengen der ausgelagten Toxine, die an den Bakterienzellen haften, auf dem Filter zurückgehalten werden.

2) Was die toten Cholera-vibrionen betrifft, wird eine tödliche Dosis der erhitzten Agarkultur völlig durch 0,05 ccm Serum unschädlich gemacht; 2 tödliche Dosen zu entgiften sind sogar 0,2 ccm Serum nicht imstande.

3) 5 tödliche Dosen unseres Toxins mit 0,05 ccm Serum t werden fast glatt vertragen (die Temperatur geht nicht unter $36,5^{\circ}$ und das Tier bleibt gesund); dasselbe gilt für 8 Dosen. Nach der Einführung von 10 tödlichen Dosen des toxischen Filtrates (die den Tod der Kontrolltiere schon nach 2—3

Stunden herbeiführen) mit 0,1 oder 0,15 ccm Serum t vermag das Serum nicht das Gift unschädlich zu machen und der Tod tritt, obgleich viel später, nach 30—48 Stunden, ein.

4) Eine tödliche Dosis des gelösten Toxins wird durch entsprechende Menge Serum t auch dann unschädlich gemacht, wenn beide Flüssigkeiten unabhängig voneinander subkutan an verschiedenen Stellen eingeführt werden. Multiple Dosen in dieser Weise zu prüfen war jedoch unmöglich, weil es nötig würde, zu große Mengen von Flüssigkeit subkutan einzuführen (um den Tod des Tieres bei subkutaner Injektion hervorzurufen, war die dreifache Dosis von Filtrat nötig).

5) Um die Frage über die heilende Wirkung des Serums zu erörtern, stellt dessen Anwendung nach der experimentellen Infektion, wenn die Intoxikation schon zutage tritt, die zweckmäßigste Methode dar, da in diesem Falle wir mit dem natürlichen Intoxikationsvorgange zu tun haben. Wenn auch die experimentelle Choleraeptikämie der Meerschweinchen mit der Darmcholera des Menschen nicht völlig identisch ist, sollen jedoch diese zwei Vorgänge hinsichtlich der Serotherapie nicht so gründlich verschieden sein, wie es von manchen Forschern hervorgehoben wurde.

In beiden Fällen ist tatsächlich die Aufgabe der Serotherapie zweifach: sie soll Toxine, die schon ins Blut hineingelangt sind, entgiften und weitere Toxinbildung verhindern (Bakteriolyse). Für die erstere Aufgabe sind in beiden Fällen die Verhältnisse völlig identisch; es liegt tatsächlich wenig daran, wo die Toxinbildung stattfindet, (im Darm in der Bauchhöhle oder im Blutkreislaufe selbst), da die Toxine ebenfalls gleich ins Blut gelangen und da mit den entsprechenden Antikörpern zusammentreffen.

Für die Bakteriolyse dagegen liegen die Verhältnisse in beiden Fällen etwas anders. Bei der experimentellen Choleraeptikämie der Meerschweinchen treffen die Vibrionen ebenso wie Toxine mit den Antikörpern im Blutkreislaufe zusammen, bei der Darmcholera dagegen sind die im Darmlumen beherbergten Vibrionen den Bakteriolytinen weniger zugänglich. Es ist aber höchst wahrscheinlich, besonders wenn man die intensive Transsudation im Auge behält, die vom Cholerafall bedingt wird, daß die ins Blut eingeführten Antikörper samt

anderen Bestandteilen des Blutplasmas ins Darmlumen in ziemlich bedeutenden Mengen gelangen.

Um die heilende Wirkung des Serums t zu prüfen, impften wir Meerschweinchen intraperitoneal mit ein oder mehreren letalen Dosen lebender Choleravibrionen und führten einige Stunden später kleine Mengen des Serums t oder M ein.

Es erwies sich, wie es zu erwarten war, daß die Anwendung des Serums t desto günstigere Resultate ergab, je kleiner die Dosis der eingeführten Vibrionen und je kürzer die Dauer der Erkrankung war; dabei erwies sich, daß das Serum t Tiere sogar in den Fällen rettete, wo das Serum M von derselben bakteriolytischen Kraft sich als machtlos erwies.

Wird z. B. eine tödliche Dosis resp. eine Oese lebender Vibrionen intraperitoneal einverleibt und 3 Stunden später, wenn die Temperatur schon um $1,5^{\circ}$ gesunken ist, 0,4 ccm des Serums t intraperitoneal eingeführt, bleibt das Tier am Leben (Gewicht 135 g).

Werden zwei tödliche Dosen und $3\frac{1}{2}$ Stunden später 0,4 ccm Serum t eingeführt (die Temperatur ist schon um 2° gesunken), so beginnt die Temperatur wieder zu steigen und das Tier geniest. 1 Stunde nach Einführung des Serums ergab ein Tropfen des Bauchexsudates keine lebensfähigen Vibrionen (Gewicht des Tieres 170 g).

Dasselbe Resultat wird auch dann erzielt, wenn ein Meerschweinchen (Gewicht 150 g) mit vier tödlichen Dosen lebender Choleravibrionen infiziert wird und 4 Stunden später 0,5 ccm Serum t bekommt.

Ein anderes Meerschweinchen (Gewicht 150 g), das mit derselben Dosis infiziert wird und 4 Stunden später 0,5 ccm des Serums M bekommt, geht nach 8 Stunden (resp. 4 Stunden nach Serumeinführung) zugrunde.

Es soll hier erwähnt werden, daß Raskin, die das Cholera-serum von Schurupow prüfte, niemals einem Heileffekt, bei der Einführung des Serums 4 Stunden nach der Erkrankung beobachten konnte.

Wurde aber in unseren Versuchen eine zu große Dosis (wie 10 tödliche Dosen) lebender Vibrionen einverleibt, so konnte das Tier durch 0,6 ccm des Serums t sogar 2 Stunden nach der Impfung nicht gerettet werden.

In einer anderen Serie der Versuche, wo ein Cholera-stamm angewendet wurde, der in der Dosis von $\frac{1}{2}$ Oese das Meerschweinchens tötete, haben wir ganz analoge Resultate erzielt.

Meerschweinchen, 139 g, 2 tödliche Dosen intraperitoneal. 4 Stunden später 0,5 ccm des Serums t intraperitoneal. Das Tier bleibt am Leben und scheint schon am folgenden Tage völlig gesund zu sein. Temperatur, Freßlust und Gewicht bleiben normal.

Meerschweinchen, 129 g, 4 tödliche Dosen. 1 Stunde später 0,5 ccm des Serums t. Bleibt am Leben.

Meerschweinchen, 121 g, das 1 Stunde nach der Impfung mit 4 tödlichen Dosen 0,5 ccm des Serums M bekommt, geht am Abend zugrunde.

Meerschweinchen, 195 g, 8 tödliche Dosen intraperitoneal. 1 Stunde später (Temperatur 34°) 0,5 ccm des Serums t. Das Tier bleibt am Leben.

In einem anderen unter denselben Bedingungen ausgeführten Versuche konnten wir nachweisen, daß das Peritonealexsudat noch am folgenden Tage lebensfähige Vibrionen enthielt; am 3. Tage dagegen blieb die durch Punktion gewonnene Flüssigkeit steril.

Ein Meerschweinchen (Gewicht 187 g), das 4 Stunden nach der Impfung mit acht tödlichen Dosen 0,5 ccm des Serums M bekommt, geht 9 Stunden später zugrunde und seine Sektion ergibt, daß die Bauchhöhle und das Blut große Mengen von lebenden Vibrionen enthält (es liegt der Gedanke nahe, daß in diesem Falle trotz der intensiven bakteriolytischen Wirkung die nicht entgifteten Toxine als Aggressine wirkten und die weitere Vermehrung der übrig gebliebenen Keime begünstigten).

Wurden nach vier und sechs tödlichen Dosen nach 3 Stunden 0,4 ccm des Serums t eingeführt, ging das Tier ebenfalls zugrunde, obgleich das Peritonealexsudat noch freie, unbenutzte Antikörper enthielt. Der Tod wird ebenfalls durch fortschreitende Infektion bedingt.

Die wahrscheinliche Ursache dieser Erscheinungen, ebenso wie die Art und Weise, die Heilwirkung solcher Sera zu verstärken, wird durch die Studien über die Wirkungsweise des Serums t erörtert. Bei der Uebersicht der Angaben über die toxinentgiftende Wirkung dieses Serums läßt sich der Schluß ziehen, daß diese Wirkung sich z. B. kaum mit der antitoxischen Wirkung der Diphtheriesera vergleichen läßt. Sie gehorcht namentlich dem Gesetze der Multipla nicht und ist ziemlich beschränkt. Es liegt der Gedanke nahe, daß die toxinentgiftende Wirkung solcher Sera auf einem fermentartigen Abbau der Toxine beruht, wie Pfeiffer es annimmt. Die spezifischen Antikörper, die diesen Abbau bedingen, scheinen aber unseres Erachtens nicht identisch mit den Bakteriolytinen zu sein. Bekanntlich ist die toxinentgiftende Wirkung mancher Sera, die einen hohen bakteriolytischen Titer besitzen, nur sehr gering (Metschnikoff, Roux und Salimbeni, Carrière und Tomarkin, Raskin u. a.);

dasselbe gilt für die Sera Cholera-geheilten [Lazarus (47), Pfeiffer und Wassermann, Kolle u. a.].

Andererseits läßt sich die toxinentgiftende Wirkung der Sera beobachten, die einen ganz niederen bakteriolytischen Titer besitzen, wie es für das von Metschnikoff, Roux und Salimbeni hergestellte Serum, unser Serum f usw. der Fall ist.

Es wäre daraus zu schließen, daß es sich hier um andere fermentartige Antikörper handelt, welche zu den Bakteriolytinen in demselben Verhältnisse wie peptolytische Fermente zu den proteolytischen stehen. Nach Pfeiffers Auffassung besteht bekanntlich unter den gelösten Endotoxinen und denen, die in der Zelle enthalten sind, dasselbe Verhältnis, das unter Peptonen und Proteinen existiert. Es liegt der Gedanke nahe, daß die Einführung der Bakterienzellen die Bildung von Bakteriolytinen, ebenso wie die parenterale Einführung blutfremder Proteine die Bildung des proteolytischen Fermentes hervorruft; bei der Einführung des gelösten Toxins dagegen werden besondere („toxinolytische“) Fermente gebildet, die keine Wirkung auf die Zelle selbst ausüben, deren Zerfallsprodukte aber tiefer spalten als Bakteriolytine es zu tun imstande sind. Die Verhältnisse seien also völlig denen ähnlich, die bei der Wirkung peptolytischer Fermente bestehen, welche Eiweißkörper selbst nicht anzugreifen vermögen, präformierte Peptone aber tiefer abbauen als es für proteolytische Fermente möglich ist.

Diese Auffassung der Immunitätsvorgänge bei der Cholera soll die Schwierigkeiten und Mißerfolge begreiflich machen, welche sich bei der Prüfung solcher „toxinolytischer“ Sera mittels gelöster Vibrionen immer beobachten lassen. Es soll hier an die Sera von Kraus erinnert werden, welche von Pfeiffer und Friedberger (48), auch von Nedrigailow und Kandiba (49) geprüft wurden, an unser Serum f usw. Für den weiteren Abbau der Toxine wäre namentlich die vorläufige Bakteriolyse nötig. Die ungünstige Bedeutung dieses Umstandes wird unten näher betrachtet.

Etwas Aehnliches haben wir beobachtet, als wir unsere toxischen Filtrate und Aufschwemmungen toter Vibrionen der Wirkung des Pankreassaftes unterwarfen. Nach 1 Stunde bei 37° wird das gelöste Toxin unter diesen Bedingungen entgiftet; eine tödliche Dosis von Vibrionen büßt dagegen sogar nach 18 Stunden der Pankreassaftwirkung ihre toxische Wirkung nicht ein. Es soll dies daran liegen, daß dem Pankreassaft die Fähigkeit fehlt, Bakterienzellen zu lösen, so daß das Endotoxin seiner Wirkung unzugänglich bleibt.

Um den Mechanismus der Toxinentgiftung aufzuklären, ist es nötig, zu erörtern, ob das Toxin unter der Wirkung

des Serums schon in vitro zerstört wird. Um diese Frage zu beantworten, erhitzen wir unsere Toxin-Serungemische, die sich bei der Einführung als unschädlich erwiesen. Endotoxin wird bekanntlich sogar durch 20 Minuten langes Kochen nicht zerstört; das Serum dagegen büßt beim Kochen seine toxinentgiftenden Eigenschaften ein.

Nach 5 Minuten langem Kochen gewann das Gemisch seine Toxizität wieder. Erwähnenswert ist, daß Kraus und Doerr dieselbe Beobachtung für Dysenterietoxin-Antitoxingemische machten und daraus schließen zu können glaubten, daß es sich in diesem Falle nicht um Zerstörung der Toxine (resp. Abbau), sondern um Bindung mit dem Antitoxin handelt. Wir sind der Meinung, daß diese Tatsache auch in anderem Sinne gedeutet werden kann; namentlich dadurch, daß es sich doch um fermentativen Abbau handelt, der aber nicht in vitro, sondern im Tierkörper selbst mit Beteiligung des Komplementes handelt.

Es soll hier daran erinnert werden, daß Wassermann auf Grund seiner Untersuchungen über den *B. pyocyaneus* (50) ganz ähnliche Beobachtungen machte, die er namentlich auf diese Weise aufzufassen geneigt ist.

Folgende Versuche scheinen diese Voraussetzung zu stützen.

Wird zum Toxin-Serungemisch eine kleine Menge (z. B. 0,02 ccm) für das Meerschweinchenserum zugesetzt und wird das Gemisch $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° 5 Minuten gekocht, so bleibt seine toxische Wirkung aus. In diesem Falle sollen Toxine definitiv zerstört resp. abgebaut werden, weshalb die nachfolgende Zerstörung der toxinspaltenden Antikörper ohne Bedeutung ist.

Es ist bemerkenswert, daß das oben erwähnte Toxin-Pankreassaftgemisch nach $\frac{1}{2}$ Stunden langem Verweilen bei 37° und nachfolgendem Kochen sich ebenfalls als ungiftig erweist. Das Toxin wurde also vom Pankreassaft in vitro, bevor das Gemisch gekocht wurde, abgebaut. Für aktivierte spezifische Fermente scheinen die Verhältnisse ganz ähnlich zu liegen.

Der Vorgang der Toxinentgiftung scheint also mutatis mutandis ganz analog dem Vorgange der Bakteriolyse zu verlaufen.

Es ergibt sich, daß in diesem Falle die Entgiftung der toten Vibrionen durch antitoxische resp. „toxinolytische“ Sera schwieriger ist als die der gelösten Endotoxine; im ersteren Falle verbraucht die vorhergehende Bakteriolyse viel Kom-

plement, so daß die nachfolgende Toxinentgiftung durch Mangel an Komplement verhindert werden kann.

Diese Auffassung stimmt völlig mit Pfeiffers Beobachtung, daß antiendotoxische Sera in entzündeter Bauchhöhle besser wirken, überein; sie erklärt ebenfalls die Tatsache, daß eine kleinere Serumdosis, die 3—4 Stunden nach der Impfung des Tieres mit 4 Oesen eingeführt wird, bessere Resultate ergibt als eine größere, die gleichzeitig mit 10 Oesen einverleibt wird; im ersteren Falle soll die Menge der Vibrionen unzweifelhaft viel größer als 10 Oesen sein, andererseits aber enthält die entzündete Bauchhöhle viel Komplement, das im letzteren Falle fehlt.

Es läßt sich daraus schließen, daß die Heilwirkung des Serums sich als bedeutender erweisen könnte, wenn seine bakteriolytische und toxinspaltende Wirkung nicht in kurzer Zeit vom Komplementmangel gehemmt würde. Tatsächlich, in den oben erwähnten Versuchen mit den Tieren, die trotz der Serumeinführung verendeten, konnten wir im Peritonealexsudat mittels hämolytischer Reaktion (Hammelblutkörperchen, inaktiviertes hämolytisches Serum, Zusatz von 0,2—0,3 ccm Peritonealexsudat) kein Komplement nachweisen; die spezifischen Antikörper blieben dagegen im Ueberschuß, das Peritonealexsudat agglutinierte Choleravibrionen $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{50}$, in einem Falle sogar $\frac{1}{100}$, übte auch mit Zusatz frischen Komplements eine gewisse bakterizide Wirkung aus.

Es liegt der Gedanke nahe, daß durch die Einführung frischen Komplements mit dem spezifischen Serum bessere Resultate hinsichtlich der Bakteriolyse und der Toxinspaltung im Tierkörper erzielt werden können. Einige in diesem Sinne ausgeführte Versuche ergaben tatsächlich ermunternde Resultate; durch solche Versuchsanordnung läßt sich der Heil-effekt in rascherer und sicherer Weise erzielen. Die Menge des Komplements scheint dabei auch von Bedeutung zu sein. Während in einem Falle z. B. die Serumeinführung mit 0,8 ccm Komplement die rasche Wiederherstellung des Tieres bewirkte, wurde bei einem anderen Meerschweinchen, das ceteris paribus nur 0,5 ccm Komplement bekam, der Choleravorgang nur verlangsamt, und das Tier ging nach 2 Tagen zugrunde (das Kontrolltier, das nicht behandelt wurde, erlag schon nach einigen Stunden).

Der Zusatz von Komplement in genügenden Mengen scheint also in zweifacher Hinsicht günstig zu wirken: durch rasche Bakteriolyse wird die weitere Toxinbildung verhindert und durch Ueberschuß von freiem Komplement wird die Aktivierung der toxinspaltenden Antikörper resp. der rasche Abbau der Toxine ermöglicht.

Leider waren unsere Versuche über die Heilwirkung solcher toxinentgiftender Sera unter Zusatz frischen Komplements wegen der beschränkten Zahl der Versuchstiere, die uns zur Verfügung standen, nicht zahlreich genug, um Schlußfolgerungen bezüglich des praktischen Wertes dieses Verfahrens zu ziehen, das jedoch theoretisch begründet und zweckmäßig zu sein scheint.

Diese Angaben scheinen also in vollem Einklange mit der in neuester Zeit von Friedberger (51, 52, 53, 54) begründeten Theorie zu sein, die bekanntlich solche scheinbar verschiedene Vorgänge, wie Anaphylaxie, Infektion und Endotoxinzerstörung, als verschiedene Stufen eines einheitlichen Vorganges betrachtet — namentlich als parenterale Spaltung des Antigens durch Antikörper mit Beteiligung des Komplements, wobei die Natur der Endprodukte hauptsächlich von der Geschwindigkeit der Reaktion und von den resp. Mengen der drei genannten Körper abhängt.

Es soll ferner darauf hingewiesen werden, daß wir nach der Serumeinführung häufig Erscheinungen beobachten konnten, wie krampfartige Bewegungen, Kontraktionen des Nackens, rhythmische Sprünge usw. Diese Erscheinungen dauern 2 bis 3 Minuten: sie lassen sich auch ziemlich regelmäßig nach dem Einverleiben unserer toxischen Filtrate (niemals nach der Impfung mit lebenden oder toten, in Kochsalzlösung aufgeschwemmten Vibrionen) beobachten. Wahrscheinlich sind sie mit der peptotoxischen Wirkung solcher Flüssigkeiten verknüpft.

Bezüglich der präventiven Wirkung unseres Serums ist nur Weniges zu sagen. Diese Wirkung ist namentlich hauptsächlich von der bakteriolytischen Kraft der Sera bedingt (nur bei der Infektion mit außerordentlich großen Mengen von Vibrionen, die sofort beträchtliche Toxinmengen ins Blut abgeben, kann man die toxinentgiftende Wirkung des Serums nicht entbehren).

Das Serum t übt auch die präventive Wirkung aus; nach der subkutanen Einführung von 0,4 ccm Serum verträgt das Meerschweinchen die intraperitoneale Impfung 24 Stunden später mit 2 tödlichen Dosen lebender Vibrionen ganz glatt.

Schließlich müssen wir die wertvollen Dienste hervorheben, welche uns die Symbiose mit der *Sarcina lutea* für die Steigerung der Virulenz und der Toxizität der Choleravibrionen leistete. Als wir 1913 unsere Ergebnisse nachprüfen wollten, erwies sich die Virulenz der Cholerastämme, die während der Epidemie von 1910 gezüchtet wurden, als sehr gering; sogar 6 Oesen riefen bei dem Meerschweinchen von 200 g nach intraperitonealer Einverleibung keine Erkrankung hervor. Wurde dagegen 1 Oese mit 2 ccm 7-tägiger Bouillonkultur der *Sarcina lutea* eingeführt, ging das Tier infolge der Cholerainfektion zugrunde, und das Blut sowie das Peritonealexsudat ergaben fast immer die Reinkultur der Choleravibrionen. Auf diese Weise war es möglich, die tödliche Cholerainfektion durch Einführung einer Oese der Choleravibrionen rasch zu erzielen. Die Toxizität des Stammes war aber noch gering, so daß 2 Agarkulturen der durch Erhitzung getöteten Vibrionen (40 mg) nicht genügten, um die tödliche Intoxikation hervorzurufen. Dieses Resultat wurde durch 5-tägige Züchtungen in Bouillon mit der *Sarcina lutea* erzielt.

Um die Rolle der *Sarcina lutea* in der Steigerung der Virulenz und der Toxizität des Choleravibrius festzustellen, haben wir denselben Stamm, ohne die Methode der Passage anzuwenden, in Bouillon mit *Sarcina lutea* gezüchtet; da unter diesen Umständen *Sarcina* vom *Vibrio* rasch überwuchert wird, ist es zu empfehlen, täglich bei jeder Impfung Bouillon mit frischer Sarcinakultur zu beschicken. Andererseits haben wir denselben Stamm in Bouillon in Reinkultur gezüchtet. Nach 10 Züchtungen resp. nach 10 Tagen erwies es sich, daß die letztere Versuchsanordnung keine merkliche Aenderung der Virulenz bedingte; der Stamm dagegen, der mit *Sarcina lutea* zusammen wuchs, tötete das Meerschweinchen bei intraperitonealer Einführung in der Dosis von $\frac{1}{2}$ Oese. Die Einführung $\frac{1}{2}$ Oese desselben Stammes, der während eines Monats auf Agar mit *Sarcina lutea* zusammenlebte, ergab dasselbe Resultat.

Es ist damit eine neue Bestätigung der Beobachtungen von Metschnikoff (55) und unserer Angaben (56) über die Bedeutung dieser Symbiose erbracht.

Zusammenfassung.

1) Die Giftigkeit steriler Filtrate der Cholera-vibrionenkulturen steht überhaupt in direktem Verhältnisse mit der Intensität des Absterbens der Vibrionen — die giftigsten Filtrate konnten wir mittels Züchtung der Cholera-vibrionen in Bouillon mit 1 Proz. Glukosegehalt gewinnen — im Nährmedium, namentlich wo sie schon am zweiten Tage massenhaft absterben und ihre Bestandteile in die Lösung abgeben.

2) Diese toxischen Filtrate rufen bei den Meerschweinchen eine Erkrankung hervor, die der durch tote Cholera-vibrionen bedingten ganz ähnlich ist; bezüglich ihrer Eigenschaften (Thermostabilität usw.) verhalten sich diese toxischen Lösungen ebenso wie Toxine toter Cholera-vibrionen, ihre Toxizität scheint also wirklich durch aus den Bakterienzellen ausgelaugte gelöste Endotoxine bedingt zu werden. In eiweißfreien Nährmedien ergibt solche Endotoxinlösung keine Biuretreaktion; es läßt sich daraus schließen, daß Endotoxine nicht eiweißartiger Natur sind, sondern vielmehr toxische Abbauprodukte der Proteine der Vibriozelle vorstellen.

3) Mittels solcher toxischen Filtrate resp. Endotoxinlösungen läßt sich Serum gewinnen, das Endotoxine in gewissem Sinne zu entgiften vermag; die agglutinogene und lysigene Wirkung solcher Filtrate ist dagegen gering.

Die Cholera-kulturen in Glukosebouillon, die nach 3—4 Tagen große Mengen gelöster Endotoxine enthalten und dabei eine sichere Autosterilisierung erleiden, erweisen sich als sehr für die Immunisierungszwecke geeignet; auf diese Weise läßt sich Serum gewinnen, das eine nicht unerhebliche toxinzerstörende Wirkung ausübt und dazu sehr reich an antiinfektiösen Antikörpern (Agglutinine, Bakteriolyse) ist.

4) Dieses Serum t gehorcht jedoch dem Gesetze der Multipla nur unter gewissen Bedingungen; seine toxin-entgiftende Wirkung scheint vielmehr vom

Toxinabbau durch spezifische fermentartige Antikörper bedingt zu werden.

5) Diese spezifischen toxinabbauenden, fermentartigen Antikörper sollen aber mit den Bakteriolytinen nicht identisch sein und nur schon gelöste Endotoxine angreifen, ebenso wie manche peptolytische Fermente die Proteine nicht zu spalten vermögen, Peptone dagegen tiefer abbauen als proteolytische Fermente es tun. Um die Bildung solcher Antikörper („Toxinolysine“) hervorzurufen, ist es zweckmäßig, als Antigene die auf möglichst schonende Weise aus den Bakterienzellen gewonnenen gelösten Endotoxine zu verwenden, in Glukosebouillon scheinen kleinere Mengen der Säure in statu nascendi diese Forderung gewissermaßen in Erfüllung zu bringen. Die Eingriffe, wie Erhitzung, CHCl_3 -Wirkung usw., sollen dagegen auf die Ausbeute der Endotoxine und ihren normalen Bau eine ungünstige Wirkung ausüben, wie es auch aus der geringen toxinentgiftenden Wirkung der auf diese Weise gewonnenen Sera hervorgeht¹⁾.

6) Das Serum t übt in den Fällen der experimentellen vorgeschrittenen Cholerainfektion und Intoxikation die heilende Wirkung auch in den Fällen aus, wo die Anwendung eines rein bakteriolytischen, mit erhitzten Choleravibrionen hergestellten Serums sich als machtlos erweist.

7) In vitro, ohne Zusatz von Komplement, werden Toxine durch Serum nicht abgebaut; diese Wirkung tritt nur im

1) Deswegen soll unseres Erachtens die Immunisierung mit sensibilisierten Bakterien nach Besredkas Verfahren, welches den natürlichen Spaltungsvorgang der bakteriellen Proteine ermöglicht, a priori für die Bildung der toxinentgiftenden Antikörper günstig sein (für die Bildung der antiinfektiösen Antikörper soll sie dagegen wenig geeignet sein, wie Fischer und Lüdke es sonst experimentell nachweisen und Broughton Alcock direkt beobachten konnte).

Es soll hier darauf hingewiesen werden, daß die Behandlung der Bakterienleiber mit Serum (resp. parenterale Spaltung des Bakterieneiweißes) überhaupt die natürlichste Bedingung für die Entstehung toxischer Stoffe (Endotoxine) zu sein scheint. Aus den Versuchen von Friedberger und Kumagai leuchtet es tatsächlich hervor (6. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1912), daß die Bakterienleiber des *B. dysenteriae* nur dann ihre toxische Wirkung entfalten, wenn sie vorher mit Serum behandelt werden. An sich üben sie auf den isolierten Darm in vitro keine merkliche Wirkung aus.

Tierkörper oder in vitro mit Zusatz von Komplement zutage Die Verhältnisse scheinen also ebenso wie bei der Bakteriolyse zu liegen.

8) Für die erfolgreiche Wirkung der toxinentgiftenden Antikörper im Tierkörper scheint die Anwesenheit größerer Mengen von Komplement (Beförderung der Komplementbildung im Tierkörper oder Zufuhr frischen Komplements) von Wichtigkeit zu sein. Es ist damit gesagt, daß die Verhältnisse bei der Anwendung solcher „toxinolytischer“ Sera immer verwickelter und schwieriger als für echt antitoxische Sera sind.

9) Für die Prüfung toxinentgiftender Sera ist es unseres Erachtens zweckmäßig, nicht tote Vibrionen, sondern gelöste Endotoxine zu verwenden, da im ersteren Falle die zur vorläufigen Bakteriolyse erforderlichen größeren Mengen von Vibrionen durch Verbrauchen des Komplements den nachfolgenden Toxinabbau hindern und auf diese Weise die Anwesenheit toxinabbauender Antikörper verkennen lassen kann. Im Menschenkörper haben es außerdem die toxinentgiftenden Antikörper im Blutkreislaufe immer mit den gelösten Toxinen, nicht mit den Vibriozellen zu tun.

10) Durch Züchtung des Choleravibrius mit der *Sarcina lutea* läßt sich rasch eine bedeutende Steigerung der Virulenz der Vibrionen erzielen.

Literatur.

- 1) Emmerich und Tsuboi, Münch. med. Wochenschr., Bd. 25 u. 26, 1893.
- 2) Emmerich, Ebenda, 1909, No. 38.
- 3) — Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 50.
- 4) — Arch. f. Hyg., Bd. 76.
- 5) Ruata, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, 1907.
- 6) Hunt Müller, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 68, 1911.
- 7) Pfeiffer und Wassermann, Ebenda, Bd. 14, 1893.
- 8) Pfeiffer, Ebenda, Bd. 11.
- 9) — Ebenda, Bd. 15, 1893.
- 10) — Ebenda, Bd. 18, 1894.
- 11) — Ebenda, Bd. 20, 1895.
- 12) — Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 42, 1910.
- 13) Kolle, Deutsche med. Wochenschr., 1897, No. 1.
- 14) — Centralbl. f. Bakt., Bd. 18.
- 15) — Ebenda, Abt. I, Bd. 42, 1910.
- 16) Hahn, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 23.

- 17) **Allan McFadyen**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, 1906.
 18) **Gamaleia**, Arch. de Méd. expérim., 1897, p. 173.
 19) **Krawkow**, Russki Wratsch, 1909, No. 16 (russisch).
 20) **Burgers**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 60, 1911, H. 12.
 21) **Carrière und Tomarkin**, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910.
 22) **Wassermann**, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 14, 1893.
 23) **Schurupow**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49, 1909.
 24) **Galeotti**, Ebenda, Bd. 67.
 25) **Strong**, Biochem. Centralbl., Bd. 13, 1905.
 26) **Metschnikoff, Roux et Taurelli-Salimbeni**, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1896, No. 5.
 27) **Ransom**, Deutsche med. Wochenschr., 1895, No. 29.
 28) **Brau et Denier**, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1906, No. 7.
 29) **Westbrook**, Ibid., 1896.
 30) **Kraus und Prantschhoff**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, 1906.
 31) — und **Pribam**, Ebenda, Bd. 41, 1906.
 32) **Kraus**, Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 26.
 33) — **Ebenda**, 1910, No. 44.
 34) — und **Müller**, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 68, 1911.
 35) **Salimbeni**, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1908, No. 2.
 36) — **Handbuch d. Technik u. Methodik d. Immunitätsf. von Kraus u. Levaditi**, I. Ergänzungsband.
 37) **Besredka**, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1906, No. 2.
 38) **Pfeiffer und Bessau**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, 1910.
 39) **Gotschlich und Weigang**, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20.
 40) **Smith, Th.**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 18, 1895.
 41) **Levy und Blumenthal**, Med. Klin., 1906, p. 411.
 42) **Hellström**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 25, 1899.
 43) **Gosio**, Arch. f. Hyg., Bd. 22, 1894.
 44) **Issaiew**, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 16, p. 287.
 45) **Bertarelli**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, 1905, H. 5.
 46) **Raskin**, Ebenda, Bd. 52, 1909, H. 4.
 47) **Lazarus**, Berl. klin. Wochenschr., 1898, No. 43.
 48) **Pfeiffer und Friedberger**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, 1908, H. 1.
 49) **Kandiba und Nedrigailow**, Charkovski Medizinski Zeitschr., 1908 (Russ.).
 50) **Wassermann**, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 22.
 51) **Friedberger**, Berl. klin. Wochenschr., 1910, No. 42.
 52) — Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 47, Beiheft.
 53) — Ebenda, Bd. 54.
 54) — Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 11.
 55) **Metschnikoff**, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1894, No. 8.
 56) **Horowitz**, Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, 1911.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Universitäts-Institut für Hygiene und Bakteriologie in
Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Koll e).]

Chemotherapeutische Experimentalstudien bei Trypanosomeninfektionen.

Von

W. Koll e, O. Hartoch, M. Rothermundt und W. Schürmann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 14. Juni 1913.)

I.

Die folgenden Untersuchungen schließen sich eng an unsere Studien mit löslichen und unlöslichen Quecksilberpräparaten an. Nachdem wir bei spirochätenkranken Hühnern und rekurrenzinfizierten Mäusen festgestellt hatten, daß unlösliche, organische wie anorganische Quecksilberpräparate gleich rasch und ebenso sicher wie die löslichen Hg-Verbindungen wirken — wobei allerdings chemotherapeutische Unterschiede zwischen den einzelnen Hg-Verbindungen, wie Koll e, Rothermundt und Dale nachwiesen, bestehen — wandten wir uns den Antimonpräparaten zu, um diese chemotherapeutisch bei den Trypanosomeninfektionen zu studieren. Diese Versuche wurden zuerst mit 2 Naganastämmen angestellt, für deren Ueberlassung wir den Herren Exzellenz Ehrlich und Professor Fülleborn zu Danke verpflichtet sind. Die weiteren Versuche wurden durchgeführt mit 2 Stämmen afrikanischer Schlafkrankheit, von denen wir einen Herrn Dr. Mesnil vom Institut Pasteur in Paris, den anderen Herrn Dr. Martin, Direktor des Lister Institute of Preventive Medicine in London verdanken, und endlich mit einem Dourinestamm, den Herr Prof. Wladimiroff vom Institut für experimentelle Medizin zu St. Petersburg uns freundlichst überließ. Um möglichst große Versuchsreihen anlegen zu können, haben wir vorwiegend mit Mäusen gearbeitet, dann aber auch die an Mäusen festgestellte Wirksamkeit der neuen Methoden und Präparate an Meerschweinchen, Ratten, Kaninchen und Affen erhärtet, Tier-

arten, die namentlich auch für die toxikologischen Studien herangezogen wurden.

Zunächst mögen einige allgemeine Bemerkungen über die toxikologischen Eigenschaften des Antimons vorausgeschickt sein.

Die Untersuchungen über die toxikologischen Wirkungen des Antimons und der Antimonpräparate, die in jüngster Zeit von neuem eine Anregung erhalten haben, haben bisher nur ein verhältnismäßig unvollständiges Bild der durch Antimon gesetzten Vergiftungserscheinungen ergeben. Die in früheren Jahrhunderten so oft beobachteten Vergiftungen nach innerlicher Darreichung der Antimonpräparate hatten zur Folge, daß förmliche Proskriptionen gegen das Antimon von den verschiedenen medizinischen Fakultäten erlassen wurden und daß es demzufolge als Therapeutikum, und zwar, wie wir ausdrücklich hervorheben möchten, ganz ungerechtfertigterweise fast vollständig verlassen wurde und auch das Interesse für die Toxikologie der Antimonpräparate abflaute. Nur der Brechweinstein, das Kaliumsalz der Antimonylweinsäure, hat trotz der großen Giftigkeit seine Stellung in der Reihe der Therapeutika behaupten können.

Die allgemeinen Giftwirkungen des Antimons werden, wie Kunkel hervorhebt, denen der arsenigen Säure nahestellt. Reizung der Magenschleimhaut mit nachfolgendem reflektorischen Brechakt, Blutdrucksenkung im Gebiete der Splanchnicus mit Hämorrhagien in die Darmschleimhaut, Störungen speziell des nervösen Apparates des Herzens und der quergestreiften Muskulatur, fettige Degeneration der großen Drüsen, Lähmungen im Gebiete des zentralen Nervensystems sind alles Erscheinungen, die in mehr oder weniger ausgesprochener Weise sowohl dem Arsen als dem Antimon zukommen. Von den stark giftigen wie schwach giftigen Stibiumverbindungen existieren wasserlösliche und solche, die in Wasser unlöslich sind. Ueber den Mechanismus der Giftwirkung des Antimons ist weit weniger bekannt als über den des Arsens. Immerhin sind verschiedene wichtige Tatsachen, sowohl bezüglich der akut wirkenden Stibiumgifte wie über die chronische Antimonvergiftung festgestellt. Bei den chronischen Vergiftungen des Menschen oder der Tiere kommt es meistens zu einer Degeneration der großen drüsigen Organe, namentlich der Leber, und wahrscheinlich auch zu Schädigungen des Nervensystems degenerativer Natur. Die Erfahrungen über die gewerblichen Vergiftungen mit Antimonpräparaten und mit Stoffen, die Antimonfarben enthalten, haben nach F. K. Lehmann ergeben, daß „die wasserunlöslichen Verbindungen keine oder nur geringe Vergiftungserscheinungen hervorzubringen vermögen“. Von den akuten Vergiftungen ist am bekanntesten diejenige des Brechweinsteins, einer löslichen organischen Verbindung. Bei Verabreichung per os wirkt der Brechweinstein stark reizend auf die Schleimhäute des Intestinaltraktes, so daß Erbrechen eintritt und daher vom Brechweinstein meistens relativ wenig resorbiert wird.

Wird aber viel resorbiert, so erfolgt der Tod, wahrscheinlich durch die toxische Wirkung auf das Zentralnervensystem und die Schädigung der Zellen der großen Drüsen und des Blutes, da die giftigen Antimonverbindungen nach der jetzt herrschenden Auffassung wie die gleichen Präparate des Arsens, Quecksilbers und des Bleies vorwiegend Protoplasmagifte sind.

Ohne auf die ausführliche Beschreibung der Symptomatologie der akuten wie der chronischen Antimonvergiftungen näher einzugehen, möchten wir hervorheben, daß trotz der bisher vertretenen Anschauung über die Aehnlichkeit des klinischen Bildes von Arsen- und Antimonintoxikationen ein erneutes und genaues Studium der toxikologischen Wirkungen der verschiedenen Antimonpräparate, namentlich der neueren, erst in letzter Zeit hergestellten Verbindungen, aber auch der älteren schon bekannten Antimonpräparate deshalb notwendig ist, weil viel größere Unterschiede, als man früher annahm, in der Giftwirkung der verschiedenen Antimonverbindungen bestehen.

Die älteren Autoren haben die Antimonverbindungen, unter denen sich, wie sich jetzt herausstellt, viele chemotherapeutisch brauchbare und dabei, verglichen mit dem Arsen, ungiftige befinden, jedenfalls vielfach summarisch, auf Grund der Giftigkeit einzelner Präparate, als zu giftig hingestellt. Das gilt hier auch für die dreiwertigen Antimonverbindungen, auf die wir noch zu sprechen kommen.

Die in jüngerer Zeit von Cloetta und seinen Schülern durchgeführten Untersuchungen bedeuten bereits einen bedeutenden Schritt vorwärts in unseren Kenntnissen über das Antimon. Zunächst konnte festgestellt werden, daß im Gegensatz zum Arsen mit Antimonpräparaten es nicht möglich ist, eine hochgradige Gifttoleranz zu erzielen und daß ferner die Resorptionsgröße mit zunehmender Dauer der Verabreichung sowohl absolut wie relativ eher zu- als abnimmt. Das Ausbleiben der Toleranz durch Angewöhnung an die Stibiumpräparate, das übrigens in Analogie zu setzen wäre mit der ausbleibenden bzw. nur sehr schwer und unvollkommen zu erreichenden Antimonfestigkeit von Spirillen und Trypanosomen ist ein Punkt, der entschieden für die therapeutische Bewertung des Stibium von einer gewissen nicht zu unterschätzenden Be-

deutung ist. Die im Gegensatz hierzu so oft sich ausbildende **Arsenfestigkeit** der Parasiten dürfte doch, und zwar besonders bei **chronisch** verlaufenden Infektionskrankheiten, bei denen es auch zu einer häufig wiederholten Anwendung des Therapeutikums zu kommen pflegt, von größerer Bedeutung sein, als man gewöhnlich annimmt.

Die gering ausgesprochene Antimonfestigkeit bei langdauernder Antimonbehandlung geht unter anderem auch daraus hervor, daß eine Serie von Mäusen (s. Salbenbehandlung mit metallischem Antimon im II. Teil dieser Arbeit), die infiziert wurden von einer an Rezidiv erkrankten, mit metallischer Antimon**salbe** längere Zeit hindurch geschmierten Maus in gleich prompter Weise auf eine Behandlung mit metallischem Antimon sowohl in Salbenform wie bei intramuskulärer Einverleibung reagierten wie diejenigen Mäuse, die von der Passage-maus (unbehandelten) infiziert waren.

Systematisch ausgeführte Tierversuche mit den verschiedenen Antimonpräparaten, von denen ein Teil das Stibium in dreiwertiger Form, die anderen in fünfwertiger enthielten, haben nach O. Brunner gezeigt, daß die Giftigkeit der einzelnen Präparate nicht etwa durch eine leichtere bzw. schnellere Resorption erklärt werden kann. Sowohl die giftigen bzw. stark wirkenden als auch die schwach wirkenden Stibiumpräparate zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der Resorptionsgröße.

Auch dem höheren oder geringeren Sb-Gehalt der verschiedenen Präparate dürfte eine nur ganz untergeordnete Rolle für die Unterschiede in der Giftwirkung der einzelnen Antimonverbindungen zuerkannt werden, da neben Sb-reichen ungiftigen verhältnismäßig Sb-arme Verbindungen existieren von äußerst starker Wirkung. Auffällig hingegen war die Tatsache, daß alle hochtoxisch wirkenden Präparate das Sb als dreiwertiges Metall enthielten und umgekehrt die nichttoxischen in fünfwertiger Form.

Diese Erscheinungen, die auf eine Wechselbeziehung zwischen Valenz und Toxizität hinweisen, sind, wie Brunner hervorhebt, nicht etwa charakteristisch für das Antimon, sondern sowohl den Chemikern aus den verschiedenen chemischen Eigenschaften verschiedener anderer Körper, als den Biologen

aus der verschiedenen Wirkungsweise derselben schon längere Zeit bekannt.

So konnte z. B. Neven im Frankfurter Institut zeigen, daß Trypanosomen durch dreiwertige Arsenderivate, speziell des Arsenilats, im Reagenzglas abgetötet werden, während fünfwertige Arsenverbindungen keinen nennenswerten Einfluß unter gleichen Bedingungen auszuüben vermögen.

Diese Erkenntnis bedeutet einen großen Fortschritt für den weiteren Ausbau der Antimontherapie, die, wie es den Anschein hat, recht vielversprechend zu sein scheint.

Bei unseren Studien an Mäusen haben wir bei der chronischen Antimonvergiftung gewisse Blutveränderungen beobachten können; die Zahl der roten Blutkörperchen nimmt stark ab, eine Wirkung, die vielleicht auf eine Schädigung der blutbildenden Organe zurückzuführen ist, weil die mannigfachsten Formen der Blutkörperchen in ähnlicher Weise wie bei den Erkrankungen des hämopoetischen Systems im zirkulierenden Blute auftreten. Die toxikologischen Wirkungen der verschiedenen Antimonpräparate sind bei Mäusen und anderen Tieren jedenfalls sehr verschieden und bedürfen noch weiterer Studien, die wir zum Teil selbst durchzuführen gedenken.

**Therapeutische Versuche mit metallischem Antimon
und anderen Metallen, deren Verbindungen und einigen
Nichtmetallen bei Trypanosomiasis.**

Da wir in vorliegender Arbeit eine systematische Durchforschung der Frage über die Verwertbarkeit von Antimonpräparaten bei der Trypanosomeninfektion in Angriff genommen haben, begannen wir unsere Versuche bei naganainfizierten Mäusen zunächst mit metallischem Antimon. Das Antimonmetall, das bekanntlich weder in Wasser noch in verdünnten Säuren löslich ist, wurde in Porzellanmörsern zu feinem Staub sorgfältig verrieben und durch feinstes Batistleinen zur Entfernung der noch vorhandenen gröberen Partikel durchgerieben. Das feine Pulver wurde alsdann in Oel aufgeschwemmt und den zu behandelnden Mäusen intramuskulär in die Glutäalgegend einverleibt.

Der zur Infektion benutzte Stamm tötete bei subkutaner Injektion die Mäuse mit Sicherheit und ausnahmslos

innerhalb von 5 Tagen. Die Injektion der Präparate geschah stets am 2. oder 3. Tage nach der Infektion, sobald im Blute die Trypanosomen in der Menge von +sw bis +w oder + nachzuweisen waren¹⁾).

Nachdem durch Auswertung des Präparates an Mäusen festgestellt werden konnte, daß die tödliche Dosis 5 mg pro 10 g Körpergewicht beträgt, vermochten wir zu zeigen, daß es mit absoluter Sicherheit gelingt, durch Injektion von 1 mg metallischen Antimons²⁾ die Trypanosomeninfektion der Mäuse zu heilen. Schon nach wenigen Stunden nimmt die Zahl der Trypanosomen im zirkulierenden Blute ab, selbst wenn das Blut bereits sehr zahlreiche Parasiten (++) bis (+++) enthält, und 24 Stunden nach der Injektion des Antimons sind die Trypanosomen aus dem Kreislauf vollkommen verschwunden und erscheinen nicht wieder.

Es gelingt somit, wie auch aus der unten folgenden Tabelle I ersichtlich, die Trypanosomeninfektion bei Mäusen, eine entsprechende Dosierung vorausgesetzt, durch eine einmalige Injektion des metallischen Antimons dauernd zu heilen, id est die Therapia magna sterilisans durchzuführen. Gleichzeitig geht aber auch aus der Tabelle hervor, daß die mit größeren Antimondosen behandelten Mäuse ausnahmslos einer chronischen Giftwirkung erliegen. Die Mäuse sterben steril und beherbergen auch, soweit Tierimpfungen vorgenommen waren, nie Trypanosomen in den inneren Organen, im Knochenmark oder Gehirn.

Nach Abschluß dieser Versuche sahen wir bei Literaturstudien, daß Plimmer und Batemann Versuche mit metallischem Antimon bei Nagana- und Surra-infizierten Ratten gemacht hatten und einen „bedeutenden Effekt auf diese Infektion, stärker auf Surra als auf Nagana“ bei intramuskulärer Verwendung des metallischen Antimons feststellen konnten.

1) Die in den Tabellen gebrauchten Zeichen bedeuten:

- +sw = sehr wenige Trypanosomen im Burripräparat,
- +w = wenige Trypanosomen im Burripräparat,
- + = in jedem Gesichtsfeld 1–2–3 Trypanosomen,
- ++ = in jedem Gesichtsfeld 4–5–10 Trypanosomen,
- +++ = in jedem Gesichtsfeld viel Trypanosomen,
- ++++ = in jedem Gesichtsfeld sehr viel Trypanosomen.

2) Die Dosen sind stets pro 10 g Körpergewicht angegeben.

Tabelle I.
Auswertung der Dosis efficace von Stibium metallicum an mit Nagana infizierten Mäusen.

No.	Gewicht in g	Tage																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	15	17	19	21	22	24	28	29	30	33				
209	16	● ¹⁾	+w	0	+0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
211	15	●	5 mg Sb. +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
213	15	●	3 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210	17	●	3 mg Sb. +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
212	17	●	2 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
226	20	●	2 mg Sb. ++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
244	10	●	1,5 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
225	15	●	0,8 mg Sb. ++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
227	12	●	0,75 mg Sb. ++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	13	●	0,75 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	11	●	0,4 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	14	●	0,4 mg Sb. +sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	13	●	0,2 mg Sb. +sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	13	●	0,2 mg Sb. +sw(w)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	15	●	0,1 mg Sb. +sw(w)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	12	●	0,1 mg Sb. +w	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	17	●	0,05 mg Sb. +sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0,05 mg Sb. +sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) ● = Infektion. 2) # = ++ + + +.

Zur systematischen chemotherapeutischen Durchforschung des Problems wandten wir nun zunächst andere metallische Präparate an, darunter solche, die dem Antimon chemisch nahestehen. Die unten folgenden Präparate wurden demgemäß zunächst ausgewertet und meistens bis zu den höchst vertragenen Dosen chemotherapeutisch beim gleichen Nagana-stamm wie oben geprüft. Untersucht wurden das Uran, Uranoxyd, Palladium, der Schwefel in kolloidaler Form, Col-largol, ferner vanadinsaures Ammonium, Vanadium, Blei, Kupfer, metallisches Zink, Strontiumfluorid, metallisches Quecksilber, Goldstaub, Silberstaub, metallisches Zinn und eine Eisenquecksilber-Sulfamino-Antipyrinverbindung. Bei keinem der aufgeführten Präparate ließen sich, selbst bei Verwendung großer Dosen, therapeutische Wirkungen auf die Trypanosomeninfektion feststellen.

Versuche über die Beziehungen der chemotherapeutischen Wirksamkeit der Antimonverbindungen zu ihrer chemischen Zusammensetzung.

Nachdem wir uns von der chemotherapeutischen Sonderstellung der Wirkungen des metallischen Antimons durch ausgedehnte Kontrolluntersuchungen mit anderen Metallen bzw. wasserunlöslichen Verbindungen derselben überzeugt hatten, wandten wir uns den chemotherapeutischen Versuchen mit verschiedenen Antimonverbindungen zu. Der nächste Zweck unserer Arbeit war der, zu untersuchen, in welcher Beziehung die chemotherapeutische Wirksamkeit der Antimonverbindungen zu ihrer chemischen Zusammensetzung steht. Es wurden die verschiedensten organischen und anorganischen Antimonverbindungen untersucht, und zwar sowohl dreiwertige wie fünfwertige, denn es lag uns daran, zu erfahren, ob die Wirksamkeit des Antimons mit der Drei- oder Fünfwertigkeit des Metalles in Beziehung steht. Es wurden zu den Versuchen herangezogen die fünfwertigen Verbindungen: Triphenylstibinsulfid, Natriummetantimoniat, Antimonpentoxyd, Stibium sulfuricum rubrum, Stibium sulfuricum aurantiacum und Kaliumpyrostibiatum, sowie von den dreiwertigen Verbindungen: das

Antimontrioxyd, das Antimonyl-Kaliumtartrat, das Antimonfluorid-Kaliumfluorid und das Triamid der Thioglykollsäure¹⁾. Die 30-proz. Oelemulsion des Antimontrioxyds haben wir der Kürze halber mit dem Laboratoriumsnamen „Trioxidin“ bezeichnet, den wir in dieser Arbeit gebrauchen werden. Die von uns geprüften fünfwertigen Verbindungen, die fast alle in chemotherapeutischer Beziehung übereinstimmten und von denen der Raumersparnis wegen nur die Versuchsergebnisse des Natriummetantimoniats und des Triphenylstibinsulfids in Tabellenform wiedergegeben sind, erwiesen sich als ausgesprochen wenig toxisch, ganz analog der Feststellung von O. Brunner, der auch nur bei Verwendung sehr hoher Dosen pharmakologische Wirkungen bei den fünfwertigen Antimonverbindungen beobachten konnte. In Uebereinstimmung damit konnten wir feststellen, daß die fünfwertigen Verbindungen auch des chemotherapeutischen Effektes selbst in hohen Dosen auf Trypanosomeninfektionen fast vollständig ermangelten.

Tabelle II.

Therapeutischer Versuch mit Triphenylstibinsulfid (Nagana).

Mäuse	Gew. in g	Dosis pro 10 g Körpergewicht	Tage				
			1	2	3	4	5
990	15	2,5 mg	●	.	+ 2,5 mg	+++	†++++
991	16	5 „	●	.	+(+) 5 mg	+++	†++++
989	15	10 „	●	.	+(+) 10 mg	++(+)	†++++
1071	10	20 „	●	+sw 20 mg	++(+)	+++(+)	†++++
1072	10	20 „	●	+sw 20 mg	++	+++(+)	†++++
1073	11	20 „	●	+sw 20 mg	++	+++(+)	†++++
1074	10	20 „	●	+sw 20 mg	+++	†++++	

1) Für die freundliche Ueberlassung einiger der obengenannten Verbindungen sprechen wir den Herren Prof. Cloetta und Dr. Brunner unseren verbindlichsten Dank aus.

Die selbst mit großen Dosen ganz im Beginn der Infektion behandelten Mäuse gingen meistens zu gleicher Zeit zugrunde wie die unbehandelten Kontrollen.

Tabelle III.

Therapeutischer Versuch mit Natriummetantimoniat (Nagana).

Mäuse	Gew. in g	Dosis pro 10 g Körpergewicht	Tage														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	55	85	87		
987	15	2,5 mg	●	.	+(+)	++(+)	†++++										
985	19	5 "	●	.	+(+)	++(+)	†++++										
986	13	5 "	●	.	+	+++	†++++										
984	15	10 "	●	.	+	++(+)	+++(+)	†#									
1087	16	20 "	●	+sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	lebt
1088	17	20 "	●	+sw	+sw	+w	†++++										
1089	14	20 "	●	+sw	+sw	+w	†+++(+)										
1090	17	20 "	●	+sw	+sw	0	0	0	0	0	0	0	interkurrent	†			
Gambiense 148	15	20 "	●	+sw	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	†#

Die dreiwertigen Verbindungen dagegen, von denen wesentlich das Antimontrioxyd (Trioxidin) hier näher berücksichtigt werden soll, von denen aber auch die anderen im Sinne der parasitoziden Wirkung mit dem genannten übereinstimmen, erwiesen sich als außerordentlich wirksam, nicht nur toxiologisch, sondern auch therapeutisch. Auf die Sonderstellung des Trioxidins wird weiter unten noch näher eingegangen werden.

Durch diese Untersuchung konnte also festgestellt werden, daß Antimonverbindungen, die wirksam sind, das Antimon in dreiwertiger Form enthalten müssen. Das Ergebnis der therapeutischen Versuche steht somit in voller Harmonie mit dem pharmakologischen Verhalten der Antimonpräparate im Tierkörper, auf das bereits oben hingewiesen wurde.

„Trioxidin“ als Chemotherapeutikum bei Trypanosomiasis.

Tabelle IV.

Toxizitätsbestimmung von Trioxidin.

Mäuse	Gew. in g	Dosis pro 10 g Körpergewicht	Tage													
			1	2	3	4	5	10	43	67	75	81	89			
1137	15	240 mg	.	.	†											
1138	17	240 "	.	†												
1135	15	120 "		munter	munter	munter	munter	munter		
1136	12	120 "		"	"	"	"	"		
1133	15	60 "		"	"	"	"	"		
1134	15	60 "		"	"	"	"	"		
1148	20	50 "		"	"	"	"	"		munter
1113	15	30 "		"	"	"	"	"		"
1114	15	30 "	† interk. Diarrhöe		"	"	"	"	"		"
1115	15	25 "		"	"	"	"	"		munter
1116	15	25 "		"	"	"	"	"		"
1117	15	20 "		"	"	"	"	"		"
1118	10	20 "		"	"	"	"	"		"

Die vorstehende Tabelle IV, die wir als Auszug unserer zahlreichen Auswertungsversuche des Trioxidins bringen, zeigt, daß selbst so ungeheure Dosen wie 120 mg pro 10 g Mausgewicht von den Versuchstieren anstandslos vertragen werden und weder zu akuten noch chronischen klinisch wahrnehmbaren Vergiftungserscheinungen führen. Auch die wiederholt ausgeführten Blutuntersuchungen haben ergeben, daß im Gegensatz zu den meisten anderen Antimonpräparaten (Stibium met., Tart. stib. usw.), die stets nach kürzerer oder längerer Zeit zu ausgesprochenen Veränderungen des Blutes führen, das Trioxidin keinerlei als Blutgift kennzeichnende Wirkung ausübt. Ebenso negativ waren ausnahmslos die Sektionsbefunde an den parenchymatösen Organen, die wir bei mit Trioxidin gespritzten Tieren erheben konnten. Auch die toxikologischen Studien an anderen Tieren, so an Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Affen haben ergeben, daß auch bei diesen Tiergattungen relativ sehr große Dosen anstandslos vertragen werden. Selbst Gaben von 15 mg pro 10 g Körpergewicht setzten, sofern unter strenger Einhaltung steriler Kautelen gearbeitet wird, bei Meerschweinchen und Kaninchen keinerlei Vergiftungssymptome. Tiere, die vor 3 Monaten mit

großen Dosen Trixid in gespritzt waren, sind, abgesehen von den an interkurrenten Krankheiten eingegangenen, auch heute noch am Leben, ohne irgendwelche kinisch wahrnehmbare Vergiftungserscheinungen zu zeigen.

Als eine entschieden unliebsame Nebenwirkung beobachteten wir bei Kaninchen, Hunden und Affen das Auftreten von Abszessen nach intramuskulärer Einverleibung größerer Mengen des Trixidins. Mäuse, Ratten und Meerschweinchen reagierten auf dieselbe Einführungsart bei gleicher Dosierung des Mittels fast ausnahmslos nur mit örtlicher Infiltratbildung. Das verschiedene Verhalten der einzelnen Tierarten gegenüber dem Trixid in veranlaßte uns, über die Ursachen der Abszeßbildung Aufschluß zu suchen und durch Anstellung entsprechender Versuche der abszeßbildenden Wirkung des Trixidins entgegenzuwirken. Das Ergebnis der vorläufigen Versuche spricht dafür, daß durch Verteilung der einzuführenden Trixidindosis auf verschiedene Körperstellen es zum Teil gelingt, eine Abszeßbildung zu vermeiden. Auch sind, wie es den Anschein hat, aussichtsvolle Versuche im Gange, die abszeßverursachende Wirkung des Trixidins durch gleichzeitige Einführung von antagonistisch wirkenden Substanzen aufzuheben.

Aus alledem geht mit Deutlichkeit hervor, daß wir im Trixid in ein wasserunlösliches, depotbildendes (langsam resorbierbares) Mittel besitzen, das selbst in sehr großen Dosen weder akut noch chronisch zutage tretende Giftwirkungen aufweist.

Auffällig muß es erscheinen, daß das Trixid in ungeachtet dessen, daß es das Sb in dreiwertiger Form enthält und therapeutisch hochwirksam sich erweist, dennoch fast ungiftig ist. Die Frage der Ungiftigkeit des Trixidins, die bisher nur an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Affen studiert worden ist, läßt selbstredend die Frage offen, wie weit auch andere, von uns zu Versuchszwecken noch nicht herangezogene, speziell größere Tiere und der Mensch sich dem Trixid in gegenüber als tolerant erweisen werden. Diese Frage hat insofern eine erhöhte Bedeutung, da gerade an der geringen Toleranz der größeren Tiere gegen verschiedene Medikamente,

wie z. B. gegen das Atoxyl, die therapeutischen Versuche in letzteren Fällen so oft fehlschlagen, während es bei kleinen Laboratoriumstieren ohne weiteres gelingt, die Trypanosomeninfektion zu heilen.

Zieht man aber in Betracht, daß bis 100 mg und darüber Trixid in pro 10 g Mausgewicht gegeben werden können, ohne akute Intoxikationserscheinungen hervorzurufen, und daß eine Dauersterilisierung bereits durch $\frac{1}{100}$ Teil davon erzielt wird (der therapeutische Koeffizient ist demnach ein günstiger, nämlich kleiner als 1:100), so dürfte bereits heute schon die Vermutung ausgesprochen werden, daß die Frage der Toleranz kein ernstes Hindernis sein dürfte für die therapeutische Verwendung des Trixidins bei größeren Tieren und beim Menschen, Versuche, die in allernächster Zeit von uns und von anderer Seite durchgeführt werden sollen.

Um die auffällige Ungiftigkeit des Trixidins bzw. die nur minimal ausgesprochene Organotropie experimentell noch weiter zu erhärten, hat der Chemiker Herr Zumbach auf unsere Veranlassung im Institut eine Reihe chemischer Analysen von den Organen der mit Trixid in gespritzten Tiere vorgenommen, um das Antimon in den betreffenden Geweben nachzuweisen. Analog dem Vorgehen von Cloetta wurde die organische Substanz mit HCl und KClO_3 zerstört, vom Ungelösten abfiltriert und mit heißem Wasser nachgewaschen.

Auf dem Wasserbade wird dann die HCl zum größten Teile aus dem Filtrat entfernt, mit Ammoniak (NH_3) die Säurereaktion etwas abgestumpft und unter Erwärmen H_2S eingeleitet. Weder in Leber, noch Lunge, Milz, Nieren oder Gehirn der mit Trixid in behandelten Tiere ließen sich nachweisbare Mengen Antimon feststellen. Nur in den Muskeln, in denen schon makroskopisch das Trixid in beim Aufschneiden an der Injektionsstelle als Depot sichtbar war, war die Reaktion stark positiv. Die Versuche, die noch den Charakter von Vorversuchen tragen, sollen demnächst weiter ausgebaut werden.

Bei Auswertung des Trixidins an naganainfizierten Mäusen zeigte es sich, daß es mit 1 mg gelingt, die Mäuse zu heilen und vor Rezidiven zu schützen.

Tabelle V.

Auswertung der Dosis effeac des „Trioxidin“ an naganainfizierten Mäusen (Antimontrioxydsuspension).

No.	Gew. in g	Tage																
		1	2	3	5	6	9	13	15	17	21	23	34	36	127	132	170	
794	15	● +sw 10 mg	+sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	lebt
795	20	● +sw 10 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	„
864	15	● +sw 2,5 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	„
865	16	● +sw 1 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	„
866	15	● +sw 1 mg	+sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	„
902	19	● +sw 0,5 mg	++	+++	†++++													
903	20	● +w 0,5 mg	++	++++	†++++													
904	16	● +sw 0,25 mg	++	++	†++++													
905	15	● +sw 0,25 mg	+sw	++	†++++													
1044	22	● .	.	+sw 2 mg	+sw	0	0	0	0	0	0	0	†0					
1045	12	● .	+sw	+sw 2 mg	+sw	.	0	0	0	0	0	0	0	†0				
1047	15	● .	0	+sw 2 mg	+w	.	0	0	0	†0								

Die günstigen Heilerfolge, die mit dem Trioxidin bei naganainfizierten Mäusen und anderen Tieren erzielt wurden, veranlaßten uns, dieses Mittel auch bei anderen Trypanosomenkrankheiten, speziell bei der experimentellen Schlafkrankheit (*Trypanosoma gambiense*) und der chronisch verlaufenden Dourine (*Trypanosoma equiperdum*) zu erproben. Die Dourineversuche, die zunächst, wie auch bei der Nagana, um möglichst an großen Tierreihen zu experimentieren, an Mäusen durchgeführt wurden, wurden in der Folge in großem Maßstabe auch an größeren Laboratoriumstieren (Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden) durchgeführt. Wie gleich vorweg genommen werden soll, waren auch bei dieser therapeutisch relativ schwer beeinflussbaren Infektion die Resultate äußerst günstig und standen bei Mäusen den bei Nagana erzielten keineswegs nach. Da aber diese Versuche noch zusammenhängend und

gesondert besprochen werden sollen, verzichten wir an dieser Stelle auf die Wiedergabe der Protokolle und verweisen auf die in Kürze in dieser Zeitschrift erfolgende Publikation. Auch auf die therapeutischen Versuche an Affen, die mit *Trypanosoma gambiense* infiziert waren, mit Hilfe des Trixidins soll an anderer Stelle eingegangen werden.

Im Gegensatz zu den Dauerheilungen, die wir mit Hilfe des Trixidins bei Nagana fast ausnahmslos erzielten, waren die Resultate bei Verwendung einer Reihe älterer, bereits vielfach angewandter Trypanosomenmittel, was Rezidive anlangt, recht ungünstig. Unter solchen Mitteln versuchten wir unter anderem das Fuchsin in Dosen von 1,5—2,0 mg pro 10 g Körpergewicht (Maus), ohne die Mäuse vor Rezidiven schützen zu können. Auch der Tartarus stibiatus, der von vielen Autoren noch heute als souveränes Mittel gegen Trypanosomiasis angesprochen wird, gab nur dann einigermaßen, was Dauerheilung anbelangt, befriedigende Resultate, wenn mit der therapeutischen Dosis nahe an die letale herangegangen wurde, ein Vorgehen, das selbstredend einen großen Ausfall an Versuchstieren durch toxischen Tod zur Folge hat und bei Verwendung in praxi a priori unannehmbar erscheinen muß. Nicht günstiger waren auch die Resultate mit arseniger Säure bei Verwendung von Dosen, die selbst die Hälfte der Dosis letalis betrug. Ausnahmslos gingen uns die Mäuse an Rezidiven sowohl bei Nagana wie bei Dourine und Gambienseinfektion ein.

Die prophylaktische Wirkung des Trixidins.

Nachdem wir mit dem Trixidin so günstige therapeutische Erfolge erzielt hatten und es selbst gelang, bei hochgradig fortgeschrittener Infektion die Tiere zu heilen und vor Rezidiven zu schützen, lag es nahe, auch über den prophylaktischen Wert des Trixidins durch Anlegen entsprechender Versuchsreihen Aufschluß zu erzielen. Bei den Versuchen variierten wir, wie es auch aus den Tabellen VI und VII ersichtlich ist, sowohl die Dosen des Präparates als auch den Zeitpunkt der Infektion; desgleichen wurde das Mittel auch in gewissen Zeitintervallen wiederholt einverleibt. Die Be-

Mäuse No.	Dosis mg	Tage																						
		1	2	3	4	6	7	8	9	10	12	14	15	16	17	20	26	30	35	37	43	54	75	
1244	30	†0
1247	30	●	0
1248	30	●	●	0
1249	30	●	●	0
1251	30	●
1252	30	●
1253	30	●
1256	30	†0
1258	30	●

Tabelle VII. Prophylaktischer Versuch mit wiederholter Trixidgabe.

Mäuse No.	Dosis	Tage																						
		1	2	5	6	8	9	10	12	19	20	23	25	37	43	48	54							
1204	5 mg	.	●	0
1196	10 "	.	●	0	0
1197	10 "	.	●	0	0
1198	10 "	.	●	0	0
1260	20 "	.	.	.	●	.	.	.	0	0	10 mg
1263	20 "	●	.	0	0	10 "
1267	20 "	●	0	10 "
1191	20 "	.	.	0	0
1245	30 "	.	.	.	●	15 mg
1246	30 "	.	.	.	●	15 "
1253	30 "	15 "
1254	30 "	15 "
1255	30 "	12 "

deutung dieser Versuche erhellt aus der Tatsache, daß es bisher bei keinem der bekannten Trypanosomenmittel gelang, durch eine präventive Impfung die Infektion dauernd hintanzuhalten. Selbst das bisher als souveränes Mittel empfohlene Atoxyl (Uhlenhuth) hat im Sinne einer auf längere Zeiträume wirkenden Prophylaxe vollständig versagt, wie aus Uhlenhuths Arbeiten hervorgeht.

Aus den obigen Tabellen VI und VII geht unzweideutig hervor, daß es bei genügender Dosierung in der übergroßen Mehrzahl der Fälle gelingt, mit Antimontrioxyd die Infektion dauernd zu vereiteln, und daß selbst bei Tieren, die 16 Tage nach der Einverleibung des Mittels mit dem hochvirulenten Naganastamm infiziert wurden, die Infektion bis heute, d. h. bis zum 91. Tage, ausgeblieben ist. Auch diese Versuche bestätigen vollauf unsere Anschauung über die Bedeutung der Behandlung von Protozoenkrankheiten, speziell der Trypanosomiasis, mit depotbildenden Mitteln, deren sukzessive und langsame Resorption einen großen Vorteil liefert vor der Anwendung selbst hochwirksamer trypanozider Mittel, deren Ausscheidung aber aus dem Körper anscheinend zu rasch vor sich geht, als daß die Einwirkungszeit zur endgültigen Sterilisierung des infizierten Körpers, sei es im Sinne der direkten Abtötung der Trypanosomen, sei es im Sinne der Entwicklungshemmung, genügte.

Neue organische Antimonpräparate und deren therapeutische Wirksamkeit.

Nachdem so die therapeutische Verwendbarkeit unlöslicher, dreiwertiger anorganischer Antimonverbindungen dargetan ist, wollen wir über weitere Versuche berichten, in denen neue, nach Analogie der unlöslichen organischen Quecksilberpräparate für unsere chemotherapeutischen Zwecke hergestellte, dreiwertige, organische Antimonverbindungen untersucht wurden, deren Synthese von dem Chemiker Herrn E. Scheitlin in der chemischen Fabrik Givaudan in Vernier bei Genf unter unserer dauernden Kontrolle der chemotherapeutischen Wirkungen unternommen wurde.

Es wurde dabei von dem dreiwertigen als chemisch reaktionsfähig bekannten Antimon-Trichlorid (SbCl_3) ausgegangen. Dieses wurde in die seinerzeit von uns untersuchte Quecksilber-Antipyrinverbindung (Argulan) eingeführt. Das so außerordentlich stark auf Spirochäten wirkende Argulan zeigte sich gegenüber den Trypanosomen unwirksam. Sobald aber das Antimontrichlorid eingeführt war, wirkte zwar die Verbindung lokal ziemlich stark reizend, besaß aber gegenüber Trypanosomen deutlich therapeutische Wirkungen. Zum Vergleich wurde in die Sulfamino-Hg-Verbindung Arsen eingeführt. Diese Verbindung war außerordentlich viel toxischer als die gleichartige Antimon-Sulfamino-Antipyrin-Quecksilberverbindung, ohne indessen eine annähernd gleiche Wirksamkeit wie die Antimon-Quecksilberverbindung auf Trypanosomen zu besitzen. Da die dreiwertige Antimonverbindung in Wasser unlöslich war und wir auf Gewinnung neuer, unlöslicher, organischer Präparate zur Therapie der Trypanosomeninfektionen abzielten, so gingen wir dazu über, die weiteren Verbindungen zu prüfen, die von Herrn E. Scheitlin hergestellt wurden.

Es handelt sich dabei um folgende Körper: 1) Dimethyl-Phenyl-Pyrazolon-Antimon-Quecksilber, 2) Dimethyl-Phenyl-Sulfamino-Pyrazolon-Arsen-Quecksilber, 3) Dimethyl-Phenyl-Acethyl-Amino-Pyrazolon-Antimon-Chlorid. Als brauchbar erwies sich dabei der unter 3) genannte Körper, der im Vergleich mit anderen bisherigen bekannten unlöslichen Antimonpräparaten außerordentlich wirksam war, wenn wir wenigstens von dem Trixidin absehen. Die Dosis letalis betrug bei intramuskulärer Injektion für gesunde Mäuse etwa 4 mg, während es mit Sicherheit gelang, mit einer Dosis von 0,25 mg die Mäuse trypanosomenfrei zu machen. Der chemotherapeutische Koeffizient war also relativ günstig, er übertraf den für metallisches Antimon, blieb aber hinter demjenigen des „Trixidins“ weit zurück.

Nichtsdestoweniger waren die bei Verwendung dieses Mittels erzielten Resultate bei intramuskulärer Injektion, da bei einem großen Teil der Tiere Rezidive auftraten, recht ungünstig, speziell in Anbetracht dessen, daß auch dieses Antimonpräparat gleich dem metallischen Antimon in einem verhältnismäßig großen Prozentsatz den sterilen Tod der Versuchstiere durch Spätintoxikation mit ähnlichen klinischen Symptomen wie bei dem metallischen Antimon hervorrief.

Ohne auf eine detaillierte Wiedergabe der sehr zahlreichen von uns geprüften Mittel unter Anführung von Versuchsprotokollen in Tabellenform einzugehen, möge die unten folgende Tabelle VIII einen Ueberblick geben über das Endresultat der chemotherapeutischen Wirksamkeit und Brauchbarkeit der von uns untersuchten Mittel.

Tabelle VIII.

Uebersicht über die untersuchten Präparate.

Unwirksam.

Argulan	Zinnstaub
Natriummetantimoniat	Zinkstaub
Triphenylstibinsulfid	Kupferstaub
Stibium sulfur. aurantiacum	Aluminium
Stibium sulfur. rubrum	Hydrarg. ciner., Salbe
Uranoxyd	Brillantgrünsalbe
Palladium metallicum	Antimonpentoxyd
Vanadium	Bleistaub
Vanadinsaures Ammonium	Kolloidaler Schwefel
Arsenquecksilber I	Eisenquecksilber - Sulfamino - Anti - pyrin
Arsenquecksilber II	Antimon met. (prophylakt.)
Goldstaub	Dimethylphenylpyrazolon - Acethyl - antimontrichlorid (prophylakt.)
Silberstaub	
Kollargol	
Strontiumfluorid	
Wirksam, aber praktisch nicht brauchbar :	Wirksam und praktisch brauchbar:
Antimon met. in kleinen wieder- holten Dosen	Tartarus stibiatus
Antimon met. (verfüttert)	Dimethylphenylpyrazolonacethyl- antimontrichloridsalbe
Antimonfluorid-Kaliumfluorid	Antimon met.-Salbe
Stibium-chloratum-Salbe	Trioxidin (Antimontrioxyd)
Dimethylphenylpyrazolonacethyl- antimontrichlorid intramuskulär	

Als das Ergebnis des ersten Teiles unserer Untersuchungen können wir folgende Sätze aufstellen: Es gelingt sowohl mit dem metallischen Antimon als auch mit verschiedenen wasserunlöslichen, organischen und anorganischen Antimonpräparaten, sofern diese das Antimon nur in dreiwertiger Form enthalten, bei intramuskulärer Injektion Trypanosomeninfektionen der Mäuse (Nagana, Dou-rine und Schlafkrankheit) bei einmaliger Injektion zu heilen. Die Mäuse gehen aber bei Einverleibung des metallischen Antimons und verschiedener anderer Antimonpräparate an chronischer Vergiftung steril zugrunde. Im Gegensatz hierzu fanden wir im Trioxidin ein Mittel, das ungeachtet der dreiwertigen Form, in der es das Antimon enthält, auch bei intramuskulärer Einverleibung relativ sehr un-giftig ist und bei entsprechender Dosierung weder zu akuten noch chronischen Intoxikationen zu führen pflegt. Das „Trioxidin“ ist von allen bisher bekannten Anti-

monpräparaten bei intramuskulärer Injektion das wirksamste, bezogen auf den chemotherapeutischen Koeffizienten und die Dauersterilisierung, wobei es gelingt, durch ein oder zwei intramuskuläre Injektionen von absolut ungiftigen Dosen des „Trioxidins“ die Dauersterilisierung naganainfizierter Mäuse in 100 Proz. der Fälle durchzuführen. In Bezug auf den Index (1:100) steht „Trioxidin“ nicht nur weit über allen Antimonpräparaten, sondern überhaupt über allen unlöslichen bisher bekannten chemotherapeutischen Mitteln. Die Frage der Antimontoleranz verliert dadurch für eine Behandlung chronischer Trypanosomiasis des Menschen und größerer Tiere ihre Bedeutung.

Im Gegensatz hierzu sind die fünfwertigen Antimonverbindungen nicht nur pharmakologisch bzw. toxikologisch schwach wirksam, sondern sie ermangeln auch therapeutischer Effekte. Wenn überhaupt, tritt die Wirksamkeit hier erst auf bei Verwendung von Dosen, die unmittelbar an die tödliche grenzen.

II.

Die kutane Anwendung unlöslicher Antimonverbindungen in Salbenform.

Der zweite, gleichfalls auf breiter Basis aufgebaute Teil unserer Untersuchungen zielte dahin, Methoden zu finden, um die Giftwirkung der chemotherapeutisch wirksam erkannten unlöslichen Stibiumpräparate auszuschalten, die bei intramuskulärer Injektion zu chronischer Vergiftung führen. Wir wandten uns hier einem Prinzip zu, das früher bei der chronisch intermittierenden Behandlung der Syphilis als das wirksamste bekannt war, nämlich der Inunktion der Verbindungen in Salbenform. Die kutane Anwendung des metallischen Quecksilbers, auch Schmierkur genannt, hat jahrhundertlang die Therapie der menschlichen Syphilis beherrscht. Da das metallische Antimon sich bei der Heilung der Trypanosomiasis der Mäuse als wirksam erwies (s. I. Teil der Arbeit), so lag es nahe, das Prinzip der Behandlung durch Salben, die wasser-

unlösliche Antimonverbindungen enthalten, bei der Chemotherapie der Trypanosomeninfektionen anzuwenden. Wir können hier gleich vorwegnehmen, daß es uns gelungen ist, bei der Uebertragung dieses Prinzips auf Trypanosomeninfektionen ganz ähnliche Resultate zu erhalten. Während das metallische Antimon oder die organischen Verbindungen, z. B. das Antipyrin-Antimon, intramuskulär oder subkutan einverleibt zwar die Naganainfektion bei Mäusen und anderen Tieren heilen, aber zu chronischer Vergiftung führen oder bei Verwendung kleinerer Dosen Rezidive nicht verhindern können, erfolgt bei kutaner Inunktion keinerlei Schädigung des tierischen Organismus. Es gelingt, durch systematische, oft wiederholte Inunktionen des metallischen Antimons in Salbenform, wie aus der Tabelle IX ersichtlich, eine allmähliche Sterilisierung der naganainfizierten Mäuse sowie der mit den Trypanosomen der Schlafkrankheit infizierten Mäuse herbeizuführen. Ein Teil der Tiere bekommt allerdings Rezidive, doch ist die Zahl der Rezidive nicht viel größer als bei Anwendung großer Dosen löslicher, akut toxisch wirkender Antimonverbindungen, wie des Tartarus stibiatus oder anderer Arsenpräparate. Auch durch Verwendung organischer unlöslicher Verbindungen, z. B. der gleichfalls dreiwertigen Antimon-Antipyrin-Chlorverbindungen (Scheitlin), gelingt es (s. Tabelle X und XI), durch ein- bis zweimalige Inunktion etwa 60—70 Proz. der Schlafkrankheit-, Nagana- oder Dourineinfizierten Tiere zu heilen. Tierverluste infolge der akuten und chronischen toxischen Wirkungen fehlen bei der Inunktion von unlöslichen Antimonverbindungen, die intramuskulär oder subkutan einverleibt toxisch wirken, vollkommen. Rezidive schwanken zwischen 30 und 40 Proz. Wir verfügen bereits über ziemlich umfangreiche Versuchsreihen, durch die das Prinzip der Salbenbehandlung in Form der Schmierkur der Trypanosomeninfektion mit unlöslichen Antimonverbindungen nach dem Vorbild der Hg-Inunktionskur der Syphilis gesichert erscheint. Es ist wohl kein Zweifel, daß hierbei die Depotbildung und langsam erfolgende Resorption vom Depot des Antimons sowie die langsame Ausscheidung ein wichtiger Faktor bei der Erzielung

Uebersicht über die Heilerfolge von naganainfizierten Mäusen

No.	Gew. in g	Tage											
		1	2	3	4	5	7	9	11	13	15	16	17
681	15	+w ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	†#	
682	15	+sw ●	+sw ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
683	15	+w ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
684	15	+w ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
685	15	+sw ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
686	16	+sw ●	+w ●	+sw	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
687	16	+sw ●	+w ●	+sw	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
688	17	+sw ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
690	16	+sw ●	+w ●	sw	w ●	0 ●	-●	-●	-●	-●	-	-	†--
705	14	+sw ●	+sw ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	†+++	
707	15	+sw ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
708	15	+sw ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	-	-	0 ●
731	23	+sw ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	+sw ●	-	+++
732	22	+w ●	++ ●	+sw	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	†+++	-	
733	20	sw ●	sw ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
734	19	sw ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
735	20	w ●	w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
736	19	sw ●	w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
737	20	+sw ●	sw ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
738	19	+w ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
741	20	+w ●	+w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
744	20	+sw ●	+ ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
745	19	+sw ●	+sw ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	+++ ●	†#	
746	19	+sw ●	0 ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	†+++	-	-
747	19	+sw ●	w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
750	19	+sw ●	w ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-
742	20	+sw ●	- ●	0	0 ●	-●	-●	-●	-●	-●	0 ●	-	-

*) Die Salbe wurde mit Eucerinum anhydricum angefertigt.

der günstigen Heilresultate darstellt. Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen nicht nur ein Argument experimenteller Natur für die Behauptungen derjenigen Autoren, die die Inunktionskur als eines der wirksamsten, wenn nicht das wirksamste Verfahren der Quecksilbertherapie der Lues halten bzw. hielten, sondern es dürfte hierin auch ein neuer Weg gezeigt sein, chronische Trypanosomeninfektionen, namentlich die Schlafkrankheit des Menschen und verschiedene chronische Trypanosomeninfektionen größerer Tiere (Beschälseuche) mit Hilfe der Therapia mite curans der Inunktionskuren von geeigneten unlöslichen, in Depots abgelagerten Antimonverbindungen therapeutisch zu beeinflussen bzw. zu heilen. Die Versuche einer kutanen Anwendung des bei intramuskulärer Injektion so wirksamen „Trixidins“ in Salbenform verliefen ergebnislos.

Tabelle X. Uebersicht über die Heilerfolge mit einer 40-proz.

No.	Gew. in g	Tage									
		1	2	3	4	5	6	7	8	10	15
714	15		+sw●	+w●	+sw	0●	.	.	0	.	.
715	15		+sw●	++●	+sw	0●	.	.	0	.	.
716	15		+sw●	0●	0	0●	.	.	0	.	.
717	15		+sw●	+sw●	0	0●	.	.	0	.	.
718	15		+sw●	++●	0	0●	.	.	0	.	.
751	17		+sw●	0●	0	.	.	.	0	.	0●
752	17		+sw●	+sw●	0	.	.	.	0	.	+sw●
753	19		+sw●	+w●	0	.	.	.	0	.	0●
754	19		+sw●	+sw●	0	.	.	.	0	.	0●
755	18		+sw●	+w●	0	-●	.	.	0	.	+##
756	17		+sw●	+sw●	0	.	.	.	0	.	0●
757	17		+sw●	0●	0	.	.	.	0	.	0
758	18		+sw●	+sw●	0	●	.	.	0	.	0●
759	16		+sw●	0●	0	.	.	.	0	.	0
760	20		+sw●	+w●	0	.	.	.	0	.	0●
940	16		+sw●	0●	0	+0	.
941	20		+sw●	0●	0	.	0
942	20		+sw●	0●	0	.	0
943	19		+sw●	0●	0	.	0
1011	19		+sw●	0	0	.	0
1012	13		+sw●	0	0	.	0
1013	14		+sw●	0	0	.	0
1014	14		+sw●	0	0	.	0
1015	15		+sw●	w	0	.	0
492	15		.	.	.	+w●	+sw●	.	0	.	0
495	15		.	.	.	+sw●	0●	.	0	.	0
496	15		.	.	.	+sw●	0●	.	0	.	0
493	15		.	.	.	+sw●	0●	.	0	.	.
494	15		.	.	.	+w●	0●	.	0	.	.
498	16		+(+)●	0	.	0	0	.	0	.	0

Infektion mit Nagana

Tabelle XI. Antimon-Pyrazolon ohne

No.	Tage								
	1	3	4	5	7	9	11	20	23
103		+sw	+sw●	0	.	.	.	+0	.
104		+sw	+sw●	0	0
105		+sw	+sw●	0
106		+sw	+sw●	0
107		+sw	+sw●	0	0
98		+sw●	+sw●	0	.	.	+0	.	.
99		+sw●	+sw●	0
100		+sw●	+sw●	0	.	+0	.	.	.
101		+sw●	+sw●	0
102		+sw●	+sw●	0	+sw
136		.	+sw●	.	●	.	0	0	.
162		.	.	+(w)●	●	.	0	0	.
163		.	.	+sw●	●	.	0	0	.
161		.	.	+sw●	●	.	.	0	.
168		.	.	+sw●	.	.	0	0	.

● Schmierung.

starkwirkenden Präparate, wie z. B. der Tartarus stibiatus, im Gegensatz zur therapeutischen Wirkung bei prophylaktischer Anwendung vollständig versagen. Die lokale selbst mehrmalige Anwendung einer 10—50-proz. Tartarus stibiatus-Salbe bewirkt in letzteren Fällen eine außerordentlich starke Dermatitis mit Blasenbildung und nachfolgendem Gifttode, während bei Verwendung der schwächeren (10-proz.) Salbe zwar die schweren Lokalerscheinungen weniger in den Vordergrund traten, aber dafür auch die präventive Wirkung fast gleich Null war. Die zweifellose Verzögerung der Infektion bei Verwendung der Salbe eines unlöslichen organischen Präparates, wie des Dimethylphenylpyrazolon-Antimons, stützt ohne weiteres unsere Anschauung über die Bedeutung der unlöslichen depotbildenden Mittel als Therapeutika bei der Trypanosomeninfektion. Auch die Kombinationstherapie der Salbenkur mit anderen intramuskulär einverleibten Mitteln dürfte in denjenigen Fällen, bei denen man mit einfacher Schmierkur nicht auskommt, von Erfolg sein. Die von uns angestellten Versuche einer Kombinierung von Fuchsindosen, die allein bei intramuskulärer Injektion in keinem einzigen Falle die Tiere vor Rezidiven schützen bzw. von Trypanosomen befreien, ergaben bei der Kombination mit einer einzigen Schmierung von Dimethylphenylpyrazolonacetyl-Antimonsalbe sehr befriedigende Resultate (97—100 Proz.).

In Ergänzung der mit Hilfe der Salbenbehandlung erzielten Resultate sei noch erwähnt, daß die Frage der tatsächlichen Resorption des Antimons durch die Haut durch entsprechende Kontrolluntersuchungen als sichergestellt zu erachten ist. A priori wäre der Einwand möglich, daß durch das Lecken der Tiere an den geschmierten Hautflächen die therapeutische Wirkung als eine per os erfolgende gedacht werden könnte. Tatsächlich konnte auch durch Anstellung einer größeren Reihe entsprechender Fütterungsversuche, wobei das in Frage kommende Mittel teils mit Hilfe der Soude eingeführt, teils in Form von Biskuits gereicht wurde, eine ausgesprochene Wirkung ermittelt werden, ohne daß es bei dieser Art der Behandlung gelang, die Tiere vor Rezidiven zu schützen. Wenn man andererseits die mit Salben behandelten Mäuse durch Anlegen von Krügen am Sichbelecken verhindert und durch Aufhängen des Futters auch dafür Sorge trägt, daß das Futter durch die Salbe nicht verunreinigt wird und somit die Aufnahme per os ganz ausschaltete, so zeigte es sich, daß auch unter diesen Bedingungen die Wirkung in gleich prompter Weise zustande-

kam und zu gleichen Dauerresultaten führte, wie bei den unter gewöhnlichen Verhältnissen geschmierten Mäusen.

Aus diesen Versuchen geht somit mit Deutlichkeit hervor, daß, wenn auch möglicherweise ein kleiner Teil des in Salbenform aufgetragenen Mittels per os aufgenommen wird, die resorptive Rolle der Haut als ausschlaggebendes Moment für die therapeutische Wirkung bei der Schmierung allein in Frage kommt.

Die im Beginn unserer Schmierkuren recht häufig beobachteten Reizerscheinungen der Haut, die vielfach sogar zu kleinen Nekrosen führten, speziell bei Verwendung des Dimethylphenylpyrazolonantimons, hatten ihren Grund zum großen Teil in der verhältnismäßig zarten Beschaffenheit der Mäusehaut, andererseits aber waren sie auch durch die Eigenschaften des Präparates bedingt. Mit fortschreitender chemischer Modellierung des Präparates gelang es, zu immer weniger Hautreiz verursachenden Präparaten zu gelangen, und die mit den neuen Portionen des Präparates durchgeführten Schmierungen an der empfindlichen Innenfläche des Unterarms von einem von uns waren weder von subjektiven noch objektiven Reizerscheinungen gefolgt.

Wie sich der unerwartete Effekt dieser kutanen Anwendung der unlöslichen Antimonverbindungen in Salbenform theoretisch erklären läßt, darüber werden die weiteren Untersuchungen noch Aufschluß zu geben haben. Vielleicht findet eine Addition kleinster Mengen, die in der Zeiteinheit sukzessive und langsam von der Haut resorbiert werden, statt und führt zu einer Potenzierung der Wirkungen. Solche Tatsachen sind bei Anwendung von Narkotika bekannt und auch experimentell begründet (Meyer, Gotschlich, Bürgi, Overton). Vielleicht läßt sich auch die starke Wirkung der intramuskulär injizierten unlöslichen Präparate so erklären, daß immer nur so viel vom Depot vom Körper resorbiert wird, wie im gegebenen Momente notwendig ist, um die Parasiten abzutöten bzw. an ihrer Teilung zu hindern. Die Organschädigung wird bei der Salbenbehandlung vielleicht dadurch ausgeschaltet, daß die kleinen Mengen resorbierten Antimons sofort an die im Blute vorhandenen Parasiten verankert werden. Endlich wäre es denkbar, daß das Präparat in der Haut bei der langsamen Resorption chemische Veränderungen besonderer Art erfährt, wobei erst die therapeutisch wirksamen Körper, z. B. Keratin-Antimonverbindung oder Fettsäure-Antimonkörper komplexer Natur, entstehen.

Wenn auch die theoretischen Erklärungen vielleicht nicht zutreffen, so bleiben doch die von uns ermittelten neuen Tatsachen als solche bestehen und dürften zur weiteren therapeutischen Verwendung des Prinzips, namentlich auch der Inunktion von unlöslichen Antimonpräparaten bei der Schlafkrankheit des Menschen und der Dourine im weitesten Umfange Veranlassung geben. Wir fassen das Ergebnis des zweiten Teiles unserer Arbeit in folgende Sätze zusammen:

Es ist möglich, die akuten und chronischen Infektionen kleinerer Tiere (Mäuse, Ratten, Meer-schweinchen, Kaninchen und Affen), die mit Nagan-, Dourine- oder Schlafkrankheitstrypanosomen infiziert sind, durch die kutane Anwendung (Inunktionskur) des metallischen Antimons oder bestimmter unlöslicher Antimonverbindungen in Salbenform in einem großen Prozentsatz (bei Mäusen bis zu 66 Proz.) rezidivfrei zu heilen, ohne daß die geringsten toxischen Wirkungen der Medikamente, akuter oder chronischer Natur, zur Wirkung gelangen. Auch Kontrolluntersuchungen an gesunden Mäusen, die in regelmäßigen Intervallen nach erfolgter Epilierung einer oftmaligen gründlichen Schmierung mit Antimon-metallicum-Salbe unterworfen wurden, haben gezeigt, daß keinerlei Blutschädigungen, wie sie nach intramuskulärer Einverleibung des metallischen Antimons zu beobachten sind, zur Wirkung gelangen.

Bei den bisher von anderer Seite hauptsächlich verwandten Präparaten handelt es sich meist um hochtoxische, leicht lösliche, schnell wirkende, leicht resorbierbare und schnell wieder der Ausscheidung unterliegende Präparate, die teils auf enteralem oder parenteralem Wege gegeben wurden, teils auch, wie Loeffler es bei der arsenigen Säure und Uhlenhuth mit dem Atoxyl zeigten, auch auf perkutanem Wege eingeführt werden können.

Im Gegensatz hierzu und zur *Therapia magna sterilisans*, die wegen der großen Mengen der in den Körper einverleibten, schnell wirkenden, löslichen Medikamente immer gefährlich sein muß und die, wie die Erfahrungen mit Salvarsan bei der menschlichen Syphilis gezeigt haben, auch nur selten durch eine einmalige Anwendung zur Sterilisierung führt, bezeichnen wir die Antimonbehandlung in der von uns angegebenen Weise als „*Therapia mite curans*“. Es handelt sich bei den von uns geübten Methoden um die Wirkung unlöslicher bzw. nur minimal löslicher depotbildender Antimonpräparate, deren langsame, aber dauernde Resorption für die Dauersterilisierung die beste Gewähr leistet. Das Prinzip

der **Anwendung** unlöslicher organischer bzw. anorganischer Antimonpräparate, sei es in Salbenform, sei es durch Bildung intramuskulärer Depots, dürfte sich auch zur Behandlung der chronischen Trypanosomeninfektionen größerer Tiere (Rinder und **Pferde**), sowie der Schlafkrankheit des Menschen, die bisher mit den löslichen chemotherapeutischen Präparaten in großen Dosen in Form des „Ictus therapeuticus“ oder auch in verzettelten Dosen nicht zu heilen waren, in größerem Umfange eignen.

Man verzichtet bei dem von uns für die Heilung der chronischen Trypanosomeninfektionen als wirksam erkannten Heilprinzip auf die Schnellwirkung, indem man eine „Dauerwirkung“ erstrebt dadurch, daß man die unlöslichen bzw. minimal löslichen Mittel, sei es durch Injektion, sei es durch intramuskuläre Injektion, in den Körper einführt und so Depots schafft. In dem „Trioxidin“ haben wir bei unseren systematischen Untersuchungen ein Mittel gefunden, das bezüglich des chemotherapeutischen Index und der Dauerwirkung alles bisher auf dem Gebiete der Trypanosomenkrankheiten Erreichte weit hinter sich läßt.

Auf unseren Antrag ist nach Befürwortung durch den Leiter der Medizinalabteilung, Herrn Generaloberarzt Dr. Steudel, seitens des Reichskolonialamtes die Erprobung der neuen Verfahren bei schlafkranken Menschen und trypanosomeninfizierten größeren Tieren durch kompetente Forscher angeordnet worden. Auch wir selbst haben Versuche bei dourinekranken größeren Tieren (Pferden, Schafen, Hunden) begonnen.

Nachtrag.

Versuche mit Trioxidin bei Recurrens und Chagas-Krankheit.

Das in vielen Beziehungen ähnliche Verhalten der durch die Spirochäten gesetzten Krankheiten mit den Trypanosomen-erkrankungen, speziell im Sinne ihrer therapeutischen Beeinflussung, veranlaßte uns, die von uns bei Trypanosomen-erkrankungen als wirksam erprobten Mittel auch bei dieser Infektion zu versuchen. Wir arbeiteten mit einem Spirochätenstamm afrikanischer Recurrens, der uns in liebenswürdiger Weise von Herrn Prof. Fülleborn in Hamburg überlassen

wurde. Das Ergebnis der Versuche, deren Protokolle wir wegen der negativen Resultate nicht weiter anführen, bei denen sowohl das „Trioxidin“ in großen Dosen, als auch die Antimonpyrazolonsalbe Verwendung fand, war ein durchaus negatives. Inwieweit diese Versuche auch für andere Spirochäten Geltung haben, mögen wir auf Grund unserer nur mit obigem Stamm durchgeführten Versuche nicht ohne weiteres entscheiden.

Ergänzend sei noch hier erwähnt, daß ebenso wenig wie bei Recurrens es uns gelang, einen Stamm von Schizotrypanum Cruzi chemotherapeutisch mit den von uns geprüften Mitteln bei Mäusen zu beeinflussen.

Zusammenfassung.

1) Die toxikologischen Wirkungen der Antimonverbindungen, sowohl der löslichen wie der unlöslichen, bedürfen eines erneuten Studiums, namentlich mit Rücksicht auf die Organotropie und die chronischen Giftwirkungen.

2) Die Antimonverbindungen sind chemotherapeutisch nur wirksam, wenn sie Antimon in dreiwertiger Form enthalten. Die fünfwertigen Verbindungen wirken erst in ganz großen Dosen, die nahe der tödlichen liegen, und haben auch dann nur eine schwache oder vorübergehende Wirkung auf die Trypanosomeninfektionen.

3) Das Antimontrioxyd („Trioxidin“) ist von allen bisher bekannten Antimonpräparaten bei intramuskulärer Injektion das wirksamste, bezogen auf den chemotherapeutischen Koeffizienten und die Erfolge einer Dauersterilisierung. Es gelingt durch ein- oder zweimalige intramuskuläre Injektion von absolut ungiftigen Dosen des „Trioxidins“, eine Dauersterilisierung von naganainfizierten Mäusen bei 100 Proz. herbeizuführen.

4) Das metallische Antimon wirkt bei intramuskulärer Injektion sterilisierend auf die trypanosomeninfizierten Tiere, führt aber bei dieser Form der Einverleibung durch chronische Giftwirkungen mit ausgesprochenen Blutveränderungen den Tod der geheilten Tiere herbei. Dasselbe Medikament läßt sich aber in Form der Inunktionskur als ein

wirksames Therapeutikum erweisen, bei dem toxische Wirkungen, wie sie bei intramuskulärer Injektion zu verzeichnen sind, fehlen.

5) Das Prinzip der Salbenbehandlung in Form von Schmierkuren mit unlöslichen Antimonverbindungen läßt sich auch bei anderen Trypanosomeninfektionen (Nagana, Dourine und Schlafkrankheit) bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Affen durchführen. Auch organische, unlösliche Antimonverbindungen, z. B. das Dimethylphenylpyrazolon-Antimonchlorid, ist in Salbenform für eine rezidivfreie Heilung, ohne daß geringste toxische Wirkungen des Medikamentes akuter oder chronischer Natur zur Wirkung gelangen, geeignet.

6) Die chemotherapeutische Sonderstellung der unlöslichen depotbildenden, langsam resorbierbaren Antimonverbindungen läßt sich auch durch die prophylaktischen Wirkungen, namentlich des Antimontrioxyds demonstrieren. Im Gegensatz zu den bisher bei Trypanosomeninfektionen bekannten chemotherapeutisch wirksamen Mitteln wirkt das Antimontrioxyd prophylaktisch, und zwar erstrecken sich die Wirkungen bis auf mehrere Wochen bzw. Monate.

7) Es wird auf Grund der Versuchsergebnisse empfohlen, die Heilung der chronischen Trypanosomeninfektionen herbeizuführen durch wiederholte bzw. intermittierende Behandlung mittels wasserunlöslicher resp. minimallöslicher depotbildender, langsam resorbierbarer Antimonpräparate, eventuell in Kombination mit anderen Mitteln, um durch langsame, aber dauernde Resorption eine Dauerwirkung und Dauerheilung zu erzielen.

Nachdruck verboten.

[Travail du Laboratoire de thérapeutique de l'Université de Bruxelles.]

De l'action de l'argent colloïdal sur la phagocytose.

Par **Marcel-V. Le Fèvre de Aric.**

Avec 6 tracés dans le texte.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Juni 1913.)

I. Introduction.

Les travaux que l'on peut ranger sous la rubrique générale de thérapeutique colloïdale sont aujourd'hui des plus nombreux. Mais, si l'on envisage le point plus spécial de l'action des métaux colloïdaux sur la phagocytose, les recherches parues deviennent assez rares.

On croit généralement que le succès des solutions colloïdales, dans les maladies infectieuses notamment, est attribuable ou bien à leur pouvoir antiseptique, ou bien aux réactions sériques qu'elles provoquent dans les organismes auxquels on les injecte; ces réactions seraient efficaces contre le microbe pathogène ou bien directement, ou bien indirectement en favorisant sa phagocytose.

Au sujet de ces conceptions, nous nous bornerons à citer les travaux de Denys et Leclef, Wright et ses élèves, Neufeld qui sont d'un ordre plus général (théorie des bactériotropines ou des opsonines).

Des recherches spéciales sur l'action des solutions métalliques, on conclut que ces dernières ont la propriété d'augmenter dans une certaine mesure le pouvoir phagocytaire des globules blancs.

D'autre part, Filippi annonçait, il y a quelque temps déjà, l'existence d'une spécificité des solutions métalliques colloïdales dans l'influence qu'elles exercent sur la phagocytose de particules de carmin ou d'aleurone¹⁾.

Bossan et Marcelet²⁾ confirmèrent cette manière de voir en expérimentant avec des métaux colloïdaux et des microorganismes divers.

1) Filippi, voir Bechhold, Ueber Kolloide in Biologie u. Medizin, p. 227.

2) E. Bossan et H. Marcelet, Gaz. des Hôpit., 24 janv. 1907; 10. sept. 1908 (Paris); Annales Labor. Clin (Paris), avril 1910; Coefficient t phag. et act. spécif. des diff. métaux coll.

Dans le présent travail, notre but a été d'étudier systématiquement l'action d'un métal colloïdal communément employé, l'argent, sur la phagocytose de différents microbes. Nous nous proposons de sortir bientôt de ce cadre limité pour réaliser l'étude successive de différents métaux.

II. Technique.

Avant d'exposer la marche d'une expérience, il nous semble utile de donner quelques renseignements sur la manière de s'en procurer les divers éléments.

Nous obtenons les leucocytes vivants en injectant la veille de l'expérience dans la cavité péritonéale d'un cobaye 5 c. c. de la solution destinée à y provoquer un exsudat stérile. Ce liquide se compose d'une solution de 5 gr. d'aleurionate de Hundhausen et de 0.50 gr. de potasse caustique dans 100 gr. d'eau, le tout ayant été stérilisé à 120°.

Ce liquide stérile provoque dans la cavité péritonéale du cobaye un afflux considérable de leucocytes et principalement de microphages, ce qui en fait l'utilité.

Quant à l'émulsion microbienne, nous l'avons toujours utilisée sous la forme de culture en bouillon; 5 c. c. de bouillon étaientensemencés du microbe à étudier 24 heures avant l'expérience.

La technique des expériences n'est en principe que celle de Wright légèrement modifiée.

Elle consiste, on le sait, à mettre dans de petits tubes les leucocytes et les microbes en présence de sérums normaux ou spécialement préparés, et à évaluer la phagocytose après un temps plus ou moins long.

Dans un porte-tubes, nous plaçons le nombre voulu de petits tubes stériles. Ces tubes, fermés à un bout, ont 3 centimètres de longueur et une contenance de 0.5 c. c. environ. On dispose l'expérience de façon à obtenir un témoin dans chaque série examinée.

Ainsi, outre l'émulsion de leucocytes et de microbes, commune à tous les tubes, ceux-ci contiendront par exemple:

- le 1^{er} tube, du sérum physiologique;
- le 2^{me} tube, du sérum de cobaye normal;
- le 3^{me} tube, du sérum de lapin normal;
- le 4^{me} tube, du sérum de cobaye en expérience;
- le 5^{me} tube, du sérum de lapin en expérience.

Pour exécuter une expérience, on suit donc la marche que voici: le cobaye, injecté d'aleurionate depuis 24 heures, ayant été fixé sur l'appareil à contention habituel, on le saigne par section d'une carotide. Le sang, porté de suite à la centrifuge, va nous donner le sérum de cobaye normal. Nous avons pu vérifier l'exactitude de cette assertion; l'expérience ne nous a, en effet, révélé aucune différence essentielle entre le sérum d'un cobaye injecté d'aleurionate et celui d'un cobaye neuf. Cette façon de procéder

7*

permet, de plus, d'étudier les leucocytes du cobaye dans leur sérum propre et d'obtenir ainsi une idée plus exacte de leur vitalité.

Cela étant fait, l'animal est immédiatement sacrifié. La cavité péritonéale est alors ouverte; on y introduit de 10 à 15 c. c. de sérum physiologique stérile, puis on retire ce liquide au moyen d'une pipette et on récolte ainsi l'émulsion leucocytaire dans le sérum physiologique. Ce liquide, centrifugé, laisse au fond du tube un culot épais de leucocytes. On décante alors le liquide, on le remplace par de la solution physiologique fraîche, on agite et on remet le culot en suspension. On répète cette manœuvre deux ou trois fois; on obtient ainsi une émulsion de leucocytes lavés.

Ces manipulations seront faites avec une certaine délicatesse, étant donné le dommage, que peuvent en subir les leucocytes, d'après les études de H. J. Hamburger.

On prélève une certaine quantité de l'émulsion dans un tube jaugé et on en dépose $\frac{3}{10}$ c. c. dans chaque tube à expérience; on a eu soin auparavant de remplir une chambre de Bürker, afin de titrer la richesse en globules blancs de l'émulsion; on a fait une rapide numération, et, suivant le résultat obtenu, on a pu diluer ou non la suspension, afin d'atteindre une teneur qui se rapproche de celle utilisée dans les expériences précédentes; on se place ainsi dans des conditions aussi voisines que possible d'une expérience à l'autre.

Il nous reste à préparer le sérum des animaux étudiés. Pour cela, qu'il s'agisse d'un lapin ou d'un cobaye, on pique l'oreille, après l'avoir préalablement frictionnée à l'alcool et à l'éther, et on recueille une petite quantité de sang dans une pipette stérile; on ferme à la flamme l'extrémité effilée, en ayant soin d'aspirer un peu le sang plus haut dans le tube, afin de le soustraire à l'action de la chaleur. On évite aussi pendant la prise de sang, de répandre celui-ci sur les tissus environnants. Chez le cobaye, on pique une des ramifications que forme le réseau veineux de l'oreille. Chez le lapin, on choisit de préférence la veine marginale qui longe le bord postérieur de l'oreille.

Ce sang centrifugé fournit le sérum nécessaire. On place alors dans chacun des 5 tubes, qui contiennent déjà des leucocytes, $\frac{3}{10}$ c. c. soit de sérum physiologique, soit de sérum des différents animaux, puis $\frac{3}{10}$ c. c. de l'émulsion microbienne. On a ainsi cinq tubes dont nous indiquerons, pour rappel, la teneur dans le tableau suivant:

- 1^{er} tube: globules blancs + sérum physiologique + microbes.
- 2^{me} tube: globules blancs + sérum normal de cobaye + microbes.
- 3^{me} tube: globules blancs + sérum normal de lapin + microbes.
- 4^{me} tube: globules blancs + sérum du cobaye étudié + microbes.
- 5^{me} tube: globules blancs + sérum du lapin étudié + microbes.

On ferme chaque tube au moyen d'un fin bouchon de liège stérile, on mélange en agitant légèrement et on place le porte-tubes durant 20 minutes à l'étuve à 37°.

Ce temps nous a paru le mieux approprié au but poursuivi. La majorité des auteurs adopte cette durée d'expérience ou une quelque peu

moindre; Wright, par exemple, procède déjà aux déterminations au bout d'un quart d'heure de séjour à 37°.

Nous avons comparé les résultats obtenus après 20 minutes et après 45 minutes de séjour à l'étuve. Ceux obtenus dans la deuxième série d'expériences nous parurent beaucoup plus confus que ceux de la première. En outre, les leucocytes étaient la plupart du temps fort endommagés, et les microbes phagocytés beaucoup moins colorables après un séjour aussi prolongé à 37°.

On retire ensuite les tubes de l'étuve, on étale une partie de leur contenu sur des lames au moyen de l'ose. On colore, puis on procède à l'examen et à la numération. Les lames sont colorées au Jenner-Giemsa. On examine assez généralement 30 à 35 polynucléaires. Nous avons préféré examiner sur chaque préparation un minimum de 50 et parfois de 100 leucocytes polynucléaires. Le total des microbes phagocytés par ces leucocytes, divisé par 50 (ou 100) donnait donc le coefficient phagocytaire, qui nous permettait de calculer l'index opsonique.

III. Protocoles d'expériences.

A. Généralités.

Dans le présent travail, nous nous sommes limités à l'étude de l'argent colloïdal électrique ou électrargol¹⁾. Nous avons expérimenté son influence sur la phagocytose des microbes suivants: Colibacille, bacille typhique, bacille pyocyanique, staphylocoque. Ainsi qu'il a été dit précédemment, nous avons recherché les variations de l'index opsonique chez le lapin et chez le cobaye.

Les injections d'argent ont été intramusculaires. Nous avons employé les doses suivantes qui nous ont paru donner les résultats les plus nets:

1 c.c. pour un lapin de 3—4 kilogrammes,

$\frac{1}{10}$ c.c. pour un cobaye de 300—400 grammes.

Nous avons pu juger par nos expériences antérieures, que des doses plus considérables que celles précitées sont moins efficaces, tant à l'égard de l'index opsonique qu'à celui des réactions numériques de la formule sanguine, et parfois même amènent des effets plutôt défavorables.

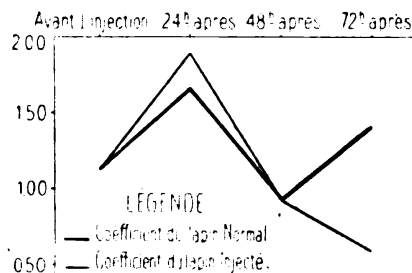
Nous réservons pour un travail ultérieur l'étude de l'action des différentes doses d'un même métal sur la phagocytose et sur la formule hématique.

1) Argent colloïdal électrique à petits grains, stabilisé et isotonisé (isotonie différée) des Laboratoires Clin, Paris.

Toutefois il nous paraît intéressant de concrétiser dès aujourd'hui par un exemple l'idée que nous émettions précédemment, à savoir que des doses fortes sont moins efficaces que des doses plus faibles.

Observation I. On injecte à un lapin 5 c.c. d'électrargol par voie intramusculaire (région lombaire). On évalue l'index opsonique du lapin vis-à-vis du colibacille, avant l'injection, puis 24 heures, 48 et 72 heures après l'injection, en même temps que l'index opsonique d'un lapin normal. Les chiffres sont indiqués dans le tableau suivant.

Examen	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection	72 heures après l'injection
Coefficient phagocytaire du lapin normal { lapin injecté	1.12	1.66	0.92	1.40
	1.12	1.90	0.92	0.58
Index opsonique	1.00	1.15	1.00	0.41



Tracé I.

En transposant les valeurs des coefficients phagocytaires des deux lapins en ordonnées et le temps en abscisse, on peut construire le tracé représenté ci-contre (voir tracé I).

On conclut de ce qui précède que l'injection d'argent colloïdal a produit le lendemain une très légère augmentation du pouvoir phagocytaire; puis,

le surlendemain, on a constaté le retour à l'état normal et le 3^{me} jour une diminution considérable de l'index opsonique.

Or, si on consulte d'autre part les résultats d'expériences faites avec une injection de 1 c.c., on voit que ceux-ci sont de loin plus favorables (voir Expériences IV, V, p. 105).

Donc, alors qu'après une injection de 1 c.c. d'argent colloïdal, l'index opsonique d'un lapin vis-à-vis du colibacille s'est trouvé plus élevé qu'au début, même 72 heures après l'injection, comme nous le verrons par la suite, une injection plus forte (5 c.c. ici) a amené après 48 heures une diminution considérable de cet index.

Considérons à présent un 2^{me} cas: il s'agit d'injections, même assez faibles, mais répétées à des intervalles rapprochés.

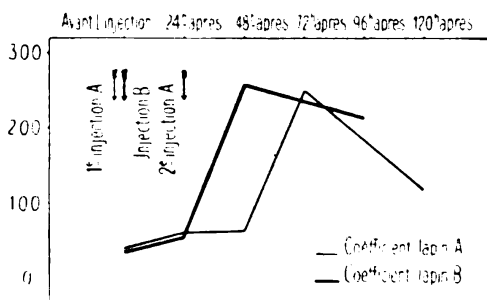
Nous faisons suivre, comme exemple encore, les résultats d'une expérience de ce genre.

Observation II. Les lapins A et B reçoivent le même jour, chacun 1 c.c. d'électrargol en injection intramusculaire (région lombaire). Le lendemain, on refait une nouvelle injection intramusculaire de 1 c.c. d'électrargol, chez le lapin A seulement. On évalue le coefficient phagocytaire de ces lapins vis-à-vis du colibacille, avant l'administration d'argent, puis 24, 48, 72, 96 et 120 heures après la 1^{re} injection.

Examens	Avant l'injection	24 heures après la 1 ^{re} injection (A et B)	48 hrs. après la 1 ^{re} inject. (A et B)	72 heures après la 1 ^{re} injection	96 heures après la 1 ^{re} injection	120 heures après la 1 ^{re} injection					
		lapin A	lapin B	lapin A	lapin B	lapin A	lapin B				
Coefficient phagocytaire du		0.40	0.38	0.60	0.54	0.62	2.52	—	2.12	1.18	—

On constate, comme on pourra le voir par les chiffres du tableau ci-dessus, que chez le lapin B, qui n'a reçu qu'une seule injection, l'augmentation maxima du pouvoir phagocytaire s'est produite au bout de 48 heures.

A l'examen du tracé ci-dessous (voir tracé II), construit de la même façon qu'il a déjà été dit plus haut, on voit que chez le lapin A, la courbe du coefficient phagocytaire est au début tout à fait identique à celle du lapin B; le coefficient augmente légèrement 24 heures après la 1^{re} injection; c'est à ce moment qu'on pratique la 2^{me} injection au lapin A seul; le lendemain,



Tracé II.

au lieu d'obtenir comme chez B le maxima caractéristique, rien ne se passe bien que nous soyons 48 heures après la 1^{re} injection; ce n'est que le surlendemain, 48 heures après la 2^{me} injection, que l'élévation apparaît chez B; la descente qui suit est brusque.

Nous concluons de ceci que la 2^{me} injection, faite 24 heures après la 1^{re} a retardé l'effet salutaire de celle-ci de 24 heures; que la réaction a été d'égale intensité, mais s'est plus rapidement effacée. Il y aurait donc eu, par la répétition trop proche d'une dose relativement faible, un effet cumulatif. Par les deux observations précédentes, et que nous n'avons données

qu'à titre d'exemples, nous le répétons, nous ne voulons affirmer quoi que ce soit; mais, nous avons voulu montrer comment des essais de ce genre, et que nous ferons mieux connaître plus tard, ont pu nous amener à choisir de préférence la dose de 1 c.c. chez le lapin, et $\frac{1}{10}$ c.c. chez le cobaye, seules doses qui aient été utilisées au cours du présent travail.

Nous indiquons brièvement, dans les pages qui suivent, les protocoles des expériences sur l'index opsonique.

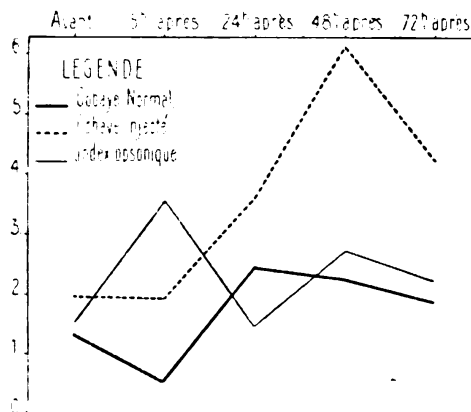
B. Expériences avec le Colibacille.

1. Milieu sérique homogène.

(Leucocytes de cobaye + sérum de cobaye.)

Expérience I. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c.c. d'électrargol en injection intramusculaire (muscles de la cuisse). On recherche le coefficient phagocytaire avant l'injection, puis 5, 24, 48 et 72 heures après. Les chiffres sont indiqués dans le tableau suivant.

Examens	Avant l'injection	5 heures après l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection	72 heures après l'injection	
Coefficient phagocytaire du	cobaye normal	1.30	0.54	2.42	2.26	1.88
	cobaye injecté	1.94	1.91	3.60	6.12	4.20
Index opsonique	1.49	3.53	1.48	2.70	2.23	



Tracé III.

En portant les valeurs du coefficient phagocytaire en ordonnées et le temps en abscisse, on obtient le tracé représenté ci-contre (tracé III).

Comme on le voit l'injection d'électrargol a eu pour conséquence d'augmenter nettement le coefficient phagocytaire du cobaye.

Expérience II. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c.c. d'électrargol par voie intramusculaire (cuisse). Le tableau qui suit montre le renforcement du coefficient phagocytaire ainsi réalisé.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	cobaye normal	0.80	0.38
	cobaye injecté	0.50	0.24
Index opsonique	0.62	0.63	1.10

2. Milieu sérique hétérogène.

(Leucocytes de cobaye + sérum de lapin.)

Expérience III. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol en injection intramusculaire (muscles de la région lombaire). On constate une augmentation du coefficient phagocytaire sous l'influence de l'électrargol. Le tableau ci-contre le montre nettement.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection	72 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	1.25	2.28	2.56
	lapin injecté	0.94	3.70	2.18
Index opsonique	0.75	1.62	0.85	1.14

Expérience IV. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol en injection intramusculaire (muscles de la région lombaire). Le résultat est encore nettement positif, ainsi que l'indique l'examen du tableau suivant:

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection	96 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	0.64	1.48	4.80
	lapin injecté	0.18	1.08	2.04
Index opsonique	0.28	0.72	0.42	0.95

Expérience V. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol par voie intramusculaire. Le résultat est dans ce cas plutôt indifférent, mais certes pas nuisible. Le coefficient phagocytaire n'a guère varié sous l'influence de l'injection d'électrargol. On peut le voir d'après le tableau qui suit:

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	0.56	0.18
	lapin injecté	0.42	0.12
Index opsonique	0.75	0.66	0.86

Conclusion: Des expériences précédentes, dont les résultats dénotent tous une influence favorable, bien qu'à des degrés différents, de l'électrargol sur la phagocytose, nous concluons que dans le sérum du cobaye, comme dans celui du lapin, l'électrargol a augmenté notablement le coefficient phagocytaire vis-à-vis du colibacille. Le sérum du cobaye s'est cependant montré plus favorablement influencé par l'électrargol que celui du lapin.

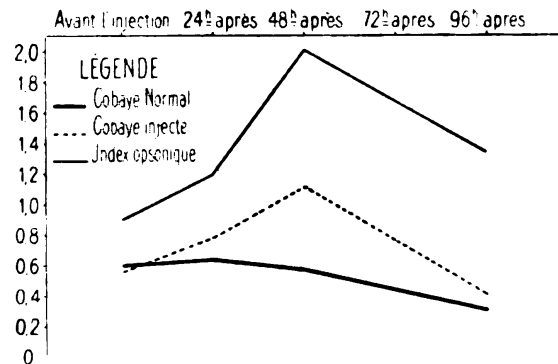
C. Expériences avec le bacille typhique.

1. Milieu sérique homogène.

(Leucocytes de cobaye + sérum de cobaye.)

Expérience VI. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire (muscles de la cuisse).

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection	96 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du cobaye normal	0.60	0.64	0.56	0.30
cobaye injecté	0.56	0.78	1.12	0.40
Index opsonique	0.90	1.20	2.00	1.33



Tracé IV.

Dans cette expérience, l'argent a augmenté nettement, comme l'indique le tableau ci-dessus, le coefficient phagocytaire pour le bacille d'Eberth. L'effet est surtout marqué à la 48^{me} heure. Les chiffres cités sont figurés dans le tracé ci-contre (tracé IV).

Expérience VII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du cobaye normal	0.46	0.56	0.26
cobaye injecté	0.26	0.34	0.34
Index opsonique	0.56	0.60	1.30

Les résultats sont identiques à ceux de l'expérience précédente.

Expérience VIII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol par voie intramusculaire. La valeur de l'index a été augmentée sous l'influence de cette injection, comme le montre le tableau suivant.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	{ cobaye normal	0.76	0.50
	{ cobaye injecté	0.64	0.48
Index opsonique	0.86	1.12	0.96

2. Milieu sérique hétérogène.

(Leucocytes de cobaye + sérum de lapin.)

Expérience IX. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol par voie intramusculaire. Le résultat est cette fois assez défavorable à la phagocytose du bacille d'Eberth; voir tableau suivant:

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	{ lapin normal	0.16	0.30
	{ lapin injecté	0.22	0.18
Index opsonique	1.37	0.60	0.60

Expérience X. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol par voie intramusculaire. Ici, également, le résultat de l'injection est défavorable à la phagocytose du bacille typhique. On le voit dans le tableau suivant:

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	{ lapin normal	0.12	0.18
	{ lapin injecté	0.30	0.36
Index opsonique	2.50	1.54	2.00

Conclusion: L'influence de l'électrargol est encore assez appréciable sur la phagocytose du bacille d'Eberth. Chez le cobaye (milieu sérique homogène), les résultats ont été nettement positifs: l'argent colloïdal a augmenté visiblement le coefficient phagocytaire. Au contraire, l'index a diminué chez le lapin, c'est à dire en milieu sérique hétérogène.

D. Expériences avec le bacille pyocyanique.

1. Milieu sérique homogène.

Expérience XI. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cyttaire du cobaye normal cobaye injecté	0.66	1.66	0.32
	1.44	2.86	0.90
Index opsonique	2.18	1.72	2.80

L'électrargol a exercé une influence défavorable (après 24 heures), puis favorable (après 48 heures) à la phagocytose du bacille pyocyanique.

Expérience XII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. Cette injection est suivie d'une action défavorable. Dans cette expérience ainsi que dans l'expérience XV, un accident empêcha de faire l'examen des lames préparées 24 heures après l'injection.

Examens	Avant l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cyttaire du cobaye normal cobaye injecté	0.66	0.56
	0.88	0.52
Index opsonique	1.33	0.92

Expérience XIII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. L'index opsonique se trouve nettement diminué.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cyttaire du cobaye normal cobaye injecté	0.40	0.80	1.64
	0.36	0.52	0.90
Index opsonique	0.90	0.65	0.54

2. Milieu sérique hétérogène.

Expérience XIV. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. Cette injection exerce une action défavorable sur la phagocytose du bacille pyocyanique.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	0.34	0.54
	lapin injecté	0.34	0.48
Index opsonique	1.00	0.51	0.88

Expérience XV. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. L'administration d'argent colloïdal a accru nettement le coefficient phagocytaire.

Examens	Avant l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	0.62
	lapin injecté	0.42
Index opsonique	0.67	2.23

Un accident survenu aux lames des expériences XII et XV, nous empêcha de faire l'examen après 24 heures.

Expérience XVI. Un lapin reçoit 1 c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. La phagocytose est accrue 24 heures après l'injection, diminuée par contre après 48 heures.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	lapin normal	0.48	0.44
	lapin injecté	0.38	0.26
Index opsonique	0.79	1.00	0.59

Conclusion: L'argent colloïdal paraît rester indifférent, et souvent même diminuer la phagocytose du bacille pyocyanique, tant chez le cobaye que chez le lapin.

E. Expériences avec le staphylocoque doré.

1. Milieu sérique homogène.

Expérience XVII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c. c. d'électrargol en injection intramusculaire. L'argent colloïdal est resté sans action bien appréciable sur le coefficient phagocytaire.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago- cytaire du	cobaye normal	2.34	1.96
	cobaye injecté	2.00	1.72
Index opsonique	0.85	0.74	0.87

Expérience XVIII. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c.c. d'électrargol en injection intramusculaire. On constate, 48 heures après, une diminution du coefficient phagocytaire, comme les chiffres suivants le montrent.

Examens	Avant l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	cobaye normal	2.62
	cobaye injecté	2.92
Index opsonique	1.11	0.90

Expérience XIX. Un cobaye reçoit $\frac{1}{10}$ c.c. d'électrargol en injection intramusculaire. On remarque, 24 heures et 48 heures après, une diminution de l'index opsonique.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	cobaye normal	1.67	3.26
	cobaye injecté	1.52	2.24
Index opsonique	0.91	0.69	0.64

2. Milieu sérique hétérogène.

Expérience XX. Un lapin reçoit 1 c.c. d'électrargol en injection intramusculaire. L'argent colloïdal a influencé très défavorablement la phagocytose du staphylocoque, comme on le verra ci-dessous.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures avant l'injection
Coefficient phago-cytaire du	lapin normal	0.92	1.32
	lapin injecté	1.12	0.34
Index opsonique	1.21	0.87	0.25

Expérience XXI. Un lapin reçoit 1 c.c. d'électrargol en injection intramusculaire. On constate une augmentation de l'index 48 heures après.

Examens	Avant l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phago-cytaire du	lapin normal	0.64
	lapin injecté	0.50
Index opsonique	0.78	1.90

Expérience XXII. Un lapin reçoit 1 c.c. d'électrargol en injection intramusculaire. On observe une diminution de l'index opsonique après 24 heures; il remonte après 48 heures.

Examens	Avant l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Coefficient phagocytaire du	lapin normal	0.07	0.38
	lapin injecté	0.06	0.22
Index opsonique	0.85	0.57	0.88

Conclusion. En général, nous avons observé ou que l'argent colloïdal restait indifférent, ou plus souvent qu'il influençait défavorablement la phagocytose du staphylocoque doré, aussi bien en milieu sérique homogène (cobaye) qu'en milieu sérique hétérogène (lapin).

IV. Considérations générales.

Quand nous disons que l'argent colloïdal reste indifférent ou même diminue l'index opsonique vis-à-vis de certains microbes, nous n'entendons évidemment pas par là que l'administration d'argent colloïdal ne peut être favorable contre des infections provoquées par ces mêmes microbes.

Il nous faut, en effet, envisager aussi les réactions leucocytaires numériques qui évoluent simultanément dans le sang; or, nous savons qu'une injection appropriée d'électrargol en suscite très nettement. Un certain nombre d'auteurs ont étudié l'action des métaux colloïdaux sur les éléments morphologiques du sang (travaux de A. Robin, Achard, E. Weill, Bardet, Stodel, Raoul de Laire et d'autres).

Il ressortirait de ces recherches que l'injection d'un métal colloïdal provoque tout d'abord une hypoleucocytose débutant peu de temps après l'injection. Ce stade est suivi d'une nouvelle phase d'hyperleucocytose, cette fois. Les avis sont partagés quant à la durée de ces deux phases réactionnelles. Après avoir fait un certain nombre d'expériences de ce genre, nous pensons pour notre part que les réactions sanguines répondant à l'administration de métaux colloïdaux sont nette-

ment accusées et que leur allure dépend de la dose de métal injectée.

Nous ferons connaître par après les résultats détaillés de ces observations, ainsi que nous l'avons déjà dit à propos de la quantité de métal à injecter pour étudier les variations de l'index opsonique.

Néanmoins, nous tenons à illustrer dès maintenant cette remarque d'un tracé.

Exemple. Écartant les doses autres que celles utilisées au cours de ce travail, nous injectons donc à un lapin 1 c.c. d'électrargol par voie intramusculaire. On fait la numération leucocytaire, ainsi que l'analyse de la formule, avant l'injection puis 1 heure, 2, 3, 4, 24 et 48 heures après l'injection.

Les chiffres obtenus par les numérations sont consignés dans le tableau suivant.

Éléments	Avant l'injection	1 heure après l'injection	2 heures après l'injection	3 heures après l'injection	4 heures après l'injection	24 heures après l'injection	48 heures après l'injection
Globules blancs	6.500	6.550	5.800	7.500	8.000	7.750	7.450
Polynucléaires neutrophiles	23 %	22 %	32 %	60 %	62 %	48 %	15 %
Polynucléaires éosinophiles	0 "	2 "	1 "	6 "	0 "	1 "	0 "
Mononucléaires	20 "	36 "	23 "	9 "	10 "	13 "	20 "
Grands lymphocytes	52 "	34 "	22 "	19 "	22 "	34 "	55 "
Petits lymphocytes	2 "	0 "	0 "	0 "	0 "	0 "	4 "
Mastzellen	3 "	6 "	21 "	6 "	5 "	3 "	6 "
Myélocytes	0 "	0 "	0 "	0 "	1 "	1 "	0 "

Rapportant le nombre absolu de chaque espèce d'éléments leucocytaires en ordonnées et le temps en abscisse, on peut construire le tracé suivant.

On voit par cet exemple que le premier effet de l'injection d'argent colloïdal est de provoquer une hypoleucocytose assez rapide, mais toujours passagère. Puis vient une seconde phase d'hyperleucocytose, d'une certaine durée, qui se maintient et peut même s'accroître les jours suivants (v. tracé V).

Si d'autre part nous considérons la formule leucocytaire, nous voyons que la diminution du nombre des formes mono-

nucléées provoque seule la leucopénie, et que la phase d'hyperleucocytose est due à l'accroissement des polynucléaires (v. tracé VI). Ces phénomènes s'effacent déjà au bout de 48 heures.

L'existence de ces réactions leucocytaires numériques que nous venons de décrire rapidement, justifie notre réserve du début. Car il est bien certain qu'avec un index opsonique non modifié ou même légèrement diminué par l'injection colloïdale, mais un nombre de microphages augmenté en proportion

considérable, un organisme se trouvera encore dans d'excellentes conditions pour soutenir la lutte contre l'infection.

Toutefois, le métal qui, en plus de l'hyperleucocytose, augmente nettement l'index opsonique vis-à-vis d'un microbe donné, nous semble hautement supérieur, et c'est là justement le but de ce travail que de préciser ce choix.

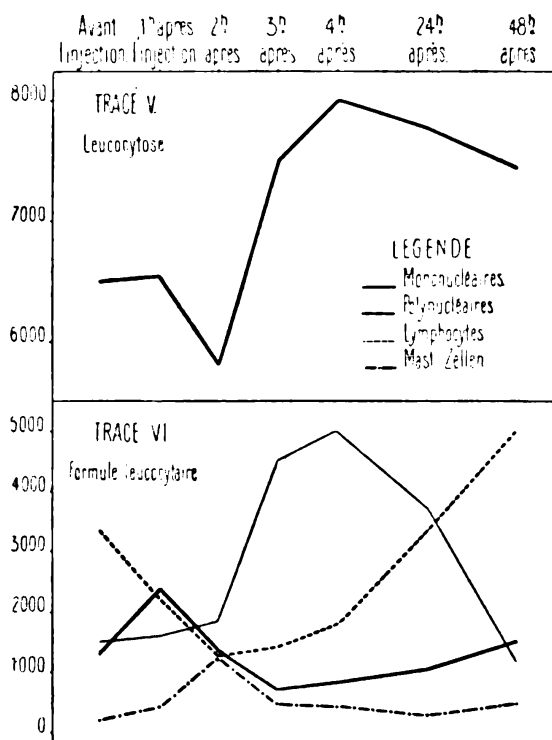
Nous comptons, pour être plus complet, communiquer par la suite les conclusions d'expériences exécutées au moyen d'autres métaux et d'autres microbes, essais que nous poursuivons en ce moment.

Zusammenfassung.

I. a) Unter dem Einfluß der intramuskulären Einspritzung einer mittels des elektrischen Verfahrens dargestellten Lösung kolloidalen Silbers (Elektrargols) nimmt sowohl beim

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIX.

8



Traces V et VI.

Meerschweinchen als beim Kaninchen das phagocytäre Vermögen der weißen Blutkörperchen für Colibacillen zu.

b) Die intramuskuläre Einspritzung kolloidalen Silbers befördert die Phagocytose der Eberth-Bacillen beim Meerschweinchen (homogenes Serum), übt hingegen einen ungünstigen Einfluß beim Kaninchen aus (heterogenes Serum).

c) Sowohl beim Meerschweinchen als beim Kaninchen übt die intramuskuläre Einspritzung kolloidalen Silbers entweder keinen Einfluß oder einen ungünstigen Einfluß auf die Phagocytose der Pyocyaneusbacillen und der Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*) aus.

II. Es besteht also eine gewisse Spezifität in dem Einflusse des Elektrargols auf die Phagocytose der verschiedenen Mikrobenarten.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XIX. No. 2.

Nachdruck verboten.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Beiträge zur Serodiagnose der Syphilis mittels der Wassermannschen Reaktion.

Von **H. Schlossberger.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Juni 1913.)

Trotz des theoretischen Dunkels, in welches das Wesen der Wassermannschen Syphilisreaktion in mancher Hinsicht noch immer gehüllt ist, stellt die Serodiagnostik der Syphilis eine Methode von hervorragender diagnostischer Dignität dar. Die bestehende Unsicherheit in der theoretischen Formulierung der sich abspielenden Gesetzmäßigkeiten tritt in der Tat bei der praktischen Ausführung des Verfahrens fast ganz in den Hintergrund, da uns eine umfassende Erfahrung gelehrt hat, die Versuchsbedingungen so zu gestalten, daß die Methode — abgesehen von bekannten Ausnahmen (Frambösie, Lepra, Malaria etc.) — für Syphilis charakteristisch arbeitet. Dementsprechend sind aber auch die der Empirie entnommenen Grenzen klinischer Spezifität nicht allzu weit gezogen, und es kann die Anwendbarkeit von Modifikationen, mögen sie auch nur in quantitativer Variation bestehen, für die Praxis nur auf Grund eines umfangreichen experimentell-kasuistischen Materials beurteilt werden.

Von den Veränderungen, welche die Methodik der Wassermannschen Reaktion erfahren hat, darf der Ersatz der ursprünglich benutzten wässrigen, durch alkoholische Extrakte (Porges und Meier, Landsteiner, Müller und Pötzl, Levaditi und Yamanouchi) aus syphilitischen Fötallebern wohl allgemeine Anerkennung beanspruchen. Aber es hat sich auch gezeigt, daß an Stelle syphilitischer Organe normale und tierische Gewebe herangezogen werden können, zumal wenn die aus ihnen bereiteten Alkoholextrakte nach

dem Vorgang von Sachs¹⁾ einen geeigneten Zusatz von Cholesterin erhalten. Die derart cholesterinierten alkoholischen Rinderherzextrakte haben sich im hiesigen Institut fortgesetzt aufs beste bewährt, und sie dienten auch mir als Reagens zu den Untersuchungen, über welche ich mir im folgenden zu berichten erlaube.

Meine Versuche sollten einige Fragen aus dem Gebiete der Wassermannschen Syphilisreaktion beantworten, welche teils in theoretischer, teils in praktischer Hinsicht von einem gewissen Interesse erscheinen durften. An erster Stelle handelte es sich dabei um eine Kontrollierung der Bedingungen, welche dem im hiesigen Institut geübten, als „Frankfurter Methode“ bezeichneten Verfahren zugrunde liegen, und um Versuche, die quantitativen Mengenverhältnisse zu variieren.

Hierzu veranlaßte auch die Diskussion über die „paradoxen Sera“, welche nach Meirovsky²⁾, M. Stern³⁾, Rasp und Sonntag⁴⁾ u. a. regellos an einem Tage positiv, an einem andern negativ reagieren können, welche aber im Frankfurter Institut nicht zur Beobachtung gelangten. Diese Differenz suchte Meirovsky auf Besonderheiten der „Frankfurter Methode“ zurückzuführen, welche nach dem genannten Autor „mit einem Ueberschuß von lösenden Faktoren arbeitet, der zwar keine paradoxen Sera aufkommen läßt, aber auch zahlreiche Sera mit geringem Gehalte an Syphilisstoffen der Diagnose durch die Wassermannsche Reaktion entzieht“.

Demgegenüber konnten Ritz und Sachs⁵⁾ darauf hinweisen, daß die Frankfurter Methode in bezug auf Häufigkeit der positiven Wassermannschen Reaktion den zu stellenden Ansprüchen durchaus gerecht wird. Durch die Gewinnung besser wirkender Extrakte, sowie durch exaktere Beobachtung und Beurteilung hatten sich die Resultate gegenüber einer 3 $\frac{1}{2}$ Jahre zuvor aufgestellten Statistik, welche den Schlußfolgerungen Meirovskys zugrunde lag, erheblich verbessert. Außerdem aber kann, wie bereits Ritz und Sachs betont haben, durch einen Ueberschuß lösender Faktoren das Fehlen paradoxer Reaktionen schwerlich erklärt werden, denn die paradox reagierenden Sera müssen wohl, wie das auch der meist vertretenen Auffassung entspricht, als die am schwächsten positiv reagierenden Sera aufgefaßt werden. Die zum Ausdruck gelangende Stärke der Reaktion stellt aber keinen absoluten Begriff dar, ist vielmehr

1) H. Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 46.

2) Meirovsky, Deutsche med. Wochenschr., No. 27, 1912, p. 1287.

3) M. Stern, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 5, 1910, p. 201.

4) C. Rasp und E. Sonntag, Deutsche med. Wochenschr., 1911, p. 683.

5) H. Ritz und H. Sachs, Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 43.

abhängig von der Wirksamkeit des Extraktes einerseits, von den Versuchsbedingungen andererseits. Werden letztere durch einen Ueberschuß von lösenden Faktoren verschoben, so wird demnach eine andere Gruppe von Serumproben, welche sonst noch deutlich positiv reagieren, das Kontingent der am schwächsten positiv und daher unter Umständen paradox reagierenden Sera darstellen¹⁾.

Bevor ich nun auf meine Untersuchungen eingehe, möchte ich kurz die Versuchsanordnung, wie sie der typischen Frankfurter Methode entspricht, und wie sie auch in den folgenden Versuchen, wenn nicht anderes bemerkt ist, herangezogen wurde, erörtern.

Als Extrakt dienen an erster Stelle cholesterinierte alkoholische Rinderherzextrakte. 6-fache fraktioniert hergestellte Verdünnungen derselben werden in Mengen von 0,25—0,15—0,1—0 ccm (Volumen 0,25 ccm) mit je 0,25 ccm 10-fach verdünnten inaktivierten Patientenserums und je 0,25 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums $1\frac{1}{4}$ Stunden bei 37° (Brutschrank) digeriert. Zur Kontrolle werden außerdem absteigende Mengen der Extraktverdünnung (0,5—0,4—0,3—0,25—0,2—0 ccm) sowie je 0,5 ccm der 10-fachen Verdünnung des inaktivierten Patientenserums mit je 0,25 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums in gleicher Weise digeriert. Sodann erfolgt zu jedem Röhrchen der Zusatz von je 0,5 ccm einer Mischung von gleichen Teilen ca. 8-proz. Hammelblutaufschwemmung und Ambozeptorverdünnung. Die letztere entspricht 3—4 Ambozeptoreinheiten. Das Fortschreiten der Hämolyse wird zeitlich verfolgt. Die Versuchsreihen bleiben höchstens 2 Stunden im Thermostaten, wenn die endgültige Beurteilung nicht schon früher geschehen ist.

I. Ueber den Einfluß der Verdünnungsart auf die Wirkung des Extraktes.

Seit den Untersuchungen von Sachs und Rondoni²⁾ ist allgemein bekannt, daß die Art der Extraktverdünnung für den Ausfall der Wassermannschen Reaktion nicht gleichgültig ist. Die genannten Autoren haben gezeigt, daß in der Regel Extraktverdünnungen, welche durch langsamen

1) Ueber paradoxe Reaktionen ist neuerdings wiederum von Grätz (Dermatol. Zeitschr., Bd. 56, 1913, p. 557) sowie von Seiffert und Rasp (Arch. f. Hyg., Bd. 79, 1913, p. 259) berichtet worden (vgl. daselbst auch die ältere Literatur). Während Grätz in Uebereinstimmung mit der überwiegenden Mehrzahl der Autoren die Differenzen resp. Grenzen der Technik und Methodik für die paradoxen Reaktionen verantwortlich macht, erblicken allerdings Seiffert und Rasp die Ursache der Reaktionsumschläge in Veränderungen des Patientenserums.

2) H. Sachs und P. Rondoni, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 44.

(fraktionierten) Zusatz der physiologischen Kochsalzlösung zu der alkoholischen Stammlösung hergestellt sind, sich mehr oder weniger erheblich wirksamer erweisen, als durch rasches Vereinigen der beiden Komponenten bereitete Gemische. Die größere Wirksamkeit äußert sich dabei meist quantitativ, indem mit gleichen Serummengen bei fraktionierter Extraktverdünnung geringere Extrakt Dosen noch positiv reagieren, als bei rascher Verdünnung, trägt aber zuweilen auch ein qualitatives Gepräge dadurch, daß innerhalb der Versuchsbreite die rasch hergestellte Extraktverdünnung eine erkennbare Reaktion überhaupt nicht mehr bewirkt. Obwohl von vornherein kaum zu erwarten war, und die bisherigen allgemeinen Erfahrungen auch nicht dafür sprachen, daß sich die cholesterinierten Rinderherzextrakte in dieser Hinsicht prinzipiell anders verhalten würden als die früher analysierten syphilitischen Leberextrakte, so erschienen doch einige systematische Untersuchungen wünschenswert zu sein. Dies um so mehr, als bereits Erfahrungen von Sachs und Rondoni¹⁾ mit künstlichen Gemischen, sowie insbesondere diejenigen von Gatz und Inaba²⁾ mit natürlichen Syphilisleberextrakten dafür sprachen, daß die Ueberlegenheit der fraktionierten Verdünnung nicht immer in Erscheinung zu treten braucht, daß vielmehr zuweilen auch die rasch hergestellten Verdünnungen das empfindlichere Reagenz darstellen können.

Zu meinen Versuchen dienten vier verschiedene cholesterinierte Rinderherzextrakte. Beim Vergleich eines größeren Materials von Serumproben ergaben sich innerhalb der Versuchsbreite (0,25—0,02 der 6-fachen Extraktverdünnung) 71mal Differenzen. Von diesen 71 Sera reagierten 9 nur bei fraktionierter, nicht bei rascher Verdünnung positiv, 44 reagierten bei fraktionierter Verdünnung, 18 bei rascher Verdünnung stärker positiv, ergaben also noch mit geringeren Extrakt Dosen Hämolysehemmung. Während somit 53 Sera dem von Sachs und Rondoni als typisch erkannten Verhalten folgten, verhielten sich 18 umgekehrt. Da die letzteren demnach ein größeres Interesse beanspruchen dürften, stellte ich die sie

1) Sachs und Rondoni, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 1, 1909, p. 132.

2) E. Gatz und R. Inaba, Biochem. Zeitschr., Bd. 28, 1910, p. 374.

betreffenden Versuchsergebnisse in der folgenden Tabelle I zusammen.

Die Reihen α stellen die Versuchsergebnisse bei rascher, die Reihen β diejenigen bei fraktionierter Verdünnung dar.

Tabelle I¹⁾.

Mengen der 6-fachen Extraktverdünnung α : rasch β : frakt. verdünnt ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, ab- steigenden Extrakt Dosen und den Patientensera											
	a		b		c		d		e		f	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	Spch.	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	0	0
0,03	Spch.	m.	0	k.	w.	Sp.	0	Spch.	0	m.	0	0
0,02	m.	k.	Sp.	k.	st.	k.	0	Sp.	w.	st.	0	w.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Mengen der 6-fachen Extraktverdünnung α : rasch β : frakt. verdünnt ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, ab- steigenden Extrakt Dosen und den Patientensera											
	g		h		i		k		l		m	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,15	0	0	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	m.	Spch.	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	Sp.	st.	w.	0	0	0	0	0	0	0	0
0,03	0	k.	st.	f. k.	0	Spch.	0	0	Spch.	Spch.	Spch.	0
0,02	Sp.	k.	f. k.	k.	0	f. k.	0	f. k.	0	k.	m.	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Mengen der 6-fach. Extrakt- verdünnung α : rasch β : frakt. verdünnt ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, ab- steigenden Extrakt Dosen und den Patientensera											
	n		o		p		q		r		s	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
0,25	0	0	0	0	Spch.	0	0	0	0	0	Spch.	0
0,15	Spch.	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	0	0
0,1	„	0	Spch.	Sp.	w.	Sp.	0	0	0	0	„	Spch.
0,05	„	Spch.	Sp.	m.	m.	0	Sp.	0	0	0	w.	Sp.
0,03	„	Sp.	w.	k.	st.	k.	0	f. k.	0	Spch.	m.	f. k.
0,02	Sp.	m.	st.	k.	f. k.	k.	0	k.	w.	f. k.	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

1) Die Abkürzungen in dieser und den folgenden Tabellen bedeuten:
 k. = komplette, f. k. = fast komplette, st. = starke, m. = mäßige, w. =
 wenig, Sp. = Spur, Spch. = Spürchen, 0 = keine Hämolyse.

Wie die Tabelle zeigt, reagieren die darin notierten 18 Serumproben bei rascher Verdünnung mit kleineren Extrakt Dosen stärker, als bei fraktionierter Verdünnung. Ein ganz abweichendes Bild ergibt sich aber beim Vergleich der oberen 3 Glieder der einzelnen Kolonnen, welche diejenigen Extrakt Dosen enthalten, welche wir bei der praktischen Ausführung der Wassermannschen Reaktion prüfen. Es zeigt sich hierbei, daß entweder ein Unterschied zwischen den beiden Verdünnungsarten nicht besteht, oder aber, daß die fraktionierte Verdünnung stärker wirkt als die rasche. In letzter Hinsicht sei auf die Beispiele c, h, n, p, s der Tabelle hingewiesen. Sie sind deswegen besonders illustrativ, weil sie dartun, daß größere Extrakt Dosen gegenüber einem und demselben Serum bei fraktionierter Verdünnung stärker wirken können als bei rascher, obgleich die Relation bei geringeren Extraktmengen eine direkte Inversion erfährt. Für die Praxis der Serodiagnostik, in der wir nur die Mengen von 0,25—0,1 ccm 6-facher Extraktverdünnung heranziehen, ergibt sich daher aus meinen Erfahrungen, daß die fraktionierte Verdünnung der cholesterinierten Rinderherzextrakte durchgehends der raschen Verdünnung gleich kommt oder ihr überlegen ist.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse stehen in gewissen Beziehungen zu den Erfahrungen von Gatz und Inaba. Auch diese Autoren haben über wechselndes Verhalten des Einflusses der Extraktverdünnungsart berichtet, indem sie teils bei einem und demselben Extrakt wechselnde Resultate hatten, teils auch über gewisse Extrakte verfügten, welche bei rascher Verdünnung stärker wirkten. In einigen der von Gatz und Inaba mitgeteilten Tabellen findet man wohl auch Andeutungen des von besonderem Interesse erscheinenden Verhaltens, daß nämlich bei höheren Extrakt Dosen die fraktionierte, bei geringeren die raschere Verdünnung stärker wirkt. In welcher Weise dieses paradoxe Verhalten zustande kommt, ist nicht ohne weiteres zu sagen. Sachs und Rondoni hatten als Ursache für die stärkere Reaktionsfähigkeit der fraktionierten Extrakte die Art des Lösungszustandes der reaktionsfähigen Stoffe angenommen

und dabei auch an die Möglichkeit einer Abhängigkeit der Wirkung von einer bestimmten Teilchengröße gedacht. Nach Kiss¹⁾ sind die Unterschiede der Wirkung verschiedenartiger Verdünnungen nur quantitativer und nicht qualitativer Natur. Es würde sich nach den Ausführungen des genannten Autors darum handeln, daß die Geschwindigkeit, mit welcher die im Wasser unlöslichen Stoffe der alkoholischen Extrakte beim Verdünnen gefällt werden, von der Verdünnungsart, resp. von einem optimalen Verhältnis zwischen Wasser und Alkohol abhängig und bei fraktionierter Verdünnung größer ist. Auch diese Erklärung dürfte sich allerdings von der von Sachs und Rondoni gegebenen nicht sehr wesentlich unterscheiden. Nach Kiss „steht die Wirkung zu der Zahl und Größe der ausgefallten Fetttröpfchen in Beziehung“. Gatz und Inaba glauben allerdings auf Grund ihrer Erfahrungen mit verschiedenen Extrakten sowie auf Grund der Feststellung von Differenzen der hämolytischen Wirkung bei verschiedenartiger Verdünnung von Extrakten und Seifenlösungen annehmen zu müssen, daß „zwei Vorgänge unbekannter Art in Frage kommen, die voneinander unabhängig sind“, und sie denken daran, daß „es sich hier vielleicht doch nicht um rein physikalische Unterschiede handelt“ und „daß vielleicht doch chemische Unterschiede maßgebend sind, deren Bedingungen wir allerdings nicht kennen“. Für das Zusammenwirken mehrerer Prozesse verschiedener Art dürften nun freilich auch meine Erfahrungen, nach denen gewisse Sera mit größeren Dosen fraktionierter, aber mit kleineren Dosen rascher Extraktverdünnung stärker reagieren können, sprechen. Möglicherweise erweist sich aber auch hierfür zur Erklärung die Annahme physikalischer Momente (Teilchengröße, Teilchenzahl, Oberflächenspannung etc.) als ausreichend. Wie dem aber auch sei, für die Praxis der Wassermannschen Reaktion dürfen wir auch bei Verwendung cholesterinierter Rinderherzextrakte die fraktionierte Verdünnungsart allgemein bevorzugen.

1) J. Kiss, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 4, 1910, p. 703.

II. Ueber den Einfluß der Variation von Extrakt- und Serummengen.

Eine Reihe weiterer Untersuchungen galt der Prüfung der Frage, ob die Abstufungen der Reaktion, welche man nach der im hiesigen Institut üblichen Methode durch Verwendung mehrerer verschiedener Extrakt Dosen erhält, in entsprechender Weise bei Variation der Serummengen zum Ausdruck gelangen. Gleichzeitig handelte es sich dabei darum, festzustellen, welchen Einfluß eine Steigerung der üblichen Serum- und Extraktmengen auf das Ergebnis hat.

Was die Variation der Serummengen anlangt, so ergaben sich bei der Untersuchung von 55 Serumproben (davon 25 positiv, 30 negativ) etwa die gleichen Verhältnisse, wie wir sie bei der üblichen Anordnung zu sehen gewohnt sind. Innerhalb der gewählten Versuchsbreite (0,25—0,1 ccm 6-facher Extraktverdünnung und 0,25—0,1 ccm 10-facher Serumverdünnung) waren wesentliche Differenzen nicht zu bemerken und man kann, wie das wohl auch meist angenommen wird, durch Variation der Extrakt Dosen ähnliche Unterschiede der Reaktionsstärke konstatieren, wie durch die von vielen Autoren geübte Variation der Serummengen.

Wenn wir dem ersteren Vorgehen den Vorzug geben, so geschieht dies aus zweierlei Gründen. Einmal bietet das Arbeiten mit verschiedenen Extrakt Dosen eine größere Sicherheit der Beurteilung, indem in solchen Fällen, in denen bei größeren Extrakt Dosen die Durchsichtigkeit der Ergebnisse mangels ganz einwandfreier Kontrollen gehemmt ist, kleinere Extraktmengen noch immer eine einwandfreie Uebersicht ermöglichen. Dann aber setzt die Anordnung verschiedener Serummengen bei strenger Kritik auch eine entsprechende Anzahl von Kontrollen (ohne Extrakt) voraus, die natürlich für jedes einzelne Serum gesondert anzusetzen sind, während bei einer einheitlichen Serumdosis die Kontrollierung der zur Reaktion dienenden Serummenge und ihres doppelten Multiplums auf anti-komplementäre Wirkung hinreicht. Erweist sich freilich das Serum derart als eigenhemmend, so muß die Wiederholung des Versuches mit absteigenden Serummengen folgen, um unter Umständen solche Serumdosen zu eruieren, welche

ohne Eigenhemmung noch eine charakteristische Reaktion ergeben ¹⁾).

Was nun den Einfluß einer Steigerung der Serummenge über die übliche Dosis anlangt, so erwies sich eine Erhöhung der Serummenge bis auf 0,125 ccm, also auf das 5-fache Multiplum der gewöhnlichen Gebrauchsdosis, bei einem freilich nur geringen Material im allgemeinen nicht von wesentlichem Einfluß für die von mir benutzten Extrakte. Weder wurde bei 21 derart untersuchten positiven Serumproben die Reaktion bei größeren Serumdosen abgeschwächt oder aufgehoben, noch wurde bei 27 negativen Seris eine positive Reaktion durch die größeren Serummengen vorgetäuscht. Nur bei 4 Seris ergaben sich bei größeren Serumdosen Differenzen, die aus folgender Tabelle II ersichtlich sind.

Tabelle II.

Mengen des Patienten- serums ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, Extraktverdünnung und absteigende Mengen folgender Serumproben:			
	a (Arteriosklerose)	b (ohne Diagnose)	c (Lues latens)	d (Scharlach)
0,125	m.	st.	0	st.
0,075	k.	f. k.	Spch.	w.
0,05	k.	k.	m.	Sp.
0,025	k.	k.	m.	Sp.
0,015	k.	k.	k.	w.
0,01	k.	k.	k.	w.
0	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabelle zeigt, ist bei den Proben a und b die durch die größte Serumdosis verursachte Hemmung so gering, daß sie für die Beurteilung nicht ernstlich ins Gewicht fallen dürfte. Bei Serum c (Lues latens) und d (Scharlach) tritt allerdings eine Verschiebung ein. Während aber die Steigerung der Serummenge bei c eine Verstärkung der Reaktion bedingt, verursacht sie im Falle d eine Abschwächung. Die Verhältnisse

1) Sonst wird im hiesigen Institut nur bei der Prüfung von Lumbalflüssigkeiten mit absteigenden Mengen des Untersuchungsmaterials im Sinne der Nonne-Hauptmannschen Auswertungsmethode gearbeitet. Jedoch werden hierbei in der Regel von vornherein zwei verschiedene Extraktmengen herangezogen.

brauchen also nicht einheitlich zu liegen, und das ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß der Ausdruck der Reaktion die Resultante aus einer Reihe von Faktoren darstellt. Denn als Antagonisten der im Serum enthaltenen charakteristischen Funktionsfähigkeit müssen wir ja einmal den variierenden Gehalt an hämolytischen Ambozeptoren, dann aber auch das Serum als solches in Betracht ziehen, das, wie in einem folgenden Abschnitt noch besonders zu erörtern sein wird, auch unabhängig vom Ambozeptor- und Komplementgehalt antikomplementäre Extraktwirkungen paralisieren kann. So erscheint es nicht verwunderlich, daß in dem einen Falle (c) die Erhöhung der Serummenge verstärkend, im anderen (d) abschwächend wirkt.

Eine qualitative Aenderung ist übrigens auch in diesen beiden Fällen nicht eingetreten. Denn beide Serumproben mußten auch bei gewöhnlicher Anordnung (0,025 ccm Serum) als schwach positiv (d) oder wenigstens als verdächtig (c) bezeichnet werden. Auch ergeben sich aus den 27 Fällen, welche bei Steigerung der Serumdosen übereinstimmend negativ reagierten, keine Anhaltspunkte für einen wesentlichen Vorteil dieses Vorgehens. Eine verallgemeinernde Schlußfolgerung wird man allerdings bei der Kleinheit des Materials nicht ziehen dürfen. Immerhin sei erwähnt, daß sich unter den negativen Serumproben 4 Fälle von Lues I, 4 Lues latens, 1 Tabes dorsalis, 3 multiple Sklerose, 2 Epilepsie, 1 perniziöse Anämie, 1 Scharlach befanden, also Fälle, bei denen man teils auf Grund allgemeiner Erfahrung, teils auf Grund gewisser Literaturangaben erwarten konnte, durch quantitative Variation ein positives Ergebnis zu erhalten.

Ueber den Einfluß, den eine Steigerung der Extraktmenge, über die im allgemeinen benutzte maximale Dosis von 0,25 ccm der 6-fachen Extraktverdünnung ausübt, ist nicht viel zu sagen. Die Vermehrung der Extraktmenge war nämlich nur bis zum doppelten Multiplum (0,25 ccm 3-facher Verdünnung) möglich, und auch bei diesem Werte waren die Kontrollen oft schon bei sehr wenig rigoroser Beurteilung nicht mehr einwandfrei. Auf die Kontrollierung der doppelten Extraktmenge mußte hierbei überhaupt verzichtet werden, da 0,5 ccm der 3-fachen Verdünnung entweder im Verein mit Meerschweinchenserum (ohne Ambozeptor) hämolytisch wirkte, oder aber eigenhemmende Funktion ausübte. Aber auch die einfache Extraktmenge bewirkte in der hohen Dosis nicht selten an und für sich vollständige Hemmung der Hämolyse.

Abgesehen von derartigen auf Eigenhemmung des Extraktes zu beziehenden antikomplementären Wirkungen erwies sich die Steigerung der Extrakt Dosen bei der Untersuchung von 183 Serumproben (davon 110 positiv, 73 negativ) als irrelevant.

III. Ueber den Einfluß von Variationen der Komplementmenge.

Zur Untersuchung über den Einfluß der Komplementmenge gab die schon in der Einleitung erwähnte Arbeit von Meirovsky den Anlaß, nach welcher bei der im hiesigen Institut üblichen Methode durch einen Ueberschuß lösender Faktoren einerseits zahlreiche schwach reagierende positive Sera der Diagnose entzogen, andererseits paradoxe Reaktionen vermieden werden sollen. Daß dies in dieser allgemeinen Form jedenfalls nicht zutrifft, haben bereits Ritz und Sachs ausgeführt. Trotzdem erschien es nicht ohne Interesse, den Einfluß quantitativer Variationen im Sinne der von Meirovsky und anderen Autoren geübten Versuchsanordnung gegenüber der Methodik des hiesigen Institutes zu erproben. Im wesentlichen bestehen die Differenzen darin, daß an Stelle der hier üblichen Mengen von 0,025 ccm Meerschweinchenserums, 0,025 ccm Patientenserums und ca. 4 Ambozeptoreinheiten 0,0125 ccm Meerschweinchenserums, 0,05 ccm Patientenserums und $2\frac{1}{2}$ —3 Ambozeptoreinheiten gewählt werden. Ich ging daher in folgender Weise vor:

Die Wassermannsche Reaktion wurde mit einem und demselben Serum in zwei Ausführungsformen angestellt:

A. Absteigende Extraktmengen wurden mit je 0,25 ccm 10-facher Verdünnung des Patientenserums und je 0,25 ccm 10-facher Verdünnung des Meerschweinchenserums digeriert. Zusatz von Blut mit 4 Ambozeptoreinheiten.

B. Absteigende Extraktmengen wurden mit je 0,25 ccm 5-facher Verdünnung des Patientenserums und je 0,25 ccm 20-facher Verdünnung des Meerschweinchenserums digeriert. Zusatz von Blut mit $2\frac{1}{2}$ —3 Ambozeptoreinheiten.

Natürlich wurde die Ambozeptoreinheit zu A und B in zwei gesonderten Vorversuchen mit 10- und 20-facher Verdünnung des Meerschweinchenserums ermittelt.

In dieser Weise habe ich insgesamt 728 Serumproben vergleichend geprüft. Dabei ergaben sich bei der Anordnung B (doppelte Patientenserummengen, halbe Komplementmenge) sehr

oft nicht unerhebliche Schwierigkeiten bei der Beurteilung. Es zeigte sich nämlich, daß einerseits die Extraktkontrollen meist sehr starke Hemmung aufwiesen, andererseits auch die Serumkontrollen zuweilen beträchtliche Eigenhemmung zeigten. Dadurch war eine einwandfreie Beurteilung in vielen Fällen nicht mehr möglich, und es entspricht wohl auch der Erfahrung anderer Autoren [vgl. hierzu Kromayer und Trinchese¹⁾ u. a.], daß bei einer Reduktion der Komplementmenge auf die Hälfte und beim Arbeiten mit nur 2—3 Ambozeptoreinheiten Eigenhemmungen mehr oder weniger störend in den Vordergrund treten. Diese Eigenhemmungen von Extrakt und Serum mußten natürlich für die Diagnosenstellung eingehende Berücksichtigung finden. Bei derartiger Beurteilung haben von den von mir vergleichend geprüften Serumproben 312 Sera übereinstimmend positiv und 395 Sera übereinstimmend negativ reagiert. Daß bei den positiven Seris sehr oft die Anordnung B (doppelte Patientenserummengung, halbe Komplementmenge) noch mit geringeren Extrakt Dosen positive Reaktion ergab, darauf wird man nicht allzu viel Gewicht legen dürfen; denn bei der durchweg stärkeren antikomplementären Extraktwirkung in Anordnung B, wozu noch zuweilen eigenhemmende Serumfunktionen hinzutreten, wird man quantitative Differenzen in dem beobachteten Sinne nur mit großer Vorsicht verwerten dürfen. Wichtiger erscheint ein Rest von 21 Serumproben, welche bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung (A) negativ reagiert hatten, in der Anordnung B aber eine positive Reaktion oder wenigstens eine Andeutung einer solchen ergaben. Wenn ich allerdings hierbei von 21 nur in Anordnung B positiv reagierenden Seris spreche, so muß ich das insofern einschränken, als die Kriterien, nach denen die Beurteilung erfolgte, im allgemeinen nicht den sonst zu stellenden Anforderungen entsprachen, indem diejenigen Extrakt Dosen, mit denen die Sera Hemmungen ergaben, in der Mehrzahl der Fälle an und für sich und fast immer in der doppelten Menge mehr oder weniger stark antikomplementär wirkten. Zur Veranschaulichung gebe ich in der folgenden Tabelle III eine Uebersicht über diese Versuchsbeispiele.

1) Kromayer und Trinchese, Med. Klinik, 1912, No. 10, p. 404.

Tabelle III.

Eingetretene Hämolyse bei der Wassermanschen Reaktion mit den in Anordnung A negativ reagierenden Serumproben in Anordnung B (0,05 ccm Patientenserum, 0,0125 ccm Komplement)											
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l
Extraktosis + Patientenserum	0	m.	m.	Spch.	0	Spch.	0	0	0	w.	Spch.
Einfache Extraktosis	m.	f. k.	f. k.	k.	f. k.	w.	w.	m.	m.	f. k.	st.
Doppelte Extraktosis	0	0	0	f. k.	m.	0	0	0	0	0	0

Eingetretene Hämolyse bei der Wassermanschen Reaktion mit den in Anordnung A negativ reagierenden Serumproben in Anordnung B (0,05 ccm Patientenserum, 0,0125 ccm Komplement)											
	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	
Extraktosis + Patientenserum	0	Spch.	0	0	0	m.	m.	0	0	Spch.	
Einfache Extraktosis	st.	m.	m.	m.	Sp.	k.	k.	f. k.	f. k.	k.	
Doppelte Extraktosis	m.	w.	w.	w.	0	st.	k.	st.	0	f. k.	

Wie die Tabelle zeigt, habe ich zunächst als positiv alle Sera zusammengefaßt, die im Verein mit Extrakt eine, wenn auch geringgradig stärkere Hemmung ergaben als der Extrakt in gleicher Dosis an und für sich. Legt man der Beurteilung die rigorose Forderung zugrunde, daß der Extrakt in dem doppelten Multiplum der Versuchsdosis nicht oder nur in geringem Maße antikomplementär wirkt, daß also die Kontrolle mit der doppelten Extraktosis wenigstens starke Hämolyse aufweist, so können nur 5 Sera (die Serumproben d, r, s, t, v) als positiv resp. schwach positiv gelten. Die Zahl der derart als positiv zu erachtenden Reaktionen vermehrt sich auch nicht, wenn man, wie das wohl unbedingt gefordert werden muß, verlangt, daß die einfache Extraktosis an und für sich jeder antikomplementären Wirkung entbehrt. Was nun die bezeichneten 5 Sera anlangt, so handelt es sich im Falle d

tatsächlich um Lues latens, während die übrigen Serumproben wohl wegen Luesverdachts zur Untersuchung gelangten, ohne daß uns aber nähere klinische Details zur Verfügung standen. Begnügt man sich allerdings mit der Forderung, daß es für die positive Diagnose hinreicht, wenn die Kontrolle mit der einfachen Extraktosis starke, aber nicht vollständige Hämolyse aufweist, wenn nur der Zusatz des Patientenserums die antikomplementäre Wirkung deutlich verstärkt, so würden sich 7 weitere schwach positive Reaktionen bei den Serumproben b, c, e, k, l, m und u ergeben. Von diesen 7 Seris stammen 2 von Luesfällen, während bei den übrigen 5 die klinische Diagnose zweifelhaft, Lues aber nicht auszuschließen war. Jedenfalls ergibt sich also, daß durch Verwendung der doppelten Patientenserummengung und der halben Komplementosis, wie es der von Meirovsky und in Breslau (Bruck, M. Stern) geübten Anordnung entspricht, eine Steigerung positiver Reaktionen erzielt werden kann (cf. auch Kromayer und Trinchese). Berücksichtigt man nur diejenigen Sera, bei denen die einfache Extraktkontrolle komplett gelöst ist, so ergibt sich innerhalb des von mir untersuchten Materials eine Steigerung der positiven Reaktionen von 312 auf 316, also um 1,28 Proz., während allerdings bei Verwertung auch derjenigen Reaktionen, bei denen die Extraktkontrolle nur fast komplette oder starke Hämolyse aufweist, die Vermehrung der positiven Fälle, 12 Serumproben entsprechend, eine Steigerung um 3,84 Proz. ergeben würde. Ob aber die Verfeinerung, welche derart die Anordnung B darstellt, von praktischem Vorteil ist, d. h. ob sie den Rahmen der für Syphilis charakteristischen Reaktionsbreite nicht überschreitet, das möchte ich vorläufig dahingestellt sein lassen.

Nach weiteren Erfahrungen des hiesigen Instituts scheint es, daß die Anordnung B bei geeigneten Extrakten jedenfalls insofern ein wertvolles Hilfsmittel darstellt, als in Anordnung A schwach positiv reagierende Sera dabei durch ausgesprochen positiven Ausfall imponieren. Unter geeigneten Extrakten sind dabei solche zu verstehen, welche an und für sich nicht oder nur in geringem Maße auch bei Verwendung der doppelten Gebrauchsdosis antikomplementär wirken. Auch kann man, wie sich gezeigt hat, die Ambozeptordosis erhöhen (auf etwa 4—6 Ambozeptoreinheiten), ohne daß derart die

größere Empfindlichkeit der Anordnung B verschwindet. Auf diese Weise erhält man in den meisten Fällen einwandfreie Kontrollen, und nur selten begegnet man eigenhemmenden Serumwirkungen. Es hat sich aus den bisherigen Erfahrungen ergeben, daß unter günstigen Versuchsbedingungen (Extrakt ohne Eigenhemmung, 4–6 Ambozeptoreinheiten) die Beurteilung in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch mangelhafte Kontrollen nicht gestört wird, und daß sich trotzdem die Versuchsanordnung B gegenüber der gewöhnlichen Methode A als eine verfeinerte Modifikation erweist. Ob aber diese Verfeinerung allgemein zulässig ist, das ist vorläufig schwer zu entscheiden. Zwar wird man wohl annehmen dürfen, daß bei schwächer wirkenden Extrakten die Anordnung B in vorteilhafter Weise die Zahl der positiven Reaktionen steigert, andererseits wird man aber daran denken müssen, daß bei stark wirksamen Extrakten, zu denen ich die von mir benutzten cholesterinierten Rinderherzextrakte rechnen darf, die Anordnung B auch bei nicht syphilitischen Serumproben positive Resultate ergibt und derart zu Fehldiagnosen führt. Ob dem so ist, darüber werden weitere Untersuchungen, die im hiesigen Institut fortgesetzt werden sollen, Aufklärung bringen müssen. Nach den vorläufigen Ergebnissen darf man jedenfalls annehmen, daß der negative Ausfall in Anordnung B (doppelte Patientenserummeng, halbe Komplementmenge) die Wahrscheinlichkeit eines Fehlens von Syphilis steigert. Paradoxen Reaktionen bin ich bisher auch bei der Anordnung B, trotz zahlreicher Wiederholungen, insbesondere schwach und negativ reagierender Serumproben, nicht begegnet.

Es war nun die Frage nicht ohne Interesse, ob die Verfeinerung, welche die Anordnung B darstellt, an erster Stelle durch die Steigerung der Patientenserumdosis oder durch die Verminderung der Komplementdosis bedingt wird, ob mit anderen Worten die Vermeidung eines Ueberschusses lösender Faktoren, wie man es nach den Angaben Meirowky's annehmen durfte, oder andere Momente für die Differenzen der Ergebnisse maßgebend sind. Tatsächlich zeigten einige orientierende Versuche mit solchen Serumproben, welche in Anordnung A negativ, in Anordnung B positiv reagiert hatten, daß die Verdoppelung der Patientenserummeng auf 0,05 ccm

bei gleichbleibender Komplementmenge (0,025 ccm) auf das Ergebnis nicht von wesentlichem Einfluß ist, womit aber nicht verneint sein soll, daß auch die Erhöhung der Patientenserummenge gelegentlich zu einer Verstärkung führen könnte. Daß aber die größere Empfindlichkeit der Anordnung B nicht oder nicht allein durch eine einfache Reduktion lösender Faktoren veranlaßt ist, zeigten besondere Versuche, in denen die Ambozeptordosis einerseits in Anordnung A auf die Hälfte reduziert, andererseits in Anordnung B verdoppelt wurde. Hierfür seien in der folgenden Tabelle IV einige Versuchsbeispiele angeführt.

Es wurden absteigende Mengen Extraktverdünnungen
in den Reihen A 1 und A 2 mit je 0,25 ccm 10-facher Patientenserumverdünnung und je 0,25 ccm 10-facher Meerschweinchenserumverdünnung,
in den Reihen B 1 und B 2 mit je 0,25 ccm 5-facher Patientenserumverdünnung und 20-facher Meerschweinchenserumverdünnung digeriert.

Nach der üblichen $\frac{5}{4}$ -ständigen Inkubation erfolgte Zusatz von Hammelblut und Ambozeptor. Die Ambozeptormenge betrug
in den Reihen A 1: 4 Ambozeptoreinheiten, B 1: 5 Ambozeptoreinheiten,
in den Reihen A 2: 2 Ambozeptoreinheiten, B 2: $2\frac{1}{2}$ Ambozeptoreinheiten.

Im ersten Teil der folgenden tabellarischen Uebersicht sind die Extraktkontrollen bei den vier verschiedenen Anordnungen, im zweiten Teil die Hauptversuche mit 2 negativen und 2 positiven Seris notiert.

Tabelle IV.

1. Teil (Extraktkontrollen).

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und ab- steigenden Extraktmengen			
	A. 0,025 ccm Meerschweinchenserum		B. 0,0125 ccm Meerschweinchenserum	
	1.	2.	1.	2.
	4 Ambozeptor- einheiten	2 Ambozeptor- einheiten	5 Ambozeptor- einheiten	$2\frac{1}{2}$ Ambozeptor- einheiten
0,5	0	0	0	0
0,4	st.	0	0	0
0,3	k.	Sp.	Spch.	0
0,2	k.	w.	k.	Sp.
0,1	k.	w.	k.	f. k.
0	k.	m.	k.	k.

2. Teil (Hauptversuche mit den Serumproben α — δ).

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, Patientenserum und absteigenden Extraktmengen			
	α	β	γ	δ
A 1.	0,025 ccm Meerschweinchenserum 0,025 „ Patientenserum			
			4 Ambozeptor- einheiten	
0,25	k.	k.	f. k.	f. k.
0,15	k.	k.	k.	k.
0,1	k.	k.	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.
A 2.	0,025 ccm Meerschweinchenserum 0,025 „ Patientenserum			
			2 Ambozeptor- einheiten	
0,25	k.	k.	w.	w.
0,15	k.	k.	m.	w.
0,1	k.	k.	st.	w.
0	k.	k.	k.	k.
B 1.	0,0125 ccm Meerschweinchenserum 0,05 ccm Patientenserum			
			5 Ambozeptor- einheiten	
0,25	st.	w.	0	0
0,15	k.	f. k.	0	0
0,1	k.	f. k.	0	0
0	k.	k.	k.	k.
B 2.	0,0125 ccm Meerschweinchenserum 0,05 ccm Patientenserum			
			2½ Ambozeptor- einheiten	
0,25	st.	w.	0	0
0,15	f. k.	st.	0	0
0,1	k.	f. k.	0	0
0	k.	k.	k.	k.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die beiden Sera γ und δ , welche in Anordnung B (B 2 der Tabelle) positiv reagieren¹⁾, auch dann zu dem gleichen Resultat führen, wenn die Ambozeptordosis auf 5 Ambozeptoreinheiten erhöht wurde (B 1). Andererseits läßt sich in Anordnung A, wie A 2 der Tabelle zeigt, durch eine Reduktion der Ambozeptormenge auf 2 Einheiten die positive Reaktion nicht zur Anschauung bringen. Denn in Berücksichtigung der bei 2 Ambozeptoreinheiten und Anordnung A stark gehemmten Extraktkontrollen können die Hemmungen, welche bei den Seris γ und δ im Teil A 2

1) Es handelt sich hierbei um Sera, welche bei früherer Untersuchung auch in Anordnung A positiv reagiert hatten, später aber, wie die Tabelle zeigt, bei diesem Verfahren nur noch eine Andeutung von positiver Reaktion (fast komplett) aufwiesen.

der Tabelle interferieren, nicht mehr als positiv gelten. Obwohl also, wie insbesondere die Extraktkontrollen zeigen, in der Anordnung B 1 die Lösungsenergie des Gemisches von Immunambozeptor und Komplement sicherlich stärker ist, als in der Anordnung A 2, ist die Anordnung B 1 zur Demonstration der positiven Reaktion geeigneter. Man wird hieraus schließen dürfen, daß, wie das bereits vermutet wurde, die Verfeinerung durch die Anordnung B auch durch die Reduktion der Meerschweinchenserummengung und nicht allein durch diejenige der komplettierenden Kraft verursacht wird. Daß die Erhöhung der Patientenserumdosis nicht von gleicher ausschlaggebender Bedeutung sein dürfte, darauf ist bereits früher hingewiesen worden. Ob aber etwa bei Reduktion der Meerschweinchenserummengung die Steigerung der Patientenserumdosis einen Vorteil darstellt, soll dahingestellt bleiben.

In dem hier erörterten Sinne, daß nämlich bei der Verfeinerung in Anordnung B die Reduktion der Meerschweinchenserummengung eine Rolle spielt, sprechen auch weitere Beobachtungen, nach denen bei Erhöhung der Meerschweinchenserumdosis (cf. hierzu auch Kromayer und Trinchese) auf das doppelte Multiplum (0,05 ccm) die Reaktionsfähigkeit trotz Verwendung äquivalenter Ambozeptoreinheiten eine Einbuße erfährt, wofür Tabelle V ein Versuchsbeispiel zeigt.

Die Wassermannsche Reaktion wurde hierbei in 2 Parallelreihen:
A unter Verwendung von 0,025 ccm Meerschweinchenserum,
B unter Verwendung von 0,05 ccm Meerschweinchenserum
ausgeführt.

Bei der vorangehenden Ambozeptoreinstellung erwies sich die Ambozeptoreinheit für beide Komplementdosen annähernd gleich. Das Ergebnis der Wassermannschen Reaktion zeigt Tabelle V.

Tabelle V.
1. Teil (Extraktkontrollen).

Mengen der Extraktverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und absteigenden Extraktmengen	
	A. 0,025 ccm Komplement	B. 0,05 ccm Komplement
0,5	0	Spch.
0,4	0	w.
0,3	m.	k.
0,2	k.	k.
0,1	k.	k.
0	k.	k.

2. Teil (Hauptversuche).

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Komplement, 0,025 ccm Patientenserum und absteigenden Extraktmengen					
	a	b	c	d	e	f
A. 0,025 ccm Komplement und Serumproben.						
0,25	Spch.	0	k.	0	k.	0
0,15	Spch.	0	k.	0	k.	0
0,1	Sp.	0	k.	0	k.	0
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
B. 0,05 ccm Komplement und Serumproben.						
0,25	k.	Sp.	k.	0	k.	k.
0,15	k.	k.	k.	0	k.	k.
0,1	k.	k.	k.	0	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabelle V zeigt, entgehen bei Verwendung der doppelten Meerschweinchenserumdosis (0,05 ccm) eine Reihe von positiven Serumproben (a, b, f) dem Nachweis oder ihre Reaktionsfähigkeit erscheint nicht unerheblich abgeschwächt. Allerdings könnte man im Hinblick auf die Extraktkontrollen (1. Teil der Tabelle V) den Einwand erheben, daß die hämolytischen Faktoren in der Anordnung mit 0,05 ccm Meerschweinchenserums im Ueberschuß vorhanden sind, denn der Extrakt wirkt bei diesem Versuchsverfahren (B) an und für sich erheblich weniger antikomplementär als bei Verwendung von 0,025 ccm Komplement, obwohl die Ambozeptordosen zwar absolut gleich, aber äquivalent gewählt sind. Ich möchte mir daher erlauben, in Tabelle VI noch ein weiteres Versuchsbeispiel anzuführen, für welches dieser Einwand nicht zugänglich erscheint.

Es handelt sich hier um Versuche, in denen die Ambozeptoreinstellung bei Verwendung von 0,025 und 0,05 ccm Meerschweinchenserums wiederum annähernd gleiche Titer von 1:4000 ergeben hatte. Trotzdem wurden für die Wassermannsche Reaktion in beiden Versuchsreihen 4-fach differente Ambozeptordosen gewählt, und zwar für die Reihen mit

- a) 0,025 ccm Meerschweinchenserum eine 500-fache Ambozeptorverdünnung (entsprechend 8 Ambozeptoreinheiten),
- b) 0,05 ccm Meerschweinchenserum eine 2000-fache Ambozeptorverdünnung (entsprechend 2 Ambozeptoreinheiten).

Das Ergebnis zeigt Tabelle VI.

Tabelle VI.
1. Teil (Extraktkontrollen).

Mengen der 6-fachen Extraktverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und absteigenden Extraktmengen	
	A. 0,025 ccm Komplement	B. 0,05 ccm Komplement
0,5	0	0
0,4	Spch.	Spch.
0,3	k.	w.
0,2	k.	m.
0,1	k.	st.
0	k.	f. k.

2. Teil (Hauptversuche).

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Komplement, 0,025 ccm Patientenserum und absteigenden Extraktmengen					
	a	b	c	d	e	f
A. 0,025 ccm Komplement und Serumproben.						
0,25	0	w.	0	0	0	k.
0,15	0	m.	0	Spch.	0	k.
0,1	0	f. k.	0	Spch.	0	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
B. 0,05 ccm Komplement und Serumproben.						
0,25	0	w.	0	Sp.	0	k.
0,15	Spch.	st.	0	w.	0	k.
0,1	w.	f. k.	0	st.	0	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die hämolytischen Faktoren bei Verwendung von 0,05 ccm Meerschweinchenserums eher zu gering bemessen waren. Denn es zeigt sich in den Extraktkontrollen, daß die Hemmungen recht erheblich sind, und sogar im hämolytischen System ohne Extrakt nur fast komplette Hämolyse eingetreten ist, während die Extraktkontrollen bei Verwendung von 0,025 ccm Meerschweinchenserums den zu stellenden Anforderungen hinreichend entsprachen. Um so beweisender sind die, wenn auch nur quantitativen Unterschiede, welche sich beim Vergleich der Reaktionsfähigkeit der Patientensera unter Verwendung von 0,025 und 0,05 ccm Komplement dartun. Trotz des relativen

Ueberschusses an lösenden Faktoren, welche im ersteren Falle bestehen, erscheint die Reaktion bei den Serumproben a, b, d bei Verwendung von 0,05 ccm Meerschweinchenserums abgeschwächt. Man wird aus diesen Versuchen schließen dürfen, daß wenigstens bei den von mir benutzten Extrakten innerhalb gewisser Grenzen nicht so sehr die hämolytische Kraft des gewählten Systems von Ambozeptor und Komplement, als vielmehr auch die Serummenge von wesentlicher Bedeutung ist. Bei der Verminderung der Meerschweinchenserumdosis würde demnach an erster Stelle nicht die Reduktion der hämolytischen Kraft, sondern die Verminderung des Meerschweinchenserums als solchem ein ausschlaggebendes Moment darstellen.

Dieses Ergebnis, das ich aus meinen Versuchen folgern zu dürfen glaube, kann nicht so sehr überraschen, wenn man bedenkt, daß ja die Wassermannsche Reaktion nach den Erfahrungen vieler Autoren auch dann unter Umständen noch zwischen positiven und negativen Seris zu unterscheiden erlaubt, wenn der Extrakt an und für sich starke Eigenhemmung besitzt. Daß unter derartigen Bedingungen bei Kombination von Extrakt und negativem Serum trotzdem komplette Hämolyse auftritt, dürfte eben nicht allein durch den Ambozeptorgehalt der Patientensera, sondern ebenso sehr durch die paralyisierende Funktion, welche das Serum als solches gegenüber der antikomplementären Extraktwirkung besitzt, veranlaßt sein. Tatsächlich stellen ja, wie das schon mehrfach von verschiedenen Seiten hervorgehoben wurde, die sogenannten Extraktkontrollen in Wirklichkeit eine zu rigorose Kontrollierung dar, indem sie für das Hervortreten antikomplementärer Extraktwirkungen günstigere Bedingungen darbieten, als es den im Hauptversuch durch das Hinzukommen des Patientenserums obwaltenden Verhältnissen entspricht. Trotzdem kann man sie zur einwandfreien Beurteilung nicht entbehren. Freilich wird man dabei dem Ambozeptorgehalt des Patientenserums eine Bedeutung keinesfalls absprechen können, zumal wenn man berücksichtigt, daß durch die Verminderung der Meerschweinchenserummenge gerade die komplettierende Wirkung auf die Normalambozeptoren wohl ganz besonders reduziert sein dürfte. Auch in diesem Moment dürfte die größere Empfindlichkeit, welche die Verminderung des Komplementgehaltes bedingt, eine ihrer Ursachen haben. Dem entsprechen auch Erfahrungen, nach denen beim Arbeiten mit 0,0125 ccm Meerschweinchenserums trotz Steigerung der Patientenserummenge auf das Doppelte und Verwendung eines Ambozeptorüberschusses gelegentlich immerhin antikomplementäre Wirkungen in den Serumkontrollen zum Nachweis gelangen. Daß aber jedenfalls die antikomplementäre Extraktwirkung nicht allein von der Stärke der lytischen Faktoren, sondern ebenso von der vorhandenen Serummenge beeinflusst wird, soll im folgenden Abschnitt noch besonders erörtert werden.

Andererseits ist aber zu berücksichtigen, daß bei Reduktion der Komplementmenge und gleichzeitiger Steigerung der Patientenserumdosis die Bedingungen in bezug auf den Serumgehalt im Hauptversuch dem von uns geübten Verfahren entsprechen. Wenn trotzdem eine größere Empfindlichkeit der Reaktion erzielt wird, so wird man annehmen müssen, daß entweder das Meerschweinchenserum als solches dem Zustandekommen der positiven Reaktion ungünstiger ist als das Menschen Serum, oder aber, daß noch weitere Faktoren hierbei interferieren. Die Verstärkung der hämolytischen Kraft des Systems von Ambozeptor und Komplement dürfte hierbei keine wesentliche Rolle spielen, möglicherweise treten aber die lytischen Faktoren des Menschen Serums bei Reduktion der Komplementmenge so sehr in den Hintergrund, daß bei einer Steigerung der Patientenserummengung die Vermehrung der für Syphilis charakteristischen Reaktionsstoffe dominieren kann.

IV. Ueber den Einfluß der Serummengung auf die anti-komplementäre Extraktwirkung.

Bereits ein Vergleich der Extraktkontrollen in den im vorhergehenden Abschnitt mitgeteilten Tabellen IV, V und VI läßt Bedingungen erkennen, welche unter der Annahme einer alleinigen Abhängigkeit der antikomplementären Extraktwirkung von dem Grade der hämolytischen Wirksamkeit nicht ohne weiteres verständlich erscheinen. Es zeigt sich nämlich, daß bei Vermehrung der Komplementmenge von 0,0125 ccm auf 0,025 ccm (Tabelle IV) trotz einer relativ geringeren Zahl von Ambozeptoreinheiten die antikomplementäre Wirkung eine geringere ist. Das ist naturgemäß insbesondere bei größeren Extraktmengen zu erkennen und kann bei geringeren Extrakt-dosen deshalb nicht zum Vorschein kommen, weil das hämolytische System an und für sich bei der kleineren Komplementdosis stärker wirksam ist. Die gleiche Steigerung der antikomplementären Wirkung ergibt sich bei einer Erniedrigung der Meerschweinchenserummengung von 0,05 ccm auf 0,025 ccm im 1. Teil der Tabelle V, trotz einer Aequivalenz von Ambozeptoreinheiten. In Tabelle VI ist eine gleichsinnige Differenz allerdings nicht festzustellen, aber immerhin ist es bemerkens-

wert, daß in den oberen Gliedern der Reihen der Grad der antikomplementären Wirkung übereinstimmt, obwohl in der Reihe mit 0,05 ccm Meerschweinchenserum die hämolytische Kraft durch Verwendung einer absichtlich zu gering bemessenen Ambozeptordosis sicherlich geringer ist als in Reihe A mit 0,025 ccm Meerschweinchenserum.

Eine Reihe von systematischen Untersuchungen führten stets zu einem entsprechenden Ergebnis, und ich lasse hierfür im folgenden ein weiteres Versuchsbeispiel folgen.

In einem Vorversuche wurde zunächst die Ambozeptoreinheit für 0,025 und 0,0125 ccm Meerschweinchenserums festgestellt. Sie betrug

I. für 0,025 ccm Meerschweinchenserums 0,0005 Ambozeptor,

II. für 0,0125 ccm Meerschweinchenserums 0,001 Ambozeptor.

Sodann wurden absteigende Mengen Extraktverdünnung in den Reihen I a und I b je mit 0,025 ccm Meerschweinchenserums, in den Reihen II a und II b je mit 0,0125 ccm Meerschweinchenserums $\frac{5}{4}$ Stunden bei 37° digeriert. Dann wurde Hammelblut in den Reihen a mit 2 Ambozeptoreinheiten, in den Reihen b mit 4 Ambozeptoreinheiten zugefügt. Das Ergebnis zeigt Tabelle VII.

Tabelle VII.

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und absteigenden Extraktmengen			
	I. 0,025 ccm Meerschweinchenserum		II. 0,0125 ccm Meerschweinchenserum	
	a 2 Ambozeptor- einheiten	b 4 Ambozeptor- einheiten	a 2 Ambozeptor- einheiten	b 4 Ambozeptor- einheiten
0,5	m.	st.	0	0
0,4	f. k.	f. k.	Spch.	Spch.
0,3	f. k.	k.	st.	f. k.
0,2	k.	k.	f. k.	k.
0,1	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabelle zeigt, ist die antikomplementäre Wirkung des Extraktes bei Verwendung der halben Meerschweinchenserumdosis deutlich stärker ausgeprägt, und diese Differenz kommt besonders eklatant zum Ausdruck, wenn man die Kolumnen Ia und IIb der Tabelle vergleicht, in denen einerseits schwache Hemmung bei großer

Komplementdosis und zwei Ambozeptoreinheiten, andererseits starke Hemmung bei starker Komplementdosis und 4 Ambozeptoreinheiten erkenntlich sind.

Wenn man demnach glauben durfte, daß der Grad der antikomplementären Wirkung innerhalb gewisser Grenzen der vorhandenen Serummenge umgekehrt proportional ist, so ergab sich die Möglichkeit, die Richtigkeit dieser Vermutung dadurch zu erproben, daß die Meerschweinchenserummengemenge vermehrt wurde, ohne den Komplementgehalt zu erhöhen. Zu diesem Zwecke wurde geprüft, welche Veränderung die antikomplementäre Extraktwirkung erfährt, wenn zu identischen Mengen aktiven Meerschweinchenserums ein Zusatz von Meerschweinchenserum erfolgte, das durch $\frac{1}{2}$ -stündiges Erhitzen auf 55° inaktiviert worden war. Es wurde demnach folgendermaßen verfahren:

Absteigende Mengen 6-facher Extraktverdünnung wurden unter Zusatz von

- a) 0,1 ccm 4-fach verdünnten inaktiven Meerschweinchenserums,
- b) 0,1 ccm 6-fach verdünnten inaktiven Meerschweinchenserums,
- c) 0,1 ccm 8-fach verdünnten inaktiven Meerschweinchenserums,
- d) 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung

mit je 0,15 ccm 6-fach verdünnten aktiven Meerschweinchenserums (Gesamtvolumen 0,75 ccm) $1\frac{1}{4}$ Stunden bei 37° digeriert. Sodann erfolgte gleichmäßiger Zusatz von Blut und Ambozeptor. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgt

- α) nach kurzer geeigneter Frist,
- β) nach 2 Stunden.

Das Ergebnis zeigt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Mengen der 6-fachen Extrakt- verdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von absteigenden Extraktmengen und je 0,025 ccm aktiven Meerschweinchenserums unter Zusatz von inaktivem Meerschweinchenserum in den Mengen							
	a) $\frac{1}{4}$ 0,1 ccm		b) $\frac{1}{6}$ 0,1 ccm		c) $\frac{1}{8}$ 0,1 ccm		d) 0	
	α	β	α	β	α	β	α	β
0,5	Sp.	w.	Sp.	Sp.	0	0	0	0
0,4	w.	m.	w.	w.	Sp.	w.	0	0
0,3	m.	st.	m.	st.	m.	f. k.	m.	f. k.
0,2	st.	f. k.	st.	f. k.	st.	k.	f. k.	k.
0,1	f. k.	k.	f. k.	k.	f. k.	k.	k.	k.
0	f. k.	k.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.

Bei den Versuchen mit Zusatz von inaktiviertem Meer-schweinchenserum ist allerdings die allgemeine Erfahrung zu berücksichtigen, daß die Komplementwirkung des aktiven Meerschweinchenserums in der Regel durch inaktives Meer-schweinchenserum mehr oder weniger stark gehemmt wird. Bei genügendem Ambozeptorgehalt äußert sich diese Hemmung nur durch verzögerten Eintritt der Hämolyse, was in Kolonnen a und b der Tabelle VIII, wenn auch schwach, so immerhin deutlich zum Vorschein kommt. Unter diesen Umständen erscheint die Reduktion, welche die antikomplementäre Wirkung größerer Extrakt Dosen durch das inaktivierte Meer-schweinchenserum in Tabelle VIII und in einer Reihe von analogen Versuchen erfahren hat, sehr beweiskräftig. Es wird derart in der Tat die Auffassung durchaus bestätigt, daß die Vermehrung der Serummenge an und für sich unabhängig von dem Grade der hämolytischen Wirkung einen Antagonismus gegenüber der antikomplementären Extraktwirkung bedeutet.

Dieses Ergebnis steht freilich in einem scheinbaren Gegensatz zu Erfahrungen, über die jüngst Blumenthal¹⁾ berichtet hat und von denen ich erst nach Abschluß meiner Untersuchungen Kenntnis erhielt. Dieser Autor gelangt nämlich auf Grund seiner Untersuchungen zu der paradoxen Schlußfolgerung, daß die antikomplementäre Extraktwirkung um so stärker in Erscheinung tritt, je mehr Komplement vorhanden ist. Allerdings leidet die Uebersichtlichkeit der Versuche Blumenthals wesentlich dadurch, daß es sich um Extrakte handelt, die sämtlich an und für sich sehr erhebliche hämolytische Wirkung ausübten (Extrakthämolyse), was von Blumenthal selbst auch angegeben wird. Wenn auch Blumenthal annehmen zu sollen glaubt, daß die unspezifische Extrakthämolyse nicht die einzige Ursache der von ihm beschriebenen Phänomene ist, so dürfte es doch bei einer Durchsicht seiner Protokolle keinen wesentlichen Schwierigkeiten begegnen, wenn man die paradoxen von ihm beschriebenen Erscheinungen nur als den Ausdruck erheblicher hämolytischer Extraktwirkung ansieht. Dann kann es aber nicht wunder nehmen, daß die Hämolyse beim Digerieren derselben Extrakt Dosis mit aufsteigenden Komplementdosen nur bei größeren Serum mengen ausbleibt. Die Komplementhämolyse wäre dann eben in allen Gliedern der Reihe durch die antikomplementäre Extraktwirkung ausgeschaltet, während zur Aufhebung der Extrakthämolyse erst die größeren Serumdosen ausreichen. Die Erscheinungen wären bei

1) F. Blumenthal, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, 1913, p. 347.

dieser Auffassung also gar nicht paradox, würden vielmehr als die natürliche Resultante des Wechselspiels zwischen Komplementfunktion und antikomplementärer Extraktwirkung einerseits, zwischen Extrakthämolyse und antilytischer Serumwirkung andererseits aufzufassen sein. Wenn dem so ist, dann wäre allerdings ein Widerspruch zwischen den von Blumenthal beschriebenen Tatsachen und den von mir erhobenen Befunden nicht vorhanden, nur könnten dann die von Blumenthal gezogenen Schlußfolgerungen nicht mehr in dem gewollten Sinne verwertet werden. Jedoch möchte ich es dahingestellt sein lassen, ob die Verhältnisse bei verschiedenen Extrakten nicht differieren. Aber man wird gerade für Untersuchungen über den Einfluß der Serummenge auf die antikomplementäre Extraktwirkung durchaus empfehlen müssen, nicht hämolytische Extrakte zu benutzen, eine Forderung, welcher die von mir verwendeten cholesterinierten Rinderherzextrakte entsprachen.

Für die Praxis ergeben sich jedenfalls aus den hier erörterten Tatsachen Mahnungen zur Vorsicht in Bezug auf eine beliebige Variation der bei der Wassermannschen Reaktion interferierenden Serumdosen. In diesem Sinne stimme ich, wenn auch auf Grund andersartiger Ueberlegung, mit Blumenthal darin überein, daß es bei theoretischer Betrachtung nicht zweckmäßig erscheint, das Meerschweinchenserum in differenten Dosen auf Grund einer Komplementtitrierung zur praktischen Ausführung der Reaktion heranzuziehen. Vielmehr dürfte sich nach meinen Erfahrungen die Fortsetzung der bewährten Methode, bei konstanter Meerschweinchenserummenge in einem Vorversuch den Ambozeptor zu titrieren, auch weiterhin empfehlen. Ob dabei eine Reduktion der üblichen Komplementmenge von 0,025 auf 0,0125 ccm allgemein vorteilhaft ist, möchte ich vorläufig nicht zu entscheiden wagen. Daß die Empfindlichkeit durch diese Variation erhöht wird, glaube ich in Uebereinstimmung mit anderen Autoren annehmen zu dürfen, und es wird Sache weiterer Erfahrung sein, festzustellen, ob diese Erhöhung der Empfindlichkeit den Rahmen der charakteristischen Reaktionsfähigkeit nicht überschreitet. Hierbei wird wohl auch die Stärke des zur Verfügung stehenden Extraktes in Betracht gezogen werden müssen, und es dürfte immerhin denkbar erscheinen, daß dieselbe Variation der Anordnung, welche bei einem schwächer wirkenden Extrakt eine erwünschte Verfeinerung darstellt, bei einem stärker wirksamen Extrakt bereits die Grenzen des für

die Diagnostik Erlaubten überschreitet. Jedenfalls erscheint es **mir** auf Grund der Erfahrungen mit cholesterinierten Rinderherzextrakten empfehlenswert, bei einer Herabsetzung der Meerschweinchenserumdosis einen ziemlich erheblichen Ambozeptorüberschuß zu benutzen. Die Gefahren eines derartigen Ambozeptorüberschusses darf man gerade hierbei nicht überschätzen, da ja die größere Empfindlichkeit wenigstens zu einem Teil durch die Verminderung der absoluten Meerschweinchenserumdosis bedingt sein dürfte. In Uebereinstimmung damit stehen in gewissem Sinne auch die Angaben von **Sormani**¹⁾ für die von ihm empfohlene quantitative Methode, welche mit zuvor austitrierten Komplementdosen arbeitet, indem hierbei das 8—12-fache Multiplum des Ambozeptortiters und dazu noch zuvor sensibilisiertes Blut zur Anwendung gelangt, also ein hämolytisches System von ziemlich starker und rascher Wirkung. Aber auch hierbei dürfte vielleicht eine Herabminderung der Komplementmenge unter 0,0125 ccm nur mit großer Vorsicht zu erfolgen haben und wohl auch, wie man nach den vorliegenden Zahlenangaben annehmen darf, im allgemeinen nicht oder nur selten in Betracht kommen.

Zusammenfassung.

1) Auch für die cholesterinierten Rinderherzextrakte hat sich die langsame fraktionierte Verdünnung der alkoholischen Stammlösung mit physiologischer Kochsalzlösung für die Praxis der Wassermannschen Reaktion als zweckmäßiger erwiesen als die rasche Verdünnung. Bei gewissen Serumproben war allerdings die Reaktion noch bei geringeren Dosen rascher Verdünnung stärker ausgeprägt, gelegentlich auch bei solchen Seris, welche bei Verwendung größerer Extraktdosen mit der fraktionierten Verdünnung stärker wirkten.

2) Steigerung der Extrakt- oder Serumdosen außerhalb der in der Regel benutzten Variationsbreiten erwiesen sich bei Verwendung von 0,025 ccm Meerschweinchenserum und 0,25 ccm Blutaufschwemmung nicht von wesentlicher Bedeutung.

1) **B. P. Sormani**, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, p. 243.

3) Bei Reduktion der Komplementmenge auf die Hälfte und gleichzeitiger Verdoppelung der Patientenserumdosis erwies sich die Empfindlichkeit der Wassermannschen Reaktion gesteigert, wobei aber für die benutzten stark wirksamen Extrakte es dahingestellt bleiben muß, ob die derart erzielte Verfeinerung die Grenzen der für Syphilis charakteristischen Reaktionsbreite nicht überschreitet.

4) Für die genannte Modifikation der Versuchsanordnung empfiehlt es sich jedenfalls, Extrakte zu verwenden, welche an und für sich auch in doppelter Dosis nicht oder nur in geringem Maße antikomplementär wirken. Die größere Empfindlichkeit der Modifikation ist nicht wesentlich oder nicht allein durch die Reduktion der hämolytischen Kraft des Ambozeptor-Komplementsystems bedingt. Die Verwendung eines Ueberschusses von Ambozeptor ist daher nicht von großer Bedeutung und ratsam. Die Steigerung der Komplementdosis verursacht auch bei Verwendung eines Ambozeptorminimums eine Abschwächung der Reaktion.

5) Die antikomplementäre Extraktwirkung wird durch die Steigerung der Meerschweinchenserummengabe abgeschwächt. Diese Abschwächung erfolgt auch, wenn der Ambozeptorgehalt ein sehr geringer ist, indem die antikomplementäre Extraktfunktion in gewissen Grenzen umgekehrt proportional der Menge des vorhandenen Serums als solchem ist. Dementsprechend können die antikomplementären Eigenschaften des Extraktes auch durch Zusatz von inaktiviertem Meerschweinchen-serum abgeschwächt werden.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität Straßburg (Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Ueber die biologische Differenzierung normaler Tierharn mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion¹⁾.

Von Medizinalpraktikant **M. Rhein.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Juni 1913.)

Zur Bestimmung der Herkunft tierischer Harn mittelst chemischer Methoden stehen zwei Wege offen. Einerseits kann man in jedem Tierharn mit chemischen Methoden nach einem spezifischen Stoffe fahnden, andererseits kann man die quantitativen Verhältnisse der normal vorkommenden Harnbestandteile bei jeder Tierart feststellen und nach einem spezifischen Verhalten dieser Proportionen suchen. Keines dieser beiden Postulate liegt streng erfüllt in der Natur vor; außerdem sind unsere Kenntnisse über die vergleichende Chemie der Tierharn sehr gering. Eppinger (1), der einzige Autor, der eine Uebersicht über die Chemie der Tierharn gibt, schreibt: „Ueber die Zusammensetzung des Harnes der niederen Wirbeltiere liegt nur äußerst dürftiges Material vor.“ „Für die Säugetiere fehlen ebenfalls systematisch-vergleichende Harnuntersuchungen nach zoologischen Gesichtspunkten.“ Folgende Tatsachen erlauben eine, wenn auch sehr beschränkte, chemische Differenzierung von Tierharnen: Vögel- und Reptilienharn, die übrigens keine flüssige Konsistenz haben, enthalten hauptsächlich Harnsäure und fast keinen Harnstoff (1), Allantoin kommt im Menschenharn nur in Spuren vor (2), Guanin fehlt im Harn von Gänsen und Hühnern (3), Thioschwefelsäure ist im Katzen- und Hundeharn nachweisbar (4), und die Kynurensäure ist vorzugsweise im Harn von Hunden und Wölfen zu finden (5). In Bezug auf die Reaktion der Tierharn ist zu erwähnen, daß der Harn

1) Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist auf der Mikrobiologerversammlung in Berlin, Ostern 1913, von Herrn Geheimrat Uhlenhuth kurz mitgeteilt worden (35).

der fleischfressenden Tiere meist sauer, derjenige der Pflanzenfresser meist alkalisch reagiert (6). Was das quantitative Verhalten der normalen Ausscheidungsprodukte anbelangt, so wurden folgende Spezifitäten festgestellt: im Menschenharn kommt in 1 Liter ca. 1 g Hippursäure vor bei 10 g Gesamt-N, im Rinderharn 12 g Hippursäure bei 7,5 g Gesamt-N. Rinderharn hat einen relativ geringen Phenol- und Indoxylgehalt im Vergleich zu dem hohen des Pferdeharns (7). Einen Ueberblick über den Gehalt der Haussäugetierharns an einigen Stoffen gibt Ellenbergers Physiologie der Haussäugetiere (8). Die Schwierigkeit, Spezifitäten in der chemischen Zusammensetzung der Tierharns herauszufinden, wird noch dadurch erhöht, daß die Zusammensetzung des Harns stark von der Ernährung abhängig ist. Ist es doch bekannt, daß man bei Kaninchen durch Tryptophanfütterung das Auftreten von der für Hunde und Steppenwölfe spezifischen Kynurensäure erzeugen kann (9). Ebenso schlägt die alkalische Reaktion der Pflanzenfresser in die saure um, wenn man ihnen Fleischkost gibt oder sie hungern läßt (6). Das Verhältnis von Ammoniak-N zum Harnstoff-N wird ebenfalls durch die Nahrung wesentlich beeinflußt (10). Es sind deshalb nur diejenigen analytischen Befunde verwertbar, die man bei Hungertieren oder bei streng auf eine Nahrung eingestellten Tieren gemacht hat.

Mit Hilfe der Methode der quantitativen Verhältnisse ist Wiechowski (11) zu phylogenetisch sehr interessanten Ergebnissen gelangt. Während beim Menschen die Harnsäure das hauptsächlichste (90 Proz.) Endprodukt des Purinstoffwechsels ist, macht, wie er nachgewiesen hat, vom niederen Säugetier bis zum Affen hauptsächlich das Allantoin (90 Proz.) die Purinausscheidung aus. Bei der Untersuchung verschiedener Affenharns konnte er feststellen, daß beim Schimpansen dieselben Verhältnisse obliegen wie beim Menschen, daß dagegen im Harn der vom Menschen entfernten Affen wie *Macacus*, *Cynocephalus* und *Cercopithecus* viel Allantoin zu finden ist. Es ist dieser Befund ein neuer Beweis für die Verwandtschaft zwischen Mensch und Affe, und als solcher ist er den Präzipitationsuntersuchungen Uhlenhuths an die Seite zu stellen. Unter demselben Gesichtspunkt betrachtet

gibt auch der Nachweis eines gemeinsamen Stoffwechselendproduktes bei Reptilien und Vögeln einen neuen Beweis für die Verwandtschaft zwischen diesen beiden Tierklassen. Ebenso deutet das gemeinsame Vorkommen der Kynurensäure bei Hund und Wolf auf verwandtschaftliche Beziehungen hin.

Gelingt es auch nicht, auf chemischem Wege in jedem Tierharn spezifische Stoffe zu finden, so kann man doch auf die Anwesenheit solcher Stoffe aus der Beobachtung schließen, daß Tiere mit gutem Geruchsorgan die Provenienz eines Tierharns erkennen und das durch ihr Gebaren kenntlich machen. Auch der Mensch soll bei guter Uebung den Ursprung wenigstens eines Haustierharnes am Geruch erkennen können. Marek (12) schreibt: „Der frisch gelassene Harn hat bei jeder Tiergattung einen spezifischen, eigenartigen Geruch, woran bei gewisser Uebung seine Provenienz erkannt werden kann. Namentlich hat der Pferdeharn einen eigentümlichen, intensiven aromatischen Geruch, der auf Formolzusatz noch deutlicher hervortritt. Einen weniger intensiven aromatischen Geruch läßt der Harn der Wiederkäuer erkennen, wohingegen der Hundeharn einen fleischbrüh- oder knoblauchartigen, der Katzenharn einen widerlich scharfen Geruch zeigt. Einen etwas widerlichen scharfen Geruch hat auch der Harn des Schweines.“

Die Möglichkeit einer biologischen Differenzierung von Tierharnen läßt sich a priori bis zu einem gewissen Grade aus der regelmäßig festgestellten Anwesenheit von kolloidalen Eiweißkörpern im normalen Menschen- und Tierharn annehmen. Es kommen nach Mörner (13) in jedem normalen Menschenharn folgende Stoffe vor:

- 1) kleine Mengen Mukoid,
- 2) eine Nukleinsäure,
- 3) Chondroitinschwefelsäure,
- 4) geringe Mengen Serumalbumin.

Diese 4 Körper haben sämtlich Kolloidnatur und sind zu den Eiweißkörpern zu zählen, sie besitzen also sicher zwei der nach den heutigen Anschauungen für ein Antigen nötigen drei Eigenschaften (14). Ueber die dritte Eigenschaft des „Immunisierungsreizes“ läßt sich allerdings nichts im voraus sagen. Die Existenz der adialysablen Stoffe ist erwiesen

worden durch die Arbeiten von Eliacheff (15), Mörner (13), Salkowski (16) und durch die im Hofmeisterschen Laboratorium unternommenen Untersuchungen von Sasaki (17), Pons (18), Savarè (19) und Ebbeke (20).

Die Anwesenheit spezifischer Hämolyse im Blut von Kaninchen, die mit normalem Harn behandelt worden waren, stellten Schattenfroh (21) und Pribram (22) fest. Der erstere konstatierte außerdem, daß die Harnantigene hohe Temperaturen vertragen und durch Bakterienwachstum nicht geschädigt werden. Spezifische Präzipitine erhielten Pribram (22), Landsteiner und von Eisler (23), letztere nach Einspritzung von 200 bis 400 ccm Harn. Dagegen berichten Friedenthal (24), Fleischmann und Michaelis (25), Schattenfroh (21) über einen negativen Ausfall der Präzipitinreaktion. Es scheint nach den vorliegenden Ergebnissen nur sehr selten zu gelingen, Präzipitine gegen Harn zu erzeugen. Wahrscheinlich spielen physikalisch-chemische Reaktionen zwischen zwei so differenten Lösungen wie Serum und Harn eine große Rolle und beeinflussen die Fällung der Kolloide. Tierharn mit Hilfe der Präzipitin- oder Hämolyse-methode zu differenzieren, hat keiner der oben genannten Autoren versucht.

Komplementbindung durch normalen Harn und spezifisches Menschenantiserum hat Wilson (26) nicht erhalten können.

Uhlenhuth und Händel (27, 28) erzeugten zum ersten Mal Anaphylaxie bei Meerschweinchen durch Vorbehandlung mit normalen Tierharnen und nach Behandlung mit den entsprechenden Tierseris. Sie schreiben: „Es reagierten sonach die mit Urin vorbehandelten Tiere in ausgesprochener Weise auf die Nachbehandlung mit dem entsprechenden Serum, während die Prüfung mit großer Urinmenge ohne jeden Einfluß blieb. Von Interesse erscheint die Beobachtung auch deshalb, weil die Tiere nur auf die Prüfung mit dem entsprechenden Serum unter Anaphylaxiesymptomen reagierten und es sonach mittels der Anaphylaxiereaktion eventuell möglich wäre, die Urine der einzelnen Tierarten zu differenzieren.

Es seien hier ihre Versuchsprotokolle angeführt:

Versuch 62.

4 Meerschweinchen werden 3mal mit je 1,0 ccm menschlichen Urins (nach chemischer Probe nicht eiweißhaltig) subkutan vorbehandelt.

Am 29. Tage erhalten:

Meerschw. 1 = 1,0 ccm Menschenser. ic. und zeigt = sehr schwere Symptome, erholt sich.
„ 2 = 3,0 „ menschl. Urins ic. u. zeigt = 0
„ 3 = 1,0 „ Menschenserum „ „ „ = sehr schw. Sympt.
„ 4 = 1,0 „ Rinderserum „ „ „ = 0

Versuch 63.

3 Meerschweinchen werden 3mal mit je 1,0 ccm Eselurin (nach der chemischen Probe nicht eiweißhaltig) subkutan vorbehandelt.

Am 45. Tage erhält:

Meerschw. 1 = 1,0 ccm Eselserum ic. u. zeigt = sehr schwere Sympt.,
„ 2 = 0,5 „ „ „ „ = leichte, aber deutliche Erscheinungen
„ 3 = 1,0 „ Menschenser. „ „ „ = 0

Die Möglichkeit, Tierharnen zu differenzieren, ist also auch schon in dieser Arbeit ausgesprochen.

J. Minet und J. Leclercq (28) berichten dagegen über negative Resultate bei einmaliger Sensibilisation der Meerschweinchen. Da Uhlenhuth und Händel bei dreimaliger Sensibilisation deutliche Anaphylaxie erhielten, ist anzunehmen, daß die einmalige Vorbehandlung nicht genügt.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war folgender:

1) Es sollten die von Uhlenhuth und Händel über Harnanaphylaxie gemachten Beobachtungen geprüft und erweitert werden.

2) Es sollte untersucht werden, ob bei sensibilisierten Tieren die anaphylaktische Reaktion auch durch Seren verwandtschaftlich nahe stehender Tiere zu erzeugen ist.

3) Es sollte untersucht werden, ob der Antigencharakter eines normalen Menschenharns bei einstündigem Kochen, bei einmonatiger Fäulnis und bei einmonatiger Antrocknung an Filtrierpapier erhalten bleibt.

4) Es sollten mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion die aus einem biologischen Körper fließenden Abwässer auf die Anwesenheit von Menscheneiweißspuren hin untersucht werden. Aus dem gefundenen Resultat soll dann ein Schluß auf die Brauchbarkeit des betreffenden biologischen Körpers gezogen werden.

Die Möglichkeit, Tierharn zu differenzieren, hat nicht nur biologisches, sondern auch praktisches Interesse. Man kann vor die Aufgabe gestellt werden, eine Harnprobe auf ihre Herkunft untersuchen zu müssen. So soll es z. B. vorkommen, daß Typhusbacillenträger an Stelle ihres eigenen Harnes einen Tierharn der Untersuchungsstation einschicken. Auch sonst kann die Bestimmung der Provenienz eines Harns forensische Bedeutung haben.

I. Differenzierung von Tierharnen und Uebergreifen der Reaktion auf verwandtschaftlich nahestehende Tiere.

Uhlenhuth und Händel ist es gelungen, bei Meerschweinchen, die mit Menschenurin vorbehandelt waren, deutliche Anaphylaxie zu erzeugen durch intravenöse Nachbehandlung mit Menschenserum, nicht aber, wenn sie Menschenurin oder Rinderserum einspritzten. Ebenso reagierte ein mit Eselurin vorbehandeltes Meerschweinchen nur mit Eselserum und nicht mit Menschenserum. In Bezug auf das Uebergreifen der anaphylaktischen Reaktion auf verwandte Tierarten bei Vorbehandlung der Tiere mit Harn liegen noch keine Versuche vor. Bei Sensibilisierung mit Serum haben Uhlenhuth und Händel gefunden, daß die mit Affen- und Menschen-, Esel- und Pferde-, Hammel- und Ziegenserum eingespritzten Meerschweinchen bei Prüfung mit dem artverwandten Serum anaphylaktisch reagierten.

Um die Harn frei von Eiweiß aus dem Tierkörper zu erhalten, wurde den geschlachteten Tieren die Harnblase an Ureteren und Urethra unterbunden und in diesem Zustand ins Institut gebracht. Hier wurde vermitteltst eines Trokarts der Harn aus der Blase gelassen. Sämtliche Harn wurden vor dem Einspritzen auf Anwesenheit von chemisch nachweisbarem Eiweiß mit der Essigsäure-Kochprobe und der Hellerschen Salpetersäureprobe untersucht. In keinem der benutzten Harn war Eiweiß nachzuweisen.

Versuch 1.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1 ccm Hammelurin subkutan vorbehandelt. Im Harn war chemisch kein Eiweiß nachzuweisen.

Nach 32 Tagen wird Tier 1 und 2 mit $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Hammelserum, Tier 3 mit $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Ziegenserum intravenös nachbehandelt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:

Tier 1 schüttelt sich lebhaft, kratzt sich, ist sehr unruhig und kaut; es erholt sich wieder. Anaphylaxie zweifelhaft.

Tier 2 kaut sehr stark, schüttelt sich, bekommt lebhaft Krämpfe, fällt um, springt in die Höhe und stirbt nach 3 Minuten. Anaphylaxie positiv.

Tier 3 schüttelt sich, kratzt auf dem Boden, schreit lebhaft; es erholt sich wieder. Anaphylaxie schwach positiv.

Versuch 2.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm Rinderharn subkutan eingespritzt. Im Harn war chemisch kein Eiweiß nachweisbar.

Nach 32 Tagen wurden Tier 1 und 2 mit je $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Rinderserum, Tier 3 mit $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Menschenserum intravenös nachbehandelt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:

Tier 1 schreit laut, macht schnelle Gehbewegungen, hat deutliche Zwerchfellkrämpfe; es erholt sich wieder. Anaphylaxie positiv.

Tier 2 kratzt sich stark an der Schnauze, schreit laut; es erholt sich wieder. Anaphylaxie positiv.

Tier 3 zeigt keine Symptome.

Versuch 3.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1 ccm Menschenharn subkutan vorbehandelt. Im Harn war chemisch kein Eiweiß nachzuweisen.

Nach 21 Tagen wurden Tier 1 und 2 mit je $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Affenserum intravenös nachbehandelt. Um zu sehen, ob nicht etwa dem Affenserum primäre Toxizität innewohne, wurde einem nicht behandelten Meerschweinchen (4) $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Affenserum intravenös eingespritzt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:

Tier 1 kratzt sich an der Schnauze, schreit laut; es erholt sich wieder. Anaphylaxie schwach positiv.

Tier 2 kratzt sich an der Schnauze, stürzt nach einer Minute zu Boden, hat starke Atemnot; es erholt sich wieder nach 5 Minuten. Anaphylaxie positiv.

Tier 3 reibt sich an der Schnauze, kaut lebhaft, stellt sich auf die Hinterbeine, fällt auf die Seite und bekommt Krämpfe; es erholt sich wieder. Anaphylaxie positiv.

Tier 4 zeigt keine Symptome.

Aus diesen 3 Versuchsreihen ergibt sich, daß man mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion normale Tierharnen bei Verwendung einer größeren Anzahl von Meerschweinchen differenzieren kann.

Allerdings sind die Krankheitssymptome der Versuchstiere nicht immer sehr ausgesprochen. Außerdem findet ein Uebergreifen der Reaktion auf verwandte Tierarten statt, so daß Hammel- und Ziegen-, Menschen- und Affenharn nicht voneinander zu unterscheiden sind.

II. Versuche mit gekochtem Harn.

Bekanntlich (29) ist es möglich, mit gekochtem Eiweiß Tiere zu sensibilisieren. Nach Uhlenhuth und Händel (27) wird jedoch die anaphylaktische Reaktion schwächer und verliert an Schärfe in Bezug auf ihre Spezifität. Schattenfroh (21) konnte keine Beeinträchtigung des Antigencharakters durch Kochen konstatieren.

Versuch 4.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm normalen Menschenharns subkutan injiziert. Der Harn hatte eine Stunde lang im Dampfsterilisierapparat gestanden. Vor dem Kochen war im Harn kein Eiweiß chemisch nachzuweisen. Nach dem Kochen war der Urin trübe und es hatte sich ein Bodensatz im Glase gebildet. Vor den Injektionen wurde der Harn kräftig geschüttelt, um auch die abgesetzten Teile mit in die Spritze zu bekommen.

Nach 46 Tagen wurden die Tiere mit je $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Menschenserum intravenös nachbehandelt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:
Tier 1 und 2 zeigen keine Erscheinungen.

Tier 3 kaut stark, kratzt sich, schreit ein wenig; es erholt sich wieder. Anaphylaxie zweifelhaft.

Eine Stunde lang gekochter, normaler Menschenharn hat also seine anaphylaktogenen Eigenschaften verloren. Bei der geringen Menge Antigen im Harn war dieses negative Resultat zu erwarten.

III. Versuche mit gefaultem Harn.

Mit 14 Jahre altem, gefaulten Menschenblut konnten Uhlenhuth und Händel (27) in einer Versuchsserie Anaphylaxie erzeugen; in einer anderen erhielten sie negative Resultate. Schattenfroh (21) sah keine Beeinträchtigung der antigenen Eigenschaften durch das Wachstum der Bakterien.

Der zu dem Versuche benutzte Harn war normal und enthielt kein chemisch nachweisbares Eiweiß. Er wurde einen

Monat lang in einer mit einem Wattepfropfen versehenen Flasche aufbewahrt. Er roch bei Ansetzen des Versuches stark nach Ammoniak und war sehr trübe.

Versuch 5.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm des faulen Harnes subkutan injiziert. Da an den Injektionsstellen harte Infiltrate entstanden, wurde die Injektion jedesmal an einer anderen Stelle vorgenommen. Die Infiltrate verschwanden später wieder.

47 Tage später wurden die Tiere mit je $\frac{1}{2}$ ccm inakt. Menschenserum intravenös nachbehandelt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:

Tier 1 macht Brechbewegungen und ist krank; es erholt sich wieder. Anaphylaxie zweifelhaft.

Tier 2 und 3 zeigen keine Erscheinungen.

Es ergibt sich aus diesem Versuche, daß normaler Menschenharn, der 1 Monat lang gefault hat, keine anaphylaktogenen Eigenschaften mehr besessen hat. Der Harn bildet einen ausgezeichneten flüssigen Nährboden für allerhand zersetzende Bakterien und es ist anzunehmen, daß vor dem Tode dieser Bakterien durch die von ihnen hervorgerufene alkalische Reaktion (31) sämtliche Eiweißstoffe zersetzt sein werden.

IV. Versuche mit angetrocknetem Harn.

Mit Mumienmaterial und mit einem seit 11 Jahren ohne Zusatz konservierender Mittel angetrockneten Blutserum hatten Uhlenhuth und Händel noch deutliche Anaphylaxie erhalten. Es wurde im folgenden untersucht, ob es auch möglich ist, den Harn, wenn er längere Zeit an einem Papier angetrocknet war, anaphylaktisch nachzuweisen.

Der normale Menschenharn wurde an einem Filtrierpapier angesaugt und dieses Papier einen Monat lang in einem unbedeckten Glase stehen gelassen. Es blieb feucht und nahm einen moderig-ammoniakalischen Geruch an. Das Filtrierpapier wurde in eine der ursprünglichen Harnmenge gleiche physiologische Kochsalzlösung gebracht und die so erhaltene reich mit Papierfasern durchsetzte Flüssigkeit den Tieren eingespritzt.

Versuch 6.

3 Meerschweinchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm des Extraktes subkutan eingespritzt. 36 Tage später wurden die Tiere mit je $\frac{1}{2}$ ccm inakt. menschlichen Serums intravenös nachbehandelt.

Keines der Tiere zeigt irgendwelche Erscheinungen.

Ein 1 Monat lang angetrockneter, normaler Menschenharn vermochte also nicht mehr, Meer-schweinchen zu sensibilisieren. Das negative Resultat ist hauptsächlich auf Rechnung der mit der Antrocknung verbundenen Fäulnis zu setzen.

V. Versuche mit Abwässern.

Im allgemeinen soll ein gut arbeitender biologischer Körper keine fäulnisfähigen Stoffe mehr im Ausfluß liefern. Allerdings wird der Gehalt der Abwässer an organischer Substanz durch die biologischen Körper nur herabgesetzt, nicht aufgehoben. Ueber die Natur dieser organischen, durch Oxydation mit Permanganat nachzuweisenden Stoffe ist in der Literatur (31, 32, 33) nichts zu finden. Es ist nun interessant festzustellen, ob diese organischen Stoffe auch anaphylaktogen wirken, was ja bei den ersten Eiweißspaltungsprodukten (34) nachgewiesen ist, oder ob der Ausfluß nur dann antigenen Charakter annimmt, wenn er nicht mehr richtig arbeitet und kleine Mengen unzersetztes Eiweiß durchläßt. Bei der großen Verdünnung wären dann diese Spuren von Eiweiß nur durch Anaphylaxie nachzuweisen. Da sich in den Abwässern einer Anstalt meist Menschenharn, Menschenkot und tierische Abfälle aus der Küche befinden, so müssen neben menschlichen Eiweißkörpern auch tierische, namentlich Schweine- und Rindereiweiß, vorkommen. Aus äußeren Gründen konnte in den nachfolgenden Versuchen nur auf Anwesenheit von Menscheneiweiß untersucht werden.

Ließe sich also ein Parallelismus zwischen antigenen Wirkung des Ausflusses und zwischen der Anwesenheit fauliger Gase nachweisen, so hätte man ein einfaches Mittel an der Hand, um den Wert eines biologischen Körpers zu prüfen. Dank dem freundlichen Entgegenkommen des Herrn Direktor Dr. Ransohoff konnte ich die Proben eigenhändig dem Ausfluß des Füllkörpers der Bezirksirrenanstalt Stephansfeld im Unterelsaß entnehmen. Da die Anlage, die seit 3 Jahren im Betrieb ist und sich gut bewährt hat, bei der Entnahme der Reparatur bedürftig war, wie mir der Herr Direktor versicherte, wurden 2 Proben dem Ausflusse entnommen. Die erste Probe wurde 2 Stunden nach Füllung des Körpers ent-

nommen, sie war vollständig geruchlos und klar, entsprach also den an einen gutgehenden Füllkörper zu stellenden Erwartungen; auch später, nach längerem Verweilen in geschlossener Flasche, entwickelte sich kein fauler Geruch. Die zweite Probe wurde $\frac{1}{2}$ Stunde nach Füllung des Körpers entnommen. Sie war leicht trübe und roch ein wenig nach Schwefelwasserstoff. Chemisch war nur in letzterer Probe mit Hilfe der Essigsäurekochprobe eine ganz geringe Menge Eiweiß nachzuweisen; Biuretreaktion war in keiner der beiden Proben zu erhalten. Die beiden Proben wurden schon am Tage nach der Entnahme dem Meerschweinchen eingespritzt.

Versuch 7.

3 Meerschweinchen wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm Abwasserprobe 1 subkutan eingespritzt. Ein Tier verstarb an einer interkurrenten Erkrankung.

45 Tage später wurden die Tiere mit je $\frac{1}{2}$ ccm inaktivierten Menschenserums intravenös nachbehandelt.

Keines der Tiere zeigt irgendwelche Symptome.

Versuch 8.

3 Meerschweinchen wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ccm der Abwasserprobe 2 subkutan eingespritzt. Die Tiere wurden nach den Injektionen krank und bekamen harte Infiltrate an den Injektionsstellen. Sie erholten sich jedoch alle wieder.

Nach 44 Tagen wurden sie mit je $\frac{1}{2}$ ccm inaktivierten Menschenserums intravenös nachbehandelt. Die Tiere zeigten folgende Symptome:

Tier 1 kaut lebhaft, kratzt sich an der Schnauze, bläht sich auf und hat starke Zuckungen; es erholt sich wieder. Anaphylaxie positiv.

Tier 2 und 3 haben keine deutlichen Erscheinungen.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß ein noch fäulnisfähige Stoffe enthaltender Ausfluß aus einem biologischen Körper auch noch anaphylaktogene Eigenschaften besitzt, daß dagegen ein einwandfreier Ausfluß nicht mehr das Vermögen besitzt, Meerschweinchen zu sensibilisieren*). Beide Proben stellen zwei Extreme dar. In der einen ist chemisch und anaphylaktisch nachweisbares Eiweiß, sie ist trübe und riecht nach Schwefelwasserstoff; die andere

*) Aehnliche Versuche, die Herr Prof. Tashiro am hiesigen Institut mit Straßburger Kanalabwasser gemacht hat, verliefen negativ.

besitzt nichts von alledem. Es ließe sich nun aber auch der Fall denken, daß der infolge Mangels an chemisch nachweisbarem Eiweiß für einwandfrei gehaltene Ausfluß in so geringen Mengen Eiweiß enthielte, daß erst nach längerer Zeit der Vorfluter verunreinigt wird. Bei der Empfindlichkeit der anaphylaktischen Reaktion wären dann diese Spuren anaphylaktisch nachzuweisen. Diese Schlußfolgerung ist allerdings nur eine Annahme, die erst durch weitere Versuche bestätigt werden müßte.

Zusammenfassung.

1) Mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion liessen sich normale Tierharnen voneinander unterscheiden.

2) Die Unterscheidung versagte bei den Harnen verwandtschaftlich nebeneinander stehender Individuen, wie z. B. Ziege und Hammel, Mensch und Affe.

3) Ein eine Stunde lang gekochter, einen Monat lang gefaulter und einen Monat lang angetrockneter normaler Menschenharn hatte seinen antigenen Charakter verloren.

4) In einwandfreien, geruchlosen, aus biologischen Körpern fließenden Abwässern war durch Anaphylaxie kein Menschen-eiweiß mehr nachzuweisen.

Herrn Geheimrat Prof. Uhlenhuth spreche ich meinen besten Dank aus für die Anregung zu dieser Arbeit und für das während derselben gezeigte Interesse, Herrn Prof. Hofmeister und Herrn Prof. Spiro danke ich für die Angaben bezüglich des chemischen Teiles und Herrn Privatdozent Dold für die freundliche Unterstützung.

Literaturnachweis.

- 1) Ellinger, A., Chemie des normalen Harns. In Oppenheimers Handbuch d. Biochem., Bd. 3, No. 1, p. 536.
- 2) Wiechowski, W., Biochem. Zeitschr., Bd. 19, 1909, p. 368.
- 3) Hoppe-Seyler, F., Med.-chem. Untersuchungen, Berlin 1866—1871, p. 584; zit. aus 1.
- 4) Schmiedeberg, O., Arch. f. Heilk., Bd. 8, 1867, p. 422; zit. aus 1.
- 5) Liebig, J., Liebigs Annal., Bd. 86, 1853, p. 125.
- 6) Abderhalden, E., Lehrb. d. physiol. Chem., 1909, p. 772.
- 7) Munk, J., Arch. f. Anat. u. Physiol., Suppl.-Bd. 22, 1880; zit. aus 1.
- 8) Ellenberger, Vergl. Physiol. d. Haussäugetiere, Bd. 1, p. 380.
- 9) Ellinger, A., Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 43, 1904, p. 325.

- 10) Eppinger, H., *Zeitschr. f. exp. Pathol.*, Bd. 3, 1906, p. 530.
- 11) Wiechowski, W., *Prag. med. Wochenschr.*, 1912, No. 22.
- 12) Marek, *Diagn. d. Krankh. d. Haussäugetiere*, 1912, p. 663.
- 13) Mörner, K. A. H., *Skand. Arch. f. Physiol.*, Bd. 6, 1895, p. 332.
- 14) Pick, E. P., *Biochemie der Antigene*. In *Kolle-Wassermanns Handbuch d. pathog. Mikroorgan.*, 2. Aufl., Bd. 1, p. 687.
- 15) Eliacheff, P., *Mém. Soc. Biol.*, T. 9, 1891, p. 71.
- 16) Salkowski, E., *Berl. klin. Wochenschr.*, 1905, p. 1581 u. 1618.
- 17) Sasaki, K., *Hofm. Beitr.*, Bd. 9, 1907, p. 386.
- 18) Pons, Ch., *Ebenda*, p. 392.
- 19) Savarè, M., *Ebenda*, p. 401.
- 20) Ebbeke, N., *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 12, p. 485.
- 21) Schattenfroh, A., *Münch. med. Wochenschr.*, 1901, p. 1239, und *Arch. f. Hyg.*, Bd. 44, 1901, p. 339; bisher fälschlich *Zeitschr. f. Hyg.* angegeben.
- 22) Pribram, H., *Wien. klin. Wochenschr.*, 1911, p. 1001.
- 23) Landsteiner, K., und v. Eisler, *Wien. klin. Rundschau*, 1903, No. 1.
- 24) Friedenthal, H., *Berl. klin.-ther. Wochenschr.*, 1904, No. 12; zit. aus 14.
- 25) Fleischmann und Michaelis, *Fortschritte d. Med.*, Bd. 22, 1904 p. 1257.
- 26) Haswell, Wilson G., *Journ. of Pathol. and Bacteriol.*, Vol. 13, 1909, p. 484.
- 27) Uhlenhuth und Händel, *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 4, 1910, p. 761.
- 28) — — *Ergebn. d. wissenschaftl. Med.*, 1910, H. 1.
- 29) Minet, J., et Leclercq, J., *Compt. rend. Soc. Biol.*, T. 73, 1912, p. 166.
- 30) Literatur darüber bei R. Doerr, *Allergie und Anaphylaxie*. In *Kolle-Wassermanns Handb. d. pathog. Mikroorgan.*, 2. Aufl., Bd. 2, p. 1003.
- 31) Kruse, *Allgem. Mikrobiol.*, 1910, p. 576.
- 32) Dunbar, *Leitfaden f. d. Abwässerreinigungsfr.*, 2. Aufl.
- 33) Schmiedtmann, Thumm und Reichle, in *Handb. d. Hyg. von Rubner, Gruber u. Ficker*, II, 2, p. 262.
- 34) Zunz, Edg., *Bull. de l'Acad. de Méd. de Belgique*, 27. V. 1911; zit. aus 14.
- 35) Uhlenhuth, *Diskussionsbemerkungen*. *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref.*, Bd. 57, Beiheft.

Nachdruck verboten.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts
der Universität Berlin.]

Ueber die Wirkung von Chinaalkaloiden auf Pneumokokkenkulturen.

Von **J. Tugendreich** und **C. Russo**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Juni 1913.)

Morgenroth und seine Mitarbeiter haben in zahlreichen Untersuchungen¹⁾ die Bedeutung des Aethylhydrocuprein als inneres Desinficiens bei der experimentellen Trypanosomeninfektion und besonders bei der Pneumokokkeninfektion erwiesen. Ihre Ergebnisse sind auch bereits durch andere Forscher bestätigt und erweitert worden²⁾.

Wir haben es nun im folgenden zunächst unternommen, die Wirkung dieses chemotherapeutischen Agens außerhalb des Tierkörpers auf Pneumokokken zu untersuchen und gleichzeitig mit der Wirkung anderer Chinaalkaloide *in vitro* zu vergleichen. Herangezogen wurden zum Vergleich das Chinin und eine homologe Reihe, welcher das Aethylhydrocuprein selbst angehört. Es kam das nächst niedere Glied, das Hydrochinin (= Methylhydrocuprein), ferner das Isopropyl-, Isobutyl- und Isoamylhydrocuprein zur Untersuchung³⁾.

1) Morgenroth und Halberstaedter, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 34. Morgenroth und Levy, Ebenda, 1911, No. 34 und 44. J. Morgenroth, Therap. Monatshefte, Febr. 1912. Morgenroth und Rosenthal, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 71, 1912. L. Gutmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 6. Morgenroth und Tugendreich, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 8. Morgenroth und Kaufmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913, Heft 2.

2) Neufeld und Engwer, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 50. Engwer, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 73, 1912. Boehncke, Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 8.

3) Wir verdanken diese Präparate den Vereinigten Chininfabriken Zimmer & Co. in Frankfurt a. M.

In einem zweiten Teil dieser Mitteilung ist, speziell im Anschluß an die Abhandlung von Morgenroth und Kaufmann über die Arzneifestigkeit der Bakterien¹⁾, der Versuch gemacht worden, die Pneumokokken durch Einwirkung des Aethylhydrocuprein im Reagenzglas ohne Benutzung des Tierexperiments gegen dieses Agens zu festigen.

I.

Bevor wir zur Schilderung unserer Versuche übergehen, möchten wir aus der in letzter Zeit von Sir Almroth E. Wright²⁾ erschienenen Arbeit, die sich zum Teil ebenfalls mit dem Einfluß des Aethylhydrocuprein auf Pneumokokken in vitro beschäftigt, einige wichtige Befunde erwähnen.

Die Technik der Wrightschen Versuche besteht im wesentlichen darin, daß 5 cmm des betreffenden bakteriziden Agens in einer mit einer Marke versehenen Kapillarröhre mit Pneumokokken zusammengebracht werden; die Mischung bleibt über Nacht stehen. In einer Reihe von Kontrollröhrchen wird die Zahl der jedesmal zugesetzten Pneumokokken ungefähr festgestellt.

Zunächst vergleicht Wright die Wirkung des Aethylhydrocuprein mit der einiger Desinfektionsmittel, wie Lysol, Kresol und Guajakol. Diese töten die Pneumokokken unter den gewählten Bedingungen in zum Teil schon sehr hohen Verdünnungen, so z. B. das Guajakol in einer Konzentration von 1:1 500 000. Bedingung aber für den positiven Ausfall der Versuche ist, daß die genannten Desinfizienzien in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden. In Gegenwart von Serum — Wright gebraucht zu seinen Versuchen menschliches Serum — bleibt der Erfolg ganz oder fast ganz aus. So bedarf das Guajakol, das, wie vorhin erwähnt, in physiologischer Kochsalzlösung in so hohem Grade bakterizid ist, in Serum verdünnt, eine Konzentration 1:500, um Pneumokokken in vitro zu zerstören.

Anders verhält sich das Aethylhydrocupreinum hydrochloricum. Da ist die Wirkung in Serum und in wässriger Lösung beinahe gleich. Eine Verdünnung des Aethylhydrocuprein in physiologischer Kochsalzlösung von 1:800 000 tötet die Pneumokokken ab, dieselbe Verdünnung in Serum hemmt in hohem Maße das Wachstum und durch 1:400 000 in Serum werden die Pneumokokken abgetötet. Kontrollversuche mit Serum allein ergaben ein üppiges Wachstum der Bakterien.

1) Morgenroth und Kaufmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 6.

2) A. E. Wright, On the Pharmaco-Therapy of Pneumococcus Infection. Lancet, 14. und 21. Dec. 1912.

In der gleichen Weise angestellte Versuche mit Staphylokokken zeigten nur einen sehr geringen Einfluß des Aethylhydrocuprein, auf Paratyphus ist das Mittel ganz wirkungslos.

Einige weitere Versuchsreihen Wrights beziehen sich auf die Wirkung des Serums und Urins von mit Aethylhydrocuprein vorbehandelten Mäusen, sowie von gesunden und an Pneumonie erkrankten Menschen. Das Ergebnis dieser in vieler Hinsicht sehr interessanten Versuche möchten wir noch ganz kurz hier wiedergeben.

Das Serum von Mäusen, die eine einmalige subkutane Injektion von 2 mg auf 10 g Körpergewicht (diese Menge entspricht der im Laboratorium von Prof. Morgenroth gebräuchlichen Dosis von 0,5 ccm einer 0,75-proz. Lösung von Aethylhydrocupreinum hydrochlorium pro 20 g Maus) erhalten haben und nach 3 Stunden entblutet wurden, vermag, auch wenn es durch Erwärmen auf 60° inaktiviert ist, Pneumokokken in erheblicher Zahl in vitro abzutöten, während das normale Serum unwirksam ist. In derselben Weise konnte Wright das Aethylhydrocuprein im Urin der vorbehandelten Mäuse nachweisen.

Auch die Versuche mit Sera gesunder und an Pneumonie erkrankter und mit Aethylhydrocuprein in Dosen von 0,5—1,0 g (per os bzw. subkutan) behandelter Menschen ergaben, daß das Aethylhydrocuprein in wirksamer Konzentration in die Blutbahn übergeht. Dabei scheint ein Unterschied in der in vitro Pneumokokken abtötenden Wirkung der Sera von kranken und gesunden Menschen nicht zu bestehen.

Die eben geschilderten Experimente von Wright bilden somit eine wertvolle Ergänzung der Tierversuche, die Morgenroth und seine Mitarbeiter mit dem Aethylhydrocuprein durchgeführt haben.

In der letzten Zeit wurde auch das Salvarsan bei einigen bakteriellen Infektionen mit Erfolg angewandt.

Neufeld und Schiemann¹⁾ prüften die bakterizide Wirkung des Salvarsans unter anderem auf Milzbrand und Rotlauf, und auch Roos²⁾ konnte zeigen, daß das Salvarsan in sehr hohen Verdünnungen Milzbrandbacillen in vitro abtötet, ebenso das Serum von Meerschweinchen, die mit Salvarsan behandelt worden sind.

Neufeld und Schiemann berichten auch kurz über Reagenzglasversuche, in welchen sie die außerordentlich starke Wirkung der Lösungen der Aethylhydrocupreinbase auf Pneumokokken und in Uebereinstimmung mit Wright das Fehlen einer Hemmung durch Serum nachweisen konnten.

1) Neufeld und Schiemann, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 57, No. 14/22, p. 183*. Bericht über die 7. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie.

2) Roos, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912.

Unsere Reagenzglasversuche mit Pneumokokken, deren Ergebnisse in den Tabellen I—XI zusammengefaßt sind, haben wir in folgender Weise ausgeführt:

2 Tropfen einer Serumbouillon-Vollkultur eines virulenten Pneumokokkenstammes wurden mit 2 ccm verschieden konzentrierter Lösungen der Salze des betreffenden Chinaalkaloids im Reagenzglas gemischt. Als Kontrollen benutzten wir dieselbe Menge der gleichen Kultur und an Stelle der Alkaloidlösung steriles destilliertes Wasser. Die Gemische verweilten entweder bei Zimmertemperatur oder im Wasserbad bei einer Temperatur von 37° 10 Minuten bis 3 Stunden.

Die Prüfung, ob die Bakterien durch das Chinaalkaloid beeinflußt worden sind, wurde dann in zweierlei Weise an gestellt. In einer Versuchsreihe wurde 0,25 ccm der Gemische Mäusen intraperitoneal injiziert, die Tiere täglich beobachtet und das Herzblut der gestorbenen Tiere auf Pneumokokken untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe impften wir die Gemische (2—3 Oesen) auf Serumbouillon; die beimpften Röhrcchen blieben 24 Stunden im Brutschrank bei 38° und wurden dann auf ihren Pneumokokkengehalt durch Gramfärbung und Tierversuch geprüft.

Tabelle I. Versuch vom 23. XII. 1912.

Einwirkung von Chinin. hydrochloricum und Aethylhydrocupreinum hydrochloricum auf Pneumococcus Ia in vitro. Geprüft durch Tierexperiment. Einwirkung 10 Minuten.

Lösungen der Alkaloidsalze in Aq. dest. Zu 2 ccm der Lösungen je 2 Tropfen einer 24-stündigen Bouillonkultur des Pneumococcus Ia. Nach 10 Minuten Zimmertemperatur je einer Maus 0,25 ccm der Gemische peritoneal injiziert. Kontrollen mit Aq. dest.

Verdünnung	I. Chinin. hydrochloricum					II. Aethylhydrocuprein. hydrochlor.					III. Kontrollen		
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:200	1:200	1:400	1:800	1:1600			1:3200
No. der Maus	13	14	15	16	17	18	18a	19	20	21	22	23	24
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	†	†
	3	0	0	0	krank	0	0	0	0	0	0		
	4	0	krank	krank	†	†	0	0	0	0	0		
	5	krank	krank	†			0	0	0	0	0		
	6	krank	†				0	0	0	0	0		
	7	†					0	0	0	0	0		

Tabelle II. Versuch vom 7. I. 1913.

Wiederholung des Versuches vom 23. XII. 1912 (Tabelle I) mit Kultur Seligmann I.

Verdünnung	I. Chininum hydrochloricum					II. Aethylhydrocuprein. hydrochloricum					III. Kontrollen	
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200		
No. der Maus	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	†	†
	3	krank	krank	krank	krank	krank	0	0	0	0		
	4	†	krank	krank	krank	†	0	0	0	0		
	5		†	†	†		0	0	0	0		

Die beiden ersten Versuche (Tabelle I und II) sind in ihrer Anordnung vollkommen gleich, nur daß es sich um zwei verschiedene Pneumokokkenstämme handelt. Es gelangten Chinin und Aethylhydrocuprein in Konzentrationen von 1:200 bis 1:3200 zur Anwendung. Die Einwirkung geschah bei Zimmertemperatur und dauerte 10 Minuten. Das Chinin bewirkt zweifellos eine Verzögerung der Infektion. In der höchsten Konzentration 1:200 stirbt das Tier (in dem einen Versuch) erst am 7. Tage nach der Infektion, während die beiden Kontrollmäuse bereits am 2. Tage tot sind. Immerhin erliegen alle Tiere der Infektion. Beim Aethylhydrocuprein dagegen ist die Verdünnungsgrenze 1:3200 offenbar noch nicht erreicht. Alle Tiere bleiben am Leben.

In dem nächstfolgenden Versuch (Tabelle III) haben wir dieselben beiden Alkaloide 10 und 30 Minuten auf Pneumokokken einwirken lassen und stärkere Chininkonzentrationen angewandt. Trotzdem erhalten wir beim Chinin, selbst in einer Konzentration 1:50, kein besseres Resultat als in den ersten zwei Versuchen. Die Wirkungsgrenze des Aethylhydrocuprein ist hier erreicht: 1:3200 tötet die Pneumokokken ab, 1:6400 verzögert die Infektion.

Tabelle III. Versuch vom 18. I. 1913.

Einwirkung von Chininum hydrochloricum und Aethylhydrocupreinum hydrochloricum auf Pneumococcus SI in vitro 10 und 30 Minuten Zimmertemperatur. 0,5 ccm der Gemische Mäusen intraperitoneal injiziert. Kontrollen mit Aq. dest.

Verdünnung	I. Chininum hydrochloricum								II. Aethylhydrocuprein. hydrochl.								III. Kontrollen. Aqua dest.			
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	103	104	
No. der Maus	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
Einwirkung	10 Minuten				30 Minuten				10 Minuten				30 Minuten				10'	30'		
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	3	0	0	0	0	0	0	krank	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	4	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	krank	0	0	0	0	0		
	5	0	krank		0	0	+		0	0	0	0	+	0	0	0	krank			
	6	+	+		0	krank			0	0	0	0		0	0	0	+			
	7				0	+			0	0	0	0		0	0	0				
	8				+				0	0	0	0		0	0	0				

Alle †: Pneumokokken in Kultur aus Blut.

Es folgen nun zunächst mehrere Versuche mit den höheren Homologen des Aethylhydrocuprein und dem Hydrochinin. Wie die Tabellen IV—VII zeigen, steht keine von den drei homologen Verbindungen: das Isopropyl-, Isobutyl- und Isoamylhydrocuprein dem Aethylhydrocuprein in der Wirkung auf Pneumokokken gleich. Das Isobutylhydrocuprein übt ebenso wie das Chinin und Hydrochinin (Tabelle VII) keinen Einfluß auf die Infektion aus; das Isoamylhydrocuprein ist in der Konzentration 1:500 wirksam und nur das Isopropylhydrocuprein nähert sich durch eine Abtötungsverdünnung von 1:2000 einigermaßen dem Aethylhydrocuprein.

Die absolute Wirkung des Aethylhydrocuprein steht, wie ersichtlich, in unseren Versuchen weit hinter denjenigen, welche Wright erzielte, zurück. Es war klar, daß dies in erster Linie mit der außerordentlich viel kürzeren Einwirkungsdauer bei unserer Versuchsanordnung zusammenhängt. Eine entsprechende Modifikation der Versuchsanordnung zeigte, daß diese Voraussetzung richtig ist und lieferte Resultate, die analog den Versuchen Wrights auf

die ungemein starke Desinfektionswirkung des Aethylhydrocuprein hinweisen.

Tabelle IV. Versuch vom 31. I. 13.

Einwirkung von: I. Isoamylhydrocuprein. hydrochl.

II. Isobutylhydrocuprein. „

III. Isopropylhydrocuprein. „

auf Pneumococcus S I in vitro. Kontrollen mit Aq. dest.

0,5 ccm der Gemische nach 10 Minuten Zimmertemperatur Mäusen intraperitoneal injiziert.

Verdünnung	I. Isoamylhydrocuprein					II. Isobutylhydrocuprein					III. Isopropylhydrocuprein					IV. Kontrollen		
	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	Aq. dest.		
No. der Maus	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+
	3	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	+		+	
	4	0	0				0	+			0	0	0	0				
	5	0	0				+				0	0	0	0				
	6	0	0								0	0	0	0				
	7	0	0								0	0	0	0				

Tabelle V. Versuch vom 4. II. 13.

Einwirkung von: I. Isoamylhydrocuprein. hydrochl.

II. Isobutylhydrocuprein. „

III. Isopropylhydrocuprein. „

IV. Aethylhydrocuprein. „

auf Pneumokokken in vitro. Kontrollen mit Aq. dest.

0,5 ccm der Gemische intraperitoneal Mäusen nach 10 Minuten Einwirkung bei Zimmertemperatur injiziert.

Verdünnung	I. Isoamylhydrocuprein			II. Isobutylhydrocuprein			III. Isopropylhydrocuprein					IV. Aethylhydrocuprein					V. Kontrollen		
	1:500	1:1000	1:5000	1:250	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	Aq. dest.		
No. der Maus	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0
	3	0	0	+	+	+	0	0	0	+		0	0	0	0	0	+	+	+
	4	0	0		+		0	0	0			0	0	0	0	0			
	5	0	kr.				0	0	0			0	0	0	0	+			
	6	0	+				0	0	0			0	0	0	0				
	7	0					0	0	0			0	0	0	0				

Alle †: Pneumokokken in Kultur aus Blut.

Ueber d. Wirkung v. Chinaalkaloiden auf Pneumokokkenculturen. 163

Tabelle VI. Versuch vom 8. II. 13.

Einwirkung von: I. Chininum hydrochloricum
 II. Isobutylhydrocuprein. hydrochloricum
 III. Isoamylhydrocuprein. „
 IV. Isopropylhydrocuprein. „
 V. Aethylhydrocuprein. „

auf Pneumokokken in vitro. Kontrollen in Aq. dest.

0,5 ccm der Gemische nach 10 Minuten Einwirkung bei Zimmertemperatur intraperitoneal Mäusen injiziert.

	I. Chinin			II. Isobutylhydrocuprein			III. Isoamylhydrocuprein			IV. Isopropylhydrocuprein			V. Aethylhydrocuprein			VI. Kontrollen			
	1:250	1:500	1:1000	1:250	1:500	1:1000	1:500	1:1000	1:2000	1:1000	1:2000	1:4000	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	Aq. dest.		
No. der Maus	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	†	†	†	†	0	0	†	0	0	†	0	0	0	0	0	0	†
	4	†					0	†		0	0		0	0	0	0	0	†	
	5						0			0	0		0	0	0	0	0		
	6						0			0	0		0	0	0	0	0		
	7						0			0	0		0	0	0	0	0		

Tabelle VII. Versuch vom 20. II. 13.

Einwirkung von: I. Hydrochininum hydrochloricum
 II. Isopropylhydrocuprein. „
 III. Aethylhydrocuprein. „

auf Pneumokokken in vitro. Kontrollen in Aq. dest.

0,5 ccm der Gemische nach 10 Minuten Einwirkung bei Zimmertemperatur intraperitoneal Mäusen injiziert.

	I. Hydrochinin					II. Isopropylhydrocuprein					III. Aethylhydrocuprein					IV. Kontrollen		
	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	Aq. dest.		
No. der Maus	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	kr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	†	kr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	†	kr.
	3	kr. ¹⁾	0		†	0	0	0	0	kr.	0	0	0	0	0	0	†	†
	4	„	†			0	0	0	kr.	†	0	0	0	0	0	†		
	5	†				0	0	0	†		0	0	0	0	0			
	6					0	0	0			0	0	0	0	0			
	7					0	0	0			0	0	0	0	0			

Alle †: Pneumokokken in Kultur aus Blut.

1) kr. = krank.

Wir ließen also zunächst das Aethylhydrocuprein länger einwirken und erzielten schon dadurch eine nicht unerheblich bessere Wirksamkeit unseres Präparates.

Wie aus den Tabellen VIII und IX hervorgeht, ist die Pneumokokken abtötende Konzentration des Aethylhydrocuprein im Versuch bei Zimmertemperatur

bei sehr kurzer Einwirkung		1:4000
„ 10 Minuten	„	1:4000
„ 1 Stunde	„	1:8000
„ 2 Stunden	„	1:16 000
„ 3 „	„	1:16 000.

Einen ganz erheblich stärkeren Effekt zeigt aber das Aethylhydrocuprein, wenn wir es bei einer Temperatur von 37° 2 Stunden auf Pneumokokken einwirken lassen (Tab. X). Wir sehen, daß unter solchen Bedingungen erst bei einer Verdünnung 1:512 000 die Pneumokokken durch das Mittel nicht geschädigt werden; die Maus 379 stirbt ebenso wie das Kontrolltier 24 Stunden nach der Infektion. Die Verdünnung 1:128 000 tötet die Pneumokokken ab, wahrscheinlich auch noch 1:256 000.

Endlich zeigt Tabelle XI die zweite von uns angewandte Prüfungsmethode der Aethylhydrocupreinwirkung *in vitro*, die, wie bereits erwähnt, darin besteht, daß wir die Gemische auf je ein Serumbouillonröhrchen überimpfen und am folgenden Tage durch Gramfärbung und Tierversuch auf das Vorhandensein von Pneumokokken prüfen. Lassen wir das Aethylhydrocuprein 2 Stunden bei Zimmertemperatur einwirken, so bleibt bei einer Konzentration von 1:64 000, wie die mikroskopische Untersuchung und der Tierversuch zeigen, die Serumbouillon steril. Bei einer Einwirkungstemperatur von 37° wird erst durch eine Verdünnung 1:256 000 das Wachstum der Pneumokokken nicht gehindert, aber auch diese sind offenbar avirulent; die mit dieser Kultur infizierte Maus ist zwar am 1. Tag krank, erholt sich aber wieder und bleibt am Leben. Erst bei der doppelten Verdünnung 1:512 000 ist das Aethylhydrocuprein ohne Wirkung.

Wenn in den Wrightschen Versuchen das Aethylhydrocuprein sich in schwächeren Konzentrationen (1:800 000) als wirksam erwies als in den unsrigen (1:256 000), so lag das,

Tabelle VIII. Versuch vom 1. III. 1913.

Lösungen von Aethylhydrocuprein. hydrochl. in Aq. dest.;
verschiedene Konzentrationen.

Zu 2 ccm der Lösungen 2 Tropfen einer Pneumokokkenkultur.

0.5 ccm der Gemische Mäusen intraperitoneal injiziert:

a) sofort nach Mischung,

b) nach Einwirkung 1 Stunde bei Zimmertemperatur.

Kontrollen in Aq. dest.

Verdünnungen	a) Injektion sofort nach Mischung								b) Injektion nach 1 Stunde Einwirkung									
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	Kontroll. Aqua destillata	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	Kontroll. Aqua destillata		
No. der Maus	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296
Tage n. d. Infekt.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	3	0	0	0	0	+				0	0	0	0	0	+	+		
	4	0	0	0	0					0	0	0	0	0				
	5	0	0	0	0					0	0	0	0	0				

Tabelle IX. Versuch vom 4. III. 1913.

Lösungen von Aethylhydrocuprein. hydrochl. in Aq. dest.

Zu 2 ccm der Lösungen 2 Tropfen Pneumokokkenkultur. Kontrollen mit Aq. dest.

0,5 ccm der Gemische Mäusen intraperitoneal injiziert:

a) sofort nach Mischung,

b) nach Einwirkung in vitro 2 Stunden bei Zimmertemperatur.

c) " " " " 3 " " "

Verdünnungen	a) Injektion sofort nach Mischung					b) Injektion nach 2 Stunden					c) Injektion nach 3 Stunden								
	1:2000	1:4000	1:8000	Kontroll. Aqua destillata	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	Kontroll. Aqua destillata	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	Kontroll. Aqua destillata			
No. der Maus	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	3	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	
	4	0	0			0	0	0	0	+			0	0	0	+			
	5	0	0			0	0	0	0				0	0	0				

Alle +: Pneumokokken in Kultur aus Blut.

Tabelle X. Versuch vom 17. III. 1913.

Aethylhydrocuprein. hydrochl. + Pneumokokkenkultur in vitro.
(Kontrollen mit Aq. dest.)

a) 2 Stunden Zimmertemperatur,

b) 2 „ 37°.

0,5 ccm der Gemische Mäusen intraperitoneal injiziert.

Verdünnungen	a) 2 Stunden Zimmertemperatur									b) 2 Stunden 37°									
	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	Kontroll. Aqua destillata	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	1:512000	Kontroll. Aqua destillata		
No. der Maus	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381
Tage n. d. Inf.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	kr.?	+	+	+
	3	0	0	0	0	+	+			0	0	0	0	0	0	0			
	4	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0			
	5	0	0	0	+	*				0	0	0	0	0	0	0			
	6	0	0	0						0	0	0	0	0	0	0			
	7	0	0	0						0	0	0	0	0	0	0			

†* keine Pneumokokken in Kultur aus Blut und Ausstrich.

Tabelle XI. Versuch vom 17. III. 1913.

Aethylhydrocuprein. hydrochl. + Pneumokokken in vitro,
Kontrollen mit Aqua dest.

Nach Einwirkung von: a) 2 Stunden Zimmertemperatur,

b) 2 „ 37°.

Gemische überimpft auf Serumbouillon, 24 Stunden Brutschrank.

I. Ausstrich: Gramfärbung. II. Tierversuch: Mäuse intraperitoneal.

+ positiver, - negativer Pneumokokkenbefund.

Verdünnungen	a) 2 Stunden Zimmertemperatur									b) 2 Stunden 37°								
	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	1:512000	Kontroll. Aq. dest.	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	1:512000	Kontroll. Aq. dest.
I. Kultur	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
II. Tierversuch No. der Maus				397	398	399	400	401	402					403	404	405	406	407
Tage n. d. Inf.	1			0	0	kr. ¹⁾	kr.	kr.	kr.					0	0	kr.	kr.	kr.
	2			0	0	†	†	†	†					0	0	0	†	†
	3			0	0									0	0	0		
	4			0	0									0	0	0		
	5			0	0									0	0	0		

1) kr. = krank.

abgesehen von der etwas verschiedenen Versuchsanordnung, vor allem daran, daß wir die Einwirkungsdauer auf 2 Stunden einschränkten, während bei Wright das Agens mindestens 12 Stunden mit Pneumokokken in Berührung war.

II.

Morgenroth und Kaufmann, l. c., haben die Frage der Arzeneifestigkeit der Pneumokokken gegenüber dem Aethylhydrocuprein im Tierkörper eingehend behandelt und gezeigt, daß es nach mehreren Passagen (mindestens 4) durch jedesmal erfolglos behandelte Mäuse gelingt, die maximale Festigkeit der Pneumokokken zu erreichen, deren Grenze im Tierversuch durch die Dosis tolerata gegeben war. Es war nun unsere Aufgabe, zu untersuchen, nachdem wir die Wirkung des Aethylhydrocuprein in vitro festgestellt haben, ob auch eine Festigung der Pneumokokken außerhalb des Tierkörpers erzielt werden kann.

Im Anschluß an die genannten Untersuchungen von Morgenroth und Kaufmann ist es neuerdings Haendel und Baerthlein¹⁾ gelungen, Typhus- und Paratyphusstämmen durch Züchtung auf chininhaltigen Nährböden allmählich zu festigen; die Versuche bieten viel des biologisch Interessanten, auf das wir hier nicht eingehen können.

Die Technik entsprach der in den oben geschilderten Versuchen angewandten.

Wir stellten uns zunächst zwei verschiedene Verdünnungen des Aethylhydrocuprein her; die eine, von der wir wußten, daß sie nach Einwirkung von 2 Stunden bei Zimmertemperatur Pneumokokken nicht abtötet (1:100 000), die zweite, wahrscheinlich wirksame Konzentration (1:50 000). Wir gaben nun zu je 2 ccm dieser Verdünnungen je 2 Tropfen einer Bouillonkultur von Pneumokokken. Nach 2 Stunden überimpften wir die beiden Gemische auf je ein Serumbouillonröhrchen und fanden nach 24 Stunden das eine Röhrchen steril, in dem zweiten Röhrchen reichlich Pneumokokken. Wir ließen nun auf diese Pneumokokkenkultur noch einmal dieselben Konzentrationen des Aethylhydrocuprein unter gleichen Bedingungen einwirken und überimpften die Gemische wieder auf 2 Serumbouillonröhrchen. Das Resultat war am folgenden Tage wieder das gleiche: 1:50 000 war

1) Haendel und Baerthlein, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 57, No. 14/22, S. 196*.

immer noch wirksam, 1:100 000 hemmte das Wachstum nicht, dieses Röhrrchen enthielt Pneumokokken. Erst als wir mit diesen Pneumokokken auch die gleiche Prozedur zum dritten Male wiederholten, zeigte sich auch 1:50 000 unwirksam.

In dieser Weise setzten wir den Versuch mit immer stärkeren Konzentrationen fort, und schon nach 12 Tagen erhielten wir eine Pneumokokkenkultur, die durch eine Aethylhydrocupreinkonzentration von 1:500 nicht mehr abgetötet wurde. Der ganze Vorgang der Festigung wird durch die Tabelle XII veranschaulicht.

Den so gewonnenen festen Stamm bezeichneten wir in den noch folgenden Versuchen als Stamm R. Die Tabelle XIII zeigt, daß trotz mehrmaliger Behandlung des Stammes R mit Aethylhydrocuprein 1:500 eine weitere Festigung nicht möglich war.

Tabelle XII.

Festigung des Pneumokokkenstammes S 1 gegen Aethylhydrocuprein in vitro.

Zu 2 ccm Aethylhydrocupreinum hydrochloricum in Aq. dest. von steigender Konzentration 2 Tropfen Pneumokokkenkultur. Einwirkung 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Ueberimpfung auf Serumbouillon. 24 Stunden Brutschrank. Ausstrich Gramfärbung. + = Pneumokokken im Ausstrich, — = keine Pneumokokken im Ausstrich. Verwendung der Pneumokokkenkulturen, die mit den stärksten Konzentrationen von Aethylhydrocuprein in Berührung waren ($\frac{K}{100\,000}$, $\frac{K}{50\,000}$ etc.), zur weiteren Behandlung und Ueberimpfung.

21. III. 13	Ausg.-Kult. + Aethylhydrocupr.:	1:100 000	1:50 000	
22. III. 13.		+	—	
22. III.	$\frac{K}{100\,000}$ + Aethylhydrocupr.:	1:100 000	1:50 000	
23. III.		+	—	
23. III.	$\frac{K}{100\,000}$ + Aethylhydrocupr.:	1:100 000	1:50 000	
24. III.		+	+	
24. III.	$\frac{K}{50\,000}$ + Aethylhydrocupr.:	1:50 000	1:30 000	1:10 000
25. III.		+	+	—
25. III.	$\frac{K}{30\,000}$ + Aethylhydrocupr.:	1:30 000	1:10 000	1:5000
26. III.		+	—	—
26. III.	$\frac{K}{30\,000}$ + Aethylhydrocupr.:	1:30 000	1:10 000	1:5000
27. III.		+	—	—

Ueber d. Wirkung v. Chinaalkaloiden auf Pneumokokkenkulturen. 169

27. III.	$\frac{K}{30\ 000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 30 000	1 : 10 000	1 : 5000
28. III.		+	+	—
28. III.	$\frac{K}{10\ 000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 10 000	1 : 5000	1 : 1000
29. III.		+	—	—
29. III.	$\frac{K}{10\ 000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 10 000	1 : 5000	1 : 1000
30. III.		+	—	—
30. III.	$\frac{K}{10\ 000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 10 000	1 : 5000	1 : 1000
31. III.		+	+	—
31. III.	$\frac{K}{5000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 5000	1 : 1000	1 : 500
1. IV.		+	+	—
1. IV.	$\frac{K}{1000}$ + Aethylhydrocupr.:	1 : 1000	1 : 500	1 : 400
2. IV.		+	+	—

Tabelle XIII.

Versuch, die Pneumokokkenkultur Stamm R = $\frac{K}{500}$ (fest gegen Aethylhydrocupreinum hydrochloricum 1 : 500) gegen noch stärkere Konzentrationen von Aethylhydrocuprein zu festigen.

Technik wie Tabelle XII.

2. IV. 13.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
3. IV.		+	—	—
3. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
4. IV.		+	—	—
4. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
5. IV.		+	—	—
5. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
6. IV.		+	—	—
6. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
7. IV.		+	—	—
7. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
8. IV.		+	—	—
8. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
9. IV.		+	—	—
9. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
10. IV.		+	—	—
10. IV.	$\frac{K}{500}$ + Aethylhydrocuprein :	1 : 500	1 : 400	1 : 250
11. IV.		+	—	—

Daß auch bei einer Einwirkung bei einer Temperatur von 37° der Stamm R die gleiche Resistenz besitzt, beweist Tabelle XIV. Wir sehen den Normalstamm bei Zimmertemperatur durch Aethylhydrocuprein 1:60 000, bei 37° durch 1:150 000 abgetötet. Der R-Stamm verhält sich ganz gleich, einerlei bei welcher Temperatur die Einwirkung erfolgte. 1:400 tötet in beiden Fällen ab, 1:500 ist bei Zimmertemperatur und bei 37° wirkungslos.

Der Stamm R erwies sich auch im Tierkörper gegen Aethylhydrocuprein resistent. Von 5 mit Normalstamm infizierten und mit der freien Base des Aethylhydrocuprein in öligler Lösung behandelten Mäusen (Tabelle XV) ist nur eine am 5. Tage nach der Infektion gestorben, während die unbehandelten Kontrolltiere alle innerhalb 24 Stunden nach der Infektion derselben erlagen. Auch die eine Maus hätte wahrscheinlich noch gerettet werden können, wenn wir die Behandlung fortgesetzt hätten. Der Stamm R ist durch die Aethylhydrocupreinbase nicht zu beeinflussen. Alle 5 Mäuse sterben, eine gleichzeitig, die anderen 1—2 Tage später als die unbehandelten Kontrolltiere.

Tabelle XIV. Versuch vom 14. IV. 1913.

Aethylhydrocuprein. hydrochl. + Pneumokokken in vitro.

I. Normalstamm,

II. Stamm R (fest gegen Aethylhydrocuprein 1:500).

Nach Einwirkung von 2 Stunden:

a) bei Zimmertemperatur,

b) „ 37°.

Kontrollen mit Aqua destillata. Gemische auf Serumbouillon überimpft. 24 Stunden Brutschrank.

Ausstrich-Gramfärbung: + Pneumokokken im Ausstrich, — keine Pneumokokken im Ausstrich.

Verdünnungen	I. Normalstamm									II. Stamm R				
	1:20000	1:40000	1:50000	1:60000	1:70000	1:100000	1:120000	1:150000	1:200000	Kontroll. Aq. dest.	1:400	1:500	1:1000	Kontroll. Aq. dest.
a) Zimmertemperat.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
b) 37°	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+

Tabelle XV. Versuch vom 11. IV. 1913.

I. Pneumokokken-Normalstamm,
 II. Pneumokokkenstamm R (fest gegen Aethylhydrocuprein. hydrochloricum 1 : 500).

0,5 ccm Vollkultur Mäusen intraperitoneal injiziert.

Behandelt mit Aethylhydrocupreinbase in Oel 2-proz. subkutan:

0,5 ccm gleichzeitig mit der Infektion,

0,4 „ am 1. Tage nach „ „

0,4 „ „ 2. „ „ „ „

	I. Normalstamm								II. Stamm R							
	Kontrollen								Kontrollen							
No. der Maus	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434
Tagen. d. Inf.	1	0	0	0	0	†	†	†	kr.	kr.	kr.	kr.	†	†	†	†
	2	0	0	0	0	0			†	0	„	†				
	3	0	0	0	0	0				†	†					
	4	0	0	0	0	0										
	5	0	0	0	0	†										
	6	0	0	0	0											
	7	0	0	0	0											

kr. = krank.

Zusammenfassung.

Der chemotherapeutischen Wirkung des Aethylhydrocuprein gegenüber den Pneumokokken im Tierkörper entspricht eine sehr hohe Wirksamkeit dieser Verbindung im Reagenzglas, wie sie bereits Wright festgestellt hat.

Bei einer Einwirkungstemperatur von 37° wird die Wirksamkeit des Aethylhydrocuprein auf Pneumokokken in vitro wesentlich erhöht.

Von den anderen von uns geprüften Chinaalkaloiden übt nur das Isopropylhydrocuprein¹⁾ einen nennenswerten Einfluß auf Pneumokokken in vitro aus.

Ebenso wie im Tierkörper (Morgenroth und Kaufmann) läßt sich die Festigkeit der Pneumokokken gegenüber dem Aethylhydrocuprein durch geeignete Behandlung der Kulturen auch in vitro erzielen.

1) Ueber die anästhesierende Wirkung einiger höheren Homologen des Aethylhydrocuprein s. Morgenroth und Ginsberg, Berl. klin. Wochenschrift, 1913, No. 8.

Nachdruck verboten.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität Budapest
(Direktor: Prof. Dr. H. Preisz).]

Ueber serologische Unterschiede zwischen mütterlichem und fötalem Blutserum.

Von Dr. Ludwig Gózony,
Assistenten.

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Juni 1913.)

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, das mütterliche und fötale Serum vom serologischen Standpunkte zu vergleichen.

Rosinelli war der erste, der das mütterliche und fötale Serum bezüglich der Hämolyse einer Prüfung unterzog. Er kam zu dem Resultate, daß das fötale Blutserum viel weniger Hämolysin enthält als das mütterliche.

Seine Versuchsergebnisse wurden durch Halban und Landsteiner bestätigt, deren Versuche sich auch auf die Bakterizidie erstreckten und konstatierten, daß das mütterliche Serum auf Cholera vibrios stärker wirkt als das fötale.

Nach Sachs fehlt in dem fötalen Blutserum des Rindes, Schweines und Meerschweinchens das hämolysierende Komplement vollständig.

Rywosch zog auch das Alter der Embryonen in Betracht und stellte seine Versuche mit Hühnerembryonen an, um die Rolle solcher Stoffe auszuschließen, die im Wege des mütterlichen Blutkreislaufes in das embryonale Serum übertreten können. Nach genanntem Autor enthalten die Hühnerembryonen bis zum 21. Tage der Brut kein Hämolysin, erreichen jedoch am 5. Tage nach der Entschlüpfung aus dem Ei den Hämolysingehalt des mütterlichen Tieres.

Nach Kopf enthält das Blutserum neugeborener Kälber gegenüber Meerschweincherythrocyten kein Hämolysin; am 4. Tage jedoch konnte Hämolysin schon nachgewiesen werden und erreichte alsbald den Titer des mütterlichen Serums.

Zu diesen Versuchen gehören auch jene von Kraus und Graff, die nachwiesen, daß das Blutserum der Nabelschnur, im Gegensatz zum mütterlichen Serum, die Carcinomzellen nicht löst.

Meine eigenen ähnlichen Versuche hatten den Zweck, zu erforschen, weshalb das fötale Blutserum kein hämolysierendes

Komplement enthält und ob zwischen den bakteriziden Stoffen und den hämolysierenden Komplementen der Blutsera ein Zusammenhang besteht oder nicht?

Ich begann meine Versuche mit dem mütterlichen und fötalen Blutserum von Meerschweinchen.

I. Versuch.

Mittels Herzpunktion ließ ich die 3 frischgeborenen Jungen des Meerschweinchens No. 1 ungefähr 10 Minuten nach der Geburt verbluten.

Dem Muttertiere entnahm ich ebenfalls 3 ccm Blut mittels Herzpunktion. Nach Gerinnung und Abzentrifugierung untersuchte ich die gewonnenen Sera vergleichend auf hämolysierendes Komplement und auf bakterizide Stoffe.

a) Untersuchung auf hämolysierendes Komplement (1 ccm 1:200 sensibilisierter Blutkörperchen in einer Gesamtmenge von 1,5 ccm).

Mütterliches Serum	Fötales Serum	Hämolyse nach 2 Stunden
0,01	—	0
—	0,01	0
0,02	—	schwach
—	0,02	0
0,03	—	komplett
—	0,03	0
0,04	—	komplett
—	0,04	0

b) Untersuchung auf Bakterizidie.

In 1/2 ccm Serum wurden 115000 Typhusbacillen und zufällig ebensoviel Metschnikoffvibrien geimpft.

	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
0,5 ccm mütterl. Serum + B. typhi	1650	0
0,5 „ fötales „ + „	∞	∞
0,5 „ mütterl. „ + Vibr. Met.	0	0
0,5 „ fötales „ + „ „	∞	∞

II. Versuch.

Hämolysierende und bakterizide Eigenschaft des Serums der neugeborenen Jungen des Meerschweinchens No. 2.

a) Untersuchung auf hämolysierendes Komplement.

Zu 1 ccm mit 1:25 verdünntem Serum sensibilisierten und nachher gewaschenen Erythrocyten gab ich verschiedene Quantitäten von mütter-

lichem und fötalem Serum. Das Resultat wurde nach 2 Stunden abgelesen.

Mütterliches Serum	Fötales Serum	Hämolyse nach 2 Stunden
0,01	—	schwach
—	0,01	0
0,02	—	komplett
—	0,02	0
0,03	—	komplett
—	0,03	0
0,05	—	komplett
—	0,05	Spur

b) Untersuchung auf Bakterizidie.

In $\frac{1}{2}$ ccm Serum wurden 88 500 Colibacillen geimpft.

	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
0,5 ccm mütterliches Serum	74	0
0,5 „ fötales Serum	∞	∞

III. Versuch.

Ich ließ 3 Junge des Versuchsmeerschweinchens No. 3 auf ähnliche Weise wie in den vorangehenden Versuchen verbluten. Der Versuch erstreckte sich auch darauf, ob beide Teile (Albumin und Globulin) des Komplementes fehlen oder nur einer derselben.

a) Bakterizidie.

Serum	B. rhinosclerom.	Vibrio Metschn.	Staphylococcus	Keimzahl nach		
				1 Std.	5 Std.	24 Std.
0,5 ccm fötales Serum	2755	—	—	4775	8320	∞
0,5 „ „ „	—	382	—	1750	3080	∞
0,5 „ „ „	—	—	11742	10200	58930	∞
0,5 „ mütterl. „	2755	—	—	535	0	0
0,5 „ „ „	—	382	—	355	0	0
0,5 „ „ „	—	—	11742	13450	4800	∞

b) Untersuchung auf hämolysierendes Komplement.

Mütterliches Serum	Fötales Serum	Hämolyse nach 2 Stunden
0,05	—	komplett
—	0,05	0
0,1	—	komplett
—	0,1	0

c) Um zu bestimmen, welcher Teil des Komplementes aus dem fötalen Serum fehlt, spaltete ich das mit destilliertem Wasser dreifach verdünnte mütterliche und fötale Serum mittels Durchführung von Kohlensäure in den Albumin- und Globulinteil (nach Liefmanns Methode).

Der Albuminteil wurde mit einer 10-proz. NaCl-Lösung isotonisch gemacht, das mittels Zentrifugierung niedergeschlagene und gewaschene Globulin löste ich in so viel physiologischer NaCl-Lösung, wie es der ursprünglichen Serummenge entsprach.

Versuchsmaterial	Hämolyse nach 2 ^h
0,45 ccm mütterl. Serumalbumin	0
0,45 " " " + 0,1 ccm mütterl. Serumglobulin	komplett
0,45 " " " + 0,1 " fötales Serumglobulin	komplett
0,45 " fötales Serumalbumin	0
0,45 " " " + 0,1 ccm fötales Serumglobulin	0
0,45 " " " + 0,1 " mütterl. Serumglobulin	0
0,1 " mütterliches Serumglobulin	0
0,1 " fötales Serumglobulin	0

Nach den übereinstimmenden Resultaten der drei obigen Versuche enthält das fötale Serum des Meerschweinchens kein hämolysierendes Komplement; während durch 0,02 ccm Serum des Muttertieres 1 ccm sensibilisierte Blutkörperchen aufgelöst wurden, trat im Versuche mit fötalem Blutserum, selbst bei Anwendung des 5-fachen Quantums (0,1 ccm), keine Hämolyse ein.

Auch konnte ich feststellen, daß im fötalen Serum der Albuminteil, d. h. der eigentlich wirksame Teil des Komplementes fehlt; der Globulinteil ist jedoch vorhanden, weil letzterer mit dem mütterlichen Albumin die sensibilisierten Blutkörperchen ebenso hämolysierte wie das mütterliche Albumin in Gemeinschaft mit dem mütterlichen Globulin. Das fötale Albumin hingegen wurde weder mit dem mütterlichen, noch mit dem fötalen Globulin wirksam.

Bei der Prüfung der Bakterizidie stellte es sich heraus, daß das fötale Serum weder Typhus- und Colibacillen, noch den Vibrio Metschnikoffi tötet, während sich das mütterliche Serum diesen Bakterien gegenüber als sehr wirksam erwies.

Das Blutserum des Meerschweinchenfoetus enthält demnach weder ein hämolysierendes Komplement, noch ist es bakterizid.

Nicht gänzlich so verhält sich das Serum von Schwein und Kaninchen.

IV. Versuch.

Hämolyse und Bakterizidie des mütterlichen und fötalen Schweineblutserums.

Vom Schlachthause stammende Schweineföten ließ ich mittels Herzpunktion verbluten.

a) Untersuchung auf hämolyzierenden Komplementgehalt.

Mütterliches Serum	Fötales Serum	Hämolyse nach 2 Stunden
0,05	—	Spur
—	0,05	0
0,10	—	komplett
—	0,10	0
0,20	—	komplett
—	0,20	0
0,30	—	komplett
—	0,30	0

b) Welcher Teil des Komplementes fehlt aus dem fötalen Schweineserum?

Versuchsmaterial.	Hämolyse nach 2 ^h
1 0,8 ccm fötales Serumalbumin	0
2 0,8 „ „ „ + 0,1 ccm fötales Globulin	0
3 0,8 „ „ „ + 0,1 „ mütterl. Globulin	0
4 0,8 „ „ „ + 0,8 „ „ Albumin	0
5 0,8 „ mütterl. Albumin	Spur
6 0,8 „ „ „ + 0,1 ccm fötales Globulin	komplett
7 0,8 „ „ „ + 0,1 „ mütterl. Globulin	komplett
8 0,8 „ „ „ + 0,8 fötal. Album. + 0,1 mütterl. Globul.	komplett
9 0,1 „ mütterl. Globulin	0
10 0,1 „ fötales Globulin	0

c) Untersuchung auf Bakterizidie.

Serum	B. dysenteriae (Shiga-Kruse)	Vibrio Metschnikoff	B. rhino- scleromatis	Keimzahl nach	
				2 Std.	7 Std.
1 ccm mütterl. Schweineserum	52 600	—	—	40	0
	—	57 000	—	0	0
	—	—	256 000	1 760	0
1 ccm fötales Schweineserum	77 120	—	—	48 240	60
	—	570 000	—	855 000	∞
	—	—	249 000	565 000	∞

V. Versuch.

Hämolyse und Bakterizidie des mütterlichen und fötalen Kaninchenblutserums.

a) Untersuchung auf hämolysierendes Komplement.

Mütterliches Serum	Fötale Serum	Hämolyse nach 2 Stunden
0,05	—	mäßig
—	0,05	0
0,10	—	komplett
—	0,10	0
0,15	—	komplett
—	0,15	0
0,20	—	komplett
—	0,20	0

b) Untersuchung auf hämolysierendes Komplement (6 und 12 Tage nach der Geburt).

Serum 6 Tage nach der Geburt	Serum 12 Tage nach der Geburt	Hämolyse nach 2 Stunden
0,05	—	0
—	0,05	0
0,10	—	0
—	0,10	mäßig
0,15	—	0
—	0,15	komplett
0,20	—	Spur
—	0,20	komplett

c) Untersuchung auf Bakterizidie.

Serum	B. anthracis	B. dysenteriae	Keimzahl nach	
			$\frac{1}{2}$ Stunde	1 Stunde
0,5 ccm fötales Serum	6400	—	40	0
	—	3200	2070	0
0,5 ccm mütterliches Serum	6400	—	0	0
	—	3200	810	0

Wie aus den Versuchsreihen IV und V zu ersehen ist, enthält weder das fötale Schweine- noch das fötale Kaninchen-serum ein hämolysierendes Komplement. Laut Tabelle b des Versuches IV fehlt sowohl aus dem fötalen Schweineserum, wie auch aus dem fötalen Meerschweinchenserum die wirksame Substanz des Albuminteiles.

Nach der Tabelle b des V. Versuches enthält das Kaninchenserum am 6. Lebenstage das hämolysierende Komplement immer nur in Spuren und erreicht den Komplementgehalt des mütterlichen Serums erst am 13. Tage.

Daß es sich hierbei nicht um irgendeine im Fötalserum befindliche hemmende Substanz handelt, welche die Hämolysenicht zur Geltung kommen läßt, beweist die Tabelle b im Versuch IV; die Wirkung des mütterlichen Globulins wird durch das fötale Globulin ergänzt, das fötale Albumin dagegen hemmt die Wirkung des mütterlichen Albumins nicht.

Die Bakterizidie des fötalen Schweineserums ist jedoch im Gegensatz zu der Hämolysen in bezug auf Dysenteriebacillen eine fast vollkommene; auch das fötale Kaninchenserum tötet die Dysenterie- und Milzbrandbacillen fast im gleichen Maße wie das mütterliche Blutserum (V. Versuch, Tabelle c).

Da das fötale Kaninchenserum kein hämolysierendes Komplement enthält, dabei aber die gleiche bakterizide Eigenschaft besitzt wie das mütterliche Serum, so kann man mit Recht darauf schließen, daß im Kaninchenserum bei der Hämolysen andere Stoffe wirksam sind als bei der Bakterizidie.

Zusammenfassung.

1) Das fötale Meerschweinchenserum enthält weder ein hämolysierendes noch ein bakterizides Komplement.

2) Das fötale Kaninchenserum enthält kein hämolysierendes Komplement, ist jedoch bakterizid.

3) Beim fötalen Meerschweinchen- und Schweineserum fehlt der wirksame Teil der Albuminfraktion des hämolysierenden Komplementes, die Globulinfraktion jedoch ist wirksam.

4) Das Blutserum junger Kaninchen erreicht erst am 12. Lebenstage die hämolysierende Kraft des mütterlichen Serums.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Sero-bakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.]

Ueber das Verhalten des Serumantitrypsins bei der Anaphylaxie.

Von Dr. Kurt Meyer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juli 1913.)

Das Verhalten des Serumantitrypsins im anaphylaktischen Anfall wurde zuerst von Rusznyák¹⁾ untersucht. Er fand bei Meerschweinchen eine starke Zunahme der antitryptischen Wirkung des Serums im Anfall, die längere Zeit bestehen blieb.

Seligmann²⁾ konnte diese Beobachtung nicht bestätigen. Dagegen hat sie vor einiger Zeit H. Pfeiffer³⁾ zum Ausgangspunkt umfangreicher Untersuchungen und theoretischer Erörterungen genommen.

Pfeiffer untersuchte zunächst mit Jarisch das Verhalten des Antitrypsins bei der Hämolysevergiftung durch frisches Rinderserum. Er fand auch hier eine beträchtliche Erhöhung des antitryptischen Titors, die aber nur eine gewisse Zeit bestehen blieb, um dann einem Absinken unter die Norm Platz zu machen. In einer weiteren Mitteilung berichtet Pfeiffer⁴⁾ mit de Crinis, daß dieser Phase ein neues Ansteigen des Titors folgen soll, so daß dieser nach etwa 48 Stunden einen zweiten Höhepunkt erreicht.

Für die Deutung dieser Befunde legt Pfeiffer, wie schon früher Rusznyák, die Hypothese Rosenthals⁵⁾ zugrunde, nach der die Hemmungswirkung des Serums gegenüber der Trypsinverdauung durch Eiweißspaltprodukte bedingt sei und kommt so zu weitgehenden Schlüssen über den Ablauf der Eiweißzersetzungsprozesse während des anaphylaktischen Anfalls.

In der ersten Phase soll es zu einem rapiden Zerfall von Körper-eiweiß unter der Einwirkung der Antikörper des Rinderserums kommen:

- 1) Rusznyák, Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 4, p. 167.
- 2) Seligmann, diese Zeitschr., Bd. 14, 1912, p. 419.
- 3) H. Pfeiffer und Jarisch, diese Zeitschr., Bd. 16, 1913, p. 38.
- 4) H. Pfeiffer und de Crinis, diese Zeitschr., Bd. 17, 1913, p. 459.
- 5) Rosenthal, Fol. serol., Bd. 6, 1910, p. 285.

seinen Ausdruck finde dieser Vorgang in der durch die Anhäufung der Spaltprodukte im Serum bewirkten Antitrypsinvermehrung. Die entstandenen giftigen Spaltprodukte hemmen den weiteren Eiweißabbau — für diese Annahme werden Beobachtungen Heilners¹⁾ und Loenings²⁾ herangezogen —: die Zersetzungsprodukte und damit die antitryptischen Hemmungskörper verschwinden aus dem Serum (2. Phase). Mit Eintritt der Erholung kehrt auch der Eiweißstoffwechsel zur Norm zurück: die Spaltprodukte treten wieder im Serum auf (3. Phase). Die Erhöhung über die Norm erklärt Pfeiffer in nicht ganz verständlicher Weise damit, daß die Wirkung des Hämolysins noch weiter andauert. Warum dabei das Wohlbefinden der Tiere nicht gestört ist, wird nicht erörtert. Gestützt sieht Pfeiffer seine Theorie dadurch, daß, wenn die giftigen Spaltprodukte, als deren Vertreter er Wittepepton und β -Imidazolyläthylamin wählt, selbst injiziert werden, die primäre Antitrypsinsteigerung ausbleibt und sogleich das Absinken des Titers beginnt.

Die Ausführungen Pfeiffers machen auf den ersten Blick einen bestechenden Eindruck. Trotzdem scheinen sie mir sehr der Kritik bedürftig.

Zunächst ist nicht einzusehen, woher bei der aktiven Anaphylaxie die große Menge der Spaltprodukte kommen soll. Entstehen doch, wenigstens nach der Annahme Friedbergers, der sich Pfeiffer angeschlossen hat, die giftigen Spaltprodukte aus dem Antigen, und von diesem genügen so geringe Mengen zur Auslösung des Anfalls, daß die Wirkung seiner Abbauprodukte für die antitryptische Wirkung gar nicht in Betracht kommen kann, jedenfalls viel geringer sein müßte als bei der Rinder Serumvergiftung, bei der nach der Anschauung Pfeiffers in dem Körpereweiß des Meer-schweinchens den Antikörpern eine unvergleichlich größere Angriffsfläche geboten wird.

Der Hauptfehler Pfeiffers aber ist, daß er aus dem Verhalten des Antitrypsins weitgehende Schlußfolgerungen zieht, ohne sich über dessen Wesen eingehender zu informieren. Offenbar kennt er nur die, wie er meint, grundlegende Arbeit Rosenthals. Daß diese Arbeit eine Fülle von Unrichtigkeiten enthält, habe ich früher³⁾ nachgewiesen, so daß ich hier nicht näher auf sie einzugehen brauche.

1) Heilner, Zeitschr. f. Biol., Bd. 56, 1912.

2) Loening, Arch. f. exper. Pathol., Bd. 66, 1911, p. 78.

3) Kurt Meyer, Fol. serol., Bd. 7, 1911, p. 471.

Hervorgehoben sei nur, daß nach den übereinstimmenden Angaben der verschiedensten Autoren das Antitrypsin des Serums thermolabil, durch Ammonsulfat aussalzbar und nicht diffusibel ist. Damit ist die Spaltprodukthypothese Rosenthals eigentlich schon erledigt.

Dazu kommt, daß die Hemmungswirkung des Antitrypsins von einer ganz anderen Größenordnung ist als die der Albumosen, Peptone und Aminosäuren, so daß diese selbst dann nicht in Betracht kommen könnten, wenn sie nicht in so außerordentlich geringer Menge im Serum vorhanden wären — selbst unter den abnormsten Bedingungen (Urämie) unter 1 Proz. —, wie es tatsächlich der Fall ist.

Endlich wirkt das Antitrypsin, wie ich nachgewiesen habe, nur auf tryptische Fermente des tierischen Organismus, während nicht einzusehen wäre, warum Albumosen und Peptone nicht in gleicher Weise auch andere proteolytische Fermente hemmen sollten, was nicht der Fall ist.

Fällt aber die Rosenthalsche Hypothese, so kann auch der Zusammenhang zwischen den anaphylaktischen Erscheinungen und den Schwankungen des Antitrypsintiters nicht in dem von Pfeiffer gewollten Sinne bestehen. Zum mindesten die Deutung seiner Befunde ist also falsch.

Diese Befunde selbst aber, an sich interessant genug, erschienen mir deswegen einer Nachprüfung wert, weil sie mit der von mir vertretenen Auffassung, daß das Antitrypsin ein Reaktionsprodukt gegenüber proteolytischen Fermenten des tierischen Organismus in der Art eines Antikörpers ist, kaum vereinbar erscheinen: eine in wenigen Minuten einsetzende Antikörperproduktion ist bisher nicht bekannt.

Ich stellte daher zahlreiche Versuche an Meerschweinchen mit aktiver und passiver Hammelserumanaphylaxie, mit Rinderserum- und Hammelantiserumvergiftung an.

Zur Versuchsanordnung sei bemerkt, daß die Injektionen an Meerschweinchen von 250—500 g intraperitoneal vorgenommen wurden. Die Antitrypsinbestimmung geschah nach der von v. Bergmann und mir ausgearbeiteten Methode. Von einer protokollarischen Darstellung sehe ich ab.

Das Ergebnis der Versuche ist, daß ich, von ganz vereinzelt Ausnahmen abgesehen, eine Antitrypsin-

vermehrung gegenüber der Norm nicht festgestellt habe. Die Versuche wurden in der verschiedensten Weise variiert. Die Tiere wurden teils eine Viertel-, teils eine halbe, teils eine ganze Stunde nach der Injektion entblutet. Es kamen solche mit schwerster und solche mit protrahierter Vergiftung zur Untersuchung. Der Einwand, daß der richtige Zeitpunkt, der allerdings nach Pfeiffers neuesten Angaben ziemlich eng begrenzt sein soll, nicht getroffen sei, dürfte daher auszuschließen sein.

Dagegen fand ich in allen Fällen, also auch in den frühesten Stadien der anaphylaktischen Vergiftung, sowie ferner auch bei der Vergiftung mit Pepton und mit β -Imidazolyläthylamin die von Pfeiffer beschriebene und anscheinend auch schon von Seligmann beobachtete Abnahme des Serumantitrypsins. In manchen Fällen war die antitryptische Wirkung scheinbar ganz verschwunden, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß bei der gewählten Versuchsanordnung Antitrypsinmengen unter etwa einem Viertel der Norm sich bereits dem Nachweis entziehen.

Endlich glaube ich auch die Angaben Pfeiffers über die nach 24—48 Stunden einsetzende Antitrypsinvermehrung bestätigen zu können. Allerdings verfüge ich in dieser Beziehung nur über einige, noch dazu nicht zahlreiche Kaninchenversuche.

Meine Versuche haben also ein wesentlich anderes Bild ergeben als die Rusznyáks und Pfeiffers. Wie der Widerspruch zwischen Seligmanns und meinen negativen Ergebnissen — auch Ando¹⁾ konnte neuerdings keine Vermehrung des Antitrypsins im anaphylaktischen Anfall feststellen — und den Angaben jener Autoren zu erklären ist, ist schwer zu entscheiden. Vielleicht war bei den betreffenden Tieren aus irgendwelchen Gründen der Titer schon von vornherein erhöht. Daß dies bisweilen vorkommt, ist nach meinen Erfahrungen sicher, und ich führe meine vereinzelt positiven Resultate darauf zurück.

Aus meinen Versuchen ergibt sich jedenfalls als konstanteste Erscheinung die Verminderung

1) Ando, diese Zeitschr., Bd. 18, 1913, p. 1.

der Antitrypsinmenge. Ist dieses Verhalten auf dem Boden der Antikörperhypothese zu erklären?

Macht man die durch viele Gründe gestützte Annahme, daß im anaphylaktischen Anfall ein Eiweißerfall stattfindet, sei es nun als primäre Erscheinung, die erst ihrerseits zur Bildung toxischer Produkte führt, sei es als sekundäre Wirkung beim Antigenabbau entstandener Gifte, und bezieht man diesen Eiweißerfall auf eine gesteigerte Tätigkeit proteolytischer Fermente, so ist eine Verminderung des normalen Antitrypsingehalts des Serums a priori zu erwarten. Diese Erscheinung würde dem nach jeder Antigeneinverleibung eintretenden Absinken des Antikörpergehalts, der „negativen Phase“, durchaus entsprechen.

Möglich wäre es auch, daß noch ein zweiter Vorgang bei der Antitrypsinverminderung eine Rolle spielt. Die im anaphylaktischen Anfall einsetzende Blutdrucksenkung führt zweifellos zu weitgehenden Verschiebungen im Flüssigkeitshaushalt des Organismus. Wissen wir doch besonders aus den Untersuchungen von Hess¹⁾ und Walter Erb²⁾, daß dabei ein Uebertritt von Gewebsflüssigkeit in die Gefäße erfolgt. Andererseits hat Calvary³⁾ gezeigt, daß die Lymphproduktion im anaphylaktischen Anfall mächtig angeregt wird, so daß auch auf diesem Wege die Zusammensetzung des Blutes Veränderungen erfahren muß. Es darf nun wohl als sicher angenommen werden, daß Lymphe und Gewebsflüssigkeit weniger Antitrypsin enthalten als das Blutserum, so daß durch die Verdünnung das Serumantitrypsin eine Verminderung erfahren muß.

Bei einigen Seren habe ich festzustellen gesucht, wie der Wassergehalt sich im anaphylaktischen Anfall verändert, indem ich den Trockenrückstand bestimmte.

Tabelle.

Trockenrückstand in 1 ccm Serum.					
Normalserum	1	67 mg	Aktive Anaphylaxie		58 mg
"	2	61 "	"	"	57 "
"	3	67 "	Passive	"	59 "
"	4	62 "	Rinderserumvergiftung		63 "

1) Hess, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 79, 1903, p. 128.

2) Walter Erb, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 88, 1906, p. 36.

3) Calvary, Münch. med. Wochenschr., 1911, p. 670.

Die Zahlen sind zu gering, als daß man in Anbetracht der individuellen Schwankungen bindende Schlüsse ziehen könnte. Immerhin scheinen sie doch für eine Verdünnung des Serums im anaphylaktischen Anfall zu sprechen. Daß diese nicht stärker zum Ausdruck kommt, erklärt sich dadurch, daß Lymphe und Gewebsflüssigkeit ebenfalls reichlich Eiweiß und Salze, die Salze sogar in gleicher Menge wie das Serum enthalten.

Daß diese Flüssigkeitsverschiebungen bei der Antitrypsinverminderung ebenfalls eine gewisse, wenn auch untergeordnete Rolle spielen, möchte ich besonders deswegen annehmen, weil man bereits nach einmaliger Entnahme mäßiger Mengen Blut aus dem Herzen eine geringe Verminderung des Antitrypsins im Meerschweinchenserum feststellen kann. Ich machte diese Beobachtung, als ich versuchte, das Verhalten des Antitrypsins bei demselben Tiere während verschiedener Stadien des anaphylaktischen Anfalls zu verfolgen. Offenbar ist auch diese Antitrypsinverminderung durch Uebertritt von Gewebsflüssigkeit in das Blut bedingt.

Was endlich die am zweiten und dritten Tage nach dem Anfall eintretende Antitrypsinvermehrung betrifft, so ist diese als reaktive Antikörperproduktion, ausgelöst durch die vermehrte Tätigkeit der proteolytischen Fermente, leicht zu erklären.

Zusammenfassung.

Die von H. Pfeiffer im Anschluß an Rusznyák aufgestellte Theorie über den Zusammenhang zwischen den Eiweißzerfallsprozessen und den Veränderungen des Antitrypsintiters im Serum ist hinfällig, weil sie von der irrtümlichen Annahme ausgeht, daß die antitryptische Wirkung des Serums durch Eiweißspaltprodukte bedingt sei.

Die Angaben Pfeiffers und Rusznyáks über eine Vermehrung des Antitrypsins im anaphylaktischen Anfall konnten weder bei der aktiven noch passiven Anaphylaxie noch bei der Rinderserum- und Hammelantiserumvergiftung bestätigt werden.

Dagegen wurde konstant das ebenfalls von Pfeiffer beschriebene Absinken der Antitrypsinmenge beobachtet.

Das nach 24—48 Stunden erfolgende Ansteigen des Antitrypsintiters konnte in einigen Kaninchenversuchen bestätigt werden.

Auf dem Boden der Antikörpertheorie wird das Absinken der Antitrypsinmenge im Anfall als „negative Phase“, bedingt durch die vermehrte Tätigkeit proteolytischer Fermente, gedeutet. Daneben wird auf die Wahrscheinlichkeit einer Verdünnung des Serums durch Gewebsflüssigkeit und Lymphe infolge der im Anfall eintretenden Blutdrucksenkung hingewiesen.

Das spätere Ansteigen des Antitrypsintiters wird als reaktive Antikörperproduktion aufgefaßt.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institute der Deutschen Universität Prag.]

Untersuchungen über die Absorption von Schafbluthämolysinen durch Meerschweinchenorgane.

Von Prof. Dr. Oskar Bail und Prof. Dr. Alexander Margulies.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Juli 1913.)

Die Beobachtungen Forssmans über die Bildung von Schafbluthämolysinen bei Kaninchen nach Injektion von Organen von Meerschweinchen, Pferden, Katzen haben berechtigtes Aufsehen hervorgerufen und sind geeignet, die bisherigen Anschauungen über die Spezifität der Antikörperbildung einer Revision zuzuführen. Es ist durchaus nicht einzusehen, wieso die Organe so wenig verwandter Tiere gemeinsam ein antigenes Vermögen für abweichende Zellen einer wieder ganz fremden Tierart, wie das Schaf, haben können. Denn es ist selbstverständlich nur eine Umschreibung der gefundenen Tatsachen, keine Erklärung, wenn man sagt, daß in diesen, dem Gewebe wie der Tierart nach verschiedenen Zellen zufällig das gleiche Antigen enthalten sei. Es läßt sich unschwer voraussehen, daß dieser Gegenstand die theoretische Serologie noch anhaltend beschäftigen wird¹⁾.

1) Mit dem Gegenstande befaßt sich auch Friedberger (diese Zeitschrift, Bd. 18, Heft 3). Auch er hält die Annahme einer Rezeptoren-

Bisher sind außer den Untersuchungen von Forssman und seinen Mitarbeitern die Arbeiten von D. Orudschiew und die von Doerr und Pick erschienenen. Sie bestätigen die Befunde Forssmans, indem sie dieselben nach verschiedenen Richtungen hin erweitern. Von großem Interesse sind die Absorptionsversuche von Doerr und Pick, welche fanden, daß Schafbluthämolysine, von Kaninchen durch Behandlung mit Pferdeorgan gewonnen, durch die Organe von Meerschweinchen, Katze, Hund, Huhn, Schildkröte absorbiert, durch die aller anderen untersuchten Tiere nicht verändert werden; daraus muß der Schluß gezogen werden, daß in den Organen aller dieser, in der Verwandtschaft soweit als nur möglich auseinanderstehenden Tiere das gleiche Antigen enthalten sei. Die schönen Untersuchungen, die sich daraus über die Giftigkeit des Serums für diese verschiedenen Tierarten ergaben, seien hier nur erwähnt.

Von den zahlreichen Fragen, zu denen diese Feststellungen anregen, interessiert zunächst die nach dem verschiedenen Verhalten der Tierarten. Daß die Uebereinstimmung im Verhalten der Organe eines Meerschweinchens, einer Katze, eines Pferdes oder gar einer Schildkröte nicht auf eine natürliche Verwandtschaft zurückgeführt werden kann, liegt auf der Hand. Es bleibt aber zu entscheiden, ob das vorhandene oder fehlende Absorptionsvermögen der Organe verschiedener Tiere auf einer primären Anlage beruht und dann der weiteren Untersuchung kaum mehr zugänglich ist, oder ob es sich um eine sekundäre Differenzierung handelt, bei der ursprünglich die Organe aller Tiere sich gleich verhalten, aber nachträglich erst in abweichender Richtung verändert werden.

Besonders angeregt wurden diese Ueberlegungen durch die Feststellungen des einen von uns, welche Verschiedenheiten des Absorptionsvermögens für Hämolysine in den verschiedenen Formen der Nervensubstanz des Meerschweinchens und Pferdes auf den wechselnden Gehalt derselben an Bindegewebe zurück-

gemeinschaft für gezwungen und ist geneigt, die Hämolysinbildung als eine gesteigerte Sekretion schon normal reichlich vorhandener Antikörper auf den Reiz der Injektion verschiedener giftiger Antigene hin aufzufassen.

führen konnten und es, wenn auch nicht strikte bewiesen, doch wahrscheinlich machten, daß überhaupt dem Bindegewebe ein sehr wesentlicher Anteil an der Hämolytinabsorption zukommen müsse. Daß aber das artlich relativ wenig differenzierte Bindegewebe seiner Anlage nach bei Kaninchen und Meerschweinchen so angelegt sein sollte, erschien unwahrscheinlich und es war daher die Möglichkeit der Untersuchung sekundär differenzierender Momente gegeben.

Am nächsten läge es, die Ursache in einem Agens zu suchen, welches selbst bei den verschiedenen Tierarten Unterschiede aufweist und dabei mit allen Geweben in beständigem und innigem Austausch steht. Ein solches Agens aber sind die Körpersäfte. Hatte also die Ueberlegung einigen Grund, so mußte es gelingen, mit dem Serum von Tieren, deren Organe nicht imstande sind, Hämolytine zu absorbieren, Organen von anderen Tieren, denen diese Fähigkeit zukommt, dieselbe zu nehmen. Eventuell konnte auch der umgekehrte Versuch gelingen, etwa mit dem Serum eines Meerschweinchens den Organen des Kaninchens die sonst fehlende Absorptionskraft mitzuteilen.

Zu den Versuchen dienten teils Normalsera der verschiedenen Tierarten, teils schafhämolytisches Serum, welches von Kaninchen nach Vorbehandlung derselben mit Hirn, Niere, Bindegewebe von Meerschweinchen oder mit Hirn von Pferden gewonnen war. In der Regel wurde nach zweimaliger Vorbehandlung, die sich an die von Doerr und Pick gegebenen Vorschriften anlehnte, Blut entnommen; das davon hergestellte Serum hatte stets einen hämolytischen Titer von 0,001 ccm und darunter für 1 ccm 5-proz. Schafblut bei Verwendung von 0,05 ccm Meerschweinchenserum als Komplement. — Die absorbierenden Organe wurden zunächst ausschließlich von Meerschweinchen gewonnen. Im Anfange wurde wirklich reines Bindegewebe verwendet, welches aus Niere und Lunge in der Weise dargestellt war, daß die Organe auf einem feinen Drahtnetze zerdrückt wurden. Die Zellen gehen dabei durch das Netz hindurch, was durch wiederholtes Aufgießen von physiologischer Kochsalzlösung beschleunigt wird. Die gröber bindegewebigen Anteile der Organe bleiben als graurötliche Massen zurück, wurden zwischen Fließpapier abgepreßt, zerschnitten und mit Kochsalzlösung verrieben. Dabei wurde keineswegs auf feinste Verteilung geachtet, im Gegenteil bestand das absorbierende Agens aus verhältnismäßig gröberen Bröckchen, was das Zentrifugieren sehr erleichtert und doch eine genügende Absorption der Schafhämolytine zuläßt. Später wurde statt dieser immerhin umständlichen Manipulation einfach die Lunge, als bindegewebsreiches Organ feinst zerschnitten, und

mit bestimmten Mengen Kochsalzlösung zu einer Emulsion verrieben; auch hier wurde auf ganz feine Verteilung des Organs kein besonderes Gewicht gelegt, wozu übrigens zu bemerken ist, daß auch fein zerriebene Lunge sich in Kochsalzlösung rasch zu kleineren und größeren Klümpchen zusammenballt. Von dieser Emulsion wurden abgemessene Mengen zentrifugiert und der verbleibende Satz zu den Versuchen verwendet. Dadurch wird zwar die Zusammenballung der Organpartikel noch mehr befördert und es ist möglich, daß ganz fein verteilte Organe eine noch bessere Absorption entfalten würden. Dagegen erleichtert man sich nicht nur das Arbeiten ganz bedeutend, sondern entfernt auch mindestens einen Teil des Organeiwisses, welches, wie Doerr und Pick richtig bemerken, sehr wohl zu Täuschungen Veranlassung geben könnte.

Die so gewonnenen Organmengen wurden nun der Einwirkung von verschiedenen Normalseren ausgesetzt, nach einiger Zeit von ihnen durch Zentrifugieren getrennt und sodann einmal mit stets 10 ccm NaCl-Lösung gewaschen. Versuche, die etwaigen Veränderungen, welche ein fremdes Serum in der Absorptionskraft der Meerschweinchenorgane hervorruft, in der Weise zu studieren, daß das hämolytische Immunserum gleichzeitig mit diesen Seren der Organmenge zugesetzt wird, stoßen insofern auf Schwierigkeiten, als viele der benutzten Normalsera von vornherein Normalhämolysine für Schafblut enthalten und dadurch schwer kontrollierbare Verhältnisse entstehen.

Der allererste Versuch wurde mit Kaninchenserum an gestellt und gelang, obwohl sich später herausstellte, daß gerade das Kaninchenserum nicht in allen Fällen verlässlich ist.

Tabelle I.

Bindegewebe aus Nieren und Lungen eines kleinen Meerschweinchens in der oben beschriebenen Weise gewonnen, wird in zwei Teilen: a) mit 5 ccm NaCl-Lösung, b) mit 5 ccm aktivem Kaninchenserum $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° im Wasserbade gehalten, dann zentrifugiert und neuerlich mit den gleichen Mengen derselben Flüssigkeiten $\frac{1}{2}$ Stunde behandelt. Nach sorgfältigem Abzentrifugieren und Abgießen wird zu den Sätzen, die diesmal nicht eigens gewaschen wurden, 2,25 ccm NaCl-Lösung + 0,25 ccm Immunserum (vom Kaninchen nach Behandlung mit Meerschweinchehirn) zugesetzt. Nach $\frac{3}{4}$ -stündigem Verweilen bei 37° wurde abzentrifugiert und die Lösungskraft der Abgüsse in den Dosen 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 und 0,02 ccm (entsprechend 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005 und 0,002 ccm Immunserum) gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut mit 0,05 ccm aktivem Meerschweinchenserum bestimmt.

Serum a	Serum b	Kontrolle	Komplementkontrolle
0	k.	k.	0
0	k.	k.	
0	k.	k.	
0	f. k.	k.	
0	Sp.	k.	
0	0	k.	

Es war somit in diesem Versuche unzweideutig gelungen, die Absorption des Meerschweinchenbindegewebes durch Kaninchenserum, wenn auch nicht vollständig aufzuheben, so doch bedeutend herabzusetzen. Es ist nicht ohne Interesse, die Untersuchung der hämolytischen Kraft des Kaninchensersums vor und nach seiner Verwendung zur Organbehandlung anzuführen.

Tabelle II.

Die beiden Portionen des Kaninchensersums, mit denen die Organe behandelt waren, sind als Serum b und c, das normale Kaninchenserum als a bezeichnet. Die Sera waren vor der Auswertung $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt. Dosen: 1, 0,5, 0,1, 0,05 ccm mit je 0,05 ccm Komplement gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut.

Serum a	Serum b	Serum c
k.	k.	k.
k.	k.	k.
k.	s. st.	k.
k.	0	f. k.

Es war zwar durch die Organbehandlung eine deutliche, aber doch nur verhältnismäßig geringe Herabminderung der Normalhämolytine des Kaninchensersums eingetreten. Im folgenden seien zunächst einige Versuche mit den Seren anderer Tierarten angeführt.

Tabelle III.

Bindegewebe von Nieren und Lungen eines kleinen Meerschweinchens werden in 8 Teilen behandelt mit: 1) 6 ccm NaCl-Lösung, 2) 6 ccm aktivem, 3) ebensoviel inaktivem Pferdeserum, 4) und 5) aktivem und inaktivem Rinderserum, 6) und 7) aktivem und inaktivem Schweineserum, 8) aktivem Schafserum. Nach $\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt bei 40° wurde zentrifugiert und die abgossenen Sera durch je 8 ccm der gleichen Sera ersetzt. Nach weiterem $\frac{1}{2}$ -stündigen Aufenthalte bei 40° wurde zentrifugiert, jeder Satz mit 10 ccm NaCl-Lösung gewaschen und mit 2 ccm einer Verdünnung von Immunserum 1:10 1 Stunde bei 37° gehalten. Die danach erhaltenen Abgüsse wurden in den Dosen von 1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm gegen je 1 ccm 5-proz. Schafblut mit 0,05 ccm Komplement ausgewertet.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
0	0	0	f. k.	f. k.
0	0	0	f. k.	s. st.
0	0	0	dtl.	dtl.
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Immuneser. 6 Immuneser. 7 Immuneser. 8 Kontrolle				
	f. k.	k.	Sp.	k.
	f. k.	k.	0	k.
	f. k.	k.	0	k.
	st.	st.	0	k.
	0	0	0	f. k.

Die Untersuchung der abgegossenen Sera, die zur Behandlung gedient hatten, ergab für Rinder- und Schweineserum nur eine ganz geringe Abschwächung der Normalhämolysine, welche in Pferde- und Schafserum von vornherein nicht vorhanden waren.

Tabelle IV.

Bindegewebe wie im vorigen Versuche in 8 Teilen wird durch 1 Stunde bei 40° behandelt mit je 10 ccm: 1) NaCl-Lösung, 2) NaCl-Lösung mit 0,2 ccm Immuneserum, 3) aktivem Meerschweinchenserum (von 2 Tieren), 4) akt. Kaninchenserum, 5) akt. Pferdeserum, 6) akt. Rinderserum, 7) akt. Schweineserum, 8) akt. Schafserum. Danach wurde zentrifugiert, jeder Satz mit 10 ccm NaCl-Lösung gewaschen und 2 ccm einer Immuneserumverdünnung 1:10 zugesetzt (das Immuneserum war durch Behandlung eines Kaninchens mit Meerschweinchenbindegewebe gewonnen). Nach 1-stündiger Behandlung bei 37° wurden die abzentrifugierten Flüssigkeiten in den Dosen 1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm gegen 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
0	Sp.	0	k.	0
0	0	0	k.	0
0	0	0	k.	0
0	0	0	f. k.	0
0	0	0	dtl.	0
Immuneser. 6 Immuneser. 7 Immuneser. 8 Kontrolle				
	k.	k.	st.	k.
	k.	k.	f. k.	k.
	f. k.	f. k.	st.	k.
	f. k.	Sp.	dtl.	k.
	dtl.	0	0	f. k.

Von den Flüssigkeiten, welche zur Behandlung des Bindegewebes gedient hatten, löste nach $\frac{1}{2}$ -stündiger Erwärmung auf 56° der Abguß von 2, 3, 5, 8 gar nicht, der von 4 und 6 bis 0,05 ccm herunter vollständig oder fast vollständig, der von 7 bis zu 0,1 ccm noch deutlich. Unverändertes Kaninchen-, Rind- und Schweineserum löste bis zu 0,05 ccm vollständig oder doch sehr stark, Meerschweinchen-, Pferde- und Schafserum lösten nicht.

Ein Ueberblick über diese Versuche zeigt, daß die Seren von Kaninchen, Rind, Schwein und Schaf die Absorptionsfähigkeit der Meerschweinchenorgane mehr oder weniger vollständig beseitigen, während die Seren von Meerschweinchen und Pferd dies nicht vermögen. In die erste Gruppe gehören aber Tiere, deren Organe nicht imstande sind, die durch Meerschweinchenorganbehandlung erzeugten Hämolytine zu binden, während der zweiten Gruppe Tiere mit ausgesprochenem Organbindungsvermögen zufallen. Es dürfte wohl berechtigt sein, darin eine ursächliche Gesetzmäßigkeit zu vermuten.

Es muß allerdings gleich hier bemerkt werden, daß nicht in allen Fällen dieses Resultat erzielt wurde. Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Normalseren findet man stets einige, welchen die Aufhebung der Absorption der Meerschweinchenorgane nur in geringem Grade zukommt oder auch ganz fehlt. Bei der großen Verschiedenheit, welche man auch sonst bei der Untersuchung von Normalseren findet, hat das nichts Verwunderliches. Kommt es ja doch auch vor, daß man Meerschweinchen findet, deren Organe ein sehr geringes oder auch gar kein Bindungsvermögen für Hämolytine aufweisen. Schon Orudschiew hat auf Verschiedenheiten des Organbindungsvermögens hingewiesen und wir selbst fanden unter ca. 40 Tieren zwei, deren Organe ganz oder fast ganz unwirksam waren. Derartige Ausnahmen ändern natürlich nichts an der Gültigkeit der positiven Befunde. Am öftesten versagte das Schafserum, nur selten Rind- und Schweineserum, etwas häufiger Kaninchenserum, namentlich von jüngeren Tieren.

Von großer Bedeutung sind die quantitativen Verhältnisse. Die Autoren, die sich bisher mit diesem Gegenstande beschäftigt haben, verwendeten relativ sehr große Organmengen zur Absorption des Immunserums. So evident dann die Resultate sind, wenn es sich darum handelt, die Absorption der Tierorgane vom Meerschweinchentypus gegen die Unwirksamkeit derer vom Kaninchentypus hervortreten zu lassen, so sind doch so große Mengen nicht erforderlich und dem Gelingen der erwähnten Versuche mit fremden Seren direkt hinderlich.

Tabelle V.

Organbindegewebe aus Meerschweinchenlunge und -niere, in der gewöhnlichen Weise verarbeitet, wird in zwei verschiedenen Dosen verwendet. Je eine einfache und je eine dreifache Dosis wird mit 10 ccm NaCl-Lösung (1 und 3) und mit 10 ccm akt. Rinderserum 1 Stunde bei 37° behandelt (2 und 4), der Satz isoliert, gewaschen und mit 2 ccm Immunsrumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° gehalten. Die danach abzentrifugierten Flüssigkeiten werden in den Dosen 1, 0,5, 0,1 und 0,05 ccm gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immunsrer. 1	Immunsrer. 2	Immunsrer. 3	Immunsrer. 4	Kontrolle
0	k.	0	0	k.
0	s. st.	0	0	k.
0	dtl.	0	0	k.
0	0	0	0	k.

Tabelle VI.

Beide Lungen eines Meerschweinchens im Gewichte von 2,1 g werden feinst zerschnitten, unter tropfenweisem Zusatz von NaCl-Lösung fein verrieben und auf 25 ccm Gesamtflüssigkeit gebracht. Je 1 ccm dieser Aufschwemmung gilt als ein Teil und entspricht daher 0,084 g des feuchten Organs. Es werden nun unter No. 1, 2, 3: 1, 2 und 4 ccm der Aufschwemmung mit je 10 ccm NaCl-Lösung, unter No. 4, 5, 6 mit ebensoviel akt. Schweineserum, unter No. 7, 8, 9 mit akt. Rinderserum, unter No. 10, 11, 12 mit akt. Pferdeserum vermischt, 1 Stunde bei 40° gehalten, zentrifugiert, die Sätze einmal mit je 10 ccm NaCl-Lösung gewaschen und mit je 2 ccm Immunsrumverdünnung 1:10 wieder 1 Stunde bei 37° gehalten. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird gegen je 1 ccm 5-proz. Schafblut in den Dosen 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm ausgewertet.

Immunsrer. 1	Immunsrer. 2	Immunsrer. 3	Immunsrer. 4	Immunsrer. 5
s. st.	0	0	k.	k.
dtl.	0	0	k.	k.
0	0	0	f. k.	st.
0	0	0	Sp.	0
Immunsrer. 6	Immunsrer. 7	Immunsrer. 8	Immunsrer. 9	Immunsrer. 10
Sp.	k.	k.	0	st.
0	k.	k.	0	dtl.
0	dtl.	dtl.	0	0
0	Sp.	Sp.	0	0
Immunsrer. 11	Immunsrer. 12	Kontrolle	Komplement	
0	0	k.	0	
0	0	k.		
0	0	k.		
0	0	k.		

Man bemerkt die Abhängigkeit der Absorption wie auch des Rückganges derselben nach Behandlung mit Normalseren von quantitativen Verhältnissen aufs deutlichste.

Von sehr großem Interesse mußte die Untersuchung der Bindungskraft der Meerschweinchenorgane sein, nachdem sie verschiedenen Eingriffen unterworfen sind.

In erster Reihe kam das Verhalten derselben nach hochgradiger Erhitzung in Betracht. Doerr und Pick konnten feststellen, daß Organe vom Pferde ohne Verlust ihrer Absorptionskraft auf 100° erhitzt werden können. Eigene Versuche bestätigten dies nicht nur, sondern konnten zeigen, daß die Bindungskraft der gekochten Organe des Meerschweinchens wahrscheinlich erhöht ist. Um dies zu zeigen, sei ein Versuch angeführt, bei dem ein Meerschweinchen Organe von nur sehr geringer Absorptionskraft hatte.

Tabelle VII.

Lungen eines Meerschweinchens in der beschriebenen Weise zubereitet. Ein Teil der durch Zentrifugieren isolierten Bodensätze wird 15 Minuten im siedenden Wasserbade gehalten. 1) Lunge + 10 ccm NaCl-Lösung, 2) Lunge + 10 ccm Schweineserum akt., 3) Lunge gekocht + 10 ccm NaCl-Lösung, 4) Lunge gekocht + 10 ccm Schweineserum akt. Nach 1-stündiger Behandlung bei 40° werden die Bodensätze gewaschen und mit 2 ccm Immunserymverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° gehalten. Dosen der abzentrifugierten Flüssigkeit von 1, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm werden gegen je 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immunsery. 1	Immunsery. 2	Immunsery. 3	Immunsery. 4	Kontrolle
k.	k.	0	0	k.
k.	k.	0	0	k.
f. k.	k.	0	0	k.
dtl.	f. k.	0	0	k.

Man merkt aufs deutlichste, wie die Absorptionskraft der Organe, die im frischen Zustande derselben minimal war, durch die Erhitzung gestiegen ist. Das ist um so auffälliger, als die gekochten Organe bei dieser Versuchsanordnung fest zusammenhaftende Klumpen bilden, die überhaupt nicht fein zu verteilen sind, so daß die Absorption durch relativ wenige grobe Materialbrocken herbeigeführt wird.

Dennoch und obwohl durch die Versuche von Doerr und Pick festgestellt ist, daß die eigentümliche Trennung der Organabsorption nach den erwähnten beiden Tiertypen durch Erhitzen nicht verloren geht, unterscheiden sich gekochte Organe von frischen dadurch, daß es bei ihnen nicht gelingt, die Absorptionskraft durch Behandlung mit entsprechendem Normalserum aufzuheben.

Tabelle VIII.

In gewöhnlicher Weise hergestellte Lungenverreibungen von Meerschweinchen werden in den Proben 1—6 in frischem Zustande mit je 10 ccm NaCl-Lösung, akt. Kaninchen-, Pferde-, Rinder-, Schweine- und Schafserum, in den Proben 7—12 nach 5 Minuten langem Kochen mit den gleichen Seren 1 Stunde bei 40° behandelt, zentrifugiert, gewaschen und sodann mit 2 ccm Immunserumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° belassen. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten werden gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut in den Dosen 0,75, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm ausgewertet.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
0	f. k.	0	k.	k.
0	st.	0	k.	k.
0	Sp.	0	k.	k.
0	0	0	f. k.	f. k.
Immuneser. 6	Immuneser. 7	Immuneser. 8	Immuneser. 9	Immuneser. 10
k.	0	Sp.	0	dtl.
k.	0	0	0	0
f. k.	0	0	0	0
dtl.	0	0	0	0
	Immuneser. 11	Immuneser. 12	Kontrolle	
	st.	0	k.	
	Sp.	0	k.	
	0	0	k.	
	0	0	k.	

Ist in diesem Versuche, offenbar infolge nicht genügend langer Erhitzung, noch eine Spur von einer Wirkung der Normalsera auf die gekochten Organe vorhanden, so beweist der folgende, in dem die Meerschweinchenorgane wieder nur sehr wenig zu absorbieren vermochten, die große Verschiedenheit zwischen den frischen und hocherhitzten Organen.

Tabelle IX.

In den Proben 1, 2, 3, 4 ist frische, in den Proben 5, 6, 7 und 8 15 Minuten lang gekochte Meerschweinchenlunge mit je 10 ccm NaCl-Lösung, akt. Pferde-, Rind- und Kaninchenserum 1 Stunde bei 37° behandelt. Nach Waschung der Bodensätze wurden sie mit je 2 ccm einer Immunserumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° behandelt und die abzentrifugierte Flüssigkeit in den Dosen 1,0, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm auf je 1 ccm 5-proz. Schafblut untersucht.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
k.	k.	k.	k.	0
f. k.	k.	k.	k.	0
dtl.	st.	k.	k.	0
0	Sp.	k.	k.	0
0	0	f. k.	f. k.	0

Immuneser. 6	Immuneser. 7	Immuneser. 8	Kontrolle
0	0	0	k.
0	0	0	k.
0	0	0	k.
0	0	0	k.
0	0	0	k.

Interessant ist ferner, daß Meerschweinchenorgane, die nach Behandlung mit Normalserum ihre Bindungskraft mehr oder weniger eingebüßt haben, nach Kochen wieder vollständig absorbieren.

Tabelle X.

Bindegewebe aus Nieren und Lunge vom Meerschweinchen in der beschriebenen Weise gewonnen, in 12 Teile verteilt. Die Organe werden 1) mit 10 ccm NaCl-Lösung, 2) akt. Pferde-, 3) akt. Rinder-, 4) akt. Schweine-, 5) akt. Schafserum 1 Stunde bei 37° behandelt. Ebenso behandelt wurden die Proben 6, 7 und 8, welche ganz genau den Proben 2, 3, 4 entsprechen. Während aber in diesen nach Waschung mit je 10 ccm NaCl-Lösung die Immuneserumverdünnung 1:10 in der Menge von 2 ccm zugesetzt wurde, wurden die Sätze von 6, 7, 8 nach der Waschung erst 15 Minuten im siedenden Wasserbade gehalten und das Immuneserum in der gleichen Menge erst jetzt zugesetzt. Die Proben 9, 10, 11, 12 enthielten Bindegewebe, welches schon vor dem Zusatz von NaCl-Lösung, Pferde-, Rinder- und Schweineserum durch 15 Minuten gekocht worden war. Nach der Serumbehandlung und Waschung wurde das zur Absorption bestimmte Immuneserum wie bei den anderen Proben zugesetzt und 1 Stunde bei 37° einwirken gelassen. Die schließlich abzentrifugierten Proben wurden in den Dosen 0,75, 0,45, 0,15 und 0,05 gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
0	0	k.	k.	Sp.
0	0	f. k.	k.	0
0	0	Sp.	f. k.	0
0	0	0	dtl.	0

Immuneser. 6	Immuneser. 7	Immuneser. 8	Immuneser. 9	Immuneser. 10
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Immuneser. 11	Immuneser. 12	Kontrolle
0	0	k.
0	0	k.
0	0	k.
0	0	k.

Man sieht deutlich, wie die durch Serum bewirkte Aufhebung der Immuneserumabsorption durch das Kochen der Organe rückgängig wird. Nebenbei ist in diesem Versuche unter anderem ein Schafserum zur Verwendung gekommen, welches versagt hatte. Aus diesen Ermittlungen geht unzweideutig hervor, daß das Kochen von absorbierenden Organen zwar die Absorption anscheinend unverändert läßt, daß aber dadurch doch tiefgehende Veränderungen in den Organen hervorgebracht werden müssen.

Untersucht man, welchen Einfluß die einmal stattgefundene Behandlung eines Normalserums mit absorbierenden Organen auf dasselbe ausübt, so ergibt sich, daß eine Erschöpfung desselben nur schwer eintritt, d. h. ein Serum, das einmal eine Portion von Organ absorbierend gemacht hat, vermag noch ein zweitesmal eine frische Organmenge zu beeinflussen.

Tabelle XI.

Meerschweinchenlunge 1) mit 10 ccm NaCl-Lösung, 2) mit 10 ccm inakt. Schweineserum 1 Stunde bei 40° behandelt, der Satz zunächst stehen gelassen und erst später, gleichzeitig mit dem von No. 3 gewaschen, 3) mit dem Abgüsse von No. 2 behandelt (1 Stunde bei 40°), 4) mit 10 ccm inakt. Schweineserum 1 Stunde bei 40° behandelt, welches vorher mit dem Satz von 3 ccm Schafblut 1 Stunde bei 40° digeriert war. 5—7 sind ganz entsprechend mit inaktivem Rinderserum hergestellte Proben. Nach der Waschung aller Sätze wurden 2 ccm Immuneserumverdünnung 1:10 zugesetzt, nach 1-stündigem Aufenthalt bei 37° abzentrifugiert und die Abgüsse in den Dosen von 1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immuneser. 1	Immuneser. 2	Immuneser. 3	Immuneser. 4	Immuneser. 5
0	k.	f. k.	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.
0	k.	s. st.	k.	k.
0	k.	dtl.	f. k.	f. k.
		Immuneser. 6	Immuneser. 7	Kontrolle
		Sp.	dtl.	k.
		0	st.	k.
		0	dtl.	k.
		0	Sp.	k.
		0	Sp.	k.

Man sieht, wie das in inaktivem Zustande verwendete Schweineserum weder durch die vorhergehende Behandlung mit Meerschweinchenorgan noch durch die mit Schafblut be-

sonders alteriert ist. Hingegen hat das Rinderserum durch die gleiche Behandlung seine Aktionsfähigkeit entweder verloren oder sie ist doch vermindert. Bei Schweineserum wurde auch durch langandauernde Behandlung mit verhältnismäßig sehr großen Organmengen keine Abschwächung erzielt.

Tabelle XII.

Je 15 ccm inaktives Schweineserum wurden mit a) 5 ccm Schafblut, b) 1,2 g zerriebener Meerschweinchenniere 2 Stunden bei 37° behandelt und dann 16 Stunden kalt aufbewahrt, sodann gründlich zentrifugiert. Eine dritte Probe c) des inaktiven Serums bleibt als Kontrolle unbehandelt. Mit den Seren a—c wurde sodann je ein Teil Nierenemulsion vom Meerschweinchen (über deren Bereitungsweise s. später), und zwar mit je 10 ccm davon 1 Stunde bei 40° behandelt, die Sätze gewaschen und dann mit je 2 ccm Immunserumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° digeriert. Die abzentrifugierten Immunseren (1—3) sowie die Sera a—c wurden dann in den Dosen 1, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immunser. 1	Immunser. 2	Immunser. 3	Kontr.	Ser. a	Ser. b	Ser. c
f. k.	s. st.	k.	k.	0	0	k.
f. k.	st.	k.	k.	0	0	k.
dtl.	Sp.	f. k.	k.	0	0	k.
0	0	st.	k.	0	0	f. k.

Es handelt sich somit nur um eine Abschwächung, nicht um eine Aufhebung der die Organabsorption beseitigenden Wirkung des Schweineserums. Da das Rinderserum sich schwankend verhielt, konnte eine vollständige Ermittlung der herrschenden Gesetzmäßigkeit um so weniger erzielt werden, als in einigen Fällen Seren, die an sich schwach wirksam waren, durch vorhergehende Behandlung mit geringen Mengen von Meerschweinchenorganen und auch von Schafblut an Wirkung zunahmen, d. h. erst jetzt in stärkerem Grade die Absorption von Meerschweinchenorganen für Immunserum aufzuheben imstande waren. Es muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben, volle Klarheit zu erbringen. Soviel dürfte aber bereits sicher ermittelt sein, daß diese eigenartige Wirkung der Normalsera einiger Tiere nicht auf „Stoffen“ beruht, welche bei der Reaktion verbraucht werden.

Es mögen noch einige Versuche angeführt werden, bei denen eine etwas veränderte Technik angewendet wurde, die aber sehr viele Vorteile bot.

Als bindendes Organ wurde die Niere gewählt. Diese wurde zunächst fein zerschnitten und in einer Reibschale mit wenig Kochsalzlösung verrieben. Der Brei wurde sodann auf ein Drahtnetz gebracht und unter Aufgießen von NaCl-Lösung mit dem Pistill durch dasselbe gepreßt. Die Emulsion wurde einige Zeit in Eprouvetten stehen gelassen, wobei sich alle gröberen und auch mehr bindegewebehaltigen Partikel zu Boden setzen. Die obenstehende, durch Zelltrümmer, Zellen und Blutkörperchen stark trübe Flüssigkeit wurde abgegossen und durch frisch aufgegossene Kochsalzlösung ersetzt, in der der Bodensatz verteilt wurde. Das Verfahren wurde noch ein- bis zweimal wiederholt, bis die obere Flüssigkeit schon nach kurzer Zeit klar wurde. Statt jedesmal absitzen zu lassen, kann man das Verfahren durch kurzdauerndes Zentrifugieren bei geringer Tourenzahl beschleunigen. Auf diese Weise gelingt es, die sehr schwer abzentrifugierenden Teile der Organemulsionen und jedenfalls auch einen Teil des Organeiweißes zu beseitigen und erhält einen leicht zu behandelnden und dabei doch stark absorbierenden Satz.

Allem Anscheine nach wirkt die Niere, in dieser Weise gewonnen, doch nicht so intensiv absorbierend wie das bisher verwendete mehr oder weniger reine Bindegewebe und die absorptionsverhindernde Wirkung der entsprechenden Normalsera tritt sehr klar hervor.

Tabelle XIII.

Beide Nieren eines großen Meerschweinchens in der oben beschriebenen Weise zubereitet und in 10 Teilen zentrifugiert. Je ein Teil wird mit je 10 ccm 1) NaCl-Lösung, 2) akt. Menschenserum a, 3) akt. Menschenserum b, 4) akt. Kaninchenserum, 5) akt. Schweineserum, 6) akt. Rinder Serum, 7) akt. Schafserum, 8) akt. Pferdeserum, 9) akt. Katzenserum, 10) akt. Meerschweinchenserum (von 2 Tieren) 1 Stunde bei 40° behandelt, zentrifugiert, mit je 10 ccm NaCl-Lösung gewaschen und mit je 2 ccm Immunsersumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 40° gehalten. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten werden in den Dosen 1, 0,5, 0,25, 0,1 ccm gegen je 1 ccm 5-proz. Schafblut ausgewertet.

Immuns. 1	Immuns. 2	Immuns. 3	Immuns. 4	Immuns. 5	Immuns. 6
0	k.	k.	k.	k.	k.
0	k.	k.	f. k.	k.	k.
0	k.	s. st.	s. st.	k.	k.
0	k.	Sp.	Sp.	k.	f. k.

Immuns. 7	Immuns. 8	Immuns. 9	Immuns. 10	Kontrolle
k.	0	f. k.	0	k.
f. k.	0	st.	0	k.
st.	0	dtl.	0	k.
Sp.	0	0	0	k.

Von den verwendeten Normalseren hatten also die von **Mensch, Kaninchen, Schwein, Rind und Schaf** eine mehr oder weniger vollständige Aufhebung der Organabsorption herbeigeführt, während **Pferde- und Meerschweinchenserum** in dieser Hinsicht ganz unwirksam waren. Das Serum der Katze hatte ebenfalls, wenn auch nur in geringerem Grade, die Absorption beseitigt. Das war in hohem Grade auffallend, da nach den Ermittlungen Forssmans wie denen von Doerr und Pick die Katze zu denjenigen Tieren gehört, deren Organe sich so wie die des Meerschweinchens verhalten. Nach den bisherigen Versuchen mit Seren dieses Typus (Pferd und Meerschweinchen, die im Versuch der Tabelle XIII auch tatsächlich die Organabsorption nicht beeinflusst hatten) wäre eine Uebereinstimmung mit **Pferde- und Meerschweinchenserum** zu erwarten gewesen. Es war nun möglich, auch die Niere der Katze, welche dieses Serum geliefert hatte, allerdings nach ca. 16-stündiger Lagerung auf Eis zu untersuchen und ihre Wirkung mit der einer frischen **Meerschweinchenniere** zu vergleichen.

Tabelle XIV.

Niere von Katze (16 Stunden auf Eis gelegen) und zwei frische Nieren eines kleinen Meerschweinchens in der beschriebenen Weise zubereitet und in je 8 ccm NaCl-Lösung verteilt. Je 1 ccm dieser Aufschwemmung wird zentrifugiert und der Satz mit je 10 ccm 1) NaCl-Lösung, 2) akt. Schweine-, 3) Menschen-, 4) Kaninchen-, 5) Rinder-, 6) Katzen-, 7) Pferdeserum 1 Stunde bei 40° behandelt. (Die arabischen Zahlen beziehen sich auf die Proben mit Meerschweinchen-, die römischen auf die mit Katzenniere.) Nach Waschung mit je 10 ccm NaCl-Lösung wird jede Probe mit 2 ccm Immunsorumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 40° digeriert und die abzentrifugierte Flüssigkeit in den Dosen 1, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm gegen 1 ccm 5-proz. Schafblut austitriert.

Immunsorum 1	Immunsorum 2	Immunsorum 3	Immunsorum 4
0	k.	st.	k.
0	k.	k.	f. k.
0	k.	k.	f. k.
0	f. k.	Sp.	st.
Immunsorum 5	Immunsorum 6	Immunsorum 7	
k.	f. k.	Sp.	
k.	f. k.	0	
f. k.	dtl.	0	
dtl.	0	0	

Immuns. I	Immuns. II	Immuns. III	Immuns. IV	Immuns. V
0	k.	k.	k.	st.
0	k.	k.	k.	st.
0	k.	k.	k.	0
0	st.	st.	f. k.	0

Immuns. VI	Immuns. VII	Kontrolle
dtl.	0	k.
Sp.	0	k.
0	0	k.
0	0	k.

Es hatte die Niere der Katze also tatsächlich ein hohes Absorptionsvermögen gezeigt, welches ebenso wie das der Meerschweinchenniere durch die Normalsera mit Ausnahme des Pferdeserums alteriert werden kann. Aber das eigene Serum der Katze hatte nicht nur in Bestätigung des vorigen Versuches Meerschweinchen, sondern auch die eigenen Nieren in ihrer absorbierenden Wirkung beeinflusst. Es mußte daher ein neuer Versuch Entscheidung bringen, bei dem die quantitativen Verhältnisse nach Möglichkeit gleich gemacht wurden.

Tabelle XV.

Am Vorabend des Versuches wurden eine Katze und 3 Meerschweinchen verblutet. Die Nieren der Tiere wurden über Nacht auf Eis gehalten und am nächsten Morgen verarbeitet. Dabei wurden 4 Meerschweinchennieren genau gegen Katzeniere ausgewogen, in der gewöhnlichen Weise verarbeitet und in je 20 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Je 1 ccm der Emulsionen wurde zentrifugiert und mit je 10 ccm 1) NaCl-Lösung, 2) akt. Menschen-, 3) Schweine-, 4) Rinder-, 5) Pferde-, 6) Katzen-, 7) Meerschweinchenserum 1 Stunde bei 40° gehalten. (Die arabischen Zahlenbezeichnungen beziehen sich auf die Proben mit Meerschweinchen-, die römischen auf die mit Katzeniere.) Nach Waschung wurden die Sätze mit je 2 ccm Immunsersumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° digeriert und dann die Abgüsse in den Dosen 1, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm austitriert.

Immunsersum 1		Immunsersum 2		Immunsersum 3		Immunsersum 4	
1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.
0	0	dtl.	f. k.	st.	k.	st.	f. k.
0	0	Sp.	f. k.	st.	k.	st.	f. k.
0	0	0	st.	dtl.	f. k.	dtl.	f. k.
0	0	0	Sp.	0	dtl.	0	dtl.

Immunsersum 5		Immunsersum 6		Immunsersum 7	
1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Immunserum I		Immunserum II		Immunserum III		Immunserum IV	
1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.
Sp.	st.	st.	st.	k.	k.	f. k.	f. k.
0	dtl.	f. k.	f. k.	k.	k.	f. k.	f. k.
0	Sp.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	st.	f. k.
0	0	st.	f. k.	f. k.	f. k.	dtl.	dtl.

Immunserum V		Immunserum VI		Immunserum VII		Kontrolle	
1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.	1/2 Std.	2 Std.
0	0	dtl.	f. k.	0	0	k.	k.
0	0	Sp.	st.	0	0	k.	k.
0	0	0	Sp.	0	0	k.	k.
0	0	0	0	0	0	k.	k.

Es hat sich somit das Serum dieser Katze gegenüber Meerschweinchenorganen genau wie Pferde- und Meerschweinchen-serum verhalten und, der Voraussetzung entsprechend, das Absorptionsvermögen der Nierenemulsion nicht verändert. Aus dem Versuche geht aber weiter hervor, daß die Katzenorgane, bei Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse ganz deutlich schwächer binden, als die des Meerschweinchens. Daraus läßt sich mit Wahrscheinlichkeit der Schluß ziehen, daß die Scheidung der Tiere nach dem Absorptionsvermögen ihrer Organe für Schafbluthämolysine doch keine ganz strenge ist. Vermutlich dürfte als reinsten Vertreter des Meerschweinchentypus das Meerschweinchen selbst gelten, während die Katze in gewissen engen Grenzen sich dem Kaninchentypus nähert. Nach den Versuchen von Doerr und Pick scheint es, als ob die Maus in ihren Organen geradezu den Uebergang vom Meerschweinchen- zum Kaninchentypus (also mit scheinbar fehlendem Bindungsvermögen der Organe) bilden würde. Daß außer diesen artlichen Verschiedenheiten auch noch individuelle Vorkommen hat bereits D. Orudschiew beim Meerschweinchen bemerkt, was oben bestätigt werden konnte. Bei diesen Schwankungen nach Art und Individuum kann es sehr wohl vorkommen, daß gelegentlich auch das Serum eines Tieres vom Meerschweinchentypus etwas abweicht, also die Absorptionskraft von Meerschweinchenorganen alteriert, wie dies im Versuche der Tabelle XIII und XIV der Fall war, ebenso wie es, wenngleich bei richtiger Versuchsanordnung nicht mehr häufig, vorkam, daß ein Serum von Tieren des Kaninchentypus unwirksam war. Gerade solche Vorkommnisse weisen in der

Folge daraufhin, daß das Absorptionsvermögen der Organe keine essentielle Eigenschaft derselben darstellt.

Versuche mit vielen Seren müssen über diese Verhältnisse weiter Aufschluß geben. Leider war es nicht möglich, zur Zeit der Versuche Katzenserum in größerer Menge zu erhalten und auch Hundeserum stand nur eines zur Verfügung, das von einem großen Tiere stammte. Dasselbe verhielt sich ganz nach dem Meerschweinchentypus, ganz entsprechend dem Umstände, daß auch die Hundeorgane starke Absorptionskraft zeigen.

Tabelle XVI.

Beide Nieren eines größeren Meerschweinchens wurden in der gewöhnlichen Weise verarbeitet und in 12 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Je 1 ccm ergab nach Zentrifugieren je eine Organversuchsprobe, die mit je 10 ccm: 1) NaCl-Lösung, 2) aktivem Schweine-, 3) Rinder-, 4) Schaf-, 5) Kaninchen-, 6) Hunde-, 7) Pferde- und 8) Meerschweinchenserum je 1 Stunde bei 40° gehalten wurden. Nach Waschung mit 10 ccm NaCl-Lösung wurde jeder Satz mit 2 ccm Immunserumverdünnung 1:10 1 Stunde bei 37° gehalten und die abzentrifugierten Flüssigkeiten in den Dosen 1, 0,5, 0,25 und 0,1 untersucht.

Immunser. 1	Immunser. 2	Immunser. 3	Immunser. 4	Immunser. 5
0	k.	f. k.	s. st.	f. k.
0	k.	f. k.	f. k.	f. k.
0	k.	st.	dtl.	dtl.
0	k.	Sp.	0	0
Immunser. 6	Immunser. 7	Immunser. 8	Kontrolle.	
0	0	0	k.	
0	0	0	k.	
0	0	0	k.	
0	0	0	k.	

Wie ist nun diese Aufhebung der Absorptionsfähigkeit der Meerschweinchchen und (soweit untersucht) auch der Katzenorgane durch gewisse Normalseren zu deuten. Am nächsten lag es, an eine Absättigung der Organe durch Normalhämolyse zu denken, die z. B. dem Schweineserum, oft auch dem Rinder- und Kaninchenserum in recht hohem Grade zukommen. Es sind aber bereits oben Versuche mitgeteilt, in denen die nach der Organbehandlung abgegossenen Sera noch immer stark hämolytisch wirkten. Ein weiterer folge im Anschlusse an den der Tabelle XVI.

Tabelle XVII.

Die nach der Organbehandlung abgegossenen Seren des Versuchs in Tabelle XVI wurden gleichzeitig mit Proben der gleichen, unbehandelt gelassenen Seren $\frac{1}{4}$ Stunde bei 56° inaktiviert und in den Dosen 1, 0,5 und 0,1 cem ausgewertet.

Abguß von 2	Abguß von 3	Abguß von 4	Abguß von 5	Abguß von 6
k.	f. k.	0	f. k.	0
k.	st.	0	f. k.	0
k.	dtl.	0	dtl.	0
Abguß von 7	Abguß von 8	Schweineser.	Rinderser.	Schafser.
0	0	k.	k.	0
0	0	k.	f. k.	0
0	0	k.	dtl.	0
Kaninchenser.	Hundeser.	Pferdeser.	Meerschweinchenser.	
k.	0	0	0	
k.	0	0	0	
f. k.	0	0	0	

Es hat also eine wesentliche Absorption der Normalhämolytine nicht stattgefunden, höchstens bei Rinderserum ist in diesem, wie auch in anderen Versuchen etwas davon zu merken. Allerdings gelingt es auch, Normalhämolytine durch Behandlung mit den Organen gewisser Tiere unwirksam zu machen¹⁾, dazu sind aber im allgemeinen viel größere Organmengen erforderlich. Bei der gewählten Versuchsanordnung ist die Absorption viel zu gering, um die große Veränderung, die in den Organen erfolgt, zu erklären, wozu noch kommt, daß auch das Schafserum, das natürlich frei von Normalhämolytinen für die eigenen Blutkörperchen ist, in sehr vielen Fällen gleichsinnig wirkt, wie etwa Schweineserum und daß der direkte Versuch gelingt, die Absorptionskraft für Immunchämolytine auch mit Normalseren zu erzielen, die vorher ihrer Hämolytine durch Kontakt mit Schafblutkörperchen beraubt sind. Trotzdem diese Versuche absolut sicher gegen einen direkten Zusammenhang dieser merkwürdigen Eigenschaft der Normalsera mit ihrer hämolytischen Fähigkeit sprechen, ist das Vorhandensein eines mehr indirekten Zusammenhanges nicht ganz auszuschließen. Wenig-

1) Vgl. dazu Forssman, Bioch. Zeitschr., Bd. 37.

stens ist es auffallend, daß die Sera, welche in den Versuchen die Organabsorption unverändert ließen, gar kein hämolytisches Vermögen für Schafblut zeigten, während das Umgekehrte (vgl. das Verhalten des Schafserums) allerdings nicht galt.

Die Tatsache, daß ein einmal mit Organ behandeltes, z. B. Schweineserum, dadurch nicht die Fähigkeit verliert, ein zweitesmal wirksam zu sein, weist darauf hin, daß es sich bei den Versuchen nicht um einen Körper handelt, der von dem reagierenden Agens gebunden wird. Mindestens müßten dazu erst sehr große Mengen desselben verwendet werden.

So wenig klar aber auch der Mechanismus dieser eigenartigen Serumwirkung im Detail sein mag, sie ist doch imstande, das abweichende Verhalten der Organe verschiedener Tiere beim Absorptionsversuch mit schafhämolytischen, nicht spezifisch erzeugten Immunserum zu erklären. Denn alle angeführten Versuche beweisen, daß die Organverschiedenheit der beiden Tiertypen keine prinzipielle, schon in der Anlage des Tieres begründete ist. Wahrscheinlich ist, wie aus den Versuchen mit Nervensubstanz geschlossen werden darf, das eigentlich absorbierende Element in den Organen deren Bindegewebe und dieses hat an sich stets die gleichen serologischen Eigenschaften. Wenn dieselben im direkten Absorptionsversuche bei verschiedenen Tierarten voneinander abweichen, so liegt die Ursache in den Körpersäften dieser Tiere, deren große Unterschiede jederzeit leicht nachweisbar sind und die sich gewissermaßen auf die Gewebe übertragen. Soweit also bei Geweben eine Artbesonderheit hervortritt, beruht sie auf den Beziehungen, welche das Gewebe zu den Körperflüssigkeiten im lebenden Tiere hat.

Es wäre von Bedeutung, auch auf dem umgekehrten Wege, der hier eingeschlagen wurde, diese Gesetzmäßigkeit nachzuweisen. Während es sich bisher um die Beseitigung der den Organen gewisser Tiere anscheinend von vornherein zukommenden Absorption für Schafbluthämolysine handelte, wäre zu zeigen, daß man auch den an sich nicht absorbierenden Organen der Tiere vom Kaninchentypus diese Fähigkeit verleihen könne. Soweit bisher in dieser

Richtung Experimente angestellt wurden, stießen sie auf Schwierigkeiten.

Der nächstliegende Weg war der, Organe von Tieren des Kaninchentypus mit Serum von Tieren des Meerschweinchentypus zu behandeln.

Deshalb wurden Kaninchenorgane mit großen Mengen von Pferde- oder Meerschweinchenserum behandelt, das Serum durch Zentrifugieren und Waschen entfernt und untersucht, ob jetzt ein Bindungsvermögen für stark verdünntes Immunsorum eingetreten sei. Die Versuche mit Pferdeserum hatten kein sicheres Resultat; mit Meerschweinchenserum wurde hingegen ein solches insofern erreicht, als die behandelten Organe wenigstens eine deutliche Beeinflussung des Immunsorum herbeiführten, die sich namentlich an der sehr stark zeitlich verzögerten Hämolyse erkennen ließ; bei sehr langer Beobachtungsdauer glichen sich aber die Unterschiede gegen die Kontrollen mehr oder minder vollständig aus. Dagegen gelang es, mit Hundeserum einen vollen Erfolg zu erzielen.

Tabelle XVIII.

Eine Niere eines großen Kaninchens wurde in der in den früheren Versuchen angegebenen Weise unter 4 maligen Aufschwemmen in NaCl-Lösung verarbeitet, die Masse in zwei Teile geteilt, zentrifugiert und sodann a) mit 25 ccm akt. Rinder-, b) 25 ccm akt. Hundeserum (wie im Versuch der Tabelle XVI) durch 2 $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° behandelt. Nach Abzentrifugieren und Waschen wurde zu den Sätzen je 2 ccm einer Immunsorumverdünnung 1 : 20 zugesetzt, die Emulsionen 1 Stunde bei 37°, weitere 3 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten; diese lange Absorptionsdauer scheint notwendig für das Gelingen zu sein. Die schließlich abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden in den Dosen von 1, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm gegen 1 ccm 5% Schafblut ausgewertet.

Immunsorum a		Immunsorum b		Kontrolle	
$\frac{1}{2}$ Std.	2 Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	2 Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	2 Std.
k.	k.	0	Sp.	k.	k.
f. k.	k.	0	0	k.	k.
st.	k.	0	0	f. k.	k.
Sp.	f. k.	0	0	st.	k.

Die Möglichkeit des Gelingens dieser Versuche und damit des weiteren Beweises der obigen Schlußfolgerungen ist somit erbracht; es wird sich nur noch darum handeln, die genaueren Versuchsbedingungen scharf zu ermitteln.

Zusammenfassung.

In Bestätigung der Angaben früherer Autoren kann man durch Injektion von Meerschweinchenorganen (Bindegewebe) bei Kaninchen ein für Schafblut hämolytisches Serum erzeugen, dessen Lösungskraft durch Organe des Meerschweinchens, des Pferdes und der Katze beseitigt werden kann. Durch Behandlung von Meerschweinchenorganen mit dem Serum von Schwein, Rind, Kaninchen, Schaf gelingt es in allen oder einem Teile der Versuche diese Absorptionskraft der Meerschweinchenorgane für Schafbluthämolytine aufzuheben; das gelingt nicht oder doch nicht sicher und vollständig mit dem Serum von Meerschweinchen, Pferd, Katze und Hund.

Die absorptionsbeseitigende Wirkung der erwähnten Normalseras hängt direkt nicht von ihrem Gehalt an Normalhämolytinen ab und äußert sich nicht gegenüber gekochten Meerschweinchenorganen. Sie wird durch Behandlung mit den Organen nicht oder doch nur sehr schwer zerstört.

Der Unterschied in dem absorbierenden Verhalten der Organe verschiedener Tierarten (Meerschweinchentypus und Kaninchentypus) beruht nicht auf einer primären Anlage dieser Organe, sondern ist sekundär durch die Wechselwirkung mit den Körpersäften bedingt.

Literatur.

- Forssman, *Biochem. Zeitschr.*, 1911, Bd. 37.
— und Widen, *Ebenda*, Bd. 44.
Orudschiew, *Dschewad, Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 16, H. 3.
Doerr und Pick, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 50, H. 1—2.
Margulies, *Prager med. Wochenschr.*, 1913, No. 29.

Nachdruck verboten.

[Aus dem pathologisch-bakteriologischen Institut in der Mediz. Akademie zu Osaka, Japan; Direktor: Prof. A. Sata. (Abteilung für Bakteriologie, Leiter: Prof. Dr. Y. Fukuhara).]

Ueber die Bakteriengifte, insbesondere die Bakterienleibesgifte.

II. Mitteilung.

Immunisierender Effekt der verschiedenen Giftpräparate.

Von Prof. Y. Fukuhara und Dr. J. Ando.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Juni 1913.)

Wir haben in unserer früheren Arbeit (1) gezeigt, daß die Kälte- sowie Wärmebakterienextrakte viererlei Partialgifte enthalten. Es wurde noch aus den pathologisch-anatomischen und klinischen Verhältnissen nachgewiesen, daß kein Unterschied zwischen dem extracellulären und dem intracellulären Gifte der Typhusbacillen und dem einiger anderer Bakterien vorhanden ist. Die Frage, mit welchem Immunantigenprinzip der Bakterien das wirksamste Immunserum gegenüber der Bakterieninfektion zu gewinnen ist, ist seit dem Beginn der serotherapeutischen Studien vielfach Gegenstand der Erörterung gewesen.

Um über die immunisierende Fähigkeit irgendeiner Bakteriensubstanz in quantitativer Hinsicht zu einem Urteil zu gelangen, gibt es keinen anderen Weg, als die Feststellung der kleinsten Dosis, welche gerade noch imstande ist, einen Ictus immunisatorius auszulösen.

Diese Forderung hat R. Pfeiffer bereits im Jahre 1903 gestellt und auch in seiner kürzlichen Typhusarbeit in überzeugender Weise behandelt.

Wir untersuchten zunächst die immunisierende Wirkung von verschiedenen Präparaten von Typhusbacillen: Waschwassergifte, 60^o-Kochsalzextrakte und die entsprechenden Rückstände. Betreffs der Darstellungsweise der Giftpräparate wird auf die 1. Mitteilung in dieser Zeitschrift (1) hingewiesen.

Die quantitativen Verhältnisse wurden berücksichtigt. Die Versuchsanordnung erfolgte nach den Angaben der Pfeiffer-Bessauschen Arbeit (2).

1 Oese Typhuskultur wird in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wird scharf zentrifugiert (etwa 3 Stunden lang). Die klare obere Flüssigkeit = Waschwassergift. Der Bodensatz wird einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 10,0 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Diese Bodensatzaufschwemmung wird 2 Stunden bei 60° C oder 10 Minuten bei 100° C erhitzt und zentrifugiert. Die obere Flüssigkeit = 60°-Extrakt bzw. 100°-Extrakt.

Jedes Giftpräparat wird je 3 Kaninchen intravenös injiziert. Allen Tieren wird nach 8 Tagen eine größere Menge Blut entnommen. Die Sera werden karbolisiert. Je 5 ccm Serum der 3 Tiere von je einer Serie werden gemischt.

Es wird nun festgestellt, inwieweit diesen verschiedenen Antigenpräparaten der immunisierende Effekt des Ausgangsmaterials zukommt.

Versuch 1.

- Serie 1. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (60': 60° C) immunisiert.
- Serie 2. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (10': 100° C) immunisiert.
- Serie 3. Mit 60°-Extrakte von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
- Serie 4. Mit dem Rückstand von 3 immunisiert.
- Serie 5. Mit Waschwassergift von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
- Serie 7. Mit dem Rückstand von 5 immunisiert.

Agglutination der Sera 1, 2, 3, 4, 5 und 7 gegenüber dem Typhusstamm „Arima“.

	1	2	3	4	5	7
1:100	+	+	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+	+	+
1:400	+	+	+	+	+	±
1:600	+	+	±	0	+	±
1:800	0	±	±	0	±	0
1:1000	0	±	0	0	0	0
1:1600	0	0	0	0	0	0

Bestimmung der bakteriolytischen Titer der Sera 1, 2, 3, 4, 5 und 7.

Serum 1 (Vollbakterien 60': 60° C)	0,0025
„ 2 (Vollbakterien 10': 100° C)	0,0025
„ 3 (60°-Extrakt)	0,005
„ 4 (Rückstand von 3)	0,003
„ 5 (Washwasser)	0,05
„ 7 (Rückstand von 5)	0,0025

Das Waschwassergift von $\frac{1}{100}$ Oese besitzt also nur einen ganz geringen immunisatorischen Effekt, während der Rückstand stark wirksam gewesen ist. Das Serum, welches durch

Vorbehandlung der Tiere mit den auf 100° C erhitzten Vollbakterien von $\frac{1}{100}$ Oese gewonnen wurde, hatte einen Titer von 0,0025, hatte also die gleiche Wirksamkeit wie das mit dem auf 60° C erhitzten Bakterien gewonnene Serum.

Zusammenfassung. 1) Die bei 100° C abgetöteten Typhusbakterien zeigen eine nicht nennenswerte Abschwächung ihrer Lysinogene und ihrer Agglutinogene.

2) Das durch das Waschwassergift gewonnene Serum zeigt die geringste Wirksamkeit bezüglich der Bakterizidie in vivo.

3) Das Typhuswaschwassergift enthält mehr Agglutinogene als Lysinogene.

Um die thermischen Einflüsse auf die Antikörperbildung der obengenannten Antigenpräparate kennen zu lernen, haben wir folgende Versuche unternommen.

Versuch 2.

Die Vollbakterien und Waschwassergifte wurden 10 und 30 Minuten auf 100° C erhitzt. Immunisierungsanordnung erfolgte wie bei Versuch 1.

- Serie 8. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (60': 60° C) immunisiert.
 Serie 9. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (10': 100° C) immunisiert.
 Serie 10. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (30': 100° C) immunisiert.
 Serie 16. Mit Waschwassergift (60': 60° C) von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
 Serie 17. Mit Waschwassergift (10': 100° C) von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
 Serie 18. Mit Waschwassergift (30': 100° C) von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
 Serie 19. Mit dem Rückstand von 17.

Agglutination der Sera 8, 9, 10, 16, 17, 18 und 19.

	8	9	10	16	17	18	19
1:100	+	+	+	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+	±	±	+
1:400	+	±	±	+	0	0	±
1:600	±	0	0	0	0	0	0
1:800	±	0	0	0	0	0	0
1:1000	0	0	0	0	0	0	0

Bakteriolytische Titer der Sera 8, 9, 10, 16, 17, 18 und 19.

Serum 8. Vollbakterien (60': 60° C)	0,002
„ 9. Vollbakterien (10': 100° C)	0,002
„ 10. Vollbakterien (30': 100° C)	0,002
„ 16. Waschwassergift (60': 60° C)	0,025
„ 17. Waschwassergift (10': 100° C)	0,2
„ 18. Waschwassergift (30': 100° C)	0,2
„ 19. Rückstand	0,01

Die 30 Minuten lang gekochten Bakterien behalten also fast unverändert ihre Lysinogene, während die gekochten Waschwassergifte ihre Lysinogene größtenteils verlieren.

Was aber den Bindungswert in vivo betrifft, so läßt sich ein Unterschied zwischen dem 60°-Vollbakteriens Serum und dem 100°-Bakteriens Serum nachweisen (s. untenstehendes Versuchsbeispiel).

Versuch 3.

Serum (subkutan) und 5-fach letale Dosis der Typhusbacillen (intra-peritoneal) gleichzeitig, aber getrennt injiziert.

Serummenge	Resultat	Serummenge	Resultat
0,1 Serum 8	lebt	0,1 Serum 9	† ca. 30 ^b
0,5 dgl.	† ca. 23 ^b	0,5 dgl.	† ca. 30 ^b
1,0 „	† ca. 23 ^b	1,0 „	lebt
2,0 „	† ca. 14 ^b	2,0 „	„
4,0 „	lebt	4,0 „	„
	Serummenge		Resultat
	0,1 Serum 10		† ca. 13 ^b
	0,5 dgl.		† ca. 30 ^b
	1,0 „		† ca. 23 ^b
	2,0 „		† ca. 23 ^b
	3,0 „		† ca. 23 ^b
	4,0 „		† 14 ^b

Zusammenfassung. 1) Die 30 Minuten auf 100° C erhitzten Vollbakterien erfahren keine Schädigung ihrer Lysinogene, dagegen eine nicht beträchtliche Verminderung ihrer Agglutinogene.

2) Der Schutzwert des 60°-Bakteriens Serums bei gleichzeitiger, aber getrennter Injektion und des durch die 10 Minuten auf 100° C erhitzten Bakterien gewonnenen Serums ist aber höher als der des durch die 30 Minuten auf 100° C erhitzten Bakterien gewonnenen Serums.

3) Bei Erhitzung der Waschwasserextrakte werden die lysinogenen Gruppen bedeutend geschädigt, während dies bei den Vollbakterien nicht der Fall ist. Diese Unterschiede des Lysinbildungsvermögens beider Antigenpräparate sind nicht auf die Verschiedenheit beider Antigenarten zurückzuführen, sondern wahrscheinlich auf die Konzentration der Antigen-substanz im erhitzten Medium.

Nun haben wir die obigen Versuche auch mit einigen anderen Bakterienarten, nämlich mit Paratyphusbacillen und Cholerabacillen vorgenommen.

Versuch 4.

Paratyphusbacillen.

Die Versuchsordnung wie bei dem Typhusbacillenversuch.

- Serie 30. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (60': 60° C) immunisiert.
 Serie 31. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (10': 100° C) immunisiert.
 Serie 32. Mit Waschwassergift (60': 60° C) von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
 Serie 33. Mit dem Rückstand von 32 immunisiert.

Agglutination der Sera 30, 31, 32 und 33.

	30	31	32	33
1:100	+	+	±	+
1:200	+	+	0	+
1:400	±	0	0	+
1:600	0	0	0	0

Bakteriolytische Titer der Sera 30, 31, 32 und 33.

Serum 30	Vollbakterien (60': 60° C)	0,0006
„ 31	Vollbakterien (10': 100° C)	0,006
„ 32	Waschwasser (60': 60° C)	0,02
„ 33	Rückstand (60': 60° C)	0,001

Versuch 5.

Cholerabacillen.

- Serie 26. Mit Waschwassergift (60': 60° C) von $\frac{1}{100}$ Oese Bakterien immunisiert.
 Serie 27. Mit Rückstand (60': 60° C) von 26.
 Serie 28. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (60': 60° C) immunisiert.
 Serie 29. Mit $\frac{1}{100}$ Oese Vollbakterien (10': 100° C).

Agglutination der Sera 26, 27, 28 und 29.

	26	27	28	29
1:100	0	+	+	+
1:200	0	+	+	±
1:400	0	0	+	0
1:800	0	0	+	0
1:1600	0	0	0	0

Bakteriolytische Titer der Sera 26, 27, 28 und 29.

Serum 26	Waschwasser (60': 60° C)	0,075
„ 27	Rückstand	0,005
„ 28	Vollbakterien (60': 60° C)	0,0025
„ 29	Vollbakterien (10': 100° C)	0,005

Aus den obigen Versuchen geht hervor, daß:

- 1) das wirksamste bakteriolytische Serum bei den Typhus-, Cholera- und Paratyphusbacillen nur durch die Behandlung mit allen Bakterienbestandteilen, d. h. mit Vollbakterien zu erzeugen ist und

2) die 10—30 Minuten auf 100° C erhitzten Paratyphus- und Cholerabacillen eine Schädigung ihrer Lysinogene, dagegen eine nicht nennenswerte Verminderung ihrer Agglutinogene erfahren.

Pfeiffer und Bessau (3) haben nachgewiesen, daß die Endotoxinvergiftung nichts anderes darstellt als das Endresultat des Prozesses, welcher mit dem granulären Zerfall der Bakterien als erstem, mikroskopisch wahrnehmbarem Stadium beginnt. Das letzte bildet dann die weitere Spaltung der giftigen Endotoxine bis zur Entstehung ungiftiger Bruchstücke.

Wir können also zweierlei verschiedene Entgiftungsprinzipien unterscheiden: 1) bindende Entgiftung durch Antitoxine, 2) spaltende oder antiendotoxische Entgiftung durch lytische Antikörper. Doch kommen noch zweierlei Modi bei diesem Entgiftungsprozesse in Betracht. Bei der antitoxischen Entgiftung gilt das Gesetz der Multipla, während dies bei der spaltenden Entgiftung nicht der Fall ist.

Einige Autoren (4) wollen die Waschwassergifte der Typhusbacillen als Exotoxine verstehen und in bezug auf die Giftwirkung oder die Antikörperbildung die Exotoxine von den Endotoxinen absondern. Daß diese Annahme keinen genügenden Beweisgrund hat, haben wir in unserer früheren Arbeit (1) angedeutet.

Folgende Versuche stützen auch unsere Behauptung.

Versuch 6.

Entgiftende Wirkung des Waschwasserserums. Serum 16.

Titer: 0,025.

Bacillenemulsion und Serum wurden gemischt, das Gemisch auf 2,0 ccm aufgefüllt und ip. injiziert. Dosis letalis $\frac{1}{10}$ Oese.

Meerschweinchen	Bakterien	Serum	Resultat
1 (245 g)	1 Oese	0,025	lebt
2 (235 „)	2 Oesen	0,05	„
3 (240 „)	3 „	0,075	+ 40 ^h
4 (240 „)	3 „	0,1	+ 17 ^h
5 (235 „)	3 „	0,125	+ 17 ^h
6 (250 „)	3 „	0,15	lebt
7 (240 „)	3 „	0,225	+ 17 ^h
8 (230 „)	3 „	0,3	lebt
9 (240 „)	3 „	0,375	+ 12 ^h

So kommt Meerschweinchen 6 oder 8, welches 3 Oesen Bacillen und 0,15 oder 0,3 Serum erhalten hat, mit dem Leben davon, 7 oder 9 mit der gleichen Menge Bacillen und 0,225 oder 0,375 Serum stirbt akut. Also fehlt hier die Gültigkeit des Gesetzes der Multipla. Die vergleichenden Versuche mit Waschwasserserum (24 und 26) und Rückstandserum (27) zeigten auch die Ungültigkeit des Multiplagesetzes auf die Serumwirkung.

Versuch 7.

Typhuswaschwasserserum (24).

Titer: 0,0006.

Meerschweinchen	Bakterien	Serum	Resultat
1	2 Oesen	0,0012	†
2	2 "	0,006	lebt
3	3 "	0,0018	†
4	3 "	0,009	lebt
5	4 "	0,0024	†
6	4 "	0,012	†
7	4 "	0,048	†
8	4 "	0,072	†
9	5 "	0,003	†
10	5 "	0,015	†
11	5 "	0,09	lebt
12	5 "	0,75	"
13	5 "	1,0	"

Versuch 8.

Cholerawaschwasserserum (26).

Titer: 0,075.

Meerschweinchen	Bakterien	Serum	Resultat
1 (200 g)	1 Oese	0,075	lebt
2 (200 „)	2 Oesen	0,15	† 16 ^b
3 (200 „)	2 "	0,3	† 19 ^b
4 (230 „)	2 "	0,45	† 14 ^b
5 (230 „)	2 "	0,6	lebt
6 (230 „)	2 "	0,75	† 38 ^b
7 (205 „)	3 "	0,225	† 16 ^b
8 (200 „)	3 "	0,3	† 8 ^b
9 (210 „)	3 "	0,375	† 16 ^b
10 (195 „)	3 "	0,45	† 16 ^b
11 (195 „)	3 "	0,675	† 12 ^b
12 (190 „)	3 "	0,9	† 40 ^b
13 (220 „)	3 "	1,125	lebt
14 (230 „)	4 "	0,9	† 18 ^b
15 (235 „)	4 "	1,2	† 18 ^b
16 (235 „)	4 "	1,5	lebt

15*

Versuch 9.

Choleraschwachwasserrückstandserum (27).

Titer: 0,005.

Meerschweinchen	Bakterien	Serum	Resultat
1	1 Oese	0,005	lebt
2	2 Oesen	0,01	†
3	2 "	0,05	†
4	2 "	0,075	†
5	3 "	0,015	†
6	3 "	0,075	lebt
7	3 "	0,15	"
8	3 "	0,45	"
9	4 "	0,02	†
10	4 "	0,1	†
11	4 "	0,5	†
12	4 "	0,6	†

Die obigen Versuche wurden auch mit den abgetöteten Bakterienemulsionen angestellt. Die Versuche, welche der Kürze halber hier nicht angeführt wurden, zeigten fast analoge Resultate wie die mit den lebenden Bacillen.

Es wurden ferner abgestufte Quantitäten des Antiwaschwassergiftes mit der 5-fach letalen Waschwasserquantität gemischt, 30 Minuten bei 37° C gehalten und Kaninchen intravenös injiziert. Es zeigte sich, daß eine sogenannte bunte Reihe resultierte. Die Tiere mit den kleinsten Serumquantitäten starben, wie zu erwarten. Bei mittleren Serummengen wurde die Giftwirkung aufgehoben, bei noch größeren Serumdosen aber starben die Tiere wieder an akuter Vergiftung (siehe folgende Versuche).

Versuch 10.

1. Kaninchen, 2100 g, erhält 2,0 Antityphuswaschwasserziegenserum und 2,0 Waschwassergift. Das Tier stirbt nach 1½ Stunden.

2. Kaninchen, 1770 g, erhält 1,0 Serum und 2,0 Waschwasser. Das Tier stirbt nach 2 Stunden unter Diarrhöe.

3. Kaninchen, 2000 g, erhält 0,5 ccm Serum und 2,0 Waschwassergift. Diarrhöe nach 1½ Stunden. Erholung.

4. Kaninchen, 1880 g, erhält 2,0 Serum und 0,2 Waschwassergift. Diarrhöe nach 2 Stunden. Tot nach 40 Stunden.

Versuch 11.

1. Kaninchen, 1880 g, erhält 0,6 ccm Antityphuswaschwassergiftkaninchenerserum (24) und 2,0 Typhuswaschwassergift. Das Tier stirbt nach 15 Stunden.

2. **Kaninchen**, 2300 g, erhält 0,4 Serum und 2,0 Gift. Das Tier stirbt **nach** ca. 15 Stunden.

3. **Kaninchen**, 2100 g, erhält 0,2 Serum und 2,0 Gift. Das Tier bleibt **am** Leben.

4. **Kaninchen**, 1870 g, erhält 0,1 Serum und 2,0 Gift. Das Tier bleibt **am** Leben.

5. **Kaninchen**, 1880 g, erhält 0,01 Serum und 2,0 Gift. Das Tier stirbt **nach** 2 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Zusammenfassung. 1) Aus den obigen Versuchen mit **den** Antiwaschwassersera geht hervor, daß das durch **Waschwassergift** gewonnene Serum keine antitoxische Wirkung entfaltet.

2) Die giftwidrige Wirkung der Typhus- und Cholera-sera **sind** wesentlich auf eine spaltende Entgiftung zurückzuführen.

Die Entgiftungsversuche mit Typhusbouillonfiltratserum lehren **uns** auch eine unregelmäßige Serumwirkung auf Waschwassergift, **wie** die Versuche mit Waschwassergiftserum.

Schlusssätze.

Die Resultate im einzelnen finden sich neben jedem **Versuchs**protokoll zusammengefaßt.

Literatur.

- 1) **Fukuhara** und **Ando**, diese Zeitschr., Bd. 18.
- 2) **Pfeiffer** und **Bessau**, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 64, p. 172.
- 3) **Pfeiffer** und **Bessau**, ebenda Bd. 56.
- 4) **Z. B. Arima**, ebenda Bd. 65.

Nachdruck verboten.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Ueber die Wirkung kolloidaler Kieselsäure auf die roten Blutkörperchen.

Von Dr. **Ernst Nathan**,
Assistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Juli 1913.)

Die Untersuchungen, über die ich mir im folgenden zu berichten erlaube, betreffen die Hämolyse durch das Zusammenwirken von kolloidaler Kieselsäure und Blutserum, deren Kenntnis wir Landsteiner und Jagič¹⁾ verdanken. Landsteiner und Jagič hatten die interessante Tatsache festgestellt, daß die kolloidale Kieselsäure für sich allein rote Blutkörperchen nur zu agglutinieren vermag, aber im Verein mit frischem aktiven Blutserum oder Lecithin Hämolyse herbeiführt. Dabei bemerkten die Autoren die späterhin auch von v. Dungern und Coca²⁾ bestätigte Tatsache, daß eine mittlere Kieselsäurekonzentration die optimale Bedingung für die hämolytische Wirkung darstellt. v. Dungern und Coca beobachteten weiterhin, daß nicht nur bei Steigerung der Kieselsäuremenge, sondern auch bei Vermehrung des Blutserums der Grad der eingetretenen Hämolyse abnimmt. In diesem Punkt würde sich die Hämolyse durch Kieselsäure und Blutserum, wie v. Dungern und Coca ausführen, von der Ambozeptor-Komplementhämolyse unterscheiden, ohne daß hieraus freilich eine Schlußfolgerung auf die Differenz der bei der Kieselsäurehämolyse wirksamen Serumstoffe und der Komplemente zu ziehen wäre. Andererseits berichten v. Dungern und Coca, daß bei Bindungsversuchen mit einem Gemisch von Kaninchenblut, Kieselsäure und Kaninchen-

1) Landsteiner und Jagič, Wiener klin. Wochenschr., 1904, No. 3; Münchener med. Wochenschr., 1904, No. 27.

v. Dungern und Coca, Berliner klin. Wochenschr., 1908, p. 348.

serum in physiologischer $BaCl_2$ -Lösung weder die derart behandelten Blutkörperchen das wirksame Prinzip der Kieselsäure vollkommen gebunden haben, noch der Abguß seine Kieselsäure aktivierende Wirksamkeit in gleicher Stärke behalten hat. Die genannten Autoren folgern daher, daß die Kieselsäure nicht nur mit den Blutkörperchen, sondern auch mit Serumstoffen in Reaktion tritt und auf diese Weise auch die wirksamen Bestandteile des Serums ihrer Funktion zu berauben vermag.

Die Analogien, welche bereits auf Grund der erörterten Arbeiten zwischen Kieselsäure-Serum- und Ambozeptor-Komplementhämolysen zu bestehen scheinen, wurden neuerdings durch interessante Untersuchungen von Landsteiner und Rock¹⁾ nicht unerheblich erweitert. Nachdem schon früher Landsteiner und Jagič gezeigt hatten, daß das im Verein mit Kieselsäure hämolytisch wirkende Prinzip des Blutserums durch dieselben Einflüsse (Erwärmen, Behandeln mit Hefe und Bakterien, Salzhypertonie, Papainverdauung) beeinflußt wird, welche, wie wir wissen, zur Komplementinaktivierung führen (vgl. hierzu auch die Versuche von v. Dungern und Coca über den Einfluß der Salze), hat sich in neueren Untersuchungen von Landsteiner und Rock ergeben, daß die Inaktivierung des Blutserums bei der Kieselsäurehämolysen auch durch Aetherwirkung, sowie Cholesterinbehandlung gelingt, daß fernerhin bei der Fraktionierung des Blutserums in die Globulin- und Albuminfraktion eine gewisse, wenn auch nicht vollständige Spaltung des wirksamen Prinzips möglich ist, und daß endlich das System Kieselsäure-Blutserum das übliche hämolytische System bei den Komplementbindungsreaktionen, sowie der Wassermannschen Reaktion ersetzen kann. Wenn auch für die Komplementbindung bei Verwendung der Kieselsäurehämolysen als Indikator wegen der größeren Neigung zu unspezifischen Hemmungen das Ergebnis augenscheinlich von der besonderen Erprobung einer richtigen Versuchsanordnung abhängt, wie das auch mißlungene Versuche von Liebers²⁾ mit einer anderen Kombination zeigen, so wird man prinzipiell doch der von Landsteiner und Rock gezeigten Eignung

1) Landsteiner und Rock, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 14, 1912.

2) Liebers, Arch. f. Hygiene, Bd. 80, 1913.

des hämolytischen Kieselsäuresystems zur Demonstration von Komplementbindungsphänomenen eine besondere Beweiskraft in dem Sinne zuschreiben müssen, daß es sich bei der durch die Kieselsäure vermittelten Serumwirkung um Komplementfunktionen handelt. Dies entspricht auch den Schlußfolgerungen von Landsteiner und Rock, welche die die Kieselsäure aktivierenden Serumstoffe mit den Komplementen identifizieren und die Kieselsäure-Komplementhämolysen als den Ausdruck einer destruktiven Beeinflussung der kolloidalen Zellstruktur auffassen. Auch nach Liebers¹⁾, welcher in einer soeben erschienenen Arbeit die Tatsache der Hämolysen durch Kieselsäure und Blutserum gleichfalls bestätigt, besteht bei der Prüfung einer Reihe von verschiedenen Sera ein Parallelismus der komplettierenden Funktion gegenüber dem mit natürlichen Ambozeptoren und mit Kieselsäure beladenem Hammelblut.

Sprechen somit eine große Anzahl von Analogien dafür, daß bei der Hämolysen durch Kieselsäure und Serum in der Tat eine wirkliche Komplementreaktion vorliegt, so soll die Frage, ob die Kieselsäure in ihrer Wirkung auf die Blutkörperchen ein Analogon der Ambozeptorfunktion darstellt, an dieser Stelle nicht näher erörtert werden. Man könnte ja vielleicht an die Möglichkeit denken, daß die Kieselsäure tiefgreifende Änderungen des Rezeptorenapparates herbeiführt, indem sie etwa das spezifische Gepräge alteriert und dafür latente Aviditäten in Aktion treten läßt, welche sich auf normale und dann auch auf Iso- oder Autoambozeptoren erstrecken, eine allerdings lediglich hypothetische Annahme, die etwa der jüngst von Rosenthal²⁾ diskutierten Auffassung über die Ursachen des unspezifischen Bindungsvermögens osmierter Blutkörperchen entspricht. Wenn auch meine Versuche dieser Hypothese keine Beweiskraft zu geben gestatten, so sind sie doch vielleicht für die Kenntnis der Veränderungen, welche die Blutkörperchen durch die Kieselsäure erleiden, nicht ohne ein gewisses Interesse, und ich darf mir daher wohl erlauben, kurz über meine Erfahrungen, die zunächst eine vollständige Bestätigung des von Landsteiner und seinen Mitarbeitern analysierten Phänomens enthalten, zu berichten.

1) Liebers, l. c.

2) Rosenthal, Bioch. Zeitschr., Bd. 46, 1912.

I. Ueber Hämolyse durch Kieselsäure und Blutserum.

Eine gewisse Schwierigkeit für die Analyse der Kieselsäurehämolyse bedeutet nach den Angaben der verschiedenen Autoren augenscheinlich die differente Beschaffenheit der verschiedenen Lösungen von kolloidaler Kieselsäure. Insbesondere verhalten sich, wie auch Landsteiner und Rock ausführen, die durch Verseifung des Kieselsäure-Aethylesters nach Grimaux¹⁾ gewonnenen Präparate verschieden je nach der Beschaffenheit des als Ausgangsmaterial dienenden Esters, und zwar vermuten Landsteiner und Rock auf Grund ihrer experimentellen Erfahrung, daß eine allzu große Reinheit des Esters dem Entstehen wirksamer Kieselsäure ungünstig, andererseits eine geringe aus Verunreinigungen des Esters durch Beimengung von SiCl_4 resultierende Säuremenge für die Bildung von biologisch wirksamer Kieselsäure erforderlich ist. Tatsächlich konnten die genannten Autoren unbrauchbare reine Präparate durch Zusatz einer kleinen Menge von SiCl_4 für biologische Versuche geeignet machen.

Auch in meinen Versuchen, zu denen mehrere Präparate von Kieselsäure-Aethylester (Kahlbaum) dienten, erwiesen sich die durch 3-stündiges Kochen im Jenaer Kolben mit Rückflußkühler erhaltenen Lösungen (2 ccm Kieselsäure-Aethylester + 100 ccm Aqua destillata) von unregelmäßiger Wirkung. Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen, versuchte ich, ausgehend von der von Landsteiner und Rock erkannten Differenz in dem Gehalt an freier Säure in dem als Ausgangsmaterial dienenden Ester, die Darstellung derart zu modifizieren, daß gleichmäßige Lösungen erhalten wurden. Anstatt des von Landsteiner und Rock geübten Zusatzes von SiCl_4 benutzte ich daher zur Verseifung eine schwach saure Lösung und erhielt derart konstant wirksame Präparate. Demnach wurde zur Darstellung kolloidaler Kieselsäure folgendermaßen verfahren:

2 ccm des Kieselsäure-Aethylesters (Kahlbaum) wurden mit 100 ccm $\frac{1}{200}$ Normalsalzsäure durch 3-stündiges Kochen

1) Grimaux, Compt. rend. de l'Acad. des Sciences, T. 98, 1884.

in einem Kolben aus Jenaer Glas mit eingeschliffenem Rückflußkühler verseift, und die Lösung sodann filtriert. Da zu den Versuchen stets 5-fach verdünnte Lösungen herangezogen wurden, sah ich von einem Besalzen ab und stellte die für die Versuche dienenden Lösungen durch Verdünnen eines Teiles der auf die beschriebene Weise dargestellten Stammlösung mit 4 Teilen physiologischer Kochsalzlösung her.

Der geringe Salzsäuregehalt der derart erhaltenen Kieselsäurelösung ist ohne störenden Einfluß auf den hämolytischen Prozeß. Bei Neutralisation der Säure durch Alkali war sogar eine mehr oder weniger starke Abschwächung der hämolytischen Funktion zu bemerken, und ich habe daher zu den weiteren Versuchen die in der beschriebenen Weise hergestellten Lösungen benutzt. Andererseits gelingt es nicht, etwa durch nachträgliches Ansäuern des in neutralem Medium gekochten Esters wirksame Kieselsäure zu erhalten, wie das folgende Versuchsbeispiel zeigt:

Zu den in der Tabelle protokollierten hämolytischen Versuchen diente:

- a) Kieselsäurelösung, gewonnen durch Kochen von 2 ccm Ester in 100 ccm destilliertem Wasser.
- b) Lösung a + HCl (50 ccm Lösung a + 0,25 ccm n-HCl = $\frac{1}{200}$ n-HCl).
- c) Kieselsäurelösung, gewonnen durch Kochen von 2 ccm des Esters in $\frac{1}{200}$ n-HCl.

Zur Prüfung auf Hämolyse wurden absteigende Mengen der drei Kieselsäurepräparate unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum mit:

- A. 1,0 ccm Hammelblutaufschwemmung,
- B. 1,0 ccm Kaninchenblutaufschwemmung

2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigen die Tabellen I A und B.

Tabelle I A.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Meerschweinchenserum und Kieselsäurelösung		
	a	b	c
$\frac{1}{5}$ 1,0	w.	w.	0
0,5	Spürchen	Spürchen	k.
0,25	0	0	k.
0,15	0	0	k.
$\frac{1}{50}$ 1,0	0	0	k.
0,5	0	0	Sp.
0	0	0	0

Tabelle I B.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Kaninchenblut durch Meer- schweinchenserum und Kieselsäurelösung		
	a	b	c
$\frac{1}{8}$ 1,0	Spürchen	w.	w.
0,5	0	Spürchen	k.
0,25	0	0	k.
0,15	0	0	f. k.
$\frac{1}{60}$ 1,0	0	0	w.
0,5	0	0	Spürchen
0	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich durch Vergleich der Kolonnen a und c die markante Differenz, welche das Kochen des Esters bei saurer Reaktion bedingte. Die hämolytische Wirkung des unter Säurezusatz verseiften Präparates zeigt bereits, daß die derart gewonnenen Kieselsäurepräparate in Anbetracht der vorhandenen Literaturangaben als recht stark wirksam aufzufassen sein dürften.

Aus dem Vergleich der Kolonnen a und b der Tabelle ergibt sich andererseits, daß nachträgliches Ansäuern der Kieselsäurelösung ohne, resp. nur von geringgradigem Einfluß ist.

Ueber die Wirksamkeit der nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen kolloidalen Kieselsäure geben die folgenden Versuchsbeispiele Aufschluß.

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1 ccm einer 5-proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung unter Zusatz verschiedener Mengen frischen Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Die eingetretene Hämolyse zeigt die Tabelle II.

Tabelle II.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Kaninchenblut durch Kieselsäure und Meer- schweinchenserum in der Menge von				
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0
$\frac{1}{8}$ 1,0	0	0	0	0	0
0,5	k.	k.	0	0	0
0,25	k.	k.	k.	Sp.	0
0,15	k.	k.	k.	m.	0
$\frac{1}{60}$ 1,0	k.	k.	k.	k.	0
0,5	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	0
0,25	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1 ccm einer 5-proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung unter Zusatz verschiedener Mengen frischen Kaninchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle III.

Tabelle III.

Mengen der Kieselsäure	Hämolyse von Kaninchenblut durch Kieselsäure und Kaninchenserum in der Menge von			
	0,4	0,2	0,1	0
$\frac{1}{8}$ 1,0	m.	Sp.	0	0
0,5	k.	w.	w.	0
0,25	k.	f. k.	w.	0
0,15	k.	k.	Sp.	0
$\frac{1}{60}$ 1,0	f. k.	f. k.	Sp.	0
0,5	Sp.	Sp.	0	0
0,25	Spürchen	0	0	0
0	0	0	0	0

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1 ccm einer 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung unter Zusatz verschiedener Mengen frischen Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle IV.

Tabelle IV.

Mengen der Kieselsäure	Hämolyse von Hammelblut durch Kieselsäure und Meerschweinchenserum in der Menge von			
	0,1	0,05	0,025	0
$\frac{1}{8}$ 1,0	0	0	0	0
0,5	k.	Spürchen	0	0
0,25	k.	k.	k.	0
0,15	k.	k.	k.	0
$\frac{1}{60}$ 1,0	k.	k.	k.	0
0,5	m.	k.	k.	0
0,25	Sp.	m.	Sp.	0
0,15	Spürchen	Spürchen	Spürchen	0
0	0	0	0	0

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1 ccm einer 5-proz. Meerschweinchenblutkörperchenaufschwemmung unter Zusatz verschiedener Mengen frischen Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle V.

Tabelle V.

Mengen der Kieselsäure	Hämolyse von Meerschweinchenblut durch Kieselsäure und Meerschweinchenserum in der Menge von			
	0,1	0,05	0,025	0
¹ / ₅ 1,0	0	0	0	0
0,5	m.	Spürchen	0	0
0,25	f. k.	w.	Sp.	0
0,15	st.	m.	Sp.	0
¹ / ₅₀ 1,0	Sp.	w.	Sp.	0
0,5	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Die in den Tabellen zum Ausdruck gelangenden Ergebnisse bestätigen die in der Literatur vorliegenden Erfahrungen, insbesondere die Resultate von Landsteiner und Rock, und zeigen die bekannte Abhängigkeit des Maximums der hämolytischen Wirkung von der Relation zwischen Kieselsäure- und Serummenge.

Nachdem durch diese Versuche prinzipiell auch die von Landsteiner und Rock beschriebene Tatsache bestätigt war, daß die Kieselsäurehämolyse sogar bei Verwendung von Blutkörperchen und Serum gleicher Herkunft eintritt, benutzte ich zu den folgenden Versuchen vornehmlich die Kombinationen, welche sich an erster Stelle wirksam erwiesen hatten. Es sind dies die Kombinationen von Hammelblutkörperchen und Meerschweinchenserum, sowie von Kaninchenblutkörperchen und Meerschweinchenserum.

II. Ueber die Wirkung einiger Einflüsse auf die die Kieselsäure aktivierende Serumkomponente.

Nachdem die eingangs erwähnten früheren Untersuchungen bereits eine größere Anzahl von Analogien zwischen dem Verhalten der bei der Kieselsäurehämolyse mitwirkenden Serumkomponente und den bei der Ambozeptorhämolyse beteiligten Komplementen ergeben hatten, suchte ich noch einige weitere als Komplementinaktivierungsmethoden bekannte Verfahren zu der Analyse des im Verein mit Kieselsäure wirksamen Serumprinzips heranzuziehen.

Zunächst bediente ich mich des von Sachs und Teruuchi¹⁾ beschriebenen Prinzips der Inaktivierung im salzfreien Medium. Dabei wurde folgendermaßen verfahren.

3 ccm normales Meerschweinchenserum wurden

- a) mit 24,6 ccm Aq. dest.,
- b) mit 24,6 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung

1 $\frac{1}{4}$ Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert. Hierauf wurde Verdünnung a durch Zusatz von 2,4 ccm 10-proz. NaCl-Lösung zur Isotonie gebracht, während zu Lösung b 2,4 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung zugesetzt wurde.

Zur Prüfung auf Hämolyse werden je 0,25 ccm 4-fach konzentrierter Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit absteigenden Mengen Kieselsäurelösung unter Zusatz von

- a) 1 ccm des mit 0,85-proz. NaCl-Lösung,
- b) 1 ccm des mit Aq. dest.

behandelten Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle VI.

Tabelle VI.

Meerschweinchenserumverdünnung	Hämolyse von Hammelblut durch: a) NaCl-Meerschweinchenserum, b) Aq.-dest.-Meerschweinchenserum und Kieselsäure in der Menge von							
	$\frac{1}{6}$ 1,0	0,5	0,25	0,15	$\frac{1}{60}$ 1,0	0,5	0,25	0
a	Spchn.	k.	k.	k.	w.	Sp.	Spchn.	0
b	0	Spchn.	Sp.	Spchn.	0	0	0	0

Aus der vorstehenden Tabelle ergibt sich, daß in der Tat die bei der Kieselsäure wirksame Komponente durch Verdünnen im salzfreien Medium ebenso wie die die natürlichen Ambozeptoren aktivierenden Komplemente inaktiviert wird.

Ingleicher Weise ließ sich das Prinzip der Inaktivierung durch Cobragift [Flexner und Noguchi²⁾, Noc³⁾, Morgenroth und Kaya⁴⁾, H. Sachs⁵⁾, Braun⁶⁾, Omorokow⁷⁾,

1) Sachs und Teruuchi. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 16, 17, 19.

2) Flexner and Noguchi, The Journ. of exper. Med., Vol. 6, 1903.

3) F. Noc, Ann. Inst. Pasteur, T. 19, 1905.

4) J. Morgenroth und R. Kaya, Bioch. Zeitschr., Bd. 8, 1908.

5) H. Sachs, Münchener med. Wochenschr., 1908, No. 9.

6) H. Braun, Bioch. Zeitschr., Bd. 31, 1911.

7) Omorokow, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10, 1911.

H. Sachs und Omorokow¹⁾, Ritz²⁾] als auch für die Kieselsäurehämolyse gültig erweisen. Zur Demonstration der Cobragiftinaktivierung verfuhr ich nach den von Omorokow³⁾ angegebenen Vorschriften folgendermaßen:

Je 4,5 ccm aktiven Meerschweinchenserums werden:

- a) mit 1,8 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung
- b) mit 1,8 ccm 6-fach verdünnter 1-proz. Cobragiftlösung,

1 $\frac{1}{4}$ Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert und hierauf durch Zusatz von je 2,7 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung auf das halbe Volumen der ursprünglichen Meerschweinchenserummengemenge gebracht.

Zur Prüfung auf Hämolyse werden je 1,0 ccm Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung mit absteigenden Mengen Kieselsäurelösung unter Zusatz von:

- a) 0,2 ccm des $\frac{1}{2}$ -fach verdünnten Meerschweinchenserums,
- b) 0,2 ccm des $\frac{1}{2}$ -fach verdünnten Cobra-Meerschweinchenserums

2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle VII.

Tabelle VII.

Meerschweinchenserum	Hämolyse von Hammelblut durch: a) 0,2 ccm $\frac{1}{2}$ -fach verdünntes Meerschweinchenserum, b) 0,2 ccm $\frac{1}{2}$ -fach verdünntes Cobra-Meerschweinchenserum und Kieselsäurelösung in den Mengen									
	$\frac{1}{6}$	1,0	0,5	0,25	0,15	$\frac{1}{60}$	1,0	0,5	0,25	0
a	0	k.	k.	k.	Sp.	Spchn.	Spchn.	Spchn.	0	0
b	0	Sp.	w.	Sp.	Spchn.	0	0	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, ist die komplettierende Wirksamkeit des Meerschweinchenserums für die Kieselsäurehämolyse nach Einwirkung des Cobragifts erheblich reduziert, wenn auch nicht vollständig aufgehoben. Es sei aber noch bemerkt, daß auch bei der vergleichenden Prüfung des benutzten mit Cobragift behandelten Meerschweinchenserums gegenüber natürlichen Ambozeptoren die Inaktivierung keine ganz vollständige war. Jedenfalls bestätigen auch diese Versuche den engen Parallelismus, welcher in dem Verhalten des Komplements und des bei der Kieselsäurehämolyse interferierenden, im Serum enthaltenen Agens gegenüber den verschiedenartigen Einflüssen besteht.

1) H. Sachs und Omorokow, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911
 2) H. Ritz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 13, 1912.
 3) Omorokow, l. c.

III. Ueber das Verhalten der Kieselsäure bei der Bindung und über den Einfluß der Kieselsäure auf das Rezeptionsvermögen und die Empfindlichkeit der Blutkörperchen.

Bei der Analyse der Beziehungen zwischen Kieselsäure und Blutkörperchen, die vom Gesichtspunkt der Ambozeptorbindung aus unternommen wurde, ergaben sich regelmäßige Differenzen zwischen dem Verhalten des Kaninchenblutes und des Hammelblutes. Bevor ich auf die Diskussion dieser Resultate eingehe, lasse ich die tabellarische Uebersicht zweier Versuchsbeispiele unter Verwendung von Kaninchenblut und Hammelblut folgen.

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1,0 ccm 5-proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung 1 Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert. Sodann wird zentrifugiert:

- a) Die Abgüsse werden mit je 0,25 ccm 4-fach konzentrierten Kaninchenbluts unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum digeriert.
- b) Die Sedimente werden in 1,75 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum aufgenommen.
- c) In einer Kontrollreihe werden direkt absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure mit je 1,0 ccm Kaninchenblut unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum digeriert.

Das Ergebnis nach 2-stündiger Digestion bei 37° zeigt die Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Kaninchenblut durch Meerschweinchenserum und absteigende Mengen Kieselsäure; letztere		
	a in den Abgüssen	b in den Sedimenten	c nativ
$\frac{1}{5}$ 1,0	k.	k.	0
0,5	m.	k.	k.
0,25	0	k.	k.
0,15	0	k.	k.
$\frac{1}{50}$ 1,0	0	k.	k.
0,5	0	w.	w.
0,25	0	Spürchen	Spürchen
0,15	0	0	0
0	0	0	0

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1,0 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung 1 Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert. Sodann wird zentrifugiert:

- a) Die Abgüsse werden mit je 0,25 ccm 4-fach konzentrierten Hammelbluts unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum digeriert.

Wirkung kolloidaler Kieselsäure auf die roten Blutkörperchen. 227

b) Die Sedimente werden in 1,75 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum aufgenommen.

c) In einer Kontrollreihe werden direkt absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure mit je 1,0 ccm Hammelblut unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum digeriert.

Das Ergebnis nach 2-stündiger Digestion bei 37° zeigt die Tabelle IX.

Tabelle IX.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Meerschweinchenserum und Kieselsäure; letztere		
	a in den Abgüssen	b in den Sedimenten	c nativ
$\frac{1}{5}$ 1,0	m.	Spürchen	0
0,5	w.	f. k.	w.
0,25	0	m.	k.
0,15	0	Sp.	k.
$\frac{1}{50}$ 1,0	0	Spürchen	w.
0,5	0	Spürchen	Sp.
0,25	0	Spürchen	Spürchen
0	0	0	0

Die erste Tabelle (VIII, Bindungsversuche mit Kaninchenblut) hat nichts besonders Auffälliges. Das wirksame Prinzip der Kieselsäure ist aus dem Abguß so gut wie vollständig verschwunden, dagegen sind die Sedimente durch die Einwirkung der Kieselsäure dem Serum gegenüber empfindlich geworden. Wenn sie dies nach Einwirkung größerer Kieselsäuredosen in höherem Maße sind, als bei gleichzeitigem Mischen von Blut, Kieselsäure und Serum, so dürfte das durch die bereits von v. Dungern und Coca hervorgehobene Annahme eine hinreichende Erklärung finden, daß die Kieselsäure auch mit dem Serum, und zwar in einem der Hämolyse entgegengesetzten Sinn reagiert.

Anders liegen die Verhältnisse, wie die zweite Tabelle (IX) zeigt, beim Bindungsversuch mit Hammelblut. Zwar hat die Kieselsäure auch hier durch Vorbehandeln mit Blut ihre lytischen Funktionen fast vollständig eingebüßt (Kolonne a), jedoch erweisen sich die mit Kieselsäure vorbehandelten Hammelblutkörperchen (Kolonne b) nicht entfernt in dem Maße der Serumwirkung gegenüber empfindlich, wie man es nach den Erfahrungen bei der Bindung natürlicher Ambo-

zeptoren erwarten sollte. Es ähneln also diese von mir unter Verwendung von Hammelblut erhobenen Befunde formal denjenigen von v. Dungern und Coca bei Fraktionierung des Gemisches von Kaninchenblut, Kieselsäure und Kaninchenserum in physiologischer $BaCl_2$ -Lösung beschriebenen Verhältnissen. Die Kieselsäure ist also nach der Vorbehandlung des Hammelbluts scheinbar verschwunden, denn sie ist weder im Abguß vorhanden, noch auch nur annähernd in dem zahlenmäßig zu erwartenden Grade im Blutkörperchensediment nachweisbar.

Da man schwerlich annehmen kann, daß die Kieselsäure bei der Bindung an Hammelblut etwa in zwei an und für sich unwirksame Komponenten gespalten wird, mußte man erwarten, daß die Kieselsäure auf die Hammelblutkörperchen derart einwirkt, daß dieselben ihre bei gleichzeitigem Zusatz von Serum vorhandene Empfindlichkeit gegenüber der hämolytischen Kraft allmählich verlieren und einen erheblichen Grad von Resistenz gewinnen. Tatsächlich hat sich gezeigt, daß bei Serumzusatz nach dem Digerieren von Hammelblut mit Kieselsäure allein auch ohne vorhergehendes Zentrifugieren die Empfindlichkeit der Blutkörperchen der lytischen Funktion der Kieselsäure gegenüber mehr oder weniger reduziert ist, und überraschend war immerhin dabei die kurze Zeit der Kieselsäureeinwirkung, welches dieses Phänomen bereits demonstrierbar macht¹⁾ (vgl. das folgende Versuchsbeispiel).

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1,0 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung in 7 parallelen Reihen:

- a) 0 Minuten,
- b) 5 „
- c) 10 „
- d) 20 „
- e) 30 „
- f) 1 Stunde,
- g) 2 Stunden

vor dem Komplementzusatz bei 37° digeriert. Hierauf wird in jeder Reihe je 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugefügt und die betreffenden

1) Durch besondere Kontrollversuche wurde festgestellt, daß die Kieselsäure allein in der gleichen Versuchsanordnung und der gleichen Zeit keine Einbuße an ihrer lytischen Kraft erlitt.

Wirkung kolloidaler Kieselsäure auf die roten Blutkörperchen. 229

Reihen 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle X.

Tabelle X.

Mengen der Kieselsäure ccm	Hämolyse von Hammelblut durch absteigende Mengen Kieselsäure und Meerschweinchenserum; letzteres zugesetzt nach						
	0 Min.	5 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.
$\frac{1}{5}$ 1,0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	k.	m.	m.	m.	m.	m.	m.
0,25	k.	k.	k.	k.	st.	st.	m.
0,15	k.	f. k.	m.	m.	m.	Sp.	Spürchen
$\frac{1}{50}$ 1,0	k.	m.	m.	Spürchen	Spürchen	0	0
0,5	Sp.	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, ist in dem vorstehend wiedergegebenen Versuchsbeispiel bereits nach 5 Minuten langer Einwirkung der Kieselsäure vor dem Serumzusatz die hämolytische Wirkung erheblich reduziert, und nach 30 Minuten langem Intervall ist eine komplette Hämolyse überhaupt nicht mehr eingetreten. Hierdurch findet der beim Bindungsversuch nachweisbare Verlust der Wirkung eine hinreichende Erklärung. Dementsprechend war auf Grund des Verhaltens der Kieselsäure beim Bindungsversuch mit Kaninchenblut zu erwarten, daß bei der gleichen Versuchsanordnung auch ohne Zentrifugieren diese Blutart sich umgekehrt verhalten würde wie Hammelblut. Wie das folgende Versuchsbeispiel zeigt, entspricht das Experiment dieser Deduktion.

Absteigende Mengen 2-proz. Kieselsäure werden mit je 1 ccm 5-proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung in 7 parallelen Reihen:

- a) 0 Minuten,
- b) 5 „
- c) 10 „
- d) 20 „
- e) 30 „
- f) 1 Stunde,
- g) 2 Stunden

vor dem Komplementserumzusatz bei 37° digeriert. Hierauf wird in jeder Reihe je 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugefügt und die betreffenden Reihen 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Resultat zeigt die Tabelle XI.

Tabelle XI.

Mengen d. Kiesel- säure ccm	Hämolyse von Kaninchenblut durch absteigende Mengen Kiesel- säure und Meerschweinchenserum, letzteres zugesetzt nach						
	0 Min.	5 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.	1 Stunde	2 Stund.
$\frac{1}{5}$ 1,0	0	Sp.	0	0	0	0	0
	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	0,5	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	0,25	k.	k.	k.	k.	k.	k.
$\frac{1}{50}$ 1,0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	0,5	m.	f. k.	m.	m.	m.	w.
	0,25	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
	0	0	0	0	0	0	0

Auch hierbei zeigt sich, ebenso wie es im Bindungsversuch der Fall war, der Grad der Hämolyse beim Digerieren von Kieselsäure und Blut vor dem Serumzusatz etwas gesteigert, während in anderen Versuchen die Steigerung noch weit ausgesprochener war.

Worauf das verschiedene Verhalten des Kaninchenblutes und des Hammelblutes beruht, möchte ich dahingestellt sein lassen. Ebenso kann ich die Frage, ob die durch die Kieselsäurebehandlung erfolgende verminderte Empfindlichkeit gegenüber der Serumhämolyse nur eine Teilerscheinung einer allgemeinen Resistenzsteigerung ist, vorläufig nicht beantworten. Erwähnen möchte ich aber jedenfalls, daß durch Vorbehandeln von Hammelblutkörperchen mit Kieselsäure auch eine gewisse Steigerung der Resistenz gegenüber Saponin eintritt, wie es das folgende Versuchsbeispiel zeigt.

Zu den Versuchen dienten Hammelblutaufschwemmungen, welche mit gleichen Teilen von

- a) 5-fach verdünnter 2-proz. Kieselsäure,
- b) 10-fach " " "
- c) 20-fach " " "
- d) 50-fach " " "
- e) 100-fach " " "
- f) (Kontrolle) 0,85-proz. NaCl-Lösung

1 Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert waren. Nach dem Abzentrifugieren werden die Blutsedimente mit physiologischer Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Zur Anstellung des hämolytischen Versuches werden je 1 ccm der derart erhaltenen Blutaufschwemmungen in 6 Parallelreihen mit absteigenden Mengen Saponinlösung im Brutschrank bei 37° digeriert. Der Grad der

Wirkung kolloidaler Kieselsäure auf die roten Blutkörperchen. 231

Hämolyse wird nach 20 Minuten und 2 Stunden abgelesen. Das Ergebnis zeigt die Tabelle XII.

Tabelle XII.

Mengen d. verdünnt. Saponin- lösung	Ergebnis nach 20 Minuten						Ergebnis nach 2 Stunden					
	Saponinhämolyse v. Hammel- blut, digeriert mit Kieselsäure in den Konzentrationen						Saponinhämolyse von Hammelblut, digeriert mit Kieselsäure in den Konzentrationen					
	a	b	c	d	e	f	a	b	c	d	e	f
ccm	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	0	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	0
0,1	0	0	st.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,05	0	0	w.	m.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,025	0	0	0	w.	w.	w.	w.	k.	k.	k.	k.	k.
0,015	0	0	0	0	Sp.	Sp.	Spchn.	m.	st.	f. k.	k.	k.
0,01	0	0	0	0	0	0	Spchn.	w.	w.	m.	m.	m.
0,005	0	0	0	0	0	0	Spchn.	Spchn.	Spchn.	Sp.	w.	w.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nachdem derart festgestellt war, daß die Behandlung der Blutkörperchen mit Kieselsäure mehr oder weniger tiefgreifende Veränderungen in ihrem biologischen Verhalten erzeugt, mußte die Frage von besonderem Interesse erscheinen, ob die Hammelblutkörperchen durch die Beladung mit Kieselsäure auch eine nachweisbare Alteration ihres spezifischen Rezeptionsvermögens erfahren. Tatsächlich erwiesen sich die mit Kieselsäure behandelten und, wie bereits erwähnt, der einfachen Serumwirkung gegenüber resistent gewordenen Hammelblutkörperchen auch gegenüber der Hämolyse durch natürlichen Ambozeptor und Komplement in erheblichem Maße unempfindlich, wie folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Zu den Versuchen dienten Hammelblutkörperchenaufschwemmungen, welche mit gleichen Teilen von

- a) 5-fach verdünnter 2-proz. Kieselsäure,
- b) 10-fach " " "
- c) 20-fach " " "
- d) 50-fach " " "
- e) 100-fach " " "
- f) (Kontrolle) 0,85-proz. NaCl-Lösung

1 Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert waren. Nach dem Abzentrifugieren werden die Blutsedimente mit physiologischer Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Zur Anstellung des hämolytischen Versuches werden in 6 parallelen Reihen je 1 ccm der derart erhaltenen Blutaufschwemmungen mit ab-

steigenden Mengen eines inaktivierten hämolytischen Immunsersums und je 0,1 ccm normalen Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Das Ergebnis zeigt die Tabelle XIII.

Tabelle XIII.

Mengen des Immunsersums ccm	Hämolytische Wirkung von Immunsersum und Meerschweinchenserum auf Hammelblut, letzteres vorbehandelt mit Kieselsäure in den Konzentrationen					
	a $\frac{1}{5}$	b $\frac{1}{10}$	c $\frac{1}{20}$	d $\frac{1}{50}$	e $\frac{1}{100}$	f 0
0,01	0	Sp.	k.	k.	k.	k.
0,005	0	Spürchen	k.	k.	k.	k.
0,0025	0	0	f. k.	k.	k.	k.
0,0015	0	0	m.	k.	k.	k.
0,001	0	0	w.	k.	k.	k.
0,0005	0	0	0	m.	k.	k.
0,00025	0	0	0	w.	f. k.	m.
0,00015	0	0	0	Spürchen	m.	w.
0	0	0	0	0	st.	0

Wie die Tabelle zeigt, nimmt mit der Konzentration der zur Vorbehandlung der Blutkörperchen benutzten Kieselsäurelösung die Empfindlichkeit der Blutkörperchen gegenüber der hämolytischen Wirkung des Immunsersums sukzessive ab, um bei Vorbehandlung mit nur 5-fach verdünnter Kieselsäure selbst gegenüber dem 20-fachen Multiplum der Ambozeptor-einheit erloschen zu sein.

Besonderer Beachtung wert dürfte dabei der Umstand erscheinen, daß parallel mit der Abnahme der Empfindlichkeit auch das Ambozeptorbindungsvermögen der mit Kieselsäure behandelten Blutkörperchen sukzessive schwindet, wofür folgendes Versuchsbeispiel angeführt sei.

Zu den Versuchen dienten Hammelblutkörperchenaufschwemmungen, die in der im vorigen Versuch beschriebenen Weise mit Kieselsäure in verschiedener Konzentration vorbehandelt waren.

Zur Anstellung des Bindungsversuches werden in 6 parallelen Reihen je 1 ccm der derart erhaltenen Blutaufschwemmungen mit absteigenden Mengen eines hämolytischen Immunsersums 1 Stunde im Brutschrank bei 37° digeriert. Sodann wird zentrifugiert, und die Abgüsse werden mit 0,25 ccm 4-fach konzentrierten Hammelblutes unter Zusatz von 0,1 ccm normalen Meerschweinchenserums 2 Stunden im Brutschrank digeriert. In einer Kontrollreihe wird direkt je 1 ccm Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit absteigenden Mengen Immunsersum unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchenserum digeriert. Das Resultat zeigt Tabelle XIV

Tabelle XIV.

Mengen des Immuns- serums	Hämolyse von Hammelblut durch Meerschweinchenserum und Immunsersum, letzteres							
	nach vorangegangener Digestion mit Hammelblut						f normalem Hammel- blut	nativ (Kontr.)
	mit Kieselsäure vorbehandelt in den Konzentrationen					e		
	a	b	c	d	e			
ccm	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$			
0,01	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
0,005	k.	k.	k.	k.	k.	m.	k.	
0,0025	k.	k.	k.	k.	w.	Sp.	k.	
0,0015	k.	k.	k.	w.	Sp.	0	k.	
0,001	m.	w.	Sp.	Sp.	Spürch.	0	k.	
0,0005	m.	Sp.	Spürch.	Spürch.	0	0	k.	
0,00025	Sp.	0	0	0	0	0	w.	
0	0	0	0	0	0	0	0	

Wie die Tabelle zeigt, sind bei einem hinreichenden Grad der Kieselsäurebeladung die Blutkörperchen so verändert, daß selbst bei Vorlage der Ambozeptoreinheit nur ein Bruchteil des wirksamen Ambozeptorprinzips gebunden erscheint. Die Verhältnisse erinnern also an diejenigen, welche v. Szily¹⁾ bei der Behandlung von Blutkörperchen mit Osmiumsäure beobachtet hat, nur mit dem Unterschiede, daß in diesem Falle der Schwund des spezifischen Ambozeptorbindungsvermögens mit dem Hervortreten einer neuen, der originären Spezifität entbehrenden Antiambozeptorwirkung vergesellschaftet ist. Möglicherweise ist der Umstand, daß auch bei starker Kieselsäurebeladung immerhin geringgradige Ambozeptormengen entzogen werden, gleichfalls auf eine Interferenz unspezifischer Adsorptionserscheinungen zurückzuführen. Um die Erwerbung eines wesentlichen unspezifischen Bindungsvermögens durch die Kieselsäurebehandlung kann es sich jedoch dabei, wie besondere Versuche gezeigt haben, nicht handeln.

Erwähnt sei noch, daß die derart erkannte Veränderung des Rezeptionsvermögens der roten Blutkörperchen schon nach recht kurzer Zeit der Kieselsäureeinwirkung demonstrabel ist. So gelang es bereits bei 5 Minuten langem Digerieren von Kieselsäure und Hammelblut und folgendem, möglichst raschem Zentrifugieren einen erheblichen Grad der Unempfindlichkeit

1) A. v. Szily, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909.

und des Mangels an Ambozeptorbindungsvermögen zu konstatieren. Es besteht also jedenfalls für das Hammelblut ein enger Parallelismus zwischen den Einflüssen, welche die Kieselsäure einerseits auf die Ambozeptor-Komplementhämolyse, andererseits auf die durch sie selbst vermittelte Serumhämolyse ausübt. Inwieweit dieses konforme Verhalten zur Deutung der besprochenen Erscheinungen herangezogen werden kann und darf, darüber wird erst eine nähere Analyse ein Urteil zu gewinnen erlauben.

Zusammenfassung.

1) Durch Kochen von Kieselsäure-Aethylester in $\frac{1}{200}$ -Normalsalzsäure gelingt es regelmäßig, kolloidale Kieselsäurelösungen zu erhalten, welche im Verein mit Serum konstant starke hämolytische Wirkungen entfalten.

2) Im Sinne der Beteiligung von Komplementen bei der Hämolyse durch Kieselsäure und Blutserum ergeben sich als weitere Argumente die Inaktivierung des wirksamen Prinzips der Serumkomponente durch Verdünnen im salzfreien Medium, sowie durch Behandeln mit Cobragift.

3) Bei der Behandlung von Kaninchenblutkörperchen mit Kieselsäure ist das wirksame Prinzip quantitativ im Blut-sediment vorhanden. Im Gegensatz dazu ist beim Beladen von Hammelblut mit Kieselsäure ein mehr oder weniger großer Verlust der lytischen Funktion zu bemerken.

4) Bei vorherigem Digerieren von Hammelblutkörperchen mit Kieselsäure und erst später erfolgendem Serumzusatz ist die hämolytische Wirkung geringer, als bei gleichzeitigem Mischen aller drei Komponenten. Beim Kaninchenblut besteht in dieser Hinsicht keine wesentliche Differenz.

5) Die Behandlung von Hammelblutkörperchen mit Kieselsäure führt zu einer Resistenzsteigerung gegenüber der Saponinhämolyse.

6) Die Behandlung von Hammelblutkörperchen mit Kieselsäure führt zu einer erheblichen Unempfindlichkeit gegenüber der Ambozeptor-Komplementhämolyse und setzt das Ambozeptorbindungsvermögen der Blutkörperchen unter geeigneten Bedingungen in hohem Maße herab.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XIX. No. 3.

Nachdruck verboten.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)].

Immunisierungsversuche mit gekochtem Hammelblut, nebst Bemerkungen über Antiserumanaphylaxie.

Von **H. Sachs** und **E. Nathan**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Juli 1913.)

Durch die interessanten Feststellungen **Forssmans**¹⁾, nach denen es gelingt, durch Vorbehandeln von Kaninchen mit den Organen des Meerschweinchens und gewisser anderer Tierarten Hammelbluthämolyse — oft in erheblicher Stärke — zu erzeugen, sind wir mit dem Bestehen von Formen hochgradiger Rezeptorengemeinschaft bei entfernten Tierarten bekannt geworden, wie man sie auf Grund des früher vorhandenen Tatsachenmaterials nicht vermuten konnte. Die von **Forssman** entdeckten wichtigen Tatsachen sind von **Orudschiew**²⁾ in einer aus dem hiesigen Laboratorium hervorgegangenen Arbeit vollkommen bestätigt und zunächst dahin erweitert worden, daß die durch Meerschweinchenorgan-Immunisierung gewonnenen Antisera außer auf Hammelblut auch auf Ziegenblut wirken, während Rinderblutkörperchen, wie das bereits **Forssman** angegeben hatte, durch dieselben nicht gelöst werden. Durch das Fehlen der hämolytischen Wirkung auf Rinderblut unterscheiden sich die Meerschweinchenorgan-Antisera von Hammelblutimmunsera (**Forssman**), entsprechen aber in dieser Hinsicht den durch Immunisierung mit Widderspermatozoen von **Rosenthal**³⁾ gewonnenen Immunseris. Daß es sich nun in der Tat bei diesen bedeutungs-

1) **J. Forssman**, *Bioch. Zeitschr.*, Bd. 37, 1911, p. 78.

2) **D. Orudschiew**, *Diese Zeitschr.*, Bd. 16, 1913, p. 268.

3) **F. Rosenthal**, *Bioch. Zeitschr.*, Bd. 43, 1912, p. 7.

vollen Ergebnissen um den Ausdruck einer Rezeptorengemeinschaft im Sinne der Rezeptorenlehre Ehrlichs handelt, zeigten die schon erwähnten Untersuchungen von Orudschiew. Es entsprach nämlich dem Immunisierungsvermögen der Meerschweinchenorganzellen in befriedigender Weise ihre Bindungsfähigkeit gegenüber den entsprechenden Ambozeptoren, ein Parallelismus, der sich nicht nur auf das bereits von Forssman festgestellte Verhalten der Nierenzellen erstreckte, sondern auch die Leberzellen, deren Bindungsfähigkeit Forssman oft vermißt hatte, in gesetzmäßiger Weise betraf. Dabei konnte durch eine große Reihe von Kontrollversuchen festgestellt werden, daß auch die Bindung der Hammelblutambozeptoren an die Organzellen ebenso wie diejenige an das Hammelblut im wesentlichen eine spezifische ist. Die Differenzen, welche man bei der Bindung der Ambozeptoren aus Hammelblut-antiserum und aus Meerschweinchenorgan-Antiserum feststellen kann (erstere werden durch Meerschweinchenorgane nur partiell, letztere vollständig gebunden), erklärten sich auf Grund der Versuche und Deduktionen Orudschiew's in einfacher Weise durch die Heranziehung des Ehrlich-Morgenrothschen Prinzips der Pluralität von Rezeptoren und Ambozeptoren. Dementsprechend ergab sich, daß die Rezeptorengemeinschaft zwischen Hammelblutkörperchen und Meerschweinchenorganzellen nur eine partielle ist. Die Hammelblutkörperchen besitzen also außer ihrem die wesentliche Ambozeptorfraktion der Hammelblutimmunsera erzeugenden Rezeptorentyp noch einen zweiten experimentell zu differenzierenden Rezeptor (oder eine Rezeptorfraktion), welcher auch in den Ziegenblutkörperchen, aber nicht in den Rinderblutkörperchen enthalten ist und sich in Organen, vielleicht auch im Blutserum fernerstehenden Tierarten vorfindet.

Unsere Kenntnis über die Verbreitung dieses Rezeptors im Tierreich und seine Verteilung im Tierkörper ist nach den grundlegenden Beobachtungen Forssmans und der folgenden Analyse von Orudschiew insbesondere durch die neueren Untersuchungen von Doerr und Pick¹⁾ erweitert und ver-

1) R. Doerr und R. Pick, Bioch. Zeitschr., Bd. 50, 1913, p. 129

tieft worden. Von besonderem Interesse erscheinen dabei die von Doerr und Pick beschriebenen Eigenschaften des den Hammelblutkörperchen und andersartigen Organzellen gemeinsamen Antigens. Während nämlich bereits Orudschiew auf Grund biologischer Untersuchungen zu einer strikten Differenzierung dieses Antigens von den übrigen Hammelblut-rezeptoren gelangte, konnten Doerr und Pick die Trennung der Antigene auf sehr elegante Weise durch die Entdeckung ihres verschiedenen Verhaltens gegenüber thermischen Einflüssen demonstrieren. Nach den Versuchen von Doerr und Pick gelingt auch nach vielstündigem Kochen der überhaupt zur Erzeugung von Hammelblutambozeptoren brauchbaren Organe die Immunisierung in gleicher Weise, und ebenso erweisen sich die gekochten Organe zu Bindungsversuchen geeignet. Besonderer Beachtung wert ist das Verhalten der gekochten Hammelerythrocyten bei der Ambozeptorbindung. Während nämlich die nativen Hammelblutkörperchen die Hammelblutambozeptoren sowohl der gewöhnlichen Hammelblutimmunsera, wie auch der Organantisera vollständig absorbieren, verankern die gekochten Hammelerythrocyten in dieser quantitativen Weise nur die Hammelblutambozeptoren der Organantisera. Die gekochten Hammelerythrocyten entsprechen also in ihrem verschiedenen Verhalten gegenüber Organantiserum und Blutantiserum einerseits, in ihrer Differenz von den nativen Hammelblutkörperchen andererseits durchaus den Bindungsverhältnissen, wie sie nach Forssman und insbesondere nach Orudschiew für die Organzellensuspensionen gelten. Man darf daher den Schlußfolgerungen von Doerr und Pick durchaus zustimmen, daß die gekochten Hammelerythrocyten nur noch diejenigen Rezeptoren enthalten, welche das Hammelblut mit den Organen anderer Tierarten gemeinsam hat, während die für Hammelblut artspezifischen Rezeptoren durch Eiweiß koagulierende Einflüsse ihrer Funktion beraubt werden.

Aus der derart gelungenen Differenzierung zweier Blutkörperchenantigene durch thermischen Einfluß resultiert, wie das Doerr und Pick mit Recht ausführen, eine einfache Klärung vielfach widersprechender Angaben der Autoren über das Verhalten erhitzter Erythrocyten oder Stromata bei der Immunisierung und beim Bindungsversuch (vgl. die Arbeiten von Muir und Fergusson, Bang und Forssman, Landsteiner und

Prasek). Die Erscheinungen finden eine leicht verständliche Deutung durch die von Doerr und Pick erwiesene Konstitution des Blutkörperchen-Rezeptorenapparates aus koktostabilen und koktolabilen Rezeptortypen, ohne daß man gezwungen ist, im Sinne von Landsteiner und Prasek eine besondere Zustandsspezifität infolge des Kochens anzunehmen.

Daß durch gekochte Blutkörperchen oder Stromata auch immunisatorisch hämolytische Ambozeptoren erzeugt werden können, haben bereits die Untersuchungen von Bang und Forssman, sowie insbesondere diejenigen von Landsteiner und Prasek gezeigt. Nach den in der Seitenkettentheorie zum Ausdruck gebrachten Prinzipien darf man von vornherein annehmen, daß auch der von Doerr und Pick erwiesenen Ambozeptorbindung durch gekochte Hammelerythrocyten ein Immunisierungsvermögen entspricht. Obgleich bereits Doerr und Pick, wenn auch ohne Anführung besonderer Versuche, angeben, daß sowohl die thermolabilen, als auch die koktostabilen Hammelblutrezeptoren lytische Ambozeptoren für Hammelblut erzeugen, so schienen uns einige besondere Immunisierungsversuche mit gekochtem Hammelblut doch nicht ohne Interesse zu sein. Wenn nämlich, wie es Doerr und Pick auf Grund ihrer Bindungsversuche annehmen, die koktostabilen Hammelblutrezeptoren mit den Organrezeptoren anderer Tierarten identisch sind, so mußten bei dem stets zu erwartenden engen Parallelismus zwischen Immunisierungs- und Bindungsvermögen auch die durch gekochtes Hammelblut erzeugten Immunsera den Organantiseren entsprechen und sich von den durch Vorbehandlung mit nativem Hammelblut gewonnenen Immunsera in gewisser Hinsicht unterscheiden. Nun wissen wir einerseits durch die Untersuchungen Forssmans, daß die Organantiseren wohl Hammelblut, aber im Gegensatz zu den gewöhnlichen Hammelblutimmunseris nicht Rinderblut auflösen, andererseits durch die Beobachtungen Orudschiows, daß hämolytische Wirkungen auf Hammelblut und Ziegenblut parallel gehen. Wenn wir vorläufig auch nur über wenige durch Immunisierung mit gekochtem Hammelblut erhaltene Immunsera verfügen, so dürfen wir vielleicht doch kurz über die bisherigen Ergebnisse berichten, zumal in Hinblick auf die im folgenden noch etwas näher zu behandelnde Frage der Antiserumanaphylaxie.

Einzelne
Antiseren
aus
Hammelblut
sind
in
der
Tabelle
aufgeführt
und
mit
den
Organantiseren
vergleichen
worden.
Die
Ergebnisse
sind
in
der
Tabelle
aufgeführt.
Die
Antiseren
aus
gekochtem
Hammelblut
sind
in
der
Tabelle
aufgeführt.
Die
Antiseren
aus
nativem
Hammelblut
sind
in
der
Tabelle
aufgeführt.
Die
Ergebnisse
sind
in
der
Tabelle
aufgeführt.

Bei der Immunisierung der Kaninchen und bei der Prüfung der Antisera auf Ambozeptorgehalt gingen wir folgendermaßen vor:

Gewaschenes Hammelvollblut wurde mit etwa der doppelten Menge destillierten Wassers digeriert, sodann auf 0,85 Proz. besalzen, 1 Stunde lang im Wasserbade gekocht und schließlich durch ein Drahtnetz geschickt. Mit der derart erhaltenen Masse wurden 5 Kaninchen vorbehandelt, und zwar erhielten die Kaninchen 1 und 2 Mengen, welche 15 ccm Vollblut entsprachen, die Kaninchen 3—5 die doppelten, also 30 ccm Vollblut entsprechenden Quantitäten intraperitoneal.

Wir begnügten uns bisher mit einer einzigen Injektion und untersuchten das Blutserum nach 10-tägigem Intervall. Die Serumproben wurden durch 1/2-stündiges Erhitzen auf 55° inaktiviert und sodann in absteigenden Mengen mit je 1 ccm Blutaufschwemmung und je 0,1 ccm Meerschweinchenserum (Gesamtvolumen 2,1 ccm) digeriert. Als Blutarten zur Prüfung dienten für die Antisera 1—4 Hammelblut, Ziegenblut, Rinderblut, Pferdeblut, für das Antiserum 5 nur Hammelblut. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle I.

Tabelle I.

Blutart	Hämolyse von Blut durch Meerschweinchenserum und folgende Mengen Antiserums:							
	0,1	0,05	0,025	0,015	0,01	0,005	0,0025	0,0015

Antiserum I.

Hammel	kompl.	kompl.	kompl.	fast kpl.	mäßig	Spur	Spchn.	0
Ziege	kompl.	kompl.	fast kpl.	wenig	Spur	Spchn.	0	0
Rind	0	0	0	0	0	0	0	0
Pferd	Spur	Spchn.	0	0	0	0	0	0

Antiserum II.

Hammel	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	mäßig	wenig
Ziege	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	wenig	Spur	Spur
Rind	0	0	0	0	0	0	0	0
Pferd	Spur	Spchn.	0	0	0	0	0	0

Antiserum III.

Hammel	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	stark	mäßig
Ziege	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	wenig	Spur
Rind	0	0	0	0	0	0	0	0
Pferd	Spur	0	0	0	0	0	0	0

Antiserum IV.

Hammel	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	fast kpl.
Ziege	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	fast kpl.	wenig
Rind	0	0	0	0	0	0	0	0
Pferd	mäßig	Spur	0	0	0	0	0	0

Antiserum V.

Hammel	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	wenig	Spur	Spchn.
--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------	------	--------

Wenn man berücksichtigt, daß der Ambozeptortiter des normalen Kaninchenserums über den Maximalwert von 0,05 ccm nicht hinausgeht und auch diesen Grad nur recht selten erreicht, so ergibt sich aus der Tabelle, daß in allen 5 Fällen nach einmaliger Injektion gekochten Hammelblutes eine mehr oder weniger starke Anreicherung hämolytischer Ambozeptoren stattgefunden hat, wenn man auch bei den Antiseris 1 und 5 nur von einem relativ geringgradigen immunisatorischen Effekt sprechen kann¹⁾. In prinzipiell gleicher Weise wirken die Antisera auf Ziegenblut, dagegen sind sie für Rinderblut und Pferdeblut unwirksam. Die geprüften, durch Immunisierung mit gekochtem Hammelblut dargestellten Antisera verhalten sich also in dieser Hinsicht genau ebenso wie die Meerschweinchenorgan-Antisera, ein weiterer Beweis dafür, daß die koktostabilen Rezeptoren des Hammelblutes zu gewissen, in den Organen von Meerschweinchen und anderen Tierarten vorhandenen Rezeptoren in näheren Beziehungen stehen dürften.

Die derart von neuem gelungene Bestätigung der von Doerr und Pick erkannten Tatsache, daß die den Hammelblutkörperchen mit fremdartigen Organen gemeinsame Rezeptorenfraktion durch Kochen von den übrigen Hammelblutrezeptoren isoliert werden kann, mußte auch in bezug auf die Frage der primären Antiserumwirkung von Interesse erscheinen, deren nahe Beziehungen zum Symptomenkomplex der Anaphylaxie von Friedberger erkannt wurden. Was die Ursache des Zustandekommens der Antiserumanaphylaxie anlangt, so beleuchtete die durch Forssmans Untersuchungen eröffnete Kenntnis des Bestehens einer Rezeptorengemeinschaft zwischen Hammelblut und Meerschweinchenorganen mit einem Schlage das früher dem Verständnis nicht unerhebliche Schwierigkeiten bereitende Tatsachenmaterial (Friedberger, Doerr und Moldovan, Biedl und Kraus, v. Dungern und Hirsch-

1) Nicht unerwähnt möge bleiben, daß die derart erhaltenen Ambozeptoren durch natives Hammelblut auch stark, d. h. in dem mehrfachen Multiplum der Ambozeptoreinheit gebunden wurden.

feld, Graetz u. a.), zumal nach den Angaben von Biedl und Kraus, Doerr, Graetz und insbesondere von Doerr und Weinfurter kein Zweifel bestehen konnte, daß in bezug auf die primäre Toxizität der Antisera je nach den Antigenen, welche zu ihrer Herstellung gedient haben, erhebliche Unterschiede bestehen, und daß gerade die Hammelantisera durch ihre oftmals außerordentlich starke Toxizität für Meerschweinchen eine Sonderstellung einnehmen. Tatsächlich sind die Konsequenzen, welche sich aus der Rezeptorengemeinschaft zwischen Hammel- und Meerschweinchenantigenen ergeben mußten, sehr bald von Forssman und Hintze¹⁾ und unabhängig von Orudschiew²⁾ gezogen worden. Die erstgenannten Autoren stellten fest, daß das giftige Prinzip der Hammelantisera von Meerschweinchenorganzellen gebunden wird, und daß durch Immunisieren mit Meerschweinchenorganzellen gleichfalls toxische Substanzen erzeugt werden, welche sich mit den Meerschweinchenorganrezeptoren verbinden. Orudschiew hatte festgestellt, daß die Hammelblutantisera mit Meerschweinchenorganzellen reagieren, und daß sie auch Beziehungen zu Meerschweinchenserum haben können, und gelangte daher zu der Schlußfolgerung, daß die Möglichkeit zur Entstehung eines anaphylaktischen Shocks bei der Injektion der Hammelantisera in gleicher Weise gegeben ist, wie bei der Injektion der Meerschweinchenantisera in den Versuchen von Doerr und Moldovan. Danach mußte die früher zur Deutung der Antiserumanaphylaxie von Friedberger aufgestellte, aber vielfachem Widerspruch (v. Dungern und Hirschfeld, Friedemann, Doerr und Weinfurter) begegnende geistvolle Theorie der Antigenreste als überflüssig erscheinen. Tatsächlich ist die Auffassung von Forssman und Hintze, sowie von Orudschiew durch die sich anschließenden Untersuchungen von Doerr und Pick von neuem auf experimenteller Basis bestätigt worden. Doerr und Pick haben zugleich, um den Einwand, daß ja die Toxizität der Meerschweinchenorgan-Antisera für Meer-

1) J. Forssman und A. Hintze, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 44, 1912, p. 336.

2) D. Orudschiew, l. c.

schweinch von vornherein gegeben erscheint, zu begegnen, an erster Stelle Antisera benutzt, welche durch Immunisierung mit Pferdenieren gewonnen waren, und welche, wie bereits Forssman mitgeteilt hat, gleichfalls Hammelbluthämolytine enthalten. Auch die derart erhaltenen Antisera erwiesen sich von starker primär-toxischer Wirkung, und zwar nur auf alle diejenigen Tierarten, deren Organzellen die hämolytischen Ambozeptoren der Organantisera binden. Bezüglich der weiteren interessanten Einzelheiten begnügen wir uns, auf die Originalarbeit von Doerr und Pick zu verweisen. Besonders hervorheben möchten wir nur die von den Autoren entdeckte Tatsache, daß es auch mit gekochten Pferdenieren gelingt, Antisera zu erzielen, welche außer der hämolytischen Wirkung auf Hammelblut nicht unerhebliche primäre Toxizität besitzen, wie das ja dann, wenn man eine Identität koktostabiler Rezeptoren in Pferde- und Meerschweinchenorganen annimmt, nicht anders zu erwarten ist.

Andererseits ist aber der bei oberflächlicher Betrachtung zu erwartende Parallelismus zwischen dem Gehalt der Antisera an hämolytischen Antikörpern und dem Grade ihrer Toxizität meist vermißt worden. Dieser sich bereits aus den Untersuchungen von Friedberger und Castelli ergebende Mangel hatte ja gerade Friedberger veranlaßt, für die giftige Wirkung der Antisera noch vorhandenen Antigenresten eine prinzipielle Bedeutung zuzusprechen. Wie Orudschiew ausgeführt hat, steht jedoch der mangelnde Parallelismus zwischen dem Gehalt der Hammelblutimmunsera an hämolytischen Ambozeptoren und ihrer Toxizität zur Auffassung der Antiserumanaphylaxie als direkte Antikörperwirkung nicht im geringsten Widerspruch. Denn die auf Meerschweinchenrezeptoren übergreifenden Antikörper der Hammelblutimmunsera stellen ja nur einen mehr oder weniger geringen Anteil des gesamten Ambozeptorvorrates dar, und das Verhältnis zwischen dieser Ambozeptorfraktion und der gesamten Schar von hämolytischen Ambozeptoren kann individuell in weiten, nicht näher präzisierbaren Grenzen schwanken. Ebenso darf es aber nicht wunder nehmen, wenn bei den Meerschweinchenorgan-Antiseris zwischen hämolytischer Wirkung auf Hammel-

blut und Toxizität für Meerschweinchen eine gesetzmäßige Relation nicht besteht, wie sich das bereits aus Versuchen von Forssman und Hintze ergibt. Denn bei der Immunisierung mit Meerschweinchenorganen dürften die auf Hammelblut wirkenden Ambozeptoren wiederum nur einen Bruchteil der gesamten Antikörpermenge darstellen, welche in individuell variierender Weise zu einem Teil aus gleichzeitig auf Hammelrezeptoren übergreifenden Ambozeptoren, zu einem anderen Teil aber aus für Meerschweinchenrezeptoren spezifischen Antikörpern besteht. Die Schlußfolgerung von Forssman und Hintze, daß die Toxizität der Meerschweinchenorgan-Antisera nicht auf ihrem Gehalt an Hammelblutambozeptoren beruht, erscheint daher in dieser Form nicht gerechtfertigt; vielmehr dürfte das toxische Prinzip eben nur partiell mit den für Hammelblut hämolytischen Antikörpern identisch sein. Allerdings haben Doerr und Pick auch bei der Prüfung von Pferdenierenantisera für Meerschweinchen eine quantitative Relation zwischen dem Hammelblut-Ambozeptortiter und dem Grade der Giftigkeit für Meerschweinchen vermißt. Möglicherweise bestehen daher außer der Rezeptorengemeinschaft zwischen Pferdeorganen, Meerschweinchenorganen und Hammelblut noch Rezeptorengemeinschaften, welche nur Pferde- und Meerschweinchenorgane, aber nicht mehr das Hammelblut betreffen.

Nach den vorangegangenen Ausführungen durfte man erwarten, daß die durch Immunisierung mit gekochtem Hammelblut erhaltenen hämolytischen Antisera einmal für Meerschweinchen primär toxisch sind, dann aber auch einen engeren Parallelismus zwischen hämolytischer Funktion und Toxizität aufweisen, als man es bei anderen Immunisierungsformen zu sehen gewohnt ist. Die Prüfung der von uns beschriebenen, durch gekochtes Hammelblut erzeugten Antisera entsprach in der Tat diesen Erwartungen. In der folgenden Tabelle II sind die Ergebnisse der Toxizitätsprüfungen, welche an Meerschweinchen von ca. 200 g durch intravenöse Injektion der inaktivierten Antisera vorgenommen wurden, zusammengestellt.

Tabelle II.

Ambozeptor- titer für Hammelblut	Injizierte Menge ccm	Ge- wicht des Tieres	Krankheitsverlauf	Ausgang
Antiserum I.				
0,025—0,015	4,5	200	keine Symptome	lebt
	3,0	200	" "	"
	2,0	200	" "	"
Antiserum II.				
0,005—0,0025	2,0	220	schwere Anaphylaxie	tot in 4 Min.
	2,0	200	" "	" " 10 "
	1,5	260	keine Symptome	lebt
	1,5	200	" "	"
Antiserum III.				
0,005—0,0025	2,0	200	schwere Anaphylaxie	tot in 4 Min.
	1,5	200	" "	" " 7 "
	1,5	200	leichte Rucke "	lebt
	1,25	215	keine Symptome	"
	1,25	200	ganz leichte Rucke	"
	1,25	200	Rucke	"
Antiserum IV.				
0,0025—0,0015	1,5	220	schwere Anaphylaxie	tot in 7 Min.
	1,5	200	" "	" " 3 "
	1,25	200	" "	" " 6 "
	1,0	200	" "	" " 8 "
	1,0	220	Dyspnoë, leichte Rucke	lebt
	1,0	200	Rucke	"
	1,1	220	Dyspnoë	"
	1,2	215	schwere Dyspnoë, Mattigkeit	"
	Antiserum V ¹⁾ .			
0,01—0,005	2,5	205	Unruhe	lebt
	1,0	200	keine Symptome	"

Aus der Tabelle ergibt sich ein durchaus befriedigender Parallelismus zwischen der Toxizität der Antisera für Meerschweinchen und ihrer hämolytischen Wirkung auf Hammelblut. Während das hämolytisch am schwächsten wirksame Antiserum I selbst in der Dosis von 4,5 ccm keine Symptome bewirkt und das in aufsteigender Skala hämolytischer Wirkung folgende Antiserum V in der Dosis von 2,5 ccm

1) Von Antiserum V stand zur weiteren Prüfung eine ausreichende Serummengende nicht zur Verfügung.

nur unbestimmte Symptome veranlaßt, sind die hämolytisch relativ stark wirksamen Antisera II—IV alle von einer bemerkenswerten toxischen Wirkung, und das an hämolytischen Ambozeptoren reichste Antiserum IV steht auch in der Toxizität an der Spitze. Natürlich sind wir uns wohl bewußt, daß man bei dem immerhin geringen Material in der Verallgemeinerung vorsichtig wird sein müssen. Ein absoluter zahlenmäßiger Parallelismus muß vielleicht auch bei der Immunisierung mit gekochtem Hammelblut schon wegen der Interferenz individueller Tierempfindlichkeit nicht immer bestehen. Aber immerhin zeigen die bisherigen, in Tabelle II protokollierten Erfahrungen, daß die erhaltenen experimentellen Ergebnisse im wesentlichen den theoretischen Deduktionen entsprechen, und wir möchten daher an erster Stelle betonen, daß man durch die Immunisierung mit gekochtem Hammelblut, wie es den vorausgegangenen Erörterungen und auch den von Doerr und Pick erhobenen Befunden entspricht, Antisera erhalten kann, welche bei relativ geringgradigem Ambozeptortiter relativ starke primäre Toxizität aufweisen. Ob der strenge Parallelismus, wie wir ihn beobachtet haben, als allgemeine Gesetzmäßigkeit gelten kann, soll um so mehr dahingestellt bleiben, als ja auch die als koktostabil sich erweisende Fraktion des Rezeptorenapparates ihrerseits wieder eine komplexe Konstitution aufweisen könnte, so daß nicht alle koktostabilen Hammelblutrezeptoren zugleich Meerschweinchenrezeptoren sein müssen. Aber jedenfalls sprechen die von uns erhaltenen Ergebnisse von neuem dafür, daß die Antiserum-anaphylaxie, wenigstens soweit die Hammelblutimmunsere in Betracht kommen, an erster Stelle als einfache Antikörperwirkung aufzufassen ist.

Wir möchten jedoch nicht darauf hinzuweisen unterlassen, daß Friedberger in einer neueren Arbeit¹⁾ zu der Schlußfolgerung gelangt, daß die Erklärung der Antiserum-Anaphylaxie als Folge einer Gruppenreaktion im Sinne von Forssman, sowie Sachs und Orudschiew verfrüht sein dürfte. Allerdings können die Argumente Friedbergers in dieser

1) E. Friedberger, diese Zeitschr., Bd. 18, 1913, p. 269.

Hinsicht nicht zwingend erscheinen. Nach Friedberger würde nämlich die Annahme Schwierigkeiten begegnen, daß die verschiedenartigen Substrate, welche nach Einverleibung in den Kaninchenorganismus zur Bildung von Hammelblut-Hämolysinen führen [außer den erwähnten Organzellen: Paratyphus- und Gaertnerbacillen nach Rothacker¹⁾, Mäusecarcinom nach Morgenroth²⁾, Mäusesarkom nach Friedberger³⁾, Pferdeurin nach Doerr⁴⁾, Meerschweinchenurin nach Friedberger und Poor⁵⁾ usw.] mit den Hammelblutkörperchen gemeinsame Rezeptoren haben sollten, und er glaubt daher, daß die Steigerung der ja schon normalerweise vorhandenen Hammel- und Ziegenbluthämolysine durch die genannten Eingriffe die Folge eines unspezifischen, auf den Organismus ausgeübten Reizes darstellt, eine Annahme, wie sie bereits von Rothacker zur Erklärung des Auftretens von Hammelbluthämolysinen in Paratyphus- und Gaertnerantiseris als möglich diskutiert wurde. Selbst wenn aber diese Ansicht in dieser allgemeinen Formulierung richtig wäre, so würde sie für die Deutung der Antiserum-Anaphylaxie im Sinne direkter Antikörperwirkung ohne Bedeutung sein; denn für die Frage der Verwandtschaftsreaktionen der Antikörper ist ja nicht die Art ihrer Entstehung, sondern die Art ihrer Avidität, mit anderen Worten das Ergebnis der Bindungsversuche, maßgebend. Auf diesem Wege ist jedoch durch die Untersuchungen von Forssman, Orudschiew, sowie von Doerr und Pick in zahlreichen Fällen nachgewiesen, daß wenigstens die durch Immunisierung mit fremdartigen Organen von Kaninchen erhaltenden Antisera, wie auch die Hammelblutantisera Antikörper besitzen, welche sowohl von fremdartigen Organzellen als auch von Hammelblutkörperchen verankert werden. Eine Rezeptorengemeinschaft zwischen Meerschweinchenorganen und Hammelblutkörperchen ist also derart in

1) A. Rothacker, diese Zeitschr., Bd. 16, 1913, p. 491.

2) J. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., No. 12, 1913; vgl. hier zu auch Doerr und Pick (l. c.).

3) E. Friedberger, l. c.

4) R. Doerr und R. Pick, l. c.

5) E. Friedberger, l. c.

einwandfreier Weise demonstriert, und damit ist auch die Möglichkeit einer direkten Giftwirkung von Hammelblutambozeptoren auf den Meerschweinchenorganismus experimentell erwiesen. Was nun die Entstehung der Antikörper anlangt, so wäre es von vorneherein überraschend, wenn die allgemein bewährten Prinzipien der Seitenkettentheorie nicht auch für diese Fälle gelten würden und ein Parallelismus zwischen immunisierender und ambozeptorbindender Wirkung nicht bestände. Tatsächlich haben aber bereits die Untersuchungen von Forssman, sowie insbesondere diejenigen von Orudschiew, Doerr und Pick mit aller Prägnanz das konforme Verhalten von Immunisierungsvermögen und Ambozeptorbindung auch für die toxische und hämolytische Quote der Organantiseren erwiesen. Besonders beweiskräftig erscheinen in dieser Hinsicht die bereits durch Forssman bekannt gewordenen Analogien, welche im Verhalten gleicher Organe, insbesondere der Niere, bei verschiedenen Tierarten in bezug auf Immunisierungsfähigkeit und Bindungsvermögen bestehen.

Allerdings gibt Friedberger an, daß man auch durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Kaninchenniere und besonders mit Kaninchenlunge hämolytische Hammelblutambozeptoren erhalten kann, die indes, wie schon nach den Erfahrungen Orudschiews anzunehmen war, eine nennenswerte Titerhöhe nicht erreichen. Orudschiew hat nämlich bereits bei der Immunisierung mit Kaninchenniere erheblich höhere hämolytische Werte als bei der Verwendung von Kaninchenleber erhalten, glaubte aber, da die höchst erhaltenen Titerwerte sich noch innerhalb der Breite der individuellen Variationen hielten, eine Schlußfolgerung im Sinne einer gelungenen Immunisierung nicht ziehen zu sollen. Möglicherweise trifft aber die von Friedberger vertretene Hypothese für die Behandlung von Kaninchen mit Kaninchenorganen durchaus das Richtige. Friedberger weist nämlich auf den Parallelismus hin, welcher zwischen der erfolgreichen Anreicherung an Ambozeptoren und der von Dold, sowie Friedberger und Ishikawa analysierten Organtoxizität besteht. So hat Friedberger in der Tat die giftigere Kaninchenlunge relativ stärker hämolysinbildend gefunden,

als die ungiftigere Kaninchenniere. Derart würde es vielleicht verlockend erscheinen können, in diesem Sinne der Anschauung Friedbergers zu folgen und anzunehmen, daß die Steigerung normal vorhandener Antikörper in gewissen Grenzen eine Funktion der Toxizität des einverleibten Agens sein kann. Man wird aber diese Fassung des Problems doch nur auf solche Fälle beschränken können, in denen der Ambozeptortiter die größte normale Variationsbreite nicht oder nicht wesentlich überschreitet. Bei einer derartigen Ambozeptoranreicherung aber, wie wir sie durch Forsmann bei der Immunisierung mit Meerschweinchenorganen kennen gelernt haben, erscheint uns diese Hypothese zur Erklärung der Tatsachen nicht ausreichend. Und tatsächlich hat sich ja auch durch die Bindungsversuche erweisen lassen, daß hier und in zahlreichen analogen Fällen Rezeptoren im Sinne der Seitenkettentheorie als Hämolysinbildner fungieren. Ob daneben noch die Toxizität der Organe eine Rolle bei der Höhe des Ambozeptortiters spielt, soll dahingestellt bleiben. Man könnte insbesondere beim Ueberwiegen der immunisierenden Wirkung der Niere über diejenige der Leber hieran zu denken versucht sein, jedoch entspricht andererseits (vgl. Forssman, Orudschiew) der geringen immunisierenden Funktion der Leber auch ein geringeres Ambozeptorbindungsvermögen¹⁾.

1) Anmerkung während der Korrektur: Allerdings berichten Friedberger und Schiff in einer soeben erschienenen interessanten Arbeit (Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 34), daß bei vergleichender Prüfung einer Reihe von Meerschweinchenorganen auch das Hämolysinbindungsvermögen sich proportional der Giftigkeit der einzelnen Organextrakte verhielt. Die Autoren glauben daher, daß sich der besonders von Orudschiew betonte Parallelismus zwischen Antikörperbindung und Bildung zwanglos durch das Prinzip der Giftigkeit erklärt, und scheinen anzunehmen, daß durch eine mit der Organgiftigkeit parallel erfolgende Bindung bzw. Zerstörung der normalen Hammelblutambozeptoren gewissermaßen ein „Ambozeptorvakuum“ entsteht, das die Ursache für eine im Ueberschuß erfolgende Regeneration bedeutet. Auch eine derartige Fassung des Problems würde natürlich unsere Auffassung der primären Antiserumtoxizität nicht tangieren können. Denn in dieser Hinsicht ist lediglich das spezifische Bindungsvermögen der Organe einerseits in Bezug auf die Herkunft derselben, andererseits in Bezug auf die vorgelegten Ambozeptoren maßgebend, und die derart definierte Elektivität des Vorgangs ist durch

Hingewiesen sei in diesem Zusammenhange auch darauf, daß nach Orudschiew bei der Bildung von Hammelbluthämoly-sinen durch Meerschweinchenorganimmunisierung Pferdeblut-ambozeptoren nicht angereichert erscheinen, obwohl das Kaninchenserum bereits normalerweise Ambozeptoren für Pferdeblut enthält. Nach alledem wird man die Toxizität der Organe bei einer erheblichen Bildung von Hammelblut-hämoly-sinen nicht als Ursache, sondern höchstens als ein die immunisatorische Bildung begünstigendes Moment ansprechen dürfen¹⁾. Für die Frage der Antiserum-Anaphylaxie aber

die Untersuchungen von Forssman, Orudschiew, Doerr und Pick erwiesen worden. Es ist aus diesem Grunde ohne weitere Hilfhypothesen auch nicht angängig, eine unspezifische Ambozeptorzerstörung durch eine giftige Komponente der Organe anzunehmen. Die Giftigkeit der Organ-extrakte, für welche man übrigens, wie auch Friedberger und Schiff angeben, nicht die akuten, vielmehr subakute Wirkungen als Maßstab zu-grunde legen müßte, könnte also nur im Verein mit dem spezifischen Ge-präge der Organe, dessen Gesamtheit wir als Rezeptorenapparat zu bezeichnen gewohnt sind, zu den Erscheinungen der Ambozeptorbindung und -Bildung führen. In welcher Weise aber ein derartiges Zusammenwirken entstehen könnte, darüber kann man vorläufig kaum zu präzisierten Vorstellungen ge-langen. Denkt man mit Friedberger und Schiff an ein zur Zerstörung der Ambozeptoren führendes und mit der Giftigkeit der Organe in irgend-einem Zusammenhang stehendes Prinzip, so könnte man vielleicht annehmen, daß die durch Organrezeptoren veranlaßte Bindung der Hammelblutambo-zeptoren durch eine nichtspezifische Organkomponente Verstärkung resp. Verfestigung erfährt, oder daß erst die an Rezeptoren gefesselten Ambo-zeptoren dem zerstörenden Agens anheimfallen. Vorläufig wird es sich aber darum handeln müssen, an einem größeren Material festzustellen, ob die von Friedberger und Schiff mitgeteilten interessanten Beziehungen zwischen Toxizität und Ambozeptorbindungsvermögen der Organe eine allgemeine Giltigkeit beanspruchen dürfen. — Was die Bildung von Hammelblut-ambozeptoren durch Kaninchenorgane anlangt, so bestätigen die von Friedberger und Schiff bisher mitgeteilten Zahlen in der Tat die oben geäußerte Vermutung, daß die Steigerung des Hammelblutambozeptor-titers die Grenzen normaler individueller Variationsbreiten nicht über-schreitet. Sie dürfte daher vorläufig unseres Erachtens nicht als Folge einer spezifischen Reaktion in dem Sinne, wie sie die Immunisierung mit Meer-schweinchenorganen darstellt, zu betrachten sein.

1) Bei geringem Ambozeptortiter wird man an die Möglichkeit denken können, daß die immunisierende Wirkung geringerer Rezeptor-mengen erst durch die Toxizität des Antigenträgers einen nachweisbaren Ausdruck erfährt.

können wir auf Grund der Untersuchungen von Forssman, Forssman und Hintze, Orudschiew, Doerr und Pick und den unsrigen die Schlußfolgerung ziehen, daß die primäre Toxizität der Antisera durch die gewonnene Erkenntnis von Rezeptorengemeinschaften bei fernerstehenden Tierarten im Sinne einer direkten Antikörperwirkung vorläufig hinreichend geklärt erscheint. Kompliziertere Erklärungsmöglichkeiten, wie sie durch Friedberger in der Theorie der Antigenreste, durch Ritz und Sachs (vgl. auch Doerr und Weinfurter) in der Annahme einer intravitalem Anaphylatoxinbildung gegeben sind, werden erst dann herangezogen werden müssen, wenn die Erklärung durch Gruppen- oder Verwandtschaftsreaktionen in besonderen Fällen mit dem Ergebnis des Experiments in Widerspruch gerät. Auf Grund des bisher vorliegenden Materials dürfte sich aber ein befriedigender Ueberblick durch das Prinzip der Rezeptorengemeinschaft ergeben.

Zusammenfassung.

- 1) Durch Immunisierung von Kaninchen mit gekochtem Hammelblut wurden Antisera erhalten, welche auf Hammel- und Ziegenblut, aber nicht auf Rinder- und Pferdeblut hämolytisch wirkten.
- 2) Die derart gewonnenen Antisera wirkten im inaktiviertem Zustande auf Meerschweinchen toxisch. Der Grad der Toxizität und die Höhe des Ambozeptortiters für Hammelblut wiesen einen Parallelismus auf, ohne daß das bisherige Material zu einem verallgemeinernden Schluß in dieser Hinsicht zwingt.
- 3) Das Prinzip der Rezeptorengemeinschaft gestattet bisher einen befriedigenden Ueberblick über das Gebiet der Antiserumanaphylaxie.

Nachdruck verboten.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militär-sanitätskomitees in Wien.]

Die primäre Toxizität der Antisera¹⁾.

2. Mitteilung.

Von **R. Doerr** und **R. Pick**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Juli 1913.)

In einem vor kurzem erschienenen Artikel (Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1. und 2. Heft) haben wir die Literatur über primär toxische Antisera und insbesondere die experimentellen Ergebnisse, welche Forssman, Forssman und Hintze sowie Sachs und Orudschiew auf diesem Gebiete erzielten, genügend ausführlich besprochen, so daß wir uns hier auf die für das Verständnis des folgenden notwendige Wiedergabe unserer früheren Versuchsergebnisse und einige Ergänzungen hinsichtlich der Arbeiten anderer Autoren beschränken dürfen.

Es gelang uns zu zeigen, daß die Organe des Pferdes des Meerschweinchens, des Hundes, der Katze, des Huhnes (und der Schildkröte) ein in biologischer Beziehung identisches Antigen enthalten, welches sich in geringer Menge auch im Blutplasma und im Harn der genannten Tierespecies, nicht aber in ihren Erythrocyten vorfindet. Dagegen läßt sich dieses Antigen in den Erythrocyten des Hammels nachweisen, während es umgekehrt in den Organen desselben vermißt wurde. Beim Rind, Kaninchen, Ratte, Schwein, Mensch und Gans²⁾ war es weder in den roten Blutkörperchen noch in den Organen anzutreffen. Seine Antigenfunktionen äußern sich darin, daß es im Kaninchenorganismus die Bildung von lytischen Ambozeptoren für Hammelerythrocyten und die Entstehung eines Antikörpers hervorruft,

1) Ausgeführt mit den Mitteln der Trenkle-Stiftung pro 1911.

2) Unsere Angaben über die weiße Maus waren, wie aus dieser Mitteilung hervorgeht, unrichtig.

der bei intravenöser Injektion auf Meerschweinchen, Hunde und Hühner (wahrscheinlich auch auf Katzen und Pferde) als Noxe wirkt. Ob die Hammelblutambozeptoren mit dem toxischen Antikörper identisch sind, ließ sich nicht mit Sicherheit feststellen; doch wurden beide in vitro durch das Antigen (Organe der betreffenden Tiere oder Hammelerythrocyten) meist gleichzeitig gebunden.

Die pathogenen Effekte der Organantisera und Hammelblutimmunsera haben wir in Uebereinstimmung mit Forssman und Hintze sowie Orudschiew als anaphylaktische Reaktionen aufgefaßt, bei denen die Organe des empfindlichen Tieres das Antigen, die Immunsera den Antikörper liefern. Da Hühner durch sorgfältig inaktivierte Antisera dieser Art akut getötet werden können, trotzdem Hühnerkomplement Kaninchenambozeptoren nicht reaktiviert, so zogen wir den Schluß, daß sich diese Form anaphylaktischer Prozesse ohne Intervention des Komplementes vollziehen müsse.

Tiere, wie Ratten, Tauben oder Kaninchen, deren Organe das Antigen nicht enthalten, werden durch solche toxische Immunsera nicht geschädigt.

Das Antigen war gegen eiweißkoagulierende Agentien (Erhitzen, absoluten Alkohol) widerstandsfähig.

Tumorzellen zeigten im allgemeinen das Verhalten der Organparenchyme des Tumorträgers, doch konnten kleine Abweichungen konstatiert werden, selbst wenn man die Tumorzellen mit den normalen Zellen des Organes verglich, in dem sich der Tumor entwickelt hatte.

Bei Tieren (Meerschweinchen), deren Gewebe das Antigen enthalten, löst dasselbe keine Produktion von lytischen Ambozeptoren oder toxischen Antikörpern aus.

Meerschweinchen ließen sich mit Pferdenierenantiserum weder gegen Pferdeniere noch gegen Hammelerythrocyten passiv anaphylaktisch machen, da die Antikörper des präventiv injizierten Immunserums durch Bindung an das Organantigen rasch aus den Säften des Tieres verschwanden. Auf gleiche Verhältnisse stößt man bisweilen, wenn man versucht, passiv gegen Hammelerythrocyten mit einem echten Hammelblut-

immenserum zu präparieren, da der anaphylaktische Antikörper (Ambozeptor) solcher Sera von Meerschweinchenorganen in vivo (Doerr und R. Pick) und in vitro (Orudschiew) in verschiedenem Grade gebunden wird.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zu dieser Frage finden wir bei Amako, dessen Publikation uns bei der Abfassung unserer ersten Mitteilung entging; sie wurde übrigens auch von anderer Seite übersehen.

Amako bestätigt zunächst die Angaben von Forssman, daß man durch die Immunisierung von Kaninchen mit den Organen gewisser Tiere, unter welchen er auch die Schildkröte anführt, Lysine für Hammelerythrocyten erhält; als bedeutungsvoller ist die Tatsache zu bezeichnen, daß er Kaninchen durch Präparierung mit Organemulsionen gegen Hammelerythrocyten anaphylaktisch machen konnte, weil dadurch angesichts der Spezifität anaphylaktischer Prozesse die partielle Identität der diesen Substraten anhaftenden Antigenfunktionen wahrscheinlich wird.

Hammelhämolysine erzielten neuerdings auch Rothacker mit Paratyphus- und Gärtner-Bacillen, sowie Morgenroth mit Mäusecarcinomzellen, ein Befund, auf den wir später noch des näheren eingehen werden. Rothacker und Morgenroth haben indes die Giftigkeit ihrer hämolytischen Immenserum für Meerschweinchen nicht geprüft und nehmen demgemäß auch zu dem Problem der primären Toxizität der Antisera keine Stellung.

Dagegen bekämpft Friedberger lebhaft die Theorie, daß Meerschweinchenzellen und Hammelblutkörperchen gleiche Antigengruppen enthalten, und daß die „primäre Antiserumwirkung speziell die des Antihammel-Kaninchenserums“ auf diese Verwandtschaft zurückzuführen sei. Das experimentelle Beweismaterial Friedbergers liegt jedoch noch nicht vor, sondern läßt sich vorläufig nur aus verschiedenen, in einen polemischen Artikel¹⁾ eingestreuten Bemerkungen in allgemeinen Umrissen erkennen.

1) In dieser „Kritik des gegenwärtigen Standes der Anschauungen über Anaphylaxie und Anaphylatoxinvergiftung“ wendet sich Friedberger gegen jene Autoren, welche die von ihm und seiner Schule aufgestellten Fundamentalsätze (über den Eiweißabbau bei der Ana-

Daraus ist zu entnehmen, daß Friedberger beim Kaninchen durch Injektion von Meerschweinchen- und Pferdeharn, Kaninchenlunge und Kaninchenniere Steigerungen des schon unter normalen Verhältnissen vorhandenen Hammelhämolytins erreichen konnte. Wie hoch der Titer der auf diesem Wege dargestellten Ambozeptoren war, wird nicht angegeben; bei Verwendung von Kaninchenniere scheint die Lysinproduktion nur gering gewesen zu sein, und die absoluten Werte lagen noch innerhalb der physiologischen Breite, wie das bereits Orudschiew konstatiert hat.

Weiter beobachtete Friedberger, daß die Fähigkeit der verschiedenen Substrate, die Ambozeptorbildung beim Kaninchen anzuregen, mit ihrer Giftigkeit bei direkter Einführung in die Blutbahn in geradem Verhältnis stand. Der Meerschweinchenharn z. B., der intravenös nur in sehr kleinen Dosen (< 1 ccm) vertragen wird, wirkte trotz der geringen

phylaxie und Anaphylatoxinbildung, über die essentielle Rolle des Komplementes beim Zustandekommen der anaphylaktischen Symptome, über die Identität des Anaphylatoxins mit dem gesuchten und durchaus hypothetischen „anaphylaktischen Gift“ bezweifelt oder versucht haben, andere Arbeitsrichtungen selbständig weiterzuentwickeln. Neue Gesichtspunkte und Argumente trifft man weder in dieser „Kritik“, noch in den folgenden fünf Arbeiten, denen sie als Einleitung dienen soll, und da ein intensives Bedürfnis nach Vermehrung der polemischen Anaphylaxieliteratur nach allgemeinem Dafürhalten nicht besteht, so könnten wir es uns ruhig versagen, auf die strittigen Punkte nochmals einzugehen. Wir würden auch trotz des Umstandes, daß gerade unsere Arbeit, sowie die von Doerr, Doerr und Russ, Doerr und Weinfurter von Friedberger am abfälligsten beurteilt werden, auf eine Fortsetzung der unfruchtbaren Debatte verzichten; die Auffindung neuer Tatsachen und Arbeitsmethoden muß ja ohnehin eine Entscheidung herbeiführen, und schon in dem kurzen Intervall seit der Abfassung des Friedbergerschen Aufsatzes sind Experimente bekannt geworden (Weil, Dale u. a. m.), die keineswegs für die Theorie dieses Autors sprechen. Wenn wir uns nun doch vorbehalten, Friedbergers Angriffe bei Gelegenheit zu beantworten, so geschieht das einmal, um tatsächliche Unrichtigkeiten klarzustellen, andererseits um die Argumentation Friedbergers zu beleuchten, die manchem in diesem enormen Gebiet weniger bewanderten Fachmann als Beweisführung imponieren könnte. Wir müssen namentlich hervorheben, daß Friedberger mehrfach ein Glied aus einer Kette voneinander abhängiger Gegenargumente zu widerlegen trachtet, und dann den Einwand, den man gegen ihn erhoben, zur Genüge entkräftet zu haben glaubt.

injizierbaren Mengen hammelhämolysinbildend, der ungiftigere Pferdeharn entfaltetete zwar denselben Effekt, jedoch erst in enorm höheren Quantitäten; ebenso erwiesen sich die ungewein giftigen Extrakte der Kaninchenlunge schon in der Dosis von 1 ccm einer 120-fachen Verdünnung gleich stark lysinogen wie das nämliche Extraktvolumen der relativ ungiftigen Kaninchenniere bei bloß 6-facher Verdünnung. Aehnliche Parallelismen sollen zwischen der Toxizität und dem lysinogenen Vermögen der Meerschweinchenniere und Meerschweinchenleber oder zwischen Pferde-, Ochsen- und Rattenniere bestehen.

Friedberger erklärt es nun für schwer annehmbar, daß manche Bakterien (Rothacker), Organextrakte und gewisse Harnsorten Antigene enthalten, welche mit bestimmten Rezeptoren des Hammelblutkörperchens identisch sind; er möchte „vielmehr glauben, daß alle die „Antigene“, die eine derartige Hämolysinsteigerung beim Kaninchen bedingen, das ganz unspezifisch vermöge des Reizes tun, den sie auf den Organismus ausüben“. Je giftiger das injizierte Material, desto stärker ist auch nach seiner Ansicht der Reiz, der die Kaninchenzelle veranlaßt, die schon de norma an die Zirkulation abgegebenen Antikörper in erhöhtem Ausmaße zu „sezernieren“, desto höher demnach auch der Titer der nach solchen Eingriffen auftretenden Hammelambozeptoren. Friedberger scheint indes nicht der Ansicht zu sein, daß jedes Gift diese Reizwirkung zu entfalten vermag, da er letztere an einer anderen Stelle seines Artikels auf die „giftigen Antigene“ beschränkt und seine Vorstellungen überdies durch ein Beispiel illustriert: er verweist darauf, daß auch Menschenblutkörperchen beim Kaninchen Hammelhämolysine erzeugen, und zwar bisweilen in solcher Menge, daß ihr Titer den der Ambozeptoren für die homologe Blutart übertrifft.

Endlich sollen sich die durch Organzellen und andere derartig unspezifische Stoffe gewonnenen Hämolysine für Hammelblut von den echten spezifischen (durch Hammelerythrocyten erzeugten) dadurch unterscheiden, daß sie keine hämagglutinierende Funktion besitzen ¹⁾.

1) Nach einer Bemerkung von Forssman und Hintze zu schließen, dürfte dieser Unterschied nicht durchgreifend sein insofern, als manche Organantisera im inaktiven Zustande doch auch auf Hammel-

Friedberger meint, daß angesichts dieser Umstände das Problem der Hammelhämolysinbildung durch artfremde Orgazellen speziell durch Meerschweinchenorgane noch nicht genügend geklärt sei, um daraus die primäre Antiserumwirkung abzuleiten.

Diese Ausführungen müssen zunächst wohl wegen der Interpretation des Giftbegriffes Bedenken erwecken. Wenn man Substanzen oder richtiger Gemenge von Substanzen, die ihrer chemischen Natur und physiologischen Wirkungsart nach größtenteils unbekannt sind, in abgestuften Mengen ausschließlich intravenös injiziert, so sind die beobachteten Folgen durchaus kein Gradmesser der Giftigkeit in dem Sinne, in welchem man dieses Wort sonst allgemein anzuwenden pflegt. Wir wissen z. B., daß arteigenes, eben defibriniertes Blut (Moldovan), Extrakte aus artgleichen Organen etc. von der Subcutis oder vom Peritoneum aus in beträchtlichen Mengen glatt vertragen werden, während geringe Volumina bei direkter Applikation in die Blutbahn blitzartig töten; dasselbe gilt nach Doerr und Moldovan vom Kieselsäurehydrosol und anderen Kolloïden, bei welchen eine bestimmte (die intravasale) Form der parenteralen Zufuhr als starke Noxe wirkt. Noch weniger erscheint es zulässig, die Giftigkeitsgrade verschiedener Substrate dieser und anderer Art auf Grund der Schädigungen, die ihre intravenöse Einspritzung beim Kaninchen involviert, miteinander zu vergleichen, und von denselben eine bestimmte Folgeerscheinung, wie z. B. die „unspezifische Antikörpersekretion“ abhängig zu machen. Der Meerschweinchenharn ist so toxisch wegen seines Gehaltes an Kalisalzen (Busson und Kerschbaum), die Organextrakte enthalten als Noxe ein gerinnungserregendes Ferment (Cytosym), bei den Bakterien sind Endotoxine die Träger der Giftwirkung usf. Es bleibt weiter auch unverständlich, warum Friedberger in allen diesen Fällen von einem durch „giftige Antigene bedingten Reiz“ spricht, der der Bildung der Hammelhämolysine zu-

erythrocyten agglutinierend wirken. Meistens entbehren sie allerdings auch nach unseren Wahrnehmungen dieser Eigenschaft, was natürlich nur beweist, daß in den Hammelerythrocyten auch Antigene existieren, die in den Orgazellen des Pferdes, Meerschweinchen etc. fehlen. Das wurde indes weder von Forssman und Hintze, noch von Orudschiew oder uns in Abrede gestellt.

grunde liegen soll; die Toxizität des Meerschweinchenharnes haftet, wie erwähnt, bestimmt nicht am Antigen, falls diese Harnart, was ja anzunehmen ist, ein solches enthält, und bei den Organextrakten ist es zumindest unwahrscheinlich, daß das Cytosym, der schädigende Faktor, Antigencharakter besitzt, da man bekanntlich gegen dasselbe nicht immunisieren kann.

Daß übrigens die Giftigkeit eines Substrates mit seiner Fähigkeit, beim Kaninchen die Hammelhämolysinbildung auszulösen, tatsächlich in keinem ursächlichen Zusammenhang steht, läßt sich leicht erweisen.

Am einfachsten wäre es, Harn zu dialysieren; die Toxizität derselben kann dann fast auf Null herabgesetzt (Versuche von Mauthner, H. Pfeiffer an Menschen- und Meerschweinchenharn) oder doch auf jenes Maß reduziert werden, welches durch die restierenden adialysablen Harnkolloide (Abelous und Bardier) bedingt ist. Auch gleichen sich nach eigenen Experimenten die Giftigkeitsdifferenzen verschiedener Harnsorten (Pferde- und Menschenharn) durch die Dialyse völlig aus. Doch sind unsere Versuche, mit salzfreien Harnen Hammelhämolysine resp. toxische Antisera zu erzeugen, noch nicht zum Abschluß gelangt.

Dagegen liegen ausreichende Erfahrungen in dieser Richtung über die Organextrakte vor, welche die Kaninchen, wie hervorgehoben, nur von der Blutbahn aus in höherem Grade schädigen; Forssman hat aber Kaninchen auch subkutan und intraperitoneal mit Organverreibungen immunisiert, und auch bei diesen Methoden, bei welchen die Extrakte aus Meerschweinchen- und Pferdeniere ebensowenig giftig wirken wie die aus Ochsen- und Rattenniere, war nur nach ersteren eine die normalen Grenzen überschreitende Ambozeptorbildung für Hammelerythrocyten zu konstatieren.

Besonders charakteristisch für die vorliegende Frage ist indes das Verhalten von zwei Immunkaninchen, welches im folgenden wiedergegeben ist.

I.

A.

Ein Kaninchen erhält 2 ccm einer Verreibung von 1 g Ochseniere auf 10 ccm NaCl intravenös und erleidet einen schweren Shock, liegt dyspnoisch atmend mit ausgestreckten Extremitäten, starker Protrusio bulbi, zurückgeworfenem Kopf da und erholt sich erst nach ca. 1 Stunde. 5 Tage später wird das gleiche Material in denselben Mengenverhältnissen injiziert und bewirkt eine ebenso intensive Reaktion.

Beim Aderlaß in weiteren 6 Tagen hat das Serum denselben Ambozeptorgehalt für Hammelerythrozyten wie vor der Behandlung und vermag selbst in einer Dosis von 3 ccm Meerschweinchen von 180 g (intravenös injiziert) nicht zu beeinflussen.

Das Kaninchen erhält hierauf neuerlich 2 ccm einer Ochsenniere-emulsion (1:20) intravenös. Auch diesmal (12. Tag) heftiger Shock.

Am 18. und 24. Tag nach Beginn der Immunisierung, also 6 und 12 Tage nach der letzten Organinjektion, wird je ein Aderlaß gemacht. Beide Male ist der Ambozeptorgehalt des Serums unverändert. Die Toxizität ist so minimal, daß selbst 4,0 und 3,2 ccm intravenös Meerschweinchen von 200 g anscheinend nicht im geringsten schädigen.

B.

Kaninchen No. 835 erhält eine einzige Injektion von Meerschweinchenniere intravenös. Die Niere wurde mit dem 20-fachen Volum NaCl fein verrieben und die Emulsion zentrifugiert; die obere giftige Flüssigkeit wurde abgegossen, der Bodensatz nochmals gewaschen und von dem Sediment auf der chemischen Wage 0,02 g abgewogen. Dieses minimale Quantum Organbrei wurde in NaCl-Lösung gespült und quantitativ in die Ohrvene des Kaninchens eingeführt, ohne daß das Tier die mindeste Reaktion darbot.

Der Titer des Normalambozeptors für Hammelerythrocyten betrug vor dieser Injektion 0,04 ccm.

10 Tage später lieferte ein Aderlaß ein Serum, dessen komplettlösende Ambozeptordosis für Hammelerythrocyten nur mehr 0,006 ccm betrug, und nach weiteren 6 Tagen war das Serum des Kaninchens auch schon für Meerschweinchen ziemlich toxisch:

Meerschw.	302,	3	ccm	Serum	835	inaktiv	intrav.	†	3'
"	303,	2	"	"	835	"	"	"	schwerste Sym- ptome, stirbt in 2 Stunden.

Es hatte also das erste Kaninchen, trotzdem es zwei bzw. drei schwere Shockinsulte durch Ochsenniereextrakt durchmachen mußte, weder Ambozeptoren noch toxische Antikörper produziert, während No. 835 in beiden Richtungen positive Resultate lieferte, obzwar es nur eine einzige völlig reaktionslos verlaufene Injektion von Meerschweinchennierensubstanz erhielt. Ueberdies war der Nierenbrei im letzteren Falle durch Waschen vom Extraktgift wenigstens partiell befreit und bloß in der Menge von 20 mg injiziert worden.

Bei den Immunisierungen mit Augenlinsen verschiedener Tiere, über welche R. Pick demnächst berichten wird, hat es sich herausgestellt, daß derartige Emulsionen im allgemeinen sehr gut vertragen werden und daß Giftigkeitsdifferenzen zwischen den Linsensubstanzen verschiedener Species kaum

nachweisbar sind. Doch gibt nur die Behandlung mit Meer-schweinchen-, Pferde- und Hühnerlinse hammelhämolytische und toxische Antisera, nicht aber die Injektion von Rinderlinse.

Ferner wissen wir aus den Angaben von Uhlenhuth, Dold, Loeb, Cesa-Bianchi, Distaso u. a. m., daß die Organextrakte ihre schädlichen Wirkungen für das intravenös injizierte Kaninchen durch langes Stehen, durch höhere Temperaturen, sowie durch Fällung mit absolutem Alkohol (Distaso) einbüßen. Wir haben aber bereits in unserer ersten Mitteilung gezeigt, daß die Pferdeniere weder durch längeres Kochen in physiologischer NaCl-Lösung noch durch andauernde Behandlung mit Alkohol ihr antigenes Vermögen verliert, sondern daß vielmehr sowohl die immunisatorischen Effekte im Kaninchenorganismus wie die spezifische Affinität zum Antikörper *in vitro* gut erhalten bleiben.

Wenn also nur bestimmte Organemulsionen Hammelhämolysine erzeugen, so liegt das jedenfalls nicht daran, daß sie durch ihre Giftigkeit einen unspezifischen Reiz ausüben, der zur gesteigerten Sekretion von Normalantikörper führt. Vielmehr kann dieses Phänomen nur als eine direkte und typische Antigenwirkung bezeichnet und als einer der Beweise aufgefaßt werden, daß die Hammelerythrocyten und die lysinogenen Organzellen eine zum Teil — natürlich nicht in ihrer Totalität — identische Antigenfunktion besitzen. Da die durch Organzellen gebildeten Hammelhämolysine zweifellos echte Antikörper vom Typus der Ambozeptoren sind (Forssman) und da ihre Entstehung im Tiere den bekannten durch v. Dungern ermittelten zeitlichen Gesetzen auf das genaueste folgt (Forssman), so existiert überhaupt nach dem gegenwärtigen Stande der Immunitätslehre nur ein Argument, welches erbracht werden kann und muß, um die Organzellen als wahres Antigen des durch sie gewonnenen Hämolysins betrachten zu dürfen, und das ist die spezifische Bindung der lytischen Ambozeptoren durch die Organzellen *in vitro*. Daß letztere nun tatsächlich erfolgt, ist nach den ausgedehnten Versuchsreihen von Forssman, Orudschiew und uns gar nicht mehr fraglich.

Ganz unabhängig von diesen Ergebnissen ist selbstverständlich die von Friedberger behauptete Möglichkeit,

die schon normalerweise im Kaninchenserum vorkommenden und bei manchen Tieren dieser Art in ganz beträchtlichen Mengen auftretenden lytischen Ambozeptoren für Hammelerythrocyten durch unspezifische Einflüsse zu steigern. Das läßt sich um so weniger von vornherein in Abrede stellen, als Nicolas, Courmont, Gaté und Charlet bei normalen Tieren und Menschen durch Salvarsanbehandlung eine Erhöhung des Agglutinationstiters für Tuberkelbacillen auf das 5—15-fache erzielten, bei Ziegen und Hunden auch eine stärkere Produktion von Typhusagglutinin. Ferner fanden Friedberger und Masuda, Agazzi, Boehncke, in geringerem Ausmaße Reiter u. a., daß die durch spezifische Antigenzufuhr (Toxine, Agglutinogene, Präzipitinogene etc.) eingeleitete Immunkörperbildung durch Salvarsan in ihrer Intensität beträchtlich vermehrt wird.

Bei den Normalambozeptoren des Kaninchens für Hammelblut sahen wir selbst derartige Oscillationen, die, wenigstens zum Teil, gewiß nicht auf Antigenwirkung zu beziehen waren. Kaninchen No. 86 wurde z. B. wiederholt intravenös mit Kieselsäurehydrosol injiziert; der Ambozeptortiter des Serums belief sich während dieser Behandlung einmal auf 0,1, ein anderes Mal auf 0,04 ccm, und schließlich lösten bei gleicher Technik nicht einmal 0,3 ccm komplett. Nach Menschenharnspritzungen, die das Kaninchen wenig schädigen und jedenfalls ungiftiger sind als die von Pferdeurin, stieg der Titer bei einem Tiere von 0,3 ccm (0,2 waren ganz wirkungslos) auf 0,04 ccm komplett und 0,006 ccm inkomplett. Bei drei anderen Kaninchen dagegen, die ungleich höhere Harnquanten (sowohl was die Einzeldosis als das Gesamtvolum anlangt) erhalten hatten, trat keine Aenderung ein.

Stets hielten sich jedoch die Werte in jenen Grenzen, die man auch bei völlig intakten Kontrollen gelegentlich konstatieren kann, und die wir nach unseren eigenen zahlreichen Titrationen bei Normaltieren nach abwärts mit Null, nach aufwärts mit 0,008 ccm fixieren müssen (ca. 40 Beobachtungen); meist waren die durch unspezifische Agentien erzielten Steigerungen geringer und die einfach lösende Ambozeptordosis ging nicht über 0,04—0,02 ccm hinaus. Das Serum von Kaninchen, die entweder von Haus aus hohen Ambozeptor-

gehalt aufwiesen, oder bei denen derselbe durch Injektionen von Kieselsäure, Menschenharn künstlich erhöht worden war, erwies sich im inaktiven Zustande für Meerschweinchen niemals toxisch, was wir hiermit ausdrücklich betonen; Meerschweinchen von 180—200 g vertrugen 4 ccm solcher Sera intravenös ohne alle krankhaften Symptome.

Wie sich die Verhältnisse bei den von Friedberger angeführten Injektionen von Kaninchen mit Kaninchenniere und Kaninchenlunge verhalten, müssen wir bis auf weiteres dahingestellt sein lassen, da uns eigene Erfahrungen darüber vorläufig mangeln und Friedberger selbst noch keine genaueren Angaben gemacht hat. Die nach solchen (art-eigenen) Organextrakten auftretenden Hammelambozeptoren könnten ebensowohl aspezifischen Vorgängen als spezifischer Antigenwirkung ihre Entstehung verdanken; bevor wir jedoch die letztere Möglichkeit, die in den sichergestellten Antigenfunktionen art- und individuumgleicher Gewebe eine Analogie fände, als zutreffend annehmen, müßte klargelegt werden: 1) ob sich die Ambozeptorbildung zeitlich und quantitativ so abspielt wie bei den Antigenen, wobei auch auf die negative Phase zu achten wäre; 2) ob die Ambozeptoren solcher Antisera normale Titerwerte übersteigen; 3) ob sie durch Kaninchenlunge und Kaninchenniere *in vitro* gebunden werden und 4) ob solche Sera eine gesteigerte Giftigkeit für Meerschweinchen besitzen.

Für die Organe des Pferdes, des Meerschweinchens, des Hundes, der Katze, des Huhnes und der Schildkröte sind die geforderten Nachweise durch Forssman, Orudschiew, Amako und uns in positivem Sinne erledigt und damit ihr Antigencharakter sichergestellt.

Die meisten Bedenken hat übrigens die Identität dieser Organantigene untereinander und mit einer bestimmten Antigenkomponente der Hammelerythrocyten erregt. Doch spricht hierfür nicht nur die Tatsache, daß die genannten Organe sämtlich Hammelhämolysine erzeugen und dieselben *in vitro* spezifisch binden, sondern auch der Umstand, daß alle die genannten Substrate toxische Antisera für Meerschweinchen geben, wie das Friedberger und Hartoch für die Hammelblutkörperchen,

Forssman und Hintze für Meerschweinchenorganzellen, Doerr und Pick für Pferde- und Hühnereien festgestellt haben. Im folgenden finden sich noch mehrfache Beiträge in dieser Hinsicht, die sich auf die verschiedenen Organe der Maus und die Leber der Schildkröte beziehen. Auch diese toxischen Antikörper, deren Beziehung zu den Hammelhämolytinen noch nicht mit Bestimmtheit ermittelt werden konnte, lassen sich, wie Forssman und Hintze zeigten und wir bestätigten, durch ihr Antigen im Reagenzglas abbinden; ein Meerschweinchen-Antiserum wurde jedoch ganz im Sinne der Theorie nicht nur durch Meerschweinchen-, sondern auch durch Pferde- und Katzeniere (Forssman und Hintze), ein Pferdenieren-Antiserum nicht nur durch Pferde-, sondern auch durch Meerschweincheniere (Doerr und Pick), beide ferner auch durch Hammelerythrocyten entgiftet.

Schließlich führten wir Experimente aus, denen zufolge nicht nur Meerschweinchen, sondern auch Hühner und Hunde auf die intravenöse Injektion von Pferdenierenantiserum mit schweren Symptomen und akutem Exitus reagieren, und zogen daraus den Schluß, daß jedes Tier, dessen Organe die in Rede stehenden Antigenelemente enthält, durch irgendein Antiserum dieser Gruppe vergiftet werden kann. Dieser Satz ist allerdings richtig, bedarf jedoch gewisser Einschränkungen. Er stellt aber jedenfalls nicht nur die Identität der geprüften Antigene, sondern auch den Mechanismus der primären Antiserumwirkung klar, der sich nach allen diesen Untersuchungen wohl kaum anders deuten läßt als eine anaphylaktische Eiweißantigen-Antikörperreaktion zwischen sessilem, im Zellverband befindlichem Antigen und zugeführtem cytotoxischem Antikörper.

Wir gehen nunmehr zu weiteren Studien über, die wir über dieses Thema angestellt haben.

II.

Bindung der Hammelhämolytine im lebenden Tiere.

Zu diesen wie zu manchen der folgenden Experimente wurde ein Mischserum benützt, welches durch Immunisierung zweier Kaninchen (No. 801 und 830) mit Pferdenieren-Emulsion gewonnen worden war. Beide Kaninchen erhielten am 28. Mai und am 2. Juni je 2 ccm einer Verreibung von 1 g Pferdeniere auf 10 ccm NaCl intravenös und

wurden am 10. Juni entblutet. Das inaktivierte Mischserum löste in der Menge von 0,0008 ccm komplett, partiell auch noch in Dosen von 0,0006 – 0,0004, bei Zusatz von 0,05 ccm konzentrierter Hammelerythrocyten-suspension und 0,05 ccm Meerschweinchenkomplement. 0,4 ccm töteten Meerschweinchen von 200 g akut mit typisch anaphylaktischem Befund.

a)

Von diesem Serum wurde einem großen Meerschweinchen von 400 g 2 ccm in die linke Jugularis injiziert. Nach 5 Minuten zeigte das Tier schwere Symptome, wurde sofort entblutet, das Blut zentrifugiert, das abpipettierte Serum inaktiviert und mit 0,05 ccm Hammelerythrocyten und ebensoviel Komplement auf seinen Ambozeptorgehalt austitriert. Das Resultat war folgendes:

0,3	ø	0,06	ø
0,2	ø	0,04	ø
0,1	ø	0,02	ø
0,08	ø	0,01	ø

b)

Ein Kaninchen¹⁾ von 400 g erhielt ebensoviel Serum 801 + 830 in die Ohrvene und bot keine sichtbaren Krankheitszeichen. Sein Serum gewonnen wie sub a) 5 Minuten nach der Injektion, erhielt den unveränderten Ambozeptor:

0,3	+++	0,06	+++
0,2	+++	0,04	+++
0,1	+++	0,02	+++
0,08	+++	0,01	+++
		0,008	+

c)

Zwei bunten Ratten¹⁾ von 120 g wird je 1,0 ccm Serum 801 + 830 in die linke Jugularis gespritzt. Keine Reaktion. Das eine Tier wird nach 5 Minuten, das andere nach 25 Minuten entblutet, das inaktivierte Serum auf seinen Hammelambozeptor austitriert:

Ratte, getötet

	nach 5 Minuten	nach 25 Minuten
0,1	+++	+++
0,08	+++	+++
0,06	+++	+++
0,04	+++	+++
0,02	+++	+++
0,01	+++	+++
0,008	+++	+++
0,006	+++	++
0,004	+	+
0,002	ø	ø

1) Das Serum des Kaninchens löste vor dem Versuch in der Dosis von 0,3 ccm nicht. Bei den bunten Ratten war das Serum nicht auf Normalambozeptoren geprüft worden; bei Ratten der gleichen Art und Größe war aber die Untersuchung negativ ausgefallen.

Der Ambozeptor des Pferdenierenantiseraums verschwindet demnach beim Meerschweinchen, dessen Organe ein entsprechendes Antigen enthalten, sofort aus der Zirkulation, und ist im Momente des Auftretens krankhafter Erscheinungen nicht mehr nachweisbar, was eben darauf hindeutet, daß die letzteren durch die Bindung des Antikörpers an das Eiweiß von Zellen zustande kommen. Beim Kaninchen, dessen Organe den Ambozeptor in vitro nicht binden, bleibt er auch in vivo erhalten, und zwar wahrscheinlich zur Gänze; nimmt man nämlich an, daß das eingespritzte Immunserum durch das Blut des Kaninchens etwa 20-fach verdünnt wurde, so resultiert ein Absinken des Ambozeptortiters von 0,0008 auf 0,016, welcher rechnermäßige Wert dem gefundenen gut entspricht. Daß die Differenz zwischen Meerschweinchen und Kaninchen nicht darauf zurückgeführt werden kann, daß der verwendete Antikörper für das erstere Tier heterolog, für das zweite homolog war, somit bei diesem weniger schnell eliminiert wurde, lehrt das Verhalten der Ratten, welches dem der Kaninchen gleich; nur war hier der Titer höher, da sich das Verhältnis des Immunserums zur Blutmenge und die dadurch bedingte Verdünnung anders gestalteten.

III.

Antigengehalt verschiedener Organe bei verschiedenen Tieren, gemessen durch ihr Bindungsvermögen für die lytischen Ambozeptoren eines Pferdenierenantiseraums.

Das verwendete Immunserum war das in der vorstehenden Versuchsreihe beschriebene Mischserum der Kaninchen 801 und 830. — Nach 25-facher Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung lösten 0,02 ccm komplett, 0,01 ccm partiell.

Die Organe von eben entbluteten Tieren wurden in Mengen von 1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025 und 0,01 g auf der chemischen Wage abgewogen, in Reibschalen gebracht, sorgfältig zerrieben und die Verreibungen mit je 5 ccm der Immunserumverdünnung verrührt. Die Organ-Serumgemenge kamen, in Eprouvetten abgefüllt, für 1 Stunde in den Thermostaten von 37° C, wurden dann zentrifugiert und die überstehenden Flüssigkeiten auf ihren Ambozeptorgehalt ausgewertet. Besondere Sorgfalt verwendeten wir auf die Reinigung der Reibschalen, da die minimalen Mengen mancher Organe, welche den Ambozeptor zu fixieren vermögen, im Falle des Zurückbleibens kleiner Ueberreste, erhebliche Fehler involviert hätten. Auch haben wir, um die Ergebnisse möglichst einheitlich

zu gestalten, 25—30 Titrationen dieser Art an einem Tag und mit dem gleichen Mischkomplement ausgeführt, hin und wieder auch einzelne Proben wiederholt und stets alle erforderlichen Kontrollröhrchen angesetzt.

Die Resultate sind im folgenden nur so weit angeführt, um daraus die Grenzwerte entnehmen zu können.

A. Homologes Antigen. — Pferdeorgane.

Ambozeptor-Titer	Organe und Menge desselben in Gramm							
	Gehirn (grau)			Leber			Milz	
	1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25	0,25	0,01
0,3	0	+++	+++	0	+++	+++	0	+++
0,2	0	+++	+++	0	+++	+++	0	+++
0,1	0	+++	+++	0	++	+++	0	+++
0,08	0	+++	+++	0	+	+++	0	+++
0,06	0	+	+++	0	Sp.	++	0	+++
0,04	0	Sp.	+++	0	0	Sp.	0	Sp.
0,02	0	0	Sp.	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Niere			Herz			Nebenniere	
	0,05	0,025	0,01	0,1	0,05	0,025	0,1	0,025
0,3	0	+++	+++	Sp.	++	+++	++	+++
0,2	0	++	+++	0	+	+++	+	+++
0,1	0	+	+++	0	Sp.	+++	Sp.	+++
0,08	0	Sp.	+++	0	0	+++	0	+++
0,06	0	0	+++	0	0	+++	0	+++
0,04	0	0	+	0	0	++	0	+++
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Lunge			Kontrolle: 25-fach verd. Ambozeptor				
	0,05	0,025	0,01					
0,3	Sp.	+++	+++	+++				
0,2	0	+++	+++	+++				
0,1	0	++	+++	+++				
0,08	0	+	+++	+++				
0,06	0	Sp.	++	+++				
0,04	0	0	Sp.	+++				
0,02	0	0	0	+++				
0,01	0	0	0	++				

B. Heterologes Antigen. — Meerschweinchenorgane.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Gehirn				Leber			
	1,0	0,5	0,25	0,1	1,0	0,5	0,25	0,1
0,3	0	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++
0,2	0	++	+++	+++	0	+++	+++	+++
0,1	0	0	+	+++	0	+++	+++	+++
0,08	0	0	0	+++	0	Sp.	+++	+++
0,06	0	0	0	+++	0	0	+++	+++
0,04	0	0	0	++	0	0	++	+++
0,02	0	0	0	Sp.	0	0	0	+++
0,01	0	0	0	0	0	0	0	++

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Herz		Lunge			Nebenniere		
	0,05	0,01	0,05	0,01	0,005	0,05	0,025	0,01
0,3	0	++	0	0	+++	0	+++	+++
0,2	0	+	0	0	+++	0	+++	+++
0,1	0	Sp.	0	0	+++	0	++	+++
0,08	0	0	0	0	++	0	++	+++
0,06	0	0	0	0	Sp.	0	+	+++
0,04	0	0	0	0	0	0	Sp.	++
0,02	0	0	0	0	0	0	0	+
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm						
	Niere			Hode		Dickdarm	Kontrolle
	0,05	0,025	0,01	0,05	0,01	0,05 g	
0,3	0	0	+	0	+++	++	+++
0,2	0	0	+	0	+++	+	+++
0,1	0	0	Sp.	0	+++	0	+++
0,08	0	0	0	0	+++	0	+++
0,06	0	0	0	0	+++	0	+++
0,04	0	0	0	0	++	0	+++
0,02	0	0	0	0	0	0	+++
0,01	0	0	0	0	0	0	++

C. Organe der Schildkröte.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm					
	Gehirn		Leber		Herz	
	0,05	0,025	0,1	0,05	0,025	0,01
0,3	0	+++	0	+++	0	+
0,2	0	+++	0	++	0	+
0,1	0	+++	0	+	0	Sp.
0,08	0	++	0	Sp.	0	Sp.
0,06	0	+	0	Sp.	0	0
0,04	0	Sp.	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm					
	Lunge		Niere			Kontrolle
	0,05	0,01	0,05	0,01	0,005	
0,3	0	++	0	0	+++	+++
0,2	0	++	0	0	+++	+++
0,1	0	+	0	0	++	+++
0,08	0	Sp.	0	0	++	+++
0,06	0	0	0	0	+	+++
0,04	0	0	0	0	0	+++
0,02	0	0	0	0	0	+++
0,01	0	0	0	0	0	+

D. Organe des Huhnes.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Gehirn	Leber		Herz			Lunge	
	0,05	0,1	0,05	0,1	0,025	0,01	0,01	0,005
0,3	0	Sp.	+++	0	+++	+++	0	+++
0,2	0	0	++	0	+++	+++	0	+++
0,1	0	0	Sp.	0	+++	+++	0	++
0,08	0	0	0	0	++	+++	0	+
0,06	0	0	0	0	Sp.	+++	0	0
0,04	0	0	0	0	0	+++	0	0
0,02	0	0	0	0	0	+	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambo- zeptor- Titer	Organ und Menge desselben in Gramm					
	Niere			Hode		Kontrolle
	0,1	0,05	0,025	0,1	0,05	
0,3	0	+++	+++	+++	+++	+++
0,2	0	++	+++	+++	+++	+++
0,1	0	++	+++	+++	+++	+++
0,08	0	+	++	++	+++	+++
0,06	0	Sp.	+	+	+++	+++
0,04	0	0	Sp.	0	+++	+++
0,02	0	0	0	0	+	+++
0,01	0	0	0	0	0	+

E. Organe der Katze.

Ambo- zeptor- Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Gehirn grau			Leber		Herz		
	1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,05	0,025	0,01
0,3	0	+++	+++	++	+++	0	+++	+++
0,2	0	++	+++	+	++	0	+++	+++
0,1	0	++	+++	0	++	0	+	+++
0,08	0	++	+++	0	++	0	Sp.	+++
0,06	0	+	+++	0	++	0	0	+++
0,04	0	Sp.	++	0	Sp.	0	0	++
0,02	0	0	+	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambo- zeptor- Titer	Organ und Menge desselben in Gramm						
	Lunge		Niere		Milz		Kontrolle
	0,025	0,01	0,025	0,01	0,025	0,01	
0,3	0	+++	0	+++	0	+++	+++
0,2	0	++	0	+++	0	++	+++
0,1	0	+	0	++	0	+	+++
0,08	0	Sp.	0	+	0	Sp.	+++
0,06	0	0	0	Sp.	0	0	+++
0,04	0	0	0	0	0	0	+++
0,02	0	0	0	0	0	0	+++
0,01	0	0	0	0	0	0	+

F. Organe der Maus.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm							
	Gehirn	Leber	Herz		Lunge			
	1,0	1,0	0,25	0,1	0,5	0,25	0,1	0,05
0,3	+++	+++	+++	+++	Sp.	+	+++	+++
0,2	+++	+++	+++	+++	0	Sp.	+++	+++
0,1	+++	+++	++	+++	0	0	++	+++
0,08	+++	+++	++	+++	0	0	++	+++
0,06	+++	+++	Sp.	+++	0	0	+	+++
0,04	+++	+++	0	++	0	0	0	++
0,02	+	+++	0	Sp.	0	0	0	0
0,01	0	+	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung.

Ambozeptor-Titer	Organ und Menge desselben in Gramm				
	Niere				Kontrolle
	0,25	0,1	0,05	0,025	
0,3	Sp.	+++	+++	+++	+++
0,2	0	+++	+++	+++	+++
0,1	0	+	+++	+++	+++
0,08	0	Sp.	+++	+++	+++
0,06	0	Sp.	+++	+++	+++
0,04	0	0	++	+++	+++
0,02	0	0	Sp.	+	+++
0,01	0	0	0	0	+

Vergleicht man diese Ziffern untereinander, so kann man zunächst sofort erkennen, daß der Ambozeptor des Pferdenieren-Antiserums durchaus nicht durch das homologe Antigen, d. h. durch Pferdeniere oder irgendein anderes Pferdeorgan am besten fixiert wurde, sondern daß die Lunge und Niere des Meerschweinchens, Lunge, Niere und Milz der Katze, die Lunge des Huhnes, Herz, Lunge und Niere der Schildkröte in weit geringeren Gewichtsmengen eine totale Adsorption des Hammelhämolysins herbeizuführen vermochten; so hatte z. B. 0,01 g Meerschweinchenlunge denselben Effekt wie 0,05 g Pferdeniere.

Bei ein und demselben Tier differiert der Antigengehalt der verschiedenen Organe erheblich, und können diese Differenzen das 20-, 50-, ja 100-fache betragen (man vergleiche Leber und Lunge des Meerschwein-

chens, Gehirn und Niere des Pferdes, Leber und Milz der Katze). Das maximale Bindungsvermögen ist nicht bei allen Tieren an dasselbe Organ gekettet; doch wirkten Lunge und Myokard, sowie die Niere in den geringsten Quantitäten, während von der Leber stets, vom Gehirne bei allen Säugetieren relativ beträchtliche Gewichtsmengen erforderlich waren, um den Ambozeptorgehalt der benutzten Immunsorumverdünnung auf Null herabzudrücken. Aus diesen Tatsachen lassen sich gewisse Schlüsse auf den Mechanismus der primären Toxizität der Organantiseren und verwandter toxischer Immunsorum ableiten.

Wir wissen, daß die schädlichen Wirkungen solcher Sera z. B. auf Meerschweinchen darauf beruhen, daß bestimmte in denselben enthaltene Antikörper mit dem in den Organzellen enthaltenen Antigen reagieren, und daß sich diese Bindung *in vitro* nach denselben Gesetzen vollzieht wie die der lytischen Ambozeptoren für Hammelerythrocyten (Forssman und Hintze, Doerr und Pick). Injizieren wir ein toxisches Antiserum subkutan, so bleiben Allgemeinerscheinungen aus, und es entstehen lediglich lokale Infiltrate und Nekrosen (Doerr und Moldovan); wenn sich nach intravenöser Einspritzung foudroyante Symptome und akuter Exitus einstellen, so kann der Unterschied eben nur darin begründet sein, daß in diesem Falle der Antikörper zunächst zu lebenswichtigen Zellkomplexen gelangt und durch diese fixiert wird. Forssman und Hintze, welche dieselbe Auffassung vertreten, sind geneigt, Störungen in den Nervenzentren als kausales Moment anzunehmen. Das ist indes bei der geringen Affinität der grauen Hirnsubstanz zum Antikörper der toxischen Antiseren nicht sehr wahrscheinlich. Viel eher kann man den Sitz des wesentlich pathogenen Anteils der Antigen-Antikörper-Reaktion in die Lunge und das Myokard, vielleicht bei mehr chronischem Verlauf der Vergiftung auch in die Niere verlegen, deren Parenchyme *in vitro* schon in so geringen Mengen die Antikörper an sich reißen. Dazu kommt, daß bei der allgemein gebräuchlichen Injektion der toxischen Antiseren in die Jugularvene dieselben zunächst das rechte Herz und dann die Lunge passieren. Durch diese

Hypothese wird auch die Art der beobachteten Symptome leichter verständlich, insbesondere die konstante Lungenblähung und das ziemlich häufige Auftreten enormer Lungenödeme und mehr minder ausgebreiteter Lungenblutungen (Biedl und Kraus, zahlreiche eigene Versuche). Die Entstehung des Oedems und der pulmonalen Hämorrhagien sind bei den primär toxischen Immun- und Normalsera jedenfalls nicht durch das größere Volum der Injektionsflüssigkeit bedingt, wie das Friedberger und Kumagai für typisch anaphylaktische Versuchsanordnungen und die Anaphylatoxinwirkung behaupten; wir haben in ungezählten Experimenten nach 0,4—0,8 ccm massige Oedeme gesehen, in anderen Fällen blieben sie trotz der Injektion von 3 ccm reinen oder durch NaCl-Lösung verdünnten Serums völlig aus und der Obduktionsbefund glich dem Bild, welches bei aktiver Anaphylaxie mit Pferdeserum die Regel ist. Dagegen hatte es den Anschein, als ob gewisse primär toxische Immun- und Normalsera ohne Rücksicht auf die Serumdosis und das injizierte Flüssigkeitsvolum konstant Oedeme erzeugen würden, andere, selbst solche der gleichen Art nicht, da bei der Toxizitäts-Titration bestimmter Serumproben oft entweder alle Meerschweinchen des Reihenversuches mit Lungenödem reagierten oder kein einziges diese Veränderung aufwies.

Endlich klären die im Vorstehenden angeführten Vitro-Versuche das Verhalten der weißen Mäuse auf, das bisher, wie aus unserer ersten Mitteilung zu entnehmen, gewisse Schwierigkeiten darbot.

IV.

Immunisierung von Kaninchen mit Organ- und Tumorzellen der weißen Maus.

a) Mäuse-Niere.

Kan. No. 828 hat vor der Behandlung einen Serumtiter von 0,04 + + +, 0,02 + +, 0,01 Spur. Es erhält am

29. III. 2 Mäuse-Nieren, emulgiert in 5 ccm NaCl intravenös.

5. IV. 2 Mäuse-Nieren, emulgiert in 5 ccm NaCl intravenös.

12. IV. Erster Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,002 + + +, 0,001 +.

Toxizität: Meerschw. 573. 2,4 ccm Serum 828 iv., leichte Symptome.

16. IV. 1 Maus-Niere (in Emulsion gebracht) intravenös.

22. IV. Zweiter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,001 + + +, 0,0008 Spur.

Toxizität: Meersch. 583. 2,0 ccm Serum 828 iv., + 5',
Lungenödem.

Meersch. 584. 1,0 ccm Serum 828 iv., leichte
Symptome.

b) Mäuse-Hirn.

Kan. No. 893. Normalambozeptor nicht nachweisbar.

2. IV. Ein Drittel eines Mäusehirnes + 9 NaCl intravenös.

7. IV. Ein Viertel Mäusehirn + 4 NaCl iv.

14. IV. Erster Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,0006 + + +, 0,0002 +.

Toxizität: Meersch. 586, 2,4 ccm iv., keine Symptome.

Meersch. 587, 2,4 ccm iv., keine Symptome.

16. IV. Ein Sechstel Mäusehirn.

22. IV. Zweiter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,0004 + + +.

Toxizität: Meersch. 589, 215 g, 2,0 ccm i.v., + 8',
Lungenödem.

Meersch. 590, 205 g, 1,0 ccm iv., keine Sympt.

29. IV. 0,15 g Mäusehirn + 5 ccm NaCl.

5. V. Dritter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,0008 + + +.

Toxizität: Meersch. 591, 200 g, 2,0 ccm iv., + 6', Oedem.

Meersch. 592, 200 g, 1,0 ccm iv., leichte Sympt.

c) Mäuse-Carcinom.

Kan. 861. Normalambozeptor auch in hohen Dosen Serum (0,1—0,3) nur
spurweise.

28. III. 0,1 g Mäuse-Carcinom + 5 NaCl intravenös.

4. IV. 0,2 g Mäuse-Carcinom + 5 NaCl intravenös.

12. IV. Erster Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,008 + + +, 0,004 +, 0,002 Spur.

Toxizität: Meersch. 600, 195 g, 2,0 ccm i.v., + 10',
Lungenödem.

Meersch. 601, 200 g, 1,0 ccm iv., + 10',
Lungenödem.

Meersch. 602, 200 g, 0,6 ccm iv., mittelschwere
Symptome, erholt sich, verendet in 30^h.

14. IV. Zweiter Aderlaß (längeres Intervall seit der Antigen-
zufuhr).

Hammelambozeptor: 0,002 + + +, 0,001 +, 0,0008 Spur.

16. IV. 0,1 g Mäuse-Carcinom + 5 ccm NaCl intravenös.

22. IV. Dritter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,002 +++, 0,001 +.

Toxizität: Meerschw. 604, 220 g, 1,0 iv., † 7', Lungen-
ödem.Meerschw. 605, 205 g, 0,5 iv., schwerste Sym-
ptome, erholt sich.Meerschw. 606, 205 g, 0,3 iv., mittelschwere
Symptome, erholt sich.

d) Mäuse-Leber.

Kan. No. 847. Normalambozeptor nicht nachweisbar.

29. III. 0,5 g Mäuse-Leber + 5 ccm NaCl intravenös.

5. IV. 0,2 g Mäuse-Leber + 5 ccm NaCl intravenös.

12. IV. Erster Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,004 +++, 0,002 Spur.

Toxizität: Meerschw. 620, 250 g, 2,5 ccm iv., keine Sympt.

16. IV. 0,3 Mäuse-Leber intravenös.

22. IV. Zweiter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,004 +++, 0,002 ++, 0,001 Sp.

Toxizität: Meerschw. 621, 210 g, 2,0 ccm iv., keine Sympt.

29. IV. 0,1 g Leber intravenös.

5. V. Dritter Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,01 +++, 0,008 ++, 0,004 +.

Toxizität: Meerschw. 622, 205 g, 2,0 ccm iv., keine Sympt.

e) Bindung des Ambozeptors des Serum 861 (Mäusecarcinom-
Antiserum) durch Mäuse- und Meerschweinchenorgane.

Serum 861 vom 14. IV. wurde 10-fach mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und je 5 ccm mit 1,0 g Organ verrieben, die Gemenge 1 Stunde bei 37° C belassen, zentrifugiert, die überstehenden Flüssigkeiten auf ihren Gehalt an Hammelambozeptor austitriert. Als Kontrolle diente die 10-fache Serumverdünnung (1 Stunde bei 37°).

Ambo- zeptor- Titer	Bindendes Organ						
	Mäuse- carcinom	Mäuse- hirn	Mäuse- niere	Meerschw.- Niere	Meerschw.- Leber	Meerschw.- Augenlinse	Kon- trolle
0,3	0	0	0	0	0	0	+++
0,2	0	0	0	0	0	0	+++
0,1	0	0	0	0	0	0	+++
0,08	0	0	0	0	0	0	+++
0,06	0	0	0	0	0	0	+++
0,04	0	0	0	0	0	0	+++
0,02	0	0	0	0	0	0	++
0,01	0	0	0	0	0	0	+

f) Bindung des Ambozeptors im Serum 893 (Mäusehirn-Antiserum) durch 0,1 und 1,0 g Meerschweinchenhirn, -leber und -niere.

Versuchsordnung wie oben; nur wurde das Serum 25-fach verdünnt.

Ambozeptor-Titer	Bindendes Organ und Menge desselben						Kontrolle
	Niere		Hirn		Leber		
	0,1 g	1,0 g	0,1 g	1,0 g	0,1 g	1,0 g	
0,3	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,2	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,1	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,08	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,06	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,04	0	0	+++	0	+++	0	+++
0,02	0	0	+	0	+++	0	+++
0,01	0	0	Sp.	0	+	0	++

Organ- und Tumorzellen der Maus binden also nach den sub III angeführten Versuchen den hammelhämolytischen Ambozeptor eines Pferdenieren-Antiserums vom Kaninchen in vitro.

Eine scheinbare Ausnahme macht nur die Leber: Doch ist zu bedenken, daß höhere Mengen als 1 g auf ihr Bindungsvermögen nicht untersucht wurden; nun besteht beim Meerschweinchen zwischen der bindenden Kraft der Leber und der Niere eine etwa 50-fache, beim Pferde eine 20-fache Differenz, und da die Mäuseniere erst in der Dosis von $\frac{1}{4}$ g die gewählte Ambozeptorverdünnung unwirksam machte, so wäre von der Leber der Maus der gleiche Effekt erst bei mehreren Grammen zu erhoffen oder man müßte, um das spurenweise vorhandene Antigen zu demonstrieren, kleinere Quantitäten des Ambozeptors in Reaktion bringen.

Gering, aber immerhin erkennbar ist die spezifische Bindung durch Mäusehirn. Hier wäre übrigens zu berücksichtigen, daß bei den größeren Tieren nur die grauen, zellreichen Hirnanteile antigenhaltig sind, das weiße Marklager nicht oder nur in minderm Grade (Doerr und Pick), und daß bei der Maus eine mechanische Trennung der grauen von der weißen Substanz bei Anstellung der vitro-Versuche nicht durchgeführt wurde; daher fielen die Werte auch relativ niederer aus.

Dementsprechend entstehen nach der Immunisierung von Kaninchen mit Organ- oder Tumorzellen der weißen Maus hammelhämolytische Ambozeptoren (wie bereits Morgenroth angibt) und toxische Antikörper für Meerschweinchen.

Die Ambozeptoren der Mausorgan-Antisera wurden nicht nur durch Mäuseorgane und Mäusetumor *in vitro* fixiert, sondern auch durch die Organe des Meerschweinchens, von welcher letzteren wieder die Niere ungleich stärker wirkte als die Leber, Verhältnisse, die sich kaum anders als im Sinne der Identität des in den Organparenchymen verschiedener Tiere enthaltenen Antigens deuten lassen¹⁾.

Nun reagiert aber die weiße Maus nicht auf die intravenöse Injektion relativ hoher Dosen Pferdenieren-Antiserum, selbst wenn diese zur Tötung eines Meerschweinchens von 200 g ausreichen (siehe unsere erste Mitteilung). Wir haben diesen Widerspruch in der Weise aufzuklären gesucht, daß wir zeigten, daß Pferdenieren-Antiserum durch die Adsorption mit Mäuseorganen für Meerschweinchen nicht entgiftet wird, daß also der toxische Antikörper in der Maus kein Antigen hat; daraus würde sich in weiterer Konsequenz ergeben, daß toxische Antikörper und Hammelambozeptoren resp. die korrespondierenden Antigene voneinander zu trennen sind. Das ist indes nicht richtig.

Wir bedienten uns zu den Entgiftungsexperimenten gleicher Gewichtsmengen von Organen der weißen Maus und des Meerschweinchens (eines ganzen Grammes) und verrieten dieselben mit 4 letalen Dosen Antiserum. Unter diesen Umständen war die mit Meerschweinchenorganen behandelte Serumprobe atoxisch geworden, die mit Mäuseorganen in Kontakt gebrachte hatte ihre Giftigkeit konserviert. Aendert man jedoch die Mengenverhältnisse, indem man mehr letale

1) Auffallend ist, daß der Hammelambozeptor eines Mäuse-Antiserums (No. 861) durch Mäusehirn bedeutend stärker adsorbiert wird, als der eines Pferdenieren-Antiserums. Mäusehirn enthält indes Mäuseserum, Mäuseerythrocyten etc., welche korrespondierende Ambozeptoren erzeugen, die miteinander auch *in vitro* reagieren und die Bindung der Hammelambozeptoren an das Organantigen verstärken; bei Organen mit größerem Gehalt an Hammellysinogen (Pferd, Meerschweinchen) treten diese Begleitfaktoren zurück, und die homologen Gewebe binden dann oft, wie gezeigt wurde, schwächer als die heterologen.

Serumdosen oder weniger Meerschweinchenorgan nimmt, so erreicht man sehr bald eine Grenze, jenseits welcher auch die bindende Kraft der letztgenannten Zellarten versagt. Da aber die Mäusezellen um so viel schlechter den Hammelambozeptor adsorbieren als die des Meerschweinchens, so darf man von ersteren kein derartiges Bindungsvermögen für die giftige Komponente voraussetzen, als wir das ursprünglich getan. Reduktion der zu entgiftenden Serumquantität, Erhöhung der Mäuseorgandosis läßt die stattgefundene Verankerung des toxischen Antikörpers sofort deutlich hervortreten.

Das refraktäre Verhalten der weißen Maus muß demnach andere Gründe haben, und zwar lassen sich zwei Möglichkeiten konstruieren. Es könnte sein, daß jede Mauszelle so wenig Antigen enthält, daß selbst bei Zufuhr großer Mengen Antikörper nur schwache Reaktionen der beiden Kolloide im Zellinneren stattfinden, und daß die dadurch bedingte Störung des chemisch-physikalischen Gleichgewichtes so unbedeutend wird, daß eine Reversion zur Norm durch Säftestrom und Stoffwechsel leicht statthaben kann. Oder die Antigen-Antikörperreaktion zeigt bei der Maus (vielleicht infolge des zu geringen Antigengehaltes ihrer Zellen) einen anderen zeitlichen, nämlich trägeren Ablauf als bei der mit Antigen übersättigten Meerschweinchenzelle; auch dieser Umstand könnte, wie nicht weiter auseinandergesetzt zu werden braucht, ein Ausbleiben akuter, shockartiger Symptome involvieren. Eine derartige verminderte „Avidität“ wäre dem Nachweis im vitro-Versuch zugänglich; wir kommen in unserer nächsten Veröffentlichung darauf zurück.

Analoge Gesichtspunkte sind auch für die Empfindlichkeitsdifferenzen anderer warmblütiger Tiere maßgebend. Wenn das Huhn und der Hund gegen ein bestimmtes toxisches Antiserum (unter Berücksichtigung des Körpergewichtes) resistenter sind als das Meerschweinchen, so muß das nicht notwendigerweise auf qualitative, von der Species abhängige, ihrem Wesen nach unaufgeklärte Differenzen der Reaktionsintensität auf den gleichen Reiz basiert, sondern kann vielleicht auch darin begründet sein, daß sich der Reiz bei jeder Tierart je nach dem Antigengehalt der einzelnen Zelle anders gestaltet, quantitativ variiert.

V.

Immunisierung mit Schildkröten-Leber.

Schildkrötenorgane erzeugen und binden Hammelambozeptoren (Amako, Doerr und Pick). Fraglich war es, ob diese Antisera für Meerschweinchen toxisch sind, und ob speziell die Schildkröten-Leber, die in vitro bedeutend besser den Ambozeptor eines Pferdenierenantiseraums fixiert als die Leber des Meerschweinchens oder gar der Maus, auch in vivo ihre höhere Antigenfunktion dokumentiert. Das Resultat der in dieser Richtung unternommenen Versuche war positiv.

Kan. No. 845 hat vor der Behandlung einen Serumtiter von 0,04 ccm für Hammelambozeptoren.

Es erhält am 18. VI. 0,01 g und am 24. VI. 0,02 g Schildkröten-Leber in NaCl emulgiert, intravenös.

Am 1. VII. Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,0004 + + +.

Toxizität: Meerschw. 751, 200 g, 0,4 ccm Serum 845 inakt. intravenös: † 10', starkes Lungenödem.

Meerschw. 752, 180 g, 0,2 ccm Serum 845: somnolent, erholt sich.

VI.

Erzeugen auch gekochte Hammelerythrocyten toxische Antisera?

Die Beantwortung bot insofern Interesse, als die Organantigene durch Kochen nicht verändert bzw. zerstört werden (Doerr und Pick); wenn die Hammelerythrocyten dasselbe Antigen enthalten, so mußten sie sich in dieser Beziehung gleich verhalten.

Kan. No. 810 wird intravenös mit Hammelerythrocyten immunisiert, welche zwei Stunden in größeren Mengen physiologischer NaCl-Lösung gekocht, dann zentrifugiert wurden.

3. III. 1 ccm Suspension von gekocht. Hammelerythrocyten intrav.

8. III. 0,5 „ „ „ „ „ „

12. III. 1,0 „ „ „ „ „ „

18. III. Aderlaß.

Hammelambozeptor: 0,00008 + + +.

Toxizität: Meerschw. 757, 200 g, 1,0 ccm Ser. 810 inakt. iv. † 1'

„ 758, 160 g, 0,4 „ „ 810 „ „ † 2'

„ 759, 175 g, 0,2 „ „ 810 „ „ † 2'

„ 760, 160 g, 0,1 „ „ 810 „ „ schwerste Sympt., verendet in mehreren Stunden.

Diese Kokto-Antisera waren demnach ebenso giftig wie die durch native Hammelerythrocyten gewonnenen. Gekochte Hammelblutkörperchen wirkten auch in der Epruvette antigen, und zwar nicht nur auf Ambozeptoren homologer, sondern auch heterologer Sera dieser Gruppe, z. B. eines Pferdenieren-Antiserums (Doerr und Pick).

VII.

Toxische Normalsera.

Die Toxizität normaler, komplementhaltiger, d. h. frischer Sera hat man in der Regel mit ihren hämolytischen Wirkungen auf die Erythrocyten der vergiftbaren Tierspecies in Konnex gebracht. Nachdem die Hypothese Friedbergers über das Entstehen anaphylaktischer Gifte durch den Abbau von Eiweißantigen mit Hilfe von Ambozeptor und Komplement Anklang gefunden, und Friedemann das Bestehen einer Erythrocytenanaphylaxie nachgewiesen, war der nächste Schritt natürlich der, daß man auch bei den giftigen Normalsera an eine „Anaphylatoxin“-Bildung aus den Blutkörperchen der empfänglichen Tierspecies dachte, wobei als eiweißspaltende Faktoren Normalambozeptoren und Komplemente in Betracht kommen sollten (Doerr und Moldovan).

Uhlenhuth, Friedberger, Zinsser, Camus und Gley u. a. m. haben aber darauf aufmerksam gemacht, daß gewisse Erfahrungen dieser Anschauungsweise zuwider laufen. Camus und Gley z. B. überzeugten sich, daß Aalserum für die Katze noch etwas giftiger ist als für das Kaninchen, während es Katzenerythrocyten *in vitro* gar nicht, Kaninchenerythrocyten in den stärksten Verdünnungen und mit großer Schnelligkeit löst. Zinsser wieder fand, daß das für Kaninchen giftige Ziegenserum durch den Kontakt mit großen Mengen Kaninchenerythrocyten nicht ungiftiger wird, daß also wohl hämolytische Normalambozeptoren nicht die Ursache der schädigenden Wirkung auf die genannte Tierart sein können.

Ebensowenig konnte die Theorie auf die Dauer verteidigt werden, welche die (*in vitro* demonstrable) Hämagglutination zum Ausgangspunkt wählte, und den akuten Exitus in der Weise zustande kommen ließ, daß die Erythrocyten intravasal verklumpt werden, und daß dadurch Obturationen wichtiger Gefäße speziell der Lunge entstehen, die durch sekundäre

Thrombose eine Steigerung erfahren (Kraus, Loeb, Strickler und Tuttle etc.). Abgesehen davon, daß nach Kraus und Sternberg Hämagglutinationen, selbst wenn man sie durch Immunsera provozieren will, nicht innerhalb des strömenden Blutes, sondern erst extravasal sichtbare Grade erreichen, wies Zinsser darauf hin, daß Ziegenserum durch das Inaktivieren wohl seine Giftigkeit für Kaninchen, nicht aber seine agglutinierenden Fähigkeiten für die Erythrocyten dieses Tieres einbüßt.

Es hätte keinen Zweck, an dieser Stelle die anderen, neueren Erklärungsversuche Revue passieren zu lassen, die Albuminolyse von Zinsser, den anaphylaktischen Index von Friedberger und Mita usw. Wir möchten nur betonen, daß sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Autoren stets das Bestreben geltend machte, die Giftigkeit der Normalsera mit der primären Toxizität der Immunsera von einem gemeinsamen Standpunkt aus zu erfassen. Dazu liegt insofern ein genügender Anlaß vor, als beide von den Venen aus giftiger sind als bei anderen Applikationsmethoden, bei intravenöser Einspritzung die gleichen shockartigen Erscheinungen beim Meerschweinchen erzeugen (Lungenblähung mit Dominieren von Oedem und Hämorrhagien nach Biedl und Kraus, Doerr und Moldovan) und bei subkutaner Zufuhr nekrotisierende Infiltrate herbeiführen (Uhlenhuth, Doerr und Moldovan). Es ist demnach gewiß nicht aussichtslos, wenn wir versuchen, die ausreichend klaren Vorstellungen über den Mechanismus der primären Toxizität der Immunsera, wie sie Forssman und Hintze, Orudschiew und wir geschaffen, auf die Normalsera zu übertragen, d. h. auch das Verständnis ihrer Wirkung nicht auf eine Reaktion zwischen Erythrocyten und hämolytischen Ambozeptoren, sondern zwischen (lebenswichtigen) Organzellen und cytotxischem Antikörper aufzubauen. Dieser Gedanke scheint übrigens schon vor den eben erwähnten Arbeiten aufgetaucht zu sein; so will z. B. Friedemann die nekrotisierenden Effekte der Normalsera wohl durch normale Antikörper derselben erklären, die aber nicht gegen die Erythrocyten, sondern gegen die fixen Zellen der Injektionsstelle gekehrt sind.

Wir haben daher die Experimente über toxische Normalsera wieder aufgenommen und können einstweilen folgendes berichten.

A. Rinderserum.

Zur Orientierung bestimmten wir den Grad der Giftigkeit frischen Rinderserums für verschiedene Tiere in absoluten Zahlen und in Werten, die sich auf 100 g Körpergewicht bezogen. Das Rinderserum wurde aus der Schlachtbank beschafft und stets 24 Stunden nach seiner Entleerung aus den Gefäßen in blutkörperchenfreiem Zustande verarbeitet.

Tierart	Tiergewicht	Menge des intravenös injizierten Rinderserums		Resultat
		in absol. Zahlen	pro 100 g Körpergew.	
Meerschweinchen	180 g	0,4 ccm	0,222 ccm	† 4'
	310 "	0,5 "	0,161 "	† 5'
	190 "	0,3 "	0,158 ¹⁾ "	† 80'
	245 "	0,3 "	0,123 "	ø, überlebt
Kaninchen	495 g	2,0 ccm	0,4 ccm	† 5'
	460 "	1,5 "	0,328 ¹⁾ "	† 5'
	485 "	1,0 "	0,206 "	ø
	1930 "	4,0 "	0,2 "	ø
Huhn	1160 g	2,0 ccm	0,172 ¹⁾ ccm	† 30'
Ratte	100 g	2,0 ccm	2,0 ccm	† 4'
	160 "	1,0 "	0,625 "	† 10', Lungenödem
	160 "	0,5 "	0,312 "	ø, überlebt
Taube	310 g	4,0 ccm	1,29 ccm	† 5'
	310 "	3,0 "	0,967 "	† 8'
	330 "	2,0 "	0,606 "	ø, überlebt

Die Empfindlichkeitsskala hätte also gelautet: Meerschweinchen, Huhn, Kaninchen, Ratte, Taube, und die Verhältniszißern wären 15 : 17 : 32 : 62 : 96 gewesen.

Die Blutkörperchen dieser Tiere werden durch nachstehende Mengen Rinderserum gelöst, resp. verklumpt:

Menge des Rinderserums	Erythrocyten des							
	Meerschw.		Kaninchens		Ratte		Taube	
	Lyse	Agglut.	Lyse	Agglut.	Lyse	Agglut.	Lyse	Agglut.
0,3	+++	+++	+++	+++	ø	+++	++	+++
0,2	+++	+++	+++	+++	ø	+++	+	+++
0,1	+++	+++	+++	+++	ø	+++	ø	+++
0,08	++	+++	+++	+++	ø	++	ø	+++
0,06	+	+++	++	++	ø	++	ø	+++
0,04	+	+++	+	+	ø	+	ø	+++
0,02	ø	+	ø	ø	ø	Sp.	ø	+
0,01	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø

1) Grenzwerte.

Wie schon Camus und Gley für das Aalserum angaben, besteht also auch beim Rinderserum kein Parallelismus zwischen der Giftigkeit für die untersuchten Tierspecies und seiner hämolytischen oder hämagglutinierenden Funktion gegenüber den entsprechenden Erythrocyten.

Die toxische Wirkung des Rinderserums konnte nun durch den Kontakt mit Erythrocyten des Hammels, Meerschweinchens, Huhnes nicht aufgehoben werden, wohl aber durch Adsorption mit den verriebenen Organen des Meerschweinchens, des Pferdes, des Kaninchens und des Huhnes, trotzdem zweifellos *ceteris paribus* die Adsorptionsfläche der gleichmäßig verteilten Blutkörperchen ungleich größer sein müßte als die der Organzellen, die sich selbst bei genauester Verreibung niemals so vollkommen voneinander isolieren lassen.

a) 1. Versuch.

9 ccm konzentrierten Rinderserums wurden mit 1 ccm einer konzentrierten Suspension gewaschener Erythrocyten vermengt oder mit 1 g Organ verrieben, 1 Stunde im Eiswasser stehen gelassen, zentrifugiert und die Toxizität der überstehenden Flüssigkeiten an Meerschweinchen ermittelt.

I. Kontrolle: 9 ccm Rinderserum konzentriert				
II.	9 ccm konzentriertes Rinderserum	+	1,0 ccm Hammelerythrocyten	
III.	9 " " "	+	0,5 " "	
IV.	9 " " "	+	1,0 " Hühnererythrocyten	
V.	9 " " "	+	1,0 " Meerschw.-Erythrocyt.	
VI.	9 " " "	+	1,0 g Hühnerherz.	

Art der inj. Flüssigkeit	Menge	No.	Gewicht	Resultat
I.	0,4 ccm	800	160 g	† 8'
	0,3 "	801	150 "	leichte Sympt., stirbt in 4 Stdn.
II.	0,5 "	802	145 "	† 6'
III.	0,4 "	803	145 "	† 40'
IV.	0,4 "	804	150 "	† 6'
V.	0,4 "	805	140 "	† 5'
VI.	0,5 "	806	145 "	ø
	0,6 "	807	142 "	ø
	1,0 "	808	145 "	† 6'

b) 2. Versuch.

Je 9 ccm konzentriertes Rinderserum verrieben I. mit 1 g Pferdenniere, II. mit 1 g Meerschweinchenniere, III. Kontrolle: 9 ccm Rinderserum. Alle drei Proben 40 Minuten bei 37° C gehalten, dann zentrifugiert.

Toxizität.

Art	Menge	No.	Gewicht	Resultat
der inj. Probe		d. Meerschweinchens		
I.	1,0 ccm	810	235 g	ø } überleben dauernd
	0,6 "	811	180 "	
	0,4 "	812	190 "	
II.	1,0 "	814	180 "	ø, am nächsten Tag † ø } überleben dauernd
	0,6 "	815	210 "	
	0,4 "	816	170 "	
III.	1,0 "	817	205 "	† 3' † 4' † 9' leichte Symptome, überlebt
	0,6 "	818	175 "	
	0,4 "	819	205 "	
	0,2 "	820	175 "	

c) 3. Versuch.

Je 9 ccm konzentriertes Rinderserum verrieben mit I. 0,5 g Meerschweinchenniere, II. 0,25 g Meerschweinchenniere, III. 0,5 g Pferdeniere, IV. Kontrolle: unverdünntes Serum. — Sonst wie der 2. Versuch.

Art	Menge	No.	Gewicht	Resultat
der inj. Probe		d. Meerschweinchens		
I.	1,2 ccm	830	200 g	leichte Symptome, überlebt ø
	0,8 "	831	215 "	
II.	1,2 "	832	240 "	† 6' † 20'
	0,8 "	833	220 "	
III.	1,2 "	834	180 "	† 5' ø } überleben
	1,0 "	835	205 "	
	0,8 "	836	205 "	
IV.	0,8 "	837	235 "	† 6' † 10'
	0,6 "	838	250 "	

d) 4. Versuch.

I.	9 ccm konz. Rinderserum	+ 1 g Kaninchenniere
II.	9 "	+ 1 " "
III.	9 "	+ 1 " Hühnerniere
IV.	9 "	+ 1 " Hühnerleber
V.	9 "	+ 1 " Hühnerherz
VI.	9 "	+ 1 " Rattenniere
VII.	Kontrolle.	

Es wurde sowohl das konzentrierte, wie das verdünnte Rinderserum, nachdem sie solange wie die Organmenge gestanden hatten, auf die Giftigkeit ausgewertet. Da die Werte identisch, sind die folgenden Dosen sämtlich auf konzentriertes Serum bezogen. Es ist jedoch selbstverständlich zu berücksichtigen, daß in II—VI die Bindung bei der geringeren Serummenge besser erfolgen konnte, als in No. I.

Art der inj. - Probe	Menge	No.	Gewicht	Resultat
		d. Meerschweinchens		
I.	1,0 ccm	840	220 g	† 5'
	0,9 "	841	186 "	† 6'
	0,6 "	842	190 "	schwere Symptome, überlebt
II.	0,9 "	843	200 "	∅
	0,8 "	844	235 "	∅ } überleben dauernd
	0,6 "	845	215 "	∅ }
III.	1,2 "	846	180 "	† 3'
IV.	1,2 "	847	180 "	† 5'
V.	1,2 "	848	180 "	∅, überlebt
VI.	1,2 "	849	208 "	† 12'
	1,0 "	850	190 "	† 9'
	0,8 "	851	170 "	† 20'
VII.	1,0 "	852	220 "	† 3'
	0,8 "	853	235 "	† 6'
	0,6 "	854	250 "	† 10'

B. Aalserum.

Je 5 ccm 250-fach verdünnten Aalserums werden mit 0,5 ccm konzentrierter Erythrocytensuspension versetzt oder mit 0,5 g Katzen- oder Kaninchenniere verrieben. Alle Röhrchen, sowie die Kontrolle 1 Stunde bei 37° C.

I. Aalserumverdünnung als Kontrolle.

II.	"	+ 0,5 ccm Meerschw.-Erythrocyten.
III.	"	+ 0,5 ccm Kaninchenerythrocyten.
IV.	"	+ 0,5 ccm Katzenerythrocyten.
V.	"	+ 0,5 g Meerschweinchenniere.
VI.	"	+ 0,5 g Katzenniere.
VII.	"	+ 0,5 g Kaninchenniere.

Art der injizierten Probe	Menge	No.	Gewicht	Resultat
		des intrav. injizierten Meerschweinchens		
I.	1,5 ccm	860	210 g	† 6'
	1,0 "	861	200 "	schwere Symptome, erholt sich
II.	1,5 "	862	182 "	† 3'
	1,3 "	863	207 "	schwere Symptome, erholt sich
III.	1,5 "	864	218 "	schwere Symptome, † nach 24 ^b
	1,5 "	865	180 "	dgl.
IV.	1,5 "	866	200 "	† 5'
V.	2,0 "	867	214 "	∅
	1,7 "	868	180 "	∅ } überleben dauernd
VI.	3,0 "	869	180 "	∅, überlebt dauernd
VII.	3,0 "	870	195 "	keine Sympt., geht nach 24 ^b ein.

Nimmt man zu demselben Experiment nur eine 50-fache Aalserumverdünnung, so äußert sich die Entgiftung nur bei feiner Abstufung der Dosierung und verschwindet bei höheren Serumkonzentrationen scheinbar ganz; es verhalten sich diese Dinge etwa so, wie die Dekoloration von Farbstofflösungen durch eine fixe Menge irgendeines Adsorbens, die bei verdünnten Solutionen deutlich sichtbar ist, bei konzentrierten ohne Anwendung besonderer Hilfsmittel nicht manifest wird, obschon sie zweifellos stattgefunden hat.

In den Schlußfolgerungen aus diesen Versuchen mit Normalserum möchten wir indes doch vorsichtig sein, da die Toxizität der Normalsera insofern von der der Immunsera abweicht als sie durch Erwärmen auf 56° C, durch längeres Stehen etc. verschwindet, also durch einen Körper bedingt ist, der entweder thermolabil ist oder doch eine thermolabile Komponente enthält. Sollte derselbe tatsächlich komplex sein (wie man gemeiniglich sagt, aus Ambozeptor und Komplement bestehen), so wäre natürlich vorab zu entscheiden, ob die Behandlung mit Organbrei den thermostabilen oder den labilen Anteil fixiert oder sonst in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt. Auch gelangen die Entgiftungen der Normalsera nicht so glatt, wie die der toxischen Immunsera; vielleicht eben deswegen, weil die Organe zwar den cytotoxischen Normalambozeptor, mit Hilfe desselben aber auch den thermolabilen Faktor (Komplement) binden, und zwar je nach den Versuchsbedingungen in wechselndem Grade.

VIII.

Entgiftung der toxischen Antisera im empfindlichen Tier.

Beruhend die Giftwirkungen primär toxischer Sera auf einer Bindung ihrer Antikörper an das in den Zellen der vergiftbaren Tiere enthaltene Antigen, so könnte man erwarten, daß die präventive Injektion eines gut bindenden Organbreies in die Blutbahn schützend wirkt.

Das trifft, allerdings in sehr bescheidenen Grenzen, tatsächlich zu.

A. Rinderserum.

Kontrolle:

- Meerschw. 900, 240 g, 0,6 ccm Rinderserum iv.: † 5'.
 „ 901, 220 g, 0,4 ccm Rinderserum iv.: schwere Symptome, † 50'.
 „ 902, 220 g, 1,5 ccm Extrakt resp. Verreibung von 1 g Meerschweinchenniere auf 20 ccm NaCl iv.: †.

Präventive Injektion von Organbrei:

- Meerschw. 903, 220 g, 1,0 ccm Nierenextrakt in die linke, nach 5' 0,4 ccm Rinderserum in die rechte Jugularis: †.
 Meerschw. 904, 220 g, 1,5 ccm Nierenextrakt in die linke, nach 2' 0,6 ccm Rinderserum in die rechte Jugularis: † 4'.

Injektion eines eben hergestellten Gemisches:

- Meerschw. 905, 240 g, 1,5 ccm Nierenextrakt + 0,6 ccm Rinderserum: †.
 „ 906, 240 g, 1,5 ccm Nierenextrakt + 0,5 ccm Rinderserum: †.
 „ 907, 210 g, 1,5 ccm Nierenextrakt + 1,0 ccm Rinderserum: † 4'.

B. Pferdenieren-Antiserum.

Kontrollen:

- Meerschw. 910, 180 g, 0,2 ccm Serum iv.: †.
 „ 911, 180 g, 0,3 „ „ „ † 5'.
 „ 912, 180 g, 0,4 „ „ „ † 5'.
 „ 913, 220 g, 0,4 „ „ „ schwerste Symptome, agonal.

Präventive Injektion von Meerschweinchen-Nierenextrakt
(2 g : 20 NaCl):

- Meerschw. 914, 230 g, 2 ccm Nierenextr. links iv., rechts 0,3 ccm Ser. iv.: †.
 „ 915, 210 g, 3 ccm Nierenextr. links iv., rechts 0,4 ccm Ser. iv.: †.
 „ 916, 200 g, 2 ccm Nierenextr. links iv., rechts 0,4 ccm Ser. iv.: † 5'.

Der Schutzwert ist also gering, wenn auch vorhanden; gering wohl deshalb, weil die Organpartikelchen sofort durch den Blutstrom fortgerissen werden, und, wenn man das toxische Serum nachschickt, die Bahn durch Herz und Lunge wieder frei ist. Ist die Avidität des Antikörpers zu den Organzellen groß, und das kann man beim Meerschweinchen wohl behaupten, dann wird er nicht erst in der Zirkulation kreisen, bis seine Absättigung durch die vorinjizierten Organzellen erfolgt ist, sondern sofort an die nächsten fixen Gewebelemente (als solche kommen schon das Endokard und das Endothel der Lungengefäße in Betracht) herantreten. Ferner kommt auch die Massenwirkung der ungeheuren Mengen von Zellen des Tieres gegenüber den wenigen prophylaktisch in-

20*

jizierten in Rechnung; bei letzteren muß man wegen der Giftigkeit der Organextrakte und der Gefahr der Embolie stets ein gewisses Maß einhalten. Schließlich könnte das Antigen der lebenden Zelle avider sein, als das der zertrümmerten oder doch abgetöteten.

IX.

Uebergreifen von Harnpräzipitinen im Sinne der Verwandtschaft der Organantigene.

Kaninchen No. 813 intravenös immunisiert mit Pferdeharn: 15. IV., 17. IV., 22. IV., 5. V., 6. V. je 5 ccm; 15. V. 26 ccm. 27. V. Aderlaß.

Kaninchen No. 808 intravenös immunisiert mit Menschenharn: am 15., 18., 23. und 28. IV., am 5., 6. und 13. V. je 8, am 16. V. 24 ccm iv. Am 25. V. Aderlaß.

Präzipitine für Menschen-, Pferde- und Rinderharn.

Je 1 ccm Harn versetzt mit 0,1, 0,2 und 0,4 ccm Serum 813, 808 und Normal-Kaninchenserum.

	Menschenharn			Pferdeharn			Hundeharn			Rinderharn		
	813	808	N.-S.	813	808	N.-S.	813	808	N.-S.	813	808	N.-S.
0,1	θ	θ	θ	+++	θ	θ	++	θ	θ	θ	θ	θ
0,2	θ	θ	θ	+++	θ	θ	++	θ	θ	θ	θ	θ
0,4	θ	θ	θ	+++	θ	θ	++	θ	θ	θ	θ	θ

Meerschweinchen-, Pferde- oder Menschenserum reagierten weder mit Serum 808 noch Serum 813. Die Mischungen der 50—6400-fachen Eiweißverdünnungen mit 0,1 ccm der Antisera blieben absolut klar.

Leider war es uns aus äußeren Gründen vorläufig unmöglich, diese Experimente, die am sichersten beweisen würden, daß die Organantigene nicht einfach im Kaninchen vorhandene Normalambozeptoren steigern und tatsächlich miteinander nahe verwandt sind, fortzusetzen. Das obige Resultat ist daher mit der Reserve späterer Bestätigung aufzunehmen.

Schließlich noch einige Bemerkungen, die mit der primären Toxizität der Immun- und Normalsera in (wenn auch entfernterer) Beziehung stehen und vielleicht geeignet sind, nach einer oder der anderen Richtung Anregungen zu bieten. Das genannte Problem — dessen Lösung nach unserer Ansicht in befriedigender Weise gelungen zu sein scheint — ist haupt-

sächlich darum so intensiv bearbeitet worden, weil man die primären akuten Serumwirkungen so gut wie allgemein als anaphylaktische Vorgänge betrachtet hat und hoffen durfte, von diesem Angriffspunkt aus das trotz aller Bemühungen noch immer dunkle Wesen der letzteren zu erschließen. Hat sich diese Erwartung nun realisiert oder nicht?

Im Jahre 1910, als gerade Friedberger seine ersten Versuche über das „Anaphylatoxin“ publiziert hatte, schrieb Doerr: „Die neuesten Arbeiten, welche die vitro-Darstellung des anaphylaktischen Giftes realisierten, lassen es als möglich erscheinen, daß sich auch beim anaphylaktischen Tiere die Entstehung des Giftes ohne Intervention von Zellen, also in der Blutbahn vollzieht und daß die Beziehungen zu den giftempfindlichen Geweben erst sekundär hergestellt werden. Es ist aber sehr wohl denkbar, daß eine der Giftkomponenten einen Bestandteil des lebenden Protoplasmas wichtiger Zellelemente bilden kann (sei es nun das Anaphylaktogen oder der Reaktionskörper), und daß bei Zufuhr der anderen Faktoren die Formation des Giftes und daher auch die Intoxikation der Zelle primär im organisierten Zelleibe vor sich geht.“ Heute steht man trotz der großen Arbeitsleistung, die darauf konzentriert wurde, nicht mehr auf dem Standpunkt, daß das Anaphylatoxin unbedingt als das gesuchte, humoral entstehende anaphylaktische Gift zu betrachten sei, und damit ist das wesentlichste Argument zu gunsten eines toxigenen Prozesses, an dem sich nur die Körperflüssigkeiten beteiligen können, erschüttert. Doerr hat dann später (Kolle-Wassermanns Handb., 2. Aufl., und Wiener klin. Wochenschr., 1912) dieser veränderten Sachlage in zusammenfassender Darstellung Rechnung getragen und auf zahlreiche Tatsachen aus der Zeit vor und nach der Entdeckung des Anaphylatoxins aufmerksam gemacht, die sich mit der rein humoralen Hypothese nicht vereinbaren lassen. Inzwischen haben wir in der toxischen Wirkung der Immun- und vielleicht auch der Normalsera Vorgänge kennen gelernt, welche sich so wie die anaphylaktischen zwischen Eiweißantigenen und Antikörper abspielen, von den gleichen pathologischen Reaktionen der Versuchstiere gefolgt sind und bei denen eine

Komponente (das Antigen) im Zellverband steht. Es rollt sich daher neuerlich die auch von anderer Seite gestellte Frage auf, ob nicht manche typisch anaphylaktischen Vorgänge einfach als inverse Prozesse zur primären Toxizität der Immunsera gelten können, d. h. als Reaktionen zwischen einem Antikörper in der Organzelle und einem von außen zugeführten Antigen. Es ist durchaus nicht notwendig, daß diese Frage etwa für die aktive und passive Anaphylaxie gleichsinnig beantwortet werden muß, die ja mannigfache Unterschiede aufweisen, welche Doerr erst betont hat. Wir wollen uns daher mit beiden Formen gesondert beschäftigen.

Die bisher ausgeführten Experimente über aktive Anaphylaxie würden kaum ein Hindernis für die Annahme einer cellulären Störung bilden; ein Meerschweinchen kann maximal anaphylaktisch sein, bevor in seinem Blute Antikörper in größeren Mengen auftreten, und es kann spezifisch überempfindlich bleiben, wenn die Antikörper bereits aus der Zirkulation verschwunden sind. Auch solche Tiere reagieren am stärksten und können mit den kleinsten Antigenmengen getötet werden, wenn man letzteres intravenös zuführt, während subkutane oder intraperitoneale Einspritzungen wenig wirksam sind und nur bei Anwendung größerer Dosen sinnfällige Ergebnisse liefern; das kann nicht daran liegen, daß das Antigen in der Zirkulation sofort auf bedeutende Antikörperquanten stößt, sondern ist wahrscheinlich so zu deuten, daß es durch den Blutstrom rasch und ohne die Einschaltung einer Resorptionszeit zu den antikörperhaltigen, allergischen Zellen gelangt. Noch viel weniger läßt sich die lokale Anaphylaxie für eine Giftbildung außerhalb der Zellen verwerten; wenn Friedberger und Cederberg zeigen, daß Entzündungen und Nekrosen an jeder Stelle des anaphylaktischen Tieres entstehen, an die man das Antigen bringt, so beweist das nicht, daß sich hier ein anaphylaktisches Gift bildet, sondern einfach, daß die allergische, antikörperhaltige Zelle durch den Kontakt mit Antigen schwerer geschädigt wird, als die normale. Wichtig ist, daß bei subkutaner und intraperitonealer Einverleibung von nicht allzugroßen Antigenmengen die Shock-symptome ausbleiben. Wenn lokal und extracellulär anaphylaktisches Gift entsteht, warum wird es nicht resorbiert und

ruft dann Allgemeinerscheinungen hervor? Friedberger meint, daß das „Anaphylatoxin“ in loco zu atoxischen Verbindungen aufgespalten wird. Anstatt sich mit dieser Hilfs-
hypothese über die Schwierigkeit hinwegzusetzen, scheint es indes zweckmäßiger, an eine Bindung des Antigens durch die Zellen zu denken, die nicht nur an der Injektionsstelle, sondern auch auf der Resorptionsbahn stattfinden muß; daher ergeben sich erst bei exzessiven Antigenquanten (subkutan 10 ccm, peritoneal 5 ccm Serum) Ueberschüsse, die noch in die Zirkulation gelangen, mit lebenswichtigen Zellen in Berührung kommen und den Shock auslösen können. Dementsprechend köinzidiert der Eintritt der Allgemeinsymptome mit dem Auftreten von Antigen im Blute (Versuche von Doerr und Pick).

Den eigentlichen Anstoß für die Verfolgung der Idee von der humoralen Genese eines anaphylaktischen Giftes gab übrigens, wie bekannt, die passive Anaphylaxie. Man sollte aber nicht den Grundversuch vergessen, wonach ein Meerschweinchen nicht die mindeste Störung zeigt, wenn man in eine Vene Antikörper, in die andere Antigen oder umgekehrt in möglichst kurzem Intervalle injiziert (Otto, Friedemann). Da ist Antigen, Antikörper und, wie man sich leicht überzeugen kann, auch Komplement vorhanden, alle Bedingungen zur Anaphylatoxinbildung in der Blutbahn sind erfüllt und doch bleiben die Erscheinungen aus, selbst dann, wenn man homologen Antikörper, d. h. Immunserum vom Meerschweinchen benutzt. Nur die präventive Injektion des Antikörpers ergibt ein positives Resultat. Ferner sind die sorgfältigen Versuche von Anderson und Frost zu beachten, wonach die Anaphylaxie bei Meerschweinchen, die man gleichartig passiv präpariert hat, ausbleibt, wenn man ein gewisses Quantum Antigen innerhalb eines bestimmten Intervalles nachspritzt; nach Ablauf dieser Zeit kann dieselbe Antigendosis die passive Anaphylaxie nicht mehr verhindern. Alle diese Momente sprechen in dem Sinne, daß nicht die Anwesenheit des Antikörpers im Blute den überempfindlichen Zustand bedingt, sondern daß derselbe erst in ein gewisses Verhältnis zu den fixen Organzellen treten muß, bevor die Antigenzufuhr

deletär wirkt. Unabhängig von den Ausführungen Doerr's erkannte auch Weil, daß diese Tatsachen den Schlüssel der Anaphylaxiefrage enthalten. Er fand, daß aktiv sensibilisierte Meerschweinchen auf die Antigeninjektion nicht reagieren, wenn man ihnen vorher reichlichen Antikörper (Kaninchenimmenserum) in die Zirkulation bringt; er schließt daraus, daß die anaphylaktische Noxe gar nicht intravasal entstehen kann, sondern daß der zirkulierende Antikörper durch Ab-sättigung des Antigens schützt. Wenn aktiv und passiv präparierte Tiere reagieren, so haben sie eben zu wenig schützenden Antikörper im Blute. Der pathogene Vorgang spielt sich nach Weil auch bei der passiven Anaphylaxie in der Zelle ab, und zwar in der antikörperhaltigen Zelle. Gibt man einem Meerschweinchen große Dosen Normalkaninchenserum, so läßt er sich mit Immenserum desselben Tieres nicht mehr passiv präparieren, weil die Organzellen des Meerschweinchens mit Kanincheneiweiß überladen sind und daher den am gleichen Eiweiß haftenden Antikörper des Immenserums nicht mehr aufzunehmen vermögen. Präpariert man endlich ein Meerschweinchen passiv, so bleibt es zwei Wochen maximal überempfindlich, obwohl gegen Ende dieser Periode auch sein gesamtes Blut nicht mehr genug Antikörper enthält, um ein normales Meerschweinchen passiv zu sensibilisieren.

Diese Versuche von Weil, wenn sie auch noch Lücken und innere Widersprüche aufweisen, dürften einen erheblichen Fortschritt inaugrieren und durch die Emanzipation von den herrschenden Auffassungen vielleicht Aufklärung in Gebiete tragen, die bisher in der Anaphylaxie zwar in Relation gebracht wurden, aber mit der als richtig angenommenen Theorie nicht in Uebereinstimmung gesetzt wurden, z. B. die vielen Formen von passiv nicht übertragbarer Hypersensibilität gegen sichergestellte Antigene, die Beziehung der „Immunität“ zur Anaphylaxie, die Antianaphylaxie u. v. a. Die celluläre Hypothese wird auch durch die Experimente von Schultz und Dale gestützt, welche lehren, daß die isolierte, nicht mehr von Blut gespülte Zelle des aktiv und passiv anaphylaktischen Tieres auf den Antigenkontakt in ungleich heftigerer Weise antwortet als die normale.

Zusammenfassung.

1) Die primäre Toxizität der Organantisera und anderer Immunsera vom Kaninchen ist nicht durch die Giftigkeit der als Antigene verwendeten Substrate bedingt.

2) Die in den Organzellen des Pferdes, Meerschweinchens, des Hundes, der Katze, des Huhnes, der Schildkröte und der weißen Maus, sowie in den Erythrocyten des Hammels erhaltenen Antigene erzeugen sämtlich lytische Ambozeptoren für Hammelerythrocyten und toxische Antikörper für Meerschweinchen, Hühner und Hunde, binden dieselben *in vitro* und werden durch anhaltendes Kochen nicht zerstört. Sie sind daher vorläufig im Sinne der Immunitätslehre als identisch zu betrachten.

3) Das bindende Vermögen der verschiedenen sub 2 genannten Organe variiert *in vitro* innerhalb weiter Grenzen, sowohl was verschiedene Tierspecies als auch was die verschiedenen Organe desselben Tieres anlangt (vgl. auch Forssman, Orudschiew). Die quantitativen Verhältnisse sind für den Ausfall derartiger Bindungsversuche entscheidend.

4) Die relative Unempfindlichkeit der weißen Maus gegen Organantisera, welche für das Meerschweinchen in gleicher Dosis tödlich sind, ist nicht auf das Fehlen von passendem Antigen in den Organen der weißen Maus, sondern auf seine geringe Menge zurückzuführen.

5) Toxische Normalsera werden nicht durch die Erythrocyten der vergiftbaren Tierspecies, wohl aber durch die Organe derselben entgiftet. Vielleicht beruht daher die Normalserumgiftigkeit auf einem ähnlichen Mechanismus, wie die der Immunsera, nämlich auf der Wirkung cytotoxischer Normalantikörper auf fixes Zellantigen.

6) Primär toxische Normal- und Immunsera lassen sich, allerdings nur in der sicher letalen Menge, im Tiere entgiften, wenn man prophylaktisch stark bindendes Organantigen injiziert.

7) Präzipitine für Pferdeharn präzipitieren auch Hundeharn, nicht aber Menschen- oder Rinderharn. Präzipitine für

Menschenharn oder Normalkaninchenserum rufen in Pferde- oder Hundeharn keine Flockung hervor (ein Versuch).

8) Es sprechen manche Tatsachen zugunsten der Annahme, daß die aktive, vielleicht auch die passive Anaphylaxie nicht auf der humoralen Entstehung eines Eiweißabbaugiftes beruhen muß, sondern als intracelluläre Reaktion zwischen Eiweißantigen und Antikörper mit konsekutiven physikalischen Störungen aufgefaßt werden kann. In letzterem Falle wäre der Mechanismus mit dem der primären Serumwirkung identisch und nur insofern invers, als die andere Reaktionskomponente den fixen Zellbestandteil repräsentiert.

Literatur.

- Amako, Zeitschr. f. Chemotherapie, Orig. Bd. 1, 1912, p. 224—320.
Rothacker, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, 1913, p. 491.
Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., 1913.
Friedberger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 18, 1913, No. 3.
Orudschiew, ebenda, Orig., Bd. 16, 1913, p. 268—308.
Loeb, L., ebenda, Orig., Bd. 12, 1912, H. 2.
Distaso, ebenda, Bd. 16, 1913, p. 466—475.
Doerr, ebenda, Referate, Bd. 2, 1910, H. 7 u. 8.
— u. Moldovan, ebenda, Orig., Bd. 7, 1910, H. 3.
Reiter, ebenda, Bd. 15, 1912, p. 116—144.
Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911, p. 78.
— u. Hintze, ebenda, Bd. 44, 1912, p. 336.
Dale, Journ. of Pharmacol. and exp. Therap., Vol. 4, 1913, p. 167—223.
Nicolas, Courmont et Gaté, C. r. Soc. Biol., Bd. 73, 1912.
— — et Charlet, ebenda.
Busson u. Kerschbaum, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 65, 1912, p. 507.
Mauthner, Deutsche med. Wochenschr., 1913.
Cesa-Bianchi, Arch. di farmacolog. sperim. e science aff., 1912.

Nachdruck verboten.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Ueber den Einfluß des Phenols auf die Wassermannsche Syphilisreaktion.

Von Dr. **Ernesto Signorelli.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 14. Juli 1913.)

Seit den Untersuchungen von Sachs und Altmann¹⁾ ist bekannt, daß die Reaktion des Mediums bei der Serodiagnostik der Syphilis eine nicht unerhebliche Rolle spielt. So kann durch geeignete Säurekonzentration das Ergebnis wesentlich im positiven Sinne beeinflußt werden, während Alkali in entgegengesetzter Richtung wirkt und unter Umständen die Wassermannsche Reaktion nicht in Erscheinung treten läßt. Größere Säurekonzentrationen können allerdings, wie Abramow²⁾ gezeigt hat, ebenso hemmend wirken wie geringere Alkalimengen. Jedoch kommt hierbei als wesentlicher Faktor der inaktivierende Einfluß, welchen die saure Reaktion auf die Funktion der beteiligten Komponenten ausübt, in Betracht. Wenn sich die Ergebnisse der genannten Autoren auf die Interferenz starker Säuren und Laugen (Salzsäure und Natronlauge) beziehen, so handelt es sich in den Untersuchungen, über welche ich mir im folgenden zu berichten erlaube, um die Analyse des Einflusses der Karbolsäure auf die Wassermannsche Syphilisreaktion.

Die Frage, in welcher Weise die Karbolsäure die Wassermannsche Reaktion zu beeinflussen vermag, erschien in mehrfacher Hinsicht nicht ohne Interesse. Einmal enthalten ja die ursprünglich empfohlenen und auch heute noch von manchen

1) H. Sachs und K. Altmann, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 14.

2) S. Abramow, Diese Zeitschr., Bd. 8, 1910, p. 145.

Seiten verwendeten wässerigen Organextrakte 0,5 Proz. Phenol. Dann aber hatte sich in Untersuchungen von Bierbaum und Boehncke¹⁾ gezeigt, daß präzipitierendes Milzbrandserum mit Karbolkochsalzextrakten aus normalen Kaninchenorganen in gleicher Weise Komplementbindung ergab, wie mit entsprechenden Extrakten aus Organen von an Milzbrand verendeten Tieren, während analoge Extrakte aus normalen Organen ohne Phenolzusatz im Verein mit dem gleichen Milzbrandserum nicht im geringsten antikomplementär wirkten. Diese Befunde waren die unmittelbare Veranlassung, die Frage näher zu untersuchen, in welcher Weise sich ein Phenolgehalt des Mediums bei der Serodiagnostik der Syphilis geltend macht. Dabei war von vornherein die Möglichkeit denkbar, daß die Wassermannsche Reaktion durch einen Zusatz von Karbolsäure einerseits empfindlicher wird, andererseits ihr charakteristisches Gepräge einbüßt.

Die Wassermannsche Reaktion wurde in der im hiesigen Institut üblichen Weise folgendermaßen ausgeführt: Absteigende Mengen von Extraktverdünnungen²⁾ (Volumen 0,25 ccm) wurden mit je 0,25 ccm 10-fach verdünnten inaktivierten Patientenserums und je 0,25 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums 1 $\frac{1}{4}$ Stunde lang im Brutschrank bei 37° digeriert. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines Gemisches gleicher Teile Hammelblutauflösung und Ambozeptorverdünnung (entsprechend 3—4 Ambozeptoreinheiten). Zur Kontrolle wurden stets absteigende Mengen von Extraktverdünnungen, sowie je 0,25 und 0,5 ccm der 10-fach verdünnten Patientensera ohne weiteren Zusatz mit der gleichen Komplementmenge wie im Hauptversuch digeriert.

Zur Bezeichnung des Grades der eingetretenen Hämolyse werden in den nachstehenden Tabellen die folgenden Abkürzungen gebraucht: k. = komplett, f. k. = fast komplett, st. = stark, m. = mäßig, w. = wenig, Sp. = Spur, Spch. = Spürchen, 0 = null.

Um den Einfluß des Phenols festzustellen, wurde zunächst in der Weise vorgegangen, daß der alkoholische Extrakt einer-

1) Die im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen der genannten Autoren erscheinen demnächst in der Zeitschrift für Infektionskrankheiten usw. der Haustiere.

2) Als Extrakte dienten alkoholische Extrakte aus Rinderherzen, die durch geeigneten Cholestearinzusatz verstärkt waren. Die Verdünnung der Extrakte mit physiologischer NaCl-Lösung erfolgte langsam (fraktioniert).

seits mit 0,85-proz. Kochsalzlösung, andererseits mit einer 0,5 Proz. Karbolsäure enthaltenden 0,85-proz. Kochsalzlösung verdünnt wurde. Dabei ergab sich übereinstimmend eine mehr oder weniger erhebliche Verstärkung der Eigenhemmung der Extraktverdünnungen durch den Phenolzusatz. Einige Versuchsbeispiele sind in Tabelle I notiert.

Tabelle I.

Mengen der 6-fach verd. Extrakte ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und absteigenden Extraktmengen							
	Beispiel I		Beispiel II		Beispiel III		Beispiel IV	
	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol	ohne Phenol	mit Phenol
0,5	f. kompl.	0	mäßig	0	stark	0	f. kompl.	0
0,4	kompl.	mäßig	kompl.	0	kompl.	Spur	kompl.	wenig
0,3	"	kompl.	"	mäßig	"	mäßig	"	kompl.
0,2	"	"	"	f. kompl.	"	kompl.	"	"
0	"	"	"	kompl.	"	"	"	"

Aus der Tabelle ergibt sich übereinstimmend die Steigerung der antikomplementären Extraktfunktion durch Verwendung von Karbol Kochsalzlösung zur Herstellung der Extraktverdünnungen. Ob es sich hierbei um einfache Summation antikomplementär wirkender Faktoren oder außerdem um andere Momente handelt, soll dahingestellt bleiben. Erwähnt sei jedoch, daß das Ergebnis annähernd ebenso war, wenn statt des alkoholischen Organextraktes reiner Alkohol zur Verwendung gelangte. Auch hierbei erwiesen sich die in Karbol Kochsalzlösung bereiteten Alkoholverdünnungen von antikomplementärer Wirkung, obwohl Alkoholverdünnungen in gewöhnlicher Kochsalzlösung sowie Karbol Kochsalzlösung (ohne Alkohol) unter sonst identischen Bedingungen keine Eigenhemmung aufwiesen. Man darf daher annehmen, daß bei der Verstärkung der antikomplementären Extraktwirkung durch Karbolsäure der Alkoholgehalt der Extraktverdünnungen eine wesentliche, wenn auch nicht die alleinige Rolle spielt.

Während nun, wie nicht anders zu erwarten ist, Karbol Kochsalzlösung mit und ohne Alkoholgehalt bei der Wasser-

mannschen Syphilisreaktion sich vollständig unwirksam erweist, ist der Einfluß des Phenols auf die charakteristische Funktion des Extraktes ein unverkennbarer. Dies äußert sich darin, daß bei Verdünnung des alkoholischen Extraktes mit 0,5 Proz. Phenol enthaltender Kochsalzlösung einerseits nicht unerheblich geringere Extrakt Dosen für die positive Reaktion hinreichen, andererseits auch Sera markant positiv reagieren, welche sonst unter gleichen Bedingungen nur ein undeutliches oder negatives Resultat ergeben. Die gewählten Versuchsbedingungen waren dabei, wie im vorhinein erwähnt sei, im allgemeinen nicht die für die positive Wassermannsche Reaktion optimalen. Einmal benutzte ich nämlich meist Extrakte, welche die für die diagnostischen Untersuchungen zur Verfügung stehenden besten Extrakte an Stärke der charakteristischen Wirkung nicht erreichten, wenn sie auch als recht brauchbar gelten konnten. Um die Interferenz des Alkohols herabzusetzen, wurden zudem oftmals 15-fache Extraktverdünnungen herangezogen an Stelle der 6-fachen, welche sonst der Praxis im hiesigen Institut dienen.

Dann aber standen für die vorliegenden Versuche auch nicht immer frische Sera zur Verfügung, vielmehr nicht selten solche, die nach der früheren Untersuchung bereits einen oder mehrere Tage gelagert hatten. Für die Frage, um deren Beantwortung es sich handelte, durften diese Faktoren aber bedeutungslos erscheinen. Wenn auch derart die Versuchsbedingungen für eine Verstärkung der Reaktion einen größeren Spielraum boten, so können die erhaltenen Ergebnisse nach den gewonnenen Erfahrungen im Prinzip auch für die optimalen Versuchsbedingungen Geltungsbereich beanspruchen.

Um den Einfluß, den das Verdünnen des Extraktes mit Karbol Kochsalzlösung ausübt, zu illustrieren, gebe ich in der folgenden Tabelle II einige dem Versuchsprotokoll eines Tages entnommene Beispiele wieder.

In Teil A der Tabelle wurde der Extrakt mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, in Teil B mit 0,5 Proz. Phenol enthaltender physiologischer Kochsalzlösung. C enthält die zugehörigen Extraktkontrollen.

Tabelle II.

Mengen der 6-fachen Extraktverdünng. ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum, absteigenden Extraktmengen und der Patientensera									
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k
A. Ohne Phenol.										
0,25	0	0	Spch.	Spch.	stark	0	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
0,15	0	Spch.	Spur	kompl.	f. k.	0	"	"	"	"
0,1	0	Spur	f. k.	"	kompl.	0	"	"	"	"
0	kompl.	kompl.	kompl.	"	"	kompl.	"	"	"	"
B. Mit Phenol.										
0,25	0	0	0	0	Spch.	0	0	Spch.	kompl.	kompl.
0,15	0	0	0	0	Spur	0	wenig	mäßig	"	"
0,1	0	0	0	Spur	wenig	0	stark	stark	"	"
0	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	"	"

C. Extraktkontrollen.

Mengen der 6-fachen Extraktverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen des Extraktes. Die Extraktverdünnung war hergestellt	
	ohne Phenol	mit Phenol
0,5	komplett	0
0,4	"	fast komplett
0,3	"	komplett

Aus der Tabelle ergibt sich eine Verstärkung und Vermehrung der positiven Reaktionen, wenn die Verdünnung des Extraktes mit Karbolkochsalzlösung anstatt mit gewöhnlicher Kochsalzlösung erfolgt. Von den 6 bei beiden Versuchsarten positiv reagierenden Serumproben (a—f) weisen 4 (b—e) infolge des Phenolzusatzes eine sehr markante Verstärkung auf, die in manchen Fällen, wie z. B. bei Serum e, eine erhebliche Erleichterung der Beurteilung bedeutet. Noch eklatanter sind die Differenzen in den Kolumnen g und h. Hier reagieren die beiden Sera in gewöhnlicher Anordnung negativ, während die Verdünnung mit Karbolkochsalzlösung zu deutlichen positiven Reaktionen geführt hat. Das letztere Resultat war dabei unzweifelhaft das richtige. Denn einerseits lautete die klinische Diagnose in beiden Fällen „Lues secundaria“,

andererseits hatte Serum g bei der vorangegangenen diagnostischen Untersuchung unter gewöhnlichen Verhältnissen positiv reagiert, während die Reaktion von h allerdings als verdächtig, aber negativ angesprochen werden mußte. Daß nun in diesen Fällen nicht etwa eine einfache antikomplementäre Wirkung der infolge des Phenolzusatzes ja in größeren Dosen eigenhemmend gewordenen Extraktverdünnungen in Frage kommen kann, ergibt sich ohne weiteres aus einer zahlenmäßigen Analyse der Tabelle.

Wenn man nun auf Grund der mitgeteilten Erfahrungen annehmen konnte, daß die Wassermannsche Reaktion durch Verwendung der 0,5-proz. Karbolkochsalzlösung zur Herstellung der Extraktverdünnung im allgemeinen eine erhebliche Erhöhung der Empfindlichkeit erfährt, so hat es sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen doch nicht als zweckmäßig erwiesen, ohne weiteres in der sich ergebenden Richtung in der Praxis zu verfahren. Es zeigten sich nämlich zuweilen, und insbesondere bei den größeren Mengen der Extraktverdünnungen (0,25—0,15 ccm) Hemmungen, welche außerhalb des charakteristischen Bereichs der Reaktion zu fallen schienen, und es mußte daher gefürchtet werden, daß durch den beschriebenen Vorgang die Empfindlichkeit der Methode über Gebühr gesteigert wird. Aus diesem Grunde versuchte ich einen Phenolgehalt in anderer Form bei der Reaktion interferieren zu lassen.

Maßgebend für die weiteren Modifikationen der Anordnung war zunächst die Frage, ob für die Verstärkung die Anwesenheit des Phenols bei dem Vorgange der Extraktverdünnung erforderlich ist, ob also das Verdünnen mit Phenolkochsalzlösung die Reaktionsfähigkeit des Extraktes verstärkt, oder ob das Phenol das Zustandekommen der antikomplementären Funktion durch das Zusammenwirken von Extrakt, Syphilitikerserum und Komplement begünstigt. Im letzteren Falle sind die Bedingungen beim Gebrauch der mit Karbolkochsalzlösung hergestellten Extraktverdünnung augenscheinlich insofern nicht ganz übersichtliche, als beim Arbeiten mit absteigenden Mengen der Extraktverdünnung in jedem Gliede der Reihe eine andere Phenolkonzentration interferiert.

Außerdem mußte es aber auch fraglich erscheinen, ob der Phenolgehalt für das Serum als solches ohne Bedeutung ist, oder ob etwa auch aus dem Zusammenwirken von Serum und Phenol antikomplementäre Wirkungen resultieren. Wenn dem so wäre, dann könnte freilich die der Tabelle II zugrunde liegende Versuchsanordnung nicht ganz einwandfrei erscheinen. Denn sie läßt die Frage unberücksichtigt, ob durch das Zusammenwirken von Phenol und Serum ohne Extraktzusatz bereits antikomplementäre Wirkungen entstehen, so daß Hemmungen, welche aus der Kombination des mit Karbolkochsalslösung verdünnten Extraktes mit Serum resultieren, einer Summierung des Phenoleinflusses einerseits auf den Extrakt, andererseits auf das Serum ihren Ursprung verdanken könnten. Tatsächlich gaben eine Reihe von Versuchen, in denen die zehnfache Serumverdünnung anstatt mit gewöhnlicher Kochsalslösung mit 0,5-proz. Karbolkochsalslösung hergestellt wurde, die Antwort in dem Sinne, daß dieser Karbolsäuregehalt nicht ganz selten Serumproben in der zur Wassermannschen Reaktion dienenden Dosis und besonders in ihrem doppelten Multiplum eigenhemmende Wirkungen verleiht. Hierfür seien in Tabelle III einige Beispiele angeführt.

Tabelle III.

Mengen der 10-fachen Patientenserumverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von 0,25 ccm 10-facher Meerschweinchenserumverdünnung und 0,25 resp. 0,5 ccm 10-facher Patientenserumverdünnung, letztere:									
	a) in physiologischer Kochsalslösung									
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k
0,25	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
0,5	„	„	„	„	„	f. k.	„	„	„	„
	b) in 0,5-proz. Karbolkochsalslösung									
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k
0,25	kompl.	kompl.	kompl.	f. k.	kompl.	mäßig	stark	kompl.	kompl.	stark
0,5	mäßig	„	„	mäßig	mäßig	0	mäßig	mäßig	f. k.	wenig

Wie sich aus der Tabelle, die nur Beispiele aus einer größeren Zahl von Versuchen enthält, ergibt, ist es in der

Tat kein ganz seltenes Vorkommnis, daß Sera, welche an und für sich in der Gebrauchsdosis ($\frac{1}{10} \cdot 0,25$ ccm) und in deren doppeltem Multiplum ($\frac{1}{10} \cdot 0,5$ ccm) der antikomplementären Wirkung entbehren, durch Benutzung einer 0,5-proz. Karbol-Kochsalzlösung zur Herstellung der Serumverdünnung mehr oder weniger große Eigenhemmung annehmen. Dieses übrigens häufig auch zu vermissende resp. nicht zum sichtbaren Ausdruck gelangende Zusammenwirken von Serum und Karbolsäure ist keineswegs ein der Wassermannschen Reaktion entsprechender Vorgang. Denn der Grad der Hemmungen stand zu der positiven oder negativen Reaktion der Sera nicht in irgendwelchen Beziehungen. Eher mag der wechselnde Vorrat an hämolytischen Normalambozeptoren für das verschiedene Verhalten der einzelnen Serumproben maßgebend sein. Für die Verwendung des Phenols zu einer Verstärkung der Wassermannschen Syphilisreaktion mußten sich hieraus Forderungen in dem Sinne ergeben, daß Täuschungen durch Zusammenwirken von Phenol und Serum vermieden werden, zumal einige vergleichende Untersuchungen zeigten, daß beim Verdünnen des Extraktes mit Karbol-Kochsalzlösung und Herstellung der Serumverdünnungen in gewöhnlicher Kochsalzlösung gerade solche Sera augenscheinlich des charakteristischen Gepräges entbehrende Hemmungen ergaben, welche beim Verdünnen mit Karbol-Kochsalzlösung an und für sich in einfacher oder doppelter Dosis antikomplementär wirkten.

Aus den erörterten Gründen bin ich in weiteren Versuchen derart vorgegangen, daß ich die in üblicher Weise mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Extraktverdünnung benutzte, dafür aber die 10-fachen Serumverdünnungen mit einer einen Phenolzusatz enthaltenden Kochsalzlösung herstellte. Nachdem die orientierenden Versuche gezeigt hatten, daß hierfür die 0,5-proz. Phenollösung oft zu stark ist, wurden geringere Phenolzusätze erprobt, und es zeigte sich hierbei, daß eine Reduktion des Phenolgehaltes wohl möglich ist, ohne daß die Verstärkung der Wassermannschen Reaktion unterbleibt. Zur Demonstration dieser Tatsache sei folgendes Versuchsbeispiel angeführt.

Absteigende Mengen der in 0,85-proz. NaCl-Lösung bereiteten Extraktverdünnung wurden mit je 0,25 ccm 10-facher Meerschweinchenserumverdünnung und je 0,25 ccm 10-facher Verdünnung der einzelnen Patientensera digeriert. Zur Verdünnung des Patientenserums wurde benutzt:

- in den Reihen 1: 0,85-proz. NaCl-Lösung,
- in den Reihen 2: 0,25 Proz. Karbolsäure enthaltende 0,85-proz. NaCl-Lösung,
- in den Reihen 3: 0,125 Proz. Karbolsäure enthaltende 0,85-proz. NaCl-Lösung.

Nach 1 1/4 Stunden erfolgte Zusatz von Blut und Ambozeptor.

Das Ergebnis zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Mengen d. Extraktverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von absteigenden Extraktmengen, Meerschweinchenserum und der Patientensera																	
	a			b			c			d			e			f		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,25	0	0	0	k.	0	0	0	0	0	st.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,15	0	0	0	k.	0	Spch.	Sp.	0	Spch.	f.k.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,1	Spch.	0	0	k.	w.	f.k.	Sp.	Sp.	Sp.	k.	m.	m.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,05	m.	Spch.	m.	k.	m.	f.k.	k.	f.k.	f.k.	k.	f.k.	f.k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,03	f.k.	Sp.	f.k.	k.	f.k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,02	k.	m.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
Doppelte Serumdos. ohne Extrakt	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß Verdünnen der Serumproben mit einer 0,25-proz. Karbol-Kochsalzlösung und selbst mit einer nur 0,125 Proz. Phenol enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung noch ausreicht, um die Wassermannsche Reaktion zu verstärken. In den Beispielen b und d der Tabelle (es handelt sich um progressive Paralyse und Tabes) wird sogar die unter sonst gleichen Bedingungen negative oder nur angedeutet positive Reaktion durch den geringen Phenolgehalt zu einer stark positiven. Bereits bei einem Phenolgehalt der zur Serumverdünnung benutzten Kochsalzlösung von 0,25 Proz. waren eigenhemmende Serumwirkungen nicht

eingetreten oder nur in Ausnahmefällen zu bemerken. Ich habe daher das sich ergebende Verfahren — Extraktverdünnung in gewöhnlicher, Serumverdünnung in einer 0,25 Proz. Karbolsäure enthaltenden Kochsalzlösung — an einem größeren Material geprüft und mit der üblichen Methode verglichen. Dabei reagierten von 316 bisher untersuchten Serumproben 156 übereinstimmend negativ und 141 übereinstimmend positiv. Bei 82 von den 141 übereinstimmend positiven Fällen war eine mehr oder weniger erhebliche Verstärkung der Reaktion durch den Phenolgehalt bedingt worden. Bei den übrigen 19 Fällen bestand eine Divergenz der Ergebnisse; diese 19 Sera reagierten unter sonst identischen Bedingungen nur beim Verdünnen mit Karbol-Kochsalzlösung positiv. Allerdings hatte ein großer Teil dieser Sera bei früherer Untersuchung auch ohne Karbolzusatz positiv reagiert, und in manchen Fällen war die durch den Phenolgehalt bedingte Reaktion nur als eine recht schwache oder angedeutete zu bezeichnen. In der folgenden Tabelle V sind die Ergebnisse der 19 nur bei Phenolzusatz positiven Reaktionen notiert. Die Kontrollen waren sämtlich ohne Eigenhemmung.

Tabelle V.

Mengen d. Extrakt- ver- dünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Patientenserum (in 0,25-proz. Phenol-NaCl-Lösung verdünnt), Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen der Extraktverdünnung								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
0,25	Spch.	0	0	w.	0	m.	m.	m.	m.
0,15	w.	Spch.	0	m.	0	st.	st.	f. k.	f. k.
0,1	m.	w.	Spch.	k.	w.	f. k.	f. k.	k.	k.
Klinische Diagnose	Tabes	Lues	?	Lues cerebri	progr. Paral.	Lues	Lues latens	Lues latens	Lues latens
Ergebnis d. i. diagn. Unter- suchung (ohne Phenol) ¹⁾	s+	s+	—A	+	+	—	+	—	—A

1) Es bedeuten: + positiv, s+ schwach positiv, —A negativ, aber mit Andeutung einer positiven Reaktion, — negativ.

Mengen d. Extraktverdünnung ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Patientenserum (in 0,25-proz. Phenol-NaCl-Lösung verdünnt), Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen der Extraktverdünnung										
	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	
0,25	0	m.	w.	0	0	Spch.	w.	st.	m.	0	
0,15	Spch.	f. k.	k.	m.	w.	w.	m.	st.	st.	Spch.	
0,1	Sp.	k.	k.	st.	k.	f. k.	st.	f. k.	k.	Sp.	
Klinische Diagnose	Lues latens	Lues latens	Lues latens	Lues II	Lues	Lues II	Lues II	?	Lues ?	Lues latens	
Ergebnis d. l. diagn. Untersuchung (ohne Phenol)	+	s+	+	+	+	+	-A	+	-	-	

Wie die Tabelle zeigt, handelt es sich bei diesen erst unter Phenolzusatz positiv reagierenden 19 Serumproben in der überwiegenden Mehrzahl (16) um Syphilis resp. metasypilitische Erkrankungen. Nur bei 3 Fällen (c, r, s) war die klinische Diagnose zweifelhaft. Zwei von diesen wiesen aber auch bei der gewöhnlichen ersten diagnostischen Untersuchung eine angedeutete oder positive Reaktion auf. Im dritten Fall (s) war aber bei der Untersuchung ohne Phenolzusatz auch von vornherein nicht die geringste Hemmung zu bemerken. Allerdings ist hier auch unter Mitwirkung des Karbolsäuregehaltes nur eine recht schwache Reaktion eingetreten. Andererseits zeigt das Beispiel t (Lues latens), daß auch bei von vornherein gänzlich negativer Reaktion unter dem Einfluß eines Phenolzusatzes starke Reaktion entstehen kann.

Auf Grund des bisher vorliegenden Materials ergeben sich daher keine Anhaltspunkte dafür, daß die Wassermannsche Reaktion unter Verwendung eines geeigneten Phenolzusatzes die Grenzen der für Syphilis charakteristischen Breite überschreitet. Andererseits möchte ich aber das Verdünnen der Serumproben mit der 0,25 Proz. Karbolsäure enthaltenden Kochsalzlösung vorläufig nicht als allgemeine Versuchsanordnung für die Praxis empfehlen, wenn es mir auch nicht zweifelhaft erscheint, daß durch eine derartige Modifikation die Empfindlichkeit der Methode nicht unerheblich

gesteigert wird. Aber gerade bei der Serodiagnostik der Syphilis ist ja eine gewisse Vorsicht in der diagnostischen Verwertung von Verfeinerungen geboten. Insbesondere ist dabei die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß für schwächer wirksame Extrakte oder unter sonst weniger günstigen Bedingungen vorteilhafte Variationen bei Verfügung über hochempfindliche Extrakte und unter optimalen Verhältnissen bereits den Rahmen der erlaubten Empfindlichkeit überschreiten.

Jedenfalls dürfte die fortgesetzte Erprobung des Phenolzusatzes bei der Wassermannschen Reaktion angeraten werden können, zumal es sich um eine Verstärkungsmethode handelt, welche einen besonderen Aufwand von Zeit oder technischen Handgriffen nicht beansprucht. Jedoch wird man dabei in der Beurteilung streng verfahren müssen und den Ausfall der Reaktion nur dann als positiv bewerten dürfen, wenn die Kontrollen einwandfrei ausgefallen sind, d. h. wenn einfache und doppelte Serummengen (ohne Extrakt), ebenso wie die einfache Extraktmenge (ohne Serum) zu kompletter Hämolyse, die doppelte Extraktmenge mindestens zu starker Hämolyse führen. Besondere Vorsicht in der praktischen Verwertung derart erhaltener positiver Reaktionen dürfte um so mehr am Platze sein in Anbetracht neuerer Angaben der Autoren über nichtspezifische, methodisch der Wassermannschen Reaktion entsprechende Komplementbindungsphänomene, welche durch unberechenbare Summationseffekte (adjuvant phenomenon) oder durch Zusatz von chemischen Stoffen zustande kommen sollen [cf. hierzu Thiele und Embleton¹⁾, Rominger²⁾ u. a.]. Ob daher die Wassermannsche Reaktion trotz des in der beschriebenen Weise interferierenden Phenolgehaltes des Mediums für Syphilis immer charakteristisch bleibt, darüber wird erst eine ausgedehnte praktische Erfahrung entscheiden können.

Die Verstärkung, welche die Karbolsäure bei Verwendung von alkoholischen Extrakten verursacht, und die man, ohne

1) F. H. Thiele und D. Embleton, diese Zeitschr., Bd. 16, 1913, p. 430.

2) E. Rominger, Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 16.

andere Erklärungsmöglichkeiten auszuschließen, wohl an erster Stelle auf die schwach saure Natur des Phenols zurückführen kann, läßt es möglich erscheinen, daß auch der Phenolgehalt in wässerigen Extrakten nicht indifferent ist und einen begünstigenden Faktor für das Zustandekommen der positiven Reaktion bedeutet. Man könnte dann daran denken, daß eine gelegentliche Ueberlegenheit von Karbolsäure enthaltenden wässerigen Extrakten über gewisse alkoholische Extrakte vielleicht dem Einfluß des Phenols zuzuschreiben wäre. Jedenfalls wird man auf Grund der sich mehrenden Erfahrungen über die Verstärkung der Extraktwirkung durch gänzlich unspezifische Faktoren in Schlußfolgerungen aus der differenten Wirkung von verschiedenen Extrakten auf die Interferenz besonderer, etwa spezifischer Komponenten um so vorsichtiger sein müssen.

Zusammenfassung.

Es gelingt, durch einen Phenolzusatz die Empfindlichkeit der Wassermannschen Syphilisreaktion nicht unerheblich zu steigern. Dabei kann man entweder die Verdünnung des alkoholischen Extraktes mit Phenol-Kochsalzlösung bereiten, wobei auch die eigenhemmende Funktion der Extraktverdünnung zunimmt, oder zur Herstellung der Patientenserumverdünnung Phenol-Kochsalzlösung verwenden.

Für die praktische Verwertung erwies sich das 10-fache Verdünnen der Patientensera mit einer 0,25 Proz. Karbolsäure enthaltenden Kochsalzlösung als geeignet. Weitere Erfahrungen werden entscheiden müssen, ob dieses die Reaktion verstärkende Prinzip für die Serodiagnostik der Syphilis gangbar ist.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität
Straßburg und der bakteriologischen Anstalt für Elsaß.]

Ueber Immunisierung mit desanaphylatoxierten Bakterien.

Von **E. Levy** und **H. Dold**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Juli 1913.)

In einer kurzen vorläufigen Mitteilung¹⁾ haben wir gezeigt, daß man mit „desanaphylatoxierten“²⁾ Bakterien (*Bac. pyocyaneus*), d. h. Bakterien, welche durch wiederholte Behandlung mit frischem Meerschweinchenserum ihrer Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung beraubt sind, noch immunisieren kann. Auf die Frage der Beziehung des Anaphylatoxins zu dem den anaphylaktischen Shok erzeugenden Gift (Anaphylaxiegift) soll hier nicht näher eingegangen werden. Es möge genügen, wenn hier erwähnt wird, daß der hauptsächlich von Friedberger und seinen Mitarbeitern vertretenen und bisher ziemlich allgemein herrschenden Auffassung von der Identität des Anaphylatoxins mit dem Anaphylaxiegift von verschiedenen Seiten Bedenken entgegengesetzt worden sind. Einmal wurde versucht, die Entstehung des Anaphylatoxins nicht chemisch, mit einem Abbau des artfremden Eiweißes durch das Komplement, sondern physikalisch zu erklären, nämlich durch die Annahme, daß das artfremde Eiweiß, die Präzipitate und Bakterien, aus dem Serum Bestandteile adsorbieren und letzteres dadurch giftig machen. Es muß aber zugegeben werden, daß für diese physikalische Theorie bis jetzt noch viel weniger sicheres Beweismaterial vorliegt als für die chemische Theorie Friedbergers. Nicht im Sinne einer Identität von Anaphylatoxin und Anaphylaxiegift spricht auch — worauf schon Neufeld und Dold hingewiesen haben — der Umstand, daß das Anaphylatoxin sich leicht ohne Zuhilfenahme von spezifischen Antikörpern gewinnen läßt, während für das Zustande-

1) E. Levy und H. Dold, Straßburger med. Zeitung, 1912, No. 12.

2) Cfr. Dold und Aoki, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913, Heft 2 und Mikrobiologenversammlung, Berlin, April 1913.

kommen der anaphylaktischen Vergiftung das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern eine Vorbedingung ist. Ferner ist für die Entscheidung dieser Frage von großer Bedeutung die Feststellung von Dold und Aoki, daß man mit desanaphylatoxiertem Bakterienmaterial, also mit Bakterien, welche kein Anaphylatoxin mehr liefern, noch aktive Anaphylaxie erzeugen kann¹⁾. Dieser Nachweis läßt wohl kaum eine andere Deutung zu, als daß Anaphylatoxin und Anaphylaxiegift nicht miteinander identifiziert werden dürfen.

Aber welche Beziehungen das Anaphylatoxin zur Anaphylaxie auch haben mag, — seine Bedeutung für die Infektionsvorgänge wird durch diese Frage wenig berührt. Da das Anaphylatoxin sich überall da bildet, wo artfremdes Eiweiß, besonders Bakterieneiweiß, mit komplementhaltigen Körpersäften in Wechselwirkung tritt, so muß es bei jeder Infektion und bei jeder Einverleibung von Bakterien oder deren Produkten zur Bildung des Giftes kommen.

Nun weiß man bezüglich der Wirkung dieses Giftes, hauptsächlich aus den Arbeiten Friedbergers und seiner Mitarbeiter, daß es — abgesehen von dem nach Injektion letaler Dosen unter Krämpfen und Lungenblähung eintretenden Tod — einen deutlichen Einfluß auf das Blutbild und auf die Temperatur der Versuchstiere ausübt. Ferner berichtete Friedberger in einer kurzen Diskussionsbemerkung²⁾, daß er „bei Anaphylatoxininjektionen am Kaninchen, bei solchen Tieren, bei denen geringe Mengen versehentlich ins subkutane Gewebe gelangten, derartige Nekrosen beobachtete, daß die Ohren vollkommen abfielen“. Nun hat neuerdings Dold³⁾ in Gemeinschaft mit Rados die lokale Wirkung des Anaphylatoxins eingehend am Auge studiert und dabei schon durch kleine Mengen (0,1 ccm anaphylatoxinhaltiges homologes Serum) rasch

1) A. Donati, dem die Entgiftung von Typhusbacillen ebenfalls gelungen ist, berichtet, daß diese entgitteten (desanaphylatoxierten) Typhusbacillen nicht mehr sensibilisieren (Arch. per le scienze mediche, Vol. 36, 1912, No. 16).

2) Friedberger, Berliner mikrobiologische Gesellschaft, 9. Jan. 1912, Diskussionsbemerkung.

3) Dold und Rados, Unterelsässischer Aerzteverein, Sitzung vom 28. Juni 1913.

auftretende und je nach der Anaphylatoxinmenge mehr oder weniger intensive Entzündungen (Conjunctivitis, Keratitis, Iridocyclitis, Panophthalmien) erzeugen können.

Es kann darum keinem Zweifel mehr unterliegen, daß das Anaphylatoxin ganz beträchtliche lokale Reaktionserscheinungen auszulösen in der Lage ist, und es liegt der Gedanke nahe, daß die nach Schutzimpfung mit Bakterienmaterial auftretenden lokalen und allgemeinen Reaktionen auf die Bildung dieses Giftes zurückzuführen sind.

Fast alle Vaccinationen ziehen bekanntlich oft recht erhebliche lokale und auch allgemeine Störungen nach sich. Besonders bei der Typhusschutzimpfung hat sich dies zum Teil in unangenehmer Weise geltend gemacht. Wenn wir z. B. eine Vaccination gegen den Abdominaltyphus besäßen, die, ohne solch unangenehme Wirkungen im Gefolge zu haben, doch einen tüchtigen Impfschutz erzielte, so wäre dies für die Bekämpfung dieser Infektionskrankheit von großem Vorteil. Wir stellten uns deshalb die Aufgabe, nachzuforschen, ob es möglich ist, mit entgifteten, desanaphylatoxierten Bakterien im Tierexperiment zunächst eine gute und brauchbare Schutzimpfung zu erzielen. Diese Betrachtungen gelten natürlich nicht allein für die Typhusbacillen, sondern für alle Mikroorganismen, da ja alle die Fähigkeit besitzen, Anaphylatoxin zu bilden.

Wir suchten zunächst das Problem am Beispiele des *Bac. pyocyaneus* zu lösen. 10 ausgewachsene 24-stündige Kulturen von *Bac. pyocyaneus* wurden durch $\frac{3}{4}$ -ständiges Erhitzen auf 58° abgetötet und dann entgiftet, desanaphylatoxiert. Nach der dritten Behandlung mit frischem Meerschweinchenserum hörte die Bildung von Anaphylatoxin auf und kehrte auch bei drei weiteren Wiederholungen des Versuches nicht wieder. Dieses desanaphylatoxierte Material wurde in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und es erhielten davon 8 Meerschweinchen vom Gewicht 270—320 g 1—2 ccm subkutan injiziert. Sämtliche Tiere überstanden anstandslos die Impfung. 14—16 Tage später bekamen diese vorbehandelten Meerschweinchen zusammen mit 9 Kontrolltieren vom Gewicht 300—335 g zum Teil den 40., zum Teil den 80., zum Teil den 160. Teil einer 48-stündigen *Pyocyaneus*agarkultur in

intraperitonealer Injektion. Die Kontrolltiere starben alle innerhalb 24 Stunden, auch die mit dem 160. Teil einer Agarkultur infizierten 2 Meerschweinchen von 300 und 330 g Gewicht.

Bei unseren Versuchen, mit desanaphylatoxiertem Typhusbacillenmaterial Immunität zu erzeugen, stießen wir auf die Schwierigkeit, daß die Typhusbacillen sich lange nicht so leicht desanaphylatoxieren lassen wie die Pyocyaneusbacillen. Es bedurfte bei derselben Anordnung eines 10maligen Serumwechsels, um vollständig entgiftetes Material zu erhalten. Wenn man, statt bei 58° abgetöteten Bacillen, lebende nimmt, so reicht sogar ein 10maliger Serumwechsel nicht aus. Es erscheint unbedingt von Interesse, daß aus dem Typhusbacillus sich so häufig hintereinander Anaphylatoxin gewinnen läßt. Es ist nicht unmöglich, daß auf dieses Verhalten des lebenden Typhusbacilleneiweißes die lange Dauer der menschlichen Typhusinfektion zurückzuführen ist.

Das desanaphylatoxierte Material von 15 gut gewachsenen Typhusagarkulturen wurde in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. 6 Meerschweinchen vom Gewicht 240—260 g erhielten davon 1—2 ccm subkutan. Sie zeigten nicht die geringsten Krankheitserscheinungen. 14 Tage später wurden sie zusammen mit 6 Kontrollen vom Gewicht 230—320 g mit dem 40. Teil einer 48-stündigen Typhusagarkultur intraperitoneal infiziert. Vorversuche hatten uns ergeben, daß der 80. Teil der Kultur bereits ausreicht, um 490 g schwere Meerschweinchen innerhalb 24 Stunden foudroyant zu töten. Unsere vorbehandelten Tiere blieben alle munter und am Leben. Sie wurden wie die Pyocyaneustiere 14 Tage lang nach der Infektion noch beobachtet.

Die Autopsie der Kontrollen ergab sowohl bei *Bac. pyocyaneus* als auch bei *Bac. typhi serös* eitrig-eitrige Peritonitis mit konsekutiver Allgemeininfektion. Im Peritonealexsudat, im Blut und in den inneren Organen waren in der ersten Versuchsreihe die Pyocyaneusbacillen, in der zweiten die Typhusbacillen in Reinkultur nachweisbar.

Es ist also durch unsere Versuche bewiesen, daß es möglich ist, mit desanaphylatoxierten Bakterien eine feste Schutzimpfung zu erzielen,

die Schutz gewährt gegen eine ganz massive, in 24 Stunden tödliche Infektion. Von einer nicht spezifischen Resistenzerhöhung kann bei unseren Versuchen keine Rede sein, da der zwischen Vorbehandlung und Infektion liegende Zwischenraum von 14—16 Tagen ein zu großer ist. Außerdem spricht die von uns gewählte Versuchsanordnung dagegen. Die Immunisierungsinjektion wurde an einer anderen Stelle ausgeführt wie die Prüfungsinjektion (subkutan gegen intraperitoneal). Um eine lokale Resistenzerhöhung konnte es sich also auch nicht handeln.

Es war dann noch von Interesse nachzusehen, ob durch Vorbehandlung mit desanaphylotoxiertem Material sich im Blutserum der betreffenden Tiere Agglutinine, Präzipitine und bakterizide Antikörper ausbilden, oder ob durch den Prozeß des Desanaphylotoxierens die Bakterien der Eigenschaft verlustig gehen, diese spezifischen Reaktionskörper zu erzeugen. Man mußte ja unbedingt auch an die, wenn auch entfernte, Möglichkeit denken, daß die entgifteten Bakterienleiber, trotzdem sie Immunität nach sich ziehen, doch die Auslösung der genannten Reaktionskörper nicht mehr veranlassen können. Man darf sich ja nicht auf den Standpunkt stellen, daß das Vorhandensein dieser Reaktionskörper, in erster Linie der bakteriziden Antikörper, einen alleingültigen Gradmesser für das Bestehen oder Nichtbestehen eines Zustandes der Immunität darstellen. Der erzielte Schutz wird einwandfrei nur dadurch bewiesen, daß die Tiere gegenüber einer foudroyanten Prüfungsinjektion sich refraktär verhalten und auch bei wochenlanger Beobachtung am Leben bleiben.

Wir injizierten 2 Kaninchen von unserem desanaphylotoxierten Typhusmaterial 2 ccm intravenös und gleichzeitig $\frac{1}{4}$ ccm subkutan. Von beiden Tieren wurde vorher das Serum auf eventuelle normale Agglutinationsfähigkeit geprüft. Das Serum des einen Kaninchens zeigte einen Agglutinationstiter für Typhusbacillen von 1 : 20. Am 14. Tage nach der Einspritzung besaß das Serum dieses Tieres einen Titer von 1 : 5000; am 18. Tage war der Titer auf 1 : 1000 zurückgegangen. Das Serum vom zweiten Kaninchen bot vor der Behandlung keine Agglutinationskraft dar. 14 Tage nach der

Injektion wies es einen Titer von 1 : 2500, am 18. Tage von 1 : 800 auf.

Die bakterizide Kraft unserer durch desanaphylatoxierte Typhusbacillen gewonnenen Kaninchenimmunsera wurde vermittelst Plattenbakterizidie (nach Stern) geprüft. Das Immunserum des einen Kaninchens wirkte bakterizid bis zur Verdünnung von 1 : 1280; das des zweiten bis zur Verdünnung 1 : 640.

Beide Immunsera wurden auch auf ihren Gehalt an Präzipitinen geprüft, indem je 5,0 ccm einer 48-stündigen, klar filtrierten Typhusbouillonkultur mit 1,0 ccm, 0,5 ccm, 0,2 ccm und 0,1 ccm der Immunsera 24 Stunden lang bei 37° C gehalten wurden. Bei beiden Seren erzeugten 1,0 und 0,5 ccm einen deutlichen und — wie Kontrollversuche ergaben — spezifischen Niederschlag.

Um uns auch ein Urteil darüber zu verschaffen, wie unser desanaphylatoxiertes Impfstoff sich beim Menschen verhält, ob er, wie die meisten bisherigen Typhusimpfstoffe, lokale und allgemeine Reaktionserscheinungen nach sich zieht, deren unangenehmen Nebenwirkungen gerade die Typhusschutzimpfung so schwer sich einbürgern lassen, injizierten wir unser Vaccin 4 gesunden Individuen subkutan in die Inter-scapulargegend. Zum Vergleich spritzten wir 4 andere gesunde Männer mit dem Typhusimpfstoff von Pfeiffer-Kolle. Wir wählten starke, kräftige Männer, die keine Bacillenträger waren und die früher spontan keinen Typhus überstanden hatten. Sie entstammten alle einer Lokalität, in der Typhus endemisch herrschte und in welcher als Ursache dieses endemischen Vorkommens Typhusbacillenträger nachgewiesen waren. Ihre Lebensbedingungen waren vollkommen gleich. Wir waren also nach den bisherigen Erfahrungen berechtigt, diese Schutzimpfungen vorzunehmen. Zunächst bekam einer dieser Impflinge $\frac{1}{2}$ ccm des Pfeiffer-Kolleschen Impfstoffs und ein zweiter eine äquivalente Menge unseres Präparates (= 2 mg Agarkultur in derselben Flüssigkeitsmenge). Der Impfling mit Pfeiffer-Kolle zeigte Temperaturerhöhung bis 38,3. Die Höchsttemperatur bei unserem Vaccin betrug 36,8. Wir verabreichten dann 3 Impflingen 1,5 ccm des

Pfeiffer-Kolleschen Impfstoffes und den 3 letzten die entsprechende Menge von unserem, in der gleichen Flüssigkeitsmenge, aufgeschwemmt. Der eine unserer Impflinge zeigte als Höchsttemperatur 2 Tage nach der Injektion 37,2, der zweite an demselben Tage dieselbe Temperatur, der dritte überhaupt keine Temperaturerhöhung. Bei keinem war eine lokale Reaktion zu konstatieren. Die 3 Impflinge nach Pfeiffer-Kolle zeigten eine deutlich ausgesprochene Fieberbewegung. Als Höchsttemperaturen wurden bei ihnen beobachtet 38; 38,5; 38,2. Der eine bekam keine lokale Reaktion; der zweite eine deutliche Anschwellung der Stichstelle mit Druckempfindlichkeit in der Axillargegend; der dritte an der Injektionsstelle ein gerötetes, 5-Markstück großes Infiltrat und gleichfalls Druckempfindlichkeit in der Axillargegend.

Wir sind uns sehr wohl bewußt, daß die Zahl unserer Impfungen beim Menschen noch sehr gering ist, und daß hier Zufälligkeiten mit herein spielen könnten. Das Ergebnis sprach aber — was das Auftreten von Reaktionen anbelangt — so regelmäßig und eindeutig zugunsten unseres Impfstoffes, daß das Verfahren unseres Erachtens unbedingt Beachtung verdient, um so mehr, als die Tierversuche uns den Beweis lieferten, daß es möglich ist, mit unserem Vaccin eine starke Schutzwirkung zu erzielen.

Zusammenfassung.

1) Es gelingt mit desanaphylatoxiertem Bakterienmaterial im Tierversuch spezifische Antikörper (agglutinierende, präzipitierende, bakterizide Antikörper) zu erzeugen.

2) Man kann Tiere (Meerschweinchen) durch eine einmalige Vorbehandlung mit desanaphylatoxiertem Bakterienmaterial gegen eine spätere Infektion mit einer mehrfach tödlichen Dosis schützen.

3) Das desanaphylatoxierte Bakterienmaterial löste bei Impfversuchen an Menschen weder lokale Entzündungserscheinungen noch Fieber aus.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Serobakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.]

Ueber Lipoidpräzipitine.

Ueber antigene Eigenschaften von Lipoiden.

VII. Mitteilung.

Von Dr. Kurt Meyer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 31. Juli 1913.)

Nachdem in früheren Mitteilungen¹⁾ das Vorkommen spezifischer komplementbindender Antikörper gegen Lipide — einstweilen nur für Lipide aus Bandwürmern und aus Tuberkelbacillen — nachgewiesen war, lag es nahe, nach Antikörpern anderer Art gegen Lipide zu forschen.

Wegen der engen Beziehungen zu den komplementbindenden Antikörpern war zunächst an das Vorkommen von Lipoidpräzipitinen zu denken.

Schon vor längerer Zeit in dieser Richtung unternommene Versuche führten anfangs nicht zum Ziel, weil in der bei der Auswertung der eiweißpräzipitierenden Sera üblichen Weise die Sera in konstanter Menge und in unverdünntem Zustande mit fallenden Mengen des in Frage kommenden Lipoids gemischt wurden. Allerdings gaben die Immunsera mit dem homologen Lipoid regelmäßig Fällungen, doch zeigten viele Normalsera und heterologe Immunsera ein gleiches Verhalten, so daß an der Spezifität der Erscheinung gezweifelt werden mußte.

Erst als die Methodik in der Weise abgeändert wurde, daß konstante Lipoidmengen mit fallenden Serumdosen versetzt wurden, trat die Spezifität der Reaktion klar hervor, und es konnten nunmehr ihre Bedingungen genauer untersucht werden.

Die mitzuteilenden Versuche beziehen sich nur auf das früher beschriebene lecithinartige Lipoid aus der Leibessubstanz von *Taenia saginata*.

1) Kurt Meyer, diese Zeitschr., Bd. 7, 1910, p. 732; Bd. 9, 1911, p. 530; Bd. 11, 1911, p. 211; Bd. 14, 1912, p. 355; Bd. 14, 1912, p. 359; Bd. 15, 1912, p. 245.

Zur Versuchsanordnung sei bemerkt, daß durchweg eine Aufschwemmung des Lipoids von der Konzentration 1:500 zur Verwendung kam. Sie wurde hergestellt, indem das Lipoid in der fünfzigfachen Menge Alkohol unter Erwärmen gelöst und diese Lösung mit der zehnfachen Menge Kochsalzlösung — soweit nicht anders bemerkt — verdünnt wurde. Es entsteht dabei eine milchig getrübe Aufschwemmung, die auch bei Lupenbetrachtung homogen erscheint und lange Zeit stabil bleibt.

In den meisten Versuchen wurde 0,5 ccm dieser Aufschwemmung verwandt und in kleinen Reagenzgläsern mit 0,5 ccm Serumverdünnung versetzt, so daß das Gesamtvolumen 1 ccm betrug.

Die Gemische kamen meist für 2 Stunden in den Brutschrank und blieben dann noch einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen, wobei sich aber das Ergebnis nicht mehr änderte.

Da die Präzipitinreaktion bei den Lipoiden sich nicht in dem Auftreten einer Trübung manifestiert, sondern in einem Zusammentreten der unter der Grenze der Sichtbarkeit liegenden Kolloidteilchen zu sichtbaren Flecken, so geschah die Ablesung wie bei der makroskopischen Agglutinationsprobe, durch Betrachtung des fast horizontal gehaltenen Röhrchens von untenher. Das Bild unterscheidet sich in keiner Weise von dem einer agglutinierten Bakterienaufschwemmung.

In den folgenden Tabellen bedeutet: +++ völlige Klärung der Suspension, ++ starke Flockenbildung mit reichlicher Sedimentbildung, aber bestehenbleibender Trübung, + deutliche gleichmäßige Flockenbildung, ± eben mit der Lupe erkennbare Ausflockung.

In der nachfolgenden Tabelle I sei zunächst dargestellt, wie sich das Präzipitationsvermögen spezifischer Immunsera — Sera mit wässrigen Bandwurmextrakten immunisierter Kaninchen — zu dem von Normal- und heterologen Immunsere verhält.

Tabelle I.

0,5 ccm Lipoidauf- schwemmung +	Bandwurm Immunsereum 1	Bandwurm Immunsereum 2	Bandwurm Immunsereum 3	Bandwurm Immunsereum 4	Bandwurm Immunsereum 5	Normalserum	Rindersereum- Immunsereum	Tuberkelbacillen- Immunsereum	Smegmabacillen- Immunsereum
0,5 ccm	±	—	—	+	+++	+	+	+	++
0,2 „	+	++	+	++	++	±	±	±	±
0,1 „	++	+++	++	+	+	—	—	—	—
0,05 „	+++	+++	++	±	±
0,02 „	+++	+++	++	—	—
0,01 „	++	++	++
0,005 „	+	+	+
0,002 „	±	±?	±?
0,001 „	—	—	—

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß das Präzipitationsvermögen der Immunsera spezifischer Art ist. Bei keinem der anderen Sera — außer den angeführten wurde noch eine große Zahl anderer Sera untersucht — geht die Präzipitationswirkung über eine Verdünnung 1:10 hinaus, während sie bei den homologen Seren noch in einer Verdünnung 1:500 nachweisbar sein kann.

Die Spezifität der Präzipitation ergibt sich aber weiter auch daraus, daß Lipide anderer Herkunft nicht ausgeflockt werden. In Tabelle II sei ein Versuch angeführt mit einem aus Menschenherz in analoger Weise wie das Bandwurmlipoid dargestellten Lecithinpräparat.

Tabelle II.

0,5 ccm Menschenherz-Lecithinaufschwemmung 1:500 +	Bandwurm Immunserum 1	Bandwurm Immunserum 2	Bandwurm Immunserum 3
0,1 ccm	—	—	—
0,05 „	—	—	—

Dieses Lecithin wurde also durch die Bandwurmsera in keiner Weise beeinflusst. Ganz ebenso verliefen Versuche mit Bakterienlipoiden.

Um ein Urteil über das Verhältnis der Präzipitine zu den komplementbindenden Antikörpern zu gewinnen, wurden die Sera auch im Komplementbindungsversuch austitriert (Tabelle III).

Tabelle III.

Antigen: 0,5 ccm Bandwurm-Lecithin 1:5000 +	Band- wurm- serum 1	Band- wurm- serum 2	Band- wurm- serum 3	Band- wurm- serum 4	Band- wurm- serum 5
0,01 ccm	0	0	0	0	0
0,005 „	0	0	0	Spur	0
0,002 „	0	0	0	k.	i.
0,001 „	0	0	Spur	k.	k.
0,0005 „	i.	i.	f. k.	.	.
0,0002 „	k.	k.	k.	.	.

0,05 ccm Meerschweinchenserum als Komplement; 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutaufschwemmung; Gesamtvolumen 2,5 ccm; k. = komplette, f. k. = fast komplette, i. = inkomplette Hämolyse.

Komplementbindungs- und Präzipitationsvermögen der Sera gehen, wenn auch nicht absolut, so doch in hohem Maße parallel, Schlüsse auf Identität oder Nichtidentität der komplementbindenden und präzipitierenden Antikörper sollen daraus aber nicht gezogen werden. Die größere Empfindlichkeit der Komplementbindungs- im Vergleich zur Präzipitinreaktion findet sich auch bei den Lipoidreaktionen.

Eine von der Eiweißpräzipitation her bekannte Erscheinung zeigt sich, wie Tabelle I ergibt, auch bei der Lipoidpräzipitation, nämlich daß das Flockungsoptimum bei mittleren Serumkonzentrationen liegt, so daß bei großen Serummengen die Präzipitation ganz fehlen oder wenigstens geringfügig sein kann.

Die für die Eiweißpräzipitate beschriebene Wiederauflösung in überschüssigen Mengen von Antigen und Antiserum war bei den Lipoidpräzipitaten in merklichem Grade nicht möglich.

Bei geeigneten Mengenverhältnissen von Serum und Lipoid erweist sich die vom Präzipitat abgegossene Flüssigkeit als frei sowohl von Antigen als Antikörper. Die vollkommene Ausfällung des Lipoids ist an der völligen Klarheit der Flüssigkeit zu erkennen. Das Verschwinden des Antikörpers ergibt sich daraus, daß die Flüssigkeit nicht mehr präzipitierend wirkt und auch im Komplementbindungsversuch unwirksam ist.

Daß das Verschwinden des Antikörpers spezifischer Natur und nicht durch mechanisches Mitreißen bedingt ist, zeigt ein Versuch mit Immuneserum 5, bei dem allerdings nur die komplementbindenden Antikörper berücksichtigt wurden. Dieses Serum stammte von einem Tier, das außer mit Bandwurmsubstanz auch mit Typhusbacillen immunisiert war und dessen Serum daher auch komplementbindende Antikörper gegen Typhusbacillen enthielt. Wie sich aus Tabelle IV ergibt, verschwanden bei der Präzipitation nur die Bandwurmlipoid-, nicht die Typhusbacillenantikörper.

Tabelle IV.

Antigen: 0,5 ccm Bandwurmlipoid 1:5000 +	Immuneserum 5		Antigen: Typhus- bacillen + ccm	Immuneserum 5	
	Vor Präzi- pitation	Nach Präzi- pitation		Vor Präzi- pitation	Nach Präzi- pitation
0,01 ccm	0	k.	0,01	0	0
0,005 „	0	k.	0,005	0	0
0,002 „	i.	k.	0,002	k.	k.
0,001 „	k.	k.	0,001	k.	k.

Um den Einfluß des Flüssigkeitsvolumens auf die Präzipitatbildung zu prüfen, wurde ein Immunserum außer in der oben beschriebenen Weise auch noch in Reihen ausgewertet, in denen das Gesamtvolumen durch Kochsalzlösung auf 2 und 4 ccm gebracht war. Es ergab sich, daß die Ausflockungsgrenze nach unten in allen Reihen bei derselben Serummenge lag, daß in den stärkeren Verdünnungen aber auch höhere Serumengen keine vollständige Ausflockung bedingten, so daß die Reaktionen über das Stadium + nicht hinausgingen.

Bei halbstündigem Erhitzen auf 65° büßten die Sera ihr Präzipitationsvermögen ein. Wie dies für die Eiweißantisera bekannt ist, hemmten sie nunmehr die Präzipitation der nativen Sera (Tabelle V).

Tabelle V.

Erhitztes Serum	+ 0,02 Immunserum 1
0,1 ccm	—
0,05 „	±
0,02 „	+
0,01 „	++
0,005 „	+++

Dagegen wurde die Fällbarkeit des Lipoids durch Erhitzen auf 65 oder 100° nicht herabgesetzt, vielmehr anscheinend etwas erhöht.

Endlich macht sich die von Van Loghem¹⁾ und anderen für die Agglutination nachgewiesene hemmende Wirkung frischen Serums, die wahrscheinlich auf das Komplement zu beziehen ist, auch bei der Lipoidpräzipitation geltend (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Frisches Meerschweinchenserum	+ 0,02 Immunserum 1
0,05 ccm	—
0,02 „	+
0,01 „	++
0,005 „	+++

* * *

Weitere Versuche galten den Eigenschaften des Präzipitates, das nach seiner Entstehung als Lipoideiweißverbindung aufzufassen ist.

1) Van Loghem, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 45, 1907, p. 539.

Zunächst wurde festgestellt, inwieweit die Verbindung wieder in ihre Komponenten gespalten werden kann. Zu diesem Zwecke wurde der abzentrifugierte und gewaschene Niederschlag mit Alkohol behandelt. Er ging dabei zum größten Teil in Lösung. Die alkoholische Lösung wurde mit Kochsalzlösung verdünnt und im Komplementbindungsversuch auf Antigengehalt untersucht. Der Rückstand war wahrscheinlich infolge der Alkoholbehandlung in Wasser unlöslich geworden und wurde daher in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und auf seinen Antikörpergehalt untersucht. Da es bekannt ist, daß Aether auf Lipoideiweißverbindungen weniger stark spaltend wirkt als Alkohol, wurde zum Vergleich ein analoger Versuch mit Aether durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle VII dargestellt.

Tabelle VII.

5 ccm Lecithinaufschwemmung 1 : 500 + 0,2 ccm Immunsérum. Niederschlag abzentrifugiert, mit 5 ccm Alkohol behandelt, alkoholische Lösung mit Kochsalzlösung auf 50 ccm verdünnt (Lösung a). Rückstand in 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt (Lösung b). Analoge Behandlung mit Aether (Lösungen a' und b').

0,1 ccm Bandwurm- sérum +	Lösung a	Lösung a'	Bandwurm- lecithin 1 : 5000	0,5 ccm Bandwurm- lecithin 1 : 5000 +	Lösung b	Lösung b'
0,2 ccm	0	0	0	0,5 ccm	0	k.
0,05 „	i.	i.	i.	0,2 „	i.	k.
0,02 „	k.	k.	k.	0,1 „	k.	k.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, gelang es sowohl bei Behandlung mit Alkohol wie mit Aether, das Lipoid quantitativ abzuspalten. Die in dem Präzipitat enthaltenen 1 cg Lipoid in 50 ccm Kochsalzlösung emulgiert, verhielten sich im Komplementbindungsversuch genau wie eine direkt hergestellte Lipidemulsion von der Konzentration 1 : 5000. Sie zeigten auch kein stärkeres Eigenhemmungsvermögen als diese, so daß offenbar kein Antikörper in den Alkohol und Aether übergegangen war.

Die Antikörperwirkung war vielmehr bei der Alkoholbehandlung zum großen Teil, bei der Aetherbehandlung ganz verschwunden. Wahrscheinlich ist die bereits oben er-

wähnte Koagulation der Eiweißkörper dafür verantwortlich zu machen.

Die Spaltung der Antigen-Antikörperverbindung läßt sich auch durch Erhitzen auf 100° durchführen. Wie früher mitgeteilt, wird das spezifische Komplementbindungsvermögen des Bandwurmlécithins beim Kochen nicht aufgehoben. Wie aus der nachfolgenden Tabelle VIII hervorgeht, ist das gleiche bei dem an seinen Antikörper gebundenen Lipoid der Fall. Wird das Präzipitat auf 100° erhitzt und dann in der oben beschriebenen Weise mit Alkohol behandelt, so läßt sich das Lipoid quantitativ mit seiner vollen Wirksamkeit wiedergewinnen. Daß andererseits der Antikörper beim Erhitzen zerstört oder zum mindesten seines Komplementbindungsvermögens beraubt wird, geht daraus hervor, daß die komplementbindende Wirkung, die das Präzipitat in nativem Zustande besitzt, beim Erhitzen aufgehoben wird.

Tabelle VIII.

Präzipitat aus 2 ccm Lecithinaufschwemmung 1:500 + 0,1 ccm Immunserum 3 Minuten auf 100° erhitzt, abzentrifugiert, mit 2 ccm Alkohol behandelt, alkoholische Lösung mit 20 ccm Kochsalzlösung verdünnt.

0,01 ccm Bandwurm- serum +	Abspaltungs- flüssigkeit	Bandwurm- lecithin 1:5000	Eigenhemmung des Präzipitats	
			vor Erhitzen	nach Erhitzen
0,2 ccm	0	0	0	k.
0,1 „	0	0	0	k.
0,05 „	i.	i.	0	k.
0,02 „	k.	k.	i.	k.

Die Versuche zeigen also, daß die Bindung, die das Lipoid mit dem Präzipitin eingeht, sehr locker ist, und daß es bei der Reaktion nicht wesentlich verändert wird.

Durch die leichte quantitative Wiedergewinnung des Lipoids ist die Möglichkeit gegeben, das Verhältnis festzustellen, in dem sich Antigen und Antikörper unter wechselnden quantitativen Bedingungen an der Präzipitatabildung beteiligen, eine Frage, deren Lösung bei den Eiweißpräzipitationen auf Schwierigkeiten stößt und daher widersprechend beantwortet worden ist. In dieser Richtung begonnene Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

* * *

Für die wichtigste Ausflockungsreaktion auf dem Immunitätsgebiete, für das Agglutinationsphänomen, ist zuerst von Bordet¹⁾, dann von Joos²⁾ und Friedberger³⁾ die wichtige Rolle der Salze nachgewiesen worden.

Bezüglich der Präzipitinreaktion liegt nur eine Angabe von M. Neisser⁴⁾ vor, nach der die Präzipitation im salzfreien Medium im Gegensatz zur Agglutination beschleunigt vor sich gehen soll.

Angesichts dieses Widerspruches erschien mir eine Prüfung dieser Frage bei der Lipoidpräzipitation, die, wie ich glaube, schärfer ablesbare Ergebnisse liefert als die Eiweißpräzipitation, von Interesse.

Bei Anstellung der Reaktion mit einer Aufschwemmung des Lipoids in destilliertem Wasser einerseits und dialysiertem Serum andererseits blieb eine Präzipitatbildung völlig aus. Durch Kontrollversuche war festgestellt, daß der Präzipitinhalt des Serums bei der Dialyse praktisch quantitativ erhalten blieb.

Es war somit nachgewiesen, daß die Mitwirkung von Salzen bei der Lipoidpräzipitation unbedingt notwendig ist, und nachdem durch die Untersuchungen von M. Neisser und U. Friedemann⁵⁾ auf die Unterschiede in der Wirkung verschiedener Salze bei der Agglutination hingewiesen war, schien es auch bei der Lipoidpräzipitation von Interesse, den Einfluß verschiedener Salze auf die Ausflockung zu prüfen.

Als Vertreter von Salzen mit einwertigen Kationen wählte ich NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, als Salze zweiwertiger Metalle die Erdalkaliverbindungen MgSO_4 , CaCl_2 und BaCl_2 sowie die Schwermetallsalze ZnSO_4 und CuSO_4 , endlich als Salze mit dreiwertigen Kationen CeCl_3 und die komplexe Verbindung

1) Bordet, Annal. Pasteur, T. 13, 1899, p. 773.

2) Joos, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 36, 1901, p. 422.

3) Friedberger, Centralbl. f. Bakt., Bd. 30, 1901, p. 336.

4) M. Neisser, Verhandl. der 75. Versamml. Deutscher Naturf. u. Aerzte 1903; zit. nach L. Michaelis in Handb. der Biochemie, Bd. 2, 1, p. 571.

5) M. Neisser und U. Friedemann, Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 5, p. 465 und No. 19, p. 827.

Co(NH₂)₆Cl₃, die unlängst von Pribram¹⁾ wegen des Fehlens einer hydrolytischen Dissoziation empfohlen wurden.

Da die Neutralsalze an sich ausflockend auf Lipoide wirken, wie besonders Porges und Neubauer²⁾ gezeigt haben, war es notwendig, zunächst das Verhalten der von mir verwandten Salze als solche auf das Bandwurmlipoid zu prüfen.

Die Resultate sind in Tabelle IX niedergelegt.

Tabelle IX.

0,5 ccm Lecithin- aufschwem- mung +	5 nNaCl	n(NH ₄) ₂ SO ₄	n/10 MgSO ₄	n/10 CaCl ₂	n/10 BaCl ₂	n/100 ZnSO ₄	n/100 CuSO ₄	n/100 CeCl ₃	Co(NH ₂) ₆ Cl ₃
0,5 ccm	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++
0,2 "	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++
0,1 "	—	+++	±	+++	+++	+	+++	—	+++
0,05 "	.	—	—	++	++	±	±	—	+++
0,02 "	.	.	.	±	±	—	—	+++	+++
0,01 "	±	++
0,005 "	—	—

In Uebereinstimmung mit den Angaben von Porges und Neubauer ergab sich, daß die Lipoide von Salzen einwertiger Kationen nicht oder nur schwach ausgeflockt werden — die etwas stärkere Wirkung des (NH₄)₂SO₄ ist vielleicht auf hydrolytisch abgespaltene freie H-Ionen zu beziehen — stärker von Salzen zweiwertiger Metalle, und zwar im Gegensatz zu den gewöhnlichen Eiweißkörpern auch von den Salzen der Erdalkalien, und daß die stärkste Wirkung den Salzen dreiwertiger Metalle zukommt.

Dagegen wurden unregelmäßige Reihen mit mehreren Ausflockungszonen bei verschiedenen Verdünnungen nicht beobachtet. Auch ein Ausbleiben der Ausflockung bei Ueberschuß an Salz wurde nur für CeCl₃ festgestellt. Ferner war eine aufhellende Wirkung konzentrierter Lösungen einwertiger Salze auf die Lipoidemulsion nicht nachzuweisen, auch nicht bei KJ, dem diese Eigenschaft in besonders hohem Maße zukommen soll.

1) E. Pribram, Verhandl. d. Verein. f. Mikrobiol., 1912, p. 217.

2) O. Porges und E. Neubauer, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, 1907, p. 152.

Inwieweit diese Unterschiede auf die verschiedene Herkunft der Lecithine zu beziehen sind, müssen weitere Untersuchungen entscheiden.

Die kombinierte Wirkung des Präzipitins und der Salze wurde nun in der Weise geprüft, daß 0,5 ccm Lipoidaufschwemmung mit 0,05 ccm dialysierten Serums resp. der das Präzipitin quantitativ enthaltenden Albuminfraktion versetzt und für die einzelnen Salze der eben noch Ausflockung bewirkende Grenzwert bestimmt wurde (Tabelle X).

Tabelle X.

0,5 ccm Lecithinauf- schwemmung + 0,05 ccm dialysiertes Serum +	NaCl n/10	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ n/10	MgSO_4 n/100	CaCl_2 n/100	BaCl_2 n/100	ZnSO_4 n/1000	CuSO_4 n/1000	CeCl_3 n/1000	$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ n/1000
0,5 ccm	++	.	+++	.	.	+++			
0,2 "	+++	.	++	.	.	++	+++		
0,1 "	++	+++	+	+++	+++	+	++		
0,05 "	±	+	.	++	++	-	+		
0,02 "	.	±	.	±	±	.	.	++	++
0,01 "	±	+
0,005 "	-	-

Das Ergebnis dieses Versuches wird am deutlichsten zu erkennen sein, wenn nachfolgend die Flockungsgrenzwerte der Salze in Millimolen zusammengestellt und mit den für die einfache Salzwirkung ohne Mitwirkung von Präzipitin gefundenen Werten verglichen werden (Tabelle XI).

Tabelle XI.

	Flockungsgrenzwerte der Salze in Millimolen	
	ohne Präzipitin	mit Präzipitin
NaCl	1000	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	2
MgSO_4	10	1
CaCl_2	2	0,2
BaCl_2	2	0,2
ZnSO_4	1	0,1
CuSO_4	0,5	0,05
CeCl_3	0,1	0,1
$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$	0,1	0,1

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß die reine Salzwirkung durch das Präzipitin in sehr verschiedener Weise beeinflußt wird. Während bei den einwertigen Salzen die Wirkung ganz außerordentlich verstärkt wird, findet bei den zweiwertigen Salzen durchweg nur eine Verstärkung auf das Zehnfache statt, während bei den dreiwertigen Salzen eine Verstärkung überhaupt nicht mehr zu erkennen ist, eher eine Hemmung der reinen Salzwirkung stattzufinden scheint. Bezüglich der Resultate mit den dreiwertigen Salzen möchte ich mich aber nur mit einer gewissen Reserve ausdrücken, da hier die spezifische Ausflockung vielleicht nur auf eine ganz schmale Zone beschränkt ist, die sich bisher dem Nachweis entzogen hat. Ich sehe mich zu dieser Reserve veranlaßt, weil mir die Fällungswirkung des reinen CeCl_3 wegen ihrer engen Begrenzung anfänglich auch entging.

Der Unterschied zwischen Salzen mit ein- und zweiwertigen Kationen bleibt aber unverkennbar. Betrachtet man den Versuch unter dem Gesichtspunkt der Aktivierung des Präzipitins durch die Salze, so ergibt sich, daß hierbei der Unterschied in der Wirkung verschiedenwertiger Salze weniger stark ausgesprochen ist als bei der reinen Salzwirkung, ein Verhalten, wie es ähnlich Neisser und Friedemann bei der Agglutination beobachtet haben.

* * *

In der Literatur finden sich Angaben über Lipoidpräzipitine, soweit mir bekannt, nur in einer Arbeit von E. P. Pick und O. Schwarz¹⁾. Diese Autoren fanden, daß das Serum von Kaninchen, die mit einem Gemisch von Typhusbacillen und Organlipoiden immunisiert waren, auch die reinen Organlipoide ausflockte. In einem Falle gelang den Autoren auch Präzipitinbildung durch Immunisierung mit reinen Pferdeserumlipoiden. Das so gewonnene Serum reagierte nur mit den Lipoiden, nicht mit Pferdeserumeiweiß. Offenbar enthielt es also ein Lipoidpräzipitin.

1) E. P. Pick und O. Schwarz, Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1909, p. 453.

Zu erwägen wäre noch, ob etwa die Präzipitation der Lipoide durch spezifische Sera auf beigemengte Eiweißspuren zu beziehen ist. Es wäre hieran zu denken angesichts der Beobachtung von Pick und Schwarz, daß Typhusimmunsera eine Typhusbacillen enthaltende Lecithinemulsion ausflocken.

Dagegen ist aber einzuwenden, daß diese Gemische sehr eiweißreich waren. Die von Pick und Schwarz verwandten Emulsionen waren in der Weise hergestellt, daß drei Agarkulturen in 10 ccm einer 1-proz. Lecithinemulsion aufgeschwemmt wurden. Für die von mir benutzten Lecithinpräparate habe ich aber früher nachgewiesen, daß die Verunreinigung mit Eiweißkörpern, wenn überhaupt vorhanden, unter 1 Promille liegen muß. Daß so geringe Spuren die Ausflockung des gesamten Lipoids bedingen sollen, ist schon an sich höchst unwahrscheinlich. Ich habe diese Möglichkeit aber auch noch experimentell auszuschließen gesucht, indem ich Emulsionen aus Menschenherzlecithin mit wässrigem Bandwurmextrakt versetzte, teils auf 37°, teils auf 60° erwärmte, um eine engere Bindung der Komponenten herbeizuführen, und dann mit Immuserum versetzte. Es erfolgte eine zweifelhafte Flockenbildung, die wohl auf das Eiweiß zu beziehen war. Die große Masse der Emulsion blieb aber unverändert stabil. Eine Beeinflussung der Fällbarkeit des Lecithins durch beigemengtes Eiweiß ist also in keiner Weise zu erkennen. Uebrigens wird auch durch die oben erwähnte Beobachtung von Pick und Přibram die Existenz echter Lipoidpräzipitine bewiesen.

Zusammenfassung.

Bandwurmimmunsera flocken Emulsionen des aus Bandwurmeibessubstanz hergestellten Lecithins noch in weitgehenden Verdünnungen aus. Heterologe Sera wirken nur in hohen Konzentrationen ausflockend. Heterologes Lecithin wird durch Bandwurmsera nicht ausgeflockt.

Präzipitationswirkung und spezifisches Komplementbindungsvermögen verschiedener Sera gehen annähernd parallel.

In hohen Immunserumkonzentrationen kann die Präzipitatbildung ausbleiben. Bereits gebildetes Präzipitat wird weder durch Antigen- noch durch Antikörperüberschuß wieder gelöst.

Bei geeigneten Mengenverhältnissen werden sowohl Antigen wie Antikörper quantitativ ausgefällt.

Bei halbstündigem Erhitzen auf 65° verlieren die Sera ihre Präzipitationswirkung. Sie hemmen nunmehr die Präzipitation durch natives Serum. Erhitzen des Lipoids auf 65 oder 100° setzt seine Fällbarkeit nicht herab, sondern scheint sie etwas zu erhöhen.

Komplementhaltiges Serum hemmt die Lipoidpräzipitation.

Aus dem Präzipitat läßt sich durch Behandlung mit Alkohol oder Aether das Lipoid quantitativ wiedergewinnen. Der Antikörper läßt sich nur zum geringen Teil nachweisen, wahrscheinlich wegen der bei der Alkohol- oder Aetherbehandlung stattfindenden teilweisen Eiweißkoagulation. Nach Kochen des Präzipitats läßt sich das Lipoid ebenfalls quantitativ wiedergewinnen, während der Antikörper zerstört oder wenigstens seines Komplementbindungsvermögens beraubt wird.

Im salzfreien Medium geht die Lipoidpräzipitation nicht vor sich. Die Aktivierungswirkung der Salze nimmt mit der Wertigkeit ihrer Kationen zu, doch nicht in gleich starkem Maße wie ihre eigene Ausflockungswirkung auf das Bandwurmlécithin.

Heterologes Lecithin wird auch im Gemisch mit Bandwurmeiweiß nicht von Bandwurmimmunserum ausgeflockt.

Nachdruck verboten.

[Travail de l'Institut de thérapeutique de l'Université de Bruxelles.]

Recherches sur l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps par l'acide silicique.

Par **Edgard Zunz.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. August 1913.)

I. Introduction.

Des recherches antérieures, faites en partie avec la collaboration de M. le Dr. Léon Jacqué¹⁾, m'ont amené à reconnaître un certain degré de spécificité à l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps.

Le noir animal adsorbe la toxine et l'antitoxine diphtériques. L'argile, le kaolin, le talc, le kieselgur, le charbon de bois, le sulfate de baryum ne les adsorbent pas.

Le noir animal, l'argile et le kaolin adsorbent la toxine et l'antitoxine tétaniques. Le talc adsorbe la toxine tétanique, mais pas l'antitoxine. Au contraire, le kieselgur et le sulfate de baryum adsorbent cette antitoxine, mais pas la toxine correspondante.

Le noir animal, l'argile et le kaolin, et à un faible degré le talc et le charbon de bois, adsorbent les hémolysines tétanique et du venin de cobra. Le kieselgur ne les adsorbe pas.

Aucun des produits employés à cet effet adsorbe soit l'antily sine des sérums antitétanique et antivenimeux, soit les combinaisons toxine-antitoxine.

Ces résultats et d'autres considérations développées dans mes précédentes communications tendent à rapprocher dans une plus ou moins grande mesure l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps des adsorptions d'ordre électrochimique.

Les amicros de l'acide silicique colloïdal sont, en général, pourvus d'une charge électrique négative²⁾. Or, plusieurs

1) L. Jacqué et E. Zunz, Arch. internat. de Physiol., T. 8, 1909, p. 227—270. — E. Zunz, Arch. di Fisiol., Vol. 7, 1909, p. 137—138. — Bull. de la Soc. chimiq. de Belgique, T. 23, 1909, p. 374—378. — Bull. de l'Acad. roy. de Médec. de Belgique, 4^{ème} série, T. 24, 1910, p. 691—718.

2) R. Zsigmondy, Kolloidchemie, Leipzig 1912, p. 147. Tout un chapitre de cet important traité (p. 145 à 167) est consacré à l'acide silicique colloïdal.

observateurs ont relaté que l'acide silicique colloïdal jouissait de propriétés thérapeutiques et d'une capacité d'adsorption du radium fort différentes selon sa provenance commerciale. D'après le Comte Botho Schwerin, ceci proviendrait de la présence de fer, de sulfates, de chlorures et d'autres impuretés dans la plupart des échantillons d'acide silicique, dont la capacité d'adsorption serait ainsi en quelque sorte saturée par ces substances étrangères. Grâce à un procédé spécial de purification, la Gesellschaft für Elektrosmose, de Francfort-sur-Main, serait parvenue à préparer de l'acide silicique colloïdal, fortement électronégatif, débarrassé des substances étrangères qui exercent une influence sur le caractère de sa charge électrique. Cet acide silicique purifié par voie électroosmotique posséderait une notable capacité d'adsorption pour des corps électropositifs tels que le bleu de méthylène.

On peut dès lors se demander si les résultats favorables obtenus par d'éminents cliniciens dans le traitement des maladies infectieuses au moyen de l'acide silicique purifié par voie électroosmotique¹⁾ ne tiennent pas en partie à un pouvoir spécial d'adsorption de cet acide vis à vis de produits nocifs pour l'économie. S'il en est bien ainsi, on doit s'attendre à trouver des différences dans la façon dont se conduisent vis à vis des toxines, des lysines et de leurs anticorps les échantillons d'acide silicique colloïdal purifié ou non par voie électroosmotique.

Il vient d'être rappelé que la toxine diphtérique n'est adsorbée de façon appréciable par aucun des silicates hydratés naturels utilisés jusqu'à présent dans ce but. D'autre part, ces produits (argile, kaolin, kieselgur, talc) n'agissent nullement tous de façon identique pour ce qui concerne l'adsorption tant de la toxine et de l'antitoxine tétaniques que des lysines tétanique et du venin de cobra.

Le kaolin est un silicate hydraté d'alumine $H_4Al_2Si_2O_9$, d'une pureté relative assez considérable, tandis que l'argile représente par contre un silicate hydraté d'alumine en aucune façon exempt de matières étrangères. On peut considérer le talc comme un silicate hydraté naturel de magnésie $H_2Mg_3Si_4O_{12}$ de composition fort constante. Le kieselgur, formé par l'accumulation de frustules de diatomées, se rattache à l'opale ou silice hydratée et présente, d'un échantillon à l'autre des variations nullement négligeables de sa composition chimique.

1) R. Marcus, Verh. d. Ges. Deutscher Naturf. u. Aerzte, Karlsruhe 1912, p. 465—466.

Le plus ou moins grand degré de pureté de ces divers silicates hydratés naturels et la nature de leur charge électrique, influencée en partie par la présence de substances étrangères, interviennent certes dans l'explication des faits signalés plus haut.

Aussi m'a t'il paru intéressant d'étudier comment se comportent vis à vis des toxines, des lysines et de leurs anticorps divers échantillons d'acide silicique chimiquement pur, d'acide silicique électronégatif purifié par voie électroosmotique et de silicate d'alumine hydraté électropositif. A titre de comparaison, je me suis, en outre, servi, dans une partie des expériences, de noir animal, d'argile, de kieselgur et de talc.

II. Technique.

Grâce à la grande obligeance de M. Robert Marcus (de Francfort-sur-Main), j'ai obtenu 6 échantillons différents d'acide silicique (A, B, C, D, E et F) et 2 de silicate hydraté d'alumine (A et B).

L'acide silicique A est de l'acide dit chimiquement pur, provenant de la maison E. Merck, de Darmstadt. L'acide silicique B est purifié par voie électroosmotique; sa composition serait la suivante: H_2O 5.23 %, SiO_2 94.47 %, résidu 0.30 %. D'après M. le Dr. Siedentopf, d'Iéna, cet acide silicique contiendrait de fines particules en proportion beaucoup plus considérable que l'acide silicique A. Les acides C à F sont préparés par précipitation, d'après les indications de M. Robert Marcus, aux dépens d'acides siliciques considérés comme chimiquement purs. Les acides D et F sont finement broyés, les acides C et E par contre pas. Les acides E et F donnent des solutions légèrement alcalines.

Le silicate d'alumine hydraté A est considéré comme chimiquement pur; il a été soigneusement débarrassé de toute trace d'alcali. Le silicate d'alumine hydraté B réagit au contraire de façon alcaline.

Dans l'expérience No. 4 du tableau I, j'ai, de plus, employé divers produits pulvérulents préparés par M. Robert Marcus¹⁾ en partant d'acide silicique B purifié par voie électroosmotique et d'autres substances: «charbon de sucre» (Zuckerkohle) purifié de la même manière, métaux etc.

La toxine diphtérique²⁾ a été employée soit telle quelle, soit diluée au moyen de 9 volumes de solution physiologique ou de liquide de Ringer.

1) Il s'agit de mélanges préparés d'après les procédés patentés par M. Robert Marcus (voir deutsches Patent 229 141, français Patent 433 779).

2) Les toxines diphtérique et tétanique, le venin de cobra, les sérums antidiphtérique, antitétanique et antivenimeux ont été mis à ma disposition par l'Institut Pasteur du Brabant, l'Institut de thérapeutique expérimentale

La toxine tétanique a été diluée au moyen de 3 volumes de solution de chlorure de sodium à 0.85 % ou de liquide de Ringer.

Les sérums antidiphthérique et antitétanique ont été examinés tels quels ou après traitement par la méthode de Frouin¹⁾ qui permet d'obtenir des solutions d'antitoxine diphthérique ou tétanique exemptes de la majeure partie des protéines du sérum dont elles proviennent. Le sérum antitétanique sec a été dissous dans la quantité de solution de chlorure de sodium à 0.85 % nécessaire pour obtenir une solution ayant une valeur antitoxique de $\frac{1}{100}$ A. E. par centimètre cube.

Les mélanges de toxine et d'antitoxine diphthériques ont été maintenus pendant 2 heures à 38° C avant tout contact avec les adsorbants. Le mélange de toxine tétanique et de sérum antitétanique est resté une demi heure à 20° C, à l'abri de la lumière, avant d'être mis en contact avec les adsorbants.

La solution de tétanolysine a été diluée à 25 % au moyen de 3 volumes de solution chlorurée sodique à 0.85 %.

On a préparé une solution de venin de cobra à 1 % dans du liquide physiologique.

Lors de chaque expérience, on a conservé une partie du liquide envisagé pour les essais de contrôle. Le restant a été mis en contact avec les divers adsorbants dans des flacons stériles. Ceux ci renfermaient selon le cas 2,4 ou 5 grammes d'adsorbant pour un volume respectif de liquide de 10 à 20, 20 à 40 et 50 centimètres cubes. Après 24 heures de séjour à une température ne dépassant pas 20° C pour les expériences entreprises avec la toxine et l'antitoxine diphthériques, 10° C pour celles effectuées avec la toxine et l'antitoxine tétaniques, les lysines et les antilyssines, on filtre les divers liquides. Pendant le contact des différentes solutions avec les adsorbants, on a soumis à plusieurs reprises les ballons les renfermant à une agitation d'un quart d'heure à une demi-heure. Ces ballons ont été placés à l'abri de la lumière, et la filtration a eu lieu dans ces mêmes conditions en prenant les précautions indispensables d'asepsie.

Pour constater s'il y a eu ou non adsorption, j'ai eu recours aux méthodes bactériologiques habituelles.

On injecte à un cobaye neuf de 250 grammes une quantité de filtrat provenant du mélange ayant contenu primitivement de la toxine diphthérique représentant 50 à 60 doses mortelles en l'absence de toute adsorption du poison. Si l'animal survit sans perte notable de poids ou symptômes de diphthérie au bout de 2 à 3 semaines, la toxine a été complètement adsorbée. Lorsqu'elle ne l'a pas été, le cobaye est toujours mort endéans 4 jours.

de Francfort-sur-Main, l'Institut Pasteur de Lille et l'Institut Pasteur de Paris. Je tiens à remercier vivement MM. les Professeurs Bordet, Calmette, Delezenne et Ehrlich de leur extrême amabilité.

1) A. Frouin, Compt. rend. de la Soc. de Biolog., T. 65, 1908, p. 444—445 et 592—593; T. 68, 1910, p. 173—174.

L'adsorption de l'antitoxine diphtérique se déceit par l'absence de tout pouvoir protecteur du filtrat pour un cobaye auquel on injecte en même temps une ou plusieurs doses de toxine diphtérique.

On se rend compte si les filtrats provenant des mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques sont restés toxiques ou s'ils continuent à préserver le cobaye contre l'action nocive d'une ou de deux doses mortelles de poison diphtérique. On met ensuite en lumière la présence du complexe toxine-antitoxine dans ces filtrats en le dissociant. A cet effet, on ajoute à 20 ccm de filtrat 2 ccm de solution décimale d'acide chlorhydrique, puis, après une demi-heure de séjour à 38° C, on injecte à des cobayes ce liquide acidifié, dont la toxine a été ainsi remise en liberté¹⁾. L'antitoxine débarrassée de la majeure partie des protéines du sérum se combine toutefois d'une manière assez intime à la toxine diphtérique pour empêcher dans certains cas la mise en liberté du poison par l'addition d'acide. On chauffe alors le filtrat pendant 10 minutes au bain-marie entre 70° et 75° C; le complexe toxine-antitoxine se dissocie, la toxine voit sa nocivité annihilée et l'on reconnaît la présence de l'antitoxine au pouvoir protecteur du filtrat ainsi traité pour le cobaye soumis à l'action nocive d'une ou de deux doses mortelles de poison diphtérique.

La présence ou l'absence de tétanotoxine a été recherchée par l'injection sous-cutanée du filtrat à des souris blanches, celle d'antitoxine par la détermination du pouvoir protecteur du filtrat pour cet animal auquel on injecte en même temps du poison tétanique²⁾.

Pour démontrer l'existence du complexe toxine-antitoxine tétaniques, on ajoute 1 c. c. d'eau oxygénée à 5 % à 10 c. c. de filtrat, de façon à détruire la toxine dissociée peu à peu hors du complexe³⁾. Après 48 heures, on se débarrasse de l'excès d'eau oxygénée en ajoutant 0.2 c. c. de sang défibriné au filtrat. On laisse reposer le tout pendant 24 heures, puis on filtre et l'on ajoute de la toxine tétanique au liquide ainsi obtenu. Après une demi-heure à une heure, on injecte ce nouveau mélange à des souris. Si celles-ci ne manifestent pas de tétanos, cela provient de la neutralisation de la toxine par l'antitoxine provenant de la dissociation du complexe toxine-antitoxine non adsorbé. Comme le mélange de toxine et d'antitoxine tétaniques employé renfermait un excès d'antitoxine, j'ai dû me baser sur l'augmentation du pouvoir antitoxique du filtrat après traitement par l'eau oxygénée lorsque (après contact avec l'acide silicique chimiquement pur), l'excès d'antitoxine n'a pas été adsorbé.

1) J. Morgenroth und K. Willanen, Virchows Arch. f. pathol. Anat., Bd. 190, 1907, p. 371—381.

2) M. v. Eisler und E. Pribram, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung de R. Kraus et C. Levaditi, T. 1, Iéna 1908, p. 103—136; T. 2, 1909, p. 139—163.

3) E. Löwenstein, cité d'après E. P. Pick, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung de R. Kraus et C. Levaditi, T. 1, Iéna 1908, p. 533.

On détermine, par la méthode colorimétrique de Madsen¹⁾, la valeur hémolytique de la solution de tétanolysine avant et après contact avec les adsorbants employés. Pour cela, on prépare une série de tubes renfermant 0.2 à 1.0 c. c. soit de tétanolysine diluée à 25 % au moyen de 3 volumes de solution chlorurée sodique à 0.85 %, soit de l'un ou l'autre des filtrats correspondants. On ajoute à chacun de ces tubes, d'abord la quantité de solution de chlorure de sodium à 0.85 % nécessaire pour obtenir 8 c. c. de liquide total, puis 2 c. c. de suspension à 2.5 % d'hématies de cheval, lavées au préalable 3 fois au moyen de solution physiologique. Après avoir bien mélangé le contenu de chaque tube, on place les divers tubes pendant 1 heure à 38° C., puis pendant 23 heures à la glacière. Au bout de ce laps de temps, on les compare aux tubes d'une échelle colorimétrique préparée selon les indications de Madsen en partant d'un c. c. d'hématies de cheval.

Afin de reconnaître si l'antilyisine du sérum antitétanique est ou non adsorbée, on mélange à la solution de tétanolysine diluée à 25 % un volume soit de sérum antitétanique dilué à 25 % au moyen de 3 volumes de solution chlorurée sodique à 0.85 %, soit de l'un ou l'autre filtrat correspondant. On maintient ces mélanges pendant une demi-heure à 20° C., puis on recherche la valeur hémolytique de chacun de ces mélanges en ajoutant à 8 c. c. de mélange 2 c. c. de suspension à 2.5 % d'hématies lavées de cheval.

Pour apprécier s'il y a eu ou non adsorption de la lysine du venin de cobra, on détermine d'abord, lors de chaque série d'expériences, la quantité de venin nécessaire pour provoquer en une demi-heure à 37° l'hémolyse complète d'une suspension à 50 % de globules rouges de cobaye, lavés à trois reprises au moyen de solution de chlorure de sodium à 0.85 %. On verse, dans ce but, dans des tubes à essai stériles 0.1 à 0.9 c. c. de solution de venin et la quantité de solution chlorurée sodique à 0.85 % nécessaire pour compléter le volume d'un centimètre cube. On introduit rapidement dans chaque tube 0.1 c. c. de la suspension d'hématies, puis l'on agite le mélange et on le maintient pendant une demi-heure à 38° C. En général, 0.2 c. c. de solution de venin à 1 ‰ entraînent l'hémolyse complète; parfois 0.1 c. c. suffit déjà; exceptionnellement il faut arriver à 3 c. c. On recherche, après contact avec l'adsorbant, si le filtrat produit encore l'hémolyse et quelle quantité de filtrat est le cas échéant nécessaire à cet effet.

Pour voir s'il y a eu ou non adsorption de l'antilyisine du sérum antivenimeux on commence par déterminer la quantité de sérum nécessaire pour empêcher l'hémolyse par le venin de cobra, puis l'on recherche si le filtrat obtenu après contact avec l'adsorbant possède encore cette propriété non modifiée ou affaiblie dans une certaine mesure. Selon la solution de venin de cobra et la suspension de globules rouges employées, il faut d'habitude ajouter à 0.2 c. c. de solution de venin à 1 ‰ 0.2 à 0.3 c. c. de

1) T. Madsen, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforschung de R. Kraus et C. Levaditi, T. 1, Iéna 1908, p. 57.

Tableau I.

Numéro de l'expérience	Solution de toxine diphtérique utilisée	Substance employée	Quantité de filtrat utilisée, en centimètres cubes	Résultat	Conclusion
1	telle quelle	acide silicique A	0.1 à 1.0	mort en 1 à 3 jours	pas d'adsorption
		" B	0.1 à 1.0	" " 3 à 6 "	très légère adsorption
		noir animal	0.1 à 1.0	mort en 1 à 3 jours	pas d'adsorption
		acide silicique A	0.1 à 1.0	" 2 à 4 "	" "
		" B	0.1 à 1.0	mort en 9 à 12 jours (10 doses moyennes pour 50 doses mortelles)	adsorption partielle
		" C	0.1 à 1.0	mort en 2 à 4 jours	pas d'adsorption
		" D	0.1 à 1.0	" 2 à 4 "	" "
		" E	0.1 à 1.0	" 2 à 5 "	" "
		" F	0.1 à 1.0	" 2 à 4 "	" "
		" silicate d'alumine hydraté A	0.1 à 1.0	" 1 à 3 "	" "
2	telle quelle	" B	0.1 à 1.0	" 1 à 4 "	" "
		" argile	0.1 à 1.0	" 2 à 4 "	" "
		" kaolin	0.1 à 1.0	" 1 à 4 "	" "
		" kiesegel	0.1 à 1.0	" 1 à 4 "	" "
		" talc	0.1 à 1.0	" 1 à 3 "	" "
		" "	0.1 à 1.0	" 1 1/2 à 4 "	" "
		" "	0.1 à 1.0	" "	" "
		" "	0.1 à 1.0	" "	" "
		" "	0.1 à 1.0	" "	" "
		" "	0.1 à 1.0	" "	" "
3	diluée par 9 volumes de solution physiolog. ou de liquide de Ringer	acide silicique A	0.1 à 10.0	mort en 2 à 4 jours	pas d'adsorption
		" B	0.1 à 10.0	survie	adsorption

4 diluée par 9 volumes de solution physiolog. ou de liquide de Ringer	noir animal	0.1 à 10.0	survie	adsorption
	acide silicique A	0.1 à 10.0	"	"
	" B	0.1 à 10.0	"	"
	" C	0.1 à 10.0	mort en 12 à 17 jours (14 jours en moyenne pour 10 doses mortelles)	adsorption incomplète
	" D	0.1 à 10.0	mort en 9 à 13 jours (10 jours en moyenne pour 10 doses mortelles)	"
	" E	0.1 à 10.0	survie	adsorption
	" F	0.1 à 10.0	"	"
	silicate d'alumine hydraté A	0.1 à 10.0	mort en 10 à 16 jours (12 jours en moyenne pour 10 doses mortelles)	adsorption incomplète
	" B	0.1 à 10.0	survie	adsorption
	argile	0.1 à 10.0	mort en 2 à 4 jours	pas d'adsorption
	kaolin	0.1 à 10.0	" 1 à 4 "	"
	kieselgur	0.1 à 10.0	" 2 à 4 "	"
	talc	0.1 à 10.0	" 1 1/2 à 5 "	" adsorption
	acide silicique B ayant adsorbé du tellure	0.1 à 10.0	survie	"
	acide silicique B ayant adsorbé de l'argent	0.1 à 10.0	"	"
	acide silicique B ayant adsorbé de l'or	0.1 à 10.0	"	"
acide silicique B + 33 hydrosol d'argent	0.1 à 10.0	"	"	
acide silicique B contenant 25 % de baume du pérou	0.1 à 10.0	"	"	
acide silicique B contenant 30 % d'isarol	0.1 à 10.0	"	"	
mélange de 90 parties d'acide silicique B + 10 parties H ₂ O ₂ (30 %) + 2 gouttes essence d'anis	0.1 à 10.0	mort en 2 à 4 jours	pas d'adsorption	
mélange de 20 parties d'acide silicique B et 30 parties H ₂ O ₂ (30 %) charbon de sucre, purifié par voie électrosmotique, puis desséché à 120°	0.1 à 10.0	" 2 à 4 "	"	
4 parties de charbon de sucre + 120 parties d'acide silicique B	0.1 à 10.0	" 2 à 4 "	"	

sérum tel quel et 0.6 à 0.4 c. c. de solution physiologique pour empêcher l'hémolyse.

L'adsorption de la combinaison lysine-antily sine (du venin de cobra et du sérum antivenimeux) a été recherchée de façon indirecte. Je n'ai pas pu dissocier la combinaison lysine-antily sine, par les procédés préconisés par Morgenroth¹⁾ et par Teruuchi²⁾ qui exigent d'assez grandes quantités de liquide.

III. Toxine et antitoxine diphtérique.

a) Toxine diphtérique.

Les résultats obtenus avec la toxine diphtérique sont rassemblés dans le tableau I. J'ai employé deux échantillons différents de toxine diphtérique. La dose mortelle simple, c'est à dire celle qui entraîne au maximum en 4 jours la mort d'un cobaye de 250 grammes, correspondait à 0.004 c. c. dans le 1^{er} cas (expériences 1 et 3), à 0.005 c. c. dans le second (expériences 2 et 4).

Des divers produits employés, seul l'acide silicique purifié par voie électroosmotique (acide B) a manifesté de faibles propriétés adsorbantes pour la toxine telle quelle. L'injection d'une quantité de filtrat correspondant à 50 doses mortelles a amené une issue fatale au bout de dix jours dans l'expérience 2.

La toxine diluée par 9 volumes de solution physiologique et de liquide de Ringer est adsorbée par le noir animal, par l'acide silicique et par le silicate d'alumine hydraté. Ceci confirme l'action favorable des sels, ou tout au moins du chlorure de sodium, sur l'adsorption des toxines. L'acide silicique purifié par voie électroosmotique possède un pouvoir d'adsorption plus considérable pour la toxine diphtérique diluée que l'acide dit chimiquement pur. L'adsorption de tellure, d'argent ou d'or par l'acide silicique purifié par voie électroosmotique ne fait pas disparaître le pouvoir adsorbant de cet acide pour la toxine diphtérique. Il en est de même de l'addition d'hydrosol d'argent, de baume du Pérou, d'isarol à l'acide silicique électroosmotique. Par contre, l'addition d'eau

1) J. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., Bd. 42, 1905, p. 1550—1554. — Arb. a. d. patholog. Inst. zu Berlin, 1906, p. 437—454. — J. Morgenroth und D. Pane, Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906, p. 354—366.

2) Y. Teruuchi, Zeitschr. f. physiolog. Chem., Bd. 41, 1907, p. 478—487.

oxygénée ou de „charbon de sucre“ purifié par voie électro-osmotique à l'acide silicique électroosmotique lui a enlevé le pouvoir d'adsorber la toxine diphtérique.

Les échantillons d'acide silicique dit chimiquement pur et le silicate d'alumine hydraté à réaction alcaline adsorbent mieux la toxine diphtérique que les échantillons de ces mêmes substances ne réagissant pas de cette manière. On sait que la réaction du milieu peut favoriser ou entraver l'adsorption ¹⁾. En voilà un nouvel exemple.

L'argile, le kaolin, le kieselgur et le talc se sont conduits comme dans mes expériences antérieures, c'est à dire n'ont pas manifesté le moindre pouvoir adsorbant pour la toxine diphtérique.

b) Antitoxine diphtérique.

Mes expériences antérieures m'ont amené à admettre que dans le sérum antidiphtérique, l'antitoxine adhère probablement aux protéines et forme avec elles un complexe non adsorbé par le noir animal. Ce dernier adsorbe au contraire l'antitoxine isolée par la méthode de Frouin. Les expériences rapportées dans le tableau II confirment entièrement cette opinion.

Des autres produits expérimentés, seuls les échantillons A et B d'acide silicique ont adsorbé dans une certaine mesure l'antitoxine diphtérique. Ils sont même parvenus parfois à s'emparer d'une partie de cette antitoxine renfermée dans le sérum antidiphtérique. Tel a été le cas une fois sur 3 (expérience 2) pour l'acide silicique chimiquement pur et (expérience 3) pour l'acide électroosmotique. L'acide silicique chimiquement pur n'est néanmoins point toujours parvenu à adsorber de façon appréciable l'antitoxine isolée par la méthode de Frouin.

Jusqu'à présent, nous ne disposons d'aucun élément qui nous permette de nous rendre compte des raisons de ces résultats en apparence discordants.

Nous devons encore mentionner que les quatre autres échantillons d'acide silicique (C, D, E, F), les deux échantillons de silicate d'alumine hydraté, l'argile, le kaolin, le kieselgur, le talc n'ont dans aucun cas adsorbé l'antitoxine diphtérique.

1) L. Michaelis und P. Rona, Biochem. Zeitschr., Bd. 25, 1910, p. 359—366.

Tableau II.

Numéro de l'expérience	Solution d'antitoxine diphtérique utilisée	Substance employée	Pouvoir protecteur du filtrat pour la toxine diphtérique	Conclusion
1	sérum tel quel	acide silicique A	non affaibli	pas d'adsorption
		" " B	" "	" " "
2	sérum tel quel	noir animal	non affaibli	pas d'adsorption
		acide silicique A	très "	adsorption incompl.
3	sérum tel quel	" " B	non "	pas d'adsorption
		noir animal	non affaibli	pas d'adsorption
		acide silicique A	" "	" " "
		" " B	très "	adsorption incompl.
		" " C	non affaibli	pas d'adsorption
		" " D	" "	" "
		" " E	" "	" "
		" " F	" "	" "
		silicate d'alumine hydraté A	" "	" "
		" " B	" "	" "
4	solution d'antitoxine isolée par la méthode de Frouin	argile	" "	" "
		kaolin	" "	" "
		kieselgur	" "	" "
		talc	" "	" "
		noir animal	disparu	adsorption
		acide silicique A	non affaibli	pas d'adsorption
		" " B	très "	adsorption incompl.
		" " C	non "	pas d'adsorption
		" " D	" "	" "
		" " E	" "	" "
5	solution d'antitoxine isolée par la méthode de Frouin, additionnée de 9 volumes de liquide de Ringer	" " F	" "	" "
		silicate d'alumine hydraté A	" "	" "
		" " B	" "	" "
		argile	" "	" "
		kaolin	" "	" "
		kieselgur	" "	" "
		talc	" "	" "
		noir animal	disparu	adsorption
		acide silicique A	très affaibli	adsorption incompl.
		" " B	" "	" "
" " C	non "	pas d'adsorption		

c) Mélanges de toxine et d'antitoxine diphtérique.

Le tableau III résume les 4 expériences effectuées avec les mélanges de toxine diphtérique et de sérum antidiphtérique ou de solution d'antitoxine isolée par la méthode de Frouin. Dans chacune de ces expériences, je suis parti d'un mélange à excès de toxine, d'un mélange théoriquement neutralisé et d'un mélange à excès d'antitoxine.

Dans mes recherches antérieures, je ne suis jamais parvenu à constater d'adsorption du complexe toxine-antitoxine diphtériques. Il en a été de même dans les expériences 1, 3 et 4 du tableau III. Au contraire, dans l'expérience 2, ce complexe a été parfaitement adsorbé par les deux produits expérimentés: acide silicique dit chimiquement pur et acide silicique purifié par voie électroosmotique. Aussi m'a t'il paru utile de reproduire dans le tableau IV le protocole détaillé de cette expérience.

Les expériences 1 et 4 du tableau III viennent à l'appui des expériences du tableau I, démontrant que l'acide silicique électroosmotique possède un pouvoir d'adsorption de la toxine

Tableau III.

Numéro de l'expérience	Mélange utilisé de toxine et d'antitoxine diphtériques	Substance employée	Adsorption			
			de la toxine	de l'antitoxine	du complexe toxine-antitoxine	
1	toxine et sérum	à excès de toxine	acide silicique A	non	.	non
			" " B	oui	.	"
		neutre	" " A	.	.	"
			" " B	.	.	"
		à excès d'antitox.	" " A	.	oui	"
			" " B	.	non	"
2	toxine et solution d'antitoxine	à excès de toxine	acide silicique A	oui	.	oui
			" " B	oui	.	"
		neutre	" " A	.	.	"
			" " B	.	.	"
		à excès d'antitox.	" " A	.	oui	"
			" " B	.	oui	"
3	toxine et solution d'antitoxine	à excès de toxine	noir animal	oui	.	non
			acide silicique A	oui	.	"
		" " B	oui	.	"	
		neutre	noir animal	.	.	"
			acide silicique A	.	.	"
		" " B	.	.	"	
à excès d'antitox.	noir animal	.	oui	"		
	acide silicique A	.	oui	"		
" " B	.	non	"			

Numéro de l'expérience	Mélange utilisé de toxine et d'antitoxine diphtériques	Substance employée	Adsorption			
			de la toxine	de l'anti-toxine	du complexe toxine-antitoxine	
4	à excès de toxine	noir animal	oui	.	non	
		acide silicique A	non	.	non	
		" " B	oui	.	"	
		" " C	incompl.	.	"	
		" " D	"	.	"	
		" " E	oui	.	"	
		" " F	oui	.	"	
		silicate d'alumine hydraté A	incompl.	.	"	
		silicate d'alumine hydraté B	oui	.	"	
		argile	non	.	"	
		kaolin	non	.	"	
		kieselgur	non	.	"	
		talc	non	.	"	
		neutre	noir animal	.	.	"
			acide silicique A	.	.	"
	" " B		.	.	"	
	" " C		.	.	"	
	" " D		.	.	"	
	" " E		.	.	"	
	" " F		.	.	"	
	silicate d'alumine hydraté A		.	.	"	
	silicate d'alumine hydraté B		.	.	"	
	argile		.	.	"	
	kaolin		.	.	"	
	kieselgur		.	.	"	
	talc		.	.	"	
	à excès d'anti-toxine		noir animal	.	oui	"
			acide silicique A	.	oui	"
		" " B	.	non	"	
		" " C	.	"	"	
" " D		.	"	"		
" " E		.	"	"		
" " F		.	"	"		
silicate d'alumine hydraté A		.	"	"		
silicate d'alumine hydraté B		.	"	"		
argile		.	"	"		
kaolin	.	"	"			
kieselgur	.	"	"			
talc	.	"	"			

diphtérique supérieur à celui du même acide dit chimiquement pur, non encore débarrassé des diverses substances étrangères qui agissent sur son signe électrique.

Tableau IV.

Mélange de toxine et de solution d'antitoxine diphthériques	Liquide injecté (Expérience 2 du Tableau III)	Résultat de l'injection	
		du liquide initial	du filtrat provenant du liquide resté en contact avec l'acide silicique
à excès de toxine	2.5 c.c. mél. ou filtrat tel quel	mort en 3 jours	survie
	2.5 " " " " " " " "	" " 3 "	mort en 6 jours
	2.5 " " " " " " " "	" " 2 "	" " 4 "
	2.75 " " " " " " " "	" " 4 "	" " 5 "
	2.75 " " " " " " " "	" " 2 "	mort en 3 jours
	2.75 " " " " " " " "	" " 1 jour	mort en 4 jours
	2.5 " " " " " " " "	survie	" " 2 "
	2.5 " " " " " " " "	" " "	survie
	2.5 " " " " " " " "	" " "	mort en 3 jours
	2.75 " " " " " " " "	" " "	" " 2 "
	2.75 " " " " " " " "	" " "	" " 2 "
	neutre	2.5 c.c. mél. ou filtrat tel quel	survie
2.5 " " " " " " " "		mort en 3 jours	mort en 3 jours
2.5 " " " " " " " "		" " 1 jour	" " 1 jour
2.75 " " " " " " " "		" " 5 jours	" " 3 "
2.75 " " " " " " " "		" " 4 "	survie
2.75 " " " " " " " "		" " 2 "	mort en 3 jours
2.5 " " " " " " " "		survie	" " 2 "
2.5 " " " " " " " "		" " "	survie
2.5 " " " " " " " "		" " "	mort en 4 jours
2.75 " " " " " " " "		" " "	" " 3 "
2.75 " " " " " " " "		" " "	mort en 5 jours
à excès d'anti-toxine		2.5 c.c. mél. ou filtrat tel quel	survie
	2.5 " " " " " " " "	" " "	mort en 4 jours
	2.5 " " " " " " " "	" " "	" " 3 "
	2.75 " " " " " " " "	" " "	survie
	2.75 " " " " " " " "	" " "	mort en 3 jours
	2.75 " " " " " " " "	" " "	" " 1 jour
	2.5 " " " " " " " "	survie	survie
	2.5 " " " " " " " "	" " "	mort en 5 jours
	2.75 " " " " " " " "	" " "	" " 2 "
	2.75 " " " " " " " "	" " "	survie
	2.75 " " " " " " " "	" " "	mort en 7 jours

Generated on 2019-01-12 23:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uc1.b3208392
 Public Domain in the United States; Google-digitized / http://www.hathitrust.org/access_use#pd-us-google

L'influence favorable de la réaction alcaline sur l'adsorption de la toxine diphtérique par l'acide silicique et par le silicate d'alumine hydraté, déjà signalée plus haut, ressort nettement de l'expérience 4 du tableau III.

Enfin, en mettant en regard les expériences des tableaux II et III, on constate que l'acide silicique électroosmotique semble adsorber moins bien l'antitoxine diphtérique que ne le fait l'acide dit chimiquement pur, c'est à dire renfermant encore certaines substances étrangères dont l'acide électroosmotique est débarrassé grâce à son mode spécial de traitement.

IV. Toxine, lysine, antitoxine et antilyisine tétaniques.

a) Toxine et lysine tétaniques.

Ainsi que le montre le tableau V, la tétanotoxine a été parfaitement adsorbée par le noir animal, par l'argile, par le kaolin, par le talc et par les divers échantillons d'acide silicique et de silicate d'alumine hydraté, sauf par l'acide silicique précipité à l'état dit chimiquement pur, non finement broyé, et présentant une réaction alcaline (acide E). Pourtant dans l'expérience 3, l'acide dit chimiquement pur n'a pas adsorbé la toxine tétanique, alors qu'il l'a fait dans les 4 autres expériences. Le kieselgur n'a pas non plus adsorbé cette toxine.

Il n'y a pas de parallélisme absolu entre l'adsorption de la tétanotoxine et de la tétanolysine. J'en ai signalé précédemment déjà quelques exemples. Le tableau V nous en fournit de nouveaux. Dans l'expérience 3, l'acide silicique dit chimiquement pur a adsorbé la tétanolysine, bien qu'il n'ait pas adsorbé la toxine tétanique. Au contraire dans les expériences 4 et 5, cet échantillon d'acide n'a pas adsorbé complètement la tétanolysine (expérience 4) ou ne l'a même pas du tout adsorbé (expérience 5), alors qu'il a adsorbé la tétanotoxine. Il en est de même dans ces deux dernières expériences de l'acide électroosmotique.

Les échantillons C, D et F d'acide silicique et le silicate d'alumine hydraté B n'ont pas adsorbé la tétanolysine, bien qu'ils aient adsorbé la tétanotoxine. L'échantillon E d'acide

Tableau V.

Numéro de l'expérience	Solution de toxine (et lysine) tétanique utilisée	Substance employée	Resultat relatif		Conclusion relative à la	
			à la toxicité	au degré d'hémolyse	tétanotoxine	tétanolysine
1	diluée par 3 vol. de liquide phys.	acide silicique A	survie	1.6 au lieu de 75 %	adsorption	adsorption
			"	"	"	"
2	diluée par 3 vol. de liquide phys.	acide silicique A	survie	1.2 au lieu de 80 %	adsorption	adsorption
			"	"	"	"
3	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	noir animal	survie	0.0 au lieu de 75 %	adsorption	adsorption
			mort en 3 jours	4.0	pas d'adsorption	"
4	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	acide silicique A	survie	6.0	adsorption	"
			"	"	"	"
5	diluée par 3 volumes de liquide de Ringer	noir animal	survie	2.0 au lieu de 70 %	adsorption	adsorption incomplète
			"	15.0	"	adsorpt. incomplète
6	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	acide silicique A	"	20.0	"	"
			"	65.0	"	pas d'adsorption
7	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	acide silicique A	"	70.0	"	"
			"	65.0	pas d'adsorpt. nette	"
8	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	silicate d'alumine hydraté A	survie	65.0	adsorption	"
			"	60.0	"	"
9	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	argile	"	65.0	"	très légère adsorpt.
			"	65.0	"	pas d'adsorption
10	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	kaolin	"	20.0	"	adsorpt. incomplète
			"	30.0	"	"
11	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	kieselgur	mort en 4 jours	60.0	pas d'adsorption	très légère adsorpt.
			survie	55.0	adsorption	"
12	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	talco	survie	40.0 au lieu de 75 %	adsorption	adsorpt. incomplète
			"	70.0	"	pas d'adsorption
13	diluée par 3 volumes de liquide physiologique	acide silicique A	"	70.0	"	"
			"	70.0	"	"

silicique, dont il a déjà été question plus haut, n'a pas non plus adsorbé la lysine tétanique.

L'argile et le kaolin ont adsorbé en partie seulement la tétanolysine, alors qu'ils ont adsorbé parfaitement la tétanotoxine. Le kieselgur n'a pas adsorbé celle-ci, mais s'est par contre emparé d'une faible partie de la tétanolysine. Le talc n'a guère adsorbé de tétanolysine et a au contraire adsorbé entièrement la tétanotoxine.

b) Antitoxine et Antilyisine tétaniques.

Au cours des expériences relatées dans le tableau VI, je n'ai jamais observé la moindre adsorption de l'antilyisine renfermée soit dans le sérum antitétanique, soit dans la solution d'antitoxine isolée hors de ce sérum par la méthode de Frouin.

Le noir animal et l'acide silicique dit chimiquement pur (échantillon A) ont toujours parfaitement adsorbé l'antitoxine tétanique, même déjà hors du sérum antitétanique non débarrassé de la majeure partie de ses protéines de la façon indiquée par Frouin.

L'acide silicique purifié par voie électroosmotique (échantillon B) n'a adsorbé l'antitoxine tétanique qu'exceptionnellement (une fois sur 5, dans l'expérience 4).

Les autres échantillons d'acide silicique (C, D, E, F) et le talc n'ont pas adsorbé l'antitoxine tétanique. Les deux échantillons de silicate d'alumine hydraté l'ont adsorbée en partie. L'argile, le kaolin et le kieselgur l'ont parfaitement adsorbée.

L'ensemble des expériences rassemblées dans les tableaux V et VI met en évidence d'une part une certaine supériorité du pouvoir d'adsorption de l'acide silicique électroosmotique pour la toxine tétanique sur cet acide non débarrassé des substances étrangères qui agissent sur la nature de sa charge électrique, d'autre part l'infériorité nette des propriétés adsorbantes de l'acide silicique purifié par voie électroosmotique pour l'antitoxine tétanique par rapport à celles de ce même acide non traité de cette manière. L'examen des tableaux I à III nous a conduit, d'ailleurs, à des constatations analogues pour ce qui concerne la toxine et l'antitoxine diphtériques.

Tableau VI.

Numéro de l'expérience	Solution d'anti-toxine (et anti-lysine) tétanique utilisée	Substance employée	Résultat relatif		Conclusion relative à	
			à la toxicité	au degré d'hémolyse	l'antitoxine	l'antilyisine
1	sérum tel quel	{ acide silicique " "	mort en 2 jours survie	0.0 au lieu de 75 % id.	adsorption pas d'adsorption	pas d'adsorption "
2	sérum tel quel	{ acide silicique " "	mort en 4 jours survie	0.0 au lieu de 80 % id.	adsorption pas d'adsorption	pas d'adsorption "
3	sérum tel quel	{ noir animal acide silicique " "	mort en 3 jours " 4 " survie	0.0 au lieu de 75 % id. "	adsorption " d'adsorption pas d'adsorption	pas d'adsorption " "
4	solution d'anti-toxine isolée par la méthode de Frouin	{ noir animal acide silicique " "	mort en 2 jours " 3 " " 3 "	0.0 au lieu de 80 % id. "	adsorption " "	pas d'adsorption " "
5	solution d'anti-toxine isolée par la méthode de Frouin	noir animal	mort en 3 jours	0.0 au lieu de 70 %	adsorption	pas d'adsorption
		acide silicique	" 4 "	id.	" d'adsorption	"
		" "	survie	" "	" "	"
		" "	" "	" "	" "	"
		" "	" "	" "	" "	"
		" "	" "	" "	" "	"
		silicate d'alumine hydraté	mort en 9 jours	" "	" adsorpt. incompl.	" "
		" argile	" 9 "	" "	" adsorption	" "
		" kaolin	" 3 "	" "	" "	" "
		" kieselgur	" 5 "	" "	" "	" "
		" talc	" 4 "	" "	" d'adsorption	" "
			survie	" "	" "	" "

c) Mélanges de toxine et d'antitoxine tétaniques.

On trouvera dans le tableau VII les résultats de deux expériences faites avec des mélanges de toxine tétanique et soit de sérum antitétanique, soit de solution d'antitoxine isolée hors de ce sérum par la méthode de Frouin. Ces deux mélanges renfermaient un excès d'antitoxine.

Aucun des adsorbants employés n'a adsorbé dans ces conditions le complexe toxine-antitoxine tétaniques.

L'antitoxine et l'antilyisine tétaniques se sont conduites vis à vis des divers adsorbants comme dans les expériences mentionnées dans le tableau VI. Toutefois dans l'expérience 1 du tableau VII, c'est à dire avec le mélange de sérum anti-tétanique et de toxine, l'antitoxine a été adsorbée par l'acide silicique électroosmotique et pas par l'acide non purifié de cette manière, ce qui est précisément l'inverse des constatations habituelles.

Comme le mélange en question contenait 4 volumes de sérum non débarrassé des protéines pour un volume de toxine tétanique diluée, il ne s'agit peut-être dans ce cas que de l'influence défavorable de la présence des protéines du sérum sur l'adsorption des antitoxines. On connaît, du reste, surtout depuis les travaux d'Hedin¹⁾ et de Gengou²⁾ la grande part prise dans les phénomènes d'adsorption par la substitution d'un phénomène d'adhésion à un autre, par la formation d'un complexe en lieu et place d'un autre.

J'ai déjà signalé antérieurement un fait analogue: adsorption de l'antitoxine par le sulfate de baryum hors du sérum antitétanique et absence d'adsorption de l'excès d'antitoxine par ce même sel en présence du complexe toxine-antitoxine tétaniques, lui même non adsorbé.

Au cours des présentes recherches, j'ai eu l'occasion d'observer d'autres exceptions de ce genre à la façon dont se comportent d'ordinaire les toxines, les lysines et leurs anticorps mis en présence d'acide silicique colloïdal purifié ou non par voie électroosmotique. Tel a été le cas pour la tétanotoxine (expérience 3 du tableau V), pour la tétanolysine (expériences 4 et 5 du tableau V), pour l'antitoxine tétanique

1) S. G. Hedin, *Ergebn. d. Physiol.*, Bd. 9, 1910, p. 433—450.

2) O. Gengou, *Arch. int. de Physiol.*, T. 8, 1908, p. 115—210.



Tableau VII.

Numéro de l'expérience	Mélange utilisé de toxine et d'antitoxine tétaniques	Substance employée	Résultat			Conclusion relative		
			Pouvoir protecteur pour la toxine tétanique		Degré d'hémolyse	à l'antitoxine	au complexe toxine-antitoxine	à l'antilyesine
			directement	après traitement par l'eau oxygénée				
1	sérum et toxine, à excès d'antitoxine	noir animal	nul	non affaibli	nul	adsorption	pas d'adsorption	pas d'adsorption
		acide silicique A	non affaibli	"	"	pas d'adsorption	"	"
		" B	nul	"	"	"	"	"
		" "	nul	non affaibli	nul	adsorption	pas d'adsorption	pas d'adsorption
		noir animal	"	"	"	"	"	"
		acide silicique A	non affaibli	"	"	pas d'adsorption	"	"
2	toxine et solution d'antitoxine à excès d'antitoxine	" B	"	"	"	"	"	"
		" C	"	"	"	"	"	"
		" D	"	"	"	"	"	"
		" E	"	"	"	"	"	"
		" F	"	"	"	"	"	"
		silicate d'alumine	"	"	"	"	"	"
		hydraté A	"	"	"	"	"	"
		silicate d'alumine hydraté B	"	"	"	"	"	"
		argile	nul	"	"	"	adsorption	"
		kaolin	"	"	"	"	"	"
		kieselgur	"	"	"	"	"	"
		talc	non affaibli	"	"	"	pas d'adsorption	"

(expérience 4 du tableau VI), pour le complexe toxine-antitoxine diphtériques (expérience 2 du tableau III).

Ces diverses constatations, en apparence anormales, proviennent peut-être de transformations subies par les adsorbants lors de leur stérilisation. Peut-être tiennent elles plutôt à la présence ou à l'absence de traces de certaines substances étrangères soit dans le liquide mis en contact avec l'adsorbant, soit dans ce dernier, et aux modifications ainsi entraînées dans la réaction du milieu ou dans la nature de la charge électrique soit de l'adsorbant, soit de la substance adsorbable.

V. Lysine du venin de cobra et antily sine du sérum antivenimeux.

L'expérience dont les résultats sont indiqués dans le tableau VIII, démontre la parfaite adsorption de la lysine du venin de cobra par l'acide silicique dit chimiquement pur et par cet acide purifié par voie électroosmotique.

Tableau VIII.

Liquide étudié	Avant contact du venin avec l'acide silicique	Après contact avec l'acide silicique	
		A	B
0.1 c. c. venin à 1‰ ou filtrat en provenant	+0.9 c. c. sol. NaCl à 0.85‰	pas d'hémol.	pas d'hémol.
0.2 " " " " " " " " " "	+0.8 " " " " " "	id.	id.
0.4 " " " " " " " " " "	+0.6 " " " " " "	"	"
0.6 " " " " " " " " " "	+0.4 " " " " " "	"	"
0.8 " " " " " " " " " "	+0.2 " " " " " "	"	"
1.0 " " " " " " " " " "	+0.0 " " " " " "	"	"

D'autre part, l'expérience résumée dans le tableau IX, ne permet pas de constater la moindre adsorption de l'antily sine du sérum antivenimeux par l'acide électroosmotique. Cette antily sine est par contre adsorbée en partie par l'acide silicique dit chimiquement pur, non débarrassé par voie électroosmotique des impuretés susceptibles de modifier son signe électrique. On peut établir un rapprochement entre ce

fait et ceux signalés à propos de l'adsorption des antitoxines diphtérique et tétanique.

Tableau IX.

Liquide étudié	Résultat	Conclusion
0.2 c. c. solution venin 1‰ + 0.8 c. c. sol. NaCl à 0.85‰	hémolyse complète	—
0.2 " " " " + 0.4 " " " " + 0.4 c. c. sérum antivenimeux	pas d'hémol.	—
0.2 c. c. solution venin 1‰ + 0.0 c. c. sol. NaCl à 0.85‰ + 0.8 c. c. filtrat provenant du sérum antivenimeux en contact avec l'acide silicique A	hémolyse incompl.	adsorpt. incompl. de l'antily sine
0.2 c. c. solution venin 1‰ + 0.4 c. c. sol. NaCl à 0.85‰ + 0.4 c. c. filtrat provenant du sérum antivenimeux en contact avec l'acide silicique A	id.	id.
0.2 c. c. solution venin 1‰ + 0.0 c. c. sol. NaCl à 0.85‰ + 0.8 c. c. filtrat provenant du sérum antivenimeux en contact avec l'acide silicique B	pas d'hémol.	pas d'adsorption de l'antily sine
0.2 c. c. solution venin 1‰ + 0.4 c. c. sol. NaCl à 0.85‰ + 0.4 c. c. filtrat provenant du sérum antivenimeux en contact avec l'acide silicique B	id.	id.

Afin de rechercher s'il se produit une adsorption du complexe lysine du venin de cobra-antily sine du sérum antivenimeux, j'ai préparé les 5 mélanges suivants:

- 8 c. c. de solution de venin à 1‰ + 32 c. c. de sérum antivenimeux (mélange a)
- 16 " " " " " " " " + 24 " " " " (" b)
- 20 " " " " " " " " + 20 " " " " (" c)
- 24 " " " " " " " " + 16 " " " " (" d)
- 32 " " " " " " " " + 8 " " " " (" e)

On trouvera dans le tableau X les expériences faites avec ces cinq mélanges.

Il n'existe aucune différence entre les résultats réalisés avec les filtrats provenant du contact des divers mélanges avec l'acide silicique soit purifié par voie électroosmotique, soit non traité de cette manière. Il ne s'est donc pas produit dans ce cas d'adsorption du complexe lysine-antily sine ni de l'excès éventuel de lysine ou d'antily sine. L'absence d'adsorption de la lysine du venin de cobra et de l'antily sine du sérum antivenimeux dans ces conditions dépend peut être de l'influence réciproque des diverses substances contenues dans les mélanges mis en expérience et des modifications ainsi entraînées dans la réaction du milieu ou la nature de la charge électrique soit des produits à adsorber, soit même des adsorbants.

Tableau X.

Liquide étudié					Avant contact avec l'acide silicique		Après contact avec l'acide silicique		
					A		B		
0.1 c. c.	venin 1% [∞]	+ 0.9 c. c.	sol. NaCl à 0.85 %	"	hémol. incompl.	"	pas d'hémolyse	"	"
0.2 "	"	+ 0.8 "	"	"	" complète	"	"	"	"
0.9 c. c.	mélange a ou filtrat en provenant	"	"	0.1 c. c. sol. NaCl à 0.85 %	pas d'hémolyse hémol. incompl. complète	" hémol. incompl. complète	pas d'hémolyse hémol. incompl. incompl.	" hémol. incompl. complète	" hémol. incompl. incompl.
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 c. c. sol. venin de cobra à 1% [∞]	" incompl. complète	" incompl. complète	" incompl. complète	" incompl. complète	" incompl. complète
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.9 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.1 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"
0.8 "	"	"	"	+ 0.2 "	"	"	"	"	"

VI. Considérations générales.

L'ensemble des résultats expérimentaux, résumés dans les tableaux I à X, permet de mettre en lumière les données suivantes: L'acide silicique, fortement électronégatif, purifié, par voie électroosmotique semble jouir, dans de certaines limites, d'une capacité d'adsorption moindre pour les antitoxines, supérieure au contraire pour les toxines, que le même acide non débarrassé par ce procédé des substances étrangères susceptibles d'influencer la nature de sa charge électrique. Les toxines, paraissent donc être d'autant mieux adsorbées que l'acide silicique est plus nettement électronégatif. Au contraire la présence de certaines impuretés qui modifient le signe de la charge électrique de cet acide, semblent favoriser jusqu'à un certain point l'adsorption des antitoxines. Les constatations effectuées avec les lysines et les antilyssines paraissent venir dans une certaine mesure à l'appui des remarques précédentes. Ces divers ordres de faits cadrent fort bien avec l'hypothèse selon laquelle l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps est probablement d'ordre électrochimique.

Il n'en est toutefois pas de même de toutes les observations mentionnées dans cette communication. C'est ainsi que le silicate d'alumine hydraté, électropositif, a adsorbé la toxine diphtérique, la toxine tétanique et l'antitoxine tétanique, mais pas l'antitoxine diphtérique.

On ne doit pas s'en étonner beaucoup. En effet, on n'opère pas avec des toxines ou des antitoxines pures, mais bien avec des liquides renfermant de multiples substances (protéines, lipoides, électrolytes) en dehors de la toxine ou de l'antitoxine considérée. Or, des traces de matières étrangères dans les adsorbants suffisent à modifier la nature de leur charge électrique ou leur réaction. Ces facteurs jouent certes un bien plus grand rôle encore dans les solutions de toxine ou d'antitoxine. Les modifications de la réaction du milieu ou de la nature de la charge électrique soit de l'adsorbant, soit de la substance adsorbée, provoquées par la présence ou par l'absence de traces de certaines substances étrangères dans l'adsorbant solide ou dans la solution contenant la toxine ou

l'antitoxine, interviennent assurément dans l'explication des faits signalés jusqu'à présent à propos de l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps. La substitution de phénomènes d'adhésion les uns aux autres, la formation et la séparation de complexes colloïdaux, l'adsorption réciproque d'ultramicros, l'action protectrice de certains colloïdes pour d'autres, tous ces différents ordres de phénomènes amènent facilement des échanges entre divers colloïdes et peuvent ainsi contribuer à faire varier la nature des charges électriques des phases en présence et par conséquent le pouvoir d'adsorption de l'acide silicique colloïdal pour les toxines, les lysines et leurs anticorps.

La nature réelle de la charge électrique des toxines, des lysines et de leurs anticorps est, d'ailleurs, pour le moment fort sujette à caution. On ne disposera de données certaines à cet égard que lorsqu'on sera parvenu à isoler dans un état parfait de pureté ces produits spéciaux, ce que les méthodes de préparation et de purification employées actuellement sont encore bien loin de permettre. Pour le moment, on ne peut que se rallier aux excellentes considérations émises à ce propos par Landsteiner¹⁾. Les toxines et les lysines se comportent probablement dans le champ électrique de façon analogue aux protéines, c'est à dire comme des substances amphotères²⁾.

D'ailleurs, l'adsorption peut se produire entre un colloïde et un adsorbant à charges électriques de même signe. C'est ainsi que le noir animal adsorbe selon Zsigmondy³⁾ l'or colloïdal, bien qu'adsorbant et substance adsorbée aient tous deux une charge électrique négative.

1) K. Landsteiner, *Handb. d. pathog. Mikroorganismen von W. Kolle und A. v. Wassermann*, 2. Aufl., Bd. 2, Jena 1913, p. 1243.

2) W. B. Hardy, *Journ. of Physiol.*, T. 24, 1899, p. 288—304. — H. Iscovesco, *Bioch. Zeitschr.*, Bd. 24, 1910, p. 53—78. — K. Landsteiner, *l. c.*, p. 1244. — L. Michaelis, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 16, 1909, p. 81—86; Bd. 19, 1909, p. 181—185. — L. Michaelis und Mostynski, *Bioch. Zeitschr.*, Bd. 24, 1910, p. 79—91. — W. Pauli, *Hofmeisters Beitr.*, Bd. 7, 1906, p. 531—547. — W. Pauli und H. Handovsky, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 18, 1909, p. 340—371.

3) R. Zsigmondy, *l. c.*, p. 65.

D'après Wo. Ostwald¹⁾, il existerait une adsorption électrique, une adsorption thermique et une adsorption chimique. Si l'on fait abstraction de l'adsorption thermique, guère étudiée jusqu'à présent, il vaut peut-être mieux, en se basant sur les recherches de Landsteiner²⁾ et de ses collaborateurs, d'Hedin³⁾, de Michaelis et Rona⁴⁾, distinguer une adsorption mécanique et une adsorption électrochimique.

Dans l'adsorption des substances immunisantes interviennent, tout comme dans l'adsorption des protéines, des forces chimiques ou électrochimiques dépendant de la nature des particules colloïdales en suspension⁵⁾. Les expériences relatées dans la présente communication démontrent une fois de plus l'existence d'affinités spécifiques d'adsorption⁶⁾, pro-

1) Wo. Ostwald, *Grundriß der Kolloidchemie*, Dresden 1909, p. 432 et suiv.

2) K. Landsteiner, *Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide*, Bd. 3, 1908, p. 221—224. — K. Landsteiner und M. v. Eisler, *Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig.*, Bd. 39, 1905, p. 309—319. — K. Landsteiner und N. Jagič, *Münch. med. Wochenschr.*, Bd. 50, 1903, p. 764—768; Bd. 51, 1904, p. 1185—1189; *Wien. klin. Wochenschr.*, Bd. 17, 1904, p. 63—64. — K. Landsteiner und W. Pauli, *Verh. d. Kongr. f. inn. Med.*, Bd. 25, 1908, p. 571—574; *Wien. med. Wochenschr.*, Bd. 58, 1908, p. 1009—1011. — K. Landsteiner und H. Raubitscheck, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 15, 1908, p. 33—51. — K. Landsteiner und M. Reich, *Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig.*, Bd. 39, 1905, p. 83—93; *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh.*, Bd. 58, 1907, p. 213—232. — K. Landsteiner und R. Stankovic, *Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig.*, Bd. 51, 1906, p. 108—117; Bd. 52, 1906, p. 353—356. — K. Landsteiner und R. Uhlitz, *Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig.*, Bd. 40, 1906, p. 265—270.

3) S. G. Hedin, l. c. — *Biochem. Journ.*, Bd. 2, 1907, p. 112—116. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, Bd. 50, 1907, p. 497—507; Bd. 52, 1908, p. 412—424 und 468—475; Bd. 60, 1909, p. 85—104 und 363—375; Bd. 63, 1909, p. 143—154; Bd. 64, 1909, p. 82—90.

4) L. Michaelis und P. Rona, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 15, 1908, p. 489—498. — L. Michaelis, *Physikalische Chemie und Medizin von A. v. Koranyi und P. F. Richter*, Bd. 2, Leipzig 1908, p. 377 et suiv.

5) K. Landsteiner und R. Uhlitz, l. c.

6) W. M. Bayliss, *The nature of enzyme action*, Londres 1908, p. 61 et suiv. — *Biochem. Journ.*, Vol. 1, 1909, p. 175—232. — H. Bechhold, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 6, 1907, p. 397—408. — L. Lichtwitz, *Therap. d. Gegenwart*, Bd. 49, 1908, p. 542—546. — L. Michaelis, *Biochem.*

blement en relation étroite avec les réactions immuno-chimiques entre les toxines, les lysines et leurs anticorps¹⁾.

La nature électrochimique ou mécanique des phénomènes d'adsorption est déterminée dans chaque cas particulier à la fois par l'adsorbant et par la substance adsorbée. Pour arriver à des résultats concordants dans les études sur l'adsorption, il est donc indispensable de partir d'adsorbants à charge électrique de signe bien caractérisé. A cet effet, ces adsorbants doivent être soigneusement débarrassés des moindres traces de substances étrangères susceptibles de modifier le caractère de la charge électrique soit de l'adsorbant, soit de la substance adsorbable. Cette précaution est d'autant plus nécessaire dans les recherches faites avec les toxines, les lysines et leurs anticorps²⁾ qu'on opère alors avec des solutions renfermant, à côté des substances immunisantes, d'autres composés, dont la nature chimique et les proportions varient dans de grandes limites d'une fois à l'autre, et qui exercent par conséquent une influence variable sur le caractère de la charge électrique des toxines, des lysines et de leurs anticorps.

Zusammenfassung.

1) Die elektroosmotische Kieselsäure besitzt ein höheres Adsorptionsvermögen für Diphtherietoxin, und bis zu einem gewissen Grade für Tetanustoxin, als die chemisch reine Kieselsäure. Hingegen besitzt letztere Kieselsäure ein höheres Adsorptionsvermögen für Diphtherieantitoxin und Tetanusantitoxin als die elektroosmotische Kieselsäure.

2) Weder der Zusatz von Silberhydrosol, Perubalsam oder Isarol zur elektroosmotischen Kieselsäure, noch die vorherige Adsorption von Tellur, Gold oder Silber durch diese Säure verhindern die Adsorption des Diphtherietoxins. Diese wird

Zeitschr., Bd. 7, 1907, p. 488—492; Bd. 12, 1908, p. 26—27. — L. Michaelis und M. Ehrenreich, Biochem. Zeitschr., Bd. 10, 1908, p. 26—27. — E. Zunz, Arch. int. de Physiol., T. 5, 1897, p. 245—256; Bull. de la Cl. des Sciences de l'Acad. roy. de Belgique, 1911, p. 653—736.

1) K. Landsteiner, Handb. d. pathog. Mikroorganismen von W. Kollé und A. v. Wassermann, I. c., p. 1247, 1264 et suiv.

2) Il en est de même pour les expériences faites avec les enzymes.

hingegen durch Zusatz von Wasserstoffsperoxyd oder Zuckerkohle zur elektroosmotischen Kieselsäure verhindert.

3) Tonerdehydrat adsorbiert Diphtherietoxin, Tetanustoxin und Tetanusantitoxin, nicht aber Diphtherieantitoxin.

4) Die alkalische Reaktion befördert die Adsorption des Diphtherietoxins durch Kieselsäure oder Tonerdehydrat.

5) Sowohl die elektroosmotische als die chemisch reine Kieselsäure adsorbieren manchmal das Diphtherieantitoxin schon aus dem Antidiphtherieserum, was für Tierkohle nie der Fall ist.

6) Kaolin, Kieselgur, Talk und Ton adsorbieren weder Diphtherietoxin noch Diphtherieantitoxin. Kaolin und Ton adsorbieren sowohl Tetanustoxin als Tetanusantitoxin; Talk adsorbiert nur Tetanustoxin, Kieselgur nur Tetanusantitoxin.

7) Es besteht kein absoluter Parallelismus zwischen der Adsorption des Tetanustoxins und des Tetanuslysins aus einer und derselben Flüssigkeit.

8) Tetanuslysin wird meistens sowohl durch die chemisch reine Kieselsäure als durch die elektroosmotische Kieselsäure völlig oder teilweise adsorbiert. Ton und Kaolin besitzen kein sehr ausgeprägtes Adsorptionsvermögen für Tetanuslysin. Kieselgur, Talk und Tonerdehydrat adsorbieren dieses Lysin nur in sehr geringem Grade.

9) Das Lysin des Cobragiftes wird sowohl durch die elektroosmotische als durch die chemisch reine Kieselsäure adsorbiert.

10) Das Antilysin des Schlangengiftserums wird durch die chemisch reine Kieselsäure teilweise adsorbiert, durch die elektroosmotische Kieselsäure hingegen nicht.

11) Der Diphtherietoxin-Diphtherieantitoxinkomplex wird nur ausnahmsweise durch elektroosmotische oder chemisch reine Kieselsäure adsorbiert.

12) Sowohl das Tetanusantilysin als der Tetanustoxin-Tetanusantitoxinkomplex werden weder durch die elektroosmotische noch durch die chemisch reine Kieselsäure, noch durch Kaolin, Kieselgur, Talk, Ton oder Tonerdehydrat adsorbiert.

13) Der aus dem Lysin des Cobragiftes und dem Antilysin des Schlangengiftserums bestehende Komplex wird weder durch die elektroosmotische noch durch die chemisch reine Kieselsäure adsorbiert.

14) Noch nicht völlig aufgeklärte Umstände können die Adsorptionsfähigkeit der chemisch reinen und der elektroosmotischen Kieselsäure für Toxine, Lysine und deren Antikörper beeinflussen, so daß man unter genau denselben Versuchsbedingungen bisweilen ganz andere Ergebnisse als gewöhnlich erzielt.

15) Tierkohle adsorbiert Diphtherietoxin, Tetanustoxin, Tetanuslysin, Tetanusantitoxin, weder aber Diphtherieantitoxin noch Tetanusantilysin, noch der Diphtherietoxin-Diphtherieantitoxinkomplex oder der Tetanustoxin-Tetanusantitoxinkomplex.

16) Die auf elektroosmotischem Wege gereinigte Zuckerkohle adsorbiert Diphtherietoxin nicht.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Ueber die Komplementbindungsreaktion und die hämolysehemmende Wirkung des Serums bei Bacillenträgerkaninchen.

Von Dr. K. Aoki.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. August 1913.)

Die Bordet-Gengousche Reaktion ist schon zur Erkennung verschiedener Krankheiten und krankhafter Zustände herangezogen worden.

Friedberger¹⁾ hat schon im Jahre 1906 bei der ostpreußischen Choleraepidemie auf spezifische Antikörper bei Bacillenträgern hingewiesen.

Schöne²⁾ war dann wohl der erste, der die Komplementbindungsreaktion zur Diagnose des Bacillenträgertums bei menschlichen Bacillen-

1) Centrabl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 40, 1906, p. 405.

2) Deutsche med. Wochenschr., 1908, p. 1063.

trägern versucht hat. Das Resultat dieser bei drei Bacillenträgern gemachten Untersuchungen war folgendes: Bei zwei Personen war die Komplementbindungsreaktion positiv, während sie bei der dritten negativ verlief. Der eine der positiven Fälle war 10 Jahre lang und der andere zwei Wochen lang Bacillenträger. Dabei ist zu bemerken, daß der eine Bacillenträger, bei dem die Bordet-Gengousche Reaktion negativ verlief, nie richtige fieberhafte Erscheinungen gezeigt hatte.

Es erschien mir darum angezeigt, weitere Untersuchungen über diese Frage anzustellen, um so mehr, als die in unserem Institute im Gange befindlichen Untersuchungen von Herrn Geheimrat Uhlenhuth und Dr. Messerschmidt über die Bacillenträgerfrage mir Gelegenheit boten, bei künstlich zu Typhusbacillenträgern gemachten Kaninchen diese Reaktion zu studieren.

Neben der Komplementbindungsreaktion studierte ich gleichzeitig jene Erscheinung, welche von Müller, Gaehgens und mir¹⁾ bei rotzigen Pferden beobachtet und daraufhin von mir²⁾ auch bei anderen experimentell erzeugten Infektionskrankheiten der Kaninchen weiter verfolgt wurde. Diese Reaktion besteht darin, daß die Hämolyse im hämolytischen System durch den Zusatz von Krankenserum stärker gehemmt wird, als durch Normalserumzusatz. Und zwar steht diese hämolysehemmende Wirkung des Krankenserums mit der Komplementbindungsreaktion in einer gewissen Beziehung. Wenn nämlich die Bordet-Gengousche Reaktion im Laufe der Krankheit zunimmt, so steigt auch die hämolysehemmende Kraft des Serums. Die letztere sinkt zur Norm, falls die Krankheit vollkommen heilt, während die erstere eventuell noch zunimmt. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde folgende Technik angewandt:

Als Antigen diente eine 24-stündige Schrägagarkultur, die in 4,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt war; von dieser Stamm-lösung wurde eine Verdünnung von 1:10 hergestellt und 0,2 ccm von dieser Aufschwemmung wurde als eine einfache Antigendose angewendet.

Als Komplement diente frisches normales Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1:10. 0,5 ccm davon wurde als die einfache Komplement-dose benützt.

1) Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 8, Heft 6.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 13, Heft 2.

Der Ambozeptor gegen Hammelblutkörperchen stammte von einem Kaninchen, welches mit gewaschenen Hammelblutkörperchen 3mal vorbehandelt war. Die doppelte Menge des Titors (1:2000) wurde als die einfache Dose benützt. Die zu untersuchenden Sera wurden durch $\frac{1}{2}$ -stündige Erhitzung auf 55° C inaktiviert und davon fallende Mengen untersucht. Als Blutkörperaufschwemmung wurde verwendet eine 5-proz. Aufschwemmung von Hammelblut in physiologischer Kochsalzlösung. Der ganze Reaktionsprozeß verlief im Wasserbade; die Röhrchen wurden 20–30 Minuten lang im Wasserbade belassen.

Es wurden im ganzen 22 Kaninchen untersucht. 15 Kaninchen waren Bacillenträger, während 7 Kaninchen normal waren. Die Bacillenträger schieden sich wieder in zwei Gruppen. Die eine Gruppe betraf Kaninchen, welche durch die Operation zu Bacillenträgern gemacht worden waren. Die zweite Gruppe von Kaninchen war vor oder nach der Operation mit abgetöteten Typhusbacillen behandelt worden.

Wie man aus der Tabelle I ersieht, fiel die Komplementbindungsreaktion bei denjenigen Kaninchen deutlich positiv aus, welche einfach durch die Operation¹⁾ (Einführung der Typhusbacillen in die Gallenblase) zu Bacillenträgern gemacht worden waren und über 2 Monate lang Bacillenträger geblieben waren; und zwar lag der Bindungswert (d. h. die geringste Menge des Serums, die noch in der Lage ist, komplette Hemmung der Hämolyse hervorzurufen) bei den Kaninchen No. 3, 5, 6 und 45 bei ca. 0,1 ccm, bei den übrigen Tieren (No. 2, 4 und 33) dagegen höher, d. h. bei größeren Serummengen. Kaninchen No. 62, welches am 2. Tage nach der Operation an Typhuseptikämie eingegangen war, zeigte eine nur schwache Reaktion. Bei Kaninchen No. 43, welches 2 Monate nach der Operation getötet und als frei von Typhusbacillen befunden wurde, war die Reaktion ebenfalls ganz schwach positiv.

Die hämolysehemmende Wirkung des Serums allein im hämolytischen System war auch bei den Tieren No. 2, 3, 4, 5 und 6, die über 2 Monate Bacillenträger waren, deutlich ausgeprägt; bei ihnen lag nämlich die minimalste Menge des Serums, welche noch die Hämolyse hemmte, zwischen 0,02—0,005 ccm. Die Kaninchen No. 33 und 45, die 1 bzw.

1) Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 51.

Tabelle I. Bacillenträgertiere.

Kan. No.	Menge des Serums mit Antigen ohne Antigen	Menge des Serums mit Antigen ohne Antigen	Menge des Serums mit Antigen ohne Antigen	Hämolysehemmung				
				0,1 cem	0,05 cem	0,02 cem	0,01 cem	0,005 cem
24. IV. 12. Operative Infektion 9. VII. 12. Blutprobe, getötet; Typhusbacillen in Gallenblase und Darminhalt positiv	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++ ++
26. IV. 12. Operative Infektion 3. VII. 12. I. Blutprobe 13. VIII. 12. Getötet: Typhusbac. in Gallenblase u. Darm positiv	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
27. IV. 12. Operative Infektion 9. IX. 12. Blutprobe, getötet: Typhusbac. in Gallenblase pos.	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
4. V. 12. Operative Infektion 13. VII. 12. Blutprobe, getötet: Typhusbacillen in Gallenblase vorhanden	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
26. IV. 12. Operative Infektion 16. VII. Blutprobe 4. X. 12. Getötet: Typhusbacillen in Gallenblase	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
5. X. 12. Operative Infektion 29. X. 12. Blutprobe, getötet: Typhusbacillen in Gallenblase vorhanden	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
9. X. 12. Operative Infektion 12. XII. 12. Blutprobe, getötet: Typhusbacillen in Gallenblase vorhanden	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
10. XI. 12. Operative Infektion 12. XI. 12. Tot (Typhusseptikämie)	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++
12. VIII. 12. Operative Infektion 24. X. 12. Getötet: Typhusbacillen nicht nachweisbar	0,1 +++ ++	0,05 +++ ++	0,05 +++ ++	0,02 +++ ++	0,02 +++ ++	0,01 +++ ++	0,01 +++ ++	0,005 +++ ++

Bemerkung: ++++ komplette Hemmung, ++++ + fast komplette Hemmung, ++++ + sehr starke Hemmung, ++++ + starke Hemmung, ++ schwache Hemmung, + fast komplette Hämolyse, — komplette Hämolyse.

2 Monate lang Bacillenträger waren, machten eine Ausnahme, indem selbst 0,1 ccm Serum keine Hemmung der Hämolyse zeigte. Ebenso war die Reaktion bei dem Kaninchen No. 43, welches 2 Monate nach der Operation getötet und bakteriologisch als frei von Typhusbacillen befunden wurde, negativ. Dagegen war die hämolysehemmende Kraft des Serums deutlich bei dem Tiere No. 62, welches am nächsten Tage nach der Operation durch Typhusbacillenseptikämie eingegangen war.

Bei den 5 normalen Kaninchen war sowohl die Komplementbindungsreaktion wie auch die Hämolysehemmungsreaktion des Serums allein ganz negativ, während bei zwei anderen normalen Kaninchen (No. 37 und No. 38) ein schwach positiver Ausschlag zu konstatieren war (Tabelle II).

Tabelle II. Normale Tiere.

Kaninchen No.	Normales Tier	Menge d. Serums	Hämolysehemmung				
			0,1 ccm	0,05 ccm	0,02 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Kaninchen No. 26	Normales Tier	mit Antigen	—	—	—	—	—
		ohne Antigen	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 27	Normales Tier	mit Antigen	—	—	—	—	—
		ohne Antigen	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 28	Normales Tier	mit Antigen	—	—	—	—	—
		ohne Antigen	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 37	Normales Tier	mit Antigen	+	+	—	—	—
		ohne Antigen	+	±	—	—	—
Kaninchen No. 38	Normales Tier	mit Antigen	++	+	—	—	—
		ohne Antigen	+	+	—	—	—
Kaninchen No. 4	Normales Tier	mit Antigen	—	—	—	—	—
		ohne Antigen	—	—	—	—	—
Kaninchen No. 41	Normales Tier	mit Antigen	—	—	—	—	—
		ohne Antigen	—	—	—	—	—

Aus dem Ergebnis der obigen Versuche geht in Uebereinstimmung mit der Schöneschen Beobachtung bei menschlichen Typhusbacillenträgern hervor, daß die Komplementbindungsreaktion auch bei künstlich erzeugten chronischen Bacillenträgerkaninchen positiv ausfällt. Die hämolysehemmende Wirkung des Serums nimmt gleichfalls zu, wie ich früher auch bei künstlich mit *B. enteritidis* Gärtner, Pneumo-

Tabelle III.
 Bacillenträgeriere mit nachträglicher Immunisierung.

Kaninchen No. 12	Menge von Serum I mit Antigen ohne Antigen	Hämolysehemmung					
		0,1 ccm	0,05 ccm	0,02 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	
6. VII. 12. Blutprobe I 17. VII. 12. Operative Infektion 18. VII. 12. Blutprobe II 9. X. 12. } Immunisierung mit 14. X. 12. } abgetöteten Typhus- 22. X. 12. } bacillen 17. XI. 12. Getötet. Blutprobe III Typhusbacillen in Gallenblase vorhanden	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum III	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum III mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I	---	---	---	---	---	---
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3. VIII. 12. Blutprobe I 3. VIII. 12. Operative Infektion 10. IX. 12. } Immunisierung mit 14. IX. 12. } abgetöteten Typhus- 22. IX. 12. } bacillen 7. XI. 12. Getötet. Blutprobe II Typhusbacillen in Gallenblase vorhanden	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8. VIII. 12. Operative Infektion 9. X. 12. } Immunisierung mit 14. X. 12. } abgetöteten Typhus- 23. X. 12. } bacillen 18. XI. 12. Blutprobe. Getötet Typhusbacillen positiv in Gal- lenblase	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum I mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	---	---	---	---	---	---
	Serum I	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Serum II mit Antigen ohne Antigen	+++	+++	+++	+++	+++	+++

kokken usw. infizierten Kaninchen beobachtete¹⁾. Eine Ausnahme bildeten 2 Bacillenträgerkaninchen, deren Serum allein (ohne Antigen) keine Hemmung der Hämolyse bewirkte.

Die Komplementbindungsreaktion fiel bei den Kaninchen (No. 12, 28, 39), die nach der Operation (Einführung von Typhusbacillen in Gallenblase) mit dem Kolleschen Typhusimpfstoff behandelt worden waren, sehr stark positiv aus, so daß noch 0,05 ccm Serum komplette Hemmung erzeugten. Es war dabei sehr bemerkenswert, daß bei diesen Tieren selbst Mengen von 0,1 ccm keine hämolysehemmende Wirkung hatten. Das Kaninchen No. 12 wurde 3 Monate nach der operativen Infektion mit Typhusbacillen mit dem Kolleschen Impfstoffe immunisiert, am 26. Tage nach der letzten Impfung getötet und als Bacillenträger befunden. Die Kaninchen No. 28 und No. 39 wurden 1—2 Monate nach der Operation mit abgetöteten Typhusbacillen vorbehandelt und ca. 2 Monate nach der letzten Impfung getötet und als Bacillenträger festgestellt (Tabelle III, p. 359).

Tabelle IV.

Bacillenträgertiere mit vorausgegangener Immunisierung.

			Hämolysehemmung					
Kaninchen	Datum	Behandlung	Menge des Serums	0,1 ccm	0,05 ccm	0,02 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Kaninchen No. 14	8. VI. 12.	Immunisierung mit abgetöteten Typhusbacillen	Menge des Serums					
	11. VI. 12.							
	26. VI. 12.							
	16. VII. 12.	Operative Infektion	mit Antigen	+++++	+++++	+++++	++	+
	24. VII. 12.	Blutprobe	ohne Antigen	+	—	—	—	—
		Getötet, Typhusb. positiv.						
Kaninchen No. 15	4. VI. 12.	Immunisierung mit abgetöteten Typhusbacillen	Menge des Serums					
	11. VI. 12.							
	25. VI. 12.							
	16. VII. 12.	Operative Infektion	mit Antigen	+++++	+++++	++++	++	+
	24. VII. 12.	Blutprobe	ohne Antigen	—	—	—	—	—
		Getötet, Typhusb. positiv.						
Kaninchen No. 17	Genau so behandelt wie No. 15.		mit Antigen	+++++	++++	+++	+	—
			ohne Antigen	—	—	—	—	—

1) Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 13, p. 192.

Bei den anderen Tieren, welche zuerst mit abgetöteten Typhusbacillen immunisiert und nachher zu Bacillenträgern gemacht worden waren, war die Bordet-Gengousche Reaktion ebenso stark positiv, wie bei den vorher genannten Tieren. Hier war die hämolysehemmende Wirkung des Serums allein nicht deutlich ausgeprägt. Die drei Tiere (No. 14, 15 und 17) wurden ca. 1 Monat nach der immunisatorischen Vorbehandlung operiert, um sie zu Bacillenträgern zu machen, 8 Tage darauf getötet und als Bacillenträger fest gestellt (Tabelle IV, p. 360).

Herrn Privatdozent Dr. Dold danke ich für die Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Zusammenfassung.

Es wurde das Serum von 15 Kaninchen, die künstlich zu Bacillenträgern gemacht worden waren, und von 7 normalen Kaninchen auf Komplementbindung und hämolysehemmende Wirkung des Serums allein (ohne Antigen) untersucht.

Bei dem Serum der 7 normalen Tiere war die Komplementbindungsreaktion durchweg negativ. Auch die hämolysehemmende Wirkung war hier negativ, mit Ausnahme von 2 Tieren, die eine ganz geringe Hämolysehemmung zeigten.

Bei dem Serum der 15 Bacillenträgerkaninchen fiel die Komplementbindung stark positiv aus. Dagegen zeigte sich ein Unterschied in dem Verhalten der Hämolysehemmung (ohne Antigen): die Sera der nicht immunisierten Tiere zeigten Hämolysehemmung, die Sera der immunisierten dagegen nicht.

Nachdruck verboten.

Kurze Bemerkungen über die Adsorption von Tetanustoxin, anschließend an die Arbeit von E. Wolff: „Ueber das Verhalten der Leukocyten in toxin- und toxin-antitoxinhaltigen Lösungen“¹⁾.

Von Privatdozent Dr. S. Loewe, Göttingen.

Die oben genannte Arbeit wirft die Frage auf, ob den Antitoxinen ähnliche Funktionen wie den Opsoninen und Tropinen zukommen, ob sie nämlich die Leukocyten zu einer der Phagocytose organisierter Antigene gleichzusetzenden Aktivität gegenüber Toxinen anzuregen vermögen. Der Autor hat seine Studien aus äußeren Gründen abgebrochen, möchte aber die Mitteilung seiner bisherigen Forschungsergebnisse „als Vorbereitung für die Lösung des Problems“ betrachtet wissen. Aus diesem Grunde dürfte es vielleicht erlaubt scheinen, auf einige Daten aufmerksam zu machen, deren Nichtbeachtung sich bereits in den Vorarbeiten Wolffs als fühlbarer Mangel zu erkennen gibt, deren Kenntnis aber auf jeden Fall geeignet sein dürfte, für die weitere Bearbeitung der zweifellos sehr interessanten Fragestellung nicht unwesentliche Gesichtspunkte zu liefern.

Wolff stellt sich in den einleitenden Sätzen auf den Boden der Seitenkettentheorie. Nun ist aber wohl für nichts diese Theorie ein ungeeigneteres Fundament, als für das Studium von Bindungsvorgängen gerade des Tetanustoxins. Das Tetanustoxin setzt die Oberflächenspannung seines wässrigen Dispersionsmittels bedeutend herab. Demgemäß vermögen, wie Landsteiner und Botteri²⁾ bereits vor langer Zeit nachgewiesen haben, zahlreiche im Organismus gar nicht vorkommende Substanzen in feiner Verteilung das Toxin seinen wässrigen Lösungen in größerem oder geringerem Umfang zu entziehen; Landsteiner³⁾ selbst hat diesen

1) Diese Zeitschr., Bd. 18, 1913, p. 562.

2) Centralbl. f. Bakt. etc., Abt. I, Bd. 42, 1906, p. 562.

3) l. c. und Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1908, p. 41.

Vorgang, wie überhaupt die Bindung des Tetanustoxins auch an Organe und Organbestandteile mit Recht als Adsorption aufgefaßt. Die Kurven der Konzentrationsabhängigkeit, die für die Bindung des Tetanustoxins an die Substanz verschiedener Hirnpartien, an Lipoidgemische und reine Lipoide aus Gehirn ermittelt sind¹⁾, zeigen, daß auch der Vorgang der Bindung an „diejenigen Zellen, an denen das Gift seine schädliche Wirkung ausübt“ — jener Vorgang, der von Wassermann zuerst beobachtet und der als direkter Beweis der Seitenkettentheorie angesprochen wurde — auf keinen Fall so verläuft, wie es von dem durch die Seitenkettentheorie postulierten „Verankerungsvorgang“ zu erwarten wäre. Später²⁾ wurden dann auch die Gründe auseinandergesetzt, warum diese Kurven kaum anders denn als Anfangsteile von Adsorptionskurven aufgefaßt werden können.

Bei den eigentlichen Versuchen Wolffs ist nun gleichfalls der Gesichtspunkt der Adsorption und alles, was sich daraus für die Bewertung quantitativer Verhältnisse ergibt, außer acht gelassen.

Betrachtet man, wie stark eigentlich das Bindungsvermögen der Leukocyten nach Wolffs Versuchen ist, so findet man — wenn die gleiche Annahme zugrunde gelegt wird, wie sie offenbar für Wolffs Versuchsanordnung maßgebend war, daß nämlich die giftbeladenen Leukocyten das gesamte von ihnen gebundene Toxin nach der Injektion abgeben und mit ihm Tetanus erzeugen — folgende Zahlen: Nach Versuch 4 (p. 564) bindet die dort verwendete Leukocytenmenge (die bedauerlicherweise wie auch in den übrigen Versuchen nicht angegeben wird) von den in der Lösung vorhandenen 150 Mäusedosen des — übrigens recht schwach wirksamen — Toxins weit unter einer Mäusedosis; und nach Versuch 6 (p. 565) binden die Leukocyten aus 100 Mäusedosen immer noch bedeutend unter einer Mäusedosis, aus 50 Mäusedosen nur noch eine winzige Menge und aus 25 Dosen überhaupt nichts mehr.

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 34, 1911, p. 507.

2) Ebenda, Bd. 42, 1912, p. 202.

Diese wenigen höchst ungenau bestimmten Zahlen sind die einzigen, die Wolff mit seiner Methode überhaupt hat ermitteln können. Er hat bewußt dieser seiner Methode — der Bestimmung des Bindungsvermögens der Leukocyten aus ihrer tetanogenen Fähigkeit bei Einverleibung in die Maus — den Vorzug vor der von allen Autoren vor ihm angewandten — der Ermittlung der Giftmenge, die nach der Behandlung mit der giftbindenden Substanz noch in der Giftlösung verblieben ist — gegeben. Man müßte also zum mindesten den wenigen mit ihr ermittelten Zahlen eine sichere Verwertbarkeit zusprechen können.

Will man dies tun, so hat man Wolffs Zahlen mit denjenigen zu vergleichen, die von anderen Autoren für die Giftbindungsfähigkeit der Leukocyten und anderer Substanzen ermittelt worden sind. Da ergibt sich denn zunächst, daß unter allen erdenkbaren bisher geprüften anorganischen, organischen und organisierten Materialien sich kein Objekt finden läßt, das ein so geringes Bindungsvermögen für Tetanustoxin besitzt, wie es nach diesen Zahlen den Leukocyten zukommt. Leider ist es unterlassen worden, durch Heranziehung der in großer Menge zum Vergleich verfügbaren Zahlen dieses zweifellos unbeabsichtigte, aber immerhin sehr bemerkenswerte Ergebnis der Arbeit festzustellen.

Was im besonderen die Leukocyten anbetrifft, so stehen die Zahlen Wolffs keineswegs, wie er anzunehmen scheint, im Widerspruch mit dem Ergebnis der Prüfung durch Mancini¹⁾. Dieser hat nämlich die Leukocyten mit einer Lösung zusammengebracht, die im ganzen nur die einfache oder doppelte Mäusedosis Tetanustoxin enthielt und diese Lösung nach Abzentrifugieren der Leukocyten unvermindert wirksam gefunden. Wenn wir nun sehen, daß in den Versuchen von Wolff die Leukocyten einer Lösung von 100 Mäusedosen Toxingehalt weniger als 1 Mäusedosis zu entziehen vermochten, so kann es nicht wunder nehmen, daß diese Reduktion der Toxizität von 100 auf 99 Proz. sich in Mancinis Versuchen nicht wesentlich bemerkbar machen konnte. Und daß Mancini nach diesem negativen Ergebnis mit Lösungen von

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 26, 1910.

niedriger Giftkonzentration nicht dazu übergegangen ist, ein ihm etwa entgangenes Bindungsvermögen an Lösungen höherer Giftkonzentration zu prüfen, das hatte seinen Grund darin, daß er im Gegensatz zu Wolff genau wußte, wie wenig Bedeutung dem geringen Bindungsvermögen, das er etwa bei derartigen weiteren Versuchen noch hätte feststellen können, zukäme.

Glücklicherweise scheint nun das Bindungsvermögen der Leukocyten in Wirklichkeit immerhin ein wenig stärker zu sein, als man nach den Zahlen Wolffs allein annehmen müßte. Wiederum aus einem Grunde, den Wolff nicht zu kennen scheint. Wassermann und Takaki¹⁾ selbst haben nämlich bereits bei ihren ersten Untersuchungen über das Bindungsvermögen der Hirnsubstanz für Tetanustoxin beobachtet, daß die giftbeladene Hirnsubstanz, die die umspülende, eine mehrfach tödliche Mäusedosis enthaltende Lösung vollständig entgiftet hatte, doch bei der Injektion nur eine sehr geringe tetanogene Fähigkeit besaß, eine Beobachtung, die später mit zahlreichen Tetanustoxin adsorbierenden Substanzen wiederholt werden konnte. Das Adsorbens vermag also, in den Tierkörper einverleibt, das adsorbierte Toxin nur sehr langsam und unvollkommen wieder abzugeben. Das war gerade der Anlaß, aus dem bisher alle anderen Autoren das Giftbindungsvermögen durch Prüfung der Außenlösung ermittelt haben. Und diese Tatsache läßt die von Wolff gehandhabte Methode der Prüfung des Adsorbens selbst hinreichend unzweckmäßig erscheinen. Denn wahrscheinlich enthalten die von Wolff geprüften Leukocyten doch noch mehr Gift, als an ihrer tetanogenen Fähigkeit gemessen werden konnte.

Wenn aber auch das Giftbindungsvermögen der Leukocyten größer ist, als die oben angeführten Zahlen angeben, so muß doch nach wie vor betont werden, daß es relativ äußerst gering ist und weit hinter dem aller Substanzen zurücksteht, deren Bindungsvermögen bisher Beachtung gefunden hat. Selbst wenn wir von den Lipoiden absehen, die zum Teil ein hunderttausendfach größeres Bindungsvermögen als die Leuko-

1) Berl. klin. Wochenschr., 1898.

cyten haben, so muß doch festgestellt werden, daß nicht nur das Gehirn, sondern auch alle anderen bisher geprüften Organe stärker bindungsfähig sind. So hat sich z. B.¹⁾ ermitteln lassen, daß Knochenmark, dem bereits ein Teil der besonders bindungsfähigen Substanzen durch Aceton entzogen war, eine Lösung, die 65 Mäuseeinheiten enthielt, noch vollständig entgiften konnte, so daß also das intakte Knochenmark sicherlich ein mindestens ebenso hohes Bindungsvermögen wie das extrahierte besitzt, jedenfalls aber das der Leukocyten wesentlich übertrifft.

Um alles zusammenzufassen, möchte man also wünschen, daß die fernere Bearbeitung des Problems methodisch so gestaltet wird, daß wirklich verwertbare Zahlen erhalten werden. Vor allem aber müßte zunächst einmal gezeigt werden, daß es überhaupt noch irgendwo im Körper Organe gibt, die noch weniger Tetanustoxin zu binden vermögen als die Leukocyten. Erst wenn dieser Beweis erbracht ist — was meinem persönlichen Dafürhalten nach recht schwierig sein dürfte — darf man „positive“ Befunde von der Art der von Wolff mitgeteilten bei der Bearbeitung der von ihm aufgeworfenen Fragestellung verwerten, oder gar derartige Untersuchungen als „Vorarbeiten für die Lösung des Problems“ betrachten.

Druckfehler-Berichtigung.

In der Arbeit von Fukuhara und Ando, diese Zeitschr., Bd. 18, Heft 4, p. 369, muß es in der 15. Zeile von oben Toxinnatur anstatt toxischer Natur heißen.

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 34, 1911, p. 507.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. XIX. No. 4.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für experimentelle Medizin zu St. Petersburg
(Abt. A. A. Wladimiroff).]

Ueber die Blutveränderungen bei der Vergiftung mit Organextrakten.

Von **L. H. Gutmann.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1913.)

Bekanntlich tritt bei Kaninchen und Meerschweinchen, die nach Injektion von Organextrakten akut zugrunde gehen, eine bedeutende Verlangsamung der Blutgerinnung ein (Dold, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10; Izar und Patané, ebenda, Bd. 14; Aronson, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 6, u. a.). Dieses Phänomen tritt hier viel stärker hervor, als z. B. bei Anaphylaxie. Die Ungerinnbarkeit kann Stunden und Tage anhalten; die schließlich eintretende Gerinnung ist oft nicht vollkommen. Die Erscheinung ist schon seit langem bekannt und wurde als „negative Phase“ der Blutgerinnung aufgefaßt. Ich prüfte in einer großen Anzahl von Fällen den Gehalt des so veränderten Blutes auf Fibrinferment und Fibrinogen und kam zu dem Schluß, daß zwei Ursachen dieser Veränderung zugrunde liegen:

- 1) Verminderung des Fibrinferments,
- 2) starke Verminderung des Fibrinogens.

Die Prüfung erfolgte nach der Methode von Wohlgemuth (Biochem. Zeitschr., Bd. 25). Als Fibrinogen diente Salzplasma (3 Teile Blut + 1 Teil konz. $MgSO_4$ -Lösung) von Kaninchen resp. Meerschweinchen, als Fibrinferment das Serum der geprüften Tiere. Zum Teil wurde die Methode geändert, insofern als: 1) statt Salzplasma in vielen Fällen direkt das frische Blut oder das reine Plasma der gefallenen Tiere gebraucht wurde (die Verlangsamung der Blutgerinnung gestattete dies), 2) das normale Salzplasma in der Quantität von 1 ccm zugesetzt wurde. Anfangs gebrauchte ich Verdünnungen des Salzplasma 1:40 und 1:20, später nur 1:10.

Die Versuche sind zum größeren Teil an Kaninchen, zum kleineren an Meerschweinchen ausgeführt worden. Kaninchen wurden von 1,5—2,0 kg gewählt, Meerschweinchen von 250—400 g. Die Extraktbereitung erfolgte

in der Weise, daß eine bestimmte Menge Lunge in der Reibschale gründlich zerrieben und dann mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:2 oder 1:10 zusammengebracht wurde. Dann wurde nach kurzem Kontakt zentrifugiert und filtriert; letzteres (Filtration) wurde zuweilen unterlassen.

Es sei bemerkt, daß die Dosis letalis minima der Extrakte keine absolute Größe darstellt. Im Winter tötete Kaninchen 0,05—0,06 Lunge, in warmer Jahreszeit 0,02—0,03. Meer-schweinchen starben schon nach Dosen von 0,2 und weniger Lunge der homologen Tierart. Dabei trat der Tod in 3 bis 5 Minuten ein. Bei Grenzdosen dauerte die Agonie auch länger ($\frac{1}{2}$ —2 Stunden). In warmer Jahreszeit gelingt die sogenannte schnelle Immunisierung viel schwerer als im Winter.

Versuche an Kaninchen.

Die Prüfung normaler Verhältnisse ergab als Mittelwerte von 14 Untersuchungen (in Klammern werden gleichzeitig maximale und minimale Werte angegeben):

A. Grenzverdünnung des Serums, die noch Gerinnung des Salzplasma hervorruft:

1) für komplette Gerinnung: Verdünnung 1:600 (maximal 1:1200, minimal 1:300);

2) für teilweise Gerinnung: Verdünnung 1:1200 (maximal 1:4800, minimal 1:600).

B. Grenzverdünnung des Salzplasma, bei der Zusatz von 0,1 frischen Serums noch Gerinnung hervorruft:

1) für komplette Gerinnung: Verdünnungen 1:60—80 (maximal 1:160, minimal 1:20);

2) für teilweise Gerinnung: Verdünnung 1:220 (maximal 1:320, minimal 1:80).

Die entsprechenden Werte für Kaninchen, die durch Organ-extrakte akut getötet wurden, zeigt Tabelle I (siehe p. 369).

Aus der Tabelle I ist folgendes zu ersehen:

1. Die geprüften Sera geben mit Salzplasma:

a) Komplette Gerinnung (normalerweise in Verdünnung 1:600):

9mal in	Verdünnung	1:320	} Mittelwert 1:200
4mal	„	1:120	
je 3mal	„	1:160, 1:80 und 1:32	
2mal	„	1:40	
je 1mal	„	1:640, 1:240 und 1:200	

Tabelle I.

(Die mit S bezeichneten Plasmaverdünnungen wurden an Salzplasma ausgeführt, die übrigen an reinem Plasma.)

No.	Extrakt-dose, berechnet auf Gehalt an Lunge	Wirksame Serumverdünnung		Wirksame Plasma- resp. Salzplasmaverdünnung	
		Komplette Gerinnung	Teilweise Gerinnung	Komplette Gerinnung	Teilweise Gerinnung
1	2,0 Lunge	1:320	—	1:2	1:4
2	1,5 "	1:240	—	S —	—
3	1,0 "	1:320	1:640	—	1:8
4	1,0 "	1:320	1:640	—	1:1
5	1,0 "	nicht geprüft	—	—	1:2
6	1,0 "	1:120	—	S —	1:4
7	0,5 "	1:120	1:240	S —	—
8	0,5 "	nicht geprüft	—	—	1:8
9	0,5 "	nicht geprüft	—	—	1:8
10	0,3 "	1:320	1:640	—	1:2
11	0,25 "	nicht geprüft	—	1:4	1:16
12	0,2 "	1:320	1:640	—	1:2
13	0,2 "	1:320	1:640	1:2	1:8
14	0,1 "	1:320	—	1:4	1:16
15	0,1 "	1:80	—	1:32	1:240
16	0,1 "	1:320	—	1:4	1:16
17	0,05 "	1:120	1:240	nicht geprüft	—
18	0,05 "	1:32	1:240	—	1:8
19	0,05 "	1:80	1:160	1:4	1:8
20	0,035 "	—	1:32	nicht geprüft	—
21	0,035 "	1:32	1:120	S —	—
22	0,03 "	1:160	—	—	1:2
23	0,03 "	1:160	—	—	1:2
24	0,02 "	1:40	1:80	S —	1:16
25 ¹⁾	0,015, 0,02, 0,025	1:80	1:160	S —	—
26	0,03, 0,04, 0,05	1:640	—	1:64	1:120
27	0,03, 0,05, 0,03, 0,05, 0,07	1:32	1:120	nicht geprüft	—
28	0,03, 0,035, 0,04, 0,05, 0,08, 0,1	1:120	1:480	S —	—
29	0,015, 0,02, 0,02, 0,025, 0,03	1:320	1:640	S 1:32	weiter nicht geprüft
30	0,03, 0,04, 0,05, 0,07	1:40	1:160	1:64	
31	0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,1, 0,18	1:160	—	1:1	—
32	0,015, 0,03, 0,03, 0,03, 0,03, 0,03, 0,05, 0,08, 0,2	vor 0,2: 1:200 nach 0,2: —	1:600 1:200	S 1:16 S —	weiter nicht gepr.

1) Von Kaninchen No. 25 an sind Versuche angegeben, wo schnelle Immunisierungsversuche vorgenommen wurden. Die Injektionen geschahen in Intervallen von 10—30 Minuten bis zum letalen Ausgang.

b) teilweise Gerinnung (normal 1:1200):

7mal in Verdünnung	1:640	} Mittelwert 1:350
je 3mal „ „	1:240 und 1:160	
2mal „ „	1:120	
je 1mal „ „	1:480, 1:200, 1:80, 1:32	

2. Die geprüften Plasmata (resp. Salzplasmata) geben für sich (oder eventuell nach Serumzusatz):

a) komplette Gerinnung (normal 1:70):

18mal in keiner Verdünnung (auch nicht unverdünnt)	} Mittelwert 1:8	
4mal in Verdünnung 1:4		
je 2mal „ „		1:64 und 1:32
je 1mal „ „		1:16, 1:2 und 1:1

b) teilweise Gerinnung (normal 1:220):

7mal in keiner Verdünnung	} Mittelwert 1:18	
6mal in Verdünnung 1:8		
5mal „ „		1:2
4mal „ „		1:16
2mal „ „		1:4
je 1mal „ „		1:240, 1:120 und 1:1

Ein Parallelismus zwischen der eingespritzten Extraktosis und den eingetretenen Blutveränderungen ist nicht deutlich ausgesprochen. Zwar ist starke Fibrinogenverminderung an die großen Extraktosen gebunden, aber es fehlt nicht an Beispielen, wo geringe Dosen das Fibrinogen fast ganz zum Verschwinden brachten. Auch besteht kein Zusammenhang zwischen Verminderung von Fibrinferment und der des Fibrinogens. Klar tritt nur das eine hervor, daß die Fermentabnahme bei weitem nicht solche Grenzen erreicht, wie die des Fibrinogens. Ersteres ist im Mittel um 3—4mal vermindert, letzteres um 9—11mal. Vollständiges Verschwinden des Fibrinogens wurde jedoch nicht nachgewiesen, denn die 6 Plasmata, wo keine Spur Fibrinogen gefunden wurde, sind als Salzplasmata geprüft worden; dabei gibt das unverdünnte Plasma und die Verdünnung 1:2 schon wegen des Salzgehaltes keine Gerinnung.

Versuche an Meerschweinchen.

An Meerschweinchen wurden fast nur Fibrinogenbestimmungen ausgeführt. Es zeigte sich bald, daß bei dieser Tierart die Verminderung des Fibrinogens noch eine viel auffallendere ist. Normalerweise gibt Meerschweinchensalzplasma (mit 0,1 frischen Serums) komplette Gerinnung noch in Verdünnung 1:60—80; inkomplette 1:160 (Mittelwerte aus

9 Prüfungen). Die Verhältnisse bei den mit Extrakt getöteten Meerschweinchen gibt die Tabelle II an.

Tabelle II.

(Die mit S bezeichneten Plasmaverdünnungen wurden an Salzplasma ausgeführt, die übrigen an reinem Plasma.)

No.	Extrakt-dose, berechnet auf Gehalt an Lunge	Wirksame Plasma- resp. Salzplasma- verdünnung	
		Komplette Gerinnung	Teilweise Gerinnung
1	2,0 Lunge	S —	—
2	2,0 "	S —	—
3	2,0 "	S —	—
4	2,0 "	S —	—
5	2,0 "	—	1:1
6	1,6 "	S —	—
7	1,0 "	—	—
8	1,0 "	S —	—
9	0,8 "	S —	—
10	0,75 "	S —	—
11	0,6 "	—	1:16
12	0,4 "	S —	—
13	0,4 "	—	1:1
14	0,4 "	—	1:2
15	0,4 "	—	1:16
16	0,2 "	S —	—
17	0,2 "	—	1:20
18	0,2 "	S —	—
19	0,2 "	S —	—
20	0,1 "	S —	—
21	0,05 "	S —	—

Vollständiges Fehlen des Fibrinogens ist nur in No. 7 gegeben, da hier die Prüfung an reinem Plasma erfolgte. In 18 Fällen fehlt das Fibrinogen beinahe vollständig und nur in 3 Fällen ist eine gewisse Menge Fibrinogen erhalten.

Die in geringer Zahl ausgeführten Titrationen des Meer-schweinchenserums auf Gehalt an Fibrinferment ergaben:

1) Normale wirksame Grenzverdünnung des Serums (mit Kaninchensalzplasma geprüft) 1:160—200 (3 Versuche).

2) Wirksame Grenzverdünnung des Serums der durch Extraktinjektion getöteten Tiere 1:40—80 (3 Versuche).

Also entspricht die Fermentabnahme ungefähr der bei Kaninchen gefundenen.

Die Frage, wo das Fibrinogen, das im Blute der verstorbenen Tiere oft fast ganz fehlt, bleiben kann, wurde noch

nicht näher geprüft. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das gesamte fehlende Fibrinogen in den intravitalen Thromben sich ansammelt, daß also diese Thromben viel reicher an Fibrin sind, als die gewöhnlichen postmortalen Gerinnsel. Ich habe öfters, besonders nach großen Extrakt Dosen, sehr ausgebreitete Thrombosen beobachtet; alle großen Gefäße waren mit Gerinnseln gefüllt. Unter diesen Umständen könnte man an eine Defibrinierung des flüssig gebliebenen Blutes durch ausgedehnte Thrombosen denken. Es bestehen auch andere Möglichkeiten, z. B. das Auftreten gerinnungshemmender Körper im Blute; jedoch sind die Thrombosen damit schlecht zu vereinigen; es sei denn, daß die Körper erst nach den Thrombosen in Funktion treten.

Gleichzeitig mit der Prüfung der Sera auf Fibrinferment und Fibrinogen wurde auch ihr Gehalt an Komplement bestimmt. Das Komplement des Kaninchenserums zeigte 21mal keine Verminderung gegen die Norm, 15mal eine geringe Abnahme (die letzte komplett hämolysierende Serumdose war im Vergleich zur Norm doppelt so groß), 5mal stärkere Abnahme. Das Komplement des Meerschweinchenserums zeigte 9mal keine, 16mal geringe, 6mal stärkere Verminderung. Letzteres trat gewöhnlich nur bei sehr hohen Extrakt Dosen ein. Wie hieraus zu ersehen, ist die Komplementabnahme im allgemeinen unbedeutend.

Zusammenfassung.

Bei der Vergiftung von Kaninchen und Meerschweinchen mit Extrakten aus Organen der gleichen Tierart treten folgende Blutveränderungen ein:

- 1) bedeutende Verminderung des Fibrinferments,
- 2) eine noch viel bedeutendere Abnahme des Fibrinogens,
- 3) unbedeutende Abnahme des Komplements.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig (Vorstand:
Geh. Rat Prof. Dr. Franz Hofmann).]

Zur Schüttelinaktivierung des hämolytischen Komplements.

Von

Dr. P. Schmidt und Dr. M. Liebers
a. o. Professor am Oberarzt an der Kgl. Sächs.
Hygienischen Institut. Heil- u. Pflegeanstalt Leipzig-Dösen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. August 1913.)

Bekanntlich haben Jacoby und Schütze (1) als erste festgestellt, daß sich hämolytisches Komplement auch durch Schütteln inaktivieren lasse. Sie bedurften bei Zimmertemperatur ca. 6-stündigen Verweilens im Schüttelapparat, bis es völlig unwirksam war. Beide Autoren suchen den Grund der Schüttelinaktivierung in einer Wirkung von OH-Ionen, die bei der Schüttelprozedur sich ablösen sollten, und wollten infolgedessen bei Anwendung von Gefäßen aus Jenenser Glas das Phänomen vermißt haben.

Ritz (2) konnte dann im Ehrlichschen Institut die Beobachtung der genannten Autoren bestätigen. Er konnte weiter feststellen, daß die Inaktivierung durch Schütteln im Kinotherm bei 37° sich beschleunigen ließ, und daß ein Faktor von größter Bedeutung bei der Inaktivierung das Verhältnis zwischen Komplementmenge und Flaschenvolumen ist. Einen Einfluß des Glases auf das Phänomen leugnet Ritz. Er vermutet vielmehr ebenso wie Courmont und Dufourt (3) in dem Sauerstoff der Luft das wirksame Agens, möchte also eine Oxydationswirkung durch diesen für die Erscheinung verantwortlich machen.

Ferner stellte ebenso wie vorgenannte Autoren auch Kashiwabara (4) im Biochemischen Laboratorium des Moabiter Krankenhauses fest, daß eine Reaktivierung des geschüttelten Komplements durch Mittelstück und Endstück möglich ist. Uebrigens konnte er geschütteltes inaktives Komplement zuweilen auch durch thermoinaktives Serum reaktivieren. Die aktivierenden Eigenschaften des thermoinaktiven Serums gingen aber verloren, wenn es zuvor selbst geschüttelt worden war. Sowohl Ritz wie Kashiwabara weisen ferner auf die Analogien hin, die von verschiedenen Autoren für die Reaktivierung des auf verschiedene Art [wie durch Aufenthalt in salzarmen Medien (Sachs und Bolkowska, 5), durch Erhitzen (Muter-milch, 6), durch Lagern (Liefmann, 7), durch Cobragiftwirkung (Sachs und Omorokow, 8)] inaktivierten Serums festgestellt worden sind. Ritz ist dann ferner auf Grund der Tatsache, daß inaktives sogenanntes Cobra-Meerschweinchenserum durch Mittelstück- und Endstückfraktion wieder

aktiviert werden kann, auch wenn das Mittel- und Endstück aus vorher durch Erhitzen oder durch Cobragiftbehandlung inaktiviertem Meer-schweinchenserum gewonnen wurde, für die Annahme der sogenannten „dritten Komponente“ des Komplements eingetreten. Diese „dritte Komponente“ soll sich durch eine „relative“ Thermostabilität auszeichnen und bei der Kohlensäuretrennung in beide Teile, hauptsächlich aber in den Globulinanteil übergehen.

Die Verfasser haben das Wesen der Schüttelinaktivierung nun noch weiter verfolgt. Sie kamen wie Ritz zunächst zu dem Ergebnis, daß für die Inaktivierung das Verhältnis zwischen Komplementmenge und Flaschenvolumen ausschlaggebend ist, und daß ferner der Einfluß der Alkalinität des Glases für das Phänomen belanglos ist. Sie erhärteten diese Tatsache dadurch, daß sie das gleiche Komplement teils in paraffinierten, teils in nicht paraffinierten Flaschen schüttelten. Die Resultate waren in beiden Fällen gleich. Auch konnte durch weitere Versuche die Anschauung widerlegt werden, daß es sich bei dem Phänomen um einen Oxydationsvorgang durch den Sauerstoff der Luft handele. Es zeigte sich nämlich, daß es für den Effekt der Schüttelung völlig gleichgültig war, ob man die Flaschen mit Luft, mit Stickstoffgas oder Wasserstoffgas füllte. Es versteht sich dabei von selbst, daß zur Herstellung der Komplementverdünnung 1:10 nur frisch ausgekochte physiologische Kochsalzlösung verwendet wurde, und daß das rein dargestellte Gas zunächst längere Zeit durch die Komplementlösung hindurchgeleitet wurde. Die Blasenbildung beim Einleiten des Gases über der Flüssigkeit erleichtert offenbar die Entfernung der Luft aus der Flasche sehr wesentlich. Ebenso gut verhütet die sich über dem Flaschenhals bildende Schaumhaube ein nachträgliches Wiedereindringen von Luft beim Verschließen der Flasche.

Die Verfasser konnten bei ihren Versuchen des weiteren feststellen, daß sich die Schüttelinaktivierung durch ein kräftiges Schütteln in der Hand auch bei Zimmertemperatur beschleunigen ließ. Es braucht dabei kaum betont zu werden, daß das Halten der Flasche nur am Boden und am Stöpsel erfolgte, um so eine Erwärmung der Flasche möglichst auszuschließen.

Das Schütteln in der Hand über Kopf führte nun schon nach 10 Minuten zu einem deutlichen Nachlaß der Komplementwirkung. Nach $\frac{1}{2}$ —1-stündiger Schütteldauer konnte eine langsam fortschreitende Nachlösung konstatiert werden, nach $1\frac{1}{2}$ -stündigem Schütteln war die Inaktivierung komplett. Blieb ein nur ca. $\frac{3}{4}$ —1 Stunde geschütteltes Komplement, welches noch langsam nachlöste, noch ca. 4 Stunden hinterher im Eisschrank stehen, so war auch bei diesem die nachlösende Wirkung verschwunden. Es war durch das Stehenlassen völlig inaktiv geworden. Schließlich konnte festgestellt werden, daß auch nach $1\frac{1}{2}$ -stündigem Schütteln der äußerst feinbläsige Schaum noch eine Nachlösung bewirkte, während das flüssige Komplement völlig inaktiv war.

Die Reaktivierung mittelst aktiven Endstücks gelang in allen Fällen prompt, die mit Mittelstück nicht oder nur unvollkommen, ebensowenig die mit thermoinaktivem Endstück.

Bei all unseren Versuchen ergab sich ferner, daß der Grad der Inaktivierung mit dem Maße einer Trübung parallel lief, die beim Schütteln über Kopf mit der Hand sich ausbildete. Wurde die Schüttelung längere Zeit, 1 Stunde und darüber, fortgesetzt, so trat beim weiteren Stehen des Komplements im Eisschrank eine deutliche Ausflockung ein. Die Trübung bestand, wie sich zeigte, aus ausgeflockten Globulinen verschiedener Korngröße. Weder Trübung noch Sediment schwanden nämlich beim Ausschütteln mit Aether.

Beim Thermoinaktivieren wies die Trübung eine geringe, aber doch deutliche Aufhellung auf.

Vergleichende Schüttelversuche mit rein dargestellter Albuminlösung in physiologischer Kochsalzlösung und Globulinlösung (letztere gewonnen durch Ausfällung mittelst Ammonsulfat in halbgesättigter Lösung und nachträglicher, ca. 2 Monate dauernder Dialyse unter Toluol nach Pauli) zeigten, daß sich solche Trübungen nur mit Globulinlösungen und nicht mit Albuminlösungen erzeugen lassen. Besonders hervorgehoben sei dabei auch, daß die Schütteltrübung bei aktivem Meerschweinchenserum am ehesten erfolgte, und

wesentlich langsamer und geringer bei aktivem und inaktivem Menschenserum. Weiter wurde festgestellt, daß bei einem 14 Tage im Frigo aufbewahrten Komplement, welches, ganz frisch gewonnen, eine intensive Schütteltrübung ergab, eine solche sich nach $1\frac{1}{2}$ -stündigem Schütteln nur minimal erkennen ließ. Dieses $1\frac{1}{2}$ Stunden intensiv geschüttelte und nur äußerst gering getrübe Komplement war nicht inaktiviert worden, sondern zeigte eine nur wenig verlangsamte Wirkung.

Aus unseren Versuchen scheint uns nun hervorzugehen, daß es sich bei der Schüttelinaktivierung um einen rein physikalischen Vorgang handelt, nämlich um eine Ausschüttelung von Globulin und eine sich anschließende Adsorption von Komplementferment auf den neugebildeten ungesättigten Oberflächen. Je gröber die Globulinflockung erfolgt, desto inniger die Adsorption. Bei einer nachträglichen Lösung des ausgeschüttelten Globulins mittelst Endstücks muß dann auch das adsorbierte Komplementferment wieder frei und voll wirksam werden. Wie der eine von uns (Schmidt, 9) schon durch seine früheren Untersuchungen über das Komplement gezeigt hat, besitzt das Endstück eine kräftige globulinlösende Wirkung und einen Restbestandteil von nicht mitausgeflocktem Komplementferment. Wenn an dem noch nicht bis zur völligen Inaktivierung geschüttelten Komplement durch Stehenlassen im Eisschrank innerhalb ca. 4 Stunden eine völlige Inaktivierung eintritt, so ist dieser Vorgang als die Folge einer weiteren intensiven Adsorption des Komplementferments auf dem Globulin völlig verständlich. Im übrigen folgt das Komplementferment dem Verhalten anderer Fermente gegenüber der Schüttelprozedur, welche, über Kopf kräftig durchgeführt, eine Unmenge feinsten Gasbläschen in die Eiweißlösung einpreßt und zu einer Anreicherung des Globulins und des Komplementferments an den Oberflächen dieser Bläschen führt. Es sei daran erinnert, daß es Abderhalden und Guggenheim (10) gelang, Pankreasferment und das Hefeferment durch Schütteln unwirksam zu machen.

Wir haben es also hier bei der Schüttelinaktivierung mit dem gleichen Vorgang zu tun wie bei der Inaktivierung des Komplements durch Dialyse, wo infolge von Salzverarmung

das Globulin ausflockt und das Komplementferment mit sich reißt. In ähnlicher Weise wie das in dem Globulinmittelstück enthaltene Komplementferment durch Lösung des Globulins wieder frei wird, so geschieht das auch hier bei dem durch Schütteln inaktiv gewordenen Komplement. Worauf die Unmöglichkeit beruht, im Frigo länger aufbewahrtes Komplement durch Schütteln zur Trübung und Inaktivierung zu bringen, sei dahingestellt. Vielleicht, daß das Globulin durch das Frieren allmählich in eine andere Form übergeht, in welcher die Verklebung der Moleküle aufgehoben oder vermindert ist, vielleicht auch, daß beim Ausfrieren infolge Anreicherung der Salze eine förmliche Aussalzung von Globulinteilchen stattfindet.

Schließlich erhob sich bei diesen Untersuchungen noch die Frage, ob die beim Schütteln sich ausbildenden Globulintrübungen vielleicht einen Einfluß auf die optische Aktivität der Eiweißlösungen besitzen. Bekanntlich hat ja Reiß (11) mittelst refraktometrischer Blutuntersuchungen höchst bemerkenswerte Unterschiede zwischen Seris von gesunden und kranken Personen gefunden, und es war zu hoffen, daß ein tieferer Einblick in das optische Gefüge und die optischen Eigenschaften der Serumeiweißlösungen vielleicht auch das Verständnis für adsorptive Vorgänge fördern konnte.

Dieser Frage näher zu treten, gestattete uns das von F. Löwe (12) bei den Zeißwerken in Jena konstruierte neue Flüssigkeitsinterferometer¹⁾, das die 50-fache Genauigkeit des von Reiß zu seinen Untersuchungen benutzten Pulfrichschen Eintauchrefraktometers für die Messung von Konzentrationsunterschieden ermöglicht, und daß sich auch, wie namentlich aus den Untersuchungen des Physikers Marc (13) hervorgeht, für die Messung von Adsorptionsvorgängen in kolloidalen Medien vortrefflich geeignet gezeigt hat. Ohne hier auf das Prinzip der interferometrischen Messung einzugehen, sei hier nur so viel bemerkt, daß auch für den Interferometerwert in letzter Linie die spezifische Refraktion der zu prüfenden Lösung maßgebend ist. Bekanntlich ist

1) Für die gütige Beschaffung des Instruments möchten wir Herrn Geh. Rat Hofmann auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank abstaten.

die Kraft aufgelösten Proteins zum Brechen von Licht im Gegensatz zu seinem Drehungsvermögen, das von der Ionisation des Proteins abhängt, nur eine Funktion des Raumes (vgl. hierzu Robertson, 14) und vom Molekularvolumen des Proteinmoleküls abhängig. Man konnte daher vielleicht erwarten, daß der Uebergang von optisch aktivem gelösten Globulin in teilweise festen, optisch undurchsichtigen und die Trübung verursachenden Zustand eine Aenderung des Interferometerwertes bewirken könne. Es wurden deshalb eine Reihe von interferometrischen Messungen vorgenommen.

Dieselben ergaben nun, daß ein Einfluß solcher Trübungen auf den Interferometerwert in keiner Weise sich nachweisen ließ. Das gilt für Trübungen, die durch Schütteln von Komplement, 1:10 verdünnt, oder auch durch Stehenlassen von sterilen aktiven menschlichen Seren zustande kommen. Ebensowenig ließ sich beim Thermoinaktivieren solcher leicht getrübtten aktiven Sera, die sich dabei teilweise wenigstens wieder aufhellten, eine Aenderung feststellen. Doch konnten bei Ausschütteln mit Bariumkarbonat nach dem Vorgange Marcs in bezug auf die Adsorption der trüben Teilchen geringe Unterschiede interferometrisch konstatiert werden, ebenso wie nach dem Absedimentieren gröber geflockten Globulins.

Aus dem interferometrischen Verhalten der Trübungen kann wohl gefolgert werden, daß der Globulinanteil, der die Trübung bedingt, einen minimalen Anteil im Verhältnis zum Gesamteiweißgehalt darstellen muß, und daß sich also die adsorptiven Immunitätsvorgänge in einer verschwindend kleinen Quote des Gesamteiweißgehaltes vollziehen müssen — eine Feststellung, die ja in der Immunitätslehre, wenn auch bisher noch nicht instrumentell durch Messung erwiesen, keineswegs neu ist. Der Empfindlichkeitswert für Serumlösungen betrug bei unseren interferometrischen Messungen ca. 0,01 Proz. des Eiweißgehaltes des Serums, d. h. es können geringere Unterschiede nicht mehr mit Zuverlässigkeit gemessen werden bei Anwendung der 0,5 ccm-Kammer. Eine größere Kammer konnte wegen der Trübung der Lösung nicht angewendet werden.

Zusammenfassung.

1) Die Schüttelinaktivierung beginnt durch kräftiges Schütteln mit der Hand über Kopf auch bei Zimmertemperatur schon nach kürzerer Zeit (10 Minuten) und ist in etwa 1½ Stunden komplett vollendet.

2) Der Grad der Inaktivierung geht dem Grad der Trübung parallel. Die Trübung selbst beruht auf ausgeflocktem Globulin, auf welchem das Komplement adsorbiert wird.

3) Vermittelt wird die Flockung des Globulins durch die feinsten Bläschen, die beim Schütteln mit der Hand entstehen und zum Schäumen führen. Der Schaum enthält das Komplement angereichert.

4) Der Sauerstoff der Luft ist für die Schüttelinaktivierung belanglos. Sie gelang ebensogut in Stickstoff- und Wasserstoffatmosphäre.

5) Die Reaktivierung des völlig inaktiven Schüttelkomplements gelang mit „Endstück“ prompt, nicht oder unvollkommen mit „Mittelstück“, und zwar beruht die Reaktivierung durch Endstück auf einer Lösung des ausgeflockten Globulins, welche das bis dahin adsorbierte Ferment in Freiheit setzt.

6) Untersuchungen über den Eiweißgehalt des ungeschüttelten, des geschüttelten und schließlich ausgeflockten Komplements mit dem Löweschen Interferometer ergaben, daß ungeschütteltes und trübes Komplement noch den gleichen Eiweißwert aufweisen, und daß erst nach sichtbarer Ausflockung und Sedimentierung des Globulins eine Abnahme des Eiweißwertes zu konstatieren ist. Trübungen, die durch Stehenlassen menschlicher Sera sich ausbilden, ändern an den Interferometereiweißwerten nichts. Ebensowenig konnte eine Aenderung des Interferometerwertes erzielt werden durch Thermoinaktivierung. Es scheinen jedoch die genannten Trübungen in Uebereinstimmung mit Robert Marcs Befunden einen Einfluß auf die Adsorptionsgröße bei Bariumkarbonatausschüttelung zu besitzen.

Literatur.

- 1) Jacoby und Schütze, diese Zeitschr., Bd. 4, 1910, p. 730.
- 2) Ritz, diese Zeitschr., Bd. 15, p. 145.

- 3) Courmont und Dufourt, zit. nach Ritz.
- 4) Kashiwabara, diese Zeitschr., Bd. 17, Heft 1.
- 5) Sachs und Bolkowska, diese Zeitschr., Bd. 7, 1910.
- 6) Mutermilch, Compt. rend. Soc. Biol., T. 70, 1911, No. 14, zit. nach Ritz.
- 7) Liefmann, Freie Vereinigung für Mikrobiologie, 1911.
- 8) Sachs und Omorokow, diese Zeitschr., Bd. 11, 1911.
- 9) Schmidt, P., Arch. f. Hygiene, Bd. 76, 1912.
— Zeitschr. f. Chemie u. Industrie der Kolloide, Bd. 11, 1912, Heft 1.
- 10) Abderhalden und Guggenheim, zit. nach Bechhold, Die Kolloide in Biologie und Medizin. Dresden (Steinkopf) 1912.
- 11) Reiß, Ergebnisse der inneren Medizin u. Kinderheilkunde, Bd. 10.
- 12) Löwe, F., Physikalische Zeitschr., 1910, No. 23.
— Zeitschr. f. Instrumentenkunde, 1910, Heft 11.
— Zeitschr. f. Chemie u. Industrie der Kolloide, 1912.
- 13) Marc, R., Chemiker-Zeitung, 1912, No. 58.
— Ueber Adsorption und gesättigte Oberflächen. Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 81, 1913, Heft 6.
- 14) Robertson, Physikalische Chemie der Proteine. Dresden (Steinkopf) 1912, p. 317 ff.

Nachdruck verboten.

[Institut de Bactériologie de Louvain (Directeur Prof. J. Denys).
Laboratoire du Prof. R. Bruynoghe.]

Contribution à l'étude de diverses alexines.

Par le Dr. A. Bessemans.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. August 1913.)

Dans ce travail, nous nous sommes proposé d'examiner l'influence exercée sur le pouvoir hémolytique de diverses alexines par les trois facteurs suivants: la chaleur, le temps, l'eau distillée.

Nos recherches ont pour objet les compléments de cobaye, poule, porc, chien et homme; elles étudient la question particulièrement au point de vue des deux constituants de l'alexine.

Première Partie: Influence de la chaleur.

Historique: La thermolabilité du complément, en général, est un phénomène admis depuis les travaux de Bordet¹⁾ concernant les hém-

1) Bordet, Annales de l'Inst. Pasteur, T. 12, 1898; T. 13, 1899 etc.

bactériolysines. Mais lorsque Ferrata¹⁾ trouva cet élément constitué de deux parties distinctes, la question suivante se posa spontanément: à quel constituant faut-il attribuer la thermolabilité? L'auteur crut la résoudre lui-même en affirmant que celle-ci tenait à l'altérabilité du chalon qui reste dissous.

Déjà la même année, les expériences de Brand²⁾ s'élevèrent contre cette manière de voir; d'après lui, le M serait, tout autant que l'E³⁾, détruit par un chauffage d'une demi-heure à 55°.

Les recherches de Tsurusaki⁴⁾ effectuées d'après une technique analogue, aboutirent à des conclusions identiques.

Les choses en restèrent là jusqu'au moment où Marks⁵⁾, voulant trouver un appui à la nouvelle théorie d'Ehrlich et Sachs⁶⁾ sur les complémentoides, mit en doute la thermolabilité du M. Comme ses prédécesseurs avaient surtout travaillé en chauffant isolément les deux morceaux de l'alexine et en opérant la reconstitution suivant des rapports quantitatifs constants, Marks fit ses recherches comme suit, en utilisant des rapports quantitatifs variables: chauffant à 55°, durant un temps plus ou moins long, le complément entier ou ses deux éléments, il en ajouta des doses décroissantes à des quantités constantes d'E et de M frais. C'est ainsi qu'il conclut au résultat suivant: les deux constituants de l'alexine de cobaye se montrent en général, quand chauffés à part, thermolabiles à 55° tandis que le complément total, inactivé comme tel par un chauffage durant une demi-heure à cette température, conserve une action nettement complétante vis-à-vis d'une dose donnée d'E frais. Il faudrait donc admettre la thermorésistance du M de cobaye chauffé en présence de l'E frais; celui-ci serait doué d'une sorte d'action protectrice et la disparition du M chauffé isolément devrait être considérée comme le résultat de sa dilution dans l'eau physiologique plutôt que celui du chauffage lui-même.

L'auteur travailla de même le complément de mouton et lui trouva le M dans tous les cas thermostabiles, qu'on le chauffe à part ou dans le complément entier.

Mutermilch⁷⁾ étudie l'influence de la chaleur sur le sérum de cobaye chauffé comme tel. Sans recourir à des rapports quantitatifs variables, il met en présence des constituants frais les constituants isolés du sérum chauffé. Ses résultats sont tels que non seulement ils corroborent les idées de Marks mais affirment, avec la thermorésistance du M, celle, quoique moins fréquente de l'E. Parfois même, dit l'auteur, «on arrive à

1) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 13, p. 366.

2) Brand, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 34.

3) Nous renvoyons à nos publications antérieures dans cette revue même: Bd. 17, 1913, H. 1 et 3.

4) Tsurusaki, Bioch. Zeitschr., Bd. 10, 1908, H. 4 et 6.

5) Marks, Studies from the Rockefeller Institute, Vol. 13, p. 590 et Vol. 14, p. 316.

6) Ehrlich u. Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 21, p. 492.

7) Mutermilch, C. R. Soc. de Biologie, 1911, p. 577.

transformer un sérum inactivé (par le chauffage d'une $\frac{1}{2}$ heure entre 53° et 57°) en sérum actif, en mélangeant le précipité avec le liquide superficiel du sérum chauffé soumis à la dialyse».

Encore d'autres auteurs ont analysé le phénomène sans arriver cependant à des conclusions concordantes. C'est ainsi que Guggenheimer¹⁾ trouva le M d'ordinaire beaucoup plus labile que l'E. Graminetsky²⁾ confirmé par les expériences de Liebermann et Fenyvessy³⁾ admet que le complément inactivé par la chaleur présente, après refroidissement et un certain repos, une régénération partielle de son activité, à condition toutefois que le chauffage n'ait pas été poussé jusqu'à l'inactivation complète de l'alexine.

Citons encore Rondoni⁴⁾ qui étudia le sérum humain et conclut à la thermolabilité de ses deux constituants.

Recherches personnelles: La question de l'influence de la chaleur sur l'alexine étant donc encore toujours débattue, nous avons cru intéressant de l'étudier de près; et cela, non seulement pour le complément de cobaye — comme l'ont fait jusqu'ici la plupart des auteurs — mais aussi pour celui de poule, porc, chien et homme.

Technique: Voici, en général, la méthode employée: après avoir divisé au CO² une partie de sérum frais⁵⁾, nous chauffons au bain-marie, durant une demi-heure et à des températures variables suivant les expériences: et du complément frais (soit comme tel, soit dilué dans de l'eau physiologique ou de l'eau distillée) et ses deux constituants isolés dilués chacun, en partie dans de l'eau distillée, en partie dans de l'eau physiologique (comme l'eau distillée ne dissout pas le M, nous secouons le liquide de façon à obtenir une suspension de fragments plus ou moins menus).

Après chauffage, nous ramenons à concentration physiologique, grâce à l'ajoute d'eau hypersalée, une partie du complément dilué dans l'eau distillée ainsi que le M en suspension dans le même liquide; remarquons, en passant, qu'en général ce M se dissout plus difficilement que le M non chauffé.

Nous dosons alors le complément chauffé, nous le séparons rapidement en M et E et faisons pour chaque constituant soumis au chauffage (soit isolément soit dans le complément entier) une série d'expériences dans laquelle nous le mettons, à dose décroissante, en présence d'une constante de l'autre élément frais obtenue par la division d'une portion fraîche de sérum identique; cette séparation est faite pendant qu'on procède au chauffage de façon à pouvoir employer les M chauffés dès qu'ils sortent du bain-marie et se sont refroidis.

- 1) Guggenheimer, Zeitschr. f. Imm., Bd. 11, 1911, p. 393.
- 2) Graminetsky, Bioch. Zeitschr., Bd. 38, p. 501.
- 3) Liebermann u. Fenyvessy, ibidem, Bd. 40, p. 353.
- 4) Rondoni, La Clin. med. Ital., 1911, No. 7, p. 395.
- 5) Voir nos publications antérieures: Zeitschr. f. Imm., Bd. 17, 1913.

Comme criterium nous déterminons, dans la même recherche, la force hémolytique de l'alexine non chauffée ainsi que la dose limite de l'activité de ses constituants vis-à-vis de la même constante de l'autre élément employée dans le dosage des éléments chauffés.

Pour les variations occasionnelles de technique et d'autres détails complémentaires, nous renvoyons aux diverses expériences ci-dessous, et à l'étude de chaque sérum en particulier.

a) Cobaye.

Comme nous l'avons expliqué dans notre premier travail, la séparation se fait par le passage de CO² dans une dilution de sérum au 10^e dans de l'eau distillée.

Nous employons le même système hémolytique que là-bas.

Inutile, sans doute, de rappeler ici: que la séparation et la reconstitution ne présentent guère de difficultés pour le sérum frais, pourvu toutefois qu'elles s'opèrent vite; que la substitution réciproque des deux constituants est chose constamment possible; que nous n'avons jamais observé, pour ce sérum, l'action inhibante que Marks¹⁾ attribue au M frais, lorsque la proportion M/E dépasse l'unité.

Pour le chauffage, nous diluons le M au 10^e; l'E au 10^e dans de l'eau distillée, au 20^e dans de l'eau physiologique (ceci à cause de l'ajoute d'eau salée à 16 ‰).

Le complément est chauffé pur; parfois aussi il est dilué au 10^e (nous ramenons à concentration physiologique par l'ajoute d'une quantité ana d'eau salée à 16 ‰).

Notons, sans insister, que lorsqu'on soumet à la séparation au CO² du complément de cobaye chauffé (une demi-heure à 55° et surtout à 57°) on obtient un précipité notablement plus intense qu'avant chauffage.

Prenons, sans plus tarder, un exemple d'expérience; il s'agit d'un chauffage durant une demi-heure à la température de 56°. Nous résumons sous forme de tableau²⁾.

1) Marks, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911, Heft 4.

2) Pour faciliter la lecture, nous emploierons les abréviations suivantes:

C^t ch. P = complément chauffé pur c. à d. non dilué

C^t ch. D_{/10} ou C^t ch. ph_{/10} = complément chauffé en dilution au 10^e dans eau dist. ou physiol.

E C^t ch. P ou E C^t ch. D_{/10} = Endstück du complément chauffé pur ou du complément chauffé en dilution au 10^e dans eau distillée etc. etc.

Tableau I.

Avant chauffage					Après chauffage											
Dosage des constituants					Dos. du Ct			Dosage des constituants								
de l'E		du M			ch. P	ch. D/10	ch. ph/10	de l'E				du M				
E décroiss.	M const. 1/10	M décroiss.	E const. 1/10	Doses décroiss. d'				Doses décroiss. de								
							M frais const. 1/10	E Ct ch. P	E Ct ch. D/10	E ch. D/10	E ch. ph/20	E frais const. 1/10	M Ct ch. P	M Ct ch. D/10	M ch. D/10	M ch. ph/10
1/20 c	1/30 c	1/20 c	1/20 c	1/10 0	1/5 0	1/5 0	1/5 0	1/5 0	1/5 ?	1/5 0	1/5 0	1/10 0	1/5 0	1/5 0	1/5 0	1/5 0
1/40 0	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/10 0	1/5 0	1/5 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0
1/80 0	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/160 0	1/5 0	1/5 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0	1/20 0
1/160 0	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/320 0	1/5 0	1/5 0										

Témoins: M frais 1/5 0 Tous les M ch. 2/5 0
 E frais 1/10 0 Tous les E ch. 1/5 0
 1/5 0 2/5 0
 1/10 0

Ainsi qu'on le constate à l'examen de ce tableau, il a suffi, dans cette expérience, d'un chauffage à 56° durant une demi-heure, non seulement pour faire disparaître l'activité hémolytique du complément comme tel mais aussi pour ne plus permettre de reconstituer (avec l'autre élément frais du même complément), à aucune des doses employées, ni l'un ni l'autre des éléments chauffés; remarquons que la constante d'éléments frais employée est pourtant de loin suffisante, puisqu'elle donne encore de l'hémolyse complète avec une faible quantité d'E ou de M frais.

Toutes nos expériences ne nous ont pas donné cette disparition totale de l'activité des deux constituants, surtout lorsqu'il s'agissait de compléments très actifs ou lorsque le chauffage n'avait été fait qu'entre 52° et 54°. Nous choisissons, à preuve, les deux tableaux suivants; ils nous donnent presque toutes les façons de chauffage que nous avons utilisées.

Tableau II.

Avant chauffage				Après chauffage										
Dosage des constituants				Dos. du Ct			Dosage des constituants							
							de l'E			du M				
E décroiss.	M constant. $\frac{1}{10}$	M décroiss.	E constant. $\frac{1}{10}$	Ct ch. P 52 à 54°	Ct ch. D/10 52 à 54°	Ct ch. P 55 à 57°	M frais const. $\frac{1}{10}$	Doses décroiss. de			E frais const. $\frac{1}{10}$	Doses décroiss. de		
								E Ct ch. P 52-54	E Ct ch. D/10 52-54	E Ct ch. P 55-57		M Ct ch. P 52-54	M Ct ch. D/10 52-54	M Ct ch. P 55-57
$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{30}$ c			$\frac{1}{10}$?	$\frac{1}{10}$?	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ peu	$\frac{1}{10}$ bon I	$\frac{1}{10}$ peu		$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$?	
$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c			$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ peu	$\frac{1}{10}$ peu	$\frac{1}{10}$?		$\frac{1}{10}$ I	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ 0	
$\frac{1}{80}$ p c	$\frac{1}{80}$ c						$\frac{1}{20}$?	$\frac{1}{20}$ tr	$\frac{1}{20}$ 0		$\frac{1}{20}$ peu	$\frac{1}{20}$ I	$\frac{1}{20}$ 0	
$\frac{1}{160}$ p c	$\frac{1}{160}$ c	bon I					$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0		$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$?	$\frac{1}{40}$ 0	
$\frac{1}{320}$ p c	$\frac{1}{320}$ c	tr											$\frac{1}{320}$ 0	
$\frac{1}{640}$ p c	$\frac{1}{640}$ c												$\frac{1}{640}$ 0	

Témoins: M frais $\frac{1}{10}$ 0 M chauffés $\frac{1}{5}$ 0
 E frais $\frac{1}{10}$ 0 E chauffés $\frac{1}{5}$ 0
 $\frac{1}{5}$ 0 $\frac{2}{5}$ 0
 $\frac{1}{5}$ 0 $\frac{2}{5}$ 0

Tableau III.

Avant chauffage				Après chauffage											
Dosage des constituants				Dos. du Ct		Dosage des constituants									
						de l'E				du M					
E décroiss.	M constant. $\frac{1}{10}$	M décroiss.	E constant. $\frac{1}{10}$	Ct ch. P 53°	Ct ch. P 56°	M frais const. $\frac{1}{10}$	Doses décroiss. de				E frais const. $\frac{1}{10}$	Doses décroiss. de			
							E ch. ph/53°	E ch. D/10 53°	E ch. ph/56°	E ch. D/10 56°		M ch. ph/10 53°	M ch. D/10 53°	M ch. ph/10 56°	M ch. D/10 56°
$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{30}$ c			$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ I	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ I	$\frac{1}{10}$?	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ bon I	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ peu	$\frac{1}{10}$ peu
$\frac{1}{40}$ I	$\frac{1}{40}$ c			$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{20}$ tr	$\frac{1}{20}$?	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$?	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0
$\frac{1}{80}$ I	$\frac{1}{80}$ p c						$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0
$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ peu														$\frac{1}{160}$ 0
$\frac{1}{320}$ 0	$\frac{1}{320}$ 0														$\frac{1}{320}$ 0
$\frac{1}{640}$ tr	$\frac{1}{640}$ I														$\frac{1}{640}$ tr

Témoins: M frais $\frac{1}{10}$ 0 M chauffés $\frac{1}{5}$ 0
 E frais $\frac{1}{10}$ 0 E chauffés $\frac{1}{5}$ 0
 $\frac{1}{5}$ 0 $\frac{2}{5}$ 0
 $\frac{1}{5}$ 0 $\frac{2}{5}$ 0

27*

Nous avons ainsi examiné, au point de vue de l'influence de la chaleur, douze sérums de cobaye. La concordance de nos résultats nous permet d'affirmer que pour aucun des constituants de cette alexine, il n'y a lieu de parler de véritable thermostabilité. Après un chauffage d'une demi-heure de 52° à 57° — qu'on chauffe les constituants isolés ou dans le complément total, dilués dans l'eau physiologique ou dans l'eau distillée — il reste, suivant la température du chauffage, tantôt une trace de M ou d'E, tantôt ne rien ni de l'un ni de l'autre. En général, nous avons observé que le M, surtout lorsqu'on le chauffe en suspension dans l'eau distillée, résiste le mieux à l'action de la chaleur; cette dernière particularité serait-elle due à ce fait que le M n'entre pas en dissolution dans ce liquide?

Deux objections se sont présentées aux conclusions énoncées: une première déjà soulevée par Marks¹⁾, une seconde que nous avons formulée nous-mêmes.

Tout d'abord, on peut se demander en effet: le M chauffé n'aurait-il pas subi de ce fait une altération telle que, sans être détruit, il aurait simplement acquis ou gagnerait très rapidement des propriétés empêchantes semblables à celles que Brand²⁾ décrivit le premier chez le M conservé quelque temps dans l'eau physiologique? Et même ne pourrait on pas en supposer autant de l'E? C'est ainsi notamment que Marks tache d'interpréter la perte d'activité du M chauffé séparément en opposition à la prétendue thermostabilité du même M chauffé en présence d'E c. à d. dans le complément entier.

Nous croyons pouvoir répondre par la négative aux questions posées plus haut grâce, tout d'abord, à l'examen des tableaux déjà donnés, grâce ensuite à des recherches complémentaires dont nous parlerons plus bas.

Voyons p. ex. l'expérience 3. Supposons que le M chauffé au lieu d'être détruit possède des propriétés inhibantes telles que $\frac{1}{20}$ ou $\frac{1}{40}$ ne donne plus trace de dissolution avec $\frac{1}{10}$ d'E frais; comment expliquer alors que $\frac{1}{10}$ ou $\frac{1}{5}$ du même M donne une hémolyse presque complète vis-à-vis de la même dose d'E frais que tantôt? Il est, en effet, un fait observé

1) Marks, Studien from the Rockefeller Inst., Vol. 14, p. 316.

2) Brand, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 34.

que le caractère inhibant d'une dose donnée de M ayant subi la modification de Brand reste au moins tout aussi marqué quand on augmente cette dose. Un même raisonnement répondrait à l'objection absolument fortuite d'une action empêchante de la part de l'E.

Voici du reste la recherche complémentaire au moyen de laquelle nous avons taché de démontrer qu'il ne s'agit pas ici d'action inhibante. Ayant toujours constaté que du M, qui a subi l'altération de Brand, entrave l'action hémolytique de l'alexine comme telle, nous mettons en présence dans des rapports variables le constituant suspect et le complément frais. Or, à chaque recherche, nous avons observé que l'ajoute du constituant ne contrecarre en rien l'activité de l'alexine, qu'on ajoute les globules sensibilisés aussitôt ou qu'on laisse le contact d'abord se faire (durant 15 à 30 min.); au contraire, l'activité du complément frais est parfois accrue, ce qui arrive notamment dans les cas où les constituants n'ont pas été complètement détruits par le chauffage. Comme exemple de cette recherche, nous donnons le tableau IV; il concerne le M et fait suite à l'expérience 3, les mêmes éléments ayant servi de part et d'autre. Ce tableau est constitué de deux séries d'expériences, chacune étant menée d'après une technique un peu différente.

Tableau IV (suite du tableau III).

Première Série					Deuxième Série				
Complément frais constant $\frac{1}{40}$ 1)	Doses décroissantes de				Complément frais décroissant	Doses constantes de M : $\frac{1}{5}$			
	M ch. 53° p _h /10	M ch. 56° p _h /10	M ch. 53° D/10	M ch. 56° D/10		M ch. 53° p _h /10	M ch. 56° p _h /10	M ch. 53° D/10	M ch. 56° D/10
$\frac{1}{5}$ c	$\frac{1}{5}$ c	$\frac{1}{5}$ c	$\frac{1}{5}$ c	$\frac{1}{5}$ c					
$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c					
$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$	c	c	c	c
$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$	c	c	c	c
					$\frac{1}{80}$	bon I	I	p c	I
					$\frac{1}{160}$?	O	O	O
Témoins: Complément frais: $\frac{1}{20}$ c					$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ I	$\frac{1}{160}$ O		

Quant à la seconde objection possible, on pouvait la formuler à peu près dans ces termes: si après chauffage du complément, vous ne parvenez pas à reconstituer ses éléments,

1) $\frac{1}{40}$ = dose limite d'activité (voir tableau III).

ce n'est pas que le chauffage a détruit ceux-ci mais qu'il leur a communiqué une fragilité telle qu'ils ne supportent plus les diverses manipulations inhérentes à une séparation au CO². Les constituants se trouveraient donc encore intacts dans le complément chauffé mais s'altéreraient au cours de la division. Mais, s'il en est ainsi, le complément chauffé devra nous donner de l'hémolyse — et plus ou moins, suivant la plus ou moins bonne conservation de ses constituants — quand nous l'ajoutons, en proportions variables, à chacun des éléments frais. Voici comment nous avons opéré.

Tableau V.

Avant chauffage									Après chauffage d'une 1/2 h. à 56°				
Dos. du Compl isolément	Dos. Compl vis-à-vis				Dos. constituants frais				Dos. du Compl chauffé, isolément	Dos. Compl vis-à-vis			
	de l'E frais		du M frais		du M		de l'E			de l'E frais		du M frais	
	Ct fr. décr.	E fr. const. 1/20	Ct fr. décr.	M fr. const. 1/20	M fr. décr.	E fr. const. 1/20	E fr. décr.	M fr. const. 1/20		Ct ch. 56° décr.	E fr. const. 1/20	Ct ch. 56° décr.	M fr. const. 1/20
1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	c	0,4 0	0,2 0	0,2 0	0 0	
1/40 pc	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	c	0,2 0	1/10 0	1/10 0	0 0	
1/80 φ	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	bon I		1/20 0	1/20 0	0 0	
1/160 0	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	peu		1/40 0	1/40 0	0 0	
	1/320 c	1/320 c	1/320 c	1/320 c	1/320 c	1/320 c	1/320 c	0		1/80 0	1/80 0	0 0	
	1/640 ?	1/640 ?	1/640 ?	1/640 ?	1/640 ?	1/640 ?	1/640 ?	0		1/160 0	1/160 0	0 0	
Témoins: E frais 1/20 0									M frais 1/20 0				
									1/10 0				

Pour donner toute sa valeur à l'expérience citée, il restait évidemment encore à prouver que le complément chauffé ne présentait aucune action inhibante; nous avons donc encore fait la série de tubes suivants.

Tableau VI (suite du tableau V).

Compl constant 1/40 ¹⁾	Compl chauffé décroissant	
	sans contact ²⁾	avec contact
	0,2 c	0,2 c
	0,1 c	0,1 c
	1/20 c	1/20 c

1) 1/40 = dose limite (voir tableau V).

2) Par résultat avec et sans contact nous entendons: celui obtenu en laissant, avant l'ajoute des globules sensibilisés le contact se faire durant

Après ces multiples recherches de contrôle, nous nous croyons donc autorisé à admettre la thermolabilité des deux constituants de l'alexine de cobaye, cette thermolabilité devant être attribuée à la destruction du M et de l'E, destruction plus ou moins complète suivant diverses circonstances (durée et température, liquide ambiant).

Si nous essayons à présent d'interpréter nos résultats comparativement à ceux des auteurs qui admettent une thermostabilité de l'un ou l'autre élément, nous tenons à faire remarquer que non seulement nous avons travaillé avec des rapports quantitatifs très variables mais encore qu'à chacune de nos expériences nous avons eu soin de ne négliger aucun critérium: ni dosage et reconstitution des morceaux frais entre eux, ni dosage du complément frais vis-à-vis des constantes de ses éléments, ni recherche des actions empêchantes pouvant fausser nos conclusions. Beaucoup d'auteurs non seulement ont négligé ces divers contrôles mais encore n'ont eu recours qu'à des recherches qualitatives; c'est pourquoi bien souvent ils n'ont pu se faire une idée exacte de la signification de leurs résultats et ont conclu à la thermostabilité dans bien des cas où ils n'auraient pu conclure qu'à une destruction incomplète de l'un ou l'autre des éléments.

Evidemment, cette destruction, sous l'action de la chaleur, n'est pas un phénomène instantané; elle se produit graduellement avec la durée et la température pour devenir complète, après une demi-heure de chauffage à 56—57°, en ce qui concerne les deux constituants de l'alexine de cobaye.

b) Poule.

Dans l'étude des diverses alexines qui suivent, nous avons dû apporter quelques modifications à la technique suivie pour le sérum de cobaye.

Tout d'abord, comme ces compléments sont notablement moins actifs au point de vue hémolytique, nous avons

15 à 30 minutes (entre le C^t frais et le C^t chauffé); et celui obtenu en ajoutant les globules de suite.

réduit de la moitié la quantité de globules de mouton tout en conservant notre dose ordinaire d'ambocepteur; ensuite, pour ramener à concentration physiologique certaines dilutions dans de l'eau distillée, nous avons usité de l'eau salée à 64 ‰ dans le but de ne pas avoir dans certains tubes (les tubes témoins p. ex.) une masse trop grande de liquide.

La séparation du complément de poule par la méthode au CO² nous réservait une surprise. Car dans plusieurs essais, faits à l'instar de la division de l'alexine de cobaye, nous obtenions toujours ce phénomène étrange que notre double dose témoin de M, parfois même aussi la simple dose, donnait dissolution complète des globules; d'autre part, nous remarquons que le précipité obtenu était particulièrement abondant et se redissolvait en partie dans l'eau distillée de lavage. Devant ces faits, nous nous sommes demandé si peut-être la dilution employée n'était pas trop forte, ayant comme conséquence une sorte d'entraînement, avec l'intense précipité, d'une partie plus ou moins grande de l'E: peut-être celui-ci ne serait-il pas exclusivement constitué d'éléments solubles dans l'eau distillée?

Nous avons donc, avec un même sérum, fait quatre essais de division successifs, notamment:

un premier	avec	du sérum	non dilué
„ 2 ^e	avec	du sérum dilué	à 1 sur 2.5
„ 3 ^e	„	„	„ à 1 „ 5
„ 4 ^e	„	„	„ à 1 „ 10

Alors que le barbotage de l'anhydride carbonique ne produisit aucun trouble apparent dans le sérum comme tel, un léger précipité se produisit dans la dilution $\frac{1}{2.5}$; devenant plus intense pour la dilution $\frac{1}{5}$, il atteignit son maximum pour la dilution $\frac{1}{10}$. En même temps le précipité, nullement soluble dans l'eau distillée pour la plus faible dilution, se redissolvait un peu (dans l'eau dist. de lavage) pour celle au cinquième et bien plus encore pour celle au 10^e. Quant au résultat hémolytique obtenu dans ces essais, le voici sous forme de résumé:

Tableau VII.

Dosage du complément	Reconstitution			Témoins					
	Division à $\frac{1}{2.5}$	Division au $\frac{1}{5}$	Division au $\frac{1}{10}$	Division à $\frac{1}{2.5}$		Division au $\frac{1}{5}$		Division au $\frac{1}{10}$	
				E	M	E	M	E	M
$\frac{4}{10}$ c	$\frac{3}{10}$ E +	$\frac{3}{10}$ E +	$\frac{3}{10}$ E +	$\frac{1}{10}$ O	$\frac{1}{10}$ O	$\frac{1}{10}$ O	$\frac{1}{10}$ O	$\frac{1}{10}$ O	$\frac{1}{10}$ O
$\frac{3}{10}$ c	$\frac{3}{10}$ M =	$\frac{3}{10}$ M =	$\frac{3}{10}$ M =	$\frac{5}{10}$ I	$\frac{5}{10}$ O	$\frac{5}{10}$ O	$\frac{5}{10}$ I	$\frac{5}{10}$ O	$\frac{5}{10}$ P c
$\frac{2}{10}$ p c	c	c	c	$\frac{10}{10}$ c	$\frac{10}{10}$ O	$\frac{10}{10}$ O	$\frac{10}{10}$ c	$\frac{10}{10}$ O	$\frac{10}{10}$ c
$\frac{1}{10}$ O									

Comme on le voit, dans la séparation à $\frac{1}{2.5}$, l'E à lui seul donne de l'hémolyse; il faut donc admettre que par cette méthode tout le M n'a pas été précipité. Pour les deux séparations à une dilution plus forte, c'est l'inverse qui a lieu c. à d. que l'E seul ne donne plus trace de dissolution tandis que celle-ci se fait pour le M seul et de plus en plus forte quand on augmente la dilution. Il en résulte que l'optimum de dilution pour l'alexine de poule se trouve entre $\frac{1}{2.5}$ et $\frac{1}{5}$. Après quelques essais, nous avons pu nous convaincre qu'une dilution au $\frac{1}{4}$ dans de l'eau distillée permet d'obtenir toujours une séparation parfaite; alors, en effet, ni M ni E ne donnent, à eux seuls, une trace d'hémolyse, quelle que soit la quantité employée.

A partir d'ici, nous nous sommes donc servi, pour le complément de poule, de la méthode au $\frac{1}{4}$. Pour ramener à concentration physiologique les dilutions au $\frac{1}{4}$ dans de l'eau distillée, nous avons employé l'eau salée à 16 ‰ (à raison notamment de 3 parties pour 4).

Voici un exemple d'une telle séparation avec reconstitution du complément et essai de substitution réciproque de ses deux éléments.

(Voir tableau VIII p. 392.)

Cette recherche nous montre que chez la poule comme chez le cobaye la substitution réciproque peut se faire, puisqu'il suffit d'augmenter la dose de l'un des constituants pour pouvoir diminuer la quantité limite de l'autre.

Tableau VIII.

Dosage du complément	Essai de substitution					
	Série I			Série II		
	E décr.	M const. $\frac{1}{10}$	M const. $\frac{5}{10}$	M décr.	E const. 0.25	E const. $\frac{5}{10}$
1 c	$\frac{4}{10}$	c	c	$\frac{6}{10}$	c	c
0.5 c	$\frac{3}{10}$	bon I	c	$\frac{4}{10}$	c	c
0.25 c	$\frac{2}{10}$	0	p c	$\frac{3}{10}$	c	c
$\frac{1}{10}$ tr	$\frac{1}{10}$	0	I	$\frac{2}{10}$	p c	c
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$	0	0	$\frac{1}{10}$	tr	p c
				$\frac{1}{20}$	0	bon I
				$\frac{1}{40}$	0	0
				$\frac{1}{80}$	0	0

Témoins: M $\frac{1}{10}$ 0 E 0.25 0
 $\frac{5}{10}$ 0 0.5 0
 $\frac{10}{10}$ 0 1.0 0

Dans d'autres essais de substitution, il nous est arrivé souvent de ne pas réussir à souhait à cause des propriétés inhibantes qu'y montraient les fortes doses de M. Comme exemple de cette inhibition, nous donnons l'expérience suivante.

Tableau IX.

Dosage du complément	Reconstitution			
	E décr.	M const. $\frac{1}{10}$	M décr.	E const. $\frac{4}{10}$
$\frac{4}{10}$ c	$\frac{6}{10}$	c	$\frac{6}{10}$	0
$\frac{2}{10}$ p c	$\frac{4}{10}$	c	$\frac{4}{10}$	0
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{2}{10}$	0	$\frac{2}{10}$	bon I
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$	0	$\frac{1}{10}$	c
			$\frac{1}{20}$	c
			$\frac{1}{40}$	c
			$\frac{1}{80}$	c
			$\frac{1}{160}$	peu
			$\frac{1}{320}$	0

Témoins: M $\frac{1}{10}$ 0 E $\frac{4}{10}$ 0
 $\frac{2}{10}$ 0 $\frac{2}{10}$ 0
 $\frac{12}{10}$ 0 $\frac{12}{10}$ 0

Dans cette recherche, nous voyons que le M frais de poule peut, à dose trop forte, diminuer et même empêcher l'hémolyse, de même qu'une quantité trop faible peut ne pas y suffire. Il est à remarquer que cette action empêchante

vis-à-vis de l'E frais s'exerce également — quoiqu'en général moins nettement et moins intensément — vis-à-vis du complément frais total; nous avons à plusieurs reprises constaté ce phénomène en ajoutant à la dose limite de l'alexine des quantités décroissantes de M frais égales à celles mises en présence des constantes d'E.

Quand nous comparons entre eux les différents sérums de poule, nous constatons que l'action empêchante du M frais n'est pas commune à tous; nous ne l'avons pu observer que dans 7 expériences sur 16. Ce fait serait-il dû à la plus ou moins grande rapidité d'altération des divers M ou à l'exécution plus ou moins lente des diverses manipulations occasionnées par la technique?

En tous cas, il ne faut pas simplement incriminer un défaut de rapport entre les doses de M et d'E employées puisque dans la recherche 9 p. ex. les quantités de M ($\frac{4}{10}$) et d'E ($\frac{4}{10}$) ne donnant par leur ajoute aucune trace d'hémolyse se trouvent identiques dans la dose de complément ($\frac{4}{10}$) qui donne la dissolution complète.

Ce curieux phénomène d'inhibition, en vertu duquel on n'obtient plus d'hémolyse avec un mélange des deux constituants frais à une dose où le complément donne le beau C, nous ne l'avons, comme déjà dit, jamais constaté pour le sérum de cobaye, d'accord en cela avec les recherches de Thomsen et Leschly¹⁾ concernant les circonstances les plus favorables à la modification de Brand.

Comment se comporte maintenant l'alexine de poule vis-à-vis de la chaleur?

De même que plus haut pour sérum de cobaye, nous avons chauffé ici à diverses températures et dilués de diverses façons non seulement le complément entier mais aussi ses deux constituants.

Nous faisons suivre un tableau concernant le chauffage durant $\frac{1}{2}$ h. à 56° du complément non dilué. Dans la même recherche, nous avons employé, à titre de contrôle, deux

1) Thomsen et Leschly, Comm. de l'Inst. Séroth. de l'Etat Danois, T. 6. — Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, p. 216.

méthodes d'examen différentes: une première dans laquelle nous ajoutons à des constantes d'élément frais des doses décroissantes de complément chauffé, une seconde dans laquelle nous séparons l'alexine chauffé pour doser ses constituants isolés vis-à-vis d'une constante d'élément frais égale à celle employée dans la première méthode. Enfin, comme criterium, nous avons le dosage des constituants frais comme celui du complément frais total, toujours vis-à-vis des mêmes constantes d'éléments frais:

Tableau X.

Avant chauffage								Après chauffage								
Dos. du Compl ^t				Dos. des const ^{ts}				Dos. du Compl ^t				Dos. des const ^{ts}				
isolément	vis-à-vis des éléments frais			du M	de l'E			isolément	vis-à-vis des éléments frais			du M	de l'E			
	C ^t décroiss.	E fr. c. ⁴ / ₁₀	C ^t décroiss.	M fr. c. ¹ / ₁₀	M décroiss.	E c. ⁴ / ₁₀	E décroiss.		M c. ¹ / ₁₀	C ^t ch. d.	E fr. c. ⁴ / ₁₀	C ^t ch. d.	M fr. c. ¹ / ₁₀	M ch. d.	E fr. c. ⁴ / ₁₀	E ch. d.
$\frac{4}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	c	$\frac{4}{10}$ c	c	$\frac{1}{10}$ c	c	$\frac{4}{10}$ c	c	2 0	$\frac{6}{10}$ I	1	?	$\frac{6}{10}$ 0	0	$\frac{10}{10}$ P	$\frac{1}{10}$ c
$\frac{3}{10}$ c	$\frac{1}{20}$ c	c	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{30}$ c	c	$\frac{2}{10}$ c	peu	1 0	$\frac{4}{10}$ I	0,4	0	$\frac{4}{10}$ 0	0	$\frac{6}{10}$ 0	$\frac{10}{10}$ P
$\frac{2}{10}$ p c	$\frac{1}{40}$ c	c	$\frac{1}{10}$ c	peu	$\frac{1}{40}$ c	c	$\frac{1}{10}$ c	0		$\frac{2}{10}$ I	$\frac{2}{10}$ 0	0	$\frac{2}{10}$ 0	0	$\frac{4}{10}$ 0	$\frac{4}{10}$ c
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{80}$ c	c	$\frac{1}{20}$ c	?	$\frac{1}{80}$ c	?	$\frac{1}{10}$ c			$\frac{1}{10}$ I	$\frac{1}{10}$ 0	0	$\frac{1}{10}$ 0	peu	$\frac{2}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	0	$\frac{1}{40}$ 0	0	$\frac{1}{160}$ 0	0				$\frac{1}{20}$ p c	$\frac{1}{20}$ 0	0	$\frac{1}{20}$ c	c	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0
	$\frac{1}{320}$ 0	0								$\frac{1}{40}$ p c	$\frac{1}{40}$ 0	0	$\frac{1}{40}$ tr	0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0
										$\frac{1}{80}$ p c			$\frac{1}{80}$ 0	0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0
										$\frac{1}{160}$ 0			$\frac{1}{160}$ 0	0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0

Témoins: M fr. $\frac{1}{10}$ 0 $\frac{1}{5}$ 0E fr. $\frac{4}{10}$ 0 $\frac{8}{10}$ 0M ch. $\frac{6}{10}$ 0 $\frac{12}{10}$ 0E ch. $\frac{10}{10}$ 0 $\frac{15}{10}$ 0

Comme contre épreuve, nous ajoutons à la dose limite du même complément soit 0,3 comme constante, des doses décroissantes de M fr., de M C^t ch. et de C^t ch. comme tel. Nous faisons pour chaque recherche deux séries de tubes, une première dans laquelle nous ajoutons les globules aussitôt, une seconde dans laquelle nous laissons d'abord le contact se faire durant 15 à 30 min. environ:

Tableau XI (suite du tableau X).

Ct fr. c. 0,3	M fr. d.		M Ct ch. d.		Ct ch. d.	
	sans contact	avec contact	sans contact	avec contact	sans contact	avec contact
	$\frac{6}{10}$ c	$\frac{6}{10}$ c	$\frac{6}{10}$ O	$\frac{6}{10}$ c	$\frac{6}{10}$ I	$\frac{6}{10}$ c
	$\frac{4}{10}$ c	$\frac{4}{10}$ c	$\frac{4}{10}$?	$\frac{4}{10}$ c	$\frac{4}{10}$ I	$\frac{4}{10}$ c
	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ I	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ I	$\frac{2}{10}$ c
	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ P c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c
	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c

Témoins: $\frac{3}{10}$ de Ct — c (ce témoin est resté, avant l'ajoute des globules, dans les mêmes conditions que les tubes où le contact a pu se faire, même température, même durée).

Une chose frappe à l'examen du tableau X, surtout quand on se rappelle les résultats obtenus par le chauffage de l'alexine de cobaye. En effet, si l'on ne parvient plus à reconstituer l'E ch. de poule avec le M frais, le M n'a perdu que faiblement de son activité. Nous croyons avoir éliminé dans notre recherche toutes les causes possibles d'erreur grâce à l'emploi simultané de deux techniques différentes et au dépistage des propriétés empêchantes.

Nous faisons remarquer en passant que pour le sérum en cause dans l'expérience X nous n'avons pas constaté d'action empêchante de la part du M frais, mais bien de la part du M du Ct ch. comme de la part du Ct ch. lui-même. Cette différence entre M fr. et M ch. ou M Ct ch. est un phénomène que nous avons pu observer assez souvent; il en est de même du fait suivant: l'action empêchante semble être plus intense vis-à-vis de l'E fr. que du Ct lui-même et se révèle le mieux vis-à-vis du Ct quand on ajoute les globules chargés d'ambocepteur aussitôt que les facteurs se trouvent en présence.

Cette relative thermostabilité de certains M de poule n'existe pas seulement quand on chauffe le complément comme tel; ainsi qu'il ressort de l'expérience ci-dessous, nous l'avons décelée aussi dans un chauffage durant $\frac{1}{2}$ h. à 56° d'un M isolé, soit en solution dans l'eau physiologique, soit en suspension dans l'eau distillée:

Tableau XII.

Avant chauffage					Après chauffage												
Dosage du Complé	Dos. des constts				Dos. du Ct	Dosage des constituants											
	de l'E		du M			de l'E ch.					du M ch.						
	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M d.	E c. $\frac{4}{10}$		M fr. c. $\frac{1}{10}$	E Ct ch. P d.	E ch. D/4 d.	E ch. ph/7 d. ¹⁾	E ch. D/10 d.	E ch. ph/10 d.	E fr. c. $\frac{4}{10}$	M Ct ch. P d.	M ch. D/4 d.	M ch. ph/4 d.	M ch. D/10 d.	M ch. ph/10 d
0.7 c	$\frac{4}{10}$ c		$\frac{6}{10}$ I	2 0		$\frac{10}{10}$ 0	1.5 0	$\frac{14}{10}$ 0	1 0	1 0		$\frac{6}{10}$ I	$\frac{6}{10}$ 0	$\frac{6}{10}$ tr	$\frac{6}{10}$ 0	$\frac{6}{10}$ 0	
0.5 c	$\frac{2}{10}$ c		p c	1 0		$\frac{5}{10}$ 0	0.5 0	$\frac{7}{10}$ 0	$\frac{5}{10}$ 0	$\frac{5}{10}$ 0		$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ c	$\frac{2}{10}$ p c	
0.25 c	$\frac{1}{10}$ c		p c			$\frac{1}{10}$ 0	0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0		$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	
$\frac{1}{10}$ tr	$\frac{1}{20}$ 0		c c			$\frac{1}{20}$ 0	0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0		$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	
$\frac{1}{20}$ 0			c c									tr	peu	tr	tr	tr	
			c c									0	0	0	0	0	
			peu									$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{80}$ peu	
			0									$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	

Témoins: M fr. $\frac{1}{10}$ 0
 $\frac{6}{10}$ 0
 $\frac{12}{10}$ 0
E fr. $\frac{4}{10}$ 0
 $\frac{8}{10}$ 0
M ch. $\frac{5}{10}$ 0
 $\frac{12}{10}$ 0
E ch. $\frac{10}{10}$ 0
 $\frac{16}{10}$ 0

Nous pouvons donc admettre que, dans certains cas du moins, le M de poule, chauffé isolément ou dans le complément entier, ne perd qu'en partie son activité hémolytique par le séjour d'une $\frac{1}{2}$ h. à la température de 56°.

Pour nous faire une idée plus complète de cette conservation, nous avons deux fois poussé le chauffage jusqu'à la température de 60°²⁾; une fois, nous avons constaté une destruction complète, l'autre fois, nous avons encore trouvé des traces assez notables de M.

Nous devons faire remarquer que cette résistance du M de poule à la chaleur n'est pas un phénomène commun à tous les sérums. Car, à côté des expériences citées plus haut, nous

1) C'est la plus faible dilution à laquelle nous avons l'E après l'avoir ramené à concentr. physiol. au moyen de l'eau salée à 16‰ (3 parties de cette eau pour 4 parties d'E D/4).

2) A cette température, il se produit dans le sérum de poule un trouble floconneux se déposant rapidement.

avons eu des cas, notamment 3 sur 7, où il suffisait de chauffer une demi-heure à 56° pour ne plus retrouver trace ni de M ni d'E, quelle que fût la méthode employée; à noter que chaque fois la recherche complémentaire fut faite pour nous assurer qu'il ne s'agissait pas d'action empêchante.

En résumé, le M de poule jouit, dans la plupart des cas, d'une certaine thermorésistance. Alors que l'E a disparu par un chauffage d'une demi-heure à 56°, le M n'a, de ce fait, que faiblement perdu de son pouvoir hémolytique; cette perte s'accroît avec la température pour devenir quasi totale à 60°.

c) Porc.

Nous avons commencé par faire plusieurs essais de séparation en diluant cette alexine au $\frac{1}{5}$ et au $\frac{1}{10}$. Comme dans la plupart des divisions au $\frac{1}{5}$ nous avons obtenu des traces d'hémolyse dans les fortes doses témoins d'E, nous avons adopté la méthode au $\frac{1}{10}$. Le trouble obtenu à cette dilution n'est jamais très intense.

Prenons aussitôt un exemple avec essai de reconstitution et de substitution.

Tableau XIII.

Dosage du complément	Reconstitution et substitution					
	Serie I			Serie II		
	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M c. $\frac{5}{10}$	M d.	E c. 0.25	E c. 0.5
0.5 c	0.5	c	I	0.25	c	c
0.25 c	0.25	p c	I	$\frac{1}{10}$	p c	c
0.1 peu	$\frac{1}{10}$	I	tr	$\frac{1}{20}$	p c	c
	$\frac{1}{20}$	0	0	$\frac{1}{40}$	peu	p c
	$\frac{1}{40}$	0	0	$\frac{1}{80}$	0	I
				$\frac{1}{160}$	0	peu

Témoins: M frais: $\frac{1}{10}$ 0
 $\frac{5}{10}$ 0
 $\frac{10}{10}$ 0
 E frais: 0.25 0
 $\frac{5}{10}$ 0
 $\frac{10}{10}$ 0

Ce tableau nous montre que la reconstitution du sérum de porc est possible, aussi bien que celle du complément de cobaye et de poule.

Tous les sérums cependant ne semblent pas se prêter à ces manipulations; car il nous est arrivé 2 fois sur 21 d'avoir un sérum qu'il nous était quasi impossible de reconstituer après séparation¹⁾, et ce fait ne devait pas tenir à un défaut de technique, le résultat restant négatif malgré la diversité des méthodes et des doses comme malgré le renouvellement de l'expérience. Certains sérums auraient-ils donc des constituants doués d'une telle fragilité qu'ils ne résisteraient pas aux divers facteurs intervenant dans la technique d'une séparation au CO²? Ou ne faudrait-il pas plutôt admettre une altération particulièrement rapide et intense de certains M de sorte que, présentant à un haut degré la propriété empêchante, ils masqueraient partout l'activité hémolytique? Nous reviendrons sur la question à propos du complément humain et faisons suivre un exemple de ces reconstitutions difficiles.

Tableau XIV.

Dos. du complément	Essai de reconstitution				
	Série I		Série II		
	M de.	E c. $\frac{5}{10}$	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M c. $\frac{5}{10}$
0.6 c	$\frac{6}{10}$	0	$\frac{6}{10}$	I	0
0.4 c	$\frac{4}{10}$	0	$\frac{4}{10}$?	0
0.2 I	$\frac{2}{10}$	0	$\frac{2}{10}$	0	0
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$	0	$\frac{1}{10}$	0	0
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{20}$	0	0
	$\frac{1}{40}$	0	$\frac{1}{40}$	0	0
	$\frac{1}{80}$	0	$\frac{1}{80}$	0	0
	$\frac{1}{160}$	0			
	$\frac{1}{320}$	0			
	Témoins: M $\frac{5}{10}$ 0		E $\frac{5}{10}$ 0		
		1 0		1 0	

En ce qui concerne la substitution réciproque et le dosage comparatif des deux constituants, nous devons faire ici pour presque tous les sérums les mêmes restrictions que nous avons faites plus haut pour quelques sérums de poule. Car s'il est possible, en augmentant les doses d'E, de diminuer la dose

1) Nous avons, une seule fois sur 16, observé le même phénomène pour le sérum de poule; très active avant la séparation, cette alexine ne donnait plus trace d'hémolyse après reconstitution avec ses deux éléments frais.

limite de M, on peut rarement dépasser comme constante de M la quantité limite du complément total; le M de porc présente en effet très souvent des propriétés empêchantes, dès qu'il est dilué dans de l'eau physiologique au $\frac{1}{10}$. Ce fait ressort déjà du tableau XIII; il est beaucoup plus net dans l'expérience suivante.

Tableau XV.

Dos. du complément	Essai de substitution					
	Série I			Série II		
	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M c. $\frac{5}{10}$	M d.	E c. 0.25	E c. $\frac{5}{10}$
0.5 c	0.5	p c	I	0.5	0	
0.25 p c	0.25	tr	0	0.25	0	I
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$	0	0	$\frac{1}{10}$	0	p c
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$	0	0	$\frac{1}{20}$	tr	c
	$\frac{1}{40}$	0	0	$\frac{1}{40}$	c	c
				$\frac{1}{80}$	c	c
				$\frac{1}{160}$	I	c
				$\frac{1}{320}$	0	peu
				$\frac{1}{640}$	0	0
	Témoins: M $\frac{1}{10}$ 0			E 0.25 0		
	$\frac{5}{10}$ 0			$\frac{5}{10}$ 0		
	1 0			1 0		

Comme on le voit dans cette recherche, l'action inhibante du M est tellement intense que sa plus petite constante ($\frac{1}{10}$) empêche même la reconstitution avec une très forte quantité d'E frais ($\frac{5}{10}$). Thomsen et Leschly ont également étudié le sérum de porc et arrivent à la conclusion que le M n'acquiert des propriétés empêchantes qu'après un séjour relativement long dans l'eau physiologique; nous faisons remarquer que ces auteurs n'ont recherché l'action inhibante que vis-à-vis de l'E frais de cobaye.

Si nous soumettons à présent le complément de porc au chauffage, nous obtenons, le plus souvent, une destruction complète de l'activité des deux constituants maintenus, soit isolés soit dans le complément total, durant une demi-heure à 55°. Nous croyons inutile de donner un exemple de ces recherches, puisqu'elles ont été faites sur un modèle déjà connu; nous tenons cependant à remarquer qu'il s'agit d'une réelle destruction puisque dans des recherches contrôles nous

avons, comme plus haut, exclus les causes possibles d'erreur. Ces recherches contrôles sont, nous le répétons, absolument indispensables. C'est grâce à elles que nous avons découvert 2 cas sur 10 où le M du Ct ch. persistait dans celui-ci en faible quantité; la méthode de la division du Ct ch. avec dosage de ses deux éléments isolés nous aurait, à elle seule, conduit à un résultat négatif. A cause de l'intérêt spécial que présentent ces 2 cas, nous faisons suivre en détail l'un d'entre eux; il s'agit d'un complément chauffé comme tel durant une demi-heure à 56°.

Tableau XVI.

Dos. du Ct fr.		Avant chauffage								Après chauffage								
		Dos. du Ct vis-à-vis				Dos. des Const's				Dos. Ct vis-à-vis				Dos. des Const's				
		du M		de l'E		de l'E		du M		du M		de l'E		de l'E		du M		
		Ct d.	M c. $\frac{1}{10}$	Ct d.	E c. $\frac{5}{10}$	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M d.	E c. $\frac{5}{10}$	Dos. du Ct ch.	Ct ch. d.	M fr. c. $\frac{1}{10}$	Ct ch. d.	E fr. c. $\frac{5}{10}$	E Ct ch. d.	M fr. c. $\frac{1}{10}$	M Ct ch. d.	E fr. c. $\frac{5}{10}$
0.4	c	0.8	c	0.8	c	0.8	c	0.8	I	30	0.8	0	0.8	c	1	0	0.8	0
0.3	c	0.6	c	0.6	c	0.6	c	0.4	I	20	0.6	0	0.4	c	0.6	0	0.6	0
0.2	c	0.4	c	0.4	c	0.4	I	0.2	I	10	0.4	0	0.2	c	0.4	0	0.4	0
$\frac{1}{10}$	tr	0.2	c	0.1	c	0.2	?	0.1	p c		0.2	0	$\frac{1}{10}$	peu	0.2	0	0.2	0
$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{10}$	I	$\frac{1}{20}$	c	$\frac{1}{10}$	0	$\frac{1}{20}$	c		$\frac{1}{10}$	0	$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{10}$	0	0.1	0
		$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{40}$	c	$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{40}$	c		$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{40}$	0	$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{20}$	0
				$\frac{1}{80}$	c			$\frac{1}{80}$	p c				0				$\frac{1}{40}$	0
				$\frac{1}{160}$	c			$\frac{1}{160}$	I				0				$\frac{1}{80}$	0
				$\frac{1}{320}$	I			$\frac{1}{320}$	peu				0				$\frac{1}{160}$	0

Témoins: M $\frac{1}{10}$ 0 E 1 0
 $\frac{5}{10}$ 0 1.6 0
 1 0

Recherche contrôle.

Ct c. 0.3	M Ct ch. d.		Ct ch. d.	
	avec cont.	sans cont.	avec cont.	sans cont.
	0.8 c	0.8 c	0.8 c	0.8 c
	0.6 c	0.6 c	0.6 c	0.6 c
	0.4 c	0.4 c	0.4 c	0.4 c
	0.2 c	0.2 c	0.2 c	0.2 c
	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c

Résumant nos expériences de chauffage concernant le sérum de porc, nous concluons qu'il faut admettre la thermolabilité des deux constituants sauf de rares cas où le chauffage d'une demi-heure à 56° laisse persister encore une faible quantité de M; dans ces cas, le M du Ct ch. semble avoir acquis une fragilité particulière.

d) Chien.

Quoique Tsurusaki¹⁾ n'ait pas réussi à diviser ce complément sans le voir dépouillé de son activité, nous n'avons guère rencontré de difficultés par la méthode au CO² dans une dilution au 10^e; il faut préférer cette dilution à celle au 5^e, car en opposition avec celle-ci — où les E contrôles donnent souvent un peu d'hémolyse — elle ne présente jamais trace de dissolution dans les tubes témoins.

Prenons aussitôt un exemple au hasard avec essai de substitution :

Tableau XVII.

Dos. du complément	Essai de reconstitution et de substitution					
	Série I			Série II		
	E d.	M c. ² / ₁₀	M c. ³ / ₁₀	M d.	E c. ² / ₁₀	E c. ³ / ₁₀
⁴ / ₁₀ c	⁴ / ₁₀	c	I	¹ / ₂₀	c	c
⁸ / ₁₀ c	² / ₁₀	c	I	¹ / ₄₀	c	c
² / ₁₀ c	¹ / ₁₀	tr	O	¹ / ₈₀	c	c
¹ / ₁₀ p c	¹ / ₃₀	O	O	¹ / ₁₆₀	c	c
¹ / ₂₀ tr	¹ / ₄₀	O	O	¹ / ₃₂₀	I	p c
¹ / ₄₀ O				¹ / ₆₄₀	O	O
	Témoins: M ² / ₁₀ O			E ² / ₁₀ O		
		⁶ / ₁₀ O		⁴ / ₁₀ O		
				¹ / ₁₀ O		

A voir ce tableau, on constate nettement la possibilité de reconstitution. On remarque aussi que la loi de substitution est observée pour l'E puisqu'on peut notablement réduire

1) Tsurusaki, Biochem. Zeitschr., Bd. 10, 1908, Heft 4 u. 6.

le M quand la constante d'E ne dépasse que légèrement la dose limite du complément. Quant au M, on dirait qu'il n'en est pas de même, puisqu'en augmentant ses constantes on ne parvient pas à diminuer l'E, au contraire; ce fait est dû — comme le montrèrent nos recherches complémentaires — à l'action empêchante du M frais. Celle-ci n'est pas mise en évidence dans les doses décroissantes de M parce que la dose la plus forte de cette colonne ne dépasse pas $\frac{1}{20}$.

Tsurusaki, pour expliquer ses insuccès, admet la présence d'un ferment destructeur. Ne pourrait-on pas incriminer l'action inhibante, surtout que cet auteur travaillait par dialyse?

Pour ne pas laisser de doute persister, d'une part au sujet de la possibilité de substitution réciproque — substitution que nous avons toujours trouvée particulièrement intense pour l'alexine de chien, en ce qui concerne la diminution des doses de M — d'autre part au sujet de la réalité de l'action empêchante de certains M frais, nous croyons superflu d'exposer de nouveaux tableaux. Qu'il nous suffise d'affirmer que nous avons eu plusieurs cas où l'absence complète d'action empêchante révélait clairement la substitution et plusieurs autres où le M frais présentait nettement le phénomène de l'inhibition.

La question du chauffage fut traitée comme toujours; nous n'avons cependant, comme pour le sérum précédent, examiné la question qu'à la temp. de 56° . Sur 9 expériences nous avons eu un cas où, grâce au procédé des doses décroissantes de Ct ch., nous sommes parvenu à mettre en évidence la persistance d'un peu de M dans le complément chauffé.

Les 8 autres fois nous n'avons plus jamais par aucune des méthodes trouvé ni M ni E après chauffage; l'expérience contrôle n'a cependant pas été négligée, nous montrant qu'il ne s'agissait pas de propriétés inhibantes.

Voici l'unique cas où nous avons eu la persistance d'un peu de M à 56° .

Tableau XVIII.

Avant chauffage								Après chauffage									
Dosage du Compl ^t				Dos. des Const ^{ts}				Dos. du Compl ^t				Dos. des Const ^{ts}					
isolément	vis-à-vis				du M		de l'E		isolément	vis-à-vis				du M		de l'E	
	de l'E		du M		M d.	E c. ³ / ₁₀	E d.	M c. ¹ / ₁₀		de l'E		du M		M Ct ch. d.	E fr. c. ³ / ₁₀	E Ct ch. d.	M fr. c. ¹ / ₁₀
	C ^t d.	E c. ³ / ₁₀	C ^t d.	M c. ¹ / ₁₀						C ^t ch. d.	E fr. c. ³ / ₁₀	C ^t ch. d.	M fr. c. ¹ / ₁₀				
0.4 c	⁶ / ₁₀	c	⁶ / ₁₀	c	⁶ / ₁₀	c	⁶ / ₁₀	c	20	⁶ / ₁₀	c	⁶ / ₁₀	0	⁶ / ₁₀	tr	⁸ / ₁₀	0
0.3 c	⁴ / ₁₀	c	⁴ / ₁₀	c	⁴ / ₁₀	c	⁴ / ₁₀	c	10	⁴ / ₁₀	c	⁴ / ₁₀	0	⁴ / ₁₀	?	⁴ / ₁₀	0
0.2 c	² / ₁₀	c	² / ₁₀	c	² / ₁₀	c	² / ₁₀	c		² / ₁₀	p c	² / ₁₀	0	² / ₁₀	0	² / ₁₀	0
¹ / ₁₀ I	¹ / ₁₀	c	¹ / ₁₀	c	¹ / ₁₀	c	¹ / ₁₀	c		¹ / ₁₀	I	¹ / ₁₀	0	¹ / ₁₀	0	¹ / ₁₀	0
¹ / ₃₀ O	¹ / ₂₀	c	¹ / ₃₀	bon I	¹ / ₂₀	c	¹ / ₂₀	c		¹ / ₂₀	O	¹ / ₂₀	0	¹ / ₂₀	0	¹ / ₂₀	0
	¹ / ₄₀	c	¹ / ₄₀	?	¹ / ₄₀	c	¹ / ₄₀	c		¹ / ₄₀	O	¹ / ₄₀	0	¹ / ₄₀	0	¹ / ₄₀	0
	¹ / ₈₀	c	¹ / ₈₀	O	¹ / ₈₀	c	¹ / ₈₀	c		¹ / ₈₀	O	¹ / ₈₀	0	¹ / ₈₀	0	¹ / ₈₀	0
	¹ / ₁₆₀	c	¹ / ₁₆₀	O	¹ / ₁₆₀	c	¹ / ₁₆₀	c		¹ / ₁₆₀	O	¹ / ₁₆₀	0	¹ / ₁₆₀	0	¹ / ₁₆₀	0
	¹ / ₃₂₀	c	¹ / ₃₂₀	O	¹ / ₃₂₀	c	¹ / ₃₂₀	c		¹ / ₃₂₀	O	¹ / ₃₂₀	0	¹ / ₃₂₀	0	¹ / ₃₂₀	0

Témoins: M fr. ¹/₁₀ 0
⁶/₁₀ 0
1.2 0
E fr. ³/₁₀ 0
⁶/₁₀ 0
1.2 0

M Ct ch. ⁶/₁₀ 0
1.2 0
E Ct ch. ⁶/₁₀ 0
1.6 0

Nous pouvons donc, au point de vue de la résistance à la chaleur, comparer l'alexine de chien à celle de porc: sauf de très rares cas, où le M persiste à l'état de traces dans le complément chauffé, on peut considérer les deux constituants du complément de chien comme réellement thermolabiles à 56°.

e) Homme.

Nous avons essayé à plusieurs reprises la division de ce sérum au 10^e. Nous y avons réussi, sans grande difficulté, pour 3 alexines sur 7: dans ce sens que les quatre autres semblaient devenues plus ou moins inactives du moment qu'elles avaient été soumises à la division en leurs deux éléments. Il y aurait donc un pourcentage énorme de compléments humains qui présenteraient le même phénomène de reconstitution difficile déjà signalé plus haut pour un seul sérum de poule sur 16 et 2 alexines de porc sur 21.

Generated on 2019-01-12 23:59 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uc1.b3208392 Public Domain in the United States; Google-digitized / http://www.hathitrust.org/access_use#pd-us-google

Le fait nous semble assez intéressant pour mériter à lui seul une étude approfondie. Nous ne nous sommes pas attardé spécialement à cette question; toutefois nous avons observé dans certaines de ces reconstitutions malaisées que parmi les doses décroissantes de M l'un ou l'autre des tubes renfermant une dose minime de ce constituant donnait plus ou moins de dissolution et qu'il en fut de même pour la petite constante de M vis-à-vis de la dose la plus élevée d'E. Ré-examinant alors nos expériences analogues sur porc nous avons de temps à autre retrouvé là-bas (voir p. ex. tableau XIV) un tube donnant également plus ou moins d'hémolyse, notamment celui qui renfermait pour la plus petite constante de M la dose la plus forte d'E. Peut-être s'accorderait le mieux avec ces faits l'hypothèse d'une rapide formation de facteurs inhibants (vis-à-vis de l'E du même sérum) dans la solution de M au 10^e dans de l'eau physiologique. Thomsen et Leschly qui ont travaillé le sérum humain au point de vue de la modification de Brand de sa partie globuline, concluent à cette rapidité particulière d'altération; toutefois, ils ne recherchent l'action empêchante que vis-à-vis de l'E frais de cobaye.

Voici une de ces expériences qui nous ont fait incliner vers l'hypothèse énoncée.

Tableau XIX.

Dosage du Complt	Essai de reconstitution			
	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M d.	E c. $\frac{3}{10}$
0.5 c	$\frac{6}{10}$	p c	$\frac{4}{10}$	0
0.25 c	$\frac{4}{10}$	0	$\frac{2}{10}$	0
$\frac{1}{10}$ I	$\frac{2}{10}$	0	$\frac{1}{10}$	0
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{10}$	0	$\frac{1}{20}$	0
$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{20}$	0	$\frac{1}{40}$	0
	$\frac{1}{40}$	0	$\frac{1}{80}$	0
	$\frac{1}{80}$	0	$\frac{1}{160}$	I
	$\frac{1}{160}$	0	$\frac{1}{320}$	p c
	Témoins: M $\frac{1}{10}$ 0		E $\frac{3}{10}$ 0	
	$\frac{4}{10}$ 0		$\frac{6}{10}$ 0	
	1 0		1.5 0	

Il aurait suffi que nous ayons négligé dans cette recherche de faire les tubes extrêmes ou encore — dans notre hypothèse — que le M ait présenté des propriétés inhibantes un

peu plus marquées pour que le résultat eût été négatif sur toute la ligne.

Une chose en tous cas intéressante à noter est ce fait que la différence, que présentent les divers compléments vis-à-vis d'une division au CO², tient non pas à la technique elle-même mais bien aux caractères particuliers des sérums; en effet, le sang d'un même individu, prélevé à des moments différents, montre toujours vis-à-vis de la reconstitution soit la même facilité soit la même difficulté. C'est notamment pour cette raison que nous avons dû nous borner, pour faire nos recherches ultérieures, au sérum des trois personnes qui se prêtait à la reconstitution.

Nous donnons un exemple de bonne reconstitution où l'on constate que les règles de la substitution sont applicables, tant pour l'E que pour le M, à l'alexine humaine comme à tous les autres compléments.

Tableau XX.

Dosage du Compl.	Substitution et reconstitution				
	Série I			Série II	
	E d.	M c. $\frac{1}{40}$	M c. $\frac{1}{10}$	M d.	E c. $\frac{3}{10}$
0.5 c	$\frac{4}{10}$	c	c	$\frac{4}{10}$	c
0.25 c	$\frac{2}{10}$	c	c	$\frac{1}{10}$	c
$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$	p c	c	$\frac{1}{20}$	c
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$	peu	c	$\frac{1}{40}$	c
$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$?	bon I	$\frac{1}{80}$	c
	$\frac{1}{80}$	0	?	$\frac{1}{160}$	p c
	$\frac{1}{160}$	0	0	$\frac{1}{320}$	I
	$\frac{1}{320}$	0	0	$\frac{1}{640}$	0
	Témoins: M $\frac{1}{40}$ 0		E $\frac{3}{10}$ 0		
		$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{6}{10}$ 0		
		1 0	1 $\frac{1}{10}$ 0		

Examinons à présent l'influence de la chaleur. Pour ne pas verser dans la cause d'erreur que constituerait la possible rapidité d'altération du M chauffé, à l'instar de celle de beaucoup de M frais, nous avons toujours travaillé avec les deux méthodes expliquées plus haut, tout en faisant l'expérience contrôle pour dépister les actions empêchantes. Les résultats ont été constants en ce sens que nous n'avons plus jamais

retrouvé trace ni d'E ni de M après un chauffage — quelle qu'en fût la manière — d'une $\frac{1}{2}$ heure à 56°.

Nous pouvons donc admettre pour le complément humain la thermolabilité de ses deux constituants.

Si nous résumons, avant d'entamer la 2^e partie, l'action de la chaleur sur les divers compléments examinés:

Il suffit d'un chauffage d'un demi-heure à 56° pour détruire l'action hémolytique des alexines de cobaye, poule, porc, chien et homme.

Chez toutes, la destruction de l'E est complète.

Quant au M, il existe une légère différence entre ces diverses alexines:

on ne le retrouve plus pour sérum de cobaye ni pour sérum humain;

on le retrouve parfois, quoiqu'en faible quantité, pour sérum de porc et pour sérum de chien;

il présente une résistance particulière dans le sérum de poule où il ne perd que faiblement de son activité hémolytique.

Deuxième Partie: Influence du temps.

A notre connaissance, peu d'auteurs ont étudié l'altération que subit, au point de vue de ses deux éléments, le complément sous l'influence du temps. Il ne nous semble pourtant pas dépourvu d'intérêt de savoir si la perte d'activité que subit l'alexine vieille lui vient de la perte de celle de son E ou de son M.

Historique: En 1911, Mutermilch¹⁾ examine la dissociation des vieux sérums de cobaye. Ayant conservé, à température ordinaire comme à la glacière, du sérum comme tel durant 17 à 140 jours, il constate à un moment donné par un dosage préalable la disparition du pouvoir hémolytique; il sépare alors, soit par la dialyse, soit par la méthode au CO² et met en présence des morceaux vieux ainsi obtenus les deux autres morceaux frais d'un nouveau complément. Travaillant avec des rapports quantitatifs constants, l'auteur constate d'ordinaire une persistance de l'E,

1) Mutermilch, C. R. S. de Biol., T. 71, 1911, p. 605.

le M étant détruit ou affaibli: dans plusieurs expériences cependant, il conclut à la conservation des deux éléments puisque le M du Ct vieux donne de l'hémolyse avec un E frais aussi bien que l'E du Ct vieux avec du M frais.

Une brève communication de Liefmann¹⁾ concerne également la question qui nous occupe. L'auteur ne donne aucun détail sur sa façon d'expérimenter mais affirme que, pour le cobaye, d'ordinaire l'E est conservé seul, le M au contraire très rarement; que dans un seul cas seulement il a pu déceler la persistance des deux constituants de l'alexine.

Recherches personnelles: Ayant, grâce à la première partie de ce travail, quelques notions sur les deux éléments de diverses alexines, nous avons étudié, dans cette deuxième partie, comment se comportent ces constituants dans les différents compléments vieilliss.

Technique: En général, nous avons opéré comme suit: après dosage d'un sérum frais, tant au point de vue de son activité totale que de celle de ses M et E, nous conservons ce sérum non dilué à la glacière, parfois en présence du caillot, le plus souvent en son absence²⁾. A certains intervalles, nous redosons le complément (activité totale), en prenant les précautions nécessaires pour ne pas l'infecter. Lorsqu'ainsi nous le trouvons un jour plus ou moins dépourvu d'activité hémolytique, nous le soumettons à la séparation au CO²; nous dosons ensuite l'activité de ses constituants vis-à-vis d'un constante de l'autre élément frais obtenu par séparation d'un nouveau sérum: cette constante est identique pour autant que possible, à celle employée lors de l'examen du sérum frais actuellement vieilli. Connaissant, par un dosage, l'activité du nouveau sérum nous avons de cette façon tous les éléments nécessaires pour pouvoir comparer sérum vieilli et sérum frais. Pour ne pas avoir de causes d'erreur, nous avons systématiquement écarté toute alexine présentant ne fût-ce qu'une trace d'infection quelconque.

De même que dans notre étude sur l'influence de la chaleur, nous avons souvent ici eu recours à d'autres méthodes. Ayant notamment déterminé l'activité du complément frais vis-à-vis des constituants, nous avons examiné de même le complément vieilli; nous avons eu soin de nous

1) Liefmann, 5. Tag. d. fr. Verein. f. Mikrob. in Dresden. Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, 1911, p. 151.

2) A ce propos, nous avons fait quelques recherches sur l'influence que peut avoir la présence du caillot sur la conservation de l'alexine de cobaye. Nous avons notamment laissé séjourner à la glacière, durant un temps variable, un même sérum en partie décanté, en partie non séparé de son caillot pour doser à un même moment ces deux portions différemment conservées. Nous avons pu constater, au moins les premiers jours, que la présence du caillot est un facteur favorable à la bonne conservation du pouvoir hémolytique.

mettre à l'abri de certaines objections déjà vues; à l'occasion, nous avons dépisté l'existence ou non d'actions empêchantes.

Remarquons en passant que Mutermilch n'a suivi qu'une seule et même technique; qu'il ne travaille qu'avec des rapports quantitatifs constants; qu'il ne fait pas de dosage comparatif entre sérum vieilli et sérum frais; qu'il ne tient pas compte des lois de la substitution; que ses expériences ne sauraient donc être de grande exactitude.

Notons enfin que nous avons examiné nos compléments vieillis à des moments très variables après leur premier dosage; nous avons ainsi plus ou moins pu suivre la marche de leur altération, surtout que parfois nous avons examiné à plusieurs reprises un même sérum dont nous avons une quantité suffisante.

a) Cobaye.

En ce qui concerne le sérum de cet animal, nous avons pu constater dans toutes nos expériences que l'élément le plus vite altéré est réellement le M; l'E se conserve beaucoup plus longtemps, quoiqu'à la longue il perde également et totalement son activité.

Pour donner une idée exacte de notre façon de travailler, nous transcrivons une recherche concernant un sérum conservé depuis 10 jours en l'absence du caillot.

Tableau XXI.

Dosage sérum N ¹⁾				Dosage sérum à examiner									
Dos. des constts				quand frais				quand vieilli = (sér. V)					
de l'E		du M		de l'E		du M		Compt		de l'E		du M	
E d.	M c. 1/10	M d.	E c. 1/10	E d.	M c. 1/10	M d.	E c. 1/10	Dos du Compt	E V d.	M N c. 1/10	M V d.	E N c. 1/10	E N c. 1/10
1/20 c	1/70 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/5 P c	1/20 c	1/5 c	1/5 c	1/5 c	1/5 c
1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/10 I	1/40 c	1/10 c	1/10 c	1/10 c	1/10 c
1/80 tr	1/80 bon I	1/80 c	1/80 c	1/80 peu	1/80 I	1/80 c	1/80 c	1/20 O	1/80 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c
1/180 O	1/160 O	1/160 c	1/160 c	1/180 O	1/180 O	1/180 c	1/180 c	1/40 O	1/160 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c
	1/320 O	1/320 P c		1/320 O	1/320 O	1/320 I			1/320 O	1/320 c	1/320 c	1/320 c	1/320 c
Témoins: M frais: 1/10 0				M N 1/5 0				M V 2/5 0					
E frais: 1/5 0				E N 1/5 0				E V 1/5 0					
				1/10 0				1/5 0					

1) Sérum N c. à d. nouveau = sérum dont M et E servent de constantes le jour du dosage du sérum vieilli.

Il s'agit donc ici d'un sérum vieilli ayant beaucoup perdu de son activité; en effet $\frac{1}{5}$ de sérum V ne donne que p. c. alors que $\frac{1}{40}$ du même sérum frais donnait le beau c. Or, quand on examine le dosage des constituants de ce sérum, on constate que l'E n'a subi aucune altération alors que le M, jadis actif à $\frac{1}{160}$, ne donne plus de c qu'à la dose de $\frac{1}{5}$. A noter que le complément N et le complément frais se valent au point de vue activité; de ce chef, il ne faut donc craindre aucune erreur.

Nous devons donc attribuer la perte d'activité du sérum V à celle seule de son M.

Inutile sans doute de donner la recherche éliminant les actions inhibantes; nous les avons faites ici de la même façon que plus haut. Du reste, l'examen du tableau lui-même suffit à écarter cette ancienne objection¹⁾.

Dans l'expérience citée, nous n'avons eu recours qu'à une de nos méthodes. L'on pourrait donc encore soulever, comme plus haut, l'objection d'une acquisition de fragilité particulière par l'élément qui semble disparu. Il nous a suffi, pour éliminer cette hypothèse, d'ajouter à des constantes d'éléments du Ct N des doses décroissantes de Ct V. Cette recherche comparée à celle faite antérieurement avec des doses décroissantes du Ct fr. (maintenant V) nous a conduit au résultat suivant: réduction minime de l'hémolyse dans la série des constantes de M, diminution touchant à la disparition dans celle des constantes d'E.

Evidemment, toutes ces expériences, en tant que comparatives, ne sauraient être d'une exactitude absolue que dans le cas où l'on disposerait comme points de comparaison de deux compléments absolument identiques. Cependant, elles suffisent amplement à prouver que l'inactivation sous l'influence du temps des sérums de cobaye tient, avant tout, à leur perte en M.

Comme nous l'avons déjà dit, l'E ne persiste pas indéfiniment intact. Il y a beaucoup de cas où on le trouve

1) Nous profitons de l'occasion pour signaler que chez le M du Ct V de cobaye pas plus que chez le M fr. de cet animal, nous n'avons jamais constaté de propriétés empêchantes immédiatement après la séparation.

déjà réduit au bout de huit à quinze jours; il est entendu que dans ces cas le M disparaît particulièrement vite.

Il existe, du reste, au point de vue de leur perte d'activité, des différences notables entre les divers sérums: nous en avons eu qui étaient déjà fortement altérés au bout de quelques jours de glacière, d'autres encore assez bien conservés après plus d'une semaine.

b) Poule.

Nos recherches n'ont eu pour objet que 6 différentes alexines de poule, quant à l'influence du temps sur leur conservation.

Sauf un seul cas où, ayant trop tardé pour faire l'examen (12 jours), nous n'avons plus découvert d'E ni de M, tous ces compléments nous ont fourni comme résultat: une conservation à peu près égale et une perte à peu près parallèle de l'activité des deux constituants avec légère prédominance d'altération du M. Les cinq sérums soumis à l'analyse étaient âgés respectivement de 4, 5, 7, 9 et 10 jours; leur perte d'activité était de 1 à $\frac{3}{4}$ jusqu'à $\frac{1}{5}$.

Nous ne donnerons pas de tableau pour ces recherches; remarquons cependant qu'à l'inverse de ce que nous avons signalé pour le cobaye on retrouve ici chez le M du Ct V l'action inhibante du même M frais.

c) Porc et chien.

La manière dont se comportent vis-à-vis du temps les constituants de ces deux alexines est tout l'opposé de ce que nous avons vu pour les sérums examinés jusqu'ici. L'E, en effet, au lieu de montrer la plus grande résistance, s'altère ici le plus vite et le plus intensément, de sorte que nous avons bien des fois constaté sa disparition dans le Ct V, quand le M n'y avait encore que faiblement perdu. Evidemment le M finit aussi par disparaître et l'examen du sérum nous donne alors un résultat négatif dans tous les tubes; ce moment arrive plus ou moins tard suivant la résistance particulière de chaque sérum: nous avons eu p. ex. des sérums de chien fort peu altérés après une semaine de séjour à la glacière,

d'autres qui en 10 jours avaient presque totalement perdu leur activité hémolytique (il en fut de même pour les sérums de porc).

Nous croyons inutile de détailler sous forme de tableau nos expériences concernant ces deux compléments. Qu'il nous suffît de dire que, comme toujours, nous avons appliqué les deux techniques connues, et que, tant pour sérum de porc que pour sérum de chien, nous avons obtenu comme résultat constant: le M persiste le mieux et le plus longtemps dans ces vieux sérums devenus inactifs.

Au cours de nos recherches, nous avons noté le fait suivant déjà signalé à propos du sérum vieux de poule: le M conserve dans le complément vieilli la propriété d'exercer son action inhibante, aussitôt après la séparation au CO²; certains M même, chez le chien comme chez le porc, nous ont paru plus inhibants dans l'alexine vieille que dans l'alexine fraîche.

d) Homme.

N'ayant que 3 alexines se prêtant bien à la reconstitution, nous n'avons pu étendre nos recherches sur des cas plus nombreux. D'autre part, nous nous sommes limité à la méthode du dosage, vis-à-vis d'éléments N, du Ct V comme tel.

Nous donnons simplement, sans insister d'avantage, les résultats obtenus dans chacune de nos expériences: une fois, pour une alexine vieille de 10 jours, nous avons trouvé une disparition totale des deux constituants, disparition allant de pair avec celle de l'activité du complément non divisé; une autre fois, pour une alexine vieille de 12 jours, le complément ne montrait quasi plus de pouvoir hémolytique, l'E avait disparu, le M se retrouvait à l'état de traces; une dernière fois enfin, pour un complément âgé de 4 jours, la dose limite de l'activité totale avait sauté de $\frac{1}{10}$ à $\frac{6}{10}$, celle de l'E de $\frac{1}{40}$ à $\frac{6}{10}$, celle du M de $\frac{1}{160}$ à $\frac{1}{10}$. Il semble donc, pour autant que ces recherches permettent une conclusion, que dans le sérum humain l'élément le plus altérable sous l'influence du temps est l'E.

Comme résumé de l'influence du temps nous pouvons dire:

le M est l'élément le plus vite altéré en ce qui concerne le sérum de cobaye; l'inverse a lieu pour sérum de porc et de chien, probablement aussi pour sérum humain: l'E en effet est ici le plus altérable;

le sérum de poule occupe une place intermédiaire: l'altération de ses deux constituants marche à peu près de pair, l'E présentant toutefois la plus grande résistance.

Troisième Partie: Influence de l'eau distillée.

Historique: Parmi les diverses manières d'inactiver un complément frais, une des plus curieuses est certes celle opérée par sa dilution dans l'eau distillée.

Deux travaux parus à peu près en même temps, ont appelé, tout d'abord l'attention sur ce phénomène: celui de Ferrata¹⁾ d'une part, le conduisant à la division du complément, celui de Sachs et Teruuchi²⁾ d'autre part étudiant le phénomène de façon plus serrée et l'attribuant à l'action de certaines substances fermentoïdes. Ces auteurs ont étudié les conditions dans lesquelles le phénomène se produit le plus aisément pour sérum de cobaye; de même ils ont établi l'influence qu'il subit de la part de divers facteurs. Sachs et Bolkowska³⁾ reprennent cette étude au point de vue de la façon dont se comportent les deux constituants du complément devenu inactif dans l'eau distillée, point de vue que leurs prédécesseurs avaient négligé; ces auteurs constatent que l'on parvient à rendre à l'alexine inactive son activité perdue en lui ajoutant l'un ou l'autre des constituants frais; la reconstitution de l'alexine altérée serait cependant le mieux réalisable par l'ajoute de l'E frais, rarement par celle du M frais.

Marks⁴⁾ aussitôt croit voir dans ces faits un nouvel argument en faveur de la théorie des complémentaires, surtout qu'il avait cru démontrer, un peu avant, la persistance du M dans le sérum inactivé par la chaleur. L'auteur constate d'abord que le complément de cobaye n'est pas toujours

1) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 13.

2) Sachs und Teruuchi, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 16, p. 467.

3) Sachs und Bolkowska, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910, p. 778.

4) Marks, Studies from the Rockefeller Inst., 1912, p. 654.

complètement inactivé par un séjour de 1 $\frac{1}{4}$ h. à 37° dans 9 fois son volume d'eau distillée; ensuite, ajoutant à des constantes d'E frais des doses décroissantes de M du complément devenu inactif dans l'eau distillée, il arrive à la conclusion que le M n'est en général que peu ou pas altéré. Examinant enfin l'E du complément altéré vis-à-vis d'une dose constante de M frais, il trouve que la fraction albumine, pas plus que l'autre, ne semble avoir subi d'altération.

Guggenheimer¹⁾ constate que la dilution de l'E seule dans l'eau distillée n'a guère d'influence sur sa fonction hémolytique; mais qu'en diluant le M dans le même liquide on obtient, au bout de 1 $\frac{1}{4}$ h. de séjour à 37°, une réduction plus ou moins grande de son activité: cette réduction serait toutefois une espèce de modification de Brand car ce M récupère sa force primitive si avant de lui ajouter de l'E frais on le laisse une heure à 37° en contact avec les globules sensibilisés.

Recherches personnelles: L'étrange altération que subit le sérum de cobaye dans l'eau distillée nous a poussé à faire l'étude de ce même facteur sur les diverses alexines que nous avons déjà travaillées. Pour avoir un criterium, nous avons voulu aussi examiner le phénomène en question chez le complément de cobaye.

Technique: Voici quelques détails sur la méthode suivie: Ayant placé à l'étuve (37°) durant un temps variable (une heure et demie en moyenne) du sérum frais dilué, en partie dans de l'eau distillée en partie dans de l'eau physiologique, nous ramenons une partie de la 1^e dilution à concentration physiologique (par l'ajouté d'eau hypersalée) et soumettons l'autre partie à la séparation au CO². Nous dosons globalement le sérum frais, le sérum étuve physiologique et le sérum étuve eau distillée²⁾; nous séparons ensuite le C^t encore intact et faisons pour celui-ci, comme pour le C^t ét. D, diverses séries d'expériences: tantôt nous dosons les constituants de part et d'autre vis-à-vis des mêmes constantes d'élément frais, tantôt nous tâchons de reconstituer entre eux les deux morceaux du C^t ét. D, tantôt nous dosons les deux compléments en cause vis-à-vis des mêmes constantes d'éléments frais.

Pour sérum de cobaye, nous avons poussé plus loin nos investigations. Nous avons notamment placé dans l'eau D à 37° les deux morceaux du C^t, chacun isolément. Nous avons ensuite étudié la reconstitution de ces morceaux entre eux comme celle avec d'autres éléments frais.

A noter que parfois nous avons fait ces diverses recherches le même jour et avec la même alexine, cela pour permettre un bon rapprochement des résultats obtenus.

1) Guggenheimer, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, Heft 3 und 4, p. 393.

2) Par abréviation: „sér. ét. ph.“ et „sér. ét. D“.

a) Cobaye.

Les dilutions de cette alexine comme celles de ses constituants ont toujours été faites au 10^e; pour ramener à concentration physiologique celles dans l'eau distillée, nous avons usité l'eau salée à 16 pour mille.

Un fait qui nous a frappé dès le début c'est que toutes les alexines ne subissent pas le phénomène avec la même intensité; il y en a même quelques unes, mais leur nombre est faible (nous en avons eu 2 sur 20), qui, malgré un séjour de 2 heures et plus, ne perdent guère de leur activité, tant au point de vue du C^t total qu'à celui des deux constituants.

Quant aux compléments qui s'altèrent, leur altération, comme il est du reste connu, n'est attribuable ni à la dilution ni à la température, puisque notre témoin, soit le C^t dilué dans l'eau physiologique, ne présente que peu ou pas de diminution d'activité. Nous avons également pu observer que l'influence de l'eau distillée ne nécessite pas une température de 37°; certains compléments sont détruits au bout d'une heure de dilution à température ordinaire. Enfin, nous avons voulu nous assurer que l'inactivation, telle que nous l'obtenions, n'était pas un simple phénomène passager; or, l'examen de compléments qui l'avaient subie, fait plusieurs heures après le 1^{er} dosage, nous a montré le caractère durable de cette altération. De plus, ce caractère nous a paru persister malgré l'ajoute au Compl^t inactivé d'une trace d'alexine fraîche, l'idée de régénération du C^t pouvant donc être, à notre avis, éliminée.

Nous n'ignorons pas que beaucoup de recherches signalées dans ce paragraphe ont déjà été entreprises par divers auteurs; nous avons cependant tenu à les exécuter nous-même pour avoir un solide point de repère dans la direction de nos recherches ultérieures.

Quel fut le résultat de nos essais de reconstitution? Voici une recherche concernant l'altération d'une alexine placée globalement, une heure et demie à 37°, dans de l'eau distillée au 10^e.

Tableau XXII.

Avant mise eau D					Après mise eau D									
Dos. du Ct	Dosage des constituants				Dos. du Ct		Reconstitution de ses constituants							
	de l'E		du M		ét. ph.	ét. D	avec const. frais				entre eux			
	E d.	M c. $\frac{1}{10}$	M d.	E c. $\frac{1}{10}$			E Ct ét. D d.	M fr. c. $\frac{1}{10}$	M Ct ét. D d.	E fr. c. $\frac{1}{10}$	E Ct ét. D d.	M Ct ét. c. $\frac{1}{10}$	M Ct ét. D d.	E Ct ét. D c. $\frac{1}{10}$
$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ 0	
$\frac{1}{40}$ p c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{40}$ p c	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ c	$\frac{1}{20}$ I	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	
$\frac{1}{80}$ peu	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{40}$ c	$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ p c	$\frac{1}{40}$ p c	$\frac{1}{40}$ peu	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	
$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{80}$ I	$\frac{1}{80}$ c	$\frac{1}{80}$ c	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{80}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{160}$ 0	
	$\frac{1}{160}$ 0	$\frac{1}{320}$ p c	$\frac{1}{320}$ tr											
Témoins: M fr. $\frac{1}{10}$ 0					M Ct D $\frac{1}{10}$ 0					E Ct D $\frac{1}{10}$ 0				
E fr. $\frac{1}{5}$ 0					E Ct D $\frac{1}{5}$ 0					E Ct D $\frac{1}{5}$ 0				

Dans l'expérience citée, nous constatons nettement que, conformément aux recherches de Sachs et Bolkowska, les deux morceaux du Ct, lui-même totalement inactif, se laissent assez bien reconstituer avec des éléments frais; cette reconstitution est cependant devenue moins aisée, les deux constituants du Ct ét. D et particulièrement le M ayant diminué d'activité.

Quant à la reconstitution entre eux des deux éléments du Ct inactif, nous ne parvenons plus à la faire, quelles que soient les doses employées.

Nous rappelant les résultats de Guggenheimer avec les éléments ét. D, nous nous sommes demandé si l'altération des éléments du Ct ét. D doit être rapprochée de la modification de Brand, au moins en ce qui concerne le M. Nous avons alors ajouté les globules sensibilisés aux constituants du Ct ét. D et laissé le contact se faire à température ordinaire durant une demi-heure environ avant d'y ajouter l'autre élément: le résultat ne changea guère. D'autre part, nous avons recherché la présence éventuelle de propriétés anticomplémentaires c. à d. de propriétés inhibantes vis-à-vis de la dose limite de complément: nous n'avons jamais non plus constaté d'action empêchante de cette façon.

L'expérience résumée plus haut a été refaite un grand nombre de fois, avec des alexines fraîches, avec des alexines âgées de quelques jours et avec d'autres méthodes. Nous avons vu, à chaque reprise, se confirmer les faits suivants: les deux éléments du C^t ét. D ne se laissent plus reconstituer entre eux mais bien avec des éléments frais; toutefois, l'activité du M a notablement diminué, celle de l'E étant d'ordinaire assez bien conservée. Les compléments vieux se comportent de même, avec toutefois une altération plus notable du M.

Comment réagissent maintenant les 2 morceaux isolés, placés chacun à part dans l'eau distillée au 10^e? Voici une exemple typique d'une telle expérience; le séjour à 37° a duré 1½ heure. Faisons remarquer que dans cette recherche nous avons introduit le contrôle suivant: nous avons mis à l'étuve dans de l'eau D au 10^e du M comme tel après avoir ajouté à cette dilution la quantité exacte de sel que le M aurait rencontré dans une dilution au 10^e dans de l'eau distillée du complément lui-même, soit, pour 10 cm³ de M/10, 8 mg de NaCl. Ce contrôle était intéressant à faire puisque dans les phénomènes en question le sel peut être un facteur jouissant d'une haute importance.

Tableau XXIII.

Avant mise eau D				Après mise eau D																		
Dos. du Ct	Dos. des Constit.				Dos. du Ct		Reconstitution des Constituants															
	de l'E		du M		ét. ph.	ét. D	avec morceaux frais					entre eux										
	E d.	M c. 1/10	M d.	E c. 1/10			E fr. c. 1/10	M ét. D d.	M ét. D d.	E ét. D d.	M fr. c. 1/10	E ét. D c. 1/10	M ét. D d.	M ét. D c. 1/10	E ét. D d.	M ét. D c. 1/10						
1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/40 c	1/5 peu	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c	1/20 c
1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/80 p c	1/10 0	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c	1/40 c
1/80 p c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/160 0	1/20 0	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c	1/80 c
1/160 0	1/160 I	1/160 c	1/160 c			1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c	1/160 c
	1/320 ?	1/320 c	1/320 c			1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c	1/320 p c
	1/640 I	1/640 c	1/640 c																			

Témoins: tous les M $\frac{1}{10}$ 0 tous les E $\frac{1}{10}$ 0
 $\frac{1}{5}$ 0 $\frac{1}{5}$ 0

Il ressort de ce tableau, ainsi que de nos trois autres expériences semblables, que placés séparément dans de l'eau distillée, les deux constituants du Ct de cobaye ne subissent guère de diminution de leur activité¹⁾. Ils restent non seulement reconstituables avec l'autre élément frais mais aussi reconstituables entre eux. Le M ayant avec lui la minime quantité de sel qu'il rencontre dans le Ct lui-même semble avoir perdu de son pouvoir hémolytique; nous croyons qu'il s'agit là non d'une réelle destruction mais de formation de faible action inhibante, ce M ajouté en grande masse au Ct frais ayant la propriété de réduire l'activité de celui-ci.

Tableau XXIV (suite du tableau XXIII).

Ct fr. d.	M fr. c. $\frac{1}{10}$	M ét. D c. $\frac{1}{10}$	M ét. D + Sel c. $\frac{1}{10}$
$\frac{1}{40}$	c	c	?
$\frac{1}{80}$	c	c	0
$\frac{1}{160}$	I	peu	0

Comparant à présent la différence de réaction que présentent vis-à-vis de l'eau distillée les deux éléments, soit combinés dans le complément soit isolés, nous croyons pouvoir admettre comme interprétation de l'étrange phénomène de l'altération du complément dans l'eau distillée non pas une destruction ni une acquisition de pouvoir anticomplémentaire ou de fragilité spéciale mais une perte d'affinité entre les 2 morceaux se trouvant en présence.

b) Poule.

Pour tous les sérums qui suivent nous avons, comme déjà dit, limité nos recherches à l'influence de l'eau distillée sur le complément comme tel, non séparé.

En ce qui concerne le sérum de poule, nous avons, à cause de sa division malaisée au $\frac{1}{10}$, commencé par rechercher comment il se comporte dans l'eau distillée non seulement à la dilution de $\frac{1}{10}$ mais aussi à des dilutions moins fortes.

1) Quelquefois aussi, conformément aux recherches de Guggenheimer, nous avons constaté une légère réduction du M ét. D; nous n'avons pas étudié la nature de cette diminution.

Or, nous avons constaté qu'il s'inactive le mieux dans une dilution au 10^e quoiqu'à $\frac{1}{3}$ il subisse déjà partiellement le phénomène; nous devons toutefois remarquer que le témoin, c. à. d. le sérum dilué dans l'eau physiologique, particulièrement à $\frac{1}{3}$, diminue également, quoique moins, d'activité.

Nous avons une dizaine de fois exécuté une recherche complète où nous avons mis environ 2 heures à 37° et du Ct comme tel et du Ct D/3 comme D/10 et du Ct ph./3 comme ph./10. Evidemment la séparation du Ct et D/10 a forcément du être fait au 10^e. Comme résultat nous avons pu formuler: l'altération de l'alexine de poule dans l'eau distillée est attribuable à une réduction de l'E. C'est ce qui nous semble expliquer pourquoi la division au 10^e du sérum et D/10 ne présente guère de difficultés: les portions d'E entraînées éventuellement par le précipité sont dépourvues d'action hémolytique.

Nous avons aussi travaillé plusieurs fois avec la méthode des doses décroissantes de Ct altéré; alors aussi nous avons constaté que la perte d'activité de l'alexine, perte plus ou moins complète suivant le sérum en cause, doit être attribuée à la destruction de l'E.

c) Porc.

Après plusieurs essais d'inactivation au 10^e dans l'eau distillée, où nous n'avons pu obtenir malgré la durée prolongée du séjour à 37° (2 à 3 heures) aucune diminution d'activité, nous avons repris cette recherche pour des dilutions plus fortes et plus faibles. Or, alors aussi nous avons constaté que l'alexine de porc restait intacte sous l'influence de l'eau distillée ou du moins ne perdait quasi rien de son activité; bien des fois au contraire, nous avons constaté ce fait étrange que l'activité se montrait légèrement accrue.

Voici, notamment, un exemple de ces dosages:

Tableau XXV.

Avant mise à 37°	Après mise à 37°				
	D/5 1 h.	D/10 1 h.	D/5 2 h.	D/10 3 h.	ph/10 3 h.
0.7 c	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
0.5 c	0.5 c	0.5 c	0.5 c	0.5 c	0.5 c
0.25 p c	0.25 c	0.25 bon I	0.25 c	0.25 c	0.25 p c
$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ tr	$\frac{1}{10}$ 0	$\frac{1}{10}$ I	$\frac{1}{10}$ peu	$\frac{1}{10}$ 0
$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ 0

Cette conservation de l'activité ne concerne pas seulement le complément total mais aussi ses deux constituants, ainsi qu'il résulte d'un dosage de ceux-ci, fait vis-à-vis des mêmes constantes d'éléments frais, avant et après la mise de l'alexine dans l'eau distillée.

La première chose à laquelle nous avons songé est la possibilité d'une absence, dans le sérum de porc, de ce ferment spécial dont parlent Sachs et Teruuchi et qui, plus ou moins concentré suivant les divers compléments, n'entrerait en action qu'à une certaine dilution dans l'eau distillée. Nous avons alors tâché d'obtenir l'inactivation du sérum en cause en lui ajoutant une trace de complément de cobaye; seulement, cette ajoute ne change rien au résultat obtenu, une recherche témoin nous prouvant cependant que le sérum de cobaye utilisé dans l'expérience présente à un haut degré le phénomène d'altération. Voici un exemple de ces recherches; tous les mélanges ont été placés 1 $\frac{1}{2}$ h. à 37°.

Tableau XXVI.

Avant		Après			
porc frais	cob. frais	sérum porc ét. D/10	id + sér. cob. (1/10 pour 2.5)	sérum porc ét. ph./10 + sér. cob. (1/10 pour 2.5)	sérum cob. D/10
0.5 c	1/80 c	0.25 c	0.25 c	1/10 c	2/10 0
0.25 c	1/160 tr	1/10 P c	1/10 c	1/20 tr	1/10 0
1/10 tr	1/320 0		1/20 I	1/40 0	1/20 0
					1/40 0

Ensuite, le sérum de porc renfermant assez bien d'hémolysines naturelles, nous nous sommes rappelé la remarque faite par Sachs et Teruuchi: de grandes quantités d'ambocepteur semblent protéger le Ct contre son altération dans l'eau distillée.

Nous avons donc commencé par doser du sérum de porc frais et du sérum ét D, avec comme sans ambocepteur artificiel. Nous avons pu constater, non seulement la richesse du sérum de porc en hémolysines naturelles mais surtout ces faits étranges non encore signalés à notre connaissance: la dose limite du complément frais pour globules de mouton est plus petite quand on opère sans hémolysine de lapin qu'avec celle-ci; cette différence ne persiste plus quand le Ct a été dans

l'eau distillée, car alors celui-ci est plus actif avec que sans ambocepteur artificiel. Quant au complément enfin ayant été dans l'eau physiologique à l'étuve, il ne présente plus de différence avec et sans hémolysine.

A preuve de ces faits, les exemples suivants :

Tableau XXVII.

Complément I						Complément II					
Avant		Après (1½ h.)				Avant		Après (2 h.)			
+ Hémolysine	sans Hémolysine	Ct ét. D/10		Ct ét. ph./10		+ H.	sans H.	Ct ét. D/10		Ct ét. ph./10	
		+ H.	sans H.	+ H.	sans H.			+ H.	sans H.	+ H.	sans H.
0.5 c	0.5 c	0.5 c	0.5 c	0.25 c	0.25 c	1 c	0.25 c	0.25 c	0.5 c	0.25 c	0.25 c
0.25 c	0.25 c	0.25 c	0.25 c	1/10 I	1/10 I	0.5 c	1/10 c	1/10 bon I	0.25 I	0.1 tr	1/10 tr
1/10 I	1/10 c	1/10 c	1/10 ?	1/20 0	1/20 0	0.25 p c	1/20 0	1/20 0	1/10 0	1/20 0	
1/20 0	1/20 tr	1/20 0	1/20 0			1/10 0			1/20 0		
	1/40 0					1/20 0					

Nous ne croyons pas pourtant qu'il faille attribuer à la présence des hémolysines naturelles la non-inactivation dans l'eau distillée de l'alexine de porc et cela notamment pour les deux raisons suivantes: le sérum de poule qui renferme également assez bien d'hémolysines naturelles¹⁾ subit nettement le phénomène d'altération (il en est de même, comme nous le verrons plus loin, pour le sérum de chien); le sérum de cobaye, malgré l'ajoute d'une quantité d'ambocepteur artificiel égale et supérieure même à celle des naturels chez le porc, ne varie pas d'altérabilité ainsi que le prouve l'expérience suivante:

1) Nous avons plusieurs fois dosé cette alexine avec et sans ambocepteur; voici deux exemples de ces dosages:

Ct I		Ct II	
+ H.	sans H.	+ H.	sans H.
0.5 c	1 c	0.5 c	1 c
0.25 c	0.5 ?	0.25 c	0.75 p c
1/10 0	0.25 0	1/10 tr	0.5 ?
			0.25 0

Comme on le voit, le sérum de poule est assez riche en hémolysines naturelles; par contre, celui de cobaye n'en renferme guère.

Tableau XXVIII.

Dos. sérum frais	Dos. Ct ét. D/10	Dos. Ct ét. D/10 + H. (0.1 pour 1) 1)	Dos. Ct ét. ph./10 + H. (0.1 pour 1)
1/40 c	2/10 0	2/10 0	1/20 c
1/30 c	1/10 0	1/10 0	1/40 c
1/180 0	1/20 0	1/20 0	1/80 c
			1/180 tr

Comme, dans le dosage du Ct avec et sans hémolysine, nous avons obtenu le curieux résultat cité, nous avons voulu compléter ces notions en faisant un essai de reconstitution et de substitution également en employant des globules sensibilisés comme des globules dépourvus d'ambocepteur. Voici le résultat que nous avons obtenu :

Tableau XXIX.

Dosage du Compl ^t		Dosage des Constituants											
		de l'E						du M					
		M c. 1/10			M c. 4/10			E c. 4/10			E c. 6/10		
+ H.	sans H.	E d.	H. +	sans H.	E d.	H. +	sans H.	M d.	H. +	sans H.	M d.	H. +	sans H.
1 c	1 c	0.5 c	c	c	0.5 c	c	c	0.5 p c	c	c	0.2 c	c	c
0.5 c	0.5 c	0.25 bon I	c	c	0.25 I	c	p c	0.25 c	c	c	1/10 c	c	c
0.25 p c	0.25 c	1/10 ?	?	?	1/10 ?	?	?	1/40 c	c	c	1/40 c	c	c
1/10 0	1/10 c	1/20 0	0	0	1/20 0	0	0	1/10 c	c	0	1/160 c	c	0
1/20 0	1/20 0	1/20 0	0	0	1/20 0	0	0	1/160 p c	?	0	1/320 p c	c	0

Témoins: M frais 1/10 0
 1 (avec et sans H.) 0
 E frais 4/10 0
 1.2 (avec et sans H.) 0

La constatation faite à propos du dosage du complément avec et sans hémolysine artificielle se dégage également du dosage des constituants.

En effet, sans hémolysine naturelle, la dose limite de l'E décroissant est plus faible qu'avec ambocepteur; cela ne se produit pas pour le M décroissant parce qu'il est un fait connu que les anticorps naturels et notamment les hémolysines

1) Hémolysine active à 1 sur 1600.

naturelles ¹⁾ sont précipités avec les globulines et doivent donc se retrouver à coté du M. Ce fait, du reste, nous l'avons directement mis en évidence: il nous a suffi d'ajouter, à nos tubes témoins, $\frac{1}{20}$ d'alexine fraîche de cobaye pour obtenir rapidement le beau C dans tous nos contrôles de M seul, les E persistant à ne donner aucune trace de dissolution.

d) Chien.

Nous avons d'abord recueilli quelques notions concernant les hémolysines naturelles que ce sérum renferme. Voici quelques dosages:

Tableau XXX.

C ^t I		C ^t II		C ^t III	
+ H.	sans H.	+ H.	sans H.	+ H.	sans H.
0.25 c	0.25 c	0.25 c	0.25 c	0.25 c	0.25 c
$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$?	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ p c	$\frac{1}{10}$ c	$\frac{1}{10}$ I
$\frac{1}{20}$ I	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ tr	$\frac{1}{20}$ 0	$\frac{1}{20}$ p c	$\frac{1}{20}$ 0
$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0	$\frac{1}{40}$ 0

On voit donc que le sérum de chien renferme beaucoup de lysines normales, plus que le sérum de poule, tout autant au moins que le sérum de porc. On constate aussi que le phénomène signalé pour sérum de porc n'existe pas ici: au lieu d'augmenter, l'activité diminue légèrement dans le dosage sans ambocepteur artificiel.

Comme pour sérum de porc, nous avons complété les notions qui précèdent en faisant une expérience de reconstitution et de substitution avec et sans hémolysine artificielle. Les mêmes remarques s'appliquent ici que pour le sérum de porc.

Quant à l'influence de l'eau distillée, le complément de chien la subit tout autant que le sérum de poule; il suffit, en général, de le placer une à deux heures dans l'eau D/₁₀ à 37° pour qu'il ait perdu en grand partie son activité primitive; cette perte est plus ou moins complète selon les diverses alexines et vraiment minime dans quelques rares cas.

Voici quelques exemples avec témoins:

1) Fränkel, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, Heft 5 u. 6.

Tableau XXXI.

Ct I (1½ h.)			Ct II (2 h.)			Ct III (2 h.)			Ct IV (2¼ h.)		
fr.	ét. D/10	ét. ph./10	fr.	ét. D/10	ét. ph./10	fr.	ét. D/10	ét. ph./10	fr.	ét. D/10	ét. ph./10
0.2 c	0.75 0	0.2 c	0.2 c	0.7 c	0.2 c	1/10 c	0.7 I	1/10 c	1/10 c	1 0	1/10 c
1/10 bon	0.4 0	1/10 p c	1/10 c	0.5 bon	1/10 p c	1/20 I	0.5 I	1/20 peu	1/20 p c	0.5 0	1/20 p c
1/20 0		1/20 0	1/20 tr	0.25 0	1/20 ?	1/40 0	0.25 0	1/40 0	1/40 0		1/40 0

Cette inactivation de l'alexine de chien ne présente guère de particularités du fait de la présence des hémolysines naturelles; nous avons observé en effet qu'après inactivation comme avant, la dose limite sans ambocepteur artificiel est toujours plus grande que celle avec hémolysine.

Essayons à présent de reconstituer l'alexine devenue inactive; à l'instar de celle des compléments de cobaye et de poule, essayons la reconstitution des constituants entre eux comme celle des constituants altérés avec l'autre élément frais. Ci-après, un exemple d'une telle expérience concernant un complément particulièrement actif.

Tableau XXXII.

Avant mise étuve					Après mise étuve									
Dos. du Ct		Dos. des Constts			Dos. Ct		Reconstitution des constituants							
		de l'E		du M	ét. D/10	ét. ph./10	avec éléments frais			entre eux				
		E d.	M c. 1/10	M d			E c. 3/10	E Ct ét. D/10 d.	M fr. c. 1/10	M Ct ét. D/10 d.	E fr. c. 3/10	E Ct ét. D/10 d.	M id. c. 1/10	M Ct ét. D/10 d.
6/10 c	3/10 c	3/10 c	3/10 c	0.7 0	1/10 c	0.6 c	6/10 ?	0.6 0	0.6 0	0.6 0	0 0	0 0	0 0	0 0
1/10 c	1/10 c	1/10 c	1/10 c	0.5 0	1/20 p c	0.3 c	4/10 0	0.3 0	0.3 0	4/10 0	0 0	4/10 0	0 0	0 0
1/20 p c	1/20 p c	1/20 p c	1/20 c	0.25 0	1/40 c	1/10 I	3/10 0	1/10 0	1/10 0	1/10 0	0 0	2/10 0	0 0	0 0
1/40 c	1/40 ?	1/40 c	1/40 c			1/20 peu	1/10 0							
	1/80 0	1/80 p c	1/80 p c			1/40 0								
		1/160 peu	1/160 peu											
		1/320 0	1/320 0											

Témoins: M fr. 1/10 0
 3/10 0
 1.2 0
 E fr. 3/10 0
 6/10 0
 1.2 0

Il résulte de ce tableau — dont les résultats sont comparables aux 7 autres recherches analogues que nous avons

exécutées — que contrairement à ce qui se passe pour le sérum de poule, c'est ici le M qui subit l'altération la plus profonde; l'E perd un peu de son activité mais le M n'agit plus du tout avec l'E frais quelle que soit la dose à laquelle on l'emploie.

Cette impossibilité de reconstitution du M n'est pas absolument constante; 9 fois sur 12 nous ne l'avons pas constatée. Ensuite, elle n'est pas, à notre avis, la conséquence d'une formation d'actions empêchantes; celles-ci, il est vrai, se découvrent parfois pour les fortes doses de M sous forme d'influences anticomplémentaires, mais elles ne concernent jamais les faibles doses et ne sont jamais prononcées au point qu'on puisse leur imputer l'inactivité du M ét. D.

Nous avons du reste cherché une confirmation de nos résultats dans l'emploi simultané de notre autre méthode de dosage; de cette façon nous avons une seule fois sur six retrouvé une grande quantité de M; les cinq autres expériences nous ont conduit au même résultat que plus haut.

Nous pouvons donc conclure que l'altération du complément de chien dans l'eau distillée est due principalement à l'altération du M: on n'en retrouve que des traces, sauf de rares exceptions; l'E, au contraire, ne diminue que peu ou pas d'activité.

c) Hommes.

En ce qui concerne le sérum humain, nous n'avons pas loin poussé nos expériences. Nous pouvons cependant affirmer que ce sérum, au point de vue de son altération globale dans l'eau distillée, se rapproche le plus du sérum de porc. En effet, un grand nombre d'alexines humaines (nous en avons eu 4 sur 7) ne présentent aucune diminution d'activité totale malgré un séjour prolongé (de 2 à 3 $\frac{1}{2}$ h.) dans l'eau D/10 à 37°; d'autres subissent une légère réduction; très rarement cette réduction est notable: dans un cas sur 7 nous avons obtenu une réduction de 1 au $\frac{1}{4}$.

Quant à la reconstitution de l'alexine altérée nous n'avons pu étendre nos recherches qu'à 3 compléments. Nous avons travaillé par la méthode des doses décroissantes de Ct altéré et avons constaté dans nos 3 recherches que l'E ne pré-

sente qu'une faible altération alors que le M est notablement réduit.

Résumant l'influence de l'eau distillée: des 5 alexines examinées, 3 seulement s'altèrent de façon nette et assez constante: celles de cobaye, de poule et de chien. L'altération de ces 3 alexines diffère cependant pour chacune d'entre elles; chez le cobaye les 2 constituants restent actifs vis-à-vis de l'autre élément frais; chez la poule on ne peut reconstituer que le M; chez le chien on ne peut reconstituer que l'E.

Zusammenfassung.

Die Prüfung der Einwirkung von Wärme, Zeit und destilliertem Wasser auf das Komplement von verschiedenen Tierarten hat gezeigt, daß die genannten drei Faktoren in verschiedener Weise von Einfluß sind.

Die 5 untersuchten Komplemente reagieren folgendermaßen:

Das Meerschweinchenkomplement ist thermolabil bei 56°; diese Thermolabilität wird veranlaßt durch Zerstörung von M und E. Die Zeit hat auch eine zerstörende Einwirkung auf dieses Komplement; diese Änderung jedoch ist hauptsächlich der Zerstörung des M zu danken. Durch destilliertes Wasser wird dieses Komplement inaktiviert; aber jede der beiden Komponenten bewahrt dabei ihre hämolytische Wirkung im Verein mit der anderen Komponente aus frischem Serum; jedoch erleiden die isolierten Komponenten im destillierten Wasser fast keine Veränderung.

Das Hühnerkomplement hat gewöhnlich ein ziemlich thermoresistentes M. Bei den älteren Komplementen bestätigt man, daß die 2 Komponenten fast auf gleiche Weise alteriert werden, das M jedoch ein wenig früher. Das destillierte Wasser raubt dem Komplement seine hämolytische Wirkung, jedoch durch eine Reduzierung des E.

Das Schweinekomplement weist meistens für die zwei Komponenten Thermolabilität bei 56° auf. Zeitlich verschwindet zuerst das E. Das destillierte Wasser läßt die Aktivität von diesem Komplement bestehen.

Das Hundekomplement zeigt gewöhnlich bei 56° Zerstörung seiner zwei Komponenten. Beim Lagern behält es am längsten M aktiv. Im destillierten Wasser verliert es seine Aktivität, was wir der Zerstörung des M zuschreiben müssen.

Das Menschenkomplement hat keine Thermoresistenz bei 56°; keine seiner Komponenten läßt sich mehr nachweisen. Die Zeit scheint das M am wenigsten zu beeinflussen. Das destillierte Wasser läßt dieses Komplement oft unversehrt; von den zwei Komponenten scheint M jedoch am leichtesten vom destillierten Wasser angegriffen zu werden.

À la fin de ce travail il m'est un devoir d'adresser à Monsieur le Professeur Bruynoghe mes sincères remerciements pour ses précieux conseils et son aimable direction.

Pendant que le présent travail se trouvait déjà sous presse, notre attention a été attirée sur certaines publications dont nous avons involontairement omis de faire la citation dans notre historique. Nous comblons cette lacune en mentionnant ci-après les recherches en question.

Fränkel¹⁾, en dehors des lois de substitution pour les constituants du complément de cobaye, constata que la réduction possible de la dose de complément par une augmentation de la dose d'ambocepteur concerne aussi l'E et le M et particulièrement ce dernier. Le même auteur fit quelques recherches avec le sérum de porc et lui trouva, après un chauffage d'une demi-heure à 57°, la persistance d'un peu de M (vis-à-vis de l'E de cobaye).

Braun²⁾ examina, comme nous, les sérums de chien et d'homme mais leur trouva constamment une pénurie sinon un manque absolu d'E.

Ritz³⁾ et Husler⁴⁾ ont fait des recherches concernant l'influence de la chaleur sur le complément de cobaye. Ils constatent, tous deux, la disparition du M et de l'E dans le sérum chauffé 1/2 heure à 54°. Husler cependant attribue au M une thermostabilité relative en ce sens que ce constituant persisterait en partie après un chauffage d'une demi-heure à 53°. Cette thermostabilité relative du M fut surtout admise par Friedemann⁵⁾, lequel découvrit encore, dans une certaine mesure, les propriétés hémolytiques de cette globuline dans du sérum chauffé une demi-heure à 56°.

1) Fränkel, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911, p. 788; Bd. 10, p. 391.

2) Braun, Biochem. Zeitschr., Bd. 31, p. 65.

3) Ritz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 13, 1912, p. 62.

4) Husler, ebenda, Bd. 15, 1912, p. 157.

5) Friedemann, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 67, 1910, p. 279.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Im-
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof.
Dr. E. Friedberger).]

Weitere Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit des anaphylaktischen Prozesses.

(Ueber Anaphylaxie. XLIII.—XLVII. Mitteilung.)

Von

**E. Friedberger, A. Gröber, Arnold Galambos, T. Kumagai,
H. Tasawa und Hans Simmel.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. Juli 1913.)

Einleitung.

Es ist ohne weiteres verständlich, daß man die Ueberempfindlichkeit wie jede Vergiftung durch eine Reihe antagonistischer, pharmakologisch und physikalisch wirkender Faktoren beeinflussen kann. Hier sei nur an die Aufhebung des Shocks durch die Narkose [Besredka¹], an die von Auer und Lewis²) entdeckte schützende Wirkung des Atropins und die des Chlorbariums [Biedl und Kraus³] erinnert. Aber im anaphylaktischen Vergiftungsprozeß ist infolge der eigentümlichen Genese der Vergiftung noch eine weitgehende Beeinflußbarkeit der Giftbildung und damit des Ablaufs der Anaphylaxie möglich.

Bei den toxikologisch erforschten Giften handelt es sich gewöhnlich um primär toxische Substanzen. Das anaphylaktische Gift bildet sich aber, wie besonders Friedberger und Kumagai⁴) überzeugend dargetan haben, erst im Tierkörper aus an sich ungiftigen Substanzen, und auch diese

1) Besredka, Annales Inst. Pasteur, 1907, p. 950.

2) Auer und Lewis, Journ. Americ. med. Assoc., Vol. 53, 1909, p. 459.

3) Biedl und Kraus, Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 11.

4) Friedberger und Kumagai, Verhandl. der Freien Vereinigung für Mikrobiologie. Centralbl. f. Bakt., Ref., 1912.

Giftbildung ist ebenso wie die Giftwirkung in verschiedener Weise beeinflussbar.

So gelingt es, wie Friedberger und Hartoch¹⁾ gezeigt haben, durch Erzeugung von Hypertonie im Blut die Komplementverankerung und damit die Giftbildung zu verhüten. Gleichfalls auf die Komplementwirkung dürfte der Schutz zurückzuführen sein, der dem präparierten und zugleich mit Trypanosomen infizierten Meerschweinchen nach Hartoch und Sirenski²⁾ zukommt.

Ferner gehört zum mindesten teilweise hierher der Schutz, der bedingt wird durch die Ausschaltung des Komplements bei vorheriger Injektion eines anderweitigen Antigenantikörpersystems [J. E. Löffler³⁾], infolge von Leberausschaltung [Manwaring⁴⁾], welche gleichfalls eine teilweise Komplementverarmung zur Folge hat, die wir für die Resultate Manwarings in erster Linie verantwortlich machen möchten.

Auch hungernde Tiere haben einen geringeren Komplementgehalt [Konstansoff⁵⁾] und sind dementsprechend weniger empfindlich [Lesné und Dreyfus⁶⁾], Friedberger und Langer⁷⁾, Konstansoff].

Ferner sind hier zu erwähnen die Versuche von v. Dungen und Hirschfeld⁸⁾, welche fanden, daß ein jodiertes Antiserum, das nicht mehr Komplement bindet, auch nicht passiv präpariert.

Auf einer Beeinflussung des anaphylaktischen Reaktionskörpers durch partielle Absättigung beruht der Schutz, der durch kurz aufeinanderfolgende Injektionen kleiner Antigenmengen [Besredka⁹⁾] oder durch sehr protrahierte Injektionen [Friedberger und Mita¹⁰⁾] erzielt wird.

- 1) Friedberger und Hartoch, diese Zeitschr., Bd. 3, 1909, p. 581.
- 2) Hartoch und Sirenski, diese Zeitschr., Bd. 12, 1911, p. 85.
- 3) J. E. Löffler, diese Zeitschr., Bd. 8, 1910, p. 129.
- 4) Manwaring, *ibid.*, p. 1.
- 5) Konstansoff, *Compt. rend. Soc. Biol.*, T. 72, p. 263.
- 6) Lesné und Dreyfus, *ibid.*, T. 71, 1911, p. 153.
- 7) Friedberger und Langer, diese Zeitschr., Bd. 15, 1912, p. 535.
- 8) v. Dungen und Hirschfeld, *ibid.*, Bd. 11, 1911, p. 557.
- 9) Besredka, *Annales Inst. Pasteur*, 1907.
- 10) Friedberger und Mita, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1911.

Auf eine ungenügende Antikörperbildung im präparierten Tier ist vielleicht zum Teil die erhöhte Resistenz zurückzuführen, die präparierte und zugleich tuberkulös infizierte Meerschweinchen gegenüber der tödlichen Dosis des homologen Eiweißes besitzen [Seligmann¹⁾] und gegenüber der Fieberdosis [Friedberger und Kumagai²⁾]. Das würde allerdings nicht die erhöhte Unempfindlichkeit tuberkulöser Tiere gegenüber Anaphylatoxin aus Tuberkelbacillen und in geringerem Grade vielleicht auch aus anderen Bacillen erklären, die neuerdings von Friedberger und Baetzner festgestellt worden ist.

Wir haben im Anschluß an unsere früheren Versuche über die pharmakologische Beeinflussung der Anaphylaxie-symptome und der Giftbildung neuere Versuche angestellt, über die in den nachstehenden Arbeiten berichtet werden soll. Bei diesen Versuchen leitete uns die Absicht, einmal weitere Aufklärung über den noch unklaren Mechanismus der anaphylaktischen Vergiftung zu erhalten und weiterhin zugleich Methoden zu finden zur Verhütung bedrohlicher anaphylaktischer Symptome bzw. der Serumkrankheit.

I. Der Einfluß der Trepanation und der Vagusdurchschneidung auf die Anaphylaxie bei präparierten Meerschweinchen³⁾.

Von E. Friedberger und A. Gröber.

Gelegentlich von Untersuchungen über die Wirkung einer Reihe von Giften aus der Morphingruppe hatte der eine von uns (Gröber) beobachtet, daß das Symptomenbild dieser Vergiftung beim Meerschweinchen in manchen Beziehungen, namentlich bezüglich Gefäßwirkung und Respiration, gewisse Analogien mit dem aufweist, das wir bei der anaphylaktischen Vergiftung an der gleichen Tierspecies kennen.

1) Seligmann, diese Zeitschr., 1912.

2) Friedberger und Kumagai, Verhandl. des Kongr. für innere Medizin, Wiesbaden 1913.

3) Die Resultate sind vorgetragen auf der Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie, Dresden 1911.

Wie bei dem anaphylaktischen Shock beobachtet man bei der akut tödlichen Vergiftung mit Giften der Morphin-Gruppe (intravenöse Injektion) Krämpfe, die mit schwerer Dyspnoë verbunden sind. Auch hier ergibt der Obduktionsbefund bei akutem Tod eine deutliche Blähung und Starre der Lunge.

Sorgfältige Untersuchungen von Frankfurther und Hirschfeld¹⁾ haben gezeigt, daß bei der Morphinvergiftung zuerst eine Erweiterung der Hirngefäße und nach einiger Zeit eine Verengung erfolgt, wie das aus den nicht unbeträchtlichen Volumschwankungen im Gehirn hervorgeht, die ihrerseits eine Reizung des Vaguszentrums resp. des verlängerten Markes bedingen müssen. Mit dieser Vagusreizung ließ sich möglicherweise der eigentümliche Lungenbefund bei Morphinvergiftung des Meerschweinchens in Verbindung bringen.

Es wurde versucht, die bei der Morphinvergiftung im Gehirn entstehenden Druck- und Volumschwankungen dadurch auszuschalten, daß die Tiere vor der Vergiftung trepaniert wurden. Wenn der vermutete Zusammenhang bestand, so mußte die Trepanation die Wirkung des Giftes hauptsächlich auf die Atmung aufheben bzw. bedeutend vermindern. Es gelingt nun tatsächlich durch diesen Eingriff, wie Gröber²⁾ gezeigt hat, die Tiere gegenüber der im Kontrollversuch sicher tödlichen Dosis zu schützen.

Bei der schon erwähnten Ähnlichkeit gewisser Symptome der anaphylaktischen Vergiftung mit den bei Vergiftungen mit Körpern der Morphingruppe beobachteten, lag es nahe, diese Methode der Trepanation in ihrer prophylaktischen Wirkung auch bei der Anaphylaxie zu versuchen. Wir haben deshalb einerseits bei mit Hammelserum präparierten Meerschweinchen, die zum Teil vor der Reinjektion trepaniert wurden, und bei denen zugleich die Dura breit gespalten wurde, und andererseits bei nicht trepanierten in gleicher Weise präparierten Tieren derselben Serie die tödliche Dosis ermittelt.

Im Nachstehenden bringen wir eine Uebersicht über unsere Versuche.

1) Frankfurther und Hirschfeld, Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1910, p. 575.

2) Gröber. Physiol. Gesellschaft Berlin, 1911.

Tabelle I. Aktive Anaphylaxie (präpariert mit Hammelserum 0,02).

No.	Gewicht in g	Dosis der Reinjektion pro kg Tier in ccm	?-fache tödliche Dosis	Krämpfe nach ? Zeit p. i. 1)	Dyspnoë nach ? Zeit p. i.	Tod nach ? Zeit p. i.	Lebt noch, (erholt nach)	Getötet nach	Sektion
Meerschweinchen : a) trepanierte									
78	190	0,29	1,16	7 Min. leicht	7 Min. leicht	—	3 1/4 Std.	3 1/4 Std.	Lunge nicht gebläht
80	200	0,38	1,5	1 " "	1 " "	43 Minuten	—	—	Lunge nur wenig gebläht
75	190	0,4	1,58	1 " "	1 " schwer	—	4 1/4 Std.	4 1/4 Std.	Lunge nicht gebläht
82	200	0,5	2,0	2 " "	2 " leicht	22 Minuten 2)	—	—	Lunge nur wenig gebläht
90	180	0,55 ..	2,2 ..	keine	keine	—	a.3. VI. 11	—	Lunge nicht gebläht
79	180	0,55 ..	2,2 ..	in den ersten 5 Minuten post. inj. minimal angedeutet, nur momentweise keine	in den ersten 5 Minuten post. inj. minimal angedeutet, nur momentweise keine	—	3 1/2 Std.	3 1/2 Std.	Lunge nicht gebläht
88	180	0,55 ..	2,2 ..	keine	keine	—	4 Std.	4 Std.	vgl.
103	180	0,83 ..	3,3 ..	sofort leichte	sofort leichte	—	3 1/4 Std.	3 1/4 Std.	"
b) nicht trepanierte.									
94	190	0,13	0,52	2 Minuten	2 Minuten	—	5 1/2 Std.	—	Lunge mäßig gebläht
101	220	0,23	0,9	1 Minute fast sofort	1 Minute fast sofort	2 1/4 Stunden	—	—	Lunge typisch gebläht
98	200	0,25	1,0	fast sofort	fast sofort	3 Minuten	—	—	—
85	190	0,26	1,0	vgl.	vgl.	—	—	—	Lunge typisch gebläht
89	220	0,34	1,4	"	"	7 Minuten	—	—	vgl.
102	200	0,38	1,5	"	"	4 " "	—	—	"
96	200	0,5	2,0	"	"	7 " "	—	—	"
	220	0,34	1,4	"	"	3 " "	—	—	"

1) p. i. = nach der Injektion.

2) Starker Blutverlust durch Verletzung des Gehirns bei der Präparation.

Es wurden die Tiere nach Spaltung der Kopfhaut unter möglichster Vermeidung von Blutverlust durch Abhebung des größeren Teiles der Schädeldecke breit trepaniert. Dann wurde die Dura beiderseits gespalten. Die intravenöse Reinjektion mit dem Antigen der Vorbehandlung geschah erst, nachdem sich die Tiere von der Operation möglichst erholt hatten.

Zunächst haben wir Versuche an aktiv präparierten Meer-schweinchen angestellt; die Kontrolltiere waren zu gleicher Zeit präpariert und wurden bis auf die Trepanation gleich behandelt.

Das Resultat zeigt Tabelle I (p. 431).

Es ergibt sich, daß es in der Mehrzahl der Fälle gelingt, die Tiere durch die prophylaktische Trepanation gegenüber der 2-fachen — in einem Fall sogar gegenüber der 3-fachen — tödlichen Dosis zu schützen. Einmal starb ein Tier, allerdings erst innerhalb von $\frac{3}{4}$ Stunde, schon bei der $1\frac{1}{2}$ -fach akut tödlichen Dosis.

Wir haben dann weiterhin den Einfluß der Vagotomie untersucht, ausgehend von dem Bestreben, auf diese Weise die Fortleitung des Reizes auszuschalten, der durch die vorher erwähnten brusken Druckschwankungen in der Schädelkapsel auf das Vaguszentrum ausgeübt wird.

Unsere Absicht ging dahin, auch hier durch vergleichende Versuche festzustellen, ob die Vagotomie nicht doch einen gewissen Schutz im Vergleich zu den Kontrolltieren bedinge, der den früheren Autoren, die nicht quantitativ die Ueberempfindlichkeit ausgewertet haben, entgangen war.

(Siehe Tabelle II p. 433.)

Es ergibt sich aus den Versuchen, daß die Vagotomie eine deutliche Schutzwirkung noch gegenüber dem 3-fachen Multiplum der tödlichen Dosis ausübt.

Weitere Versuche, deren Resultat mit diesen übereinstimmen, sind in der nachstehenden Arbeit von Galambos enthalten.

Tabelle II.

Aktive Anaphylaxie (Präparierung wie in Tab. I). Vagusdurchschneidung.

1. Kontrollen siehe Tabelle I.

2. Vagustiere.

No.	Gewicht in g	Dosis der Reinjektion pro kg Tier in cem	?-fache tödl. Dosis	Vago- tomie ?	Symptome		Tod nach ? Minuten	Erholt nach ? Minuten	Sektion
					Dyspnoë nach ? Minut.	Krämpfe nach ? Minut.			
95	160	0,93	3,7×	bdrsts.	nach 1 Min. etwas Dyspnoë, nach 5 Min. leichte Krämpfe	15	—	Lunge nur wenig gebläht	
76	170	0,58	2,3×	bdrsts.	nach 1 Min. etwas Taumeln, leichte Dyspnoë	—	bald	—	
92	150	1,0	4,0×	links	nach 10 Min. schwere Dys- pnoë, Seitenlage	25	—	Lunge nicht gebläht	
77	170	0,9	3,5×	rechts	keine Symptome, munter	—	—	—	

Eine große Anzahl Autoren hat die Schutzwirkung des Atropins bei der Anaphylaxie, wie sie zuerst von Auer¹⁾, Auer und Lewis²⁾ gefunden wurde, nachgeprüft und mehr oder weniger bestätigt [Kraus³⁾, Friedberger und Mita⁴⁾, Mita⁵⁾, Doerr und Moldovan⁶⁾, Graetz⁷⁾, Karsner und Nutt⁸⁾, Anderson und Schultz⁹⁾, W. H. Schultz¹⁰⁾]. Auer und Lewis geben an, daß man mit Atropin einen Schutz gegen die Dosis letalis minima erzielen könne¹¹⁾.

Wesentlich aus dieser Schutzwirkung des Atropins gegenüber der Lungenblähung bei Anaphylaxie hat man geschlossen,

- 1) Auer, Journ. of the Americ. Med. Assoc., 1909.
- 2) Auer und Lewis, *ibid.*
- 3) Biedl und Kraus, diese Zeitschr., Bd. 7, 1910, p. 211.
- 4) Friedberger und Mita, *ibid.*, Bd. 8, 1910, p. 283.
- 5) Mita, *ibid.*, Bd. 11, 1911, p. 514.
- 6) Doerr und Moldovan, *ibid.*, Bd. 7, 1910, p. 232.
- 7) Graetz, *ibid.*, Bd. 8, 1911, p. 740.
- 8) Karsner und Nutt, Journ. of Americ. Med. Assoc., Vol. 57, 1911, p. 1023.
- 9) Anderson und Schultz, Proceed. Soc. exp. Biol. and Med., Vol. 7, 1909.
- 10) Schultz, Journ. of exp. Pharm. and Therap., 1910.
- 11) Ueber den interessanten Einfluß, den dabei die zeitlichen Verhältnisse spielen, siehe die folgende Abhandlung von Galambos.

daß das anaphylaktische Gift peripher, an den Vagusendigungen, angreift. Aber schon W. H. Schultz weist darauf hin, daß die wirksamen Atropingaben nicht nur die glatte Bronchialmuskulatur lähmen, sondern auch die Erregbarkeit der übrigen Körperzellen gegenüber dem anaphylaktischen Gift vermindern; Chloral und Chloralurethan schützen ebensogut wie Atropin. Dazu ist zu sagen, daß das Atropin an sich in kleineren Dosen erregend auf das Atemzentrum wirkt, während große Dosen das Zentralnervensystem lähmen. Diese zentralen Wirkungen des Atropins sind von den genannten Autoren nicht berücksichtigt worden. Man könnte doch aber wohl den Schutz durch Atropin gegenüber der anaphylaktischen Lungenblähung auch auf eine Beeinflussung des Atemzentrums und dadurch veränderte Atemtätigkeit beziehen.

Eine Lösung der Frage, ob die anaphylaktische Lungenblähung zentral oder peripher bedingt sei, ist nur möglich mit Hilfe von Methoden, die gestatten, entweder das Zentrum oder die Peripherie isoliert auszuschalten. Da das bei letzterer nun nicht möglich ist, hat eine Anzahl Autoren der ersten Möglichkeit die Aufmerksamkeit zugewendet. Schürer und Strassmann¹⁾ haben das Großhirn und die basalen Ganglien extirpiert. Sie haben unter 17 Tieren (übrigens meistens Kaninchen, die sich bekanntlich zum mindesten quantitativ ganz anders verhalten als Meerschweinchen), bei denen sie diesen Eingriff vor der Reinjektion vornahmen, 2 Todesfälle mit Lungenblähung gehabt. Daraus schließen sie auf die periphere Genese dieses Symptoms.

Auer²⁾, Biedl und Kraus³⁾ durchschnitt die Medulla oblongata, zerstörten das Rückenmark, wendeten beiderseitige Vagotomie an, curarisierten. Da sie trotzdem Lungenblähung erhielten, erklären sie diese für peripheren Ursprungs.

Wichtiger erscheint die Angabe von Auer, Biedl und Kraus, daß beiderseitige Vagotomie die Lungenblähung nicht zu verhindern vermöge, entgegen unseren eigenen Resultaten, die einen deutlichen Schutz durch prophylaktische Vagotomie ergaben, wenn auch nicht gegen allzuhohe Reinjektionsdosen.

1) Schürer und Strassmann, diese Zeitschr., Bd. 12, 1912, p. 143.

2) l. c.

3) l. c.

Daß die Auslösung der Anaphylaxie auch scheinbar ohne Mitbeteiligung des Gehirns möglich ist, spricht aber keineswegs dagegen, daß gleichwohl bei der anaphylaktischen Versuchsanordnung unter gewöhnlichen Verhältnissen der Einfluß des Zentralnervensystems eine ausschlaggebende Rolle spielt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei sehr großen Reinjektionsdosen möglicherweise auch eine periphere Giftwirkung zustande kommt. So könnten sich die Resultate mit großen Reinjektionsdosen bei enthirnten, trepanierten, vagotomierten und atropinisierten Tieren erklären. Es ist sonach wahrscheinlich, daß bei den betreffenden Versuchen von Auer, Biedl und Kraus die Dosierung eine ungeeignete war, die Reinjektionsdosen zu hoch waren. (Auch Atropin schützt, wie Auer und Lewis zeigten, nicht gegen allzu hohe Multipla der tödlichen Dosis.)

Daß es gelingt, durch die Vagotomie die Tiere gegen die 3-fache tödliche Dosis zu schützen, spricht mit Entschiedenheit gegen eine ausschließlich primäre Schädigung bzw. Reizung der Vagusenden durch das Gift bei diesen Dosen, sondern vielmehr dafür, daß irgendwie ein Reiz auf das Vaguszentrum ausgeübt werde. Daß wir uns diese Reizung des Vaguszentrums nicht allein auf chemischem, sondern zum großen Teil auch auf mechanischem Wege zustande gekommen denken müssen, dafür sprechen unsere weiteren Versuche, die zeigen, daß man durch breite prophylaktische Trepanation die Tiere gegen die 2—3-fache tödliche Dosis zu schützen vermag. Als Stütze für diese Auffassung führen wir die Angabe von Pearce und Eisenbrey¹⁾ an, die onkometrisch feststellten, daß mit dem Sinken des Blutdrucks im anaphylaktischen Shock nicht nur das Volumen von Milz, Niere und Extremitäten, sondern auch das des Gehirns abnimmt, und die Erklärung von Loewit²⁾, daß die Atemstörungen als sekundär, und zwar als Folge der anaphylaktischen Zirkulationsstörungen und der durch diese bedingten Hirnanämie aufzufassen seien.

Das Hirn ist von der unnachgiebigen Schädelkapsel eng umschlossen, der es fest anliegt. Der Liquor cerebrospinalis ist, wie seinerzeit Oestreich und De la Camp zeigten, viel

1) Pearce und Eisenbrey, Journ. of Infect. diseases, Vol. 7, 1910.

2) Loewit, Schmiedebergs Archiv, Bd. 68, 1912, p. 83.

zu langsam und schwer beweglich, als daß durch sein Ausweichen plötzliche größere Volumenschwankungen des Hirns ausgeglichen werden könnten, ganz abgesehen davon, daß weder das Meerschweinchen noch das Kaninchen überhaupt nennenswerte Mengen von Liquor cerebrospinalis besitzen. Tritt also eine momentane stärkere Volumenabnahme des Hirns ein, so muß der intrakranielle Druck sinken. Diese Druckverminderung scheint nun als Reiz auf das Vaguszentrum zu wirken, in der gleichen Weise, wie Filehne und Biberfeldt¹⁾ es für plötzliche intrakranielle Drucksteigerung nach Digitaliskörpern nachweisen konnten. Die Autoren zeigten, daß die Pulsverlangsamung nach Digitalis am Hunde ausbleibt, wenn man vorher das Tier breit trepaniert. Diese Beobachtung stimmt — vice versa — mit den bei unseren Trepanationsversuchen gemachten völlig überein.

Es scheint uns so auch für das Meerschweinchen der Beweis geführt, daß die einfach tödliche und selbst noch höhere Reinjektionsgaben ihren deletären Einfluß auf den Organismus viel weniger durch direkte Schädigung des Zentralnervensystems oder der Vagusenden ausüben, als vielmehr durch Schädigung der Gefäße. Diese Schädigung der Gefäße führt erst sekundär in der beschriebenen Weise zu den Krankheitssymptomen bzw. der Lungenblähung. Diese ist ja zweifellos nur ein beim Meerschweinchen, in geringerem Maße auch beim Kaninchen, zu findendes Symptom der Anaphylaxie. Denn bei Katzen und Hunden konnte es bisher nicht beobachtet werden. Daß es auch beim Meerschweinchen für Anaphylaxie nicht pathognomonisch ist, ist heute allgemein bekannt. Wir selbst haben gezeigt, daß das Meerschweinchen auf alle möglichen Insulte mit einer Lungenblähung reagiert.

Wenn endlich betont wurde (Auer), daß die anaphylaktische Blutdrucksenkung vorwiegend durch primäre direkte Herzschädigung entstehe, so steht dem — mindestens beim Meerschweinchen und Kaninchen — entgegen, daß das Herz nach Atemstillstand noch lange fortschlägt, daß man die Tiere durch künstliche Atmung retten kann. Auch daß Auer

1) Filehne und Biberfeldt, Pflügers Archiv, Bd. 128.

nach Reizung des Vasomotorenzentrums kein Ansteigen des gesunkenen Druckes erzielen konnte, spricht nicht gegen eine primäre Gefäßschädigung, die ja nicht die Gefäßnerven zu treffen braucht, sondern nur die Wand selbst beeinflussen könnte.

Zusammenfassung.

Die vorherige Trepanation schützt präparierte Meerschweinchen gegen die tödliche Reinjektionsdosis.

Ebenso wirkt die Vagotomie.

Wenn auch die Anaphylaxie ohne Mitbeteiligung des Zentralnervensystems zustande kommen kann, so sprechen doch die obigen Ergebnisse für seine Mitbeteiligung unter natürlichen Verhältnissen.

Es wird die Ansicht diskutiert, daß die Symptome zentral durch Reizung des Vaguszentrums, bedingt durch Druckdifferenzen in der Schädelkapsel infolge primärer Gefäßschädigung, ausgelöst werden.

II. Ueber die therapeutische Beeinflussung der Anaphylaxie durch Atropin und Adrenalin sowie über weitere Versuche über den Einfluß der Vagusdurchschneidung.

Von Dr. **Arnold Galambos** aus Budapest.

Die durch Atropin bedingte Beeinflussung der Anaphylaxie bei Meerschweinchen wurde von **Auer** und **Lewis** festgestellt

Die interessante und wichtige, immerhin aber noch strittige Frage, ob die Anaphylaxie durch Atropin zu beeinflussen sei, diente mir als Ausgangspunkt meiner Versuche, die ich dann noch auf eine Reihe anderer pharmakologisch wirksamer Substanzen ausdehnte.

In erster Reihe schien es interessant, Versuche mit Adrenalin vorzunehmen.

Nach **Auer** und **Lewis** ist die bei der Anaphylaxie nachweisbare und von **Gay** und **Southard** zuerst beschriebene Lungenblähung durch Asphyxie bedingt, welche als eine Folge der peripherischen, bronchospastischen, anaphylaktischen Gift-

wirkung angesehen worden ist (Auer und Lewis, Biedl und Kraus, Graetz, Schürer und Strassmann, Löwit, H. T. Karsner). Atropin soll eben durch die Behebung des peripherischen Bronchialspasmus kurativ wirken (Auer und Lewis) [eine Auffassung, die nach der vorstehenden Arbeit von Friedberger und Gröber allerdings nicht zwingend erscheint]. Die experimentell und klinisch nachgewiesene, im Endeffekt gleichsinnige, wenn auch auf verschiedene Weise zustande kommende Wirkung des Adrenalins (Atropin wirkt auf den Vagus hemmend, Adrenalin auf den antagonistischen Sympathicus reizend [Sympathicotonie]) ließ es als möglich erscheinen, daß Adrenalin auch bei anaphylaktischen Zuständen (wie z. B. auch bei Asthma bronchiale) auf die bronchospastischen Zustände kurativ wirkt. Die Durchschneidung des N. vagus sollte bei Annahme einer, wenn auch indirekten (vgl. Friedberger und Gröber) zentralen Wirkung des anaphylaktischen Giftes auch auf das Zustandekommen des Bronchialspasmus hemmend wirken.

In sämtlichen Fällen wurden Meerschweinchen mit 2 ctg Pferdeserum in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Die Reinjektion wurde nach 13 Tagen vorgenommen; die Reinjektionen erfolgten wie die vorangehenden Injektionen der Arzneimittel in sämtlichen Fällen intravenös; die Gewichte in den Tabellen sind diejenigen vor der Reinjektion.

I. Reihe.

No.	Körpergewicht in g	Angewandte Arznei und Dose (Flüssigkeitsmenge)	Reinjiziertes Pferdeserum in ccm (Flüssigkeitsmenge)	Nach ? Minuten	Bemerkungen
I	360	—	0,10 (in 1 ccm)	—	Schwerer anaphyl. Shock. Erholt sich
II	390	—	0,10 (in 1 ccm)	—	Schwerer anaphyl. Shock. Erholt sich
III	350	—	0,12 (in 1,2 ccm)	—	Typ. Anaphyl. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
IV	370	—	0,12 (in 1,2 ccm)	—	Typ. Anaphyl. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
V	350	—	0,12 (in 1,2 ccm)	—	Typ. Anaphyl. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
VI	330	5 ccm phys. NaCl	0,12 (in 1,2 ccm)	18	Typ. Anaphyl. In 6 Min. tot. Sektionsbild typisch

No.	Körpergewicht in g	Angewandte Arznei und Dose (Flüssigkeitsmenge)	Reinjiziertes Pferdeserum in ccm (Flüssigkeitsmenge)	Nach ? Minuten	Bemerkungen
VII	400	Atropin 3 mg (in 3 ccm)	—	—	In 1½ Min. tot (Atropintod)
VIII	410	Atropin 24 mg (in 2,4 ccm)	0,5 (in 0,5 ccm)	36	Gesund
IX	390	dgl.	0,75 (in 0,75 ccm)	41	Gesund
X	370	Atropin 15 mg (in 1,5 ccm)	0,5 (in 0,5 ccm)	8½	Typ. Anaphyl. In 9 Min. tot. Sektionsbild typisch
XI	320	Atropin 3 mg (in 0,3 ccm)	0,5 (in 0,5 ccm)	26	Typ. Anaphyl. In 9 Min. tot. Sektionsbild typisch
XII	330	Atropin 10 mg (in 1 ccm)	0,5 (in 0,5 ccm)	gleichzeitig	Typ. Anaphyl. In 7½ Min. tot. Sektionsbild typisch
XIII	300	dgl.	0,5 (in 0,5 ccm)	10	Typ. Anaphyl. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
XIV	320	„	0,5 (in 0,5 ccm)	18	Leichter anaphylaktischer Shock. Ueberlebt
XV	320	„	0,5 (in 0,5 ccm)	26	Gesund
XVI	350	„	0,5 (in 0,5 ccm)	84	Typ. Anaphyl. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch
XVII	330	Adrenalin 0,4 mg (in 1 ccm)	—	—	In 4 Min. tot (Adrenalin-tod). Sekt.-Bild: Geringfügige Lungenblähung; sehr starke Lungenblutungen; sehr blasse Eingeweide. Ueberlebendes Herz
XVIII	340	Adrenalin 0,1 mg (in 1 ccm)	—	—	In 5 Min. tot (Adrenalin-tod). Sekt.-Bild: Lungenblähung, konfluierende Lungenblutungen. Auffallende Blässe d. Bauchorgane. Ueberlagertes u. überlebendes Herz
XIX	340	Adrenalin 1/30 mg (in 1 ccm)	0,24 (in 2,4 ccm)	10	Gesund

No.	Körpergewicht in g	Angewandte Arznei und Dose (Flüssigkeitsmenge)	Reinjiziertes Pferdeserum in ccm (Flüssigkeitsmenge)	Nach ? Minuten	Bemerkungen
XX	340	Adrenalin $\frac{1}{80}$ mg (in 1 ccm)	—	—	In 6 Min. tot (Adrenalin-tod). Sekt.-Bild: Geringfügige Lungenblähung, konfluierende Lungenblutungen. Anämie der Bauchorgane. Ueberleb. Herz
XXI	300	Adrenalin $\frac{1}{60}$ mg (in 0,5 ccm)	0,36 (in 0,36 ccm)	26	Gesund
XXII	320	dgl.	0,4 (in 0,4 ccm)	15	Typ. Anaphyl. In 11 Min. tot. Sektionsbild typisch
XXIII	330	„	0,5 (in 0,5 ccm)	33	Leichte Anaphyl. Ueberlebt
XXIV	260	„	0,6 (in 0,6 ccm)	21	Bis 1 Stunde vollkommen normal. Dann protrah. Verlauf d. Anaphyl. In 100 Min. tot. Sekt.-Bild: nicht typisch für Anaph.
XXV	330	Adrenalin $\frac{1}{60}$ mg (in 0,5 ccm) + Atropin 10 mg (in 1 ccm)	0,8 (in 0,8 ccm)	14	Typ. Anaphyl. In 15 Min. tot. Sektionsbild typisch
XXVI	400	Beide N. vag. durchgeschnitten	—	—	Schweres Atmen. Später Sprünge, Krämpfe. In 75 Min. tot. Normale Lungengrenze. Lunge voll m. Blutung. Hyperämische Bauchorgane
XXVII	350	Beide N. vag. durchgeschnitten	0,2 (in 2 ccm)	gleichzeitig	Schwer Atmen. In 30 Min. tot. Kein anaphylaktisch. Sektionsbild
XXVIII	360	Beide N. vag. durchgeschnitten	0,4 (in 0,4 ccm)	gleichzeitig	Schweres Atmen. Sonst nach 1 Std. auch munter
XXIX	410	Beide N. vag. durchgeschnitten	0,6 (in 0,6 ccm)	gleichzeitig	Schwer. Atmen. Typische Anaphylaxie. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
XXX	370	Recht. Vagus durchgeschnitten	0,2 (in 2 ccm)	gleichzeitig	Gesund
XXXI	370	Recht. Vagus durchgeschnitten	0,6 (in 0,6 ccm)	gleichzeitig	Typ. Anaphyl. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch

II. Reihe.

No.	Körpergewicht in g	Angewandte Arznei und Dose (Flüssigkeitsmenge)	Reinjiziertes Pferdeserum in ccm (Flüssigkeitsmenge)	Nach ? Minuten	Bemerkungen
XXXII	200	—	0,12 (in 1,2 ccm)	—	Anaphylaxie. In 3 $\frac{1}{2}$ Min. tot. Sektionsbild typisch
XXXIII	200	—	0,12 (in 1,2 ccm)	—	Anaphylaxie. In 4 $\frac{1}{2}$ Min. tot. Sektionsbild typisch
XXXIV	200	—	0,10 (in 1,0 ccm)	—	Anaphylaxie. Erholt sich
XXXV	210	—	0,10 (in 1,0 ccm)	—	Anaphylaxie. In 8 Min. tot. Sektionsbild typisch
XXXVI	300	—	0,08 (in 0,8 ccm)	—	Normal
XXXVII	340	3 ccm phys. NaCl	0,12 (in 1,2 ccm)	gleichzeitig	Matt. Erholt sich
XXXVIII	220	3,5 ccm phys. NaCl	0,15 (in 1,5 ccm)	dgl.	Anaphylaxie. In 3 Min. tot. Sektionsbild typisch
XXXIX	290	3 ccm phys. NaCl	0,16 (in 1,6 ccm)	„	Anaphylaxie. In 3 Min. tot. Sektionsbild typisch
XL	1)	Adrenalin $\frac{1}{80}$ mg (in 0,5 ccm)	0,35 (in 0,35 ccm)	„	Normal
XLI	200	dgl.	0,6 (in 0,6 ccm)	„	Anaphylaxie. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
XLII	210	„	0,5 (in 0,5 ccm)	„	Anaphylaxie. In 4 $\frac{1}{2}$ Min. tot. Sektionsbild typisch
XLIII	200	„	dgl.	12	Anaphylaxie. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
XLIV	215	„	dgl.	25	Anaphylaxie. In 25 Min. tot. Sektionsbild typisch
XLV	180	„	0,42 (in 0,42 ccm)	27	Normal
XLVI	270	„	0,5 (in 0,5 ccm)	42	Anaphylaxie. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
XLVII	200	„	0,35 (in 0,35 ccm)	75	Anaphylaxie. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch
XLVIII	280	Adrenalin $\frac{1}{20}$ mg (in 0,25 ccm)	0,3 (in 0,3 ccm)	26	Anaphylaxie. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch

1) Das Körpergewicht lag auch bei den Tieren, bei denen die Angaben fehlen, zwischen 200 und 300 g.

III. Reihe.

No.	Körpergewicht in g	Angewandte Arznei und Dose (Flüssigkeitsmenge)	Reinjiziertes Pferdeserum in ccm (Flüssigkeitsmenge)	Nach ? Minuten	Bemerkungen
XLIX	270	—	0,10 (in 1,0 ccm)	—	Anaphylaxie. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch
L	170	—	0,10 (in 1,0 ccm)	—	Anaphylaxie. In 4½ Min. tot. Sektionsbild typisch
LI	200	—	0,08 (in 0,8 ccm)	—	Anaphylaxie. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch
LII	200	—	0,08 (in 0,8 ccm)	—	Anaphylaxie. In 4½ Min. tot. Sektionsbild typisch
LIII	—	—	0,08 (in 0,8 ccm)	—	Anaphylaxie. In 5 Min. tot. Sektionsbild typisch
LIV	280	—	0,08 (in 0,8 ccm)	—	Anaphylaxie. Erholt sich
LV	—	—	0,065 (in 0,65 ccm)	—	Gesund
LVI	210	5 ccm phys. NaCl	0,08 (in 0,8 ccm)	gleichzeitig	Anaphylaxie. In 4 Min. tot. Sektionsbild typisch
LVII	360	4 ccm phys. NaCl	0,08 (in 0,8 ccm)	dgl.	Gesund
LVIII	180	3 ccm phys. NaCl	0,08 (in 0,8 ccm)	„	Matt. Erholt sich
LIX	190	3 ccm phys. NaCl	0,09 (in 0,9 ccm)	„	Anaphylaxie. Erholt sich
LX	220	3 ccm phys. NaCl	0,12 (in 1,2 ccm)	„	Matt. Erholt sich

Bei der Anwendung der schützenden Arzneimittel müssen im allgemeinen zwei Umstände berücksichtigt werden, nämlich erstens die Größe der angewendeten Dose des Arzneimittels, die übrigens schon von Auer bei der Anwendung von Atropin betont wurde; zweitens, wie aus den Ergebnissen meiner Versuche ersichtlich, die Länge des Zeitintervalls zwischen der Injektion der Arzneimittel und derjenigen des Antigens (Reinjektion).

Daß größere Atropindosen gegen eine letale Dose der anaphylaktisch wirkenden Substanz besser schützen als kleinere Dosen (Auer, Karsner und Nutt), wird auch durch meine Untersuchungen bestätigt (gleiches Zeitintervall vorausgesetzt). So genügten z. B. (No. XV) 10 mg Atropin, um bei der giftigen Wirkung des reinjizierten Pferdeserums

(0,5 ccm, über 4-fach letale Dose) ein Auftreten der anaphylaktischen Erscheinungen zu verhindern, dagegen tritt bei der ungenügenden Dose von 3 mg Atropin (No. XI) der Tod in 9 Minuten ein (0,5 ccm Pferdeserum). Die Injektionen gingen in beiden Fällen 26 Minuten der Reinjektion voraus.

Zur Erreichung erheblicher Schutzwirkung müssen sehr große Dosen von Atropin angewendet werden. 24 mg Atropin wurden noch gut vertragen, erst 30 mg erwies sich als letale Dose bei mittelgroßen Meerschweinchen.

Die Rolle des Zeitintervalls bei der Schutzwirkung der Arzneimittel ist um so auffallender, als sich ein Zwischenraum von 25—30 Minuten als Optimum erwies, während die Wirkung der intravenös verabreichten Medikamente im allgemeinen in Sekunden, spätestens in einigen Minuten auftritt. Die Wichtigkeit der Rolle des Zeitintervalls der Injektionen erhellt folgende Versuchsreihe: In den Fällen (No. XII—XVI) wurde 10 mg Atropin und nach verschiedenen Zeiten 0,5 ccm Pferdeserum reinjiziert. Bei gleichzeitiger Anwendung der Injektionen (No. XII), sowie in Fällen, wo die Reinjektion 10 Minuten (No. XIII) oder 84 Minuten (No. XVI) nach der Injektion des Atropins erfolgte, trat der Tod in 4—7½ Minuten nach der Reinjektion unter typischen anaphylaktischen Erscheinungen ein, während dann, wenn die Reinjektion nach 18 Minuten verabfolgt wurde (No. XIV), das Tier — nach einem überstandenen anaphylaktischen Shock — mit dem Leben davorkam. Erst wenn die Injektion nach 26 Minuten erfolgte, überlebte das Tier die Reinjektion ohne anaphylaktische Erscheinungen (No. XV).

So können wir durch die Kombination dieser zwei variablen Faktoren (Arzneidose und Zeitintervall) erreichen, daß kleinere Atropindosen eine größere Schutzwirkung entfalten als größere Atropindosen, wenn nämlich die Zeit der Reinjektion in ersterem Falle vorteilhafter gewählt wird als im letzteren Falle. So erfolgte z. B. im Falle No. X, wo das Zeitintervall 8½ Minuten betrug, der Tod trotz einer Atropindose von 15 mg nach einer Reinjektionsdosis von 0,5 Pferdeserum in 9 Minuten, während sich im Falle No. XIV bei 18 Minuten Zeitintervall, noch auffallender aber im Falle No. XV mit einem Zeitintervall von 26 Minuten

gegen dieselbe Dose des Pferdeserums schon eine geringere Dose von Atropin (10 mg) als hinreichend erwies.

Ganz ähnliche Verhältnisse fand ich auch bei Adrenalin. Es wurde von der 30-fachen Verdünnung des 1-prom. Adrenalins (Parke, Davis & Co.) $\frac{1}{2}$ ccm injiziert ($\frac{1}{60}$ mg Adrenalin). Größere Dosen wirkten letal.

Die mit Adrenalin behandelten Tiere (No. XXIII und XXIV) ertrugen eine mehrfach (5-fach) letale Reinjektionsdosis, ebenso wie die mit Atropin behandelten Tiere (Intervall 21 Minuten). Ein kleineres Intervall erwies sich auch hier als ungenügend. So trat bei einem Intervall von 15 Minuten (No. XXII), selbst nach Anwendung von 0,4 Pferdeserum ($3\frac{1}{3}$ -fach letale Dose) der Tod unter anaphylaktischen Erscheinungen, wenn auch etwas verspätet (in 11 Minuten) ein.

In anderen Fällen, wo die Injektion des Adrenalins gleichzeitig mit der Reinjektion (No. XLII) oder 12 (No. XLIII) bzw. 42 Minuten (No. XLVI) vor derselben erfolgte, trat der Tod in 4 Minuten ein, dagegen bei einem Zeitintervall von 25 Minuten (No. XLIV) erst nach 25 Minuten, immer gleiche Mengen Pferdeserums vorausgesetzt (0,5 ccm). Bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin und 0,35 ccm Pferdeserum ($3\frac{1}{2}$ -fach letale Dose) blieb das Tier am Leben (No. XL), dagegen trat bei einem Zeitintervall von 75 Minuten der Tod ein (No. XLVII). Wenn die Reinjektion nach 27 Minuten verabreicht wurde (No. XLV), ertrug das Tier eine über 4-fach letale Dose (0,42 ccm Pferdeserum). Bei einem optimalen Zeitintervall (26 Minuten) erwies sich eine kleinere Dose von Adrenalin ($\frac{1}{120}$ mg Adrenalin) selbst gegen eine geringere Reinjektionsdosis von 0,3 ccm Pferdeserum als ungenügend (No. XLVIII).

Die einseitige oder beiderseitige Durchschneidung des N. vagus bewirkte auch eine ausgesprochene Schutzwirkung gegen Anaphylaxie, wie meine Versuche in Bestätigung derjenigen von Friedberger und Gröber dartun.

Die anaphylaxiehemmende Wirkung der Durtrennung der Vagi könnte im Sinne einer zentralen Wirkung des anaphylaktischen Giftes gedeutet werden. Nach Friedberger und Gröber (siehe vorstehende Mitteilung) ist diese Wirkung eine indirekte, bedingt durch Gefäßwirkung mit sekundären

Druckveränderungen im Schädel. Das Zustandekommen einer typischen Anaphylaxie nach Darreichung einer mehrfach letalen Dose des Antigens trotz Vagotomie scheint jedoch zu beweisen, daß es bei einer konzentrierteren Giftwirkung auch durch einen Reiz der peripheren Nervenenden (oder Gefäßwände) direkt zu Anaphylaxie kommen kann. Auer und Lewis und alle jene, die durch Ausschaltung des zentralen Nervensystems Anaphylaxie hervorriefen und dadurch den ausschließlichen peripheren Ursprung der anaphylaktischen Giftwirkung beweisen wollten, scheinen diese quantitativen Verhältnisse nicht genügend in Erwägung gezogen zu haben.

Zusammenfassung.

Bei der Entwicklung eines anaphylaktischen Zustandes zeigt außer Atropin (Auer und Lewis) auch Adrenalin eine Schutzwirkung. Die einseitige oder beiderseitige Durchtrennung des Vagus wirkt in gleichem Sinne.

Bei der Darreichung dieser Mittel ist nicht nur auf die Größe der angewendeten Dosis des schützenden Mittels zu achten, was bei der Anwendung von Atropin schon von Auer betont wurde, sondern auch dem Zeitintervalle der Injektion die größte Aufmerksamkeit zu schenken.

Dies ist nicht nur bei Atropin, sondern auch bei Adrenalin der Fall.

III. Ueber den Einfluß der Körpertemperatur präparierter Meerschweinchen auf die Ueberempfindlichkeit bei der Reinjektion ¹⁾.

Von E. Friedberger und T. Kumagai aus Tokio.

Die Veranlassung zu den Versuchen, über die im nachstehenden berichtet werden soll, wurde uns durch eine zufällige Beobachtung gegeben.

Gelegentlich von Anaphylaxieversuchen an aktiv präparierten Tieren, die im Winter vorgenommen wurden, beobach-

1) Vorgetragen in der Freien Vereinigung für Mikrobiologie, Sitzung vom 1. Juni 1912. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 54, 1912, p. 242.

teten wir eines Tages, daß die präparierten Tiere im Vergleich zu unseren sonstigen Erfahrungen auffallend geringe Empfindlichkeit bei der Reinjektion zeigten.

Bei der Nachforschung nach der Ursache dieses Verhaltens stellten wir fest, daß wegen einer Störung in der Heizungsanlage in dem Stall, in dem sich die Tiere bis zur Reinjektion befanden, eine sehr niedere Temperatur herrschte. Auch die Tiere wiesen infolgedessen eine abnorm niedere Körpertemperatur auf.

Da wir ein weiteres Moment für die geringere Empfindlichkeit unserer Tiere bei der Reinjektion nicht feststellen konnten, so beschlossen wir, zunächst einmal den Einfluß der Abkühlung der Körpertemperatur auf die Ueberempfindlichkeit beim präparierten Tier systematisch zu untersuchen.

Im nachstehenden bringen wir die Resultate.

Versuchsserie I.

Eine Serie Meerschweinchen wurden am 15. Nov. 1911 mit je 0,02 Hammelserum präpariert.

Reinjektion am 8. Dezember mit Hammelserum.

A. Bestimmung der tödlichen Dosis des Hammelserums in der Reinjektion.

- K 97, 370 g.
 10⁵³ HS. 0,01 intravenös.
 10⁶⁵ Unruhig und etwas dyspnoisch.
 12⁵⁶ Krämpfe, erholt, bleibt leben.
- K 108, 320 g.
 1¹⁹ HS. 0,01 iv.
 1²⁰ Unruhig, leichte Krämpfe, bald erholt, bleibt am Leben.
- K 85, 340 g.
 1²⁴ HS. 0,025 iv.
 1³⁰ Krämpfe, Seitenlage.
 1³¹ Reflex erloschen, tot. Sektion: typisch.
- K 76, 350 g.
 1³⁰ HS. 0,025 iv.
 1³¹ Krämpfe, Sprünge.
 1³⁵ Tot. Sektion: typisch.
- K 115, 320 g.
 3⁴⁵ HS. 0,025 iv.
 3⁴⁷ Sprünge, Krämpfe.
 3⁵¹ Tot. Sektion: typisch.

K 109, 350 g.

10⁴⁰ HS. 0,025 iv.

10⁴¹ Kratzt sich.

10⁴² Krämpfe.

10⁴⁶ Reflexlos.

10⁴⁷ Tot. Sektion: typisch.

Sicher tödliche Dosis 0,025.

B. Injektion nach vorheriger Kaltwasserbehandlung.

K 110, 350 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,4° C.

3⁵⁵ Ins Wasser (10° C).

3⁵⁹ Aus dem Wasser. Gleich darauf Temperatur 25° C.

4⁴ HS. 0,025 iv. Gleich nach der Injektion 24° C.

4¹⁸ Zittert.

4¹⁹ Temperatur 23,5° C, ruhig, etwas dyspnoisch.

4²⁴ Temperatur 23,5° C, etwas kurzatmig, bewegt sich nicht aktiv.

4⁴⁶ In den Brutschrank gebracht.

4⁵⁸ Temperatur 24,5° C.

5³⁹ Temperatur 26° C, noch etwas krank.

5⁵⁹ Temperatur 28° C.

6³⁰ Temperatur 33° C.

6¹⁰ Frißt Futter, ganz gesund.

K 104, 340 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,6° C.

4⁵⁰ Ins Wasser.

4⁵⁴ Aus dem Wasser. Gleich darnach Temperatur 28° C.

4⁵⁹ HS. 0,05 (2-fach tödliche Dosis) iv. Gleich nach der Injektion 27° C.

5¹ Unruhig, kratzt sich.

5⁵ Etwas dyspnoisch, frißt.

5¹⁰ Temperatur 25° C.

5¹⁹ Krank, läuft herum.

5²⁹ Schwer krank.

5⁵⁹ 30°.

6³⁰ 33°.

6⁴⁰ Ziemlich munter. Am folgenden Tage ganz gesund.

K 105, 320 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,2° C.

6³⁰ Ins Wasser (10° C).

6³⁴ Aus dem Wasser. Gleich darnach Temperatur 30° C.

6³⁸ HS. 0,05 iv. (2-fach tödliche Dosis).

6⁴⁵ Unruhig, zittert und zuckt.

6⁴⁶ Schwer krank, 26° C.

7^b In den Brutschrank gestellt.

7³⁰ Temperatur 33° C. Am folgenden Tage ganz gesund.

K 106, 330 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 39,4° C.

5³⁶ Ins Wasser (10° C).

5³⁹ Aus dem Wasser. Gleich darauf Temperatur 28° C.

5⁴⁶ HS. 0,075 (3-fach tödliche Dosis) iv. Darauf Temperatur. 26° C.

5⁵⁰ Ruhig, aufrecht.

5⁵⁶ Leichte Krämpfe, dyspnoisch.

6^b 26° C.

6¹⁶ 25° C, in den Brutschrank.

6³¹ 28° C, Seitenlage.

7^b 30° C, schwer krank.

7³¹ Zustand gebessert, aus dem Brutschrank heraus. Am folgenden Tage ganz gesund.

K 108, 320 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,9° C.

3¹³ Ins Wasser (10° C).

3¹⁷ Aus dem Wasser. Gleich darauf Temperatur 26° C.

3²⁴ HS. 0,075 (3-fach tödliche Dosis) iv.

3²⁶ Zuckung, leichte Sprünge.

3²⁷ Seitenlage.

3²⁸ Reflexlos.

3²⁹ Tot. Sektion: Lunge stark aufgebläht. Herz schlägt, Blut nicht geronnen.

K 84, 360 g.

Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38° C.

6^b Ins Wasser (10° C).

6⁴ Aus dem Wasser. Gleich darauf Temperatur 29° C.

6¹⁶ HS. 0,1 (4-fach tödliche Dosis) iv. Gleich darnach 26° C.

6¹⁸ Unruhig, zuckt.

6²⁰ Kann sich nicht bewegen, sitzt jedoch aufrecht, erholt sich.

K 107, 340 g.

Vor der Kälte 38,4° C.

6⁸ Ins Wasser (10° C).

6²² Aus dem Wasser. Gleich darnach Temperatur 28° C.

6²⁸ HS. 0,125 (5-fach tödliche Dosis) intravenös injiziert.

6²⁹ Seitenlage.

6³⁰ Dyspnoisch. Hinterbeine gelähmt.

6⁴² Temperatur 23° C.

6⁵⁰ Tot ohne Krämpfe. Sektion: Lunge sehr wenig gebläht, Herz schlägt, Blut ungeronnen.

Uebersichtstabelle.

Meerschweinchen, vorbehandelt am 15. XI. mit 0,02 Hammelserum subkutan.

No. des Tieres	Gewicht in g	Dosis pro 200 g	Multipla der tödlichen Dosis	Ausgang
97	370	0,01	.	krank, lebt
108	320	0,01	.	krank, lebt
85	340	0,025	1	tot in 7 Minuten
76	350	0,025	1	tot in 5 "
115	320	0,025	1	tot in 6 "
109	350	0,025	1	tot in 7 "
Mit vorheriger Wasserbehandlung.				
110	330	0,025	1	lebt
104	340	0,05	2	lebt
105	320	0,05	2	lebt
106	330	0,075	3	lebt
108	320	0,075	3	tot in 5 Minuten
84	360	0,1	4	lebt
107	340	0,125	5	tot in 1 Stunde

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß eine künstliche Herabsetzung der Körpertemperatur durch kalte Bäder die Empfindlichkeit der anaphylaktischen Meerschweinchen bei der Reinjektion bedeutend verringert. Alle Tiere vertrugen die doppelte tödliche Dosis. In einem Fall erlag allerdings das abgekühlte Tier bereits der 3-fach tödlichen Menge; in zwei weiteren aber ertrug es sogar die 4—5-fache letale Dosis, und auch im letalen Falle ist der protrahierte Tod ohne Symptome und Obduktionsbefund der Anaphylaxie wohl zum Teil auf die Abkühlung an sich zurückzuführen.

Ganz analog dieser verlief eine weitere Versuchsreihe, in der zum Teil die Kälteeinwirkung erst nach erfolgter Reinjektion stattfand.

Die Meerschweinchen wurden am 11. Jan. 1912 subkutan mit Hammelserum 0,02 präpariert.

Reinjektion am 26. Jan. 1912 mit Hammelserum intravenös.

A. Bestimmung der tödlichen Dosis.

K 60, 280 g.

11³⁸ Injektion 0,01 HS. pro 200 g.

11⁴⁰ Krämpfe.

11⁴² Seitenlage

11⁴³ Reflexe erloschen, tot. Typische Lungenblähung, Herz schlägt.

31*

- K 56, 210 g.
 12²⁰ Injektion 0,0075 HS.
 12²⁸ Krämpfe, Sprünge.
 12²⁴ Seitenlage.
 12²⁵ Tot. Sektionsbefund: typisch.
- K 51, 280 g.
 1⁸ Injektion 0,0075 HS.
 1⁵ Krämpfe, Sprünge.
 1⁶ Tot. Sektionsbefund: typisch.
- K 59, 300 g.
 1¹⁸ Injektion 0,0075 HS.
 1²¹ Sprünge, Krämpfe.
 1²² Seitenlage, Reflexe erloschen. Sektionsbefund: typisch.
- K 58, 300 g.
 12⁴⁵ Injektion 0,0075 HS.
 12⁴⁶ Krämpfe, Seitenlage.
 12⁴⁷ Reflexe erloschen. Sektionsbefund: typisch.
- K 52, 230 g.
 12⁵⁵ Injektion 0,005 HS.
 12⁵⁸ Krämpfe, Sprünge.
 12⁵⁹ Erholt sich.
- K 57, 250 g.
 12³⁴ Injektion 0,0025 HS.
 12³⁶ leicht krank, bleibt leben.
- B. Reinjektion nach vorheriger Kaltwasserbehandlung.**
- K 54, 250 g.
 2⁵⁵ Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,1° C. 3 Minuten im kalten Wasser (10° C).
 2⁵⁹ Temperatur 36,3° C.
 3⁴⁵ Temperatur 30° C. Wieder ins kalte Wasser (10° C).
 3⁵² Temperatur 25° C.
 3⁵⁵ Injektion 0,015 HS. (2-fach tödliche Dosis).
 4¹⁰ Temperatur 24° C. Schwer krank, aber keine Krämpfe.
 4¹⁵ In den Brutschrank gestellt.
 4⁵⁰ Temperatur 24,5° C.
 6^b Temperatur 25° C.
 7^b Temperatur 29° C. Etwas munter, geht spontan herum. Aus dem Brutschrank. Am folgenden Tage ganz gesund.
- K 53, 290 g.
 3⁵⁵ Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38,8° C. 3 Minuten im kalten Wasser (10° C).
 4^b Temperatur 26° C. Wieder 3 Minuten ins kalte Wasser (10° C).
 4¹⁰ Temperatur 26° C.
 4¹⁵ Injektion 0,037 HS. (5-fach tödliche Dosis).
 4²⁵ Temperatur 23° C. Keine Krämpfe, sehr schwach.

Einfluß der Körpertemperatur präparierter Meerschweinchen etc. 451

- 4⁵⁰ Temperatur 25° C. In den Brutschrank gebracht.
6^a Temperatur 25° C.
7^b Temperatur 26° C. Matt. Am folgenden Tag vollkommen gesund.
- K 47, 280 g.
Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38° C.
4²⁸ Ins Wasser (10° C) während 3 Minuten.
4³⁵ Temperatur 29,8° C.
5^a Temperatur 31,2° C. Wieder ins Wasser, 3 Minuten darnach
Temperatur 21° C.
5¹⁵ HS. 0,053 (7-fach tödliche Dosis) pro 200 g injiziert, gleich nach
der Injektion Temperatur 21° C.
5²⁰ Schwer krank, kann kaum stehen.
5⁴⁰ Allmählich ohne Krämpfe eingegangen.
Sektion: typische Lungenblähung.
- K 55, 270 g.
Vor der Kälteeinwirkung Temperatur 38° C. 3 Minuten ins Wasser.
4⁵⁰ Temperatur 26,6° C.
5³⁰ Temperatur 29° C. Wieder ins Wasser, 3 Minuten.
5³⁵ Temperatur 22° C.
5⁴⁰ HS. 0,053 pro 200 g injiziert (7-fach tödliche Dosis), gleich nach
der Injektion 22° C.
5⁵⁵ Temperatur 21°.
6^a In den Brutschrank gebracht.
6⁴⁵ Temperatur 26° C.
7^b Temperatur 26° C. Matt, zittert von Zeit zu Zeit. Während
der Nacht eingegangen. Sektion: Lunge kollabiert.
- K 50, 270 g.
4⁴⁵ Vor der Kälte Temperatur 38° C, 3 Minuten ins Wasser (10° C).
4⁵⁰ Temperatur 21° C.
5³⁰ Temperatur 24° C.
5⁵⁵ HS. 0,075 iv. (10-fach tödliche Dosis).
5⁵⁵ Temperatur 21° C.
6⁴⁵ Temperatur 24° C. Schwer krank, liegt auf der Seite.
7¹⁵ Somnolent, Seitenlage, von Zeit zu Zeit tiefes Atmen, während
der Nacht tot. Sektion: Lunge kollabiert.
- C. Nach der Reinjektion mit Kälte behandelte Tiere.
- K 49, 270 g.
Vor der Injektion 38° C.
6¹⁵ HS. 0,0075 pro 200 g iv. (1-fach tödliche Dosis), sofort ins Eis-
wasser (2° C) 1½ Minuten lang, Temp. bald darauf 30° C.
6³⁰ Kollaps, sehr krank.
7²⁰ Ohne Krämpfe, tot.
- K 46, 250 g.
Vor der Injektion 38° C.
6²⁸ HS. 0,0075 pro 200 g iv., sofort ins Eiswasser 1 Minute,
darauf 34° C.

- 6²⁶ Wieder ins Wasser (2° C).
 6²⁷ Aus dem Wasser.
 6²⁸ Temperatur 28° C.
 6³⁰ Kratzt sich.
 6³⁴ Temperatur 24,5° C.
 6³⁵ Dyspnoisch, etwas krank.
 6⁴⁵ Sträubt die Haare, krank.
 7^b Temperatur 28,5° C, geht spontan umher, etwas munter. Am folgenden Tage ganz gesund.

K 61, 260 g.

Vor der Injektion 38,4° C.

- 6⁴³ HS. 0,015 (2-fach tödliche Dosis) iv., gleich ins Wasser (2° C).
 6⁴³ Aus dem Wasser herausgenommen, Temperatur 35° C.
 6⁴⁴ Wieder ins Wasser.
 6⁴⁵ Aus dem Wasser, Temperatur 25° C, krank.
 7^b Temperatur 26° C, etwas munter, geht spontan, am folgenden Tage ganz gesund.

Uebersichtstabelle.

No. des Tieres	Gewicht in g	Dosis pro 200 g	Multipla	Ausgang
K 60	280	0,01	.	tot in 5'
K 56	210	0,0075	.	tot in 5'
K 58	300	0,0075	.	tot in 3'
K 51	280	0,0075	.	tot in 4'
K 59	300	0,0075	.	tot in 2'
K 52	230	0,005	.	schwere Krämpfe, erholt sich
K 57	250	0,0025	.	krank, lebt
Kältebehandlung vor der Injektion				
K 54	250	0,015	2	lebt
K 53	290	0,037	5	lebt
K 47	280	0,053	7	tot in 25'
K 55	270	0,053	7	tot in der Nacht
K 50	270	0,075	10	tot in der Nacht
Kältebehandlung nach der Injektion				
K 49	270	0,0075	1	tot in 65'
K 46	250	0,0075	1	lebt
K 61	260	0,015	2	lebt

Der Versuch verlief analog den vorhergehenden.

Die Abkühlung vor der Reinjektion schützt selbst vor der 5-fachen sonst tödlichen Dosis; aber auch bei der 7- und 10-fachen Menge erfolgt der Tod erst subakut nach erheblich längerer Zeit als bei den Kontrollen.

Auch die Kälteeinwirkung nach der Reinjektion bedingt einen ausgesprochenen Schutz.

Die nachstehende Versuchsreihe zeigt den Einfluß der Herabsetzung der Körpertemperatur auf die Reinjektion bei passiv präparierten Tieren.

Schutzwirkung der niedrigen Temperatur gegenüber der Reinjektion bei passiver Anaphylaxie.

Eine Serie von Meerschweinchen wurde mit je 0,5 Antihammelkaninchenserum intraperitoneal gespritzt; nach 24 Stunden Reinjektion mit Hammelserum.

A. Bestimmung der tödlichen Dosis des Hammelserums.

- K 135, 250 g.
4⁷⁹ HS. 0,02 injiziert, sofort unruhig, kratzt sich.
4⁸¹ Seitenlage.
4⁸⁶ Erholt.
- K 144, 300 g.
2⁴⁸ HS. 0,03 injiziert.
2⁶⁰ Fast kein Symptom, lebt.
- K 136, 270 g.
2⁶⁰ HS. 0,03 injiziert.
2⁶⁸ Leichte Krämpfe, lebt.
- K 145, 280 g.
3^b HS. 0,05 injiziert.
3¹ Urinabgang, Krämpfe.
3³ Seitenlage.
3⁴ Tot.
- K 138, 270 g.
3⁵ HS. 0,05 injiziert.
3⁷ Seitenlage.
3⁸ Tot.
- K 143, 300 g.
3²⁰ HS. 0,05 injiziert.
3²³ Typische Anaphylaxie, tot.
- K 134, 170 g.
4^b HS. 0,05 injiziert.
4³ Typische Anaphylaxie.
4⁴ Tot.

B. Eiswasserbehandlung nach der Reinjektion.

- K 137, 270 g. Temperatur 39° C.
3⁴⁵ HS. 0,05 (1-fach tödliche Dosis) iv., 3mal hintereinander je ½ Minute mit Pause von 3 Minuten ins Eiswasser.
3⁵⁹ Temperatur 25° C, schwer krank, während der Nacht tot.
Sektion: keine Lungenblähung.

- K 140, 220 g. Temperatur 38° C.
 4^b HS. 0,05 (1-fach tödliche Dosis) iv., darauf 3mal hintereinander ins Eiswasser, mit Pausen von 2 Minuten.
 4⁸ Temperatur 24° C.
 4¹⁰ Ohne Krämpfe tot. Sektion: typische Lungenblähung.
- K 130, 180 g. Temperatur 38,4° C.
 6²⁵ HS. 0,05 (1-fach tödliche Dosis), 2mal 1 Minute ins Wasser.
 6³⁵ Ziemlich schwach, Temperatur 24° C.
 7^b Munter, frißt. Am folgenden Tage ganz gesund.
- K 141, 240 g. Temperatur 38,6° C.
 6¹⁵ HS. 0,05 (1-fach tödliche Dosis), 3mal 1/2 Minute hintereinander mit Pause von 1 Minute ins Eiswasser.
 6²⁰ Temperatur 25° C, keine Krämpfe, während der Nacht tot. Sektion: keine Lungenblähung.
- K 139, 290 g.
 4⁶ HS. 0,05 (1-fach tödliche Dosis) iv., 3mal ins Eiswasser je 1/2 Minute.
 4¹² Temperatur 26° C, ohne Krämpfe, während der Nacht tot. Sektion: keine Lungenblähung.
- K 129, 230 g. Temperatur 38,6° C.
 3¹⁵ HS. 0,1 (2-fach tödliche Dosis) iv., 3mal hintereinander 1/2 Min. ins Eiswasser.
 3²⁸ Temperatur 23° C, geringe Krämpfe, während der Nacht tot. Sektion: keine Lungenblähung.

Uebersichtstabelle.

No. des Tieres	Gewicht in g	Dosis pro 200 g	Multipla	Ausgang
K 135	280	0,02	.	lebt
K 144	300	0,025	.	lebt
K 136	270	0,03	.	lebt
K 145	280	0,05	1	tot in 4'
K 138	240	0,05	1	tot in 3'
K 143	300	0,05	1	tot in 5'
K 134	270	0,05	1	tot in 4'
Mit Eiswasserbehandlung				
K 137	270	0,05	1	tot in > 5 Stunden
K 140	220	0,05	1	tot in 5'
K 141	240	0,05	1	tot in der Nacht
K 139	290	0,05	1	tot in > 5 Stunden
K 130	180	0,05	1	lebt
K 129	230	0,1	2	tot in > 5 Stunden

Auch bei der passiven Anaphylaxie tritt der Schutz, den die vorherige Abkühlung gegenüber der Reinjektion bietet,

bis auf einen Fall deutlich hervor; wenn hier die Resultate insofern weniger günstig liegen als bei der aktiven Anaphylaxie, daß die Tiere meist innerhalb der Nacht eingingen, so liegt das wohl daran, daß die Abkühlung zu intensiv mit Eiswasser und nicht bei 10° wie dort meist erfolgte.

Wenn wir nun der Ursache des Schutzes, den abgekühlte präparierte Tiere bei der Reinjektion zweifellos zeigen, nachgehen, so ergeben sich auf Grund unserer Anschauungen über das Wesen der Ueberempfindlichkeit zunächst drei Möglichkeiten:

1) die Abkühlung beeinflußt den Ambozeptor präparierter Tiere („anaphylaktischen Reaktionskörper“) im Sinne einer Verminderung;

2) die Abkühlung wirkt auf das Komplement im gleichen Sinne;

3) die relativ niedere Temperatur, bei der das injizierte Antigen mit dem Antikörper und Komplement zusammentrifft, bedingt eine trägere Reaktion zwischen diesen drei Komponenten und damit eine geringere Anaphylatoxinbildung.

Zu 1. Ueber den Einfluß der Temperatur auf die Ambozeptoren im tierischen Organismus liegen eine Reihe von Untersuchungen bereits vor, die sich allerdings mehr auf das Verhalten bei erhöhter Körpertemperatur (Fieber) beziehen [Rolly und Melzer¹⁾, Aronsohn und Citron²⁾, Lüdke³⁾, Lissauer⁴⁾, Friedberger und Bettac⁵⁾]. Den Einfluß der Abkühlung studierte nur Lissauer sowie Fukuhara.

Lissauer fand durch Abkühlung bei immunisierten Kaninchen eine Abnahme des hämolytischen Ambozeptors; seine Versuche sind jedoch wenig zahlreich und technisch nicht einwandfrei.

Fukuhara⁶⁾ fand im Gegensatz dazu bei der Abkühlung ebenso wie bei der Erhöhung der Körpertemperatur einen Anstieg.

Die Resultate über den Einfluß der Abkühlung auf den Antikörpertiter sind also wenig zuverlässig und widersprechen sich untereinander.

Für die vorliegenden Versuche kam es uns lediglich darauf an, festzustellen, ob die von uns angewandte kurz dauernde

1) Rolly und Melzer, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, Bd. 94, 1908.

2) Aronsohn und Citron, *Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther.*, Bd. 8, p. 13.

3) Lüdke, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, Bd. 95, 1909.

4) Lissauer, *Arch. f. Hyg.*, 1906.

5) Friedberger und Bettac, *Diese Zeitschr.*, Bd. 12, 1911, H. 1.

6) Fukuhara, *Arch. f. Hyg.*, 1908.

Kälteprozedur den Gehalt des Organismus an Ambozeptor beeinflussen. Wir konnten zur Prüfung die präparierten Meerschweinchen selbst nicht heranziehen, weil ihr Gehalt an durch die vitro-Methode nachweisbaren Antikörpern (Präzipitin) viel zu gering war. Wir benutzten deshalb Kaninchen, die mit Hammelblutkörperchen vorbehandelt waren.

24. Januar 1912.

Kaninchen 158 und 159. Zweimal, am 10. und 16., mit 2 ccm Hammelblut intravenös injiziert.

K 158. Temperatur 39,4° C. 15 Minuten in Wasser von 10° C. Temperatur nach der Kälteeinwirkung 27° C. Vor und nach der Kälteprozedur Blutentnahme (158 A und 158 B).

K 159. Temperatur 38,4° C. 20 Minuten in Wasser von 10° C. Temperatur nach der Kälteeinwirkung 26° C. Blutentnahme vor und nach der Kälteprozedur (159 A und 159 B).

Der hämolytische Titer war bei 158 A und 158 B 0,004, bei 159 beidemale 0,002. Es war also kein Unterschied nachzuweisen.

Wir haben dann für beide Tiere in beiden Serumproben noch die Normalagglutinine gegenüber Typhusbacillen bestimmt.

Verdünnung	158 A	158 B	159 A	159 B
1:8	—	—	—	—
1:16	+	+	—	—
1:32	++	++	+	+

Auch hier also keine nachweisbare Differenz.

Zu 2. Beeinflußt die von uns vorgenommene Kälteprozedur den Komplementgehalt der Meerschweinchen?

Nach Lüdke soll Erhöhung der Körpertemperatur meist eine Vermehrung des Komplementes zur Folge haben; nach zahlreichen Versuchen von Friedberger und Bettac an Kaninchen, deren Körpertemperatur durch den Fieberstich nach Aronsohn und Sachs erhöht war, trifft das nicht zu; nur der Ambozeptor (hämolytischer Normalambozeptor gegen Ziegenblut) erfährt eine Steigerung; der Komplementgehalt bleibt konstant.

Ueber das Verhalten des Komplementes bei künstlicher Herabsetzung der Körpertemperatur sind uns keine Untersuchungen bekannt geworden.

Wir selbst stellten folgende Versuche an:

1. Meerschweinchen, 350 g, Temperatur 38,4° C. Aus der Carotis wurden 3 ccm Blut entnommen (1 A). Darauf wurde das Tier 4 Minuten

ins kalte Wasser (5° C) gesetzt. Temperatur 26,5° C. Dann wurde es entblutet (1 B).

2. Meerschweinchen, 350 g, Temperatur 38,4° C. Gleichfalls aus der rechten Carotis 3 ccm Blut entnommen (2 A). Darauf wurde das Tier 6 Minuten ins Wasser gesetzt. Temperatur 23° C. Dann wurde es entblutet (2 B).

Von den 4 Blutportionen wurden Sera auf übliche Weise gewonnen. Der Komplementgehalt der 4 Serumproben wurde mit einem hämolytischen System geprüft. Als Ambozeptor wurden 2-fach lösende Dosen des Antihammel-Kaninchenserums benutzt.

Menge des Komplementserums	1 A	1 B	2 A	2 B
0,1	komplett	komplett	komplett	komplett
0,08	"	"	"	"
0,06	"	"	"	"
0,04	"	"	"	"
0,02	inkomplett	inkomplett	inkomplett	inkomplett
0,008	∅	∅	∅	∅

Resultat: Keine nachweisbare Veränderung des Komplementgehaltes durch die kurzdauernde Abkühlung.

Die Unempfindlichkeit abgekühlter Tiere beruht also weder auf einem Verschwinden des Antikörpers noch des Komplementes.

Sie dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß die Reaktion zwischen den drei zur Anaphylatoxinbildung im Organismus in Betracht kommenden Komponenten bei niederer Temperatur träger abläuft und sich daher nicht so plötzlich eine tödliche Giftdosis bildet. Wir sehen ja auch, wie sehr im Reagenzglas die Schnelligkeit der Anaphylatoxinbildung von der Temperatur abhängt; sie erfolgt nur dann momentan, wenn die Komponenten auf 37° vorgewärmt sind. Ob auch noch eine besondere Wirkung der Kälte auf den Organismus, speziell vielleicht auf das Gefäßsystem in unseren Versuchen eine Rolle spielt, mag offen gelassen bleiben.

Zusammenfassung.

Eine künstliche Herabsetzung der Körpertemperatur aktiv und passiv präparierter Meerschweinchen durch kalte Bäder setzt die Ueberempfindlichkeit bedeutend herab (5—7mal).

Auch die Kälteeinwirkung nach der Reinjektion bedingt einen gewissen Schutz.

Die Unempfindlichkeit abgekühlter Tiere beruht weder auf einer nachweisbaren Verminderung des Antikörpers noch des Komplementes. Sie dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß die Reaktion zwischen den für das Zustandekommen an der Anaphylaxie nach Friedberger nötigen Komponenten Ambozeptor—Antigen—Komplement bei der niederen Körpertemperatur träger verläuft.

IV. Ueber den Einfluß des Volums der Reinjektionsflüssigkeit auf den anaphylaktischen Shock ¹⁾.

Von Dr. H. Tasawa aus Tokio.

Gelegentlich von Versuchen mit Atropin hatte Friedberger beobachtet, daß die Vergrößerung des Reinjektionsvolums an sich schon die Empfindlichkeit gegen die Reinjektion etwas herabsetzt. Wir haben auf Grund dieser Beobachtungen systematische Untersuchungen angestellt, über die im nachstehenden berichtet wird.

Es wurde die tödliche Reinjektionsdosis bei 17 bzw. 22 Tagen zuvor mit 0,02 Hammelserum präparierten Tieren einerseits in 1 ccm, andererseits in 4 ccm Volum ermittelt. Die Resultate ergeben bei 2 Serien von Tieren die nachstehenden Tabellen I und II.

Tabelle I.
Präparierung mit 0,02 Hammelserum. Reinjektion nach 17 Tagen.

Nummer der Tiere	Gewicht	Dosis des Hammelserums bei Reinjektion	Gesamt-Volum (mit phys. Kochsalzlösung)	Multipla	Resultat
296	320	0,005	1,0 ccm	$\frac{1}{4}$	lebt
319	300	0,01	1,0 "	$\frac{1}{3}$	" "
309	320	0,02	1,0 "	1	typ. tot 5'
283	290	0,02	1,0 "	1	typ. tot 3'
301	300	0,02	4,0 ccm	1	lebt
302	280	0,03	4,0 "	$1\frac{1}{2}$	" "
299	310	0,04	4,0 "	2	" "
311	280	0,05	4,0 "	$2\frac{1}{2}$	typ. tot 15'
297	280	0,1	4,0 "	5	typ. tot 5'

1) Vorgetragen in der Sitzung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie vom 1. Juli 1912. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 54, 1912 p. 242.

Tabelle II.

Präparierung 0,02 Hammelserum. Reinjektion nach 22 Tagen.

Nummer der Tiere	Gewicht	Dosis des Hammelserums bei Reinjektion	Gesamt-Volum (mit phys. Kochsalzlösung)	Multipla	Resultat
282	250	0,02	1,0 ccm	< 1	lebt
321	230	0,02	1,0 "	< 1	"
320	210	0,025	1,0 "	1	tot 5'
291	200	0,025	1,0 "	1	tot 3'
304	350	0,025	1,0 "	1	tot 3'
284	205	0,025	4,0 ccm	1	lebt
318	260	0,03	4,0 "	> 1	"
306	260	0,04	4,0 "	> 1	"
315	250	0,05	4,0 "	2	"
308	230	0,07	4,0 "	< 3	"
300	210	0,08	4,0 "	> 3	"
287	260	0,08	4,0 "	> 3	"
285	250	0,09	4,0 "	< 4	tot 5'
290	250	0,1	4,0 "	4	tot 4'
292	360	0,1	5,0 "	4	tot 4'

Es ergibt sich aus den beiden Tabellen, daß die Tiere, die das reinjizierte Serum in 4 ccm Volum erhalten haben, gegenüber der zweifach (Tabelle I) und selbst gegenüber der dreifach tödlichen Dosis (Tabelle II) geschützt sind.

Wenn man dagegen die tödliche Dosis zunächst allein injiziert und dann in die andere Vene sofort 3 ccm Kochsalzlösung nachspritzt, so tritt der schützende Einfluß der Volumvermehrung nicht hervor. Das zeigt die folgende Tabelle III bei 28 Tage zuvor präparierten Tieren.

Tabelle III.

Präparierung mit 0,02 Hammelserum. Reinjektion nach 28 Tagen.

Nummer der Tiere	Gewicht	Vorher injiziert. Dosis in 1,0 NaCl	Nachher injiziert. NaCl-Mengen in andere Vene	Resultat
38	240	0,025	—	lebt
43	260	0,05	—	tot 4'
37	230	0,075	—	tot 3'
34	210	0,05	3,0	tot 4'
41	290	0,075	3,0	tot 4'

Die Reinjektion erfolgte in allen Versuchen möglichst gleich schnell.

Zusammenfassung.

Die Reinjektionsdosis des Antigens ist bei präparierten Tieren abhängig von dem Volum der Injektionsflüssigkeit.

V. Ueber Anaphylaxie bei neugeborenen Meerschweinchen ¹⁾).

Von E. Friedberger und cand. med. Hans Simmel.

Man stößt in der Literatur zuweilen auf die Meinung, daß es sich bei der Anaphylaxie um eine Erscheinung handle, die nur die kleineren Laboratoriumstiere betrifft. Das ist unrichtig, denn gerade eines der für die Anaphylaxie empfänglichsten Tiere ist das Pferd; auch die Ziege ist, wie sich aus den gelegentlichen Erfahrungen bei Immunisierungsversuchen ergibt, außerordentlich empfindlich gegenüber der Reinjektion artfremden Eiweißes. An anderen großen Tierpezien, die wohl selten nur zur Heilserumdarstellung benutzt werden, liegen unseres Wissens Erfahrungen nicht vor. Es ist aber jedenfalls danach nicht weiter verwunderlich, daß auch der Mensch für die Anaphylaxie, d. h. für die wiederholte Injektion artfremden Serums relativ empfindlich ist. Wenn man die Krankengeschichten derjenigen, allerdings äußerst seltenen Fälle studiert, in denen es beim Menschen nach der ersten Injektion von Heilserum (Idiosynkrasie), mehr aber noch bei der Wiederholten zu foudroyanten Erscheinungen, ja zum Exitus kam [vgl. die ausgezeichnete Zusammenstellung von Gaffky ²⁾], so fällt es auf, daß es sich hier nicht, wie man von vorneherein erwarten sollte, nur um Kinder oder gar um kleine Kinder handelt, sondern meistens um erwachsene oder halberwachsene Individuen. Wenn man also diese Erfahrungen an einem ja vom experimentellen Standpunkt aus keineswegs homogenen, leicht zu übersehenden und abzuschätzenden Material berücksichtigt, so gewinnt man doch den Eindruck, daß besonders Individuen in den mittleren

1) Vorgetragen in der Sitzung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie vom 1. April 1913. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 57, 1913, p. 201.

2) Veröffentl. a. d. Gebiet d. med. Verwalt., Bd. 2, 1913, H. 8.

Jahren zur Anaphylaxie disponieren. Das legt den Gedanken nahe, diese Frage experimentell an einem gleichartigen und durchsichtigen Material einer Prüfung zu unterziehen. Wir wählten das klassische Versuchstier, das Meerschweinchen.

In der Anaphylaxieliteratur liegen bereits einige Beobachtungen vor, die dafür zu sprechen schienen, daß tatsächlich ausgewachsene Tiere empfindlicher sind wie junge. So hat Friedberger darauf hingewiesen, daß das ausgewachsene Kaninchen weit empfindlicher ist für die Anaphylaxie als die gerade wegen der relativen Unempfindlichkeit sonst allgemein angewandten kleinen Tiere von 1 kg Körpergewicht (Pick u. a.). Vergleichende Versuche an ausgewachsenen Meerschweinchen haben dann ergeben, daß 200 und 300 g schwere Tiere etwa gleich empfindlich sind, ja daß im allgemeinen die Symptome bei den 250—350 g-Tieren deutlicher und schneller in Erscheinung treten als bei denen von 200 g. Das entspricht auch den Erfahrungen von H. Sachs. Dagegen haben sich nach unseren eigenen Versuchen wieder sehr große Meerschweinchen von über 600 g, also ganz alte Tiere, wenig empfindlich erwiesen. Wir gingen nun daran, eben geborene saugende Meerschweinchen und andererseits Tiere, der Größe, wie sie gewöhnlich für Anaphylaxieversuche benutzt werden (200—250 g) zu präparieren und nach einem geeigneten Intervall die tödliche Reinjektionsdosis bei beiden Serien zu ermitteln.

Aktive Anaphylaxie: Eine Serie von 6 Meerschweinchen, vom Durchschnittsgewicht 250—350 g und 11 neugeborene saugende Tiere im Alter von 4—6 Tagen, deren Anfangsgewicht leider nicht bestimmt wurde, deren Gewicht am Ende der Präparierung aber aus der Tabelle zu ersehen ist, wurden mit je 0,01 Hammelserum subkutan behandelt. Die Tiere wurden unter möglichst gleichen Bedingungen gehalten, die Säuglinge natürlich bei ihren normalen Müttern. Am 16. Tag nach der Präparierung wurde die tödliche Dosis bei beiden Gruppen ausgewertet. Das Resultat zeigt die Tabelle I (siehe p. 462).

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, daß die Säuglinge sich bedeutend unempfindlicher bei der Reinjektion erwiesen als die ausgewachsenen Tiere. Sie vertrugen pro Tier bis zum 7-fachen,

Tabelle I.

Präparation 2. XII.	Gewicht 18. XII. 1912	Intravenöse Reinjektion 18. XII.	Resultat	
je 0,01 Hammel- serum subkutan	275	0,005	leicht krank	Dosis letalis minima 0,01 pro Tier, 0,03 pro kg von den kleinen Tieren ertragene Multipla der obigen Dosis 3 pro Tier = 7 pro kg
	315	0,01	schwer krank	
	330	0,01	tot 5'	
	248	0,02	„ 5'	
	345	0,02	„ 3 1/2'	
geboren 26.—28. XI. je 0,01 Hammel- serum subkutan	270	0,02	„ 4'	4 pro Tier = 10 pro kg 5 „ „ = 13 „ „ 5 „ „ = 10 „ „ 7 „ „ = 17 „ „
	143	0,03	kaum krank	
	112	0,04	tot 4'	
	137	0,04	„ 4	
	127	0,04	kaum krank	
	114	0,05	bleibt gesund	
	148	0,05	krank	
	128	0,07	schwer krank	
	120	0,07	tot 4'	
	114	0,1	„ 3'	
155	0,1	„ 4'		
117	0,1	„ 3'		

auf das Körpergewicht berechnet bis zum 17-fachen der für die größeren Tiere tödlichen Dosis.

Bei der folgenden Versuchsreihe wurden unter sonst gleichen Versuchsbedingungen (die Säuglinge waren durchgehends 3 Tage alt, das Körpergewicht bei Beginn des Versuches ist in der Tabelle verzeichnet) nicht die gleiche präparierende Dosis bei beiden Serien gegeben, sondern bei den ausgewachsenen Tieren 0,01 und bei den Säuglingen die entsprechende annähernd auf das Körpergewicht berechnete Menge. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle II (siehe p. 463).

Das Ergebnis stimmt im großen und ganzen mit dem der vorigen Tabelle überein. Das war zu erwarten, da bekannterweise auch bei erwachsenen Tieren Schwankungen in der Präparationsdosis innerhalb einer gewissen, relativ großen Breite ohne Einfluß auf die Höhe der tödlichen Reinjektionsdosis sind (Friedberger und Burckhardt). Aus beiden Versuchsreihen ergibt sich also übereinstimmend die bedeutend geringere Empfindlichkeit saugender Meerschweinchen.

Wenn wir nun nach der Ursache dieses merkwürdigen Verhaltens forschen, so ergeben sich auf Grund unserer Kenntnisse über den Mechanismus der Anaphylaxie drei Möglichkeiten:

Tabelle II.

Präparation 16. I. 1913	Ge- wicht 16. I. 1913	Ge- wicht 31. I.	Re- injektion 31. I.	Resultat		
je 0,01 Hammel- serum subkutan	275	340	0,01	leicht krank	Dos. let. min. (0,02) 0,01	
	280	355	0,01	schwer krank		
	255	325	0,01	tot 8'		
	270	305	0,02	schwer krank		
	250	300	0,02	tot 5 1/2'		
	250	325	0,02	" 5'		
13. I. geboren 0,003 0,0035 0,004 0,003 0,004 0,0025 0,004 0,004 0,004 Hammelerum subkutan	260	315	0,03	" 7'	die kleinen Tiere ertragen Multipla der für große tödlichen Dosis	
	70	107	0,04	tot 4 1/2'		
	85	135	0,05	leicht krank		5 pro Tier = 12 pro kg ¹⁾
	90	150	0,05	schwer krank		5 " " = 11 " "
	70	108	0,05	" "		5 " " = 15 " "
	100	155	0,06	leicht krank		6 " " = 12 " "
	62	112	0,06	tot 4'		
	90	180	0,07	" 5'		
	92	142	0,07	" 7'		
	92	135	0,08	" 5 1/2'		

I. Es wäre denkbar, daß ein geringerer Komplementtiter bei den saugenden Meerschweinchen eine ungenügende Anaphylatoxinbildung zur Folge hat.

II. Die saugenden Tiere könnten an sich unempfindlicher sein gegenüber dem bei der Anaphylaxie sich bildenden Gift.

III. Es wäre daran zu denken, daß die Intensität der Bildung des anaphylaktischen Antikörpers (Reaktionskörper) bei Säuglingen geringer ist.

Zu I: Diese Möglichkeit ist natürlich nicht von der Hand zu weisen²⁾. Aber es fragt sich, ob nicht noch andere Momente dabei eine wesentliche Rolle spielen, zumal namentlich bei den aktiv präparierten Tieren zur Zeit der Reinjektion auch bei den neugeborenen der Komplementtiter bereits normal gewesen sein dürfte.

Zu II: Ist das saugende Meerschweinchen weniger empfänglich gegenüber dem Anaphylatoxin? Hierüber gibt die folgende Tabelle III Auskunft.

1) Auch bei der Annahme der letalen Dosis 0,02 tritt die Differenz noch deutlich hervor.

2) Anmerkung bei der Korrektur: Siehe die Arbeit von Gózon y (diese Zeitschr., Bd. 19, Heft 2); vgl. auch die dort zitierte Arbeit von Sachs.

Tabelle III.

Das injizierte Anaphylatoxin war auf folgende Weise gewonnen worden: 40 ccm frisches Meerschweinchenserum wurden mit 5 Agarkulturen von *Bac. prodigiosus* versetzt, 2 Stunden bei 37° gehalten, über Nacht in den Eisschrank gestellt und dann zentrifugiert.

Gewicht 27. II.	Intravenöse Injektion 27. II.	Resultat	
220	1,5	leicht krank	
190	2,0	tot 30'	
210	2,0	tot 4'	Dosis letalis: 2,0
220	3,0	tot 5'	
geboren am 26. II.			Die kleinen Tiere ertragen Multipla der obigen Dos. let. pro kg:
67	0,75	leicht krank	1,1 ertragen
70	0,75	Krämpfe, erholt	1,1 "
70	0,8	kaum krank	1,2 "
55	0,85	tot 5'	3,0 nicht ertragen!
58	1,0	Krämpfe, erholt	3,5 ertragen
105	1,0	" "	1,0 "

Die Versuchsserie zeigt, daß die saugenden Tiere etwas weniger empfindlich sind für das Anaphylatoxin als die Kontrollen. Doch ist die Differenz nur eine geringe und jedenfalls nicht imstande, allein, ja nicht einmal wesentlich, die großen Unterschiede bei der aktiven Anaphylaxie zu erklären, zumal doch mehrere kleine Tiere, die die einfache tödliche Dosis erhielten, deutliche Krankheitssymptome zeigten.

Zu III: Ist die Bildung des anaphylaktischen Reaktionskörpers bei den saugenden Tieren herabgesetzt? In Anbetracht des Umstandes, daß beim Meerschweinchen bei der üblichen Art der Präparierung ein Reaktionskörper weder in der Form des Präzipitins noch des komplementablenkenden Antikörpers mit Sicherheit nachzuweisen ist, war eine direkte Vergleichung von vornherein ausgeschlossen. Wir mußten diese Frage indirekt zu entscheiden suchen. Wenn tatsächlich bei den Säuglingen eine verminderte Antikörperbildung statthat und diese die wesentliche Ursache der geringeren Empfindlichkeit ist, so mußte die Differenz zwischen saugenden und erwachsenen Tieren bei passiven Anaphylaxieversuchen wegfallen, da ja hier die Mitwirkung des Tieres bei der Bildung der Antikörper, die im Versuch in Aktion treten, nicht statthat.

Wir verfahren insofern entsprechend den Versuchen mit aktiver Anaphylaxie, daß wir die präparierenden Dosen des Antihammeleiweiß-Kaninchenserums C 45 in einer Serie bei den jungen und alten Tieren gleichgroß wählten, in der zweiten Serie den jungen Tieren auf das Körpergewicht berechnet die relativ gleiche Dosis des präparierenden Serums verabfolgten wie den erwachsenen. Das Resultat in beiden Serien zeigt die folgende Tabelle IV a und IV b.

Tabelle IV a.

Gewicht 12. II.	Präparation 12. II.	Intravenöse Reinjektion 13. II.	Resultat
210	je 1,0 Serum C 45 [Kaninchen → Hammel] intraperitoneal	0,07	schwer krank
210		0,1	leicht krank
220		0,1	tot 25'
210		0,1	tot 6'
210		0,2	tot 8'
geboren am 12. II.	je 1,0 Serum C 45 intraperitoneal	0,005	schwer krank
33		0,01	tot 6'
50		0,03	tot 6'
51			
11. II.			
50		0,05	tot 6'
50		0,1	tot 6'
50		0,1	tot 5'
12. II.			
90		0,1	kaum krank

Tabelle IV b.

Gewicht 17. II.	Präparation 17. II.	Intravenöse Reinjektion 18. II.	Resultat
210	je 1,0 Serum C 45 intraperitoneal	0,05	leicht krank
210		0,07	" "
210		0,1	schwer krank
210		0,1	tot 5'
geboren am 15. II.	je 0,3 Serum C 45 intraperitoneal	0,1	schwer krank
63		0,2	" "
62		0,3	leicht krank
17. II.			
65		0,4	schwer krank
65		0,6	" " tot 50'

Es ergibt sich, im strikten Gegensatz zu den Versuchen bei der aktiven Anaphylaxie, daß bei den passiv präparierten

Tieren eine verminderte Empfindlichkeit nicht zu konstatieren ist. In der Serie mit Dosierung auf das Körpergewicht haben wir bei Erwachsenen wie Jungen etwa die gleiche Empfindlichkeit, eher eine geringere bei den jungen Tieren¹⁾. In der Serie, in der die kleinen Tiere die gleiche Dosis erhielten wie die großen, also auf das Körpergewicht relativ mehr, haben wir sogar das umgekehrte Verhalten, nämlich eine bedeutend höhere Empfindlichkeit bei den kleinen Tieren. Dieser Versuch beweist besonders eklatant, daß tatsächlich die geringere Empfindlichkeit der jungen Tiere bei der aktiven Anaphylaxie auf einer verminderten Fähigkeit zur Antikörperbildung beruhen dürfte. Noch deutlicher zeigt sich übrigens die höhere Empfindlichkeit der jungen Tiere bei passiver Präparierung mit gleichen Dosen in einer folgenden Serie (Tab. V),

Tabelle V.

Gewicht 24. I.	Präparation 21. I.	Intravenöse Reinjektion 25. I.	Resultat
220	je 1,0 Serum No. 6 [Kaninchen → Hammel] intraperitoneal	0,4	leicht krank
220		0,6	" "
220		0,75	" "
am 21. I. geboren			
80	je 1,0 Serum No. 6 intraperitoneal	0,03	schwer krank
100		0,075	tot 3'
70		0,1	tot 3'
95		0,3	tot 4'
95	0,45 } Serum No. 6 intraperitoneal	0,075	kaum krank
95		0,3	" "
105		0,5	bleibt gesund
90		0,45	tot 3 1/2'

in der ein an sich wenig wirksames präparierendes Antihammelkaninchenserum No. 6 die erwachsenen Tiere überhaupt nicht deutlich überempfindlich zu machen vermochte, während sämtliche mit derselben Dosis behandelten jungen Tiere bis auf eins bei erheblich kleineren Reinjektionsmengen eingingen. Auch die Serie, bei denen nur mit einem aliquoten

1) Diese im Vergleich zu den Versuchen der Tabelle I geringe Differenz zugunsten der neugeborenen Tiere auch in diesem Versuch dürfte lediglich auf einen relativen Komplementmangel der noch sehr jungen Tiere beruhen.

Teil des Serums entsprechend dem Körpergewicht präpariert wurde, zeigt jedenfalls keine geringere Empfindlichkeit.

Zum Schluß soll noch einem Einwand begegnet werden, der gegen die Ergebnisse unserer Versuche mit passiver Anaphylaxie erhoben werden kann. Da hier Mengen bis zu mehreren Zehntel Kubikzentimeter Hammelserum injiziert wurden, liegt die Möglichkeit vor, daß die jungen Tiere vielleicht durch die primäre Giftigkeit, die jedes artfremde Serum bei der Injektion zeigt, geschädigt worden sind. Entsprechende Kontrollversuche ergaben aber, daß bei 4 Tage alten Meerschweinchen Mengen bis zu 0,75 ccm Hammelserum intravenös glatt vertragen wurden. Entsprechend fanden wir, daß bei Seris, die im Gegensatz zu dem relativ harmlosen Hammelserum eine hohe primäre Giftigkeit für Meerschweinchen haben, wie Aal- oder Rinderserum, die akut tödliche Dosis für Tiere von 70 g oder 240 g annähernd die gleiche ist.

Zusammenfassung.

Neugeborene Meerschweinchen sind am 16. Tage nach der aktiven Präparation bedeutend (8—10mal) weniger empfindlich gegenüber der Reinjektion artfremden Eiweißes als Tiere von 200—300 g Körpergewicht. Da dieser Unterschied in entsprechendem Grade sich weder bei Versuchen mit passiver Anaphylaxie noch im Anaphylatoxinversuch wiederfindet, ist er wohl im wesentlichen auf unvollkommene Bildung des anaphylaktischen Antikörpers bei den ganz jungen Tieren zurückzuführen

Nachdruck verboten.

Antwort auf die „Kurzen Bemerkungen über die Adsorption von Tetanustoxin“¹⁾.

Von Dr. Ernst Wolff.

In einer Bemerkung über meine Arbeit „Das Verhalten der Leukocyten in toxin- und toxin-antitoxinhaltigen Lösungen“²⁾ übt Loewe an der von mir auf eine Anregung Geheimrats v. Wassermann angewandten Methode Kritik und findet

1) Diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, p. 362.

2) Diese Zeitschr., Bd. 18, 1913, p. 562.

sie unzweckmäßig, wiewohl er anscheinend die Richtigkeit der mit ihr ermittelten Tatsache der Tetanustoxinbindung an Leukocyten nicht in Zweifel zieht. Er irrt, wenn er behauptet, daß ich der erste bin, der von der gewöhnlichen Methode abgewichen ist. Diese soll in der Untersuchung der Außenlösung nach stattgehabter Behandlung mit dem auf Bindung zu untersuchenden Mittel auf die Abnahme ihrer Giftigkeit bestehen und nicht, wie ich es getan habe, auf Prüfung des bindenden Mittels selbst. In der Arbeit, die er selbst in seiner Kritik aufführt¹⁾, heißt es auf p. 362: „Eine sehr geringe Affinität zu Eiweißkörpern ließ sich allerdings durch ein empfindlicheres Verfahren (von mir gesperrt) nachweisen, da es gelang, durch Behandeln von Kasein mit Giftlösungen, mehrmaliges Waschen des so behandelten Kaseins und Injektion desselben Mäuse unter Tetanuserscheinungen zu töten.“

Auch mir ist es ebensowenig bei den Leukocyten gelungen, auf dem gewöhnlichen Wege eine Giftbindung zu konstatieren, obgleich ich dieselbe Lösung mit verschiedenen Leukocytenfraktionen hintereinander behandelt habe. Was die von mir angewandte Giftkonzentration anbetrifft, die Loewe anscheinend bemängelt (p. 365 oben), so bemerke ich, daß ich diese leicht hätte verringern können, falls ich nur mit der Leukocytenmenge gestiegen wäre. Ich glaube, daß Mancini unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse auch bei niedrigeren Giftkonzentrationen zu einem positiven Resultat gekommen wäre.

Die Daten, die ich in der Literatur²⁾ über die Giftbindung von Emulsionen verschiedener Organe fand, sind leider mangels Angabe der angewandten Organmenge nicht ohne weiteres zum Vergleich heranzuziehen. Daher ich denn auch die Behauptung Loewes, die er allerdings wieder einzuschränken scheint (p. 365), zum mindesten als verfrüht ansehen muß, daß „unter allen erdenkbaren bisher geprüften anorganischen, organischen und organisierten Materialien sich kein Objekt finden läßt, das ein so geringes Bindungsvermögen für Tetanustoxin besitzt, wie es nach diesen Zahlen den Leuko-

1) Landsteiner und Botteri, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 42, 1906, p. 41.

2) Ignatowski, Centralbl. f. Bakt., Bd. 35.

cyten zukommt“. Nehmen wir aber einmal an, daß die Leukocyten wirklich nicht besser als viele andere Organe und sogar schlechter als das lipoidreiche Nervensystem Gift aufnehmen können, so wäre damit keineswegs eine biologische Bedeutung dieser Funktion im Sinne eines Schutzes abgetan. Allerdings darf man nicht bei den einfachen Bedingungen des Reagenzglasversuches stehen bleiben, sondern muß die Verhältnisse im lebenden Organismus ins Auge fassen.

Da lehrt denn die pathologische Anatomie, daß gerade durch das Wanderungsvermögen der Leukocyten an den Infektionsherd im Gewebe, der ja in den meisten Fällen gleichzeitig als Giftbildungsherd zu betrachten ist, die rein örtlichen Bedingungen gegeben sind, daß das Gift von den weißen Blutkörperchen gleichsam abgefangen wird, bevor es an edlere Teile, wie etwa das Nervensystem, herankommen kann, und daß demgegenüber das Moment des größeren Bindungsvermögens der Nervensubstanz in der Wirklichkeit ganz in den Hintergrund treten müßte.

Ferner beherbergen Leukocyten ein eiweißspaltendes Ferment (Jochmann u. a.). Auch deshalb lag eine Untersuchung auf Giftbindung nahe, als Grundlage zur Behandlung der Frage, ob Toxin im Organismus von Zellfermenten angegriffen wird (vgl. dazu Friedberger, Berl. klin. Wochenschrift, 1911, p. 1880).

Schließlich gehören die weißen Blutkörperchen zu den wenigen Zellarten, die man längere Zeit außerhalb des Organismus lebend erhalten kann.

Wertvoll erscheint mir in den Loeweschen Bemerkungen seine Forderung, die verwandte Leukocytenmenge im einzelnen Falle anzugeben. Von den in meiner Arbeit angegebenen 4 Versuchen habe ich bei zweien durch Auszählung der weißen Blutkörperchen dieser Forderung Genüge zu leisten mich bemüht. Wenn es darauf ankäme, das Giftbindungsvermögen verschiedener Gewebsarten zu vergleichen, so würde sich übrigens eine Abwägung mehr empfehlen.

Auf die theoretische Seite des Problems, ebenso wie auf eine Würdigung der umfangreichen Literatur bin ich nicht eingegangen, was sich aus dem Charakter der Arbeit, auf deren Fortsetzung ich seinerzeit hoffen durfte, rechtfertigt.

Zu der Seitenkettentheorie habe ich, im Gegensatz zur Annahme Loewes (p. 362), bisher keine Stellung genommen. Die Frage, die ich bearbeite, nämlich das Schicksal des Toxin-Antitoxin-Komplexes, liegt außerhalb ihres Bereiches, wie ich am Anfang meiner Ausführungen andeutete (p. 562).

Nachdruck verboten.

Ueber das Verhalten des „Serumantitrypsins“ bei der Anaphylaxie und Hämolysinvergiftung.

Bemerkungen zu der Arbeit K. Meyers in Band 19, Heft 2 dieser Zeitschrift.

Von Professor Dr. Hermann Pfeiffer.

Während die Versuche Andos¹⁾ über das Verhalten der antiproteolytischen Serumwirkung bei der Anaphylaxie schon ihrer ganzen Natur nach mich nicht veranlassen konnten, gegen sie Stellung zu nehmen, zwingen mich die Ausführungen K. Meyers, zunächst einmal einige Hauptirrtümer und Fehler des Verfassers hier zu beleuchten, während ich mir vorbehalte, auf andere nach Durchführung neuer Versuchsreihen zurückzukommen. Dabei will ich, der Disposition des Autors folgend, die nachstehenden Feststellungen machen:

1) K. Meyer unterzieht zunächst meine Anschauung über die Entstehung der ersten positiven, der zweiten negativen und der dritten, gleichfalls positiven Phase der Antitrypsinkurve bei der Hämolysinvergiftung einer Kritik und bemängelt, daß ich letztere als bedingt durch die Fortwirkung des eingespritzten Hämolysins bei eintretender Erholung von den schweren Vergiftungserscheinungen ansehe. Er versteht nicht, wie es während dieser Zeitperiode zu einer neuerlichen Titersteigerung, also zu einer Anhäufung von Spaltprodukten im Serum kommen könne, da nach ihm doch „das Wohlbefinden der Tiere jetzt nicht gestört ist“. Eine eingehendere Kenntnis der ihn beschäftigenden Zerfallstoxikose hätte nun K. Meyer ohne weiteres belehrt, daß zu der Zeit der tertiären Titer-

1) Diese Zeitschr., Bd. 18, p. 1.

steigerung keineswegs, wie er annimmt, die Tiere gesund sind, sondern in Form von Fieber, Leukocytose etc. jene unverkennbaren, dabei aber leichten Folgen eines gesteigerten parenteralen Eiweißzerfalles darbieten, deren Kenntnis wir den Untersuchungen von Krehl und Matthes, von E. Friedberger und S. Mita verdanken. Diese können auftreten, wie hier neuerlich festgestellt werden möge: a) Sekundär, bei der Erholung nach Injektion stark toxischer und subletaler Dosen des Eiweiß der Vorbehandlung oder des Hämolysins nach Ueberstehen jenes schweren Zustandes, der sich in Temperatursturz, Leukopenie, Komplementschwund, Ungerinnbarkeit des Blutes, Darniederliegen des Eiweißstoffwechsels, also schweren Allgemeinerscheinungen zu erkennen gibt. b) Primär bei Darreichung kleinster Mengen des Eiweißes der Vorbehandlung oder des Hämolysins. Dementsprechend ist der Zeitpunkt ihres Auftretens und die Dauer dieser Phase durchaus abhängig von der Schwere der Erkrankung, demnach auch von der Größe der eingespritzten Eiweiß- oder Giftmenge. Gerade sie aber ist, wie ich mit de Crinis zeigen konnte, besonders geeignet, zu einem Studium der Wesenheit der Stoffwechselvorgänge bei den Zerfallstoxikosen, weil hier durch die schwere Erkrankung der Tiere nicht mehr, wie in der ersten Periode sekundäre Stoffwechselstörungen gegeben sind, welche das Charakteristische des ganzen Erkrankungsprozesses verdecken. Die Tiere sind also in der Phase der tertiären Titersteigung nicht, wie K. Meyer meint, gesund, sondern noch erkrankt. Wenn nun trotz der von uns nachgewiesenen neuerlichen Anhäufung von Eiweißspaltprodukten schwerere Krankheitserscheinungen, wie Temperatursturz, Leukopenie etc. hier ausbleiben, so möge der Verfasser unter anderem auch an die altbekannte, für die Hämolysinvergiftung zuerst von mir und S. Mita erbrachte Tatsache erinnert werden, daß das Ueberstehen einer Zerfallstoxikose einen Schutz gewährt gegen eine neuerliche, gleichartige Schädigung in kurzen Zeitintervallen (vgl. dazu die Titerbestimmungen bei wiederholten Hämolysinvergiftungen!).

2) Dem Verfasser ist es weiterhin unklar, woher bei der Anaphylaxie jene Eiweißspaltprodukte kommen, welche eine Titersteigerung veranlassen sollen. Es genügen, wie er richtig

sagt, bei der Anaphylaxie unter Umständen so geringe Mengen des Eiweißes der Vorbehandlung, um bei Einbringung in die Blutbahn die Erkrankung auszulösen, daß ihre Aufspaltung allein in einer Aenderung der Titerwerte sich nicht ausdrücken könne. Dagegen ist einzuwenden, daß eine solche Annahme, solange wir nicht über den Chemismus der Aufspaltung des eingebrachten Eiweißes im Organismus des überempfindlichen Tieres genauestens orientiert sind, die Hemmungskraft der dabei entstehenden Eiweißbausteine nicht ausgewertet haben, vorschnell und keineswegs experimentell gestützt ist. Ferner ist die Frage, ob lediglich das Eiweiß der Vorbehandlung oder nicht auch das des sensibilisierten Tieres angegriffen wird, heute keineswegs einwandfrei geklärt. Gerade in diesem Punkte möchte ich K. Meyer auf meine einschlägige Arbeit mit S. Mita („Zur Kenntnis der Eiweiß-Antieiweiß-Reaktion“) in dieser Zeitschrift, sowie auf meine Monographie über das Problem der Eiweißanaphylaxie verweisen, wo er sich weitere Belehrung über diese sehr komplizierte und, wie gesagt, noch nicht restlos gelöste Frage holen kann.

3) Was die Angriffe K. Meyers gegen die Rosenthalsche Anschauung über das Wesen der antiproteolytischen Serumwirkung anlangt, so hat ihr Begründer, wie mir bekannt ist, dagegen selbst das Wort ergriffen, so daß ich es mir vorläufig ersparen kann, in diese Diskussion einzutreten. Wohl aber möchte ich hervorheben, daß in einem Zeitpunkte, wo die Antikörpertheorie der antiproteolytischen Serumwirkung aus vielfachen Gründen hinfällig geworden ist, die Lipoidtheorie bei pathologischen Hemmungsverhältnissen gänzlich im Stiche läßt, Rosenthals Anschauung aber allein eine allgemein gültige Erklärung dieser Vorgänge gibt und sich mir nicht nur beim Studium der Anaphylaxie und Hämolysinvergiftung, sondern auch bei Verbrühungen, gewissen Psychosen usw. immer wieder als eine zutreffende Arbeitshypothese erwiesen hat, ich wohl berechtigt bin, mich auf sie so lange zu stützen und an sie als die heute bestfundierte zu wenden, solange nicht ihre Unrichtigkeit durch gewichtige Gründe nachgewiesen ist. Zu diesen letzteren zähle ich die Behauptung K. Meyers über die Aussalzbarkeit der hemmenden Körper

durch Ammonsulfat, ihre Thermolabilität und das ihnen mangelnde Dialysiervermögen keineswegs, da diese seine Angaben nicht unwidersprochen geblieben sind (vgl. Rosenthals grundlegende Arbeit in den Folia serologica, wie seine in der Münchener medizinischen Wochenschrift erscheinenden Ausführungen). Daß aber jedenfalls eine Anhäufung von Eiweißspaltprodukten, wie sie durch einfache Retention nach beiderseitiger Nephrektomie oder bei Urannephritis — ein entsprechend langes Ueberleben der Kaninchen vorausgesetzt! — im direkten Gegensatz zu K. Meyers Annahme eine Verdoppelung, ja Verdreifachung des Serumtiters trotz der damit verbundenen Hydrämie bedingen kann, habe ich selbst in Gemeinschaft mit A. Jarisch und M. de Crinis festgestellt, Erfahrungen, die mich neben der Hemmungskraft des Harnes als experimentum crucis von der Richtigkeit der Rosenthalschen Anschauung überzeugt haben. Doch will ich selbst darauf hinweisen, daß unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse von Eiweißspaltprodukten die quantitativen Hemmungsverhältnisse physiologischer Seren verglichen z. B. mit der Hemmungskraft von Pepton Witte, ferner die geringe Zunahme des antiproteolytischen Vermögens von Serum nach seinem Abbau durch sein Antiserum (noch unveröffentlichte Versuche mit de Crinis) vorläufig sich nicht so ohne weiteres in die Rosenthalschen Anschauungen einpassen. Wir werden auf diesen Punkt später einmal zurückkommen.

4) Was nun die Versuche des Verfassers über Anaphylaxie und Hämolysevergiftung anlangt, so konnte er die unseren in zwei wesentlichen Punkten — sekundärer Abfall und tertiärer Anstieg der Hemmungswerte — bestätigen, aber die primäre Titersteigerung nur in vereinzelten Ausnahmefällen beobachten. Ich habe schon früher ausführlich dargetan und diese Tatsache, wie ich glaube, auch entsprechend begründet, warum es bei schwer geschädigten Tieren nicht immer leicht ist, die primäre Titersteigerung im Einzelfalle nachzuweisen, während das bei Anwendung des „Prinzips der Minimal-schädigung“ ohne weiteres und immer möglich ist. Im Wesen der Sache liegt es auch begründet, daß es zur Beurteilung derartiger Versuche durchaus notwendig ist, alle Einzelheiten

des Versuches — Dosis der ersten und zweiten Injektion, bzw. des Hämolytins, Temperaturreaktion, Verhalten der Temperatur zur Zeit des Todes usw. — an der Hand zu haben. Ich muß es daher doppelt bedauern, daß K. Meyer gerade in diesem, für seine Ausführungen wesentlichen Punkte von einer Veröffentlichung der Versuchsprotokolle absieht, die mich, so darf ich nach hundertfältigen Erfahrungen wohl annehmen, in den Stand gesetzt hätten, seine von den unseren abweichenden Ergebnisse richtig zu beurteilen und den Widerspruch aufzuklären. Ich kann daher auch die von dem Verfasser aufgeworfene und strikte verneinte Frage, daß das Fehlen der primären Titersteigerung in seinen Versuchen durch eine Blutentnahme zu einem unrichtigen Zeitpunkte bedingt gewesen sei, nicht endgültig entscheiden. Hängt das doch nach allem von mir und meinen Mitarbeitern Festgestellten zu sehr von der Erkrankungsphase des Tieres zur Zeit seiner Tötung ab. Doch glaube ich nach all unseren vielfachen gegenteiligen und ausführlich mitgeteilten Erfahrungen über primäre Titersteigerung und sekundären Kurvenabfall, daß dieses Moment — Blutentnahme in einem unrichtig gewählten Zeitpunkte — nicht nur nicht, wie der Verfasser meint, „auszuschließen sein dürfte“, sondern im Gegenteil sehr wohl in Betracht gezogen werden müßte. Freilich fehlen mir mangels genauer Versuchsprotokolle die Handhaben, diese aus unseren eingehenden Studien geschöpfte Vermutung auch zur Evidenz zu beweisen. Ich werde, wie eingangs erwähnt, gerade auf diesen Punkt später an der Hand eines neuen Tatsachenmaterials zurückkommen. Jedenfalls hat K. Meyer, wie er selbst zugibt, auch bei seiner Versuchsanordnung gelegentlich Titersteigerungen in der ersten Phase beobachtet. In solchen Fällen anzunehmen, daß der Titer a priori gesteigert war, ist nicht nur durchaus willkürlich, sondern dann auch unrichtig, wenn der Verfasser zu seinen Versuchen wirklich gesunde, nichtschwangere und ungebrauchte Meerschweinchen verwendete. In mehreren Hundert von Kontrollversuchen fand ich, in voller Uebereinstimmung mit E. Rosenthal, absolut konstante Titerwerte, die für das von mir verwendete Verdauungssystem 20 AE betragen. Wenn K. Meyer über gegenteilige Erfahrungen verfügt, so sind sie entweder durch ein nicht ganz einwandfreies

Tiermaterial oder durch Mängel in der Technik der Titerbestimmung begründet, zwei Faktoren, deren strengste Beachtung ich schon wiederholt als Grundvoraussetzung für die klaglose Durchführung derartiger Versuche bezeichnet habe.

5) K. Meyer führt ferner, auf der Antikörpertheorie stehend, die von uns zuerst genauer studierte Verminderung der antiproteolytischen Serumwirkung zurück auf das Auftreten der sogenannten „negativen Phase“, auf das Absinken des Antikörpergehalts nach Antigeneinverleibung. Dagegen ist zu bemerken, a) daß heute die Frage nach der Antikörpernatur der hemmenden Körper als im negativen Sinne beantwortet angesehen werden muß, b) daß keinerlei Parallelismus zwischen dem Auftreten der „negativen Phase“ und der Verminderung der antiproteolytischen Serumwirkung besteht. Insbesondere bei leichteren Vergiftungen, aber auch nach den schwersten ist, wie ich mit de Crinis zeigen konnte, der sekundäre Abfall der antiproteolytischen Serumwirkung zu einer Zeit (6—10, 24—48 Stunden) völlig aus dem Krankheitsbilde verschwunden, ja hat der tertiären Titersteigerung Platz gemacht, wo die negative Antikörperphase voll entwickelt noch anhält, ein Umstand, der allein den Erklärungsversuch Meyers als völlig unzutreffend charakterisiert. c) Während die negative Phase in der Antikörperproduktion auch nach Einverleibung kleiner Antigenmengen unverkennbar eintritt, fehlt, wie ich gleichfalls für die Hämolysinvergiftung erwiesen habe, unter solchen Versuchsbedingungen (bei leichter Erkrankung mit dem Eintreten der Immunität) der Abfall der antiproteolytischen Serumwirkung unter die Norm vollständig, ja bei Anwendung des Prinzipes der Minimalschädigung sehen wir lediglich einen Anstieg über die Norm als Ausdruck einer absoluten Steigerung der parenteralen Zerfallsvorgänge am Eiweiß. d) Der Titerabsturz tritt bei geeigneten Versuchsbedingungen auch bei Verbrühung, nach Organin-, Harn-, Peptoninjektionen ein, Eingriffe, die nicht mit einer Antigeneinverleibung verbunden sind, nach dem Stande unseres Wissens demnach auch nicht Anlaß zur Entwicklung einer „negativen Phase“ geben dürften. Es sind dies vier Beweismomente, welche allein die Unrichtigkeit der Annahme des Verfassers erhärten.

6) Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Absinken der Hemmungskurve im toxischen Shock sucht K. Meyer in einer Verdünnung des Blutes durch Lymphe und Gewebsflüssigkeit und meint: „Es darf nun wohl als sicher angenommen werden, daß Lymphe und Gewebsflüssigkeit weniger Antitrypsin enthalten als das Blutserum, so daß durch die Verdünnung des Serumantitrypsins es eine Verminderung erfahren muß.“ Mit solchen a priori-Annahmen hat es immer etwas Mißliches, besonders wenn sie, wie in diesem Falle, durch Versuche nicht gestützt scheinen. Gerade über diese Frage aber habe ich in Gemeinschaft mit de Crinis in Verfolgung anderer Ziele quantitative, bisher unveröffentlichte Versuche angestellt. Hinsichtlich der Lymphe konnten wir zu sicheren Resultaten deshalb nicht kommen, weil ihre Eigentrübung ein genaues Ablesen der Hemmungswerte bisher unmöglich machte. Hinsichtlich der Gewebsflüssigkeit konnten wir aber an auf ihren Eiweißgehalt geprüften Preßsäften von Kaninchen und Meerschweinchen feststellen, daß ihr Hemmungswert nicht nur nicht gleich ist dem des Serums, sondern dasselbe sogar etwas zu übertreffen scheint, Erfahrungen, die gleichfalls in ihrer Bedeutung an anderem Orte gewürdigt werden sollen. Schon das weist darauf hin, daß der Annahme des Verfassers, der Abfall sei bedingt durch Verdünnung des Blutes infolge der Blutdrucksenkung, wenig Beweiskraft innewohnt. Daß sie unrichtig ist, ergeben unsere Studien über den Verbrühtod und die Urämie (vgl. H. Pfeiffer, Das Problem des Verbrühtodes, Monographie bei Ed. Hölzel, Wien 1913, und H. Pfeiffer und M. de Crinis, diese Zeitschr., Bd. 18, Heft 1). Sehen wir doch unter geeigneten Versuchsbedingungen bei dieser Erkrankung des Meerschweinchens zur Zeit, wo das Blut infolge des Flüssigkeitsverlustes nach außen eine beträchtliche Eindickung erfährt, der Eiweißstoffwechsel der letal geschädigten Versuchstiere aber darniederliegt, gleichfalls ein Absinken der Titerwerte unter die Norm, andererseits bei der Retentionsurämie trotz eintretender Hydrämie zunächst keine Veränderung der Hemmungskraft, agonal aber ein Ansteigen. Die Angabe K. Meyers, daß durch weitgehende Blutentziehung die Titerwerte etwas absinken, kann ich für pathologische Seren (Urämie), und nur für diese, nicht

aber für physiologische, nach Versuchen, die Prof. O. Löwi anregte und mit mir durchführte, bestätigen.

7) Aus dem im vorstehenden Festgestellten ergibt sich, daß die Kritik, die K. Meyer an meinen und meiner Mitarbeiter Versuchen geübt hat, wohl in allen wesentlichen Punkten versagt hat, seine Anschauung über die Wesenheit der Antitrypsinkurve bei der Anaphylaxie und Hämolysungsvergiftung schwere Irrtümer und innere Widersprüche aufweist und ich wohl berechtigt bin, an meinen früher geäußerten Anschauungen und beobachteten Tatsachen vollinhaltlich festzuhalten. In eine Fortsetzung der Diskussion werde ich gelegentlich einer neuen Veröffentlichung über dasselbe Thema eintreten.

Nachdruck verboten.

Ueber die sogenannte antitryptische Wirkung des Blutserums.

Erwiderung auf K. Meyers Aufsatz, diese Zeitschrift, Bd. 19, Heft 2.

Von **Eugen Rosenthal.**

In Band 7, Heft 5 der *Folia serologica* hatte ich Gelegenheit, eine Versuchsreihe über die antitryptische Wirkung des Blutserums zu veröffentlichen. Auf Grund dieser Versuche konnte ich eine Erklärung dieser Eigenschaft des Serums geben, welche geeignet war, das Vorhandensein derselben unter physiologischen Zuständen und ihre Steigerung unter pathologischen Verhältnissen einheitlich, klar und einfach verständlich zu machen. — Es war das Prinzip der Reversibilität der Enzymreaktionen, worauf ich mich hierbei stützte, indem ich zeigen bzw. mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen konnte, daß die hemmenden Agentia mit den Spaltungsprodukten des „antigenen“ Enzyms identisch sind.

In einer Arbeit über das Verhalten des sogenannten Serumantitrypsins bei der Anaphylaxie sieht sich K. Meyer auf Grund seiner etwa vor 2 Jahren erschienenen diesbezüglichen „kritischen“ Publikation veranlaßt, einen Versuch zu

machen, die einigermaßen geklärten Verhältnisse der Antitrypsinwirkung wieder einmal zu verwickeln.

Ich unterließ seinerzeit, den Ausführungen Meyers entgegenzutreten, zumal doch jeder Kundige leicht einsehen konnte, daß Versuche anderer Autoren von Meyer oft nicht genügend sorgfältig wiederholt wurden, daß sich in seiner Arbeit Widersprüche finden und schließlich, daß ihm Dinge, deren Kenntnis zur richtigen Beurteilung der uns beschäftigenden Fragen unerlässlich ist, nicht genügend geläufig sind. — Da sich indessen Meyer in seinem soeben erschienenen Aufsatz auf diese seine frühere Publikation stützen möchte, will ich es diesmal nicht unterlassen, die diesbezüglichen Verhältnisse in aller Kürze klarzulegen.

Bezüglich der Thermoresistenz des Antitrypsins behauptete ich bekanntlich eine relative Thermostabilität bis zu 65° C. — Meine diesbezügliche Angabe steht nicht allein, sondern dasselbe wird auch von Döblin, Achalme und Bauer behauptet. Meinen Angaben entsprechend fand neuerdings auch V. Fresemann (Fol. microbiol., Bd. 1, Heft 3) eine Thermostabilität von 65—70°. Döblin konnte sogar die Kockstabilität des Antitrypsins beobachten. Eigene Versuche über den letzteren Punkt stehen mir nicht zur Verfügung, aber selbst wenn das Antitrypsin die Siedehitze nicht verträgt, so spricht dies durchaus nicht gegen die Annahme, daß die Hemmung der Trypsinwirkung durch chemisch gut definierte Körper erfolgt.

Man denke nur daran, wie zahlreiche chemisch gut definierte Körper durch die Siedehitze verändert werden und ihre Struktur in irgendeiner Weise beeinflusst wird. Bezüglich der Ursache, welche die Abnahme der Hemmung über 65—70° bewirken, ist es sehr wahrscheinlich, daß das bei diesen Temperaturen koagulierte Eiweiß eine Reihe von Körpern adsorbiert, unter welchen sich auch die hemmenden Eiweißbausteine befinden. — Daß diese Voraussetzung den Tatsachen entspricht, beweisen die Versuche, welche ich mit der folgenden Anordnung ausführte:

Bestimmte Mengen von Aminosäuren werden mit koaguliertem Eiweiß zusammengebracht und die Menge der Aminosäuren wird nach Verlauf von einer Stunde wieder bestimmt.

Die Einzelheiten sowie das Resultat eines solchen Versuches sind im folgenden wiedergegeben:

Je 20 ccm einer $n/_{10}$ -Glykokoll-, Alanin- und Leucinlösung werden gemischt; bei der Formoltitrierung von 20 ccm dieses Gemisches werden 9,7 ccm $n/_{8}$ $Ba(OH)_2$ verbraucht; 30 ccm des erwähnten Gemisches wurden auf 1 Stunde mit 5 g in kleine Stücke zerschnittenen koagulierten Eiereiweißes zusammengebracht; nach Verlauf der erwähnten Zeit wurde filtriert und der Aminosäuregehalt von neuem bestimmt: so ergab sich, daß hierbei nur 7,9 ccm $Ba(OH)_2$ verbraucht wurden; die Menge der vom koagulierten Eiweiß adsorbierten Aminosäuren war somit 5,04 mg Aminosäuren-N gleich. — (Ein gleichzeitig ausgeführter Parallelversuch ergab dasselbe Resultat.)

Obwohl dieser Versuch nur qualitativ ist und nicht über quantitative Verhältnisse einen genauen Aufschluß gibt, geht aus ihm mit aller Klarheit hervor, daß in einem System, welches aus einem Eiweißkörper und einer bestimmten Menge von Aminosäure besteht, die Menge der letzteren beinahe um 20 Proz. abnehmen kann, wenn man das System einer Temperatur aussetzt, wo der betreffende Eiweißkörper koaguliert wird. Daß „ein Rest“ der Hemmungskraft selbst durch sehr hohe Temperaturen nicht verschwindet, ist ja übrigens auch Meyer geneigt zuzugeben.

Ein weiterer Punkt, den wir zu besprechen haben, ist die Frage der Dialyse der hemmenden Körper. Will jemand Versuche anderer Autoren nachprüfen oder zum Gegenstand einer Kritik machen, so war es bisher Brauch, sich stets der Versuchsanordnung des betreffenden Autors vollständig anzupassen. Scheinbar wollte Meyer auch in diesem Punkte etwas Neues bieten, kümmerte sich nicht im geringsten um meine Angaben, führte die diesbezüglichen Versuche ganz anders aus und ist noch zum Schluß überrascht, daß er zu einem anderen Resultat kam als ich und andere Autoren. — In bezug auf die Dialyse untersuchte ich 11 Sera; in 10 Fällen von diesen betrug die Dialyse 4—5 Tage; nach dem, was ich über Meyers Nachprüfungsmethodik bemerkte, dürfte es wohl niemanden überraschen, daß er nur 2 Tage hindurch dialysierte und daß er dabei zu einem negativen Resultate kam; selbst wenn aber Meyer 5 Tage hindurch dialysiert hätte, wäre er auch nicht zu einem richtigen Resultate gekommen, da er überdies nicht

bemerkte, daß die wirksamen Substanzen von ihm in einer 2,5 mal größeren Verdünnung geprüft wurden, als sie im Serum vorhanden waren. (Meyer dialysierte 2 ccm Serum gegen 50 ccm destillierten Wassers und engte dieses anstatt auf 2 ccm auf 5 ccm ein.) Man sieht wohl hieraus, daß es doch am zweckmäßigsten ist, stets den Originalangaben entsprechend zu arbeiten. Daß die Dinge tatsächlich nicht so liegen, wie sie sich Meyer vorstellt, zeigt, daß Zunz sich über diesen Punkt folgendermaßen äußert: „après cinq jours de dialyse le pouvoir empêchant du sérum est entièrement disparu, ou n'est que très minime.“

Es kann somit festgestellt werden, daß der Schluß Meyers, wonach meine Hypothese „sich damit erledigt, daß das Antitrypsin weder thermolabil noch diffusibel ist“, ein absolut unbegründetes Urteil vorstellt, welchem aus den weiter oben auseinandergesetzten Gründen nicht die geringste Beweiskraft zukommt.

Uebrigens scheint selbst Meyer von der Richtigkeit der Ansicht vollständig überzeugt gewesen zu sein, daß sich meine Arbeiten in dem von ihm gewollten Sinn mit seinem obigen Schluß bezüglich der Thermolabilität und Dialyse erledigen, und vorsichtshalber führt er einen weiteren Einwand an, welcher darin besteht, daß zwischen der antipeptischen und antitryptischen Wirkung quantitativ ein Unterschied besteht und somit eine notwendige Folge meiner Hypothese nicht vorhanden ist. Daß zwischen der Hemmungskraft des Serums Pepsin und Trypsin gegenüber eine quantitative Differenz vorhanden ist, ist wahr, aber auch kaum anders zu erwarten, denn beträgt in einem System die Menge der Albumosen und Peptone x , die der Aminosäuren y , so wird einem peptischen Enzym gegenüber nur die Menge x der vorhandenen Eiweißspaltungsprodukte seine hemmende Wirkung entfalten können, da doch Pepsin in der entgegengesetzten Richtung des Pfeiles nur dieselben Eiweißbausteine zu Eiweiß zu „katalysieren“ vermag, die durch seine Wirkung entstanden sind. Anders steht die Sache bei Trypsin: hier ist die Menge der hemmenden Eiweißabbauprodukte aus leicht verständlichen Gründen $x + y$. — Es ist also aus dieser einfachen Ueberlegung zu sehen, daß ein Parallelismus quantitativ a priori nicht vorhanden

sein kann. Das Hauptgewicht ist übrigens darauf zu legen, daß eine antipeptische Wirkung des Serums überhaupt vorhanden ist, was am besten der Umstand illustriert, daß die antipeptische Wirkung des Serums früher beobachtet und beschrieben wurde, als die antitryptische, ferner, daß die antipeptische Wirkung bei den meisten Zuständen gesteigert ist, wo eine erhöhte Hemmung des Trypsins beobachtet werden kann.

Die Beweiskraft meiner Argumente sucht schließlich Meyer dadurch zu entkräften, daß er auf Grund einer Angabe Hedins den hemmenden Einfluß der Eiweißspaltprodukte einfach in Abrede stellt; indem er behauptet, daß Peptone und Albumosen eine schwache, Aminosäuren dagegen überhaupt keine Hemmungswirkung haben.

Nach den Untersuchungen von Ostwald, Croft Hill, E. Fischer und Armstrong, M. Kremer, Kastle und Loevenhart und Taylor, welche ich in meinem ersten diesbezüglichen Aufsätze besprochen habe, konnte kein Zweifel sein, daß das Prinzip der Reversibilität für die Enzymreaktionen und allgemein für die Vorgänge im Organismus von besonderer Bedeutung und Wichtigkeit ist. — Speziell für die Eiweißabbauprodukte haben Kühne, Abderhalden und Gigon, ferner Bayliss die Gültigkeit dieses Gesetzes bewiesen, so daß heute das Prinzip der Reversibilität der Enzymreaktionen und die hierdurch bedingte Hemmungskraft der Eiweißabbauprodukte über jeden Zweifel feststeht.

Es ist wohl bedauerlich, daß diese wichtigen Arbeiten der Aufmerksamkeit Meyers entgangen sind [das diesbezügliche Tatsachenmaterial ist in den Werken Ostwalds (Allg. Chemie), Loeb's (Dynamik der Lebenserscheinungen), Eulers (Allg. Chemie der Enzyme) und Fraenkels (Dynamische Biochemie) zu finden], doch dürfte dieser Umstand die Tatsache der hemmenden Wirkung von Eiweißspaltprodukten nicht berühren.

Bezüglich des von Meyer angeführten Versuches Hedins muß noch bemerkt werden, daß eine Hemmung der Kaseinverdauung speziell durch Glykokoll aus dem einfachen Grunde nicht stattfindet, da Kasein zu den wenigen Eiweißkörpern gehört, welche wohl eine Reihe von Aminosäuren,

aber kein Glykokoll enthalten bzw. bei der Aufspaltung liefern (E. Fischer und E. Abderhalden, Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 44; zit. Röhmann, Biochemie, p. 277); im Sinne der Reversibilität der Enzymreaktionen wird aber die Proteolyse eines bestimmten Eiweißkörpers nur durch Abbauprodukte gehemmt, welche er zu liefern imstande ist.

Im vorliegenden Falle war somit eine Hemmung bereits aus theoretischen Gründen nicht zu erwarten.

Aus den vorstehenden Ausführungen dürfte wohl die vollständige Unhaltbarkeit der Einwände Meyers mit einer Klarheit hervorgehen, welche jede weitere Behandlung derselben als überflüssig erscheinen läßt.

In bezug auf die Frage, auf welche Weise die anti-proteolytische Wirkung des Serums entsteht, taucht von Zeit zu Zeit die bereits von den verschiedenen Autoren vielfach abgetane Vorstellung auf, wonach die Wirkung durch Lipoid e erzeugt wird. Dieser Ansicht ist zunächst entgegenzuhalten, daß die von diesen Autoren supponierten hemmenden Körper, wie allgemein bekannt, im Aetherextrakt nicht nachweisbar sind; wäre die Wirkung durch lipoid e Substanzen erzeugt, so müßte doch das hemmende Prinzip im Aetherextrakt nachweisbar sein. Ferner, wenn diese Annahme zu Recht bestünde, müßte in Zuständen, wo ein erhöhter Gehalt des Serums an Lipoiden direkt chemisch nachgewiesen ist, auch eine erhöhte antitryptische Wirkung zu beobachten sein. Diesbezüglich will ich nur auf die bekannten Resultate von Peritz (Zeitschr. f. exper. Pathol., Bd. 5), sowie auf K. Kawashimas Versuche (ebenda Bd. 8) hinweisen: obwohl von Peritz der Beweis geführt wurde, daß bei Syphilis und parasyphilitischen Erkrankungen der Gehalt des Blutserums an Lipoiden wesentlich erhöht ist, konnte Kawashima bei den gleichen Erkrankungen keine höheren Hemmungswerte beobachten.

Im gleichen Sinne fielen auch Cobliners Versuche aus: in der Narkose konnte durchaus keine gesteigerte Hemmung beobachtet werden, obwohl es bekannt ist, daß dieser Zustand mit einem erhöhten Lipoidgehalt des Serums einhergeht. Bei bestimmten Zuständen dagegen, wo eine erhöhte antiproteo-

lytische Wirkung besteht, z. B. bei Anaphylaxie, bei Nephritis, ist es schwer anzunehmen, daß hier Lipoide im Spiele sind, dies ist zumindest nicht bewiesen.

Außer diesen Tatsachen, welche mit aller Entschiedenheit gegen die Richtigkeit der „Lipoidtheorie“ sprechen, ist noch zu erwähnen, daß die Extraktion mit Aether aus einem wässerigen Medium durchaus nicht die Lipoidnatur der betreffenden Körper beweist, da inzwischen auch der wasserfreie Aether wasserhaltig wird; daß hierdurch auch wasserlösliche Substanzen extrahiert werden können, liegt auf der Hand; wird zur Extraktion trockenes Serum herangezogen, so nimmt die hemmende Wirkung nur relativ wenig ab (Meyer), als Beweis dafür, daß die vorstehende Annahme richtig ist. Wer ein Serum jemals mit Aether extrahierte, dem wird es gewiß aufgefallen sein, daß das Serum nicht mehr klar, sondern vielmehr trübe geworden ist; die Ursache dieses Umstandes ist offenbar, daß infolge der Extraktion ein Teil der Eiweißkörper ausgefallen ist, was auch den Angaben von Meyer entspricht, wonach ein Teil der Eiweißkörper durch die Extraktion unlöslich wird. Hierdurch entstehen aber die gleichen Verhältnisse, wie ich sie bei der Frage der Thermostabilität des näheren besprochen; an der Oberfläche des ausgefallten bzw. unlöslichen Eiweißes werden Eiweißbauprodukte adsorbiert, ein Umstand, der die Entfaltung der Wirkungen dieser Körper verhindert. Wir sehen somit, worum es sich bei der neuerdings auch von Gammeltoft vertretenen Lipoidtheorie handelt: zunächst um Tatsachen, die mit meinen diesbezüglichen Ansichten durchaus nicht in Widerspruch stehen.

Dieser Theorie über die Hemmung der tryptischen Kaseinverdauung durch Lipoide stellte Meyer seine Antikörpertheorie gegenüber; bereits in meinem ersten diesbezüglichen Aufsatz wurden die gewichtigen Gründe, welche eine derartige Annahme im höchsten Grade unwahrscheinlich und mit den Tatsachen unvereinbar erscheinen ließen, näher besprochen, und ich möchte an dieser Stelle nur hervorheben, daß, wie mir neuere in dieser Richtung ausgeführte Versuche zeigen, zunächst ein jedes Serum die Wirkung von Pyocyaneustrypsin und Takadiastase hemmt. Wie ist dieser Befund mit der Antikörpertheorie vereinbar? Zunächst wäre es ja in bezug auf das

„Pyocyaneusantitrypsin“ denkbar, daß es von einer Infektion durch *B. pyocyaneus* herrührt, aber diese Möglichkeit dürfte nur recht selten erfüllt sein und die wahre Ursache des Pyocyaneustrypsins vorstellen. Nun, und für die Takadiastase besteht doch kaum die Möglichkeit, als Antigen in den tierischen Organismus zu gelangen; dennoch hemmt jedes Serum mehr oder weniger intensiv die proteolytische Wirkung dieses Fermentes, eine Tatsache, über die man nicht einfach hinweggehen kann. Zunächst zeigt sie, daß das Serum gegenüber den verschiedensten proteolytischen Fermenten eine hemmende Wirkung besitzt, ferner daß die Antikörpertheorie bereits bei der Beurteilung rein theoretischer Fragen völlig versagt; es dürfte wohl demnach nicht Wunder nehmen, daß sie für die Erklärung des „Serumantitrypsins“ in verschiedensten Zuständen und Erkrankungen nicht ausreicht und diese Serumwirkung nur in einem unwesentlichen Bruchteil zu erklären vermag.

Die Ansicht, wonach die antitryptische Wirkung des Blutserums ein Antikörper intracellulärer proteolytischer Fermente ist, vertrat auch Braunstein; dieser Ansicht Braunsteins sieht sich Meyer auf p. 481 seiner erwähnten kritischen Arbeit veranlaßt, entgegenzutreten, „da sich gegen diese Hypothese schon theoretisch Bedenken geltend machen“.

Dies ist zweifellos richtig, nur ist das eine nicht verständlich, warum dann Meyer auf der folgenden Seite die Ansicht ausspricht, wonach das Antitrypsin einen Antikörper von „intracellulären Tryptasen“ vorstellt. Wie dies wohl jeder einsieht, ist das von Meyer supponierte Antigen mit dem von Braunstein identisch und ist nur moderner ausgedrückt; es ist doch recht erfreulich, daß er gegen seine eigene zweifellos unrichtige Hypothese theoretische Bedenken hat.

Wenn somit über die Unrichtigkeit der Lipoidtheorie und der Antikörpertheorie Meyers keine Zweifel bestehen, ist die von mir ausgesprochene Hypothese geeignet, die antiproteolytische Serumwirkung in jedem Zustand, wo sie zu beobachten ist, einfach und ungezwungen zu erklären, bei Nephritis, bei Morbus Basedowii ebenso wie bei der Schwangerschaft, bei Carcinom oder Anaphylaxie. Wenn meine Annahme hinreicht, daß wir mit ihrer Hilfe bestimmte Dinge unserem Verständnis näher bringen und man auf der durch dieselbe geschaffenen

Basis erfolgreich weiterarbeiten kann und zur Erkennung neuer Beziehungen kommt, wie dies zuerst Rusznyak und namentlich H. Pfeiffer im Verein mit seinen Mitarbeitern Jarisch und M. de Crinis in großangelegten Arbeiten zeigen konnte, so ist dies nur ein weiterer Beweis dafür, daß sie mit den Tatsachen in bestem Einklang steht.

Nachdruck verboten.

Ueber das Serumantitrypsin und sein Verhalten bei der Anaphylaxie.

Entgegnung auf die Bemerkungen von H. Pfeiffer und E. Rosenthal.

Von Dr. **Kurt Meyer.**

Da Pfeiffer sowohl wie Rosenthal ihre gegen meine Kritik gerichteten Einwände mit einer so zuversichtlichen Sicherheit vorbringen, daß sie einem diesen Fragen ferner Stehenden berechtigt erscheinen könnten, so sehe ich mich zu einer Erwiderung gezwungen¹⁾.

Ich wende mich zunächst gegen Rosenthal, da er ja die Theorie aufgestellt hat, daß die antitryptische Wirkung des Serums durch Eiweißspaltprodukte bedingt sei. Er glaubt meine Behauptung, daß das Antitrypsin thermolabil, durch Ammonsulfat aussalzbar und nicht diffusibel sei, womit seine Theorie hinfällig würde, nicht anerkennen zu können.

Was zunächst die Frage der Thermolabilität betrifft, so ist zu bemerken, daß Rosenthal diesen Begriff anders faßt als allgemein üblich ist. Während Fermente, Toxine, Antikörper, die zum Teil erst bei 70—75° zerstört werden, allgemein als thermolabil gelten, glaubt Rosenthal das Antitrypsin als thermostabil bezeichnen zu dürfen, weil es bei 65° noch nicht zerstört werden soll. Die Frage, wie es sich bei etwas höheren Temperaturen verhält, hat er nicht geprüft.

Allerdings soll nach Döblin²⁾ und Bauer³⁾ das Antitrypsin sogar coctostabil sein, doch stehen diese Autoren mit

1) Vgl. auch die kürzlich erschienenen Ausführungen Kämmerers in der Münch. med. Wochenschr., No. 34, p. 1873.

2) Döblin, diese Zeitschr., Bd. 4, 1909, p. 224.

3) Bauer, diese Zeitschr., Bd. 5, 1909, p. 186.

ihren Angaben völlig isoliert gegenüber der großen Zahl aller anderer Untersucher — darunter auch Achalmé und Victor Fresemann, die Rosenthal sonderbarerweise zu seinen Gunsten anführt — die sich mit dieser Frage befaßt haben und übereinstimmend bekunden, daß eine halbstündige Erhitzung auf 65—70° die antitryptische Wirkung des Serums aufhebt.

Nachdem diese Tatsache immer wieder von den verschiedensten Untersuchern festgestellt worden, sollten die Zweifel an der Thermolabilität des Antitrypsins endlich ein Ende finden.

Nach Ansicht Rosenthals würde aber auch die Thermolabilität des Antitrypsins mit seiner Theorie vereinbar sein. Es könnten „durch das bei diesen Temperaturen (65—70°) koagulierte Eiweiß“ Eiweißbausteine adsorbiert werden. Der von ihm hierfür angeführte Adsorptionsversuch mit koagulierte Eiweiß ist zu summarisch beschrieben, als daß ein Urteil über seine Beweiskraft möglich wäre. Auffällig ist sein Ergebnis jedenfalls, da eine so starke Adsorption von Aminosäuren jede Reststickstoffbestimmung im Blute als illusorisch erscheinen lassen würde.

Für die Antitrypsinfrage beweist aber der Versuch überhaupt nichts. Einmal verschwindet die antitryptische Wirkung bei 65° nicht zu einem Bruchteil, sondern fast quantitativ. Sodann erfolgt bei dieser Temperatur keine vollständige Koagulation des Eiweißes, und die etwa eintretenden Zustandsänderungen sind für Adsorptionsvorgänge jedenfalls so wenig günstig, daß selbst die Mehrzahl der sicher kolloidalen echten Antikörper nicht inaktiviert wird, eine Adsorption von Aminosäuren oder Peptiden also um so unwahrscheinlicher ist.

Auch den Begriff der Diffusibilität umgrenzt Rosenthal unzweckmäßig. Ihm scheint unbekannt zu sein, daß auch Kolloide ein geringes Diffusionsvermögen besitzen und daß der Uebergang zu der Diffusionsgröße der Kristalloide ein fließender ist. Wenn eine Substanz in 48 oder selbst in 24 Stunden nicht in merkbarer Menge diffundiert, so ist sie praktisch als nicht diffusibel zu bezeichnen und als Kolloid anzusehen. Dementsprechend habe ich meine Versuchsanordnung gewählt.

Wenn Rosenthal den Anschein zu erwecken sucht, als hätte ich einen Versuchsfehler begangen, so verschweigt er, daß bei der von v. Bergmann und mir ausgearbeiteten Antitrypsinmethode, die auch er anwendet, das Serum in verdünntem Zustande untersucht wird und daß diese Verdünnung genau von mir berücksichtigt wurde.

Nicht verständlich ist, wie Rosenthal Döblin und Zunz zugunsten seiner Ansicht anführen kann. Döblin, der erst nach Ablauf einer Woche die antitryptische Wirkung des dialysierten Serums langsam abnehmen sah, spricht sich ausdrücklich gegen die Möglichkeit einer Diffusion aus, und dasselbe ist bei Zunz¹⁾ der Fall, der allerdings die antitryptische Wirkung des Serums nach etwa 5 Tagen verschwunden fand, aber nachweisen konnte, daß das hemmende Prinzip von der Kollodiumwand adsorbiert worden war.

Die Fällbarkeit des Antitrypsins durch Ammonsulfat scheint Rosenthal nicht mehr zu bestreiten. Sie ist ja auch durch Jürgenson²⁾ nachgewiesen worden sowie indirekt durch die zahlreichen Autoren, die die antitryptische Wirkung zum größten Teil an die isolierte Albuminfraktion des Serums gebunden fanden. Auch aus der Beobachtung von Döblin, daß die antitryptische Wirkung beim Enteiweißen des Serums durch Kaolin verschwindet, und der von Zunz, daß sie durch Tierkohle stark herabgesetzt wird, ergibt sich die kolloidale Natur des Antitrypsins.

Meine Behauptung, daß das Antitrypsin des Serums thermolabil, durch Ammonsulfat ausfällbar und nicht diffusibel ist und daß schon damit die Spaltprodukthypothese Rosenthals erledigt sei, ist durch die Ausführungen dieses Autors also in keiner Weise widerlegt worden.

Ich hatte weiter darauf hingewiesen, daß das Antitrypsin nur tryptische Fermente des tierischen Organismus, nicht andere proteolytische Fermente hemmt. Wenn Rosenthal demgegenüber behauptet, daß Steigerung der antipeptischen und

1) E. Zunz, *Mém. de l'Acad. roy. de méd. de Bruxelles*, T. 20, 1909, p. 50.

2) Jürgenson, *Inaug.-Diss. Petersburg*, zitiert nach *Zeitschr. f. Immunitätsf., Ref.*, Bd. 3, 1911, p. 927.

antitryptischen Serumwirkung meist parallel gehen, so widerspricht dies wiederum den Tatsachen. Abgesehen von meinen eigenen Erfahrungen haben sowohl Oguro¹⁾ wie Lieblein²⁾ bei Carcinom keine nennenswerte Abweichungen der Antipepsinwirkung von der Norm feststellen können, obgleich hier das Serumantitrypsin fast regelmäßig stark vermehrt ist.

Andererseits sucht Rosenthal etwaige Differenzen zwischen Antipepsin- und Antitrypsinwirkung damit zu erklären, daß auf das Pepsin nur Peptone, auf das Trypsin dagegen Peptone sowohl wie Aminosäuren hemmend wirken. Ich gebe die Möglichkeit dieser Erklärung zu, obschon die experimentellen Unterlagen fehlen.

Wie will Rosenthal aber auf dem Boden der Spaltprodukthypothese erklären, daß das Antitrypsin auch die autolytischen Fermente, die doch die gleichen Spaltprodukte liefern wie das Trypsin, nicht hemmt, wie von mir festgestellt und von Opie, Barker und Dochez³⁾ bestätigt wurde, und daß es auch gegenüber Bakterientryptasen nach den übereinstimmenden Beobachtungen von mir und Kämmerer⁴⁾ unwirksam ist?

Nun noch einige Worte über die Grundlage der Rosenthalschen Theorie, die Hemmung der Proteolyse durch die Eiweißspaltprodukte. Rosenthal hat einerseits gelesen, daß es enzymatische Synthesen gibt, andererseits, daß Eiweißspaltprodukte die Verdauung hemmen können. Daraus folgert er zunächst, daß diese Hemmungswirkung auf einer der Spaltung entgegengesetzt verlaufenden Synthese beruht. Mit von quantitativen Ueberlegungen nicht getrübtter Unbefangenheit zieht er dann ohne weiteres den Schluß, daß die im Serum vorhandenen Spaltprodukte die antitryptische Wirkung bedingen.

Dazu ist zu bemerken, daß synthetische Wirkungen proteolytischer Fermente bisher nicht bekannt sind, wenn man von der in ihrem Wesen noch nicht genau erkannten Plastein-

3) Oguro, Biochem. Zeitschr., Bd. 22, 1909.

4) Lieblein, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir., Bd. 25, 1912, p. 391.

1) Opie, Barker and Dochez, Journ. of exp. Med., Vol. 13, 1911, p. 162.

2) Kämmerer, Arch. f. klin. Med., Bd. 103, 1911, p. 341.

bildung absieht. Sodann liegt das Gleichgewicht bei allen genauer studierten fermentativen Synthesen weit nach der Seite der Spaltprodukte. Eine völlige oder fast völlige Hemmung der Spaltung, wie sie bei der Antitrypsinwirkung vorliegt, könnte also niemals durch einen synthetischen Gegenprozeß zustande kommen. Es ist daher auch, soweit ich sehe, die Hemmungswirkung der Eiweißspaltprodukte von keiner Seite mit synthetischen Prozessen erklärt, sondern vielmehr auf eine Bindung des Ferments an die Spaltprodukte zurückgeführt worden, sofern man nicht auf jede weitere Erklärung verzichtete.

Was nun diese Hemmungswirkung selbst betrifft, so kann ich nur wieder darauf hinweisen, daß sie von einer gänzlich anderen Größenordnung ist als die des Antitrypsins. Rosenthal geht hierüber wieder stillschweigend hinweg, obwohl dadurch seine Theorie als völlig haltlos erwiesen wird.

Hätte Rosenthal die Arbeit von Abderhalden und Gigon¹⁾, die mir ebenso wie die anderen von ihm angeführten sehr wohl bekannt war, etwas genauer studiert, so hätte er gefunden, daß diese Autoren den hemmenden Einfluß einer Aminosäuremenge auf die Peptidspaltung untersuchten, die der des zu spaltenden Peptids gleichkam. Trotz dieses außerordentlich großen Zusatzes von Spaltprodukten wurde die Spaltung keineswegs aufgehoben, sondern nur verzögert, häufig nur auf das Doppelte, in anderen Fällen auf das Dreifache, ganz vereinzelt nur auf das Vierfache der Spaltungsdauer im Kontrollversuch.

Wie liegen aber die Verhältnisse bei der Antitrypsinwirkung? Bei der üblichen Versuchsanordnung wird die Verdauung von 2 mg Kasein durch 0,01 ccm Serum völlig aufgehoben. Diese Serummenge enthält etwa 0,002 mg Reststickstoff. Rechnet man selbst dieses ganze Quantum im Widerspruch mit den Tatsachen auf Aminosäuren um, so würden sich erst etwa 0,01 mg ergeben. Diese minimale Menge soll nun nach Rosenthal die Verdauung einer 200-fach größeren Menge von Kasein nicht nur hemmen, sondern sogar aufheben! Das Widersinnige dieser Vorstellung liegt auf der Hand.

1) Abderhalden und Gigon, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 53, 1907, p. 251.

Die Rosenthalsche Theorie geht also von falschen Voraussetzungen nicht nur bezüglich der Eigenschaften des Antitrypsins, sondern auch hinsichtlich der Wirkung der Eiweißspaltprodukte aus. Sie entbehrt also jeder Grundlage und dürfte nunmehr wohl endgültig erledigt sein.

Bei der Ablehnung der Lipoidtheorie des Antitrypsins macht sich Rosenthal meine Argumentierung erfreulicherweise ganz zu eigen. Gegen die von mir vertretene Antikörpertheorie wendet er neuerdings ein, daß bereits normales Serum auch die Wirkung solcher Fermente hemmt, die niemals mit dem Organismus in Berührung kommen, wie Pyocyaneustrypsin und Takadiastase. Daß die Erklärung der meisten Antikörperwirkungen des normalen Serums der gleichen Schwierigkeit begegnet, scheint Rosenthal ganz zu übersehen.

Wenn Rosenthal endlich es so darstellt, als ob in meiner Arbeit ein Widerspruch bezüglich des „Antigens“ des Antitrypsins enthalten sei, so hat er offenbar meine Ausführungen nicht verstanden. Ich hatte die Ansicht Brausteins, daß die autolytischen Zellfermente das Antigen darstellen, abgelehnt, weil ich gefunden hatte, daß das Antitrypsin gegenüber diesen bei saurer Reaktion optimal wirksamen Fermenten unwirksam ist und hatte zunächst hypothetisch die Existenz tryptischer Zellfermente postuliert. Der Nachweis des Vorkommens solcher Fermente wurde später durch Opie, Barker und Dochez erbracht. In diesen intracellulären Tryptasen, die von den autolytischen Fermenten völlig verschieden sind, hatte ich das Antigen des Antitrypsins erblicken zu dürfen geglaubt.

Daß das Antitrypsin sich von den immunisatorisch erzeugten Antikörpern in wesentlichen Eigenschaften unterscheidet, habe ich selbst hervorgehoben. Trotzdem scheint mir die Auffassung, daß das Antitrypsin ein Reaktionsprodukt des Organismus gegenüber tryptischen Fermenten darstellt, den Tatsachen noch am meisten gerecht zu werden.

Ich wende mich nun zu den Ausführungen Pfeiffers, die ich in der von ihm eingehaltenen Reihenfolge besprechen will.

ad 1. Daß zur Zeit der tertiären Titersteigerung noch leichte Erscheinungen wie Fieber und Leukocytose bestehen können, will ich nicht bestreiten, obgleich gerade in den Versuchsprotokollen Pfeiffers bei der Mehrzahl der Tiere die Temperatur bereits zur Norm zurückgekehrt ist. Ob diese Erscheinungen die Folgen eines noch andauernden und nicht vielmehr eines vorausgegangenen Eiweißzerfalls sind, mag dahingestellt bleiben. Schwer verständlich bleibt auf jeden Fall, daß ein Eiweißzerfall, der, mit Pfeiffer nach den Antitrypsinwerten zu urteilen, ebenso umfangreich sein müßte, wie beim Ausbruch des anaphylaktischen Shocks, nur jene kaum erkennbaren Symptome herbeiführen soll. Wissen wir doch durch die Untersuchungen Friedbergers und seiner Schüler, daß die nach dem anaphylaktischen Anfall eintretende unspezifische Resistenzsteigerung nur mäßige Grade erreicht.

ad 2. Daß die Frage, ob im anaphylaktischen Anfall lediglich das Antigen und nicht auch Körpereiwweiß zerfällt, keineswegs entschieden ist, war auch mir bekannt, wie sich aus der Form, in der ich die erste Eventualität anführte, ergibt. Ich brauche daher Pfeiffers Belehrung nicht in Anspruch zu nehmen. Daß Pfeiffer jene erste Ansicht vertrete, schloß ich aus seinen Worten auf p. 85 seiner Arbeit über Eiweißzerfallstoxikosen, „daß dieses Ferment . . . mit dem Antigen der Vorbehandlung¹⁾ im Versuchstier einen akuten parenteralen Eiweißzerfall herbeiführt“. Wie ich mich jetzt überzeugt habe, hat Pfeiffer allerdings in einem früheren Aufsatz angenommen, daß wenigstens in manchen Fällen auch Körpereiwweiß abgebaut wird. In seinen letzten Arbeiten findet sich diese Annahme aber nicht mehr vertreten, so daß es wohl verzeihlich ist, wenn ich sie bei der Kritik dieser Arbeiten übersah.

ad 3. Wie es mit der Theorie Rosenthals und seinen „grundlegenden“ Versuchen steht, ist oben auseinandergesetzt. Uebrigens scheinen ja auch Pfeiffer neuerdings Zweifel an ihrer Richtigkeit gekommen zu sein. Ich darf vielleicht hoffen, das diese durch meine obigen Ausführungen noch verstärkt werden.

1) Im Original nicht gesperrt.

ad 4. Der Widerspruch, der zwischen Pfeiffers und meinen experimentellen Erfahrungen besteht, kann nur durch weitere Versuche, am besten von dritter Seite, gelöst werden. Von der Wiedergabe der Versuchsprotokolle habe ich abgesehen, weil sie hinsichtlich der Antitrypsinverminderung mit den von Pfeiffer für das „zweite Stadium“ gegebenen völlig übereinstimmen. Bezüglich der injizierten Dosen hatte ich mich genau an Pfeiffers Versuche gehalten. Alle Tiere zeigten tiefen Temperaturabfall.

ad 5. Der Einwand Pfeiffers, daß zwischen der Antitrypsinverminderung, die ich als „negative Phase“ gedeutet hatte, und dem Verschwinden der anaphylaktischen Antikörper kein Parallelismus bestehe, ist mir unverständlich. Ein solcher Parallelismus wäre doch nur zu erwarten, wenn beide Antikörper identisch wären. Die Absättigung des Antitrypsins erfolgt aber nach meiner Auffassung durch einen Vorgang, der mit dem Verbrauch der anaphylaktischen oder hämolytischen Antikörper unmittelbar nichts zu tun hat. Ob die nach Injektion von Pepton und β -Imidazolyläthylamin eintretende Antitrypsinverminderung in gleicher Weise erklärt werden kann, also durch gesteigerte Tätigkeit proteolytischer Fermente, bedarf noch der experimentellen Untersuchung, ist aber a priori keineswegs auszuschließen.

ad 6. Daß die Lymphe einen weit geringeren Antikörpergehalt aufweist als das Blutserum, ist von mehreren Forschern gezeigt worden. Ich erinnere nur an die Arbeiten von Landsteiner¹⁾ und Ransom²⁾. Die Annahme, daß dasselbe vom Antitrypsingehalt gilt, ist daher nicht ganz unberechtigt, zumal sich die Lymphe noch in vielen anderen Beziehungen wie ein „Filtrat“ des Blutserums verhält. Den Versuchen Pfeiffers mit Organpreßsäften kann ich keine Beweiskraft zuerkennen, da nicht zu übersehen ist, inwieweit die antitryptische Wirkung durch Organeiweiß bedingt ist. Auch diese Frage bedarf daher noch weiterer experimenteller Bearbeitung. Ob das Verhalten des Antitrypsins bei der Verbrüfung und bei der Urämie mit meiner Auffassung tatsäch-

1) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 27, 1900, p. 357.

2) Ransom, Berl. klin. Wochenschr., 1901, No. 13, p. 337.

lich unvereinbar ist, vermag ich erst nach Anstellung eigener Versuche zu entscheiden.

Ich glaube durch meine Darlegungen gezeigt zu haben, daß die Kritik, die ich an Pfeiffers theoretischen Ausführungen geübt habe, durchaus berechtigt war und daß andererseits meine eigene hypothetische Auffassung durch Pfeiffer noch keineswegs bündig widerlegt worden ist. Dagegen fällt sein eigenes Theoriengebäude mit der Widerlegung der Rosenthalschen Spaltprodukttheorie notwendigerweise in sich zusammen.

Zusammenfassung.

Gegenüber den Einwänden von Rosenthal wird nochmals dargelegt, daß das Antitrypsin thermolabil, nicht diffusibel und durch Ammonsulfat aussalzbar ist, so daß es mit Eiweißspaltprodukten nicht identisch sein kann. Es wird ferner gezeigt, daß die Hemmungswirkung der Eiweißspaltprodukte unvergleichlich viel stärker sein müßte, als sie tatsächlich ist, wenn durch sie die antitryptische Wirkung des Serums bedingt sein sollte. Die Spaltprodukttheorie entbehrt somit jeder Grundlage.

Die Berechtigung der an Pfeiffers theoretischen Anschauungen geübten Kritik wird gegenüber seiner Antikritik dargetan und die eigene Deutung der Antitrypsinschwankungen gegenüber seinen Einwänden verteidigt.

Nachdruck verboten.

Ueber die Teilnahme der Normalambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung in vitro.

Bemerkungen zu der Arbeit von E. Friedberger
in Bd. 18, Heft 3 dieser Zeitschrift.

Von **C. Moreschi** und **C. Vallardi**.

Im 1. Heft des XI. Bandes dieser Zeitschrift berichteten wir über einige Untersuchungen, welche feststellen sollten, welcher Anteil den Normal- und Immunambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung in vitro zukommt. Es ging aus diesen Versuchen hervor, daß die Entfernung der Normalambozeptoren

durch Absorption in der Kälte (bei 0° C), nach den Angaben von Ehrlich und Morgenroth, den Wert des absorbierten Serums, im Vergleich zu dem des nativen Serums, betreffs der Anaphylatoxinbildung quantitativ unverändert läßt. Friedberger und Cederberg bestätigen jetzt diese Resultate, auf Grund deren wir uns berechtigt glaubten, die Teilnahme der Normalambozeptoren bei der Giftbildung als nicht bewiesen anzusehen. Friedberger bezeichnet in seiner letzten Mitteilung über Anaphylaxie (siehe diese Zeitschrift, Bd. 18, Heft 3) diese unsere Deutung als falsch. Er hebt hervor, daß wir die Möglichkeit einer Komplementbindung auch in der Kälte (wie sie Neufeld und Haendel bewiesen haben) unbeachtet gelassen hätten, und daß auf diese Komplementbindung eine Anaphylatoxinbildung, wenn auch in kleinen Mengen, folgen müßte; ferner sagt er, daß, indem wir zu wiederholten Malen die Kälteausfällung ausgeführt hätten, sich dadurch immer neue Anaphylatoxinmengen gebildet hätten, deren Summe genügte, um ein Tier akut zu töten.

Durch Versuche Friedbergers und Cederbergs, die in dieser Richtung ausgeführt wurden, wird diese Möglichkeit ohne weiteres bewiesen; nach 5—6 aufeinanderfolgenden Kälteausfällungen erhalten die obengenannten Verfasser oft ein Gift, welches das Meerschweinchen akut tötet. Friedberger und Cederberg fügen im Text hinzu: „So findet in den Versuchen von Moreschi und Vallardi bei der wiederholten Kälteausfällung zwar eine weitgehende, wenn auch nicht absolute Bindung des normalen Ambozeptors statt, aber gleichzeitig auch eine Komplementbindung und damit eine Giftbildung, so daß man schon allein durch mehrmalige Ausfällungen in der Kälte akut tödliche Abgüsse erhalten kann. Und in den Kälteversuchen, in denen noch nicht eine tödliche Giftdosis gebildet ist, läßt sich die in der Kälte vorgebildete Menge leicht zu einer solchen ergänzen, wenn nachher bei erneuter Digerierung bei 37° C auch nur sehr geringe Mengen von Ambozeptor noch in Aktion treten.“ Diese Worte können nur auf einem Mißverständnis beruhen; nicht in einem einzigen Versuche (und es handelt sich um 28) wurde die Kälteausfällung nach der von Fried-

berger und seinem Mitarbeiter angeführten Weise ausgeführt. Die Kälteausfällung wurde stets ein einziges Mal, und zwar mit der größten Sorgfalt bei 0° C ausgeführt, indem das Serum auf diese Temperatur gebracht wurde und dann die Bakterien, die gleichfalls zuvor abgekühlt worden waren, hinzugefügt wurden, und indem diese Mischung nach verschiedenen Zeiträumen (zwischen 40 Minuten bis 2 Stunden 30 Minuten) so schnell als möglich zentrifugiert wurde. Trotz aller dieser Vorsichtsmaßregeln erhielten wir schon nach einmaliger Absorption (siehe Versuch 1, Tabelle I) ein Anaphylatoxin, welches bei 3,5 ccm schwere Symptome verursachte. Diese Anaphylatoxinbildung nach einmaliger Kälteausfällung haben wir auch in weiteren Versuchen gelegentlich beobachtet. Diese Tatsache ist jedoch von Friedberger und Cederberg nicht erwähnt worden. Weder die Möglichkeit der Anaphylatoxinbildung bei 0° C noch die Komplementbindung in der Kälte sind uns entgangen. In Bezug auf die Bakterien und die genauen Beziehungen zwischen der Komplementbindung bei 0° C und der Anaphylatoxinbildung hat Vallardi eine lange Reihe von Versuchen ausgeführt, welche eine solche Bindung bestätigten.

Nach Vorausschickung dieser Tatsachen können wir die Frage aufstellen, ob die letzten Beobachtungen Friedbergers und Cederbergs in irgendeiner Weise mit unseren Beobachtungen verglichen werden können und ob jene unsere Behauptung zu erschüttern vermögen, daß eine Teilnahme der Normalambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung bis jetzt noch nicht nachgewiesen ist. Was den Vergleich zwischen unseren Versuchen und denen Friedbergers und Cederbergs anbetrifft, so ist es für jedermann klar, daß bei der von uns verwandten Sorgfalt die einmalige Ausfällung jedenfalls besser geeignet war als die wiederholte Absorption nach Friedberger und Cederberg, auch wenn sie noch so sorgfältig ausgeführt war, um eine übermäßige Komplementbindung zu verhindern. Denn die wiederholte Absorption begünstigte natürlich die Komplementbindung. Wir wollen nun die Herstellung des Giftes (sei es in der Kälte, sei es bei 37° C) durch diese Autoren auf Grund von Friedbergers Theorie eingehender betrachten. Sie erhalten nur

nach 5—6 Absorptionen toxische Sera von verhältnismäßig niederem Wert (tödliche Minimaldosis 4—5 ccm); es bilden sich also kleine Anaphylatoxinmengen, was infolge der wiederholten Prozeduren, denen das Serum bei jeder Absorption unterzogen wird, leicht zu erklären ist. Was uns jedoch näher beschäftigt, ist die neue Giftbildung, welche eintritt, wenn die genannten Sera, welche 5—6mal absorbiert wurden, aufs neue, und zwar nicht bei 0° C, sondern bei 37° C digeriert wurden. Der toxische Wert dieser Sera sinkt von 4—5 ccm auf 3 ccm. Diesen Zahlen können wir jedoch keinen absoluten Wert beimessen, da in allen Versuchen Friedbergers und Cederbergs die Kontrolle fehlt, die quantitativ die Menge des aus dem nativen Serum entstandenen Giftes im Vergleich zu der Menge des aus dem absorbierten Serum gebildeten Giftes angibt. Aus jenen Versuchen ersehen wir, daß durch wiederholte Kälteausfällungen Anaphylatoxin gebildet wird und daß neues Anaphylatoxin entsteht, wenn dieselben Sera bei 37° C digeriert werden; es geht jedoch nicht daraus hervor, ob der Ambozeptor bei der Giftbildung beteiligt ist. Durch die von Moreschi und Vallardi zahlreich gelieferten Versuche wird hingegen bewiesen, daß man nach einer einmaligen Kälteausfällung mit verschiedenen Bakterienmengen (also bei den für die Giftbildung günstigsten Bedingungen, da die Ambozeptoren und das Komplement dem Antigen vollständig zur Verfügung stehen) nur ausnahmsweise nennenswerte Anaphylatoxinmengen erhält und daß bei 0° C ausgefällte Sera, die dann bei 37° C digeriert wurden, quantitativ ebenso große Mengen von Anaphylatoxin liefern, wie die nativen Sera. Auf Grund dieser klaren und berechenbaren Tatsachen haben wir die Beteiligung der Normalambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung bezweifelt, indem wir damals, wie auch heute, nur zögernd die Hypothese aufstellen, daß Minimaldosen vom Ambozeptor das Optimum für die Anaphylatoxinbildung darstellen. Aus diesen Gründen fühlen wir uns berechtigt, bis auf weiteres an unserer Meinung festzuhalten: daß eine Beteiligung der Normalambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung *in vitro* nicht bewiesen ist.

Nachdruck verboten.

Erwiderung zu vorstehenden Bemerkungen von C. Moreschi und C. Vallardi.

Von **E. Friedberger** und **O. A. Cederberg**.

Moreschi und Vallardi haben durch Behandlung von Serum bei 0°), durch die sie den Ambozeptor zu entfernen meinten, Abgüsse erhalten, die scheinbar quantitativ noch bei 37° tödliche Dosen von Anaphylatoxin lieferten. Sie deuteten diese Versuche in dem Sinne, daß eine Mitbeteiligung des Ambozeptors nicht bewiesen sei.

Die Autoren drücken sich also in ihren Schlußfolgerungen sehr vorsichtig aus, in denen sie selbst sagen, daß ihre Versuche „kein endgültiges Urteil“ darüber gestatten, „welche Rolle dem Normalambozeptor zukommt“?).

Wir haben in einer späteren Arbeit zu zeigen gesucht, daß die Versuchsanordnung von Moreschi und Vallardi nicht nur keine sichere Entscheidung über die Frage gestattet, sondern überhaupt nicht geeignet ist, irgend etwas über die Beteiligung oder Nichtbeteiligung des Ambozeptors bei der Anaphylaxie auszusagen.

An dieser Anschauung müssen wir auch heute noch trotz der neuerlichen Einwendungen von Moreschi und Vallardi festhalten. Die Autoren dachten daran, durch die Kälteadsorption den Normalambozeptor ohne Mitwirken des Komplements entfernen zu können, wie sich aus folgendem Satze ihrer Arbeit ergibt: „Die Analyse der Wirkung der Immun- und Normalambozeptoren, unabhängig vom Komplement, wird erleichtert durch Anwendung des Verfahrens von Ehrlich und Morgenroth für die Trennung der Antikörper vom Komplement in der Kälte.“

Das angewandte Verfahren ermöglicht aber weder eine Ausschaltung des Komplements, wie übrigens Moreschi und Vallardi selbst später erfuhren (l. c. p. 46), noch ermöglicht es offenbar eine sichere, vollkommene

1) Es sei ausdrücklich auch unsererseits noch einmal hervorgehoben, daß Moreschi und Vallardi die Ausfällung bei 0° nur einmal vorgenommen haben; das ergibt sich auch aus den Ausführungen in der Einleitung unserer Arbeit. Wenn wir an anderer Stelle schreiben, daß „in den Versuchen von Moreschi und Vallardi bei der wiederholten Kälteausfällung“ eine Giftbildung statt hat, so sollte damit nicht gemeint sein, daß Moreschi und Vallardi wiederholt ausgefällt haben, sondern lediglich, daß wir uns bei der Anwendung der Versuchsanordnung von Moreschi und Vallardi der wiederholten Ausfällung bedienten.

2) Andere weniger kritische Autoren haben allerdings schon auf Grund dieser Versuche behauptet, daß eine Nichtbeteiligung des Normalambozeptors bewiesen sei.

Ambozeptoradsorption, wie sich aus der Angabe von Moreschi und Vallardi selbst ergibt, daß man zwar „immer eine Verminderung“, aber nur „in einigen Fällen“ ein vollständiges Verschwinden der Normalambozeptoren (gemessen als Agglutinine) in der Kälte feststellen könne. Dazu kommt aber als ausschlaggebendes Moment, daß (was Moreschi und Vallardi offenbar nicht hinlänglich beachtet haben) in dem Maße, als bei 0° eine Ambozeptor- und Komplementadsorption statt hat, auch eine Anaphylatoxinbildung erfolgt. Je ärmer also ein Serum durch die Adsorption mit Bakterien bei 0° scheinbar an Normalambozeptor wird, um so reicher wird es dafür an Anaphylatoxin, so daß es natürlich nicht gegen die Mitbeteiligung des Normalambozeptors spricht, wenn in dem durch die Kälteausfällung schon anaphylatoxinhaltig gewordenen Serum trotz des theoretisch nur noch minimalen Ambozeptorgehaltes bei einer weiteren Digerierung bei 37° diese Anaphylatoxinmenge sich zu einer akut tödlichen ergänzt.

Aus diesem Grunde ist es auch ganz zwecklos, wie es Moreschi und Vallardi fordern, „quantitativ die Menge des aus dem nativen Serum entstandenen Giftes im Vergleich zu der Menge des aus dem absorbierten Serum gebildeten Giftes“ zu bestimmen.

Denn es hängt ja natürlich von Fall zu Fall davon ab, ob in den Versuchen von Friedberger und Cederberg durch die wiederholten Kälteausfällungen mit nachträglicher Digerierung bei 37° einmal mehr, das andere Mal weniger Anaphylatoxin gebildet wird, als wenn auf einmal die Digerierung unter optimalen Bedingungen bei 37° erfolgt. Moreschi und Vallardi selbst haben ja auch bald das adsorbierte Serum weniger giftig gefunden (Tabelle A, Versuch 2), bald beide gleich giftig (Versuch 3), bald das adsorbierte Serum weniger fähig zur Giftbildung (Versuch 10). Schon daraus ergibt es sich, daß quantitative Versuche, wie sie hier Moreschi und Vallardi fordern, ganz zwecklos sind. Für uns aber kam es ja überhaupt nicht in Betracht, quantitativ zu untersuchen, ob die Giftbildung in der Wärme besser geht als zuerst bei 0° und dann bei 37°, sondern lediglich darauf, daß bei 0° nicht nur eine Absorption des Normalambozeptors, sondern auch eine Giftbildung statt hat. Einerlei, ob man mit uns die Mitbeteiligung normaler Ambozeptoren bei der Anaphylaxie annehmen will oder nicht, ist also die Methode von Moreschi und Vallardi, wie wir bereits in unserer Arbeit betont haben und hier aufrecht erhalten müssen, nicht geeignet, in dieser Frage überhaupt eine Entscheidung zu bringen.

Nachdruck verboten.

[Laboratoire de l'Établissement Dermatologique de Paris.]

Réaction de fixation du complément et pouvoir hémolytique des sérums humains. Procédé de Wassermann et procédé de Hecht-Weinberg.

Par MM. Leredde et Rubinstein.

Avec 3 courbes dans le texte.

(Eingegangen bei der Redaktion am 20. Juli 1913.)

Popoff, Bickel, Kafka ont récemment attiré l'attention sur l'intérêt que présente l'étude du pouvoir hémolytique des sérums, comme méthode secondaire permettant d'affirmer l'infection syphilitique à côté de la réaction de déviation du complément. Mais ces auteurs n'étudient pas le pouvoir hémolytique des sérums dans le but d'interpréter la réaction de Wassermann elle-même ou ses modifications.

Weinberg, Busila, Hallion et Bauer d'abord, Brendel, Demanche, etc. à leur suite, en pratiquant la réaction de déviation du complément au moyen des sérums non chauffés, ont envisagé l'utilité de mesurer le pouvoir hémolytique des sérums et d'ajouter aux sérums frais une quantité de globules rouges de mouton, variable suivant le pouvoir hémolytique plus ou moins élevé des sérums à examiner. Weinberg (de l'Institut Pasteur de Paris) a étudié en outre les propriétés hémolytiques et anti-hémolytiques des sérums frais et chauffés pour pouvoir interpréter le résultat fourni par la réaction de fixation du complément. Il a élaboré une technique rationnelle permettant de pratiquer la réaction dans les conditions les plus exactes.

Dès le début de nos recherches sur la réaction de Wassermann, nous nous sommes attachés à l'étude systématique des propriétés hémolytiques des sérums, en pratiquant la réaction de déviation du complément aussi bien au moyen du sérum chauffé qu'au moyen du sérum frais avec détermination de l'index hémolytique, comme le recommande Weinberg. Nous avons été les premiers à étudier la valeur de ce procédé au point de vue clinique, et dans une série de communications nous avons attiré l'attention sur l'utilité considérable qui existe de pratiquer la réaction d'une manière simultanée avec le sérum chauffé et avec le sérum frais.

Différents auteurs ont déjà constaté que la réaction de déviation du complément est plus souvent positive avec le sérum frais qu'avec le sérum chauffé. Malheureusement, à l'exception de Hecht, de Marg. Stern, de Levaditi et Latapie, ils n'ont accordé aux procédés reposant sur l'emploi des sérums frais qu'une confiance assez limitée. Il est également vrai que la majorité de ces auteurs ne donnent pas les détails de leur technique, ne disent pas s'ils emploient l'antigène à la même dilution que dans la réaction de Wassermann et surtout ne déterminent pas la force hémolytique des sérums afin de pouvoir interpréter les résultats.

Nous avons établi que la dissociation du sérodiagnostic (réaction de Wassermann négative, réaction pratiquée avec le sérum frais — positive) se rencontre chez les syphilitiques, soit au début de l'infection, soit à la suite d'un traitement qui a atténué cette dernière, soit chez les syphilitiques, traités ou non traités, dont la syphilis est atténuée, mais présente des localisations graves, par exemple, au niveau du globe oculaire ou même de l'axe spinal, quelquefois au début d'une syphilis grave telle qu'une syphilis cérébrale, parfois dans des cas de syphilis atténuée spontanément. La dissociation du sérodiagnostic offre donc au point de vue pratique un intérêt considérable.

Parmi les causes qui provoquent cette dissociation nous relèverons les suivantes :

1° Le chauffage des sérums à 56° nuit à la sensibilité de la réaction de Wassermann en affaiblissant ou en détruisant dans une certaine mesure les substances syphilitiques (« anticorps ») (Noguchi, Oluf Thomsen, Steinitz, etc.). Cette destruction est surtout marquée dans des cas, où l'infection syphilitique n'a pas atteint son développement maxima.

2° Par le chauffage se forment les « complémentaires » qui peuvent masquer la réaction. Une partie d'alexine non détruite par l'inactivation et transformée en complémentaire s'unit au mélange antigène-anticorps ; l'alexine de cobaye qui a été ajoutée reste alors libre et provoque l'hémolyse. On obtient donc une réaction négative — là où il peut s'agir d'une réaction positive. Le traitement du sérum par le sulfate de baryte (Wechselmann) a pour résultat d'éliminer les « complémentaires » et de rendre à la R. de W. sa signification réelle.

3° Une troisième cause d'erreur réside dans l'excès de sensibilisatrice antimouton. On ajoute aux sensibilisatrices normales existant dans le sérum une sensibilisatrice obtenue par voie d'immunisation sans se rendre compte de la force que présente la sensibilisatrice normale. Cet excès de sensibilisatrice peut influencer la réaction en ce sens qu'une réaction positive devient négative.

Il est possible d'éliminer la deuxième cause d'erreur par le traitement du sérum avec le sulfate de baryte; d'autre part, en dosant la sensibilisatrice normale nous pouvons remédier au défaut que présente un trop grand excès d'hémolytines. Mais nous ne pouvons rien contre la destruction des substances syphilitiques par l'inactivation, surtout si ces substances se trouvent dans le sérum en petites quantités et ne peuvent être découvertes en présence d'un système hémolytique fort comme on l'emploie généralement dans la réaction de Wassermann.

Dans ce dernier cas, l'usage des sérums frais nous rend de grands services. Nous pratiquons donc d'une manière systématique la réaction avec les sérums frais parallèlement avec la réaction de Wassermann type. Une contrôle et complète l'autre. Dans le procédé reposant sur l'emploi du sérum frais, la détermination exacte du pouvoir hémolytique permet de juger dans une certaine mesure de la spécificité de la réaction.

La réaction avec les sérums chauffés et l'index de la sensibilisatrice normale des sérums.

Nous appelons, après Weinberg, index du sérum chauffé, ou, ce qui est la même chose, index de la sensibilisatrice du sérum, le pouvoir qu'a 0.1 c. c. de sérum inactivé de sensibiliser les globules rouges de mouton (à 5 %). Pour déterminer cet index, nous ajoutons à 0.1 c. c. du sérum inactivé, 0.1 c. c. de sérum de cobaye dilué suivant son titre. Autrement dit, l'alexine du sérum humain est remplacée par l'alexine de cobaye et nous déterminons le pouvoir hémolytique du dit sérum pour connaître la quantité de sensibilisatrice antimouton que le sérum possède normalement.

L'étude de 133 sérums nous a montré que la quantité de sensibilisatrice normale varie d'un sérum à l'autre dans la proportion de 1 à 20, c'est-à-dire que, la quantité d'alexine étant égale, un sérum peut dissoudre 20 fois plus de globules rouges qu'un autre.

Dans 37 cas sur 133, l'index hémolytique était égal à 10 ou dépassait ce chiffre, c'est-à-dire que 0.1 c. c. de sérum chauffé est capable de dissoudre (en présence de l'alexine) $10/10$ c'est-à-dire 1 c. c. de globules rouges de mouton — quantité que l'on emploie ordinairement dans la réaction — 0.3 c. c., quantité de sérum que nous employons, est capable de dissoudre un peu moins de 3 c. c. de globules de mouton (il faut remarquer qu'il n'existe

pas de proportionnalité entre la quantité de sérum et celle des globules rouges à dissoudre). En d'autres termes, le sérum avec l'index 10 contient assez de sensibilisatrice pour pouvoir pratiquer la réaction.

J. Bauer a déjà attiré l'attention sur l'inconvénient que présente un excès de sensibilisatrice, et a proposé de se servir uniquement de la sensibilisatrice normale, sans recourir à la sensibilisatrice obtenue par voie d'immunisation.

Réaction de J. Bauer.

Nous avons appliqué la méthode de Bauer à l'examen de 122 sérums que nous avons étudiés parallèlement avec la réaction de Wassermann type et la réaction de Hecht-Weinberg (sérum actif). En même temps nous avons déterminé l'index hémolytique du sérum frais (quantité de globules rouges de mouton à 5% dissous par 0.1 c. c. de sérum actif), et l'index hémolytique du sérum chauffé (quantité de globules rouges de mouton à 5% dissous par 0.1 c. c. de sérum chauffé en présence d'alexine de cobaye).

Sur ces 122 cas, 29 fois la réaction de Bauer n'a pas donné de résultat précis: 0.1 c. c. de sérum chauffé additionné d'alexine de cobaye a dissout seulement de 0.1 à 0.5 c. c. de globules rouges de mouton. L'index de la sensibilisatrice était de 1 à 5.

Pour que la réaction de Bauer donne un résultat net, il faut donc que l'index hémolytique du sérum chauffé dépasse 5.

Par contre dans 93 cas sur 122 où la réaction de Bauer donne un résultat, nous avons constaté 8 fois une discordance entre elle et la réaction de Wassermann.

2 fois la réaction de Bauer était positive et celle de Wassermann négative.

6 fois la première était franchement positive et la seconde faible ou douteuse.

Noms	R. W.	R. de Bauer	R. de W. H.	Index hémolytique	
				sérum frais	sér. chauffé
Fauc.	0	++++	+	4	10
Lec.	0	++++	+	5	12
Fern.	++	++++	+	11	15
Mar.	+	++++	+	10	14
Dub.	+	++++	+	5	12
Cour.	+	++++	+	5	12
Lour.	+	++++	+	4	10
Hyv.	++	++++	+	3	10

Ce tableau nous montre que dans les cas où l'index hémolytique du sérum chauffé est élevé, on peut obtenir une réaction de Wassermann négative dans le cas d'un sérum syphilitique. Il est certain que dans ce cas il est inutile, dangereux même d'ajouter le sérum lapin antimouton. Le mieux est de faire la réaction en double, une fois sans ajouter le sérum hémolytique artificiel, l'autre en le joignant au sérum chauffé. En même temps on détermine l'index hémolytique du sérum chauffé. S'il atteint 10 on considérera le résultat de la réaction de Bauer comme définitif.

Méthode de «désensibilisation».

Dans la réaction de Wassermann, ainsi que dans la réaction de Bauer nous opérons avec une quantité inégale de sensibilisatrice hémolytique. En outre, les tubes témoins, contenant l'antigène sont moins riches en sensibilisatrice que les tubes avec le sérum (les premiers contiennent seulement la sensibilisatrice obtenue par voie d'immunisation).

Pour opérer toujours avec les mêmes unités on peut procéder de 2 façons: 1^o ramener tous les tubes au même nombre d'unités en sensibilisatrice, comme le propose Weinberg. Pour les ramener par exemple à 30 unités, il faut sensibiliser chaque centimètre cube de globules rouges avec 0.1 c.c. d'une dilution de sérum lapin antimouton capable par lui-même de sensibiliser 3 c.c. d'hématies. Voilà un exemple: supposons que le chiffre de la sensibilisatrice hémolytique antimouton du sérum chauffé est de 6, cela veut dire qu'un dixième de centimètre cube de ce sérum est capable de sensibiliser 0.6 c.c. de globules rouges. Ce sérum renferme donc, à la dose de 0.1 c.c. 6 unités d'ambocepteurs. Comme Weinberg emploie 0.3 c.c. de sérum à examiner, il s'ensuit que les tubes avec le sérum humain, renfermeront déjà $3 \times 6 = 18$ unités hémolytiques tandis qu'il n'y en aura pas du tout dans les tubes témoins. Comme chaque tube de l'expérience doit recevoir 30 unités, il faudra donc n'ajouter dans les tubes contenant le sérum que 12 unités seulement.

On simplifie l'opération en préparant quelques dilutions de sérum hémolytique dont 0.1 c.c. représente 30, 15 ou 10 unités d'ambocepteurs. Les globules rouges sont utilisés

sans sensibilisation préalable, si l'index atteint ou dépasse 10.

2° Dans le même but d'opérer toujours avec les mêmes unités on peut encore débarrasser les sérums de leurs sensibilisatrices naturelles, comme le font Rossi, Jacobaeus, Mintz, et d'ajouter ensuite dans les tubes une dose titrée de sensibilisatrice antimouton.

Nous avons pratiqué cette méthode de «désensibilisation» de la manière suivante:

Le sérum chauffé (1.2 c. c.) est mis en contact avec les globules rouges de mouton frais et bien lavés (0.5 c. c.). On les laisse en contact pendant 30 secondes à la glacière (pour éviter le phénomène de Sachs-Friedberger). On retire ensuite, on centrifuge et on recueille le sérum surnageant qui est dès lors complètement débarrassé de sensibilisatrice antimouton. Avec ce sérum on pratique ensuite la réaction de Wassermann en se servant des globules sensibilisés.

Cette méthode a été appliquée par nous à l'étude de 64 sérums. Jamais un sérum non syphilitique ne nous a donné une réaction positive; mais dans 7 cas sur 64, où la réaction de Wassermann était faible ou douteuse et où il s'agissait des sérums provenant des syphilitiques certains, la réaction de désensibilisation s'est montrée nettement positive.

Noms	R. W.	R. de dés.	R. de Bauer	R. de H. W.	Index hémolytique	
					S. frais	S. chauffé
Bour.	++	++++	++++	+	4	7
Macr.	++	++++	++++	+	10	14
Bed.	++	++++	—	+	4	—
Mor.	++	++++	—	+	2	—
Hub.	+	++++	—	+	8	19
Sou.	++	++++	—	+	3	2
Hot.	+	++++	++++	+	4	8

Nos recherches sur la quantité de sensibilisatrice hémolytique nous montrent nettement qu'un excès de celle-ci peut rendre une réaction positive, tantôt douteuse, tantôt négative.

Il est intéressant à noter que partout où il y a divergence entre le résultat fourni par la réaction de Wassermann et celle de Bauer ou de «désensibilisation» partout la réaction avec le sérum frais (réaction de Hecht-Weinberg) est positive et concorde avec l'état clinique du malade.

**Réaction de déviation du complément avec le sérum frais —
Réaction de Hecht-Weinberg.**

Hecht (1908) a proposé de se servir pour la réaction de fixation du complément de sérum frais qui contient et l'alexine et la sensibilisatrice pour dissoudre les globules rouges de mouton. Il ajoute des doses croissantes de sérum 0.1 et 0.2 c. c. à 1 c. c. d'extrait de cœur de cobaye et après une heure d'étuve ajoute 1 c. c. de sang de mouton à 5 ‰.

Le principe de l'emploi de sérum frais a été repris par Levaditi et Latapie (de l'Institut Pasteur de Paris) qui ont modifié cette méthode en employant 0.1 c. c. de sérum auquel ils ajoutent 0.1 c. c. et 0.2 c. c. d'antigène provenant d'une macération alcoolique de foie syphilitique. Après une heure de séjour à l'étuve ils ajoutent 0.1 c. c. de globules rouges de mouton à 5 ‰.

Il arrive parfois que le tube témoin contenant le sérum et les globules de mouton n'est pas hémolysé: ces auteurs ajoutent alors, à tous les tubes, de la sensibilisatrice antimouton titrée. Rarement, quand le sérum est privé d'alexine, ils recommencent l'expérience en l'ajoutant.

Levaditi et Latapie ont employé cette méthode pendant plusieurs années et ont publié plusieurs statistiques portant sur un grand nombre d'examen (1734).

Weinberg pratique la réaction de déviation du complément avec le sérum frais en se servant de doses constantes de sérum (0.1 c. c.) et de doses croissantes d'antigène (0.1 et 0.2 c. c.). En se guidant sur le pouvoir hémolytique des sérums qu'il recherche systématiquement pour chaque sérum à examiner, il ajoute au bout d'une heure d'étuve des doses de globules de mouton variant de 0.1 à 0.2 c. c. suivant la force hémolytique plus ou moins grande du sérum.

D'autres auteurs (Busila, Hallion et Bauer, Brendel etc.) ont également préconisé l'emploi des sérums frais avec détermination du pouvoir hémolytique des sérums.

Nous avons suivi avec quelques modifications la technique de Weinberg que nous avons appliquée à l'étude de 1636 sérums parallèlement avec la réaction classique de Wassermann. Nous procédons de la façon suivante:

Nous employons pour pratiquer la réaction 4 tubes à hémolyse qui reçoivent chacun 0.1 c. c. de sérum frais, 3 de ces tubes reçoivent en outre 0.1 c. c., 0.15 c. c., 0.20 c. c. d'antigène, on ramène tous les tubes au même volume avec de l'eau physiologique. Cette opération est répétée deux fois.

En même temps nous déterminons l'index hémolytique du sérum en mettant dans 10 tubes 0.1 c. c. de sérum frais et des doses croissantes de globules rouges de mouton. On ramène les tubes au même volume avec de l'eau physiologique.

Au bout d'une heure, au moment où l'on retire de l'étuve les tubes de l'expérience de déviation du complément, on lit l'index hémolytique.

S'il dépasse 5 (c'est-à-dire si 0.1 c. c. du sérum dissout plus de 0.5 c. c. de globules de mouton) on ajoute à la première série des tubes 0.1 c. c. et à la deuxième 0.2 c. c. de globules rouges de mouton.

S'il est inférieur à 4, il est bon d'ajouter à la première série 0.1 c. c., à la deuxième 0.05 de globules de mouton.

On replace à l'étuve pour 30 minutes et on lit les résultats :

Réaction de déviation du complément				Détermination de l'index hémolytique			
Sérum humain	Antigène	Eau physiol.	Globules de mouton à 5 %	Sérum humain	Globules de mouton	Eau physiol.	
0.1	0.1	0.2	1 heure d'étuve à 37°	0.1	0.1	1.0	On lit l'index hémolytique au bout d'une 1/2 h. d'étuve; s'il dépasse 10, on continuera avec des doses plus élevées de globules de mouton et on lira le résultat au bout de la première heure quand on ajoutera le sang de mouton aux tubes de la réaction.
0.1	0.15	0.15		0.1	0.2	0.9	
0.1	0.2	0.1		0.1	0.3	0.8	
0.1	—	0.3		0.1	0.4	0.7	
				0.1	0.5	0.6	
				0.1	0.6	0.5	
				0.1	0.7	0.4	
				0.1	0.8	0.3	
				0.1	0.9	0.2	
				0.1	1.0	0.1	

Les tubes contenant les doses de globules de mouton 0.2 et 0.05 c. c. ne servent qu'à contrôler le résultat obtenu avec 0.1 c. c. de globules; il nous est arrivé à de nombreuses reprises de constater qu'il est insuffisant d'ajouter 0.1 c. c. de globules de mouton — là où l'index hémolytique est élevé — (pour obtenir un résultat positif conforme au résultat fourni par la réaction de Wassermann).

D'autre part, il est très utile de contrôler le résultat obtenu dans les tubes avec 0.1 c. c. de globules de mouton par le résultat obtenu avec des doses inférieures de globules — dans le cas où l'index hémolytique de sérum est peu élevé (1, 2, 3).

La détermination de l'index hémolytique des sérums nous sert non seulement pour dicter la quantité de globules de mouton à ajouter dans les tubes de l'expérience, mais aussi pour interpréter la réaction.

Nous répétons que nous érigeons en système l'emploi parallèle des sérums frais et chauffés; dans les cas de discordance, dans les résultats obtenus par les deux pro-

cédés, l'index hémolytique permet souvent de trancher la question.

1° Si la réaction obtenue avec le sérum chauffé est négative et celle avec le sérum frais également négative, l'index du sérum frais étant faible (moins de 5), le résultat est définitif.

2° Si la réaction avec le sérum chauffé est négative et celle avec le sérum frais positive, l'index hémolytique du sérum frais étant élevé (dépasse 5—6) il y a lieu de considérer la réaction comme positive.

3° Si la réaction avec le sérum chauffé est négative et celle avec le sérum frais est positive, mais l'index étant plus faible, on considérera la réaction comme douteuse, mais on a tout lieu de croire qu'on se trouve en présence d'un cas spécifique et on a le devoir, si l'hypothèse de syphilis est permise, au point de vue clinique, de traiter le malade comme syphilitique.

La dissociation de la réaction s'observe très souvent dans les cas prévus dans le groupe 2. Faisons remarquer que l'index élevé coïncide exceptionnellement avec les sérums pauvres en alexine; dans la presque totalité des cas ces sérums sont riches en alexine et la réaction positive peut être considérée comme spécifique.

La détermination de l'index hémolytique du sérum devient donc un auxiliaire très précieux de la réaction de déviation du complément.

Et cela se comprend: le procédé avec le sérum frais qui conserve au sérum son alexine, ne nous renseigne pas exactement sur la quantité d'alexine en présence dans le sérum. D'autre part, le pouvoir hémolytique des sérums frais est très variable. D'après notre expérience, qui porte sur 1636 sérums, elle varie de 0 à 29. La richesse en alexine peut donc être considérée comme très inégale dans les sérums frais; plus l'index hémolytique est élevé, plus on a le droit de considérer le résultat positif comme spécifique. Nous voyons donc l'importance qu'il faut attribuer à la force hémolytique des sérums si on tient à se servir de procédé avec le sérum frais et si on veut se rendre compte si le sérum est riche ou pauvre en hémolysines.

Nous avons également recherché si les sérums frais sont riches ou pauvres en alexine par rapport à la dose d'alexine fournie par le sérum de cobaye dans la réaction avec le sérum chauffé.

Nous avons étudié dans ce but 126 sérums; en déterminant l'index hémolytique des sérums frais et celui des sérums chauffés nous pouvons comparer l'alexine du sérum humain et l'alexine du sérum de cobaye, car dans la détermination de l'index du sérum chauffé nous remplaçons la première par la seconde.

Dans 35 cas l'index hémolytique du sérum frais dépasse l'index du sérum chauffé, c'est-à-dire que le sérum frais est plus riche en alexine que le sérum de cobaye.

Dans 36 cas l'index est le même pour le sérum frais que pour le sérum chauffé, c'est-à-dire que la valeur alexique du sérum humain est égale à la valeur alexique du sérum de cobaye.

Dans 55 cas l'index hémolytique du sérum chauffé dépasse celui du sérum frais.

Dans 71 cas sur 126 (56.3 %), le sérum humain est donc très riche en alexine; dans les autres la richesse en alexine est inférieure à celle du sérum de cobaye, mais suffisante pour pouvoir pratiquer la réaction de déviation du complément¹⁾.

Il faut d'autre part, pour la bonne conduite de la réaction, se préoccuper de l'antigène. La plupart des auteurs qui se sont prononcés contre l'emploi des sérums à l'état actif ne disent pas s'ils emploient l'antigène à la même dilution que celle que demande la réaction avec le sérum inactivé.

Toutefois Marg. Stern, Hecht et Lederer préconisent l'emploi des doses réduites d'antigène ($\frac{2}{8}$ de la dose nécessaire pour la réaction de Wassermann).

Nous nous sommes demandés si l'antigène que nous employons dans le procédé avec le sérum frais, fixe par lui-même l'alexine. Ignorant la dose exacte de l'alexine en présence dans le sérum, nous avons par tâtonnements déterminé la dose la plus faible d'alexine qui avec une dose appropriée de sensibilisatrice donne l'index hémolytique des plus faibles (1 et 2), c'est-à-dire que, supposant notre sérum très pauvre en alexine, nous avons voulu savoir si notre dilution d'antigène donne lieu à une fixation non spécifique. C'est là un moyen

1) Marg. Stern a déjà attiré l'attention sur le fait que les sérums frais contiennent l'alexine en quantité suffisante.

excellent de vérifier la spécificité de la réaction obtenue par le procédé avec le sérum frais.

La plupart de nos antigènes (extrait alcoolique de foie hérédo-syphilitique), employés à la dose égale de $\frac{2}{3}$ de celle dont nous nous servons dans la réaction de Wassermann, nous ont donnés pleine satisfaction à ce point de vue; ils ne fixaient pas à la dose 0.1 c. c. 0.15 et 0.2 c. c. l'alexine en question.

On a reproché au procédé fondé sur l'emploi de sérum frais l'emploi d'un antigène alcoolique. On sait en effet, que l'alexine est sensible à l'alcool.

Nous avons pratiqué la réaction de déviation du complément avec le sérum frais parallèlement avec 2 antigènes dans plus de 600 cas. Un des antigènes était une macération alcoolique de foie syphilitique; l'autre aqueux de Lesser (extrait étheré de cœur humain ou de bœuf, d'où l'éther a été chassé dans la suite et le résidu émulsionné dans de l'eau). Deux fois seulement les réactions étaient discordantes; dans un cas la réaction positive avec l'antigène alcoolique était négative avec l'antigène aqueux (il s'agissait d'un ancien syphilitique traité); dans l'autre la réaction faiblement positive avec le premier, était franchement positive avec le second. Il s'agissait dans ce cas d'un malade qui s'est présenté avec un chancre (recherche des spirochètes — positive).

Nous voyons donc que l'influence de l'antigène alcoolique (à la dilution dont on se sert dans la réaction) n'est pas aussi néfaste que l'admet l'opinion courante).

On a prétendu qu'un antigène obtenu à l'aide de l'acétone (Noguchi) donne de meilleurs résultats qu'un extrait alcoolique. Nous avons comparé un antigène alcoolique à un antigène acétoné provenant du laboratoire de Noguchi. L'expérience a porté sur 57 cas et n'a relevé aucune différence.

Pour finir avec la pratique de la réaction avec le sérum frais, disons qu'il est indispensable que les sérums soient recueillis depuis moins de 24 heures et qu'ils soient clairs. Le pouvoir alexique des sérums frais baisse très vite et il importe que le sérum conserve son alexine. Il faut rejeter un sérum fortement hémolysé; d'autre part, on doit débarrasser

le sérum; par une centrifugation énergique, des globules humains sous peine d'avoir une réaction non spécifique.

La nécessité de pratiquer la réaction aussi bien avec le sérum frais qu'avec le sérum chauffé est évidente d'après l'étude de 1636 cas que nous avons faite. La dissociation de la réaction a été observée 176 fois (10.8 %).

Ces 176 faits ont été relevés sur 162 malades. Chez 10 la séroration dissociée a été constatée à 2 reprises, chez 2 à 3 reprises.

Existe-t-il des cas où la réaction de Hecht-Weinberg se soit montrée positive chez des sujets indemnes de syphilis? Nous en sommes encore à nous le demander. Parmi les cas que nous avons étudiés au point de vue sérologique, quelques-uns ont trait à des malades que nous n'avons pas examinés, et sur lesquels nous n'avons pas eu de renseignements précis (en tout 28 cas). En général il s'agit de malades connus de nous, suivis de près — il est vrai qu'un grand nombre sont des syphilitiques en cours de traitement.

Dans deux ou trois cas concernant des malades n'ayant pas eu, à leur dire, de syphilis antérieure, et ne présentant pas d'accidents dont la nature syphilitique fût certaine au point de vue clinique, nous avons conservé quelques doutes sur l'existence d'une infection spécifique malgré l'existence d'une réaction de Hecht-Weinberg positive ($W = 0$). Deux de ces cas concernent des malades atteints l'un d'alopecie diffuse, l'autre d'une alopecie peladoïde des extrémités de la moustache. Dans un autre cas la syphilis était douteuse mais le malade avait été atteint de malaria — il est possible que la réaction de Hecht-Weinberg puisse être positive chez les paludéens comme la réaction de Wassermann elle-même.

Au point de vue pratique, nous sommes des plus affirmatifs; nous considérons qu'une réaction de Hecht-Weinberg positive constitue une indication nette, précise d'un traitement antisypilitique. Celui-ci commencé, et manié par les agents et aux doses nécessaires on verra normalement la réaction de Hecht-Weinberg disparaître ou bien on constatera passagèrement par suite de réactivation l'apparition de la réaction de Wassermann ce qui confirmera le diagnostic.

Sous l'influence du traitement par le salvarsan, fait aux doses normales¹⁾ et avec la continuité nécessaire, la réaction de Hecht-Weinberg disparaît régulièrement chez les syphilitiques. La disparition est rapide quand on la rencontre chez des malades traités à la période primaire ou au début de la période secondaire — il s'agit du reste de malades déjà traités ayant eu antérieurement une réaction de Wassermann franchement positive, sauf dans les cas de chancre récent, la réaction de Hecht-Weinberg apparaissant avant la réaction de Wassermann. La disparition est lente en général dans la syphilis ancienne — tout le monde sait aujourd'hui que la stérilisation de la syphilis, toutes choses égales d'ailleurs, est d'autant plus difficile que l'infection est plus ancienne.

Nous avons vu parfois la réaction de Wassermann reparaitre, faible ou forte à la suite d'une première série d'injections faite chez des malades atteints soit de tabes, soit de méningite spécifique. Nous attirons l'attention sur ce fait remarquable, qui s'explique peut-être (?) par un retour de la perméabilité des méninges à certaines substances spécifiques.

Ces faits nous conduisent à parler de ceux où on voit la réaction de Hecht-Weinberg redevenir positive à la suite d'une injection de 0.30 de salvarsan ou de néosalvarsan faite dans un but de réactivation. Le cas n'est pas rare, il concerne en général des syphilis anciennes, peu virulentes, ou des syphilis récentes très bien traitées, la séroration suivant la méthode de Hecht-Weinberg apparaît tardivement du 10^e au 20^e jour. Au contraire dans les syphilis virulentes, la séroration est souvent précoce et en général positive, franchement, par la méthode de Wassermann.

D'autres auteurs pratiquent la réaction avec le sérum frais suivant d'autres méthodes.

Le procédé de Marg. Stern a trouvé le plus de crédit dans de nombreux laboratoires. Marg. Stern considère que les sérums actifs sont assez riches en alexine pour pouvoir pratiquer la réaction; elle met en garde contre le danger que présente l'emploi d'alexine de cobaye et

1) C'est-à-dire (Leredde) à la dose de 0 gr. 01 par kg. (salvarsan) — 0 gr. 015 (néosalvarsan).

elle n'ajoute aux sérums frais que de l'ambocepteur artificiel (lapin antimouton). Les doses d'antigène et celles de globules de mouton sont réduites par comparaison aux doses que demande la réaction de Wassermann.

Le procédé de Marg. Stern donne sensiblement les mêmes résultats que la réaction de Hecht-Weinberg dont nous nous servons. Toutefois les résultats sont souvent moins nets en raison de l'excès de sensibilisatrice hémolytique. Dans un cas de syphilis que nous avons observé (l'index hémolytique était de 14) la réaction était même négative avec le procédé de Stern, positive avec le procédé de Hecht-Weinberg, la réaction de Wassermann classique était des plus nettes.

Steinitz en comparant les réactions de Wassermann, Stern et Hecht, a trouvé une concordance dans 88 % des cas (nos chiffres sont sensiblement les mêmes) et il constate également que la réaction de Hecht était plus nette que celle de Stern.

Nous ajoutons des substances hémolytiques aux sérums frais uniquement dans le cas où l'index hémolytique est de 0, c'est-à-dire lorsque le sérum frais est dépourvu d'action hémolytique pour les globules de mouton. Dans 72 cas sur 1636, l'index hémolytique du sérum était égal à 0. De ces 72 sérums, 4 seulement manquaient d'alexine et la réaction a pu être effectuée après addition de 0.1 c. c. d'alexine à 10 %. Un seul sérum fixait par lui-même l'alexine (0.1 c. c. de sérum fixait 0.1 c. c. d'alexine à $\frac{1}{4}$) et l'hémolyse n'a pu être effectuée dans ces conditions. 67 sérums étaient dépourvus de sensibilisatrices et l'hémolyse a eu lieu dans la majorité des cas après avoir ajouté aux sérums 0.1 c. c. de sérum lapin antimouton (comme on l'emploie dans la réaction de Wassermann) dilué au $\frac{1}{10}$.

Ceci prouve encore que les sérums frais contiennent assez de substances hémolytiques, car dans 95 % la réaction a pu être pratiquée dans des conditions naturelles. La détermination de la force hémolytique des sérums nous permet en outre de ne pas interpréter le résultat à l'aveugle.

Pouvoir hémolytique des sérums frais.

En se servant de la méthode de Weinberg appliquée à la réaction de déviation du complément nous avons eu l'occasion d'étudier de près les propriétés hémolytiques des sérums, l'influence du traitement antisyphilitique sur les hémolysines du sérum et nous avons pu étudier également la valeur de la détermination de la force hémolytique des sérums comme méthode de diagnostic, préconisé par Popoff.

Nous avons examiné en tout 1636 cas. L'index hémolytique de ces 1636 cas, c'est-à-dire le pouvoir que possède 0.1 c.c. de sérum frais de dissoudre des globules rouges de mouton, se répartit de la façon suivante:

L'index 0 a été observé 72 fois	L'index 12 a été observé 8 fois
" 1 " " " 82 "	" 13 " " " 5 "
" 2 " " " 199 "	" 14 " " " 9 "
" 3 " " " 230 "	" 15 " " " 2 "
" 4 " " " 337 "	" 16 " " " 2 "
" 5 " " " 263 "	" 18 " " " 1 "
" 6 " " " 162 "	" 19 " " " 3 "
" 7 " " " 84 "	" 20 " " " 4 "
" 8 " " " 57 "	" 21 " " " 3 "
" 9 " " " 59 "	" 22 " " " 1 "
" 10 " " " 33 "	" 29 " " " 1 "
" 11 " " " 19 "	

72 fois, c'est-à-dire dans 4.5 % de nos examens, le sérum a été privé de tout pouvoir hémolytique contre les globules de mouton.

4 de ces sérums manquèrent d'alexine, un était antialexique, et

67 sérums ne pouvaient produire l'hémolyse du fait de l'absence d'ambocepteurs hémolytiques.

Chez 119 personnes, l'index a été étudié à plusieurs reprises (de 2 à 5) au cours du traitement ce qui a permis d'étudier les variations.

Dans 6 cas, les sérums présentaient toujours l'index hémolytique 0.

De l'index 0 le sérum est monté aux index plus élevés (1-6), dans 6 autres cas.

L'index est monté chez 16 personnes — tous malades traités d'une manière sévère par le Salvarsan. Voilà quelques exemples:

M. d'Arg.	4-5-6-9
Barb.	1-7
Bl.	5-11-16
Mis.	4-7-8
Th.	6-10-14 ¹⁾ .

1) Nous éprouvons toujours nos globules rouges de mouton de telle manière qu'1 c.c. de leur dilution à 5 % dans le volume total qu'on emploie dans la réaction de Wassermann — 3 c.c. donne toujours la même teinte étalon quand on lui ajoute de l'eau distillée — pour avoir des résultats comparables.

Il est possible que le Salvarsan augmente l'action hémolytique du sérum sanguin ou bien que l'index tende à revenir à l'état normal, la syphilis étant atténuée sous l'influence d'un traitement actif.

La diminution de l'index hémolytique a été observée 2 fois seulement.

L'index est resté le même dans 89 cas.

De 72 cas où l'index est resté nul, 40 concernent les femmes, or nous n'avons étudié sur 1636 sérums que 297 appartenant au sexe féminin. Il existe une relation certaine avec les règles, l'index étant à 0 au cours de celles-ci.

D'autre part, les index élevés se rencontrent plus souvent chez la femme que chez l'homme.

Pouvoir hémolytique des sérums syphilitiques et non syphilitiques.

Nous avons signalé au début de notre article que Popoff, Bickel, Kafka, constatent une relation entre l'infection syphilitique et la diminution ou disparition de la force hémolytique des sérums.

Popoff en déterminant le pouvoir hémolytique des sérums humains par rapport aux hématies des cobayes, constate que le sérum des syphilitiques empêche plus ou moins cette hémolyse. Il propose même de se servir de cette action empêchante du sérum humain pour établir le diagnostic de la syphilis et d'effectuer cette détermination hémolytique parallèlement à la réaction de Wassermann. Popoff pense que l'appauvrissement des sérums syphilitiques en force hémolytique doit être attribué au manque d'alexine qui s'unirait aux lipoides dont le sérum des syphilitiques est très riche. Dans la syphilis récente toute l'alexine s'unirait aux lipoides, dans la syphilis ancienne ou traitée, la quantité des lipoides diminue, une partie d'alexine reste libre et l'hémolyse des globules de cobaye reste incomplète.

De l'examen de 600 sérums, l'auteur conclut que dans 75 % des cas il y a concordance entre cette disparition ou diminution de l'alexine et la réaction de Wassermann.

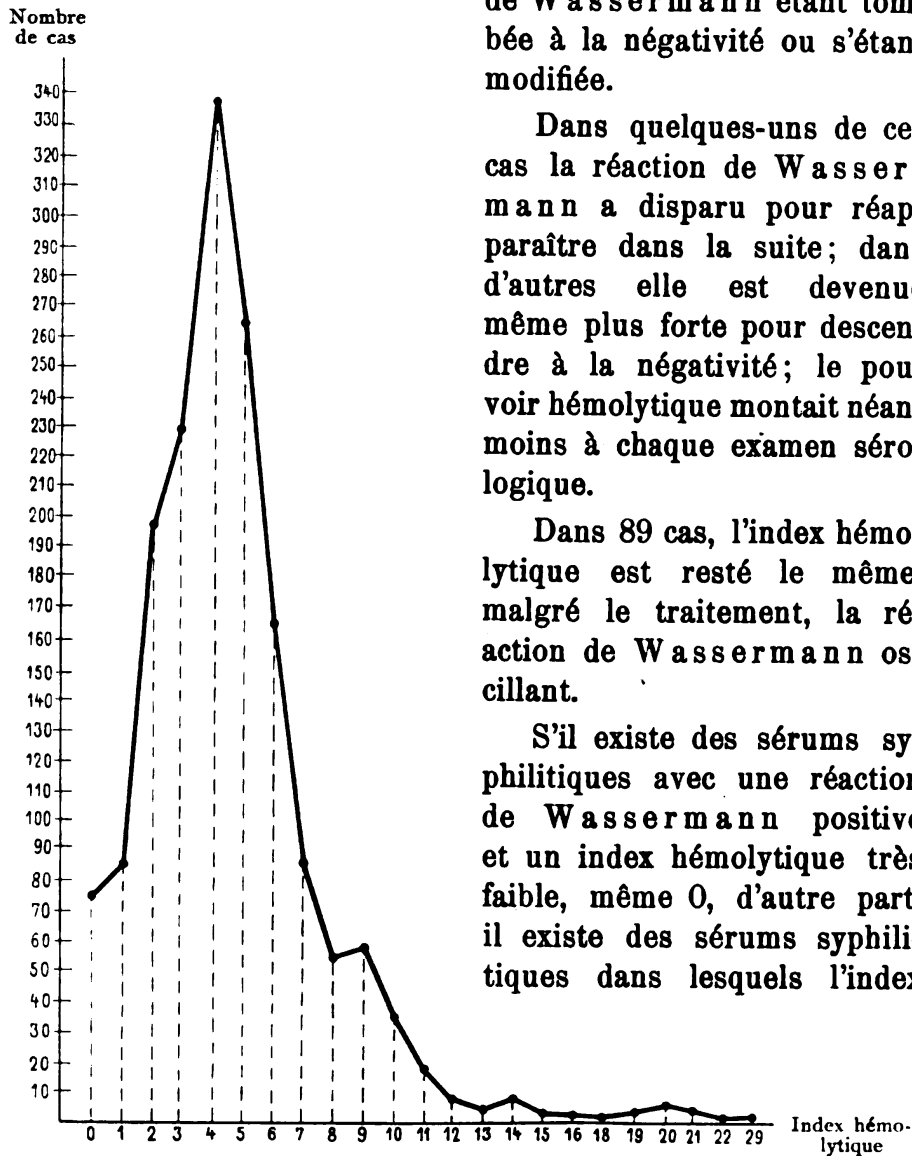
Nous avons déjà mentionné que 16 fois sur 119 malades, tous présentant une réaction de Wassermann forte, le pouvoir hémolytique (calculé d'après l'hémolyse des globules de mouton par le sérum humain) augmente à la suite du

traitement. Dans 6 autres cas, il est resté nul et le traitement n'a nullement influencé la force hémolytique, la réaction de Wassermann étant tombée à la négativité ou s'étant modifiée.

Dans quelques-uns de ces cas la réaction de Wassermann a disparu pour réapparaître dans la suite; dans d'autres elle est devenue même plus forte pour descendre à la négativité; le pouvoir hémolytique montait néanmoins à chaque examen sérologique.

Dans 89 cas, l'index hémolytique est resté le même, malgré le traitement, la réaction de Wassermann oscillant.

S'il existe des sérums syphilitiques avec une réaction de Wassermann positive et un index hémolytique très faible, même 0, d'autre part, il existe des sérums syphilitiques dans lesquels l'index

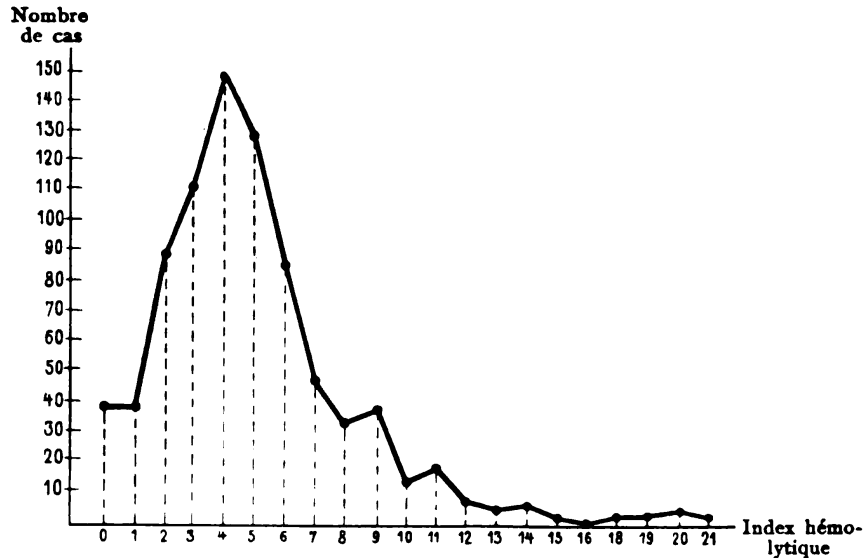


Courbe I (W. = +, W. = 0).

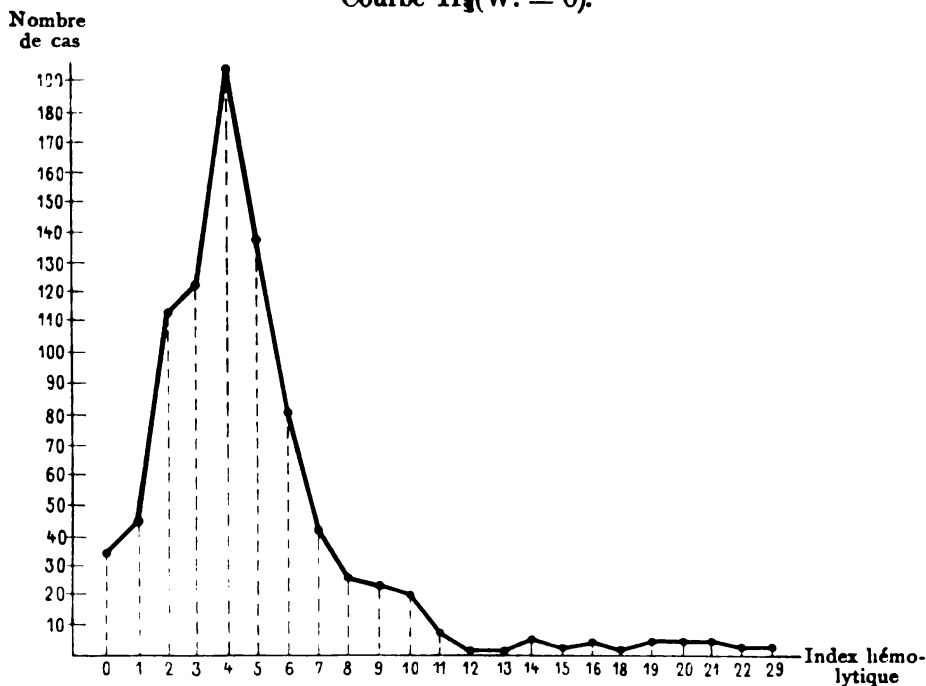
hémolytique (correspondant évidemment avec une richesse en alexine) est des plus élevés (20, 29 même).

Il est donc impossible pour nous d'affirmer la syphilis ou de la nier à la suite d'un examen du pouvoir hémolytique du sérum.

Nous donnons ci-dessous une statistique complète de nos observations, montrant la répartition des index hémolytiques chez les sérums frais ayant une réaction de Wassermann négative et une réaction de Wassermann positive. (Les cas où la réaction de Wassermann = 0 et la réaction de Hecht-Weinberg = + sont considérés comme positifs.)



Courbe II (W. = 0).



Courbe III (W. = +).

Les trois courbes montrent :

I le pouvoir hémolytique des sérums (R.W. = 0, R.W. = +)
 II " " " des sérums dont la R.W. = 0
 III " " " " " " " R.W. = +

W. = 0				W. = +			
L'index	0	a été observé	38 fois	L'index	0	a été observé	34 fois
"	1	"	38	"	1	"	44
"	2	"	89	"	2	"	110
"	3	"	110	"	3	"	120
"	4	"	147	"	4	"	190
"	5	"	128	"	5	"	135
"	6	"	84	"	6	"	78
"	7	"	44	"	7	"	40
"	8	"	32	"	8	"	25
"	9	"	35	"	9	"	24
"	10	"	13	"	10	"	20
"	11	"	15	"	11	"	4
"	12	"	8	"	12	"	0
"	13	"	5	"	13	"	0
"	14	"	6	"	14	"	3
"	15	"	1	"	15	"	1
"	16	"	0	"	16	"	2
"	18	"	1	"	18	"	0
"	19	"	1	"	19	"	2
"	20	"	2	"	20	"	2
"	21	"	1	"	21	"	2
"	22	"	0	"	22	"	1
"	29	"	0	"	29	"	1

Il résulte de nos recherches qu'il n'existe aucune relation entre la réaction de Wassermann positive — symptôme de la syphilis — et le pouvoir hémolytique des sérums déterminé par rapport à la richesse en hémolysine des sérums humains contre le sang de mouton.

Zusammenfassung.

Die Bestimmung der hämolytischen Kraft des inaktivierten und des frischen, nicht erhitzten Serums gestattet die Komplexbindungsreaktion unter den genauesten Bedingungen auszuführen und das Resultat der Reaktion zu deuten.

Die erhitzten hochwertigen Sera (hämolytischer Index über 10) können eine spezifische positive Reaktion (Bauersche Reaktion) dort verursachen, wo die Wassermannsche Reaktion negativ bleibt.

Die „Desensibilisierungsreaktion“, welche darin besteht, daß die hämolytischen Ambozeptoren durch Digerierung der erhitzten Sera mit Hammelerythrocyten ausgeschaltet werden,

kann positiv und spezifisch dort eintreten, wo die Wassermannsche Reaktion negativ verläuft.

Demnach ist es sehr nützlich, eine oder die andere dieser Modifikationen anzuwenden, wo die Wassermannsche Reaktion negativ bleibt.

Die Komplementbindungsreaktion muß ebenso mit frischen wie mit erhitzten Sera ausgeführt werden.

Die Verwendung frischer Sera bewirkt eine positiv spezifische Reaktion dort, wo die Wassermannsche Reaktion negativ ausfällt.

Die Bestimmung des hämolytischen Index der frischen Sera gestattet in gewissem Grade die Spezifität der gewonnenen Resultate zu beurteilen.

Man bestimmt die hämolytische Kraft des Serums, nicht um diesen Vorgang als sekundäre diagnostische Methode neben der Wassermannschen Reaktion (Popoff) zu verwenden, sondern um die Resultate zu deuten, welche bei Verwendung frischer Sera gewonnen werden. Uebrigens besteht kein Parallelismus zwischen der hämolytischen Fähigkeit der Seren (den Hammelblutkörperchen gegenüber) und der Wassermannschen Reaktion.

Ouvrages cités.

- Bickel, Münch. med. Wochenschr., 1912, No. 15, p. 804.
Busila, Revista Stintelor Medicale, 1910, No. 10, p. 838.
Brendel und Müller, Münch. med. Wochenschr., 1912, No. 32.
Bauer, J., Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 16.
— Berl. klin. Wochenschr., 1908.
Demanche, La Clinique, 1912, No. 45.
Jacobaeus, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., Bd. 8, p. 615.
Hecht, Wien. klin. Wochenschr., 1908, p. 1742 und 1909, p. 265.
— Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., Bd. 5, 1910, p. 572.
Kafka, Med. Klinik, 1913, No. 10, p. 378.
Levaditi et Latapie, Presse médicale, 1910, 16 avril.
— — Ibid., 1911, 4 novembre.
Leredde et Rubinstein, Communication à l'Académie de Médecine, octobre 1911.
— — Société de Médecine de Paris, 27 janv. 1912.
— — Bull. de la Soc. Fr. de Syphiligraphie, 5 déc. 1912.
Müntz, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., Bd. 9, 1911, p. 29.
Popoff, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., Bd. 14, 1912, p. 218.
— Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 39.
Rossi, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther., Bd. 10, 1911, p. 321.

- Steinitz, Med. Klinik, 1912, No. 45, p. 1834.
Thomsen und Boas. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther., Bd. 10, 1911.
Stern, M., Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., 1909.
Wechselmann, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap., Bd. 3, 1909,
p. 525.
Weinberg, Bull. de l'Inst. Pasteur, 1909, p. 774.
— Compt. rend. de la Soc. de Biol., T. 4, XXI, p. 453.
— Ann. de l'Inst. Pasteur, 1912, No. 6, p. 424.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Kaiserl. Japan. Institut für Infektionskrankheiten zu
Tokio (Direktor: Prof. Dr. S. Kitasato).]

Ueber die Bildungsstätte des komplementbindenden Antikörpers.

Von Dr. **M. Tsurumi** und Dr. **K. Kohda**.

Mit 1 Kurve im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Juli 1913.)

In bezug auf die Komplementbindungsreaktion unterscheidet man heutzutage die spezifische von der nicht spezifischen.

Obwohl die Wassermannsche Reaktion früher als ein Phänomen spezifischer Natur betrachtet wurde, so nimmt man jetzt einen anderen Standpunkt ein, da ja diese Reaktion nicht nur bei Syphilis, sondern auch bei anderen Erkrankungen zur Verwendung kommen kann.

Dagegen ist es noch nicht klargestellt, ob die bindende Substanz der Reaktion immunisatorischen Ursprungs ist oder nicht.

Die Komplementbindung, welche bei gewissen Infektionskrankheiten, z. B. bei Typhus abdominalis, mit dem Bacillenextrakte als Antigen zustande kommt, ist natürlich eine spezifische Immunreaktion, da sie weder bei gesunden Individuen noch anderen Erkrankungen angewandt werden kann. Wenn der Antikörper des soeben genannten Phänomens immunisatorischen Ursprungs ist, so ist es selbstverständlich, daß er durch Erkrankung oder künstliche Immunisierung erzeugt wird. Forschungen in bezug auf die Bildungsstätte des Bakteriolytins sind schon durch viele Autoren, nämlich Pfeiffer und Marx, v. Wassermann, Citron und Deutsch, sowie neuerdings von Kusama und Kohda vorgenommen worden. Die Meinungen der verschiedenen Autoren stimmen darin überein, daß gewisse Organe als die Bildungsstätten des Bakteriolytins angesehen werden müssen.

Dagegen liegt aber unseres Wissens keine Literatur vor, welche die Bildungsstätte des komplementbindenden Antikörpers behandelt.

I. Versuchsanordnung.

An und für sich ist das Komplementbindungsverfahren schon sehr kompliziert und es ist gar nicht so leicht, exakte Resultate zu erzielen. Hierzu kommt noch erschwerend, daß in unserem Falle die Untersuchungsmaterialien verschiedene Organextrakte waren. Zunächst sollen die für den Versuch angewandten Methoden der Reihe nach beschrieben werden.

1. Antigen: Die Aufschwemmung der Typhusbacillen wurde in der Weise hergestellt, daß auf 1 ccm einer 0,85-proz. Kochsalzlösung mit 0,5 Proz. Karbol 3 mg einer 18-stündigen Typhuskultur beigegeben wurde. Diese Suspension wurde 24 Stunden lang hindurch stark geschüttelt; dann kam 0,1 ccm von der durch Zentrifugieren entstandenen darüberstehenden Flüssigkeit als Antigenlösung zur Verwendung. Dabei führte natürlich das doppelte Quantum der Flüssigkeit weder Selbsthämolyse noch -hemmung herbei.

2. Hinsichtlich der Herstellung des Immuserums und der Organextrakte wurden jedesmal junge Kaninchen als Versuchstiere ausgewählt. Nun wurde die Subletaldosis der Typhusbacillen (1,5 mg pro Kilogramm) nach 30 Minuten langem Erhitzen auf 60° C intravenös injiziert. Nach Ablauf eines gewissen Zeitraums erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Verblutung. Dann haben wir die wässrigen Extrakte der verschiedenen Organe dem Gewichtsverhältnis entsprechend hergestellt, so daß ein Teil eines Organes in vier Teile der physiologischen Kochsalzlösung mit 0,5-proz. Karbol hineingetan wurde. Es mußte hier aber die Extraktionsdauer beachtet werden. Da in unserem Falle nach einer 24-stündigen bis 4-tägigen Verweildauer der Materialien im Eisschrank für die Extraktion ganz gleiche Resultate sich ergaben, beschränkten wir uns nur auf die kurzfristige Dauer. Ferner durfte die Beachtung der Selbsthämolyse und -hemmung der Organextrakte nicht vernachlässigt werden. In der Tat rief 0,1 ccm jeden Extraktes weder bemerkbare Selbsthämolyse noch -hemmung hervor. Die Resultate mit den Extrakten des Knochenmarks und der Milz müssen besonders erwähnt werden, weil man auf die Auszüge besondere Rücksicht zu nehmen hat.

Tabelle I.

Knochenmarksextrakt	0,1	0,05	0,025	0,01
Komplement (10-fach verdünnt)	0,5	0,5	0,5	0,5
Hämolyse	—	—	—	—
5-proz. Ziegenblutkörperchen	0,5	0,5	0,5	0,5
Resultat	H	H	H	H

Wie aus der Tabelle hervorgeht, enthält 0,1 ccm Rückenmarksextrakt keine hämolysinartig wirkende Substanz.

Tabelle II.

Knochenmarksextrakt	0,1	0,05	0,025	0,01
Komplement (10-fach verdünnt)	—	—	—	—
Hämolysin	+	+	+	+
5-proz. Ziegenblutkörperchen	0,5	0,5	0,5	0,5
Resultat	f. k. H	H	H	H

Nach dem Versuche ließen sich ganz minimale Mengen von einer wie Komplement wirkenden Substanz in 0,1 ccm des genannten Extraktes nachweisen, während schon in 0,05 ccm desselben keine Spur davon zu finden war. Man darf deshalb wohl mit Recht sagen, daß die Selbsthämolysen und -hemmung der Organextrakte auf das Resultat in diesem Falle keinen merkbaren Einfluß ausübten.

3. Um den Leukocytenextrakt zu gewinnen, injizierten wir zuerst dem Versuchstiere 50—100 ccm einer 5-proz. Aleuronatbouillon in die Bauchhöhle. 6—10 Stunden später wurde die Peritonealflüssigkeit herausgenommen und zentrifugiert, um die Leukocytenmasse von der überstehenden Flüssigkeit zu trennen. Nachdem die Leukocytenmasse im Mörser vorsichtig zerrieben worden war, setzten wir dem Material eine physiologische Kochsalzlösung mit 0,5-proz. Phenol ganz wie bei Organextrakten hinzu. Schließlich wurde die Leukocytenemulsion im Eisschrank 24 Stunden lang extrahiert.

4. Die Komplementmenge betrug 0,5 ccm des 10-fach verdünnten frischen Meerschweinchenserums.

5. Die angewandte absolute Hämolysinmenge belief sich auf 0,004 ccm in einem Röhrchen, in dem der Titer des Hämolysins 0,001 ccm erreichte.

6. Die Resultate des Versuchs wurden wie folgt eingeteilt: H = Hemmung, f. k. H = fast komplette Hemmung, K = große Kuppe, k = kleine Kuppe, L = Lösung.

II. Die Verteilung des komplementbindenden Antikörpers im Tierkörper.

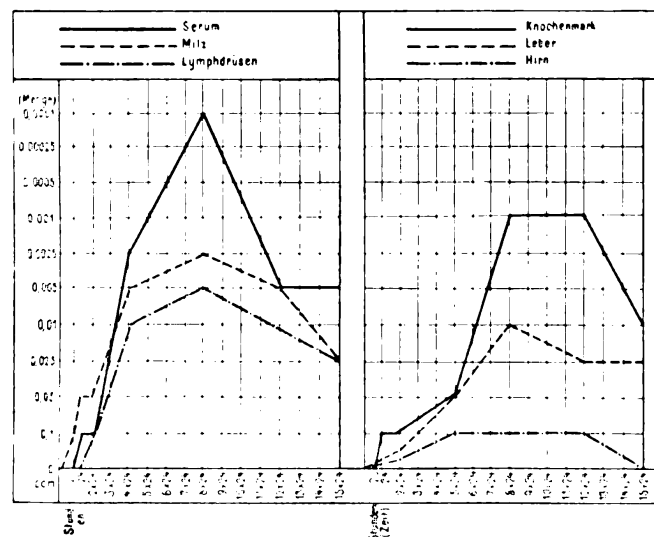
Mit der oben erwähnten Versuchsanordnung haben wir die Verteilung des komplementbindenden Antikörpers im normalen gesunden Kaninchen und in den verschiedenen Stadien der Immunisierung untersucht. Das Resultat geht aus folgender Tabelle hervor. Hier beziehen sich die Ziffern in der Tabelle auf die höchste Verdünnung des Serums und der Organextrakte,

z. B. zeigt 0,0001 des Serums den maximalen Grad seiner positiven Erfolge; genauer gesagt, die bindende Substanz ließ sich in so verdünnter Menge noch nachweisen. Ferner muß betont werden, daß die Ziffern in der Tabelle die durchschnittliche Zahl angeben, die durch mehrmals wiederholte Versuche erzielt worden ist.

Tabelle III.

Materialien	Kon- trolle	Zeit						
		20 Std.	24 Std.	2 × 24 Std.	5 × 24 Std.	8 × 24 Std.	12 × 24 Std.	15 × 24 Std.
Serum	—	—	0,1	0,1	0,0025	0,0001	0,005	0,025
Milz	—	0,1	0,05	0,05	0,005	0,0025	0,005	0,025
Lymphdrüsen	—	—	—	0,1	0,01	0,005	0,01	0,025
Knochenmark	—	—	0,1	0,1	0,05	0,001	0,001	0,01
Lunge	—	—	—	—	—	0,0025	0,0025	0,025
Leber	—	—	—	—	0,05	0,01	0,025	0,025
Niere	—	—	—	—	0,025	0,025	0,01	0,025
Herz	—	—	—	—	0,025	0,0025	0,005	0,025
Hoden	—	—	—	—	0,05	0,0025	0,0025	—
Ovarium	—	—	—	—	—	—	—	—
Hirn	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	—
Rückenmark	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	—
Galle	—	—	—	—	—	—	—	—
Peritonealfliu- sigkeit	—	—	—	—	—	—	—	—

Die folgende Kurve stellt das Resultat der obigen Versuche graphisch dar.



Es ergibt sich aus dem Versuche:

1. Der komplementbindende Antikörper im Blutserum.

Wenn auch der Antikörper sich in 0,1 ccm des normal gesunden Kaninchenserums nicht nachweisen läßt, so trat er doch im Serum 24 Stunden nach der einmaligen intravenösen Injektion der Typhusbacillenaufschwemmung auf. Am 8. Tage erreichte der Antikörpergehalt im Serum den Gipfelpunkt, um nachher anfangs schneller und dann allmählicher herabzusinken. Streng genommen ließ sich die bindende Substanz im ersten 24-stündigen Verlauf nach der Injektion zuerst in 0,1 ccm des Serums nachweisen, während sie sich in derselben Zeit in 0,05 ccm des Milzextraktes erwies. Daraus geht deutlich hervor, daß, obwohl der Antikörpergehalt des Serums (0,1) im Anfangsstadium (nach 24 Stunden) dem der Milz (0,05) nachsteht, er schon vom 5. Tage an deutlich den Gehalt der Milz und der anderen Organextrakte übertrifft, und daß die Antikörpermenge im Serum am 8. Tage das Maximum (0,0001) erreicht, während sie schon am 12. Tage dem Gehalt des Knochenmarks nachsteht. Das Quantum der bindenden Substanz im arteriellen und venösen Serum ließ sich ausschließlich weder im ganz früheren Stadium (24 Stunden) noch im hoch immunisierten Falle unterscheiden.

2. Der komplementbindende Antikörper in der Milz.

Obwohl der Antikörper beim normal gesunden Kaninchen, gleich wie im Serum, in 0,1 ccm der Milzextrakte in keiner Spur sich nachweisen ließ, trat er schon in 0,1 ccm im 24-stündigen Verlaufe nach der einmaligen Einverleibung des Antigens auf. Dagegen war er in derselben Zeit weder im Serum noch in den anderen Organextrakten zu finden. Erst 24 Stunden nach der Injektion ließ sich der Antikörper selbst in 0,05 ccm des Milzextraktes nachweisen, in dem der Antikörpergehalt des Extraktes im Vergleich mit dem des Serums und der anderen Organextrakte immer noch an der Spitze steht. Am 5. Tage trat aber der Antikörpergehalt der Milz gegenüber dem des Serums zurück, während er nachher nicht mehr, wie die Tabelle zeigt, in der ersten Linie steht.

3. Der Antikörper im Knochenmark und in den Lymphdrüsen.

Wie die Tabelle erklärt, enthalten die Extrakte des Knochen-

marks und der Lymphdrüsen den Antikörper im allgemeinen reichlich. Wenn auch der Antikörpergehalt des Knochenmarks-extraktes im Anfangsstadium dem Gehalt des Milzextraktes nachsteht, so nimmt schon am 8. Tage nach der Injektion der Antikörper im Knochenmark deutlich zu, so daß er den Gehalt der Milz übertrifft. In dem Verhältnis verlief der Vorgang weiter. Obwohl die Antikörpermenge in jedem Organe im späteren Stadium einen absoluten Beweis für die Bildungsstätte des Antikörpers nicht ergibt, so liegt doch die Vermutung nahe, daß diesem Vorgang für die Bildungsstätte des Antikörpers einige Bedeutung beigelegt werden kann. Das in der Tabelle wiedergegebene Resultat geht aber aus Rücksicht auf die Funktion der Milz hervor, welche man als eine Bildungsstätte annehmen könnte. Daher war es nötig, das Verhältnis am entmilzten Tiere zu studieren, um beurteilen zu können, ob die anderen Organe außer der Milz für die Bildungsstätte des Antikörpers Geltung haben.

4. Die Verteilung des Antikörpers in den übrigen Organen (Lungen, Leber, Niere, Herz, Hoden, Ovarium, Hirn- und Rückenmark, sowie Galle).

Im 24-, sogar 48-stündigen Ablauf nach der Einverleibung der Typhusbacillen ließ sich keine Spur vom Antikörper in den obengenannten Organen nachweisen. Erst am 5. Tage trat der Antikörper in jedem Organ auf, aber sein Gehalt zeigte untereinander keine merkbaren Unterschiede. Sogar standen die Antikörpermengen in den Organen den Mengen im Serum und in der Milz deutlich nach. Ferner übertrafen die Mengen des Antikörpers in den ersteren Organen den ganzen Verlauf hindurch die in der Milz. Man kann also nicht gut annehmen, daß die Organe irgendwie mit der Bildungsstätte des Antikörpers im Zusammenhang stehen. Außerdem war es nicht möglich, die bindende Substanz in den verschiedenen Stadien in so kleinen Mengen wie 0,05 ccm in den Hirn- und Rückenmarksextrakten zu konstatieren. Diese Erscheinung dürfte darauf zurückzuführen sein, daß sich beide Organe nicht nur an der Produktion dieser Substanz beteiligen, daß vielmehr auch der verteilte Antikörper nur in geringen Mengen vorhanden ist, und zwar wegen einer relativ spärlichen Vaskularisation der betreffenden Organe. In bezug auf den

Antikörper in der Galle ließ er sich weder im gesunden Zustande noch im ganzen Verlauf der Immunisierung nachweisen. Das gleiche gilt ebenfalls auch für Peritonealflüssigkeit in 48-stündigem sowie 15-tägigem Ablauf nach der Einverleibung der Typhusbacillen.

III. Der Versuch beim entmilzten Kaninchen.

Wie schon oben erwähnt, unterliegt es keinem Zweifel mehr, daß die Milz eine dominante Bildungsstätte des komplementbindenden Antikörpers ist. Doch bleibt immer noch die Frage offen, ob sich die übrigen Organe an der Bildung des Antikörpers beteiligen oder nicht. Um dieser Frage näher zu kommen, mußte der Versuch beim entmilzten Tiere vorgenommen werden. Also haben wir den Antikörper 2 Wochen später am entmilzten Kaninchen in den verschiedenen Stadien der Immunisierung im Serum und in den verschiedenen Organ- und Leukocytenextrakten aufgesucht.

Tabelle IV.

Materialien	Zeit				
	2 × 24 Std.	3 × 24 Std.	5 × 24 Std.	7 × 24 Std.	11 × 24 Std.
Serum	—	—	0,05	0,01	0,0025
Knochenmark	—	—	0,05	0,05	0,01
Lymphdrüsen	—	—	0,01	0,05	0,1
Lunge	—	—	0,1	0,1	0,1
Leber	—	—	—	0,1	0,05
Niere	—	—	—	0,1	0,05
Herz	—	—	—	0,1	0,1
Hoden	—	—	—	—	0,1
Ovarium	—	—	—	—	—
Leukocyten	—	—	—	0,05	—

Obwohl sich der Antikörper, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, im 2- oder 3-tägigen Ablauf nach der Injektion der Typhusbacillen im Knochenmark und in den Lymphdrüsen sowie in den anderen Organen nicht nachweisen ließ, trat er am 5. Tage im Knochenmark, in den Lymphdrüsen und im Serum ganz geringfügig auf. Am 7. Tage übertraf aber der Antikörpergehalt des Serums den der anderen zwei Organe. Das Verhältnis dauerte bis zum 11. Tage an. Also läßt sich auch die Bildung des komplementbindenden Antikörpers am entmilzten Tiere nachweisen. Es muß aber hier

betont werden, daß die Bildung des Antikörpers in diesem Falle deutlich verzögert war. Selbst am 5. Tage ließ sich der Antikörper im Knochenmark und in den Lymphdrüsen erst in kleiner Menge (0,05) konstatieren, während er schon nach 24 Stunden nach der Injektion im Milzextrakt des nicht entmilzten Kaninchens zu finden war. Ferner betrug am 7. Tage der Antikörpergehalt des Serums beim entmilzten Tier nur 0,01, während derselbe beim nicht entmilzten am 8. Tage schon 0,0001 erreichte.

IV. Passive Immunisierung.

Die oben erörterten Resultate waren die von der aktiven Immunisierung. In diesem Falle könnte man ja die Milz nach den obigen Versuchen als die dominante Bildungsstätte des Antikörpers annehmen. Wie verhält es sich aber bei der passiven Immunisierung? Von der Voraussetzung ausgehend, daß Milz und Knochenmark etc. keine Bildungsstätten des Antikörpers sind, und daß diese Organe nur als Reservoir gelten können, müssen sie natürlich den Antikörper bei der passiven Immunisierung reichlicher als die anderen Organe und Serum enthalten. Um diese Frage zu lösen, gingen wir an den nächsten Versuch.

Einem Kaninchen, dessen Körpergewicht 1,63 kg betrug, injizierten wir ca. 10 ccm Typhuskaninchenserum intravenös. 45 Stunden danach wurde das Versuchstier durch Verblutung abgetötet, um den nächsten Versuch auszuführen.

Tabelle V.

Materialien	Dosis				
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
Serum	K	k	L	L	L
Milz	L	L	"	"	"
Lymphdrüsen	"	"	"	"	"
Knochenmark	"	"	"	"	"
Lunge	"	"	"	"	"
Leber	"	"	"	"	"
Niere	"	"	"	"	"
Herz	"	"	"	"	"
Hoden	"	"	"	"	"
Ovarium	"	"	"	"	"
Rückenmark	"	"	"	"	"
Hirn	"	"	"	"	"
Galle	"	"	"	"	"

Nach dem Versuch fiel die Reaktion mit dem Serum positiv aus, während dieselbe nicht nur mit den verschiedenen Extrakten, sondern auch mit dem Milzextrakte ganz negativ ausfiel. Da dabei ein Zeitraum von etwa 2 Tagen nach der Einverleibung der Typhusbacillen verstrichen war, mußte natürlich der Antikörper bei der aktiven Immunisierung in der Milz und sogar in den anderen Organen sich nachweisen lassen, doch war das Resultat gänzlich umgekehrt. Daraus geht deutlich hervor, daß die Voraussetzung, daß die Milz infolge ihrer lebhaften Funktion für Aufbewahrung des Antikörpers zeitlich und quantitativ in dem Vordergrund steht, ganz falsch ist. Also kann man mit Recht behaupten, daß die Milz die dominante Bildungsstätte des Antikörpers ist.

Wenn auch der Antikörpergehalt der Milz im Anfangsstadium der Immunisierung den des Serums und der anderen Organe übertrifft, so steht er schon am 5. Tage nach intravenöser Injektion der Typhusbacillen dem des Serums nach. Am 8. Tage geht der Antikörpergehalt der Milz und des Serums ganz auseinander. Woher kommt das? Auf diese Frage kann man leider noch nicht eine einwandfreie Antwort geben. Es liegt aber der Gedanke nahe, daß, obwohl sich die Milzzellen unter einem bestimmten Reize an der Bildung des Antikörpers beteiligen, und der Zeitraum für die Produktion *sui generis* sehr beschränkt ist, die Produktion ganz sistiert oder deutlich abnimmt, wenn der Reiz schon nachläßt. Dagegen beteiligt sich das Knochenmark relativ im späteren Stadium an der Bildung. Ferner gilt die Blutbahn nur als Reservoir. Daraus läßt sich weiter folgern, daß der Antikörpergehalt in der Blutbahn in einem gewissen Stadium den in den eigentlichen Bildungsstätten übertrifft.

Zusammenfassung.

- 1) Der komplementbindende Antikörper wird im Verlauf der Immunisierung oder Erkrankung gebildet.
- 2) Die Milz ist die dominante Bildungsstätte des Antikörpers. Schon im 20-stündigen Ablauf nach Einverleibung der Typhusbacillen läßt sich die bindende Substanz in diesem Organe nachweisen.

3) Es scheint uns, daß sich das Knochenmark und die Lymphdrüsen auch an der Bildung des Antikörpers beteiligen, aber der Vorgang findet nicht wie bei der Milz so früh statt. Ferner steht in diesem Falle die gebildete Menge des Antikörpers der Menge des in der Milz gebildeten Antikörpers nach.

4) In der Galle kann man den Antikörper nicht nachweisen.

Zum Schluß möchten wir nicht unterlassen, unserem verehrten Direktor, Herrn Prof. Kitasato, auch an dieser Stelle nochmals unseren tief gefühlten Dank für die hilfsbereite Unterstützung bei dieser Arbeit zum Ausdruck zu bringen.

Nachdruck verboten.

[Aus dem chemischen Laboratorium der Kgl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen.]

Weitere Versuche über die Entgiftung von Eiweißspaltprodukten von Kenotoxincharakter.

Von **W. Weichardt** und **E. Schwenk**.

Mit 1 Figur und 7 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1913.)

In unserer Veröffentlichung in der Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 83, p. 381, haben wir einen Weg angegeben, mittels der Elektrolyse Eiweißspaltprodukte herzustellen, die, kleinen Tieren subkutan injiziert, im wesentlichen Temperaturerniedrigung, Sopor und Atemverlangsamung verursachen.

Diese relativ schwer dialysierbaren Eiweißspaltprodukte waren mit unserer Methodik in stets gleicher Weise und Wirksamkeit darzustellen.

Vor allem interessant ist die Tatsache, daß es gelingt, diese Substanzen mit chemisch gut charakterisierten Stoffen zu entgiften.

Derartige antikörperartig wirkende Substanzen wurden in ihrer Gesamtheit, um in bezug auf ihre Wirkung zunächst nichts zu präjudizieren, von dem einen von uns unter dem Namen Retardine (Hemmungskörper) zusammengefaßt.

Hier sei auf die interessanten Versuche, die von Lorentz (3) und Lobsien (4) unternommen worden sind, hingewiesen. Diese Autoren tun auf Grund eines sehr großen und mit großer Vorsicht gewonnenen Zahlenmaterials dar, daß es möglich ist, durch Einwirkung von Retardin die natürliche Ermüdung des Körpers, welche durch geistige und körperliche Arbeit verursacht wird, wenigstens teilweise aufzuheben.

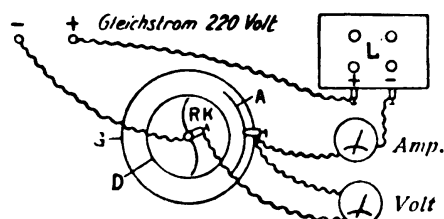
Retardin vermag aber stets auch die Wirkung der in vitro dargestellten Ermüdungsstoffe zu paralysieren. Dies macht es nach unserer Meinung wahrscheinlich, daß in beiden Fällen, sowohl bei der natürlichen Ermüdung als auch bei unserer Versuchsanordnung, mindestens sehr ähnliche Substanzgemische in Frage kommen.

Angesichts dieser Tatsachen schien eine eingehendere Kenntnis der unsere Eiweißspaltprodukte von Kenotoxincharakter entgiftenden Gruppen von Wichtigkeit, und wir haben deshalb die in der oben zitierten Arbeit begonnenen Versuche weitergeführt.

I. Darstellung der Eiweißspaltprodukte von Kenotoxincharakter.

Möglichst gut entblutetes Muskelfleisch wird sehr fein gehackt und der so erhaltene Brei auf flachen Schalen bei möglichst niedriger Temperatur im Faust-Heimschen Trockenapparat rasch vollkommen eingetrocknet. Hierbei, sowie bei allen Arbeiten zur Toxindarstellung, ist peinlich darauf zu achten, daß die Temperatur nicht über 35–37° C steigt. Stärker erhitzte Substanzen liefern geringerwertige oder unwirksame Stoffe. Nach dem Trocknen wird das Muskeleiweiß möglichst fein zerrieben. Von dem so erhaltenen Pulver werden 10 g mit 80 ccm physiologischer Kochsalzlösung in einem Tondiaphragma gut benetzt und $\frac{1}{2}$ Stunde lang mit einer Röhrelektrode gerührt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Hierauf wird der elektrische Strom eingeschaltet und unter fortgesetztem Rühren $\frac{1}{2}$ Stunde lang elektrolysiert. Dabei dient die Röhrelektrode als Kathode. Nebenstehende Uebersichtsskizze zeigt die verwendete Anordnung.

D ist das Tondiaphragma, in dem sich das zu elektrolysierende Eiweiß befindet. In diesem wird die aus Nickel gefertigte Rührkathode *RK* durch einen kleinen Elektromotor, mit etwa 150 Umdrehungen in der Minute, gedreht. Elektrolysiert haben wir mit Gleichstrom von 220 Volt mit einem vorgelegten Glühlampenwiderstand *L*. *A* ist die Anode (Platin) und *G* ein



Glasgefäß, das mit physiologischer Kochsalzlösung beschickt wurde. Als Kathode wurde ein S-förmig gekrümmtes Nickeldrahtnetz (5:5 cm) gebraucht. Die ganze Apparatur stand in einem großen kühlen Wasserbad, um die Temperatur möglichst niedrig und konstant halten zu können. Die Stromstärke hielten wir anfangs auf 1,3—1,6, in den späteren Versuchen auf 2,0 Amp. Die Tonzelle wurde nach dem Gebrauch mit einer weichen Bürste sorgfältig gereinigt, und, während sie nicht gebraucht wurde, unter Wasser aufbewahrt. Nach dem Abstellen des Stromes wird der stark alkalische Inhalt der Tonzelle in ein Becherglas entleert und tropfenweise vorsichtig mit verdünnter Salzsäure versetzt, so lange bis die Reaktion schwach sauer geworden ist. Man muß jedesmal nach dem Zusatz einiger Tropfen Salzsäure mit einem Glasstab gut umrühren, um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Hierauf zentrifugiert man, um so die klare, schwach saure oder neutrale Flüssigkeit von den nicht gelösten Eiweißanteilen zu trennen. Diese Lösung wird nun möglichst genau neutralisiert und in einer Petrischale im Faust-Heim eingedampft. Wenn die Menge der Lösung etwa 3—4 ccm beträgt, wird sie in einem Dialysator von 8 cm Durchmesser gegen fließendes kaltes Wasser längere Zeit dialysiert. Hiernach sind gewöhnlich die niedermolekularen Spaltprodukte, die beim Tierversuch die Wirkung der Ermüdungsstoffe stören, bis auf unschädliche Reste entfernt. Man dampft nun, falls etwa die Flüssigkeit bei der Dialyse erheblich sich vermehrt haben sollte, nochmals im Faust-Heim auf etwa 3—4 ccm ein. Sollten sich noch Flocken von Eiweiß abgeschieden haben, so wird nochmals zentrifugiert.

Hin und wieder kommt es vor, daß ganz frische Tonzellen bei der Elektrolyse erst „eingearbeitet“ werden müssen. Von größter Wichtigkeit ist die Beschaffenheit des Dialysators. Auch ihn muß der Experimentator gut kennen.

Wie schon an der angeführten Stelle hervorgehoben wurde, sind unsere charakteristisch wirkenden Eiweißspaltprodukte nicht vollständig adialysabel, so daß man bei intensivem Dialysieren wieder zu unwirksamen Produkten gelangt. Man muß daher erst feststellen, wie lange Zeit bei einem neuen Dialysator notwendig ist, damit man wirksame Lösungen bekomme. Bei zu kurzer Dialyse sind unsere Toxine, wie auch schon früher erwähnt, durch Salze verunreinigt, und man beobachtet dann nicht das reine, unseren Produkten zukommende Bild der stundenlangen Benommenheit bei erniedrigter Körpertemperatur, einen Symptomenkomplex, der bei nicht zu hohen Dosen nach einiger Zeit ohne Schädigung der Tiere wieder verschwindet. Mit Salz und anderen Abbauprodukten verunreinigte Präparate verursachen dagegen Krämpfe, schädigen die Versuchstiere schwer und sind vor allen

Dingen durch unsere Antikörperprodukte nicht vollkommen zu entgiften.

Wir verwendeten flache Dialysatoren, die mit Rindsblase überspannt waren; bei dünner Schicht der zu dialysierenden Lösung und fließendem Außenwasser war eine Zeit von 3 bis 4 Stunden die richtige.

Man erhält so eine klare gelbliche Flüssigkeit, die aber beim Aufbewahren ihre Wirksamkeit verliert. Es rührt dies von Zersetzungen her, die in der Flüssigkeit eintreten, so daß sich niedriger molekulare Spaltprodukte anhäufen. Schließlich reagieren die Lösungen deutlich sauer, was von frei gewordener Milchsäure herzurühren scheint (Isonitrilreaktion). Es ist deshalb ratsam, nur möglichst frisch hergestellte Toxine zu verwenden. Ebenso wirksame Produkte erhielten wir aus Klopferschem Pflanzeiweiß.

II. Entgiftungsversuche.

Zu den Entgiftungsversuchen wurde je 1 ccm der Toxinflüssigkeit mit einer sterilen Pipette abgemessen und in ein kleines Schälchen getan. Zu je 1 ccm Toxin wurde dann 0,1 ccm der Lösung des zu untersuchenden Präparates in frisch destilliertem Wasser gegeben. In ein gleiches Schälchen kam ebenfalls 1 ccm Toxin, das mit 0,1 ccm destillierten Wassers auf dasselbe Volumen gebracht wurde (Kontrollschälchen). Von den zu untersuchenden entgiftenden Präparaten wurden Lösungen 1:1000 verwendet¹⁾. Die mit Uhrgläsern zugedeckten Schälchen standen, um die Entgiftung zu begünstigen, etwa $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° im Brutschrank. Nach dieser Zeit wurde je eine Maus mit dem Toxin allein und eine andere mit der gleichen aus den jeweiligen Angaben in den folgenden Versuchsreihen ersichtlichen Menge entgifteten Toxins subkutan injiziert.

Die subkutane Injektion hat sich für das Studium gerade der Eiweißspaltprodukte von Kenotoxincharakter als vorteilhafter erwiesen als die intravenöse. Letztere ist besonders durch die Anaphylaxiestudien in den letzten Jahren in den Vordergrund des Interesses gerückt worden. Für das Studium der Ermüdungsstoffe und ihre Wirkungsweise ist sie jedoch zweifellos unvorteilhaft, weil durch die Injektion der giftigen

1) Bei dem Versuch mit Coniin (No. 21) wegen der Giftigkeit des Präparates eine Lösung 1:1 000 000.

Substanzen direkt in die Blutbahn sofort ein ganz aphysiologischer Zustand geschaffen wird und weil vor allen Dingen die geänderten Verhältnisse der Blutgerinnung die reine Toxinwirkung stören. Bei subkutaner Injektion sind die sekundären Schädigungen dieser Art zweifellos geringer, und die langsamere Resorption entspricht den Verhältnissen bei der natürlichen Ermüdung bei weitem mehr. Auch für die bei unserer Versuchsanordnung so wichtigen Absättigungsreaktionen ist die subkutane Injektion die bei weitem bessere Anordnung. Wir fanden bei derselben ähnliche Verhältnisse, wie sie in bezug auf die Diphtherietoxin-Antitoxin-Absättigung schon vor Jahren von der Ehrlichschen Schule aufgedeckt worden waren. Auch bei unseren Toxin-Antikörpergemischen ist die entgiftende Wirkung der antikörperartig wirkenden Präparate bei subkutaner Injektion viel besser zu zeigen. Es scheint, als wenn bei intravenöser Injektion vielleicht durch die reichlich umspülenden Fermente die reversiblen Bindungen rasch wieder gelöst würden. Die Erfahrungen, welche Dold, Cesa-Bianchi u. a. in der letzten Zeit bei intravenösen Injektionen von Organextrakten gemacht haben, bestätigen unsere Anschauungen und Befunde über den Wert intravenöser Injektionen beim Studium physiologischer Verhältnisse.

Die Tiere waren vor der Injektion gewogen und aus einer größeren Anzahl die zu einem Versuche verwendeten so ausgewählt worden, daß sie womöglich gleiches Gewicht hatten oder nur wenig (0,5—1 g) voneinander abwichen. Ferner wurde besonders darauf gesehen, daß die Körpertemperatur gleich war und etwa 36,5—38,0° C betrug. Bei nicht ganz gleichen Tieren wurde das schwerere und höhertemperierte als Toxintier genommen, um nicht günstige Bedingungen für unsere Versuche zu erhalten. Injiziert wurde mit langer stumpfer Kanüle, deren Spitze weit unter die Rückenhaut nach vorn geschoben wurde. Die Injektionsstelle wurde mit einer schon die eingestochene Injektionsnadel mit umfassenden kleinen Klemme abgeschlossen, die nach dem Herausziehen der Nadel noch bis zur Resorption der Flüssigkeit liegen blieb, so daß die injizierte Flüssigkeit quantitativ resorbiert wurde. Die Temperatur der Mäuse wurde anfangs alle Viertelstunden, später in größeren Zeiträumen im After gemessen (Mäusethermometer von C. Richter, Berlin). In seltenen Fällen kommt es vor, daß trotz großer Vorsicht der Dickdarm der Mäuse durchbohrt wird. Bei den Tieren stellt sich dann nach einiger Zeit Temperaturerniedrigung ein und sie gehen bald zugrunde. Man soll es sich deshalb zur Regel

machen, alle im Laufe der Versuche eingegangenen Mäuse so zu sezieren, daß man den Thermometer in den After steckt und sich überzeugt, daß der Darm über demselben intakt ist.

Eine geringe Temperatursenkung bis zu etwa 2° tritt auch bei vollkommen entgifteten Toxinen ein und muß deshalb auf Rechnung des Injektionsschocks gestellt werden. In den später folgenden kurvenmäßigen Darstellungen kann man diese Tatsache in einigen Fällen leicht erkennen. Als ausschlaggebende Beobachtungszeit kommen die ersten 5 Stunden in Betracht. Die reine Wirkung unserer auf die oben beschriebene Weise hergestellten Spaltprodukte äußert sich außer in fortschreitendem Temperaturabfall in Atemverlangsamung und Benommenheit. Hat man größere Dosen injiziert, so kann nach einigen Stunden die Atmung völlig zum Stillstand gelangen, während bei geringeren injizierten Mengen schließlich nach einiger Zeit die Temperatur des Tieres wieder ansteigt, so daß eine völlige Erholung eintreten kann. Letzteres ist vor allem zu beobachten, wenn das Gift in unserem Sinne rein ist und keine hochgradig deletären, vor allem krampferregenden Komponenten enthält. Als gut wirkend möchten wir ein solches Toxin bezeichnen, welches bei Injektion von 0,6—0,8 ccm in der ersten halben Stunde bei der Toxinmaus einen Temperaturabfall von etwa 10—15 Proz. der Anfangstemperatur hervorruft. Stellt man das Toxin rein dar und injiziert es Mäusen, so kann man in Stadien, in denen die Tiere schon schwer benommen sind und ruhig auf der Seite liegen bleiben, durch Reizung des freipräparierten Gastrocnemius noch deutliche Zuckungen der Extremitäten hervorrufen. Unsere rein dargestellten Toxine wirken also vorwiegend zentral.

* * *

Es ist sehr bemerkenswert, daß diese charakteristisch wirkenden Eiweißspaltprodukte von Ermüdungstoxincharakter durch Substanzen von bestimmter Konstitution entgiftet werden können.

Wir stellen uns diese Entgiftung als eine Bindung der Ermüdung bewirkenden Gruppen durch die aktiven Gruppen der Retardine vor, wobei eine physiologisch unwirksame Sub-

stanz entstehen dürfte. Gegen diese Auffassung kann man geltend machen, daß aus der bloßen Wirkung am Tier auf eine solche Bindung nicht geschlossen werden kann, da ja die Annahme einer antagonistischen Wirkung zunächst in Betracht kommt. Wir haben deshalb unsere antikörperartig wirkenden Präparate in den von uns verwendeten starken Verdünnungen an und für sich injiziert und fanden bei fast allen, daß von einer gegensätzlichen Wirkung in den von uns verwendeten Konzentrationen keine Rede sein kann. So ging z. B. die Temperatur nach der Injektion der Antikörper allein eher um ein geringes herunter, während diese Mittel mit unseren reinen Toxinen zusammen deren temperaturerniedrigende Wirkung zu verhindern imstande waren¹⁾.

Was die Anordnung der Versuche anbetrifft, so haben wir unsere in Bd. 83, p. 381 der Zeitschrift für physiologische Chemie beschriebene Arbeitsweise beibehalten. Bei den meisten der Versuche haben wir jedoch zu gleicher Zeit Mäuse mit den betreffenden Antikörpern allein injiziert.

Die nachfolgenden Versuche sind durchgeführt mit solchen Substanzen, welche die Konfiguration C—NH—C zeigen. Ein Teil derselben enthält die angeführte Gruppe in offener, ein anderer Teil in geschlossener, ringförmiger Bindung. Beide Gruppenreihen zeigen sich als Antikörper wirksam.

Daß die entgiftende Wirkung nicht auf die alkalische Reaktion eines Teiles dieser Substanzen zurückgeführt werden kann, ersieht man außer aus der Wirksamkeit der Hydrochloride der verwendeten Amine auch aus denjenigen Versuchen, bei welchen Succinimid oder Phtalimid oder Derivate dieser beiden Körper zur Verwendung kamen. Diese wenn auch nur schwach sauren Substanzen waren ebenso wirksam wie die stark basischen Amine. Es wurde zunächst die Reihe der aliphatischen Amine in Verwendung genommen und mit Monomethylamin begonnen.

1) Recht interessant erscheinen uns die Versuche, die in der letzten Zeit von W. Pauli veröffentlicht wurden, in denen auf physikalisch-chemischem Wege eine Bindung von Koffein und Theobromin an Eiweißspaltprodukte wahrscheinlich gemacht wurde. S. Zeitschr. f. Chemie und Industrie der Kolloide, Bd. 12, 1912, p. 230.

Versuch No. 1 am 3. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 3. V. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Monomethylaminhydrochlorid. $\text{CH}_3 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Methylaminhydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	14,1	14,0
Anfangstemperatur	37,2	36,8
5 ³⁰	Injiziert 0,8 ccm	
5 ⁶⁰	32,0	36,4
6 ⁰⁰	30,0	34,8
6 ³⁰	29,4	32,4
6 ³⁵	28,5	30,0
7 ⁰⁰	27,0	27,0

Versuch No. 2 am 12. IV. 1913.

Toxin aus Kaninchenmuskel. Hergestellt am 12. IV. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Dimethylaminhydrochlorid. $\text{CH}_3 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Dimethylaminhydrochlorid	Dimethylaminhydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	20,9	20,4	19,6
Anfangstemperatur	37,8	37,8	37,8
4 ⁴⁰	Injiziert 0,8 ccm		4 ⁰⁵
4 ⁵⁵	33,8	35,4	4 ³⁰ 38,0
5 ¹⁰	33,6	36,2	4 ³⁵ 38,4
5 ²⁰	32,8	35,8	4 ⁵⁵ 38,6
5 ³⁵	32,6	36,2	5 ³⁰ 38,4
6 ¹⁰	32,0	36,0	6 ⁰⁰ 38,0
7 ²⁰	28,8	35,9	7 ⁰⁰ 37,6
9 ⁴⁰	25,8	36,0	

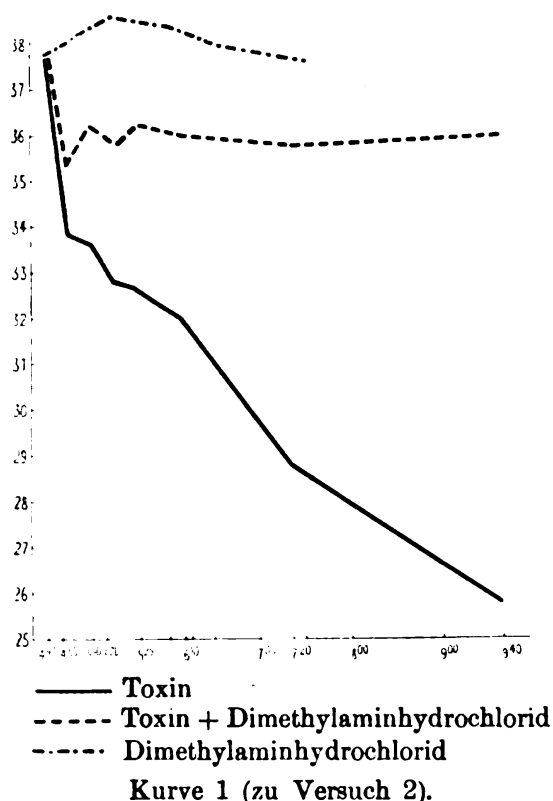
Siehe hierzu Kurve 1 auf p. 536.

Versuch No. 3 am 2. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 2. V. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Trimethylaminhydrochlorid $(\text{CH}_3)_3\text{N} \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Trimethylaminhydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	14,0	13,6
Anfangstemperatur	37,2	37,4
5 ¹⁰	Injiziert 0,8 ccm	
5 ²⁵	33,2	36,8
5 ⁴⁰	32,4	37,0
5 ⁵⁵	31,4	36,8
6 ²⁵	30,2	36,8
6 ⁵⁵	29,0	36,8
9 ¹⁵	20,3	33,4

Ob die in den vorstehenden Versuchen auch bei Mono- und Trimethylamin bemerkbare Wirkung eine diesen Sub-



stanzen eigentümliche ist, oder nur auf eine Beimischung von Dimethylamin zurückgeführt werden muß, können wir vorerst nicht entscheiden. Mit Rücksicht darauf, daß die käuflichen Präparate stets Dimethylamin enthalten und von diesem Körper freie Präparate von Mono- und Trimethylamin nicht erhältlich sind, neigen wir dazu, das letztere anzunehmen¹⁾.

Eine Vergrößerung der an der NH-Gruppe haftenden Reste verändert die Wirkung der Stoffe nicht, wie fol-

gende Versuche mit Diäthylamin und Dipropylamin zeigen, bei denen auch zugleich die Präparate allein injiziert wurden.

Versuch No. 4 am 6. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 4. und 5. V. 1913 mit 2,0 Amp. Antikörper: Diäthylaminhydrochlorid. $\text{CH}_3\text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_3 \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Diäthylamin- hydrochlorid	Diäthylamin- hydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	10,5	10,4	10,0
Anfangstemperatur	37,8	37,8	38,4
		Injiziert 0,6 ccm	
11 ³⁰		33,4	36,6
11 ⁴⁵	32,6	32,4	35,8
12 ⁰⁰	30,2	31,0	36,1
12 ¹⁵	28,0	31,0	36,2
1 ⁰⁰	26,2	31,8	36,6
3 ¹⁵	23,6	33,8	37,4
6 ⁴⁵	24,0		

Siehe hierzu Kurve 2 auf p. 537.

1) Vgl. hierzu J. Meisenheimer, Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 46, 1913, p. 1125.

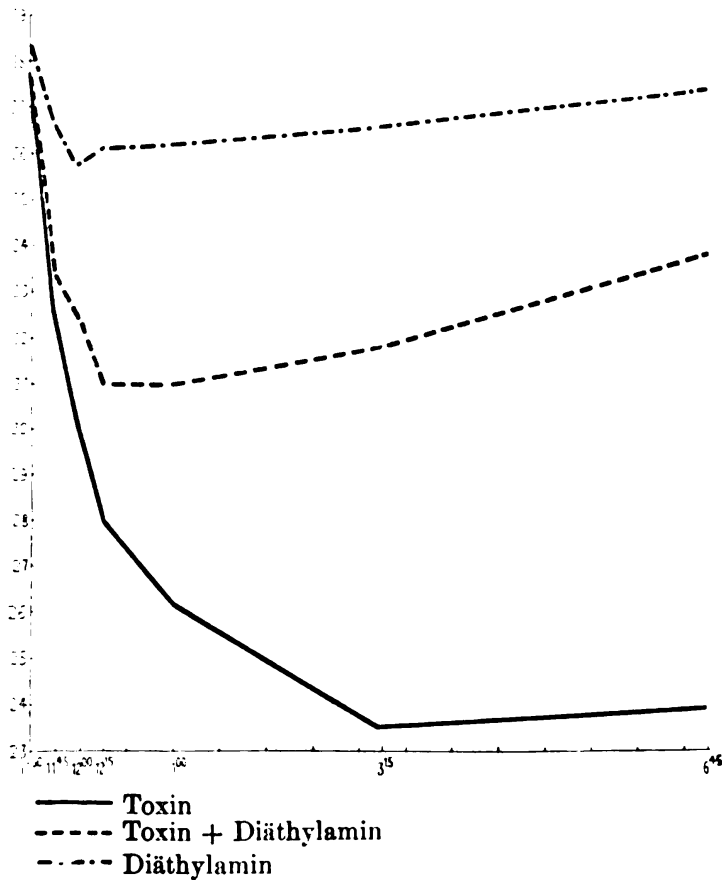
Entgiftung von Eiweißspaltprodukten von Kenotoxincharakter. 537

Versuch No. 5 am 7. VI. 1913.

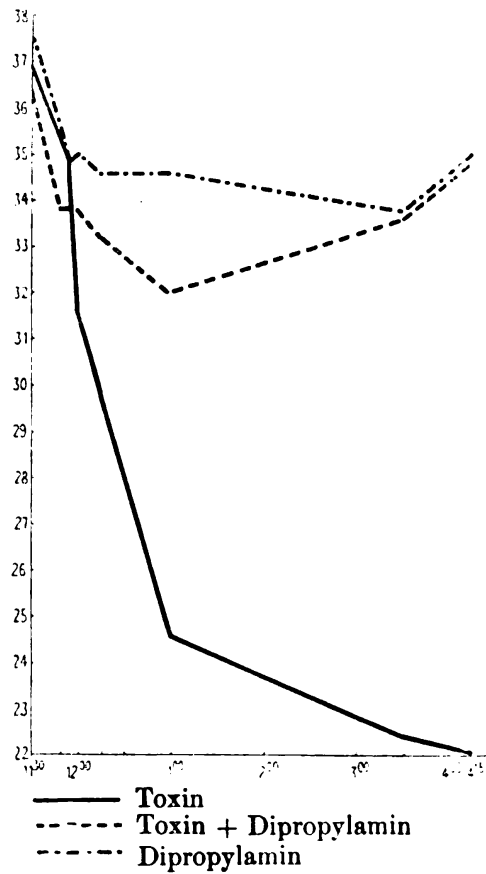
Toxin aus Kalbsemuskel. Hergestellt am 6. VI. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Dipropylamin. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

	Toxin	Toxin + Dipropylamin	Dipropylamin
Gewicht der Mause in g	14,2	13,9	12,9
Anfangstemperatur	37,0	36,4	37,4
11 ³⁰	Injiziert 0,6 ccm		
11 ⁵⁰	34,8	33,8	34,8
12 ⁰⁰	31,6	33,8	35,0
12 ¹⁵	29,8	33,2	34,6
1 ⁰⁰	24,6	32,0	34,6
3 ³⁰	22,4	33,6	33,8
4 ¹⁵	22,0	34,9	35,0
11 ⁰⁰	21,4	35,8	35,8
8. VI. 13. 10 ²⁰ nächsten Tag früh	tot	lebt	tot

Siehe hierzu Kurve 3.



Kurve 2.



Kurve 3.

Eine weitere Beschwerung der Alkylgruppen durch Einfügen von Benzolresten ändert die Antikörperwirkung nicht in qualitativer Hinsicht.

Versuch No. 6 am 26. III. 1913.

Toxin aus Kaninchenmuskel. Hergestellt am 26. III. 1913 mit 1,6 Amp. Antikörper: Dibenzylamin. $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot C_6H_5$.

	Toxin	Toxin + Dibenzylamin	Dibenzylamin
Gewicht der Mäuse in g	18,1	18,0	15,5
Anfangstemperatur	38,0	38,0	11 ⁴⁰ 37,6
6 ⁰⁰	Injiziert 0,8 ccm		
6 ¹⁵	34,8	36,8	11 ⁵⁰ 38,6
6 ³⁰	33,6	35,2	12 ⁰⁵ 38,4
6 ⁴⁵	32,0	34,4	1 ¹⁰ 37,6
7 ⁰⁰	31,8	34,4	2 ¹⁵ 38,0
8 ⁰⁰	32,0	34,4	5 ⁴⁵ 36,8
10 ⁴⁵	36,6	36,0	

Versuch No. 7 am 15. IV. 1913.

Toxin aus Kaninchenmuskel. Hergestellt am 15. IV. 1913 mit 1,6 Amp. Antikörper: Dibenzylamin $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot C_6H_5$.

	Toxin	Toxin + Dibenzylamin
Gewicht der Mäuse in g	18,3	18,2
Anfangstemperatur	38,0	38,0
5 ¹⁵	Injiziert 0,8 ccm	
5 ³⁵	33,8	35,6
5 ⁴⁵	33,0	36,4
6 ⁰⁰	32,4	36,8
6 ¹⁵	32,4	37,4
6 ⁴⁵	31,6	36,6
7 ⁰⁰	32,2	36,8
9 ³⁰	35,4	37,2

Ein dritter Versuch ergab dasselbe Resultat. Die nun folgenden 2 Versuche wurden mit Substanzen angestellt, bei denen die NH-Gruppe einseitig direkt an einen Benzolrest gebunden ist.

Entgiftung von Eiweißspaltprodukten von Kenotoxincharakter. 539

Versuch No. 8 am 11. IV. 1913.

Toxin aus Kaninchenmuskel. Hergestellt am 11. IV. 1913 mit 1,6 Amp. Antikörper: Methylanilinhydrochlorid. $\text{CH}_3 \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Methylanilin- hydrochlorid	Methylanilin- hydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	17,2	16,5	15,0
Anfangstemperatur	37,8	38,0	37,2
6 ⁰⁰	Injiziert 0,8 ccm		4 ⁰⁰
6 ³⁰	34,2	35,2	4 ³⁰ 36,4
6 ³⁵	31,6	35,4	4 ³⁵ 36,8
6 ⁵⁰	30,8	36,0	4 ⁵⁵ 37,1
7 ⁰⁰	30,9	37,8	5 ³⁰ 37,6
9 ⁰⁰	29,8	36,6	7 ⁰⁰ 38,0

Versuch No. 9 am 25. VII. 1913.

Toxin aus Pflanzeneiweiß. Hergestellt am 27. VII. 1913 mit 2,0 Amp. Antikörper: Benzylanilin. $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$.

	Toxin	Toxin + Benzylanilin	Benzylanilin
Gewicht der Mäuse in g	16,5	15,5	16,6
Anfangstemperatur	36,4	36,4	37,2
10 ⁴⁰	Injiziert 0,8 ccm		4 ⁰⁰
10 ⁵⁵	32,0	35,0	4 ³⁰ 36,6
11 ⁰⁰	32,6	37,0	4 ³⁵ 37,2
11 ²⁵	30,8	37,0	4 ⁵⁵ 37,8
11 ⁴⁰	30,4	37,0	5 ³⁰ 38,2
12 ⁰⁰	28,6	35,8	6 ⁰⁰ 38,2
1 ³⁰	22,8	31,6	7 ⁰⁰ 38,9
3 ³⁰	tot	27,4	

Daß die Wirksamkeit der C-NH-C-Gruppe erhalten bleibt, auch wenn beiderseits an die NH-Gruppe direkt Benzolreste geknüpft erscheinen, geht aus folgendem Versuch mit Diphenylamin hervor.

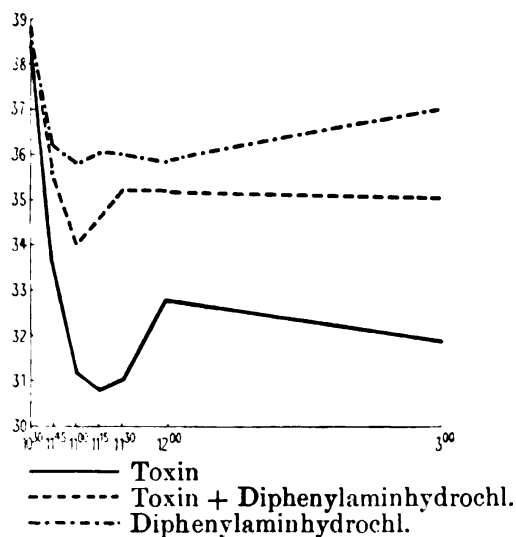
Versuch No. 10 am 22. VII. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 23. VII. 1913 mit 2,0 Amp. Antikörper: Diphenylaminhydrochlorid. $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$.

	Toxin	Toxin + Diphenylamin- hydrochlorid	Diphenylamin- hydrochlorid	
Gewicht der Mäuse in g	11,8	11,5	11,5	
Anfangstemperatur	38,8	38,8	38,4	
	10 ³⁰	Injiziert 0,8 ccm		
	10 ⁴⁵	33,6	35,6	36,2
	11 ⁰⁰	31,2	34,0	35,8
	11 ¹⁵	30,8	34,6	36,0
	11 ³⁰	31,0	35,2	36,0
	12 ⁰⁰	32,8	35,2	35,8
	3 ⁰⁰	31,8	35,0	37,0
	5 ⁰⁰	33,4	35,4	36,8

Siehe hierzu Kurve 4.

Da sich, wie seinerzeit berichtet wurde, das Succinimid als wirksam gezeigt hatte, lag es nahe, eine Substanz zu er-

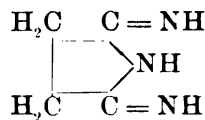


Kurve 4.

proben, die wie das Pinner'sche¹⁾ Succinimid zu gleicher Zeit die Konfiguration des Succinimids mit der des Guanidins vereinigt. Das Präparat, das wir nach Vorschrift von Pinner herstellten, erwies sich aber als unwirksam. Uns erscheint die Konstitution dieser Substanz nicht genügend sicher festgestellt, um aus dem Ausfall dieses Versuches weitere Schlüsse zu ziehen.

Versuch No. 11 am 28. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 28. V. 1913 mit 2,0 Amp. Antikörper: Succinimidin.



1) Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., Bd. 16, 1883, p. 362, 1657.

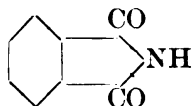
	Toxin	Toxin + Succinimidin	Succinimidin
Gewicht der Mäuse in g	13,9	13,9	14,0
Anfangstemperatur	38,6	38,4	38,6
6 ⁰⁰	Injiziert 0,6 ccm		10 ³⁰
6 ¹⁵	35,4	35,8	10 ⁴⁵ 38,4
6 ³⁰	33,8	33,4	11 ⁰⁰ 37,8
6 ⁴⁵	32,2	32,2	11 ¹⁵ 38,0
7 ⁰⁰	31,4	30,8	12 ⁰⁰ 36,6
9 ³⁰	33,0	29,4	3 ⁴⁵ 37,2
am 29. V. 8 ⁰⁰ früh	erholt	tot	

Die folgenden Versuche sind mit solchen Substanzen durchgeführt, die mit Phtalimid in Zusammenhang stehen. Bei diesem Körper war, wie in unserer vorigen Mitteilung gezeigt wurde, Antikörperwirkung nachzuweisen. Ebenso wie das Phtalimid waren seine höheren Homologen, das Pyromellitsäurediimid und das Mellitsäuretriimid¹⁾, die wir beide der Freundlichkeit von Prof. Hans Meyer (Prag) verdanken, wirksam.

Da man von dem schwach absättigenden Glutarsäureimid durch Reduktion zum stark wirkenden Piperidin gelangt, haben wir Reduktionsprodukte des Phtalimids hergestellt und geprüft. Von diesen zeigte sich das Oxyphthalimidin²⁾ nur sehr schwach wirksam, während das weiter reduzierte Produkt, das Phtalimidin, wirksamer war. Inwieweit die Aenderung der Wirksamkeit mit der Abschwächung des sauren Charakters der NH-Gruppe durch die fortschreitende Reduktion der Verbindungen zusammenhängt, läßt sich nicht entscheiden.

Versuch No. 12. am 9. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 9. V. 1913 mit 2,0 Amp. Antikörper: Phtalimid.



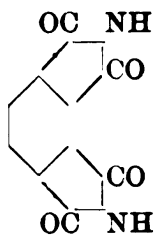
1) Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., Bd. 45, 1912, p. 3676.

2) A. Reissert, Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., Bd. 46, 1913, p. 1484.

	Toxin	Toxin + Phtalimid
Gewicht der Mäuse in g	13,4	13,2
Anfangstemperatur	37,0	37,6
6 ⁰⁰	Injiziert 0,8 ccm	
6 ¹⁵	32,0	33,6
6 ³⁰	25,6	30,8
6 ⁴⁵	24,6	28,8
7 ⁰⁰	23,8	27,0
7 ³⁰	21,0	24,0

Versuch No. 13 am 22. V. 1913.

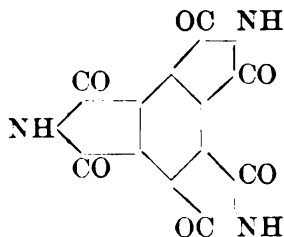
Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 22. V. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Pyromellitsäurediimid.



	Toxin	Toxin + Pyromellitsäurediimid
Gewicht der Mäuse in g	14,0	13,5
Anfangstemperatur	37,8	37,8
5 ¹⁵	Injiziert 0,8 ccm	
5 ⁰⁰	36,0	34,8
5 ⁴⁵	34,5	32,6
6 ⁰⁰	31,6	31,4
6 ¹⁵	30,2	31,4
7 ⁰⁰	27,0	32,2
abends	25,8	26,8

Versuch No. 14 am 7. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 7. V. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Mellitsäurediimid.

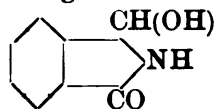


Entgiftung von Eiweißspaltprodukten von Kenotoxincharakter. 543

	Toxin	Toxin + Mellit-säuretriimid
Gewicht der Mäuse in g	15,2	14,4
Anfangstemperatur	37,0	37,0
6 ⁰⁰	Injiziert 0,8 ccm	
6 ¹⁵	34,8	36,6
6 ³⁰	34,0	35,0
6 ⁴⁵	33,6	36,2
7 ⁰⁰	33,6	37,2
8 ¹⁵	32,4	37,0
10 ⁰⁰	31,0	36,4
früh 8 ⁰⁰	36,0	34,4

Versuch No. 15 am 26. V. 1913.

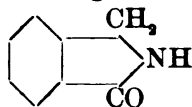
Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 26. V. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Oxyptalimidin.



	Toxin	Toxin + Oxyptalimidin	Oxyptalimidin
Gewicht der Mäuse in g	13,4	13,0	13,0
Anfangstemperatur	38,2	38,6	38,6
6 ¹⁰	Injiziert 0,8 ccm		10 ³⁰
6 ²⁵	35,0	35,0	10 ⁴⁵ 36,4
6 ⁴⁰	34,0	33,6	11 ⁰⁰ 36,5
6 ⁵⁵	33,4	33,2	11 ¹⁵ 36,6
7 ¹⁰	32,7	32,4	12 ⁰⁰ 36,0
Am 27. V. 9 ⁰⁰ früh	19,0	20,0	3 ⁴⁵ 37,2

Versuch No. 16 am 29. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 28. V. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Phtalimidin.



	Toxin	Toxin + Phtalimidin	Phtalimidin
Gewicht der Mäuse in g	14,2	14,1	14,7
Anfangstemperatur	37,0	37,0	
10 ¹⁵	Injiziert 0,8 ccm		
10 ³⁰	34,2	35,6	38,2
10 ⁴⁵	29,2	31,2	36,3
11 ⁰⁰	27,0	29,2	36,4
11 ¹⁵	25,2	26,8	36,6
11 ⁴⁵	23,4	25,0	—
12 ⁰⁰	22,0	22,8	35,8
1 ¹⁵	22,6	22,0	3 ⁴⁵ 36,6

Durch den Zusammenhang mit dem Anilin sind, ebenso wie die in den Versuchen No. 8 und 9 besprochenen Substanzen, die zwei folgenden Körper charakterisiert. Das Azetanilid (Antifebrin), das in größerer Menge eine temperaturerniedrigende Wirkung hat und deshalb als Fiebermittel verwendet wird, hält in der bei unserer Versuchsanordnung gewählten Verdünnung die Temperatur gegenüber der Toxinwirkung nahe dem Normalen, während es, allein injiziert, in der verwendeten Konzentration keine sichtbaren Effekte hat. Ebenso verhält sich das homologe Azetmetaxylidid.

Versuch No. 17 am 9. VI. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 5.—7. VI. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Azetanilid. $C_6H_5 \cdot NH \cdot CO \cdot CH_3$.

	Toxin	Toxin + Azetanilid	Azetanilid
Gewicht der Mäuse in g	17,4	16,8	16,4
Anfangstemperatur	36,8	36,8	37,8
11 ¹⁵	Injiziert 0,8 ccm		
11 ³⁰	32,0	36,0	37,6
11 ⁴⁵	28,0	34,6	38,2
12 ⁰⁰	26,8	33,6	38,2
12 ¹⁵	25,2	33,6	37,0
1 ⁰⁰	24,6	33,4	37,0
3 ⁰⁰	23,6	33,8	36,8

Siehe hierzu Kurve 5 auf p. 545.

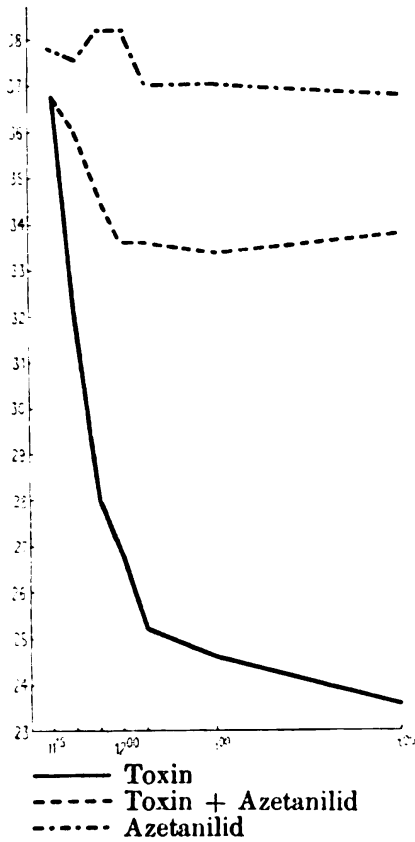
Versuch No. 18 am 4. VI. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 3. VI. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Azetmetaxylidid. $m-C_6H_4(CH_3)_2NH \cdot COCH_3$.

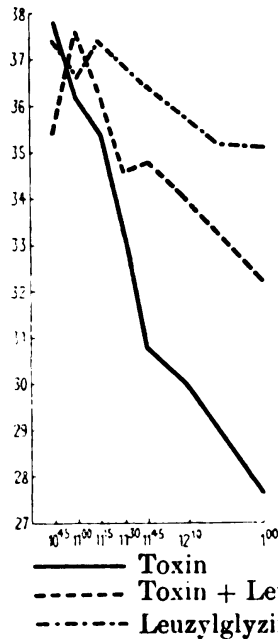
	Toxin	Toxin + Azetmetaxylidid
Gewicht der Mäuse in g	16,1	15,9
Anfangstemperatur	37,0	37,0
11 ¹⁵	Injiziert 0,8 ccm	
11 ³⁰	35,2	36,2
12 ⁰⁰	32,6	36,2
12 ¹⁵	31,4	36,0
1 ⁰⁰	31,8	34,4
3 ³⁰	36,0	37,2

Anschließend an diesen Versuch sei ein solcher angeführt, bei dem als Antikörper Leuzylglyzin verwendet wurde. Da alle Polypeptide die von uns als für die Antikörperwirkung cha-

Charakteristisch angesehene Gruppe C—NH—C enthalten, sollte es wirksam sein, was der folgende Versuch auch bestätigt hat.



Kurve 5.



Kurve 6.

Versuch No. 19 am 15. VI. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 5.—15. VI. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Leuzylglyzin. $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\cdot\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$.

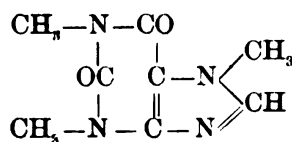
	Toxin	Toxin + Leuzylglyzin
Gewicht der Mäuse in g	13,9	13,0
Anfangstemperatur	37,8	35,4?
	Injiziert 0,8 cem	
10 ⁴⁵		
11 ⁰⁰	36,2	37,6
11 ¹⁵	35,4	36,2
11 ³⁰	33,2	34,6
11 ⁴⁵	30,8	34,8
12 ¹⁰	30,0	34,0
1 ⁰⁰	27,6	32,2
3 ⁰⁰	23,0	25,4
6 ⁰⁰	21,8	21,2

Siehe hierzu Kurve 6.

Merkwürdig erscheint uns die absättigende Wirkung des nun folgenden Coffeins im Hinblick auf seine Konstitution, da ja in diesem Körper die NH-Gruppen durch CH₃-Gruppen substituiert sind. Die Temperatur wurde in den von uns angewendeten Dosen beim Coffein allein bei unseren Tieren nicht beeinflußt, dagegen verhinderte es die ausgesprochene Senkung der Temperatur durch unser Toxin. Inwieweit die durch das Coffein hervorgerufene zentrale Reizung für die hier beobachtete Wirkung in Frage kommt, entzieht sich unserer Beurteilung.

Versuch No. 20 am 31. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 30. V. 1913 mit 2,0 Amp.
Antikörper: Coffein.

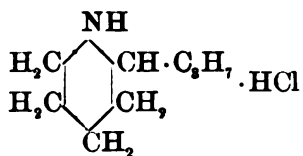


	Toxin	Toxin + Coffein	Coffein
Gewicht der Mäuse in g	12,0	12,0	11,2
Anfangstemperatur	37,8	36,8	38,0
10 ³⁶	Injiziert 0,8 ccm		10 ³⁰
10 ⁴⁰	34,2	35,4	10 ⁴⁶ 36,6
11 ⁰⁶	29,4	34,0	11 ⁰⁰ 36,4
11 ²⁰	26,8	32,2	11 ¹⁶ 36,0
11 ³⁶	25,1	27,2	12 ⁰⁰ 35,8
12 ⁰⁰	ganz soporös	hochgradige Krämpfe	3 ⁴⁶ 37,2

In unserer oben zitierten Veröffentlichung zeigten wir die Wirksamkeit des Piperidins. Ebenso wie dieses wirkt auch das Coniin (r. α -Propylpiperidin) absättigend; als es allein angewendet wurde, sahen wir erst nach 5 Stunden eine Temperaturerhöhung.

Versuch No. 21 am 6. V. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 6. V. 1913 mit 1,6 Amp.
Antikörper: Coniinhydrochlorid (Verdünnung 1 : 1 000 000).



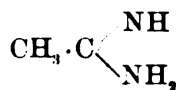
	Toxin	Toxin + Coniin-hydrochlorid	Coniin-hydrochlorid
Gewicht der Mäuse in g	15,5	14,8	18,4
Anfangstemperatur	38,2	38,8	4 ⁵⁰ 37,6
6 ⁰⁰	Injiziert 0,8 ccm		
6 ¹⁵	35,4	36,6	5 ⁰⁵ 37,4
6 ³⁰	32,0	35,4	5 ³⁵ 37,8
6 ⁴⁵	31,0	35,0	6 ³⁰ 37,8
7 ⁰⁰	31,0	34,8	7 ¹⁰ 38,6
7 ¹⁵	30,2	34,2	9 ⁴⁵ 39,4
8 ³⁰	26,0	37,0	
nächsten Tag	tot	erholt	

Siehe hierzu Kurve 7.

Schließlich sei noch ein Versuch mit Azetamidin wiedergegeben, das die von uns als wirksam beschriebene Gruppe C = NH enthält.

Versuch No. 22
am 25. IV. 1913.

Toxin aus Kalbsmuskel. Hergestellt am 25. IV. 1913 mit 1,3 Amp. Antikörper: Azetamidin.



Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIX.



Kurve 7.

548 Weichardt und Schwenk, Entgiftung von Eiweißspaltprodukten.

	Toxin	Toxin + Azetamidin
Gewicht der Mäuse in g	15,4	14,8
Anfangstemperatur	38,0	38,0
5 ³⁰	Injiziert 0,8 ccm	
5 ⁴⁵	33,2	35,2
6 ⁰⁰	31,8	34,0
6 ¹⁵	32,0	33,6
6 ³⁰	32,6	33,0
7 ⁰⁰	32,8	33,4
8 ²⁵	33,0	36,2
früh	36,2	36,8

Zusammenfassung.

1) In Fortsetzung der früheren Versuche wird an einer Reihe neuer Substanzen gezeigt, daß in bestimmter Weise hergestellte Eiweißspaltprodukte von gut charakterisierter Wirkung (Kenotoxine) durch gewisse chemische Gruppen im Sinne einer Entgiftung beeinflußt werden.

2) Nach unseren bisherigen Versuchen ist diese Wirkung an die Gegenwart einer mit zwei Wertigkeiten am Kohlenstoff gebundenen NH-Gruppe geknüpft.

Literatur.

- 1) Weichardt, Wolfgang, und Schwenk, Erwin, Ueber ermüdend wirkende Eiweißspaltprodukte und ihre Beeinflussung. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 83, Heft 5.
 - 2) Weichardt, Wolfgang, Ueber Ermüdungsstoffe, II. Aufl., Stuttgart, Ferdinand Enke, 1912, und Kolle-Wassermanns Handbuch, Bd. 2, Jena, G. Fischer, 1913.
 - 3) Lorentz, Friedrich, Ueber Resultate der modernen Ermüdungsforschung und ihre Anwendung in der Schulhygiene. Hamburg und Leipzig, Leopold Voss, 1911.
 - 4) Lobsien, Marx, Ueber den Einfluß des Antikenotoxin auf die Hauptkomponenten der Arbeitskurve. Langensalza, Herm. Beyer & Söhne, 1912.
- Ueber den Einfluß des Antikenotoxin auf die geistige Leistungsfähigkeit. Archiv f. Pädagogik, Leipzig, Friedrich Brand tätter.

Nachdruck verboten.

[Aus Statens Seruminstitut, Kopenhagen (Direktor:
Dr. Th. Madsen).]

Phagocytosestudien.

Von Privatdozent Dr. Ove Wulff.

(Eingegangen bei der Redaktion am 20. August 1913.)

Die Technik dieser Versuche ist die von Wright angegebene, jetzt allgemein angewandte, wobei gleiche Teile Serum, Blutkörperchen und Bakterien entweder in der Pasteurpipette oder im Widalglass gemischt werden.

Das Serum ist durch Zentrifugieren frischen Blutes, die Blutkörperchen sind durch Waschen frischen Blutes gewonnen. Die Bakterien von einer 24 Stunden alten Agarkultur sind in isotonischem Salzwasser emulgiert. Die Mischung ist 15 Minuten in den Brutschrank bei 37° gesetzt. Die Ausstrichpräparate sind darauf in 6-proz. Sublimatlösung gehärtet und mit Karbol-Alkohol-Thionin gefärbt.

Es ist klar, daß sich in einem so komplizierten Versuch wie der Phagocytosebestimmung und ferner bei der Messung des opsonischen Index eine Reihe von Fehlerquellen finden, deren nähere Prüfung für die Schätzung der Resultate notwendig ist. Es sind zweierlei Fehlerquellen, teils solche, die von Versuchsfehlern, also direkt aus der Technik, teils solche, die von Variationen in den Komponenten oder den einzelnen Phasen des Versuches herrühren. Es wird deswegen nötig sein, um Klarheit in diese Frage zu bringen, die einzelnen Phasen und Komponenten des Versuches kritisch durchzugehen und auf diese Weise die einzelne Seite, die man zu untersuchen wünscht, unter Verhältnissen, in denen alles andere gleich ist, in ein möglichst scharfes Licht zu bringen.

Eine Seite der Frage, die entschieden von technischer Bedeutung und für das Endresultat von hervorragender Wichtigkeit ist, ist das Zählen.

Wenn man von den Fehlern absieht, die sich beim Versuch eingeschlichen haben, und diesen als abgeschlossen und das fertige, gefärbte Präparat als vorliegend betrachtet, ist in der Tat die allerschwierigste Seite des Versuches noch übrig. Bei der Ausstreichung erreicht man, daß sich die größte Anzahl Leukocyten in den Spitzen des Präparats sammelt, und man sollte meinen, es wäre leicht, in kurzer Zeit eine passende Anzahl Leukocyten zu zählen; hier aber bietet sich die erste Schwierigkeit, welche Leukocyten sind zu zählen und welche nicht? Von den vielen bekannten Formen der Leukocyten sind nur sehr wenige imstande, Bakterien in sich

aufzunehmen. Es sind besonders die polymorph-nukleären Leukocyten, die diese Fähigkeit besitzen, wogegen die Lymphocyten, sowohl die groß- als auch die kleinkernigen, keine größere Tendenz hierfür zeigen, jedoch können bei hochgradiger Phagocytose auch einzelne kleinkernige Lymphocyten wenige Bakterien aufnehmen. Da indessen die Thioninfärbung nur eine äußerst grobe Trennung zwischen den verschiedenen Leukocytenformen zuläßt, muß man andere Kennzeichen haben. Es würden sich also zwei Auswege finden, entweder alles zu zählen, was man von Leukocyten antrifft, darunter die vielen nicht phagocytierenden Lymphocyten, und dadurch einen größeren Divisor und eine kleinere Phagocytosenzahl bekommen, oder nur die zu zählen, die sich deutlich als polymorph-nukleäre Formen erkennen lassen und alle zweifelhaften außer acht lassen. Da die Lymphocyten in bedeutenden Mengen auftreten, wird man sehen, daß sich aus diesem Grunde bei der schließlichen Phagocytosenzahl recht bedeutende Divergenzen ergeben und bedeutende Schwierigkeiten bedingen, wenn es darauf ankommt, die Resultate verschiedener Untersucher zu vergleichen. Ich selbst habe stets nur die polymorph-nukleären Formen gezählt und alle anderen außer acht gelassen. Es wäre jedoch wünschenswert, endgültige Regeln hierfür zu erhalten.

Es geschieht nicht selten, daß die Leukocyten, und besonders die polymorph-nukleären, sich in größeren oder kleineren Klumpen sammeln, und die meisten Verfasser, die dies Phänomen erörtern, scheinen das Zählen dieser Leukocyten zu unterlassen. Es ist jedoch in vielen Fällen sehr wohl möglich, diese Klumpen mitzunehmen, indem man die Anzahl der Bakterien im Konglomerat zählt und danach aus der Lagerung der Kernteile auf die Anzahl der Leukocyten schließt. Bei sehr großen Konglomeraten läßt sich dies jedoch kaum ausführen.

Busse und mehrere andere zählen solche Leukocyten nicht mit, die auffällig viele Bakterien enthalten; dies ist sicherlich nicht richtig, indem das Endresultat in einem sehr merkbaren Grade von einem solchen Leukocyten beeinflußt wird. Sogar bei geringen Graden von Phagocytose trifft man ab und zu einzelne stark gefüllte Leukocyten, und es läßt sich nicht bestreiten, daß auch diese einen Ausdruck für den Grad der Phagocytose ergeben.

Ich glaube bemerkt zu haben, daß, wo es sich um Steigerungen in der Phagocytose handelt, diese nicht immer dadurch entstehen, daß die gesamte Anzahl Leukocyten mehr Bakterien aufnimmt, sondern auch dadurch, daß einzelne besonders viele aufnehmen, und sollte sich dies als richtig erweisen, so wird die Unterlassung des Zählens solcher stark gefüllten Leukocyten auf fühlbare Weise das Resultat beeinflussen.

Noch ein Moment, das man nicht außer acht lassen darf, ist die Suggestion beim Zählen; es zeigt sich nämlich, daß das Bewußtsein des Resultates, das erreicht werden soll, in nicht geringem Grade imstande ist, das Zählen zu beeinflussen.

Ueberhaupt muß man sagen, daß immer dieselbe Person die Präparate zählen muß, weil eine Menge Fehlerquellen, die darin zusammengefaßt werden können, was Thomas den persönlichen Koeffizienten nennt, da-

durch behoben wird; man hat dann immer die größte Garantie für die Richtigkeit des Resultats, wenn man seine Präparate selbst zählt. Ich habe selbst alle Präparate aus meinen Untersuchungen gezählt und habe mir über die Suggestion dadurch hinweggeholfen, daß ich die Präparate nie sofort zählte, sondern diese fortlaufend nummerierte, alles was dargestellt wurde untereinander, und die Nummern mit erläuternden Erklärungen verzeichnete und dann erst nach der Zählung das Resultat mit der Aufzeichnung verglich. Ich glaube hierbei über diese Schwierigkeit hinweggekommen zu sein. Den persönlichen Koeffizienten wird man, wenn man selbst ohne suggestive Einwirkung und in der Form das Zählen ausführt, welche die Uebung ergibt, auf ein Minimum reduzieren können.

Wie man sieht, enthält das Zählen in sich eine große Reihe Fehlerquellen, so daß man schon aus dem Grunde zweifeln sollte, ob es gelingen kann, einigermaßen zuverlässige Resultate aufzustellen, und doch wird eine nähere Nachforschung das Gegenteil zeigen. Der Grund hierfür sind teils die durch den persönlichen Koeffizienten desselben geübten Untersuchers ausgeglichenen Fehler, teils die Phagocytose als ein gesetzlich bestimmtes biologisches Phänomen.

Nun liegt ja indessen das Verhältnis so, daß man durch das Zählen die Phagocytose in Zahlen ausdrückt. Die einzelne Phagocytosenzahl ist also ein annähernder Ausdruck für die immuno-biologische Reaktion, die man Phagocytose nennt, der Ausdruck ist nur annähernd, weil man sowohl mit Methodenfehlern als mit Versuchsfehlern, bei denen besonders der Zählfehler der wesentlichste ist, rechnen muß. Wenn man also imstande ist, seine Versuche so anzustellen, daß Methodenvariationen vermieden werden, wird man sich eine Reihe von Zahlen schaffen können, deren gemeinschaftliche Verschiedenheiten die Versuchsfehler zum Ausdruck bringen.

Man wird also auf Grund der Erfahrungen der Beobachtungslehre durch das exponentielle Fehlergesetz imstande sein, seinen Versuchsfehler zu messen. Das exponentielle Fehlergesetz zur Schätzung der Variationen des opsonischen Index ist zuerst von Kjer-Petersen zur Anwendung gebracht worden.

Da der opsonische Index aus einem Verhältnis zwischen zwei Phagocytosenzahlen bestimmt wird, scheint es mir, daß es in erster Linie von Interesse sein muß, zu entscheiden, mit welcher Genauigkeit man überhaupt imstande ist, die Phagocytose zu messen.

Der Versuch wird so ausgeführt, daß man mit demselben Serum, Blutkörperchen und Bakterienemulsion verschiedene Pipetten von ungefähr gleicher Weite bei gleicher Temperatur und Zeit aussetzt. Ein Versuch mit Colibacillen ergibt, wenn man 50 Zellen in dem Präparat von jeder Pipette zählt, die Phagocytosezahlen:

1,31	1,38	Durchschnittszahl	1,37
1,34	1,38	Mittelfehler	0,03
1,36	1,40	in Proz. der Mittelzahl	2,19
1,38	1,41		

Der Mittelfehler ist also bei diesem Versuche 2,19 Proz. der Durchschnittszahl gewesen. Indessen muß man darüber klar sein, daß man nicht immer Zahlen bekommt, die so nahe aneinander liegen. In einem anderen Versuch, ebenfalls mit Colibacillen und sonst gleichen Bedingungen, wurden 5 Pipetten ausgesetzt:

Von Pipette I	wurden 2	Präparate gezählt	1,72	1,76
" " II	" 2	" "	1,30	1,54
" " III	" 2	" "	2,06	2,14
" " IV	" 2	" "	1,54	1,60
" " V	" 6	" "	1,60	1,50
			1,64	1,68
			1,64	1,68

Betrachtet man alle 14 Zahlen zugleich, so bekommt man:

Durchschnittszahl	1,67
Mittelfehler	0,21
in Proz. der Mittelzahl	12,5

Man sieht also, daß in diesem Falle mit merkbar größerem Fehler gezählt ist als im vorhergehenden, gleichzeitig deutet dieser Versuch darauf hin, daß noch Versuchsfehler außer Zählfehlern unterlaufen sein können, indem die Verteilung im einzelnen Präparat, in den verschiedenen Präparaten und in den verschiedenen Pipetten möglichenfalls einen Unterschied ergeben könnte. Wir wollen dies Verhältnis deswegen näher untersuchen.

Zuerst muß ein einzelnes Präparat untersucht werden, um zu entscheiden, ob die Verteilung der Leukocyten hier Bedeutung hat. In einem einzelnen Präparat einer größeren Serie zählt man sämtliche Phagocyten in Serienverschiebung von der Spitze nach innen, die Leukocyten sammelt man in Gruppen von 50, und die dabei gewonnenen Durchschnittszahlen schreibt man in der Reihenfolge auf, in der sie gezählt sind, so daß die ersten die Leukocyten in den Spitzen angeben, und darauf abwärts nach der Basis des Präparates zu. Es werden im ganzen 500 Leukocyten gezählt:

3,80	3,60	Durchschnittszahl	3,79
3,72	3,14	Mittelfehler	0,43
4,28	4,26	in Proz. der Mittelzahl	11,3
4,36	3,96		
3,32	3,42		

Wie aus den Zahlen deutlich hervorgeht, ist hinsichtlich des Bakterieninhaltes der Leukocyten in den Spitzen und weiter im Innern des Präparates kein Unterschied vorhanden. Wir wollen nun den Unterschied der Zahlen in verschiedenen Präparaten, aber aus derselben Pipette, untersuchen. Es werden aus derselben Pipette, die beim vorigen Versuch angewandt wurde, noch 12 Präparate gemacht und man zählt 50 Zellen in jedem. Die Phagocytosenzahlen werden dann:

3,18	4,24		
3,46	4,24	Durchschnittszahl	4,08
3,60	4,38	Mittelfehler	0,52
3,76	4,56	In Proz. der Mittelzahl	12,7
3,86	4,78		
4,08	4,80		

Hieraus geht hervor, daß der Mittelfehler nahezu derselbe wird, gleichgültig ob man in demselben oder in verschiedenen Präparaten aus derselben Pipette zählt.

Es ist nun noch der Mittelfehler zu untersuchen, wenn man verschiedene Pipetten gebraucht. Es werden im ganzen 15 Pipetten mit derselben Mischung von Serum, Blutkörperchen und Colibacillen hergestellt, die erste Pipette ist zu den zwei vorhergehenden Versuchen angewandt, von den restierenden 14 werden 2 Präparate aus jeder Pipette gebildet und in jedem Präparat werden 50 Zellen gezählt. Man erhält bei dieser Doppelbestimmung aus:

Pipette	I	II	Mittelzahl
2	3,62	3,68	3,65
3	3,54	4,40	3,97
4	3,64	4,34	3,99
5	3,92	4,22	4,07
6	3,58	3,90	3,74
7	3,70	3,80	3,75
8	4,04	3,90	3,97
9	3,76	4,68	4,22
10	3,98	4,72	4,35
11	4,32	4,22	4,27
12	3,70	3,58	3,64
13	4,14	3,66	3,90
14	3,88	3,22	3,55
15	4,38	4,10	4,23
Durchschnittszahl	3,87	4,03	3,95
Mittelfehler	0,27	0,43	0,26
In Proz. der Mittelzahl	7,0	10,7	6,6

Man sieht also, daß sich kein größerer Zählfehler einzuschleichen braucht, wenn man die Mischung aus verschiedenen

Pipetten nimmt, indem die Zahlen hier kleiner sind als die vorhergehenden; es geht gleichzeitig hieraus hervor, daß die Weite der Pipetten für den Grad der Phagocytose keine Rolle spielt, indem dünne und dicke Pipetten durcheinander gebraucht sind.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß man beim Zählen von 50 Zellen die Phagocytosenzahl mit einem Mittelfehler von 10—13 Proz. bestimmen kann. Daß im letzten Versuch die Kolonne der Durchschnittszahl einen Mittelfehler von 7 Proz. ergibt, stimmt somit, da diese Zahlen das Resultat des Zählens von 100 Zellen sind.

Man weiß, daß, wenn man die Anzahl der Observationen verdoppelt, der Fehler mit $\sqrt{2}$ abnimmt. Dem Fehler von 10—13 Proz. für 50 gezählte Zellen entsprechend wird man für 100 einen Fehler von 7—10 Proz. bekommen.

Während das Zählen von 100 Zellen die Zählerarbeit verdoppelt, sieht man, daß der Fehler nur unbedeutend kleiner wird, so daß es aus dem Grunde zweifelhaft ist, ob sich das Plus der Arbeit in dieser Beziehung lohnt. Erst das Zählen von 3200 Zellen wird den Fehler gegen Ueberschreiten einiger Prozente sichern, während umgekehrt das Zählen von nur 20—25 Zellen, das Wright erst anwandte, einen Fehler von 20—25 Proz. ergibt.

Findet sich eine Kontrollprobe für die Richtigkeit des Zählens? Faßt man alle meine oben verzeichneten Zählungen von 50 Zellen zusammen, so erhält man 50×50 Zellen, die gesammelt ergeben:

Durchschnittszahl	3,95
Mittelfehler	0,42

Nun sollen infolge des exponentiellen Fehlergesetzes

innerhalb der	Mittelzahl	$\pm \frac{1}{2}$	Mittelfehler	38,3	Proz.	der	Anzahl	fallen
"	"	± 1	"	68,3	"	"	"	"
"	"	± 2	"	95,4	"	"	"	"
"	"	± 3	"	99,7	"	"	"	"

Prüfen wir dies nach, so bekommen wir:

$\frac{1}{2}$ M.	3,74—4,16	liegen	15 = 30	Proz.	(38,3	Proz.)
1	" 3,53—4,37	"	36 = 72	"	(68,3	")
2	" 3,11—4,79	"	49 = 98	"	(95,4	")
3	" 2,69 5,21	"	50 = 100	"	(99,7	")

Diese Zahlen stimmen wohl nicht ganz mit den ideellen überein, divergieren aber andererseits nicht so sehr, daß man annehmen darf, daß andere Faktoren als Zählfehler sich geltend machen.

Noch ein Punkt von Interesse dürfte hervorgehoben werden: Wie verteilen sich die Bakterien numerisch auf die einzelnen Leukocyten? Die Verschiedenheiten im Grade der Phagocytose rühren im wesentlichen von einer Verschiebung der numerischen Majorität nach oben oder unten her, wie man aber aus meinen unten angeführten Resultaten ersieht, rühren sie auch zum Teil von der stärkeren Phagocytose einzelner Zellen her, weswegen man diese mitrechnen dürfte, um ein richtiges Resultat zu erhalten. Die Verteilung in einigen meiner Zählungen war folgende.

Anzahl der Bakterien:

pro Zelle	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2,44	0	9	22	12	4	1	2	0	0	0	0
2,46	1	9	19	11	8	1	1	0	0	0	0
2,88	0	7	21	9	8	2	1	0	0	0	2
3,26	0	1	16	16	9	5	0	3	0	0	0
3,54	0	0	8	20	15	3	2	2	0	0	0
5,06	0	0	3	8	12	11	7	2	3	0	4
5,44	0	0	0	7	10	15	5	7	1	1	4

Der opsonische Index. Die Erörterung des Zählens hat sich bisher um die Phagocytosenzahl gedreht. Ist die Rede vom opsonischen Index, so liegt darin also die Entscheidung über das Verhältnis zwischen zwei Phagocytosenzahlen. Wir haben nun gesehen, mit welcher Genauigkeit man imstande ist, jede der einzelnen Zahlen in diesem Verhältnis zu zählen, wir werden nun sehen, wie genau sich diese Verhältniszahl bestimmen läßt.

Es sei hier gleich angeführt, daß viele der Faktoren, die die Phagocytosenzahl beeinflussen, innerhalb desselben Versuches fortfallen, wenn von einer Verhältniszahl die Rede ist, und Wright hat wohl auch mit diesem Gedanken diesen Begriff aufgestellt, indem nur die Verschiedenheiten in der phagocytosebefördernden Fähigkeit des Serums dieser Zahl Ausdruck geben sollten. Der opsonische Index hat ferner als das klinische Maß für den Opsonininhalt des Organismus Wert.

Es wird deswegen nötig sein, wie es auch von vielen Seiten eingesehen worden ist, bevor man sich über die Schätzung der Schwingungen aussprechen kann, genau zu untersuchen, mit wie großer Genauigkeit man überhaupt imstande ist, den opsonischen Index zu bestimmen, was wiederum bedeutet, wie groß die Ausschläge der Indexbestimmung werden ausschließlich beim Gebrauch normaler Sera.

Bulloch hat durch Versuche die Grenzen des tuberkulo-opsonischen Index auf 0,8—1,2 festgesetzt, und dieses Resultat ist im wesentlichen von Urwick, Lawson und Stewart, Potter, Ditman und Brandley, Fleming, Strübel und Felber, Bine und Lissny u. a. bestätigt worden, während andere, wie Park und Biggs, Böhme, Shaw, Jeans und Sellards, Saathoff und Kier-Petersen die Grenzen noch weiter gefunden haben.

Um einen Beitrag zu dieser Frage zu liefern, habe ich mit Colibacillen folgenden Versuch ausgeführt:

Ich habe die Phagocytosenzahl zweimal bei bzw. 3 und 9 normalen Individuen bestimmt. Diese Zahlen sind:

2,08	4,62		
2,09	4,68		
2,28	5,08		
	5,58	Durchschnittszahl	5,58
	5,62	Mittelfehler	0,72
	5,64	In Proz. der Mittelzahl	13,0
	5,78		
	6,58		
	6,62		

Der Fehler 13 Proz. ist nicht größer, als die Zählung ergeben kann, so daß man diese Zahlen für fast gleich groß ansehen darf. Die beiden Zahlenreihen lassen sich nicht ohne weiteres vergleichen, weil die Versuche verschieden angestellt worden sind. Aus diesen beiden Reihen von Phagocytosenzahlen normaler Individuen kann man durch Division eine bestimmte Anzahl opsonischer Indices darstellen, die ein Maß für die Ausschläge des normalen opsonischen Index geben.

Aus der ersten Reihe der drei Phagocytosenzahlen lassen sich durch Kombination von zwei 6 Indices bilden. Aus der zweiten Reihe der 9 Phagocytosenzahlen lassen sich auf dieselbe Weise 72 Indices bilden. Man bekommt somit 78 Normalindices, die ideell gleich groß sein sollten und bei denen man imstande ist, zu bestimmen, mit welcher Genauigkeit sich der opsonische Index durch Zählung von 50 Zellen bestimmen läßt. Diese 78 Indices werden die Durchschnittszahl 1,02 und den Mittelfehler 0,18 geben.

Verteilt man die Indices nach Flemings Schema, so bekommt man:

unter 0,90	23 = 29 Proz.
0,90—0,95	7 = 9 „
0,95—1,05	18 = 23 „
1,05—1,10	5 = 6 „
über 1,10	25 = 32 „

Kleinster und größter Wert sind 0,70 bzw. 1,43.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind die Zahlen auf alle Werte innerhalb der Grenzen ganz gleich verteilt. Es finden sich demnach nur 4 auf 1,00, während Bulloch bei 84 bereits 28 auf 1,00 hatte. Wir werden nun sehen, wie sich meine Indices nach dem Fehlergesetz verhalten:

Innerhalb $\frac{1}{2}$ Mittelfehler	0,93—1,11 liegen	25 = 32 Proz. (38,3 Proz.)
„ 1	0,84—1,20	53 = 68 „ (68,3 „
„ 2	0,66—1,38	74 = 95 „ (95,4 „
„ 3	0,48—1,56	78 = 100 „ (99,7 „

Die Divergenzen sind hier nicht so groß, daß man annehmen kann, daß andere Faktoren mitgewirkt haben. Man sieht hier, daß nur ca. 70 Proz. der Zahlen innerhalb der Bullochschen Grenze fallen. Man muß hier nun in Betracht ziehen, daß meine Zahlen nicht das Resultat fortlaufender Indexbestimmungen, sondern einer Reihe einzelner Normalzahlenbestimmungen sind. Man muß deswegen annehmen, daß in meinem Versuche ein Teil der Fehlerquellen vermieden ist, der dann in Betracht kommen kann, wenn viele verschiedene Versuche verglichen werden sollen. Man kann also aus diesen Untersuchungen schließen, daß sich der normale coli-opsonische Index nur mit einem Fehler von ca. 20 Proz. bestimmen läßt und daß sich seine normalen Grenzen zu 0,70—1,40 feststellen lassen.

Der Einfluß der Blutkörperchen und der Bakterienemulsion auf die Phagocytose.

Bei der Anwendung von gewaschenem Blut erreicht man, daß man nahezu dieselbe Phagocytenzahl in derselben Raummenge Blut erhält. Es fragt sich nun, ob sich, wenn man die Blutemulsion mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, so daß auf dasselbe Raummaß weniger Leukocyten gehen, im Verhältnis zu der unveränderten Menge Serum und Bakterien, dann dadurch die Phagocytosenzahl verändert.

Ich habe diesen Versuch so ausgeführt, daß eine Coliemulsion auf ca. 8000 Mill. pro 1 ccm und eigenes Serum angewandt wurde. Die Blutemulsion ist eigenes gewaschenes Blut, das durch Zusatz von physiologischer NaCl-Lösung verdünnt wurde.

Blut unverdünnt	5,69
„ verdünnt 0,5	8,08
„ „ 0,25	15,60
„ „ 0,125	18,80
„ „ 0,0625	19,00
„ „ 0,03125	21,00

Das Zählen ist bei den hohen Zahlen recht schwierig, teils wegen der geringen Anzahl von Leukocyten, teils weil die einzelnen Zellen so viele Bakterien enthalten, daß ein genaues Zählen ausgeschlossen ist, so daß man diese Zahlen nur als einen annähernden Ausdruck für die Phagocytose betrachten muß.

Ein anderer Versuch, auf ganz dieselbe Weise, aber mit anderen Verdünnungen ausgeführt, ergab folgende Resultate:

Blut unverdünnt	6,46
„ verdünnt 0,75	7,58
„ „ 0,67	8,14
„ „ 0,50	8,88
„ „ 0,33	9,44
„ „ 0,25	10,20
„ „ 0,125	10,40
„ „ 0,0625	11,18

Auch bei diesem Versuche machte das Zählen bei den hohen Zahlen dieselbe Schwierigkeit wie beim vorhergehenden. Diese beiden Versuche zeigen, daß die abnehmenden Mengen von Leukocyten im Verhältnis zum konstanten Bestandteil der Bakterien und des Serums bei allen anderen gleichen äußeren Verhältnissen eine stark ausgesprochene Vermehrung der Phagocytosenzahl ergeben.

Hektoen sagt in einer seiner ersten Arbeiten von der Phagocytose: „We have found that in order to obtain the same degree of phagocytosis in different experiments it is important that approximately the same number of bacteria be present.“ Trotzdem man von vielen Seiten einen offenen Blick hierfür gehabt hat, liegen doch nur sehr wenige exakte Untersuchungen hierüber vor. Verschiedene Verfasser erwähnen wohl die Bedeutung dieses Faktors und führen sogar den ganzen Versuch auf Basis der Emulsionsstärke aus, geben aber keinen weiteren Beitrag zur Klärung der Sache. Bevor wir mit der Ausführung über die Stärke der Bakterienemulsion und ihre Bedeutung für die Phagocytose beginnen, wird es nötig

sein, die Methoden zu berühren, die man für die Bestimmung der Stärke derselben hat. Die meisten angegebenen Methoden stützen sich auf die Bakterienzählung. Die größte Verbreitung hat die Wright-Leishman'sche Methode, indem sie als ein einigermaßen leichtes Verfahren von Anfang an in England angewandt wurde und von dort aus in die gangbare Technik übergegangen ist.

Eine Frage, die sich natürlich aufwerfen läßt, wenn vom Abschätzen der Resultate der Methode die Rede ist, ist die, mit welcher Genauigkeit dieselbe arbeitet. Der Versuch wurde derart ausgeführt, daß die Durchschnittszahl des Zählens von Blutkörperchen und Bakterien in 5 Feldern verzeichnet wurde. Von solchen Durchschnittszahlen sind je 5 von 3 verschiedenen Ausstrichpräparaten im folgenden aufgeführt:

	Blutkörp.	Bakterien	Verhältnis
Präparat I	3,35	2,94	1,14
	2,54	2,54	1,00
	2,76	1,83	1,51
	3,88	2,45	1,58
	3,51	2,91	1,21
Präparat II	5,30	3,32	1,60
	4,49	3,70	1,21
	7,05	3,36	2,10
	5,55	3,43	1,62
	6,41	3,63	1,77
Präparat III	6,41	3,71	1,73
	6,07	3,30	1,84
	5,62	3,30	1,70
	6,48	3,17	2,04
	6,45	2,95	2,19

Nimmt man diese 15 Verhältniszahlen, die also ideell gleich groß sein sollten, und berechnet daraus nach dem exponentiellen Fehlergesetz, so bekommt man:

Durchschnittszahl	1,62
Mittelfehler	0,36
in Proz. der Mittelzahl	22

Das Zählen nach Wright-Leishman ist jedoch viel zu beschwerlich, als daß es sich bei jedem Versuche in Anwendung bringen ließe. Ich habe deshalb eine leichtere Methode gebraucht.

Eine Emulsion von Colibacillen wurde durch viele Zählungen festgesetzt, wurde dann in zugepfropften Widalgäsern in verschiedenen Verdünnungen angebracht, diese wurde autoklaviert, wodurch die Dichtigkeit der Emulsion nicht verändert wird. Die auf diese Weise sterilisierten Gläser können sich jahrelang unverändert halten.

Man benutzt nun diese zum Vergleich anderer Emulsionen, indem man gegen das Licht Proben mit fein gedrucktem Text als Hintergrund hält. Man kann auf diese Weise schnell und leicht die Stärke einer Emulsion messen, wenn diese aus Stäbchen besteht, ebenso wie die Normal-emulsion.

Um einen Begriff von der Genauigkeit dieser Methode zu geben, werden folgende Zahlen mit Kontrollzählungen angeführt:

beim Durchleuchten	7000	25 000	2500	3500 Mill. pro 1 ccm
beim Zählen	7500	24 000	2597	3375 „ „ 1 „

Es zeigt sich also eine gute Uebereinstimmung und dies beweist die Brauchbarkeit der Methode.

Nach diesen einleitenden Untersuchungen können wir nun zum Schätzen der Schwingungen in der Stärke der Emulsion übergehen.

Der Versuch ist so ausgeführt, daß man dasselbe Serum und dieselbe Blutaufschwemmung anwandte, aber fallende Mengen von Bakterien. Es ergab sich folgendes Resultat:

Bakterienemulsion	unverdünnt	= 8000 Mill. pro 1 ccm	5,69
„	verdünnt 0,5	= 4000 „ „ 1 „	4,82
„	„ 0,25	= 2000 „ „ 1 „	3,88
„	„ 0,125	= 1000 „ „ 1 „	3,34
„	„ 0,0625	= 500 „ „ 1 „	2,48
„	„ 0,03125	= 250 „ „ 1 „	1,88

Ein anderer Versuch auf gleiche Weise aber mit andern Verdünnungen ausgeführt, ergab folgendes:

Bakterienemulsion	unverdünnt	= 8000 Mill. pro 1 ccm	6,46
„	verdünnt 0,75	= 6000 „ „ 1 „	5,78
„	„ 0,67	= 5333 „ „ 1 „	5,18
„	„ 0,50	= 4000 „ „ 1 „	4,44
„	„ 0,33	= 2667 „ „ 1 „	3,20
„	„ 0,25	= 2000 „ „ 1 „	2,70
„	„ 0,125	= 1000 „ „ 1 „	2,12
„	„ 0,0625	= 500 „ „ 1 „	1,84

Diese Versuche zeigen, wie die Zahl mit der Stärke der Emulsion fällt. Vergleichen wir nun diese Versuche mit den entsprechenden über Verdünnung der Blutaufschwemmung, so sieht man, wie aus demselben Ausgangspunkt die Verdünnung des Blutes eine Steigung, die Verdünnung der Bakterienemulsion ein Fallen ergibt.

Dies läßt stark vermuten, daß einer der entschiedenen Faktoren der Phagocytose die relative Anzahl der Leukocyten

und Bakterien ist. Um dies Verhältnis noch näher zu untersuchen, habe ich zwei entsprechende Versuchsreihen aufgestellt, in denen ich gleichzeitig sowohl das Blut als auch die Bakterienemulsion gleich stark verdünne. Ich bekomme darauf der ersten Versuchsreihe entsprechend:

Blut und Bakterien	unverdünnt	5,69
" "	verdünnt 0,5	5,36
" "	" 0,25	6,08
" "	" 0,125	6,00
" "	" 0,0625	5,20
" "	" 0,03125	5,40

Diese Zahlen ergeben:

Durchschnittszahl	5,62
Mittelfehler	0,36
in Proz. der Mittelzahl	6

Die zweite Versuchsreihe sieht folgendermaßen aus:

Blut und Bakterien	unverdünnt	6,46
" "	verdünnt 0,75	6,08
" "	" 0,67	6,58
" "	" 0,50	5,70
" "	" 0,33	7,56
" "	" 0,25	6,80
" "	" 0,125	5,80
" "	" 0,0625	6,00

Diese 8 Zahlen ergeben:

Durchschnittszahl	6,37
Mittelfehler	0,62
in Proz. der Mittelzahl	10

Die Differenzen dieser beiden Zahlenreihen liegen innerhalb der Fehlergrenze des Zählfehlers und man darf sie deswegen als gleich groß betrachten. Man sieht hieraus, daß die Verdünnung, wenn man derselben in den beiden Komponenten folgt, keinen Einfluß auf das Resultat ausübt, obgleich die absolute Anzahl sowohl der Leukocyten als auch der Bakterien vermindert wird, während die Flüssigkeitsmenge, worin sie aufgenommen sind, beständig die gleiche ist. Hiermit ist also gezeigt, daß das relative Mengenverhältnis zwischen Leukocyten und Bakterien für die Größe der Phagocytenzahl von großer Bedeutung ist.

Da das normale Blut annähernd dieselbe Anzahl Leukocyten pro Raummaß gibt, würde man diese Fehlerquelle da-

durch vermeiden können, daß man eine Normalemulsion der Bakterien anwendet. Dies stößt jedoch auf viele Schwierigkeiten; denn würde man eine Emulsion von lebenden Bakterien aufbewahren, so würden diese nach und nach sterben und dadurch andere Bedingungen für die Phagocytose abgeben, oder man könnte, um dieselben Bedingungen sofort zu erreichen, die Bakterien durch Erwärmen töten und dann diese aufbewahren. Dies läßt sich auch sehr gut bei Bakterien ausführen, die diese Behandlung vertragen, wie z. B. Tuberkelbacillen. Die meisten Bakterienformen aber werden durch Erwärmen Veränderungen erleiden, die sie für diesen Gebrauch mehr oder weniger ungeeignet machen.

Man kann nicht sagen, daß es endgültig entschieden ist, inwiefern das Erwärmen der Bakterien im allgemeinen eine bedeutende Rolle spielt. Loehlein hat die Aufmerksamkeit hierauf gelenkt, speziell beim *Bacterium coli*, indem er gezeigt hat, daß dies Bakterium beim Erwärmen auf 58° so sehr leidet, daß es sich nur sehr schlecht färben läßt, und er betont, daß in diesem Moment eine unübersehbare Fehlerquelle im Schätzen dieser Dinge liegt.

Ich kann mich aus eigener Erfahrung voll und ganz der Anschauung Loehleins anschließen, indem ich zur Herstellung einer Normalemulsion Colibacillen 1 Stunde lang auf 60° erwärmte und hernach die Phagocytose mit diesen versucht habe. Der Versuch wurde mit normalem Serum und Blutkörperchen und Kontrolle eines nicht erwärmten Teiles derselben Emulsion ausgeführt:

Coli lebend	1,30	1,60	1,40
Coli auf 60° erwärmt	0,56	0,58	0,70

Von den toten Bakterien zeigte sich nur ein geringer Teil bewahrt und gefärbt, die meisten waren in schwach gefärbte Granula zerfallen, daher erklärt sich die niedrigere Zahl. Es geht hieraus hervor, daß es nicht möglich sein wird, aus *Bacterium coli* eine Normalemulsion durch Erwärmen der Bakterien herzustellen. Die Emulsionen müssen frisch hergestellt und für jeden Versuch standardisiert werden.

Schließlich dürfte die Bedeutung des Alters der Bakterien erwähnt werden. Hierunter verstehe ich die Zeit, in der die einzelne Agarkultur gezüchtet worden ist. Diese Frage ist sozusagen nicht behandelt, indem die meisten Untersuchungen mit 24 Stunden alten Kulturen ausgeführt sind; indessen ist es sicher nicht ohne Interesse, zu wissen, ob man ohne nennens-

werten Einfluß auf das Resultat Kulturen benutzen kann, die 2 oder 3 Tage alt sind. Ich habe geprüft, wie die Phagocytose vom Alter der Kultur für jeden Tag abhängt.

Der Versuch wurde so ausgeführt, daß dieselbe Coliform jeden Tag auf Agar ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum wieder aus dem Thermostaten herausgenommen wurde, wonach sie in Kälte und Dunkelheit aufbewahrt wurde; als ich auf diese Weise die Kulturen von einer Woche gesammelt hatte, wurden alle Versuche mit demselben Serum und denselben Blutkörperchen ausgeführt, indem ich darauf achtete, daß alle Emulsionen dieselbe Stärke hatten. Der Versuch ergab folgende Zahlen:

Kultur	24 Stunden alt	7,96
” 2 × 24	” ”	5,60
” 3 × 24	” ”	5,12
” 4 × 24	” ”	4,04
” 5 × 24	” ”	3,36
” 6 × 24	” ”	3,06
” 7 × 24	” ”	2,20

In den Präparaten von 5 Tagen und darüber sieht man die Bakterien in Granula deutlich zerfallen, man muß deswegen annehmen, daß die Verminderung in der Phagocytose von dem Degenerationsphänomen bei den Bakterien herrührt, und daß diese Erscheinung spezifisch ist für Bakterienformen, die wie *Bacterium coli* und ähnliche leicht zerstört werden. Allerdings zeigt uns der Versuch, daß man bei der Phagocytose von Colibacillen auf das Alter der Kultur beim Beurteilen der Resultate Rücksicht nehmen muß, und daß man, um diese Fehlerquelle zu vermeiden, immer Kulturen von gleichem Alter anwenden muß.

Der Einfluß der Reaktionszeit auf die Phagocytose.

Die Expositionszeit des Versuches wird von verschiedenen Verfassern auf 10—30 Minuten angegeben. Sofern die Variationen der Expositionszeit auf die Phagocytosenzahl Einfluß haben, wird es durch Versuche hierüber möglich sein, sich über das Optimum der Exposition für die betreffende Bakterienform Klarheit zu verschaffen.

Der Einfluß der Reaktionsschnelligkeit auf die Phagocytose ist von Loehlein, Fleming, Sauerbeck, Milhit, Potter, Thomas, Knorr, Neisser und Guerrini u. a. studiert worden, die alle fanden, daß die Phagocytosenzahl mit der Expositionszeit wuchs. Die Versuche sind mit verschiedenen Bakterienformen und sehr oft mit Serum ausgeführt worden. Da für Colibacillen derartige Untersuchungen noch nicht vorliegen, habe ich einige Versuche hierüber ausgeführt.

Die Technik war die gewöhnliche, indem ich Normaleserum anwandte und darauf die Proben zu verschiedenen Zeiten herausnahm. Ein Versuch mit normalem Menschenserum gibt:

Nach	5 Minuten	2,00
"	10 "	2,38
"	20 "	2,70
"	40 "	3,98
"	80 "	4,16

Man sieht, wie die Zahl der Zeit entsprechend steigt. Nimmt man in einem anderen Versuch, ebenfalls mit normalem Menschenserum und Colibacillen, die Proben nach kleineren Zwischenräumen heraus, so bekommt man die Zahlen:

Nach	5 Minuten	1,70	Nach	30 Minuten	4,28
"	10 "	2,12	"	40 "	5,52
"	15 "	2,36	"	50 "	5,43
"	20 "	3,15	"	60 "	4,60
"	25 "	4,12	"	120 "	3,85

Man sieht, daß das Maximum der Kurve bei 40 Minuten liegt, worauf sie wieder langsam fällt. Der Fall scheint zu charakteristisch zu sein, um ihn demselben Zählfehler zuzuschreiben zu dürfen, und die Präparate geben auch vollen Aufschluß hierüber. Es zeigt sich nämlich, daß die Zeiten von über 40 Minuten in den Präparaten eine ausgesprochene intracelluläre Bakteriolyse zeigen, die das Zählen erschwert und die Zahl vermindert. Der nächste Versuch, mit denselben Komponenten, aber mit einer stärkeren Bakterienemulsion ausgeführt, ergibt folgende Zahlen:

Nach	5 Minuten	2,46	Nach	30 Minuten	5,12
"	10 "	3,10	"	40 "	6,32
"	15 "	4,10	"	50 "	6,22
"	20 "	4,42	"	60 "	6,26
"	25 "	4,66	"	90 "	5,65

Die Form der Kurve ist dieselbe, die Steigung nur etwas stärker. Bei 40 Minuten sieht man auch hier ein Maximum und darauf ein Fallen, das hier jedoch schwächer ist, weil die höchste Zeit hier nur 90 Minuten ist, während sie im vorigen Versuch 120 Minuten war.

Mein letzter Versuch dieser Art ist mit Doppelbestimmung und bei weit kleineren Zeitintervallen ausgeführt, außerdem ist er sowohl mit Ziegenserum als auch mit Menschenserum ausgeführt, und zwar so, daß die zwei ersten Kolonnen die Zahlen des Ziegenserums sind, die dritte die Zahlen des Menschenserums.

Bei allen drei Versuchsreihen ist dieselbe Colibacillenemulsion und dieselbe Aufschwemmung der Ziegenblutkörperchen angewandt, während aber die zwei ersten Reihen dadurch entstanden sind, daß ich im Widalglass die Komponenten vermischt und darauf zu verschiedenen Zeiten die Proben herausgenommen habe, ist die letzte Reihe auf gewöhnliche Weise mit Pipetten ausgeführt. Die Zahlen sehen folgendermaßen aus:

			Ziegenserum	Menschenserum
Nach	0	Minuten	0,40	
"	2	"	0,56	
"	4	"	1,56	
"	5	"	1,58	1,58
"	6	"	2,04	2,24
"	8	"	3,32	
"	10	"	3,36	3,36
"	12	"	3,60	
"	14	"	4,26	
"	15	"	4,35	4,35
"	16	"	4,90	3,68
"	18	"	5,13	
"	20	"	5,50	5,55
"	25	"	5,54	5,80
"	30	"	6,60	6,10
"	35	"	6,40	5,14
"	40	"	6,14	5,60
"	50	"	5,50	5,30
"	60	"	4,56	5,15
"	70	"	5,20	4,77
"	80	"	4,04	
"	90	"	4,40	4,83

Man bemerkt auch hier, daß die Form der Kurve den früheren ganz ähnlich ist. Was in besonderem Grade die Aufmerksamkeit erregen dürfte, ist, daß die Zeit 0 mit der Zahl 0,40 aufgeführt wird. Damit soll gesagt sein, daß die Probe in demselben Augenblick aufgenommen ist, in dem die Komponenten gemischt sind. Dies zeigt also, mit welcher Schnelligkeit der Phagocytoseprozeß vor sich geht, daß einige Sekunden, um die es sich handelt, imstande sind, eine nicht gerade geringe Phagocytose aufzuweisen.

Faßt man diese Kurven zusammen, so zeigt sich also, daß im Einklang mit früheren Untersuchungen auch meine Versuche über Colibacillen eine Vermehrung der Phagocytosenzahl geben, einer Vermehrung der Expositionszeit entsprechend, es zeigt sich aber gleichzeitig, daß diese Vermehrung nicht geradezu proportional zur Zeit ist, sondern daß die Kurven

krumm verlaufen, ferner, daß sie bei etwa 40 Minuten im allgemeinen ihr Maximum erreichen und darauf wieder eben abfallen, der eintretenden Bakteriolyse entsprechend.

Die praktische Seite der Frage ist nun, auf Grund dieser Versuche die geeignetste Expositionszeit für diese Bakterien in Erfahrung zu bringen. Die Expositionszeit muß vor dem Maximum der Kurven liegen, also innerhalb 30 Minuten, um die schädliche Wirkung der Bakteriolyse zu vermeiden. Innerhalb dieser Grenze ist es recht gleichgültig, welche Zeit man nimmt, aber um eine einigermaßen volle Zahl in einer passenden Zeit zu erreichen, wird man 10—15 Minuten als eine geeignete Expositionszeit bezeichnen können, die Zeit, welche auch bei den meisten meiner Versuche angewandt worden ist. Nachdem wir nun gesehen haben, wie die Phagocytosenzahl von der Expositionszeit beeinflußt wird, kann man fragen, welchen Einfluß diese auf den opsonischen Index hat, oder mit anderen Worten, ob das Steigen der Phagocytosenzahl dermaßen die beiden Sera begleitet, daß der opsonische Index immer derselbe bleibt.

Ich habe, um dies zu untersuchen, Coliimmunserum vom Menschen mit normalem Menschen Serum verglichen und einige Versuche hierüber angestellt. Der erste Versuch ergab folgende Zahlen:

	Normalserum	Coliserum	Index
Nach 5 Minuten	3,86	8,16	2,11
„ 10 „	6,28	8,80	1,40
„ 15 „	6,46	12,75	1,97
„ 20 „	7,52	14,10	1,88
„ 30 „	7,90	11,65	1,47
„ 60 „	7,70	13,75	1,76

Diese Indexreihe zeigt nicht, wie Milhit es behauptet hat, ein Abnehmen der Werte mit steigenden Zeiten. Der Unterschied der Zahlen überschreitet nicht 16 Proz. Fehlergrenze.

Der folgende Versuch ist mit zwei Colisera und demselben Normalserum als Kontrolle aufgeführt und gibt:

	Normalser.	Coliser. I	Index I	Coliser. II	Index II
nach 5 Min.	1,08	2,00	1,85	1,40	1,30
„ 10 „	1,36	2,76	2,03	1,84	1,35
„ 15 „	1,92	3,22	1,68	2,22	1,16
„ 30 „	2,40	3,56	1,88	2,46	1,03
„ 60 „	2,56	3,56	1,39	2,56	1,00

Beide Reihen zeigen einen fallenden Index, aber die Variationen der Zahlen liegen innerhalb der Fehlergrenzen von

bzw. 14 und 15 Proz., so daß die Ausschläge nicht bedeutend sind. Aus diesen Versuchen läßt sich mit Sicherheit nichts schließen, aber es scheint doch, daß sich bei höheren Reaktionszeiten eine fallende Tendenz im Index zeigt. Es scheint mir, daß man die Erklärung für das Phänomen weniger in einer verhältnismäßig höheren Steigung der Normalkurven als in einer stärkeren Bakteriolyse der Präparate von den höheren Zeiten des Immuserums suchen müßte. In praxi hat das Phänomen kaum große Bedeutung, indem man es dadurch ganz vermeiden kann, daß man eine bestimmte Expositionszeit, z. B. 15 Minuten wählt. Aus den obigen Reihen der Indices wird man sehen, daß der Index, welcher einer Expositionszeit von 15 Minuten entspricht, sozusagen mit der Mittelzahl der Reihe zusammenfällt.

Studien über die spontane Phagocytose.

Es ist nun gezeigt, wie eine Reihe von Faktoren und Variationen in den Komponenten die Phagocytose zu beeinflussen vermag, wenn die Serumwirkung nicht ausgeschlossen wird. Man wird nun im folgenden sehen, wie sich die Verhältnisse zur Phagocytose stellen, wenn die Wirkung des Serums und der darin enthaltenen Stoffe eliminiert wird. Unter spontaner Phagocytose versteht man die Phagocytose, die eintritt, wenn gewaschene Leukocyten und Bakterien in einem indifferenten, isotonischen Medium gemischt werden, so daß jede Serumwirkung vermieden wird. Schon lange bevor die Phagocytosenfrage durch Wrights Untersuchungen aktuell geworden war, wies Bordet darauf hin, daß Leukocyten Bakterien ohne Mitwirken des Serums aufnehmen können. Im Jahre 1905 legte Loehlein einige Untersuchungen vor, in denen er deutlich das Vorhandensein der spontanen Phagocytose an einer Reihe von Bakterien zeigte. Es ist indessen von der Wrightschen Schule behauptet worden, daß die spontane Phagocytose von einem unvollständigem Waschen der Blutkörperchen herrührt.

Um dieses Verhältnis zu untersuchen, habe ich hierüber Versuche sowohl mit Colibacillen als mit Staphylokokken unternommen. Die Versuche sind mit normalem Blut und Serum aus Menschen vorgenommen worden und ergaben das untenstehende Resultat:

Mit Colibacillen:

Blut + Colibacillen				7,64
nach Zentrif. mit Natriumcitratlösung	6,54	gleiche + Serum		7,86
„ 1 Waschung mit NaCl	5,06	„ + „		7,00
„ 2 Waschungen „ „	2,14	„ + „		7,62
„ 3 „ „ „	2,88	„ + „		6,88
„ 4 „ „ „	3,36	„ + „		7,00
„ 5 „ „ „	2,30	„ + „		7,44

Mit Staphylokokken:

Blut + Staphylokokken					
nach Zentrif. mit Natriumcitratlösung	4,78	gleiche	+	Serum	12,0
„ 1. Waschung mit NaCl	1,54	„	+	„	12,3
„ 2. Waschungen „ „	1,10	„	+	„	11,5
„ 3 „ „ „	1,20	„	+	„	11,9
„ 4 „ „ „	1,18	„	+	„	12,8
„ 5 „ „ „	1,16	„	+	„	12,0

Diese Versuche zeigen übereinstimmend, daß die spontane Phagocytose nach jeder Waschung der Blutkörperchen fällt, um nach dem zweiten Mal in der NaCl-Lösung die Größe zu erreichen, welche konstant wird, während der Zusatz von Serum die ganze Reihe hindurch dasselbe Resultat gibt. Es geht daraus hervor, daß man jede Serumwirkung durch einmalige Behandlung der Leukocyten mit Natriumcitrat und zweimalige Behandlung mit NaCl-Lösung ausschließen kann. Mit derartig behandelten Leukocyten wird es somit möglich werden, Versuche über die Gesetze der Spontanphagocytose anzustellen.

Ein einzelner Versuch mit Colibacillen:

Coliemulsion unverdünnt	5000	Mill. pro 1 ccm	1,62
„ verdünnt 0,5	2500	„ „ 1 „	1,14
„ „ 0,2	1000	„ „ 1 „	1,02
„ „ 0,1	500	„ „ 1 „	0,80
„ „ 0,05	250	„ „ 1 „	0,68

zeigt, daß die spontane Phagocytose mit dem Verdünnen der Bakterienaufschwemmung abnimmt. Um dies näher zu beleuchten, habe ich noch zwei Versuche mit Verdünnung der Bakterienemulsion und konstant gehaltener Blutaufschwemmung vorgenommen. Die Versuche wurden sowohl mit Colibacillen als mit Staphylokokken ausgeführt, und zwar mit untenstehendem Resultat:

Coliemulsion unverdünnt	4000	Mill. pro 1 ccm	4,12
„ verdünnt 0,5	2000	„ „ 1 „	2,76
„ „ 0,2	800	„ „ 1 „	1,60
„ „ 0,1	400	„ „ 1 „	0,92

Mit Staphylokokken:

Staphylokokkenemulsion unverdünnt	8000	Mill. pro 1 ccm	8,42
„ verdünnt 0,5	4000	„ „ 1 „	3,80
„ „ 0,2	1600	„ „ 1 „	2,00
„ „ 0,1	800	„ „ 1 „	1,04

Die Versuche zeigen übereinstimmend, daß die Phagocytosenzahl mit der Stärke der Emulsion abnimmt.

Versucht man umgekehrt die Emulsion konstant zu halten, während die Blutaufschwemmung verdünnt wird, so erhält man das untenstehende Resultat:

		Coli	Staphylokokken
Blutaufschwemmung	unverdünnt	4,12	8,42
"	verdünnt 0,5	6,38	15,00
"	" 0,2	9,20	30,00
"	" 0,1	18,40	∞

In den schwachen Verdünnungen der Blutaufschwemmung stellen sich beim Zählen der Präparate Schwierigkeiten ein, teils wegen der geringen Anzahl der Leukocyten, teils weil die einzelnen Leukocyten so viele Bakterien enthalten, daß die Zählung ziemlich ungenau wird.

Dies macht sich besonders bei Staphylokokken geltend, weshalb die aus der Blutverdünnung 0,1 stammende Zahl mit ∞ bezeichnet wird.

Bei gleichzeitigem und gleichstarkem Verdünnen sowohl von der Bakterien- als auch von der Blutaufschwemmung erhält man:

		Coli	Staphylokokken
Blut + Bakterien	unverdünnt	4,12	8,42
" + "	verdünnt 0,5	4,28	6,84
" + "	" 0,2	3,66	8,00
" + "	" 0,1	3,80	7,00

Die Fehlergrenzen dieser beiden letzten Reihen fallen mit einer kleineren Anzahl von Ziffern innerhalb des Zählfehlers. Man darf somit schließen, daß die Zahlen hier gleich groß sind. Es ist aus diesen Versuchen ersichtlich, daß die Spontanphagocytose von den gegenseitigen Mengenverhältnissen zwischen Leukocyten und Bakterien in der Weise abhängig ist, daß ein Herabsetzen der Anzahl von Leukocyten eine größere, ein Herabsetzen der Zahl der Bakterien eine kleinere Phagocytosenzahl ergibt, während schließlich eine Abnahme der Mengen beider Komponenten unter Beibehaltung von demselben gegenseitigen Mengenverhältnis unveränderte Phagocytosenzahlen ergibt. Bezüglich des Verhaltens der spontanen Phagocytose gegenüber dem Einfluß der Reaktionszeit wird der untenstehende Versuch Aufschlüsse geben. Die Versuche wurden sowohl mit Colibacillen als mit Staphylokokken in der Weise ausgeführt, daß gleich große Mengen von Bakterien-

und Blutaufschwemmung in Widalgläsern gemischt worden sind und Proben entnommen wurden.

	Coli	Staphylokokken
nach 5 Minuten	2,20	3,04
„ 10 „	2,40	3,20
„ 15 „	2,76	3,50
„ 20 „	3,40	4,14
„ 30 „	4,64	4,82
„ 45 „	4,70	5,92
„ 60 „	4,92	5,64

Es zeigt sich, daß beide Reihen mit der Zeit steigen, daß aber die Kurve in den ersten 30 Minuten am stärksten steigt. Aus einem Versuche, welcher später erwähnt werden soll, geht ferner hervor, daß die spontane Phagocytose von der Temperatur sehr abhängig ist, indem sie in Uebereinstimmung mit der normalen Serumphagocytose ihr Maximum bei 37° hat. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der Verlauf der spontanen Phagocytose wahrscheinlich derselbe ist wie bei der normalen Serumphagocytose, nur mit dem Unterschied, daß die Zahlen der Spontanphagocytose unter gleichen Umständen gewöhnlich kleiner als die der Serumphagocytose sind.

Es liegt jetzt die Frage vor, ob es nicht möglich wäre, die spontane Phagocytose bei der quantitativen Austitrierung des phagocytären Vermögens des Serums zu verwenden. Die ursprüngliche quantitative Phagocytosebestimmung war die opsonische Indexmessung Wrights, welcher die Normalserumphagocytose als Grundlage betrachtete, indem der normale Index nur innerhalb ziemlich enger Grenzen schwanken sollte.

Um dieses Verhältnis näher zu untersuchen, habe ich Phagocytosebestimmungen in 10 Sera von normalen Personen sowohl mit Colibacillen als auch mit Staphylokokken ausgeführt. Die erhaltenen Zahlen waren wie untenstehend:

	Coli	Staphylokokken
Serum 1	5,58	9,36
„ 2	3,72	7,76
„ 3	4,41	10,22
„ 4	4,06	14,98
„ 5	3,24	13,48
„ 6	3,40	10,28
„ 7	4,88	9,90
„ 8	4,54	14,92
„ 9	3,70	14,00
„ 10	5,08	10,02
Mittelzahl	4,26	11,49
Mittelfehler	0,8	2,6
in Proz. der Mittelzahl	19	23

Man sieht, daß die Ausschläge der Phagocytosenzahlen bei normalen Sera weit außerhalb der Zählfehler liegen, und daß die Phagocytosenzahl des Normalserums somit eine sehr variable Größe ist.

Untersuchen wir nun nach der Indexmessung Wrights die Verhältnisse zwischen dem größten und dem kleinsten Werte der Colireihe bzw. 5,58 und 3,24, so erhalten wir die Indices 1,72 und 0,58, die somit weit außerhalb der Wrightschen Grenzen liegen und trotzdem das Verhältnis zwischen zwei normalen Serumphagocytosenzahlen repräsentieren. In der Staphylokokkenreihe wird der Unterschied zwischen den Indices noch größer, nämlich 1,93 und 0,52, indem die größte und die kleinste Zahl hier bzw. 14,98 und 7,76 ist. Die 5 ersten dieser Sera stammen von normalen Frauen und die 5 letzten von normalen Männern, so daß man keinen den verschiedenen Geschlechtern entsprechenden Unterschied in den Größenverhältnissen der Zahlen beobachten kann.

Hierzu kommt noch, daß bei täglichen Messungen von demselben zu derselben Tageszeit entnommenen Normalserum sich ebenso große Schwankungen in der Größe der Phagocytosenzahl zeigen. Der Versuch wurde mit Colibacillen täglich in 13 Tagen ausgeführt:

Dato	Phagocytosenzahl	Dato	Phagocytosenzahl
15	3,20	22	3,88
16	2,74	23	3,90
17	2,24	24	3,40
18	3,24	25	2,60
19	2,85	26	2,00
20	3,48	27	2,30
21	2,75		
	Mittelzahl		2,97
	Mittelfehler		0,61
	in Proz. der Mittelzahl	21	

Es ist ersichtlich, daß die Schwankungen dieser Zahlen auch außerhalb des Zählfehlers liegen. Die niedrigste Phagocytosenzahl dieser Reihe war 2,00, die höchste 3,90, was somit einen ähnlichen prozentualen Unterschied wie in den oben erwähnten Reihen ergibt.

Hieraus darf man wohl schließen, daß die Wrightsche Indexmessung bei der quantitativen Messung des phagocytären Vermögens des Serums keine zuverlässige Hilfe leistet.

Untersuchen wir jetzt, wie es sich mit einer ähnlichen Serienuntersuchung über die spontane Phagocytose verhält, so ergeben die Versuche mit Colibacillen und Staphylokokken in 10 verschiedenen Pipetten ausgeführt, das untenstehende Resultat:

	Coli	Staphylokokken
Versuch 1	2,90	5,78
” 2	3,00	6,02
” 3	3,06	6,22
” 4	3,08	6,32
” 5	3,18	6,34
” 6	3,18	6,46
” 7	3,20	6,70
” 8	3,32	6,80
” 9	3,36	6,84
” 10	3,40	7,20
Mittelzahl	3,17	6,47
Mittelfehler	0,16	0,42
in Proz. der Mittelzahl	5	7

Man sieht, daß, wenn der variable Serumfaktor ausgedeutet wird, die Fehlergrenze dann weit innerhalb des Zählfehlers fällt, und es geht hieraus hervor, daß die spontane Phagocytose eine bei weitem konstantere Größe ist als die normale Serumphagocytose, weshalb sie bei quantitativen Phagocytosenmessungen ein weit besseres Standardmaß ist. Man hat schon längst gewußt, daß die Wrightsche Messung des opsonischen Index nicht besonders genau ist, weshalb andere Methoden zur Lösung der Frage über die quantitative Phagocytosenmessung gesucht worden sind.

Die zweite Methode, welche in Vorschlag gebracht worden ist, ist eine mit dem Verfahren bei der Austitrierung anderer Antikörper analoge Verdünnung des Serums.

Die Serumverdünnung ist als Maßmethode erst von Simon eingeführt worden und später von Neufeld u. a. empfohlen, wobei jedoch Neufeld hervorhebt, daß es notwendig ist, die spontane Phagocytose zu berücksichtigen, ein Vorbehalt, welcher scheinbar von Simon übersehen worden ist. Die Berücksichtigung der spontanen Phagocytose ist aber eben der schwache Punkt der Verdünnungsmethode, denn es ist sicher, daß der niedrigste bei Serumverdünnung erreichbare Wert eben die Zahl der spontanen Phagocytose ist. Die Technik muß sich somit derartig gestalten, daß man mißt, bei welcher Serumverdünnung die Phagocytosenzahl die Zahl der spontanen Phagocytose erreicht.

Neufeld behauptete, daß virulente Bakterien keine spontane Phagocytose ergaben und daß die Verdünnungsmethode somit in den meisten

Fällen sehr brauchbar war. Indessen konnte ich bei Versuchen mit einigen der häufigst vorkommenden Bakterienformen diese Behauptung nicht bestätigen, indem sowohl Colibacillen als Staphylokokken und Gonokokken, die direkt den betreffenden Infektionsfoci entnommen wurden, mitunter eine sogar besonders hohe Spontanphagocytose zeigten. Man wird deswegen in den meisten Fällen die durch die Spontanphagocytose entstandene Schwierigkeit nicht umgehen können, und das Entscheidende wird somit sein, wie schnell die Serumphagocytose mit dem Verdünnen des Serums fällt.*

In einem Versuche mit Staphylokokken (Aufschwemmung 4000 Mill. pro 1 ccm) und Normalserum wurde folgendes gefunden:

Serum unverdünnt	7,60
„ verdünnt 0,1	3,94
„ „ 0,05	3,62
„ „ 0,01	3,98
„ „ 0,005	3,88
„ „ 0,001	4,14
Spontanphagocytose	4,00

Die 5 Zahlen der Serumverdünnung sind hier gleich groß (Fehlergrenze 5 Proz.) und die Zahl der Spontanphagocytose gleich. Man sieht ferner, daß die Zahl der spontanen Phagocytose schon bei der Serumverdünnung 0,1 erreicht worden ist. Die Grenze liegt in diesem Falle wahrscheinlich zwischen den Verdünnungen 1,0 und 0,1, und eine weitere Austitrierung wird somit notwendig sein, um den Titerwert dieses Serums gegenüber dieser Bakterie festzustellen. Es wird somit beim Ausmessen des Phagocytosenwertes unter gewissen Verhältnissen notwendig sein, eine große Reihe von Titrierungen vorzunehmen, indem der der Zahl der Spontanphagocytose entsprechende Verdünnungsgrad anscheinend regellos in einigen Fällen sehr hoch und in anderen sehr niedrig in der Verdünnungsreihe gefunden werden kann. Die technischen Schwierigkeiten der Methode werden hierdurch einleuchtend.

Hierzu kommt noch das eigentümliche, von Huggenberg klar gezeigte Verhältnis, daß nicht immer ein Fallen der Phagocytosenzahl, sondern ein Steigen derselben sich einstellt. In solchen Fällen wird die Verdünnungsmethode sich als unverwendbar erzeigen. Es geht hieraus hervor, daß die Verdünnungsmethode daher nicht ohne Schwierigkeiten ist, und sie ließe sich vielleicht durch ein anderes, in technischer Beziehung bequeres Verfahren ersetzen.

Da man somit keine Maßmethode besitzt, welche gleichzeitig genau, allgemein verwendbar und in technischer Beziehung leicht ausführbar ist, habe ich gedacht, daß der Umstand, daß die spontane Phagocytose genau der Serumphagocytose folgt, sich vielleicht verwenden ließe, indem man das Wrightsche Verhältnis in der Weise modifizierte, daß die Serumphagocytose mit der Spontanphagocytose verglichen würde.

Die Methode wird dann so ausgeführt, daß man erst auf gewöhnliche Weise die Phagocytosenzahl mit Serum mißt, darauf die Zahl der Spontanphagocytose, und der Wert ist dann:

$$\frac{\text{Serumphagocytosenzahl}}{\text{Spontanphagocytosenzahl}}$$

Hierdurch wird erzielt, daß man als Divisor den niedrigsten konstanten Wert für die betreffende Versuchsanstellung hat, daß ferner die Messung nur zwei Phagocytosenversuche verlangt und somit in technischer Beziehung weit einfacher als die Verdünnungsmethode ist und schließlich weit genauere Zahlen als die Wrightsche Methode ergibt. Ich glaube, daß die Methode für alle Phagocytosenmessungen verwendbar ist und daß sie sich auch zu eventuellen klinischen Opsoninmessungen, bei denen ein Vergleich zwischen mehreren Seren von Interesse ist, verwenden läßt, indem der Wert selbstverständlich je nach der Opsoninmenge des Serums bei konstanter Spontanphagocytosenzahl variieren wird.

Um den Wert der Methode sorgfältig zu probieren, habe ich auf diese Weise das Verhalten eines Normalserums durch die verschiedenen Versuchsvariationen untersucht; alle Versuche sind mit Doppelmessungen teils für Colibacillen, teils für Staphylokokken ausgeführt worden. Die Untersuchung mittels Verdünnen der Bakterienaufschwemmung ergab mit Colibacillen das untenstehende Resultat:

					Serum- phagoc.	Spontan- phagoc.	Ver- hältnis
Coliemulsion	unverdünnt	3000	Mill. pro	1 ccm	4,24	2,12	2,00
"	verd. 0,5	1500	" "	1 "	3,70	1,80	2,06
"	" 0,2	600	" "	1 "	2,64	1,34	1,97
"	" 0,1	300	" "	1 "	1,90	1,02	1,86

Derselbe Versuch mit Staphylokokken ergab die folgenden Zahlen:

				Serum- phagoc.	Spontan- phagoc.	Ver- hältnis
Emulsion	unverdünnt	4000	Mill. pro 1 ccm	7,76	3,66	2,12
"	verd. 0,5	2000	" " 1 "	5,60	2,66	2,11
"	" 0,2	800	" " 1 "	4,26	1,96	2,17
"	" 0,1	400	" " 1 "	3,60	1,48	2,43

Wie man sieht, ist das Verhältnis in beiden Versuchsreihen ein konstantes, indem die Fehlergrenze für diese Zahlen 4 bzw. 7 Proz. ist, und es geht hieraus hervor, daß das Verhältnis zwischen der Normalserumphagocytose und der Spontanphagocytose konstant und von der Stärke der Bakterienschwemmung unabhängig ist, d.h. ferner von den gegenseitigen Mengenverhältnissen zwischen Bakterien und Leukocyten unabhängig.

Ich habe darauf auf dieselbe Weise Versuche mit Variationen in der Expositionszeit unternommen.

Mit Colibacillen:

	Serumphag.	Spontanphag.	Verhältnis
Nach 5 Minuten	2,26	1,10	2,05
" 10 "	3,20	1,56	2,05
" 20 "	4,00	1,92	2,08
" 40 "	4,66	2,42	1,93

Mit Staphylokokken:

	Serumphag.	Spontanphag.	Verhältnis
Nach 5 Minuten	2,84	1,46	1,95
" 10 "	5,62	2,54	2,21
" 20 "	10,60	5,00	2,10
" 40 "	14,46	—	—

Es geht hervor, daß auch bei dieser Versuchsanordnung das Verhältnis in beiden Reihen ein konstantes ist, indem die Fehlergrenze 3,5 und 6 Proz. ist, und man kann somit hieraus schließen, daß das Verhältnis zwischen der Normalserumphagocytose und der Spontanphagocytose konstant und unabhängig von der Expositionszeit ist.

Schließlich habe ich dieses Verhältnis bei verschiedenen Temperaturen untersucht, Versuche, welche mit einer vollkommeneren Technik als frühere von derselben Art ausgeführt worden sind, indem sie früher so ausgeführt wurden, daß Bakterien, Leukocyten und eventuelles Serum bei Zimmer-

temperatur gemischt wurden, um erst darnach bei der betreffenden Temperatur hingestellt zu werden. Ich habe in dessen oben gezeigt, daß die Phagocytose sozusagen augenblicklich eintritt, und falls es sich um Untersuchungen bei Temperaturen, die niedriger als die gewöhnliche Zimmertemperatur waren, handelte, wurde das Resultat dadurch wesentlich geändert, daß die Phagocytose bei Zimmertemperatur angefangen hatte, um darnach in der übrigen Expositionszeit bei einer niedrigeren Temperatur zu verlaufen. Bei diesen Versuchen habe ich deswegen dafür Sorge getragen, daß sowohl Bakterien als auch Leukocyten und Serum vor dem Mischen längere Zeit hindurch bei der Temperatur konstant gehalten wurden, bei welcher der Versuch vor sich gehen sollte. Bei dieser Versuchsanordnung wurde erzielt, daß die Temperatur sowohl vor dem Phagocytosenversuch als auch während desselben konstant war, und dadurch wurde der schädliche Einfluß einer anderen Temperatur vermieden.

Diese Versuche haben mit Colibacillen das untenstehende Resultat ergeben:

	Serumphag.	Spontanphag.	Verhältnis
bei 0°	0,78	0,56	1,39
„ 15°	1,82	1,44	1,26
„ 37°	4,66	3,22	1,40
„ 41°	3,40	2,64	1,29

Mit Staphylokokken:

	Serumphag.	Spontanphag.	Verhältnis
bei 0°	1,02	0,48	2,13
„ 15°	3,20	1,42	2,25
„ 37°	14,80	6,48	2,28
„ 41°	12,68	6,14	2,07

Beide Versuche zeigen wegen der neuen Versuchsanordnung einen weit größeren Unterschied zwischen den Phagocytosenzahlen bei 15° und 37°, als man früher beobachtet hat. Beide Versuchsreihen zeigen ferner gleich wie die früheren Versuche, daß die Verhältnisse konstante sind, indem die Fehlergrenze beider 5 Proz. ist, und man darf somit daraus folgern, daß das Verhältnis zwischen der Serumphagocytose und der Spontanphagocytose konstant und vom Einflusse der Temperatur unabhängig ist.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß das Verhältnis zwischen der normalen Serumphagocytose und der Spontanphagocytose für dieselbe Bakterienform, bei verschiedenen Mengenverhältnissen zwischen Leukocyten und Bakterien, verschiedener Zeit und wechselnden Temperaturen konstant ist, d. h. konstant für die am häufigsten vorkommenden Variationen der Versuchsanordnung, und es scheint somit, als ob dieses konstante Verhältnis ein zuverlässiges Maß für den Phagocytosengrad beim betreffenden Serum ist.

Wo es sich um Serienuntersuchungen über die Phagocytose von einer bestimmten Bakterie handelt, Versuche, die sich vielleicht oft über längere Zeit erstrecken entweder an demselben Tage oder an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen, wird es schwierig oder unmöglich sein, gleichartige Versuchsbedingungen zu bewahren. Betreffend Zeit und Temperatur läßt sich die Versuchsanstellung ziemlich genau einhalten, die Schwierigkeiten sind aber hauptsächlich darin gelegen, dasselbe Mengenverhältnis zwischen Leukocyten und Bakterien zu bewahren. Es stellt sich indessen aus den obenerwähnten Versuchen heraus, daß diese Schwierigkeit leicht durch die Verwendung der Verhältniszahl vermieden werden kann.

Es wird auf diese Weise möglich, die Resultate verschiedener mit derselben Bakterie ausgeführten Versuchsreihen zu vergleichen, indem die Ausschläge nur den Schwankungen im phagocytären Vermögen des verwendeten Serums entsprechen werden.

Die Phagocytose läßt sich somit durch eine Zahl ausdrücken, deren Genauigkeit nur von den Variationen des Zählfehlers abhängig ist, welche bei diesen Versuchen nie vermieden werden können, und ich bin der Meinung, daß es sich auf diese Weise ermöglichen lassen wird, größere Gleichartigkeit in den Phagocytosenmessungen zu schaffen und dadurch auf diesem Gebiete genauere Resultate zu erzielen.

Z u s a m m e n f a s s u n g.

Durch Versuche mit Colibacillen ist gefunden worden, daß die Phagocytosezahl beim Zählen von 50 Leukocyten mit einem Fehler von 10—13 Proz. festgestellt werden kann. Beim Zählen von derselben Anzahl Zellen wird für den opsonischen

Index eine Genauigkeit von etwa 20 Proz. erzielt. Die Grenze für den normalen Index wird bei 0,7—1,4 gefunden.

Die Wright-Leishmannsche Methode zur Zählung von Bakterien im Verhältnis zu Erythrocyten hat in einer einzelnen Versuchsreihe einen Fehler von 22 Proz. ergeben. Für praktische Zwecke läßt sich die Durchleuchtungsmethode leichter verwenden.

Die Phagocytosezahl ist vom gegenseitigen Mengenverhältnis zwischen Leukocyten und Bakterien in der Weise abhängig, daß eine verhältnismäßig kleinere Anzahl von Leukocyten eine stärkere Phagocytose, während eine relativ kleinere Anzahl von Bacillen eine schwächere Phagocytose ergibt. Wird das zahlenmäßige Verhältnis zwischen Leukocyten und Bakterien konstant gehalten, erhält man *ceteris paribus* dieselbe Phagocytose.

Bei Erwärmen auf 60° stellt sich schnell ein Zerfall der Colibacillen ein, so daß die Herstellung einer Standardemulsion auf diese Weise unmöglich ist.

Die Phagocytose ist vom Alter der Bakterienkultur in der Weise abhängig, daß die Phagocytosezahlen mit zunehmendem Alter der Kultur kleiner werden. Ferner ist die Phagocytosezahl von der Reaktionszeit abhängig, aber jedoch so, daß die Steigung nach einer gewissen Zeit ein Maximum erreicht, um danach von einem Fallen abgelöst zu werden.

Beim Vergleich der Reaktionsschnelligkeitskurven der Phagocytose in bezug auf Normal- und Immunserum sieht man keine dem Einfluß der Zeit entsprechende Aenderung in der Größe des opsonischen Index. Es ist durch Versuche mit Colibacillen und Staphylokokken dargetan, daß die spontane Phagocytose denselben Gesetzen wie die normale Serumphagocytose folgt und daß das Verhältnis zwischen der normalen Serumphagocytose und der spontanen Phagocytose unter wechselnden Versuchsbedingungen ein konstantes ist. Diese konstante Verhältniszahl läßt sich zum Ausmessen der phagocytierenden Fähigkeit des Serums verwenden.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Ueber das Auftreten von komplementbindenden Antikörpern nach Vorbehandlung mit art eigenen Gewebezellen, nebst Bemerkungen über die anaphylaktische Entstehung der sympathischen Ophthalmie.

Von Dr. **Andreas Rados**,

Assistent an der Kgl. Ung. Universitäts-Augenklinik No. 1 zu Budapest.

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. August 1913.)

Elschnig¹⁾ erklärte die sympathische Ophthalmie als eine anaphylaktische Entzündung des zweiten, sympathisierten Auges. Er hat nachgewiesen, daß eine antigene Resorption aus dem Auge erfolgen kann und glaubt, daß bei Verletzungen aus dem sympathisierenden Auge das Pigment in antigener Form resorbiert wird, wodurch eine Ueberempfindlichkeit im Organismus, insbesondere aber im homologen Organe (Auge) erzeugt wird.

Der Zerfall einer Uveazelle sollte die Reinjektion darstellen und die anaphylaktisch-sympathische Entzündung des zweiten Auges mit den durch die Vulnerabilität des Organs bedingten schweren Folgen auslösen. Diese Theorie, auf die ich noch später zurückkommen werde, wird gestützt durch den Nachweis, daß Chorioidealemulsion bzw. Reinpigment eine antigene Wirkung besitzt. Die Einverleibung von Aderhautemulsion bzw. Reinpigments soll nach Elschnig die Bildung komplementbindender Antikörper auslösen, welche Antikörper ein nicht art- und nicht streng organspezifisches Verhalten zeigen.

Auch Kraupa²⁾ hat nach Immunisierung mit artfremden Hornhäuten ähnliche Antikörper erzeugt. Diese auf Anregung Elschnigs ausgeführten Untersuchungen beziehen sich hauptsächlich auf Immunisierung mit artfremdem Material. Nur in einem Falle wurden Komplementbindungsversuche angestellt, wo das Immunserum durch Vorbehandlung mit artgleichen Hornhäuten hergestellt war. Nach subkutaner Vorbehandlung erhaltene Antikörper waren nicht artspezifisch. Zum Nachweis der Organspezifität wurden Kontrollen mit Leber und Milz angestellt. Die Leberkontrollen ergaben auch eine vollständige Hemmung der Hämolyse.

1) Elschnig, Arch. f. Ophthalm., Bd. 75, 76, 79, 80.

2) Kraupa, Arch. f. Ophthalm., Bd. 80, p. 489.

lyse, welche aber nach Kraupa nicht berücksichtigt zu werden brauchen, weil die Leberemulsionen auch mit normalen Seris Hemmung verursachen könnten. Bei Verwendung der Milz als Antigen trat dagegen Hämolyse ein, und infolgedessen wurden die Antikörper nach Immunisierung mit artfremden Hornhäuten auch als organspezifisch gedeutet. Mit arteigenen Hornhäuten wurde nur ein Kaninchen erfolgreich immunisiert; das Serum ergab aber auch mit Hornhaut keine vollständige Hemmung der Hämolyse. Auf Grund dieser Versuche macht Elschnig wichtige Schlüsse bezüglich des Zustandekommens der Keratitis parenchymatosa beim Menschen.

Die Versuche Uhlenhuths, von Wolff-Eisner und Vertes¹⁾ zeigten erst in jüngster Zeit, daß Anaphylaxie mit körpereigenen Organen auslösbar ist.

Von Dold und mir wurden in anderer Richtung zahlreiche Versuche angestellt, die uns bewiesen haben, daß zwischen homologen Organen, speziell zwischen beiden Augen, gewisse Zusammenhänge tatsächlich vorhanden sind.

Die Elschnigsche Theorie erklärt nur jene Fälle von sympathischer Ophthalmie, welche mit einer Iridocyclitis sympathica einsetzen, aber nicht jene Fälle, die in Form einer Papilloretinitis sympathica auftreten und erst später die Zeichen einer Iridocyclitis aufweisen, oder wo im ganzen Verlaufe die entzündlichen Erscheinungen auf der Netzhaut und auf der Papille lokalisiert bleiben. Elschnig versucht trotzdem alle Fälle und Modifikationen der sympathischen Augenentzündung mit Hilfe seiner Anschauung zu erklären und bezweifelt das Vorhandensein einer Papilloretinitis und gleichfalls einer Atrophia nervi optici sympathica. Diese von verschiedenen Autoren beschriebene Form der sympathischen Ophthalmie läßt sich auch mit der Elschnigschen Anschauung nicht erklären, und so könnten die sympathischen Entzündungen auf keiner einheitlichen Aetiologie beruhen.

Die Immunisierung mit verschiedenen Organen führt zur Antikörperbildung. Die meisten Autoren beschreiben ein nicht organspezifisches Verhalten dieser Antikörper, nur die Linse (Uhlenhuth) und die Geschlechtszellen (Dunbar, Uhlenhuth und Haendel) veranlassen nach Angabe der Autoren die Bildung streng organspezifischer Antikörper.

1) Wolff-Eisner und Vertes, Münch. med. Wochenschr., 1912, p. 1140.

Ehrlich und Morgenroth¹⁾ konnten in manchen Fällen Hämolyse erzeugen bei Ziegen durch Einspritzung von Ziegenblut, und damit haben sie bewiesen, daß auch arteigene protoplasmatische Substanzen als Antigene fungieren können. Diese Hämolyse reagierten nicht mit dem Blute der antikörpererzeugenden Ziege, dagegen reagierte das Blut der antigenspendenden und anderen Ziegen positiv. Metalnikoff²⁾ hat bei Meerschweinchen nach arteigener Hodeneinspritzung Antikörper erzeugt, welche die Spermatozoen von Meerschweinchen abtöteten. Die Immunsere töteten auch die körpereigenen Spermatozoen ab. Daß intra vitam diese Abtötung nicht eintreten kann, erklärt er mit dem Komplementmangel, da nach Metschnikoff nur bei Gerinnung das Komplement aus den Leukocyten frei wird. Eingehende Studien über die Isoantikörper machten v. Dungern und Hirschfeld³⁾, die Einspritzungen von Stier- und Kaninchenhoden bei Kaninchen vorgenommen haben. Von dem fein zerriebenen Hodengewebe spritzten die Verfasser in das Unterzellgewebe des Ohres. Die mit Stierhoden vorbehandelten Tiere reagierten bei der Reinjektion im Durchschnitt viel stärker. Sie konnten feststellen, daß die Reaktion nicht art-, dagegen deutlich organspezifisch ist. Alkoholische Organextrakte waren stets wirkungslos. In einer späteren Arbeit konnten v. Dungern und Hirschfeld⁴⁾ feststellen, daß die Sera der mit Hoden vorbehandelten Tiere bei anderen artgleichen Tieren ohne Antigenzusatz toxisch wirken. Für dasselbe Tier sind sie unschädlich. Damit sei bewiesen, daß im Blute der mit Hoden vorbehandelten Tiere Substanzen kreisen, die bei artgleichen Tieren eine toxische Wirkung ausüben können. Pick und Yamanuchi⁵⁾ haben schon darauf hingewiesen, daß bei jeder Immunisierung solche Substanzen auftreten können. Aehnliche Resultate erhielt Ascoli bei Immunisierung von Kaninchen mit Aalserum. Auch die Ergebnisse von Friedberger und seinen Mitarbeitern stimmen damit überein. Weiterhin haben v. Dungern und Hirschfeld beobachtet, daß eine passive Uebertragung der lokalen Organanaphylaxie gegenüber Hodengewebe möglich ist, besonders wenn die Injektion des Blutes und des Organs an demselben Tage vorgenommen wird. Das Blut von normalen männlichen Kaninchen war für Männchen nicht toxisch, darum beruhe die Toxizität nicht auf Fibrinfermentwirkung.

Landsteiner⁶⁾ beobachtete, daß die Spermatozoen in der Bauchhöhle der mit Tiersperma vorbehandelten Tiere ihre Beweglichkeit schon zu einer Zeit einbüßten, wo bei nicht vorbehandelten Tieren die Beweglich-

1) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., 1900, No. 21.

2) Metalnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 14, 1900.

3) v. Dungern und Hirschfeld, Diese Zeitschrift, Bd. 4, 1910, p. 256.

4) v. Dungern und Hirschfeld, Diese Zeitschrift, Bd. 8, 1911, p. 417.

5) Pick und Yamanuchi, Wien. klin. Wochenschr., 1908.

6) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 25, 1899, p. 546.

keit derselben ausgesprochen war. Adler¹⁾ arbeitete mit körpereigenem Material und stellte bei Meerschweinchen Spermotoxine her. Die Spermatozoen der Immunsera liefernden Tieres blieben nach Zusatz von Komplement beweglich, ebenso wie bei nicht vorbehandelten Tieren; gleiches Verhalten zeigte sich auch nach Zusatz von Plasma (mit Natrium citricum gewonnen). Damit hält er die Angaben von Metalnikoff für widerlegt und glaubt, daß die Spermotoxine intra vitam zirkulieren, aber es komme nicht zur Bindung derselben, vielleicht weil die intakten Endothelien eine Schutzwirkung ausüben. Die Spermotoxine sollen organ- und nicht streng artspezifische Eigenschaften besitzen. Eine Wirkung auf die artgleichen Blutkörperchen wurde nicht beobachtet, mit Leber und Milz waren auch keine Spermotoxine nachweisbar. Seine Befunde decken sich mit den Angaben von London²⁾. Moxter³⁾ stellte Immunsera mit Hammelsamen dar. Die Immunsera übten keine schädliche Wirkung auf andere Zellen, z. B. auf Flimmerepithelzellen aus, dagegen aber auf die Blutkörperchen des Hammels. Der Immunkörper zeigte aber eine größere Affinität zu den Spermatozoen als zu den Blutkörperchen.

Die Frage der Antikörperbildung nach Bluteinspritzung wurde von v. Dungern und Hirschfeld⁴⁾ bearbeitet. Sie konnten bei Hunden mit Hundeblood Isoagglutinine erzeugen, wobei sie einen eigentümlichen Zusammenhang zwischen der Agglutinabilität der Blutkörperchen und dem Auftreten von Isoantikörper beobachteten. Die Autoren unterscheiden zwei Arten von Blutkörperchen beim Hund nach der Beeinflußbarkeit mit bestimmten Isoagglutininen. Es gelang ihnen nie bei Hunden Antikörper zu erzeugen, wenn die Blutkörperchen dieselbe Struktur hatten, wie die Blutkörperchen der behandelten Tiere. Die Antikörperbildung ist also keine absolute Eigenschaft der Blutkörperchen, sondern ist abhängig von der Struktur der als Antigen dienenden und antikörperbildenden Blutkörperchen. Die Bildung der Antikörper erfolgt nur dann, wenn die zwei Blutkörperchenarten nicht identische Bestandteile enthalten. Durch Untersuchung der menschlichen normalen Isoagglutinine hat Landsteiner⁵⁾ schon bereits früher ähnliche Verhältnisse gefunden. Er konnte im menschlichen Blute zwei Strukturen (A und B) unterscheiden. Die Menschen, deren Blut die Struktur A besitzt, haben im Serum ein gegen B eingestelltes Agglutinin, und umgekehrt. Die Menschen, deren Blut die beiden Strukturen besitzt, haben im Serum überhaupt keine Isoagglutinine; bei Menschen ohne spezifische Blutbestandteile reagiert das Serum sowohl mit Struktur A wie mit Struktur B. v. Dungern und Hirschfeld haben diese Gesetzmäßigkeit bestätigt und fanden bei tierischen Seris noch weitere gruppenspezifische Bestandteile. Die Agglutinine der tierischen Sera

1) Adler, Diese Zeitschrift, Bd. 3, 1909, p. 417.

2) London, Centralbl. f. Bakt., Bd. 32, 1902, p. 48 und 147.

3) Moxter, Deutsche med. Wochenschr., 1910, No. 4, p. 61.

4) v. Dungern und Hirschfeld, diese Zeitschr., Bd. 4, 1909, und Bd. 8, 1911, p. 520.

5) Landsteiner, Wien. klin. Wochenschr., 1901.

zeigten im allgemeinen eine Artspezifität, in einigen Fällen wurden aber die Agglutinine für Menschenblut durch tierisches Blut absorbiert. Die Bildung der Isoantikörper beruht nach v. Dungern und Hirschfeld darauf, daß diese nur dann entstehen, wenn das eingeführte Blut Bestandteile enthält, welche in dem Blute des die Antikörper produzierenden Tieres nicht in gleicher Weise vorhanden sind. Die Autoren konnten auch nachweisen, daß die Blutkörperchen der Säugetiere eine Struktur B besitzen, die auch bei Menschen (in ca. 17 Proz. der Fälle) vorhanden ist. Entsprechend dieser Tatsache ist es gelungen, mit Menschenblut bei Tieren Antikörper hervorzurufen, die gegen die gruppenspezifischen, und auch solche, die gegen die artspezifischen Bestandteile gerichtet waren, weiterhin Antikörper mit Hundeblood bei Hunden, die gegen die Gruppeneigenschaften der Menschen gerichtet waren. Brockmann¹⁾ hat später festgestellt, daß die Spezifität der immunisatorisch hergestellten Antikörper mit der Spezifität der normalen Antikörper im Zusammenhange steht. Das Menschenserum enthielt Agglutinine, die für Säugetierblut einerseits, für Vogelblut andererseits nicht artspezifisch waren. In Säugetiersera hat der Autor für Säugetierblut artspezifische Agglutinine nachgewiesen. Halpern²⁾ hat bei seinen Versuchen mit körpereigenen Organen das Auftreten von Isohämagglutininen für dieselben Blutsorten, weiterhin das Auftreten bzw. Verstärkung der gruppenspezifischen Agglutinine für Menschenblut bei Hunden gesehen.

Die oben angeführten Versuche beziehen sich auf Immunisierung mit Blutkörperchen und Spermatozoen. v. Dungern³⁾ injizierte Tracheal-epithelien in die Bauchhöhle von Meerschweinchen und Kaninchen und beobachtete, daß die Flimmerepithelzellen in der Bauchhöhle derart vorbehandelter Tiere schneller zugrunde gehen. Das Flimmerepithelzellenserum übte aber nicht nur auf die Epithelien, sondern auch auf die Blutkörperchen der gleichen Art eine schädliche Wirkung aus. Forssner⁴⁾ stellte bei Kaninchen Immunsera gegen Meerschweinchenblut, -leber, -niere und -milz her; er kam zu dem Ergebnis, daß sich das Blut von Leber und Nieren gut trennen läßt und umgekehrt, weniger leicht Leber und Nieren voneinander. Centanni⁵⁾ hat beobachtet, daß nach Vorbehandlung mit artgleichen Organen in den Seris Autocytpräzipitine entstehen, die mit Extrakten der eigenen Organe einen Niederschlag geben. Pearce erhielt durch Injektion gewaschener Organe Sera, welche hämolytisch und in vivo toxisch wirkten, wenn auch nicht artspezifisch. Woltmann stellte verschiedene Organimmunsera her; alle waren nicht streng organspezifisch, am wenigsten aber das Antileberserum. Michaelis und Fleischmann⁶⁾

1) Brockmann, diese Zeitschr., Bd. 9, 1911, p. 87.

2) Halpern, diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, p. 609.

3) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr., 1899, No. 38.

4) Forssner, Münch. med. Wochenschr., 1905, No. 19.

5) Centanni, Centralbl. f. Bakt., Bd. 35, 1903; Bd. 43, 1907.

6) Michaelis und Fleischmann, Zeitschr. f. klin. Med., 1906, Bd. 58, p. 463.

arbeiteten mit subkutaner und intraperitonealer Einspritzung von Leberemulsion. Die Autoren geben an, daß durch Injektion von Leberzellen ein Hämolsin und außerdem noch ein Ambozeptor entsteht. Der durch Leberzellen erzeugte Ambozeptor hat nicht nur zur Leberzelle, sondern auch zu Zellen anderer Organe Affinität. So z. B. hemmte Mäuseleber-Kaninchenserum vollständig auch mit Mäusenierenemulsion. Die Reaktion gelang auch mit filtrierter Emulsion, d. h. es sind lösliche Substanzen der Zelle, die Bindung verursachen. In ihren Versuchen zeigte sich keine Organspezifität. Fleischmann und Davidsohn¹⁾ haben mit der Komplementbindungsmethode gearbeitet, und machen folgende Schlußbemerkungen: „Organzellen erzeugen, in den Tierkörper injiziert, Organzellantikörper nicht organspezifischer und nicht streng artspezifischer Natur, aber keine Serumantikörper (Präzipitine). Serum erzeugt, in den Tierkörper injiziert, Serumantikörper strenger Artspezifität und in geringem Maße auch Organzellantikörper.“

Halpern²⁾ hat mit körpereigenen Organen (Niere, Leber, Milz, Pankreas, Testikel) bei Hunden nach intraperitonealer Einverleibung Antikörper erzeugen können. Diese Antikörper erzeugten im Komplementablenkungsversuch eine Hemmung der Hämolyse, die zum Teil organspezifisch war, zum Teil aber war die Organspezifität nicht streng ausgesprochen. Die Antikörper, die nach Einverleibung von Nierensubstanz entstanden waren, reagierten z. B. auch mit Leber; die nach Einverleibung von Pankreas aufgetretenen Antikörper ergaben mit Hunde- und Meerschweinchenniere auch eine Hemmung der Hämolyse. Bis auf drei Fälle waren die Antikörper nicht artspezifisch.

Uhlenhuth³⁾ hat bezüglich der Kristallinse eine strenge Organspezifität und keine Artspezifität nachgewiesen. „So erzeugt ein Rinderblutantisera im Blut und allen Organsäften des Rindes, auch in der Glaskörperflüssigkeit und im Kammerwasser, einen Niederschlag, nur nicht in der Lösung der Kristallinse des Auges. Umgekehrt präzipitiert ein durch Einspritzungen von Rinderlinseneiweiß von Kaninchen gewonnenes Serum nur Linsenslösungen, sonst kein anderes vom Rinde stammendes eiweißhaltiges Substrat.“ Nach Uhlenhuth reagiert Linsenerinderantisera gleich stark auf das Linseneiweiß der Säugetiere, Vögel, Amphibien, und auch in gewissem Grade auf das der Fische.

Ranzi⁴⁾ gibt an, daß durch Vorbehandlung mit Tumor und Organextrakten es gelingt, Tiere zu sensibilisieren und dann bei der Reinjektion von Serum oder verschiedenen Organaufschwemmungen anaphylaktische Erscheinungen auszulösen. Die mit Sera vorbehandelten Tiere zeigen ein

1) Fleischmann und Davidsohn, *Folia serolog.*, Bd. 1, 1908, p. 173.

2) l. c.

3) Uhlenhuth, *Festschrift für Robert Koch*, Jena 1903, p. 49; *Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, No. 31, p. 1244.

4) Ranzi, *diese Zeitschr.*, Bd. 2, 1909, p. 12.

ähnliches Verhalten bei der Reinjektion mit Organextrakten. Die durch Organextrakte hervorgerufene Sensibilisierung ist nicht organspezifisch und der anaphylaktische Zustand besitzt keine Zellspezifität. Ohkubo¹⁾ konnte aber keine Sensibilisierung mit Organextrakten erzielen, wenn dieselben von den Blutbestandteilen befreit waren. Die schon bereits erwähnten Versuche von Wolff-Eisner und Vertes zeigten, daß ebenso wie mit körpereigener Hodensubstanz die Anaphylaxie auch mit körpereigener Leber, Niere und Gehirn auslösbar ist; nur das Auftreten der Sensibilisierung dauert etwas länger. Frank²⁾ arbeitete mit der Präzipitinreaktion. Er hat Kaninchenplacenta, Nukleoproteide aus menschlicher Placenta, weiterhin mit fließendem Wasser und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene menschliche Placenten Kaninchen injiziert. Nur bei der letztgenannten Methode war eine positive Präzipitinreaktion erreichbar, welche aber nicht streng gegen die Placenta gerichtet war, sondern eine schwach menschliche gewesen ist.

Wenn wir diese Resultate überblicken, so ergibt sich, daß außer Hoden und Blutkörperchen auch mit anderen Organen eine Bordetsche Antikörperproduktion und Anaphylaxie auslösbar ist. Bei der Iso- und Autoantikörperproduktion scheint das Wichtigste der Umstand zu sein, den v. Dungern und Hirschfeld hervorheben, daß auch die körpereigenen Organextrakte für die Blutbahn blutfremd sind, und in diesem Sinne können alle beliebigen Organe auch eine Isoantikörperproduktion veranlassen. Sachs³⁾ hebt hervor, daß diese Antikörper mit Ausnahme der Linse und Geschlechtszellen keine strenge Organspezifität besitzen. Die Untersuchungen von Elschmig und Salus⁴⁾ zeigten, daß dem Chlorioidealpigment kein artspezifisches Verhalten eigen ist, doch bewiesen diese Untersuchungen nicht die strenge Organspezifität. Die Untersuchungsergebnisse von Halpern bezüglich der Autoantikörper ergaben ja auch weder ein strenges art- noch ein strenges organspezifisches Verhalten. Die Elschmigschen Untersuchungen hatten bewiesen, daß auch das Reinpigment dieselbe antigene Wirkung ausübt, wie die Aderhautaufschwemmung selbst. Ob nicht das Stroma der Chorioidealzellen ebenso wirkt, ist noch unentschieden.

Im Anschluß an die Elschmigsche Theorie versuchte Peters⁵⁾ die Gehörstörungen bei der sympathischen Ophthalmie ebenfalls mit Sensibilisierung des Pigments im Labyrinth zu erklären. Ferner berichten Arisawa und v. Szily⁶⁾ in einer kurzen Mitteilung über vergleichende Untersuchungen mit Hilfe der Präzipitation, Komplementbindung und Ana-

1) Ohkubo, diese Zeitschrift, Bd. 6, 1910, p. 176.

2) Frank, Centralbl. f. Gynäkol., 1907, p. 414; Journ. f. exp. Med., Bd. 4, 1907, p. 363.

3) Sachs, Kolle-Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg., 2. Aufl.

4) Elschmig und Salus, Arch. f. Ophthalm., Bd. 79, 4. Teil.

5) Peters, Klin. Monatsbl. f. Augenheilk., 1911, p. 433.

6) Arisawa und v. Szily, Bericht üb. d. Versamml. d. ophthalm. Gesellsch., Heidelberg 1912, p. 253.

phylaxie. Die Immunisierung mit Hammel- und Kalbuvea ergab eine deutliche Artspezifität und einen geringen Grad von Organspezifität. Die Immunisierung mit embryonaler Hühnerlinse und -uvea führte zur Bildung von Antikörpern, die in erster Linie artspezifisch waren. Erst mit der Uebernahme der Organfunktionen sollten organspezifische Eigenschaften auftreten. Die ausführliche Arbeit mit Protokollen steht noch aus. Wissmann¹⁾ konnte in 3 Fällen durch Zusammenbringen der Patientensera von verletzter und entzündeter Uvea bei der Präzipitinreaktion zweimal Niederschläge beobachten, dagegen war die Komplementbindung negativ. Weichardt und Kummell²⁾, sowie Kummell³⁾ benutzten die Epiphaninreaktion zum Studium dieser Frage. Weichardt und Kummell fanden, daß die Antikörper bei Kaninchen nach Immunisierung mit Rinderuvea positiv reagierten, wenn als Antigen Mensch-, Schwein-, Pferde-, Schaf- und Kaninchenuvea benutzt wurde. Die Sera der unvorbehandelten Tiere gaben nie positive Reaktion. In der ersten Mitteilung berichtet Kummell, daß 13 sympathische Sera positiv reagierten, dagegen war von 15 Kontrollfällen, wo kein Pigmentzerfall vorhanden war, die Reaktion nur in 2 Fällen, bei anderen 15 Kontrollfällen mit lädierter Uvea nur einmal positiv. In der zweiten Mitteilung berichtet Kummell über 9 sympathische und 10 Kontrollsera: in beiden Gruppen war die Reaktion in 30 Proz. der Fälle positiv. Bekanntlich sind sich die Autoren über den Wert der Epiphaninreaktion noch nicht einig, Korff-Petersen und Erinkmann bestreiten die Zuverlässigkeit der Reaktion. Aber wenn auch die Zuverlässigkeit der Reaktion außer Frage stünde, so würden diese Ergebnisse der Untersuchungen von Kummell keinesfalls für die von Elschnig aufgestellte Theorie sprechen. Kummell bemerkt zwar, daß man auch daran denken muß, daß die Anaphylaxie sich auch in cellulärer Form, wo keine freien Antikörper zirkulieren, gestalten kann.

Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, zu prüfen, ob die Aderhaut und die Hornhaut streng organspezifische Antikörper erzeugen oder nicht?

Die Resultate der Tierexperimente dürfen nicht ohne weiteres auf die menschliche Pathologie übertragen werden. Mit besonderer Vorsicht dürften wohl die mit artfremdem Material erhaltenen Resultate für die menschliche Pathologie verwertet werden. Darum haben wir alle Versuche mit art-eigenen Organextrakten angestellt. Voraussichtlich war es noch fraglich, ob eine eventuelle Organspezifität die Autoanaphylaxie im Sinne Elschnigs bestätigen kann.

1) Wissmann, Arch. f. Ophthalm., Bd. 80, 1912, p. 399.

2) Weichardt und Kummell, Münch. med. Wochenschr., 1911, No. 32.

3) Kummell, Arch. f. Ophthalm., Bd. 81, p. 488 und Bd. 84, 1913.

Versuchstechnik.

Die Immunisierung wurde bei Kaninchen mit arteigenen Organen ausgeführt. Die Vorbehandlung der Tiere war stets dieselbe. Alle Immunsera stammten von Tieren, die zusammen 6mal an aufeinanderfolgenden Tagen intravenös (Hornhaut und Aderhaut) oder subkutan (Niere) vorbehandelt waren. Nach einer Probeblutentnahme (am 9. Tage) wurden sämtliche Tiere am 19. Tage post ultimam injectionem entblutet. Die Sera wurden sofort abzentrifugiert, nachher $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° C Wasserbad inaktiviert, dann wurde 5-proz. Phenollösung zugesetzt, so daß eine 0,5-proz. Lösung resultierte. Die Sera wurden im Eisschrank aufbewahrt.

Die toxisch-kachektische Wirkung äußerte sich bei allen Organextrakttieren, besonders aber bei den Aderhauttieren, die teilweise frühzeitig eingegangen sind.

Zum Zwecke der Gewinnung des Chorioidealpigments wurde bei den Kaninchenaugen mit einer Schere beim Sehnerveneintritt in das Auge eingestochen, dann sofort der Bulbus in einem Meridian bis zum Limbus eröffnet. Nach Umstülpung des Bulbus entleert sich meistens der Glaskörper spontan. Nach Entfernung der Linse wurde die Netzhaut mit einer feinen Pinzette abgezogen, wobei immer peinlich darauf geachtet wurde, daß keine Partikel der Netzhaut zurückblieben. Nachher wurde die ganze Uvea mit einem kleinen Pinsel in physiologischer Kochsalzlösung langsam abgeschwemmt und in sterilem Mörser zerrieben. Dann wurde die ganze Pigment enthaltende Flüssigkeit im Vakuum eingetrocknet. Nach der Eintrocknung wurde mit einem Spatel das Pigment von der Glasschale abgekratzt und in physiologischer Kochsalzlösung (auf eine Uvea 1,5 ccm gerechnet) zerrieben. Während der Manipulation wurde auf die Erhaltung der Sterilität möglichst geachtet.

Bei Rinderaugen war das Vorgehen im wesentlichen das gleiche; nur nach Eröffnung des Auges wurde nur die Hinterfläche der Aderhaut und Iris abgeschwemmt.

Von den Hornhäuten wurde nur die Zentralpartie verwendet. Die Epithelschicht der Vorderfläche und Endothelschicht der Hinterfläche wurde abgeschabt, die so zurückgebliebene Substantia propria mit der Schere zerkleinert, dann ebenso im Vakuum eingetrocknet, zerrieben und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt (auf je ein Kaninchenhornhaut wurde 1 ccm physiologische Kochsalzlösung genommen).

Die Nieren wurden nach Tötung des normalen Tieres entfernt, entkapselt, fein zerschnitten, auf Gipsplatten ausgestrichen, nach der Eintrocknung im Vakuum trocken zerrieben und pulverisiert aufbewahrt. Die Lösungen wurden immer frisch hergestellt. Bei jeder Einspritzung wurde annähernd $\frac{1}{6}$ einer Niere subkutan eingespritzt.

Die Antigenlösungen erhielten einen Zusatz von 0,5 Proz. Phenol und wurden so im Eisschrank aufbewahrt.

Die intravenösen Einspritzungen wurden in die Randvene des Ohres ausgeführt. Zur Immunisierung wurden nur junge Kaninchen (von ca. 2000 g Gewicht) verwendet.

Komplementablenkungsreaktion.

Innerhalb jeden Versuchs wurde dasselbe Antigen verwendet, als Ambozeptor das durch Vorbehandlung mit den Organgewebe gewonnene Immunserum, als Komplement frisches Meerschweinchenserum, als hämolytischer Ambozeptor Antihammelblutserum von Kaninchen (doppelter Titer), als hämolytisches Antigen eine 5-proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen (2-fach sensibilisiert). Außer den in den Tabellen angeführten Kontrollen wurde noch in jedem Falle eine Kontrolle des Antigens und Serums allein ohne Komplement gemacht.

Der Grad der hemmenden Wirkung der Antigene wurde durch Verwendung fallender Antigenmengen untersucht. Die Antigene waren keine Lösungen, sondern nur möglichst gleichmäßige Aufschwemmungen. Die verwendeten drei Arten von Aufschwemmungen (Aderhaut, Hornhaut und Niere) enthalten normalerweise verschiedene Mengen von indifferentem Stroma, Blut usw.

Vor dem Zusatz des hämolytischen Systems kam die Mischung $\frac{1}{2}$ Stunde lang ins Wasserbad (37° C). Die Ablesung erfolgte nach 5, 10, 15 und 20 Minuten und schließlich nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank als definitiv.

Versuche über Organspezifität.**Versuch No. 1.**

Das Immunserum war durch intravenöse Aderhautaufschwemmung erzeugt.

Tabelle I¹⁾.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,1	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	1,0	—	—
Kaninchen-Hornhautemulsion	—	—	—	0,5	0,1	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—
Meersch.-Komplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,7	1,3	1,7	1,6	1,3	1,0	2,0	—

1) Es bedeuten in den Tabellen: k. = vollständige, uv. = unvollständige, Sp. = kaum bemerkbare Hämolyse und 0 = vollständige Hemmung der Hämolyse.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C												
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C												
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	k.	0	0	uv.
" " 10 "	0	0	0	0	Sp.	0	Sp.	k.	k.	Sp.	0	k.
" " 15 "	0	0	0	0	uv.	0	uv.	k.	k.	uv.	0	k.
" " 25 "	0	0	Sp.	0	k.	0	k.	k.	k.	uv.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors 1:1500.

Das Ergebnis der in Tabelle I wiedergegebenen Versuche ist folgendes: Niere und Hornhaut gaben in Mengen von 0,5 ccm eine vollständige Hemmung der Hämolyse, dagegen trat in Mengen von 0,1 ccm eine komplette Hämolyse ein. Das Antigen (1,0) gibt in großen Dosen auch eine unvollständige Hemmung.

Versuch No. 2.

Gleicherweise hergestelltes Isoimmunserum.

Tabelle II.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Kaninchen-Aderhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,3	0,1	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Hornhautemuls.	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—
Meersch.-Komplement(1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiol. Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,5	1,7	1,9	2,0	—
1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C														
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C														
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	k.	0	0	0	0	k.
" " 10 "	0	0	0	0	0	0	0	?	k.	Sp.	Sp.	Sp.	0	k.
" " 15 "	0	0	Sp.	0	0	0	0	uv.	k.	Sp.	Sp.	Sp.	0	k.
" " 25 "	0	0	Sp.	0	0	0	0	k.	k.	uv.	uv.	k.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	Sp.	0	0	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors 1:1500.

Aus Tabelle II geht hervor: Die Dosen von 0,5 und 0,3 ccm von verschiedenen Antigenen (Hornhaut, Aderhaut

und Niere) verhinderten vollständig die Hämolyse. Die gleiche Menge Antigen Aderhaut ohne Immunserum gibt eine komplette Hämolyse.

Es ergaben also die Versuche 1 und 2, daß nach Vorbehandlung von Kaninchen mit arteigener Aderhautaufschwemmung sich Antikörper bildeten, die bei der Verwendung von Aderhaut-, Hornhaut- und Nierenaufschwemmung als Antigen die Hämolyse verhinderten: d. h. die nach Immunisierung mit Aderhaut gebildeten Antikörper waren nicht spezifisch gegen die Aderhaut gerichtet. Die Frage der Artspezifität soll später erörtert werden.

Versuch No. 3.

Immunisoserum gewonnen durch Vorbehandlung mit Kaninchenniere.

Tabelle III.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,3	1,0	—	—
Kaninchen-Hornhautemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninch.-Nierenantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum A	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—
Meerschw.-Komplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,3	1,5	1,7	1,0	2,0	--
½ Stunde Wasserbad bei 37° C															
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C															
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp.	0	Sp.	0	Sp.	0	0
" " 10 "	0	0	0	0	0	0	0	0	uv.	Sp.	uv.	0	uv.	0	0
" " 15 "	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	k.	uv.	k.	Sp.	k.	0	0
" " 20 "	0	0	uv.	0	0	0	0	0	k.	k.	k.	uv.	k.	Sp.	0
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	uv.	0	0	0	0	0	k.	k.	k.	uv.	k.	Sp.	0

Titer des hämolytischen Ambozeptors 1:1300.

Die Mengen von 0,5 und 0,3 ccm Aderhaut-, Hornhaut- und Nierenaufschwemmung verursachten eine Hemmung, 0,1 ccm von der Nierenaufschwemmung eine vollständige Hämolyse. Größere Dosen Antigen 1,0 ccm können schon ohne Zusatz von Immunserum hemmend wirken.

Versuch No. 4.

Immunserum ebenso gewonnen wie bei Versuch 3.

Tabelle IV.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Kaninchen-Nierenemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,3	0,1	1,0	—	—
Kaninchen-Hornhautemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Nierenantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum A	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—	—
" " B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meersch.-Komplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,3	1,5	1,7	1,9	1,0	2,0	—

1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C.

Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Wasserbad bei 37° C.

Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	k.	0	Sp.	0	Sp.	uv.	0	0	k.
" " 10 "	0	0	uv.	0	Sp.	0	0	k.	Sp.	Sp.	0	Sp.	k.	0	0	k.
" " 14 "	0	0	k.	0	uv.	0	0	k.	Sp.	k.	Sp.	uv.	k.	0	0	k.
" " 20 "	0	0	k.	0	k.	0	Sp.	k.	k.	k.	uv.	k.	k.	Sp.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	k.	0	k.	0	Sp.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	Sp.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors 1:1300.

Aus Tabelle IV geht hervor, daß die Niere (homologes Antigen) noch in Dosen 0,3 ccm, Hornhaut und Aderhaut dagegen nur in Mengen von 0,5 ccm hemmte. Auch hier zeigte sich, daß die Antigene in großen Mengen 1,0 ccm allein schon hemmen.

Die Versuche 3 und 4 zeigen also, daß nach subkutaner Vorbehandlung mit arteigener Nierenaufschwemmung sich Isoantikörper bildeten, die nicht nur mit Kaninchenniere als Antigen, sondern auch mit Kaninchenhornhaut und Kaninchenaderhaut in hämolytischem Versuch das Komplement binden. Das Antigen hemmte ohne Immunserum nur in großen Mengen.

Versuch No. 5.

Immunserum, gewonnen durch intravenöse Vorbehandlung mit arteigener Hornhautaufschwemmung.

Tabelle V.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Kaninchen-Hornhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,3	0,1	1,0	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Hornhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum A	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,3	1,3	1,5	1,6	1,3	1,3	1,5	1,7	1,9	1,0	2,0	—
½ Stunde Wasserbad bei 37° C																
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C																
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	uv.	0	0	0	0	k.	0	0	Sp.	Sp.	Sp.	0	0	k.
„ „ 10 „	0	0	uv.	0	0	0	0	k.	0	uv.	k.	k.	k.	Sp.	0	k.
„ „ 15 „	0	0	k.	0	0	0	0	k.	Sp.	k.	k.	k.	k.	Sp.	0	k.
„ „ 20 „	0	0	k.	0	0	0	0	k.	uv.	k.	k.	k.	k.	uv.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	k.	0	0	0	0	k.	uv.	k.	k.	k.	k.	uv.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1200.

Man ersieht aus Tabelle V, daß 0,5 ccm und 0,3 ccm der verschiedenen Antigene in gleicher Weise eine vollständige Hemmung verursachten. 0,1 ccm der Hornhautaufschwemmung konnte die Hämolyse nicht verhindern. Hornhautantigen ohne Immunserum ergab noch in kleineren Mengen als 1,0 ccm eine komplette Hämolyse.

Versuch No. 6.

Auf gleiche Weise gewonnenes Hornhautimmunserum wie bei Versuch No. 5.

Tabelle VI.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kaninchen-Hornhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,3	0,1	1,0	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Hornhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,3	1,3	1,5	1,6	1,3	1,3	1,5	1,7	1,9	1,0	2,0

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$\frac{1}{2}$ Stunde Wasserbad bei 37° C															
Hämolytischer Ambozeptor Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 38° C.															
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	k.
„ „ 10 „	0	0	Sp.	0	0	0	0	uv.	uv.	Sp.	Sp.	Sp.	0	0	k.
„ „ 15 „	0	0	k.	0	0	0	0	k.	k.	uv.	k.	k.	0	0	k.
„ „ 20 „	0	0	k.	0	Sp.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	Sp.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	k.	0	Sp.	0	Sp.	k.	k.	k.	k.	k.	Sp.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1200.

0,1 ccm Hornhautantigen löste die Blutkörperchen. Dagegen hemmte Hornhautantigen in Mengen von 0,5 ccm und 0,3 ccm vollständig die Hämolyse, ebenso 0,5 ccm des Nieren- und Aderhautantigen; in Mengen von 0,3 ccm waren bei den zwei letzteren Antigenen Spuren von Hämolyse sichtbar. Das Antigen allein verursachte in Mengen unter 1,0 ccm komplette Lösung.

Versuch No. 7.

Hornhautantiserum, in gleicher Weise hergestellt wie bei Versuch No. 5 und 6.

Tabelle VII.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kaninchen-Hornhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,3	0,1	1,5	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Hornhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,5	1,7	1,9	0,5	2,0	—
$\frac{1}{2}$ Stunde Wasserbad bei 37° C															
Hämolytischer Ambozeptor Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C															
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	0	0
„ „ 10 „	0	0	0	0	0	0	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	0	0
„ „ 15 „	0	0	0	0	0	0	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	0	0
„ „ 20 „	0	0	0	0	0	0	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	0	0
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	0	Sp.	Sp.	0	Sp.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	0	0

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1400.

Nur nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank zeigten die Antigene Niere: (0,5 und 0,3 ccm) und Aderhaut (0,5 ccm) Spuren einer Hämolyse. Hornhaut als Antigen hemmte mit Isoimmunserum in allen verwendeten Mengen; dagegen war ohne Immunserum und mit Normalserum die Lösung immer eine komplette.

Es zeigen also die Versuche No. 5, 6 und 7, daß die nach Vorbehandlung mit intravenöser Einspritzung von arteigener Hornhautaufschwemmung auftretenden Antikörper auch mit Nieren- und Aderhautaufschwemmung als Antigenen die Hämolyse vollständig hemmen. Es war also keine Organspezifität vorhanden.

Versuch No. 8 und 9.

In den bisherigen Versuchen wurde als Kontrolle immer frisches normales Kaninchenserum verwendet. In Versuch 8 und 9 wurde altes normales Kaninchenserum benutzt.

Versuch 8. Dasselbe Antiserum wie bei Versuch 2.

Tabelle VIII.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kaninchen-Aderhautemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,3	0,1	1,0	—	—
Kaninchen-Nierenemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Hornhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,0	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,5	1,7	1,9	1,0	2,0	—
1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C.															
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasserbad bei 37° C															
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	uv.	uv.	uv.	0	0	k.
„ „ 10 „	0	0	0	0	0	0	0	uv.	0	uv.	uv.	uv.	0	0	k.
„ „ 15 „	0	0	0	0	0	0	0	k.	0	k.	k.	k.	Sp.	0	k.
„ „ 20 „	0	0	0	0	0	0	0	k.	0	k.	k.	k.	uv.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	0	0	Sp.	0	0	k.	Sp.	k.	k.	k.	uv.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1200.

Versuch 9. Dasselbe Antiserum wie bei Versuch 4.

Tabelle IX.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kaninchen-Nierenemulsion	0,5	0,3	0,1	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,3	0,1	1,0	—	—
Kaninchen-Hornhautemulsion	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautemulsion	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Nierenantiser.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum (das- selbe wie in Tabelle VIII)	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Meersch.-Komplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,7	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	1,3	1,5	1,7	1,9	1,0	2,0	—

¹/₂ Stunde Wasserbad bei 37° C

Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Wasserbad bei 37° C

Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp.	Sp.	0	0	k.
" " 10 "	0	0	0	0	0	0	0	uv.	0	Sp.	uv.	uv.	0	0	k.
" " 15 "	0	0	Sp.	0	0	0	0	k.	0	uv.	k.	k.	Sp.	0	k.
" " 20 "	0	0	uv.	0	Sp.	0	0	k.	0	k.	k.	k.	uv.	0	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	uv.	Sp.	Sp.	0	Sp.	k.	0	k.	k.	k.	uv.	0	k.

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1200.

Es zeigte sich in beiden Versuchen, daß altes Normalserum mit Antigen die Hämolyse auch verhindern kann: diese Hemmung ist aber ganz unspezifisch, denn sie tritt bei Verwendung von Nierenaufschwemmung als Antigen ebenso auf wie bei Verwendung von Aderhautaufschwemmung.

Versuche über Artspezifität.

Versuch No. 10.

In dieser Serie wurden die Kaninchen-Immunsere von Versuch 1—7 mit heterologen Antigenen zusammengebracht.

Ferner wurde untersucht, ob diese Immunsere mit Kaninchenlinsen-Aufschwemmung als Antigen, welche nach den Untersuchungen von Uhlenhuth organspezifisch ist, hemmen.

Tabelle X.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Rinder-Hornhautemulsion	0,5	0,3	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5	0,3	—
Rinder-Aderhautemulsion	—	—	0,5	0,3	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5
Kaninchen-Linsenemulsion	—	—	—	—	0,5	—	—	—	—	—	—	0,5	—	—	—
Kaninch.-Hornhautantiserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2
Meerschweinchenkomplement (1 : 10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,3	1,5	1,3	2,0	—	1,3	1,5	1,0	1,5	1,3	1,3	1,5	1,3
Arteigenes Kaninchen-Nieren- serum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Anmerkungen	Serum von Versuch I							Serum von Versuch II							
	1/2 Stunde Wasserbad bei 27° C														
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Wasserbad bei 37° C														
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	k.	0	0	0	0	0	0	Sp.	Sp.
„ „ 10 „	0	0	0	0	0	0	k.	0	0	0	0	0	Sp.	Sp.	uv.
„ „ 15 „	0	0	0	0	Sp.	0	k.	0	0	0	0	0	Sp.	k.	k.
„ „ 20 „	0	Sp.	0	0	uv.	0	k.	0	0	0	0	0	uv.	k.	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	Sp.	0	0	uv.	0	k.	0	0	0	0	0	uv.	k.	k.

Röhrchen	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Rinder-Hornhautemulsion	0,5	0,3	—	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5	0,3	—
Rinder-Aderhautemulsion	—	—	0,5	0,3	—	0,3	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5
Kaninchen-Linsenemulsion	—	—	—	—	0,5	—	0,5	0,3	—	—	—	—	0,5	—	—	—
Kaninch.-Hornhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1 : 10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,3	1,5	1,3	1,3	1,5	1,3	1,3	1,5	1,3	1,5	1,3	1,5	1,7	1,5
Arteigenes Kaninchen-Nieren- serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anmerkungen	Serum von Versuch III								Serum von Versuch IV							
	1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C															
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Wasserbad bei 37° C															
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	Sp.	Sp.	Sp.	0
„ „ 10 „	0	0	0	0	Sp.	0	Sp.	uv.	0	0	0	0	uv.	uv.	uv.	Sp.
„ „ 15 „	0	0	0	0	uv.	Sp.	uv.	k.	0	uv.	0	0	k.	uv.	k.	uv.
„ „ 20 „	0	0	0	Sp.	uv.	k.	k.	k.	0	k.	0	0	k.	k.	k.	k.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	Sp.	0	Sp.	uv.	k.	k.	k.	0	k.	0	0	k.	k.	k.	k.

Röhrchen	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Rinder-Hornhautemulsion	0,5	0,3	—	—	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—
Rinder-Aderhautemulsion	—	—	0,5	0,3	—	0,3	—	—	—	0,5	0,3	—	—	—	0,5	0,3	—
Kaninchen-Linsenemulsion	—	—	—	—	0,5	—	0,5	—	—	—	—	0,5	—	—	—	—	0,5
Kaninch.-Hornhautantiserum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen-Aderhautantiserum	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Normales Kaninchenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Meerschweinchenkomplement (1:10)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Physiologische Kochsalzlösung	1,3	1,5	1,3	1,5	1,3	1,7	1,5	1,3	1,5	1,3	1,5	1,0	1,5	1,3	1,5	1,3	1,5
Arteigenes Kaninchen-Nierenserum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anmerkungen	Serum von Versuch V							Ser. v. Vers. VI					Ser. v. Vers. VII				
	1/2 Stunde Wasserbad bei 37° C																
Hämolytischer Ambozeptor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hammelblut, 5-proz.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Wasserbad bei 37° C																
Hämolyse nach 5 Minuten	0	0	0	0	0	Sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" " 10 "	0	0	0	0	0	uv.	Sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp.
" " 15 "	0	0	0	0	Sp.	k.	uv.	0	0	0	Sp.	Sp.	0	0	0	0	Sp.
" " 20 "	0	0	0	0	uv.	k.	k.	0	Sp.	0	uv.	uv.	0	0	0	0	uv.
Hämolyse nach 24-stündigem Aufenthalt im Eisschrank	0	0	0	Sp.	uv.	k.	k.	0	Sp.	0	uv.	uv.	0	0	0	0	uv.

Titer des hämolytischen Ambozeptors: 1:1600.

Beim Ueberblicken der Tabelle sieht man, daß die Immunsera mit heterologen Antigenen (Rinderhornhaut und Rinderaderhaut) ebenso die Hämolyse verhinderten wie mit den homologen Antigenen. Nur bei dem Serum von Versuch 4 stellte sich bei 0,3 ccm Hornhautaufschwemmung eine komplette Lösung ein, im übrigen waren nur Spuren einer Hämolyse sichtbar.

Eine gewisse Sonderstellung war nur bei Verwendung arteigener Linsen aufschwemmung als Antigen erkennbar; diese ergab in größeren Mengen (0,5 ccm) regelmäßig eine allerdings meist unvollständige Lösung der Hammelblutkörperchen.

Unsere Versuche zeigten also, daß die Isoantikörper, welche nach Vorbehandlung mit arteigener Aderhaut aufschwemmung und Hornhaut aufschwemmung auftreten, bei Verwendung verschiedener Antigene (Aderhaut, Hornhaut und Niere) die Hämolyse in gleicher Weise hemmen. Ebenso trat eine Hemmung der Hämolyse ein, wenn die Isoantikörper der Niere mit Aderhaut- und Hornhaut aufschwemmung als

Antigen zusammengebracht wurden. Die Resultate waren bei Verwendung von artfremden Antigenen (Aderhaut und Hornhaut) die gleichen. Nur die arteigene Linsenaufschwemmung nimmt eine gewisse Sonderstellung ein, insofern sie in keinem Falle eine vollständige Hemmung der Hämolyse verursachte.

Die Grundlage der Elschnigschen Auffassung, das nicht art-, sondern organspezifische Verhalten der Uvea- und Hornhaut-Antikörper, konnte nicht bestätigt werden. Diese Antikörper sind nicht art-, aber auch nicht organspezifisch.

Es sollen die klinischen Einwände gegen die Elschnigsche Theorie der sympathischen Ophthalmie an dieser Stelle nicht berücksichtigt werden. Es möge nur erwähnt werden, daß von klinischer Seite auf die Unhaltbarkeit der von Elschnig beschriebenen Indikanurie bei der sympathischen Ophthalmie schon früher von E. v. Hippel¹⁾, Stuelp²⁾ u. a. hingewiesen wurde. E. v. Hippel stellte auch die Frage, warum z. B. eine Pigmentzerstörung der Uvea (verschiedene Formen von Chorioiditis mit Pigmentzerfall) nicht zu einer sympathischen Erkrankung des zweiten Auges führt, wenn eine Autoanaphylaxie durch das Resorbieren des Pigmentes stattfindet und wenn die entstandenen Antikörper eine organspezifische Wirkung ausüben.

Zusammenfassung.

Die Isoantikörper nach Immunisierung mit arteigener Aderhaut ergaben außer mit Aderhaut- auch mit Hornhaut- und Nierenaufschwemmungen als Antigenen eine vollständige Hemmung der Hämolyse. Aehnlich war das Verhalten der Hornhaut- und Nieren-Antisera.

Die bei Kaninchen erzeugten Aderhaut-Antisera gaben auch mit heterologen Antigenen (Rinderhornhaut und Rinderaderhaut) eine Komplementbindung.

Es ergibt sich daraus, daß die nach Immunisierung mit arteigenen Hornhaut-, Aderhaut- und Nierenaufschwemmungen gebildeten Isoantikörper nicht art- und nicht organspezifisch sind.

1) E. v. Hippel, Arch. f. Ophthalm., Bd. 79, p. 451.

2) Stuelp, Arch. f. Ophthalm., Bd. 80, 1912, p. 548.

Nachdruck verboten.

[From the Pathological Laboratory of the University of Chicago.]

Nucleo-Proteins as Antigens.

By Prof. Dr. H. Gideon Wells.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. August 1913.)

The literature of immunology contains numerous references to the antigenic properties of nucleo-proteins. These fall into two chief groups: One, and with the largest literature, concerns the use of "nucleoproteins" derived from bacteria, the work having been done chiefly in Italy and recently reviewed in full by Lustig¹). The other concerns the use of nucleo-proteins derived from tissue cells, one of the chief exponents of which is Beebe of New York. In either case, the basis for the selection of nucleo-proteins is frequently stated by the various investigators, to rest upon the idea that the nucleo-proteins are the most specific of the cell constituents, as compared with the other proteins of the cell substance. So far as I can learn, however, this is pure assumption. There seems to be no evidence that nucleo-proteins of different cells of the same animal differ more from one another than the other proteins of those cells. To be sure, the nucleus is a vitally important part of the cell, as these authors argue, but it does not necessarily follow that the proteins of the nucleus are more differentiated than those of the cytoplasm. Furthermore, we do not know what proportion of a given nucleus is nucleo-protein, nor whether the nucleo-protein is either more important or more characteristic chemically than other constituents of the nucleus. Again, we do not know how much of the cytoplasmic structure outside the nucleus is nucleo-protein.

Hammarsten holds that there is a considerable proportion of nucleo-protein in the extra-nuclear structure of cells, and Corper²) has made the

1) Kolle und Wassermann, Handb. d. Mikrobiol., Bd, 2, 1913, p. 1362.

2) Journ. ex. Med., Vol. 15, 1912, p. 429.

suggestive observation that in cells undergoing autolysis, when all stainable nuclear elements are gone, there still remains some 72 % of the nucleins in an intact form, as shown by the fact that their purine content is still in an insoluble or coagulable form.

This indicates that there is a large discrepancy between the chromatin of the cytologist and the nucleo-protein of the chemist, although they are commonly referred to as if practically identical.

The chief criticism of the published work in this field, however, is in respect to the nature of the substances used under the name of "nucleo-proteins". Inspection of the literature summarized in the table shows that the material has been obtained according to Woolridge's method for isolating nucleo-proteins, or some modification thereof. This method is delightfully simple, at least in principle. It consists essentially in an extraction of finely divided tissues with distilled water, filtration, and then acidifying slightly, usually with acetic acid; a flocculent precipitate is now obtained which is labelled "nucleo-protein", used as such, and the results interpreted accordingly. If further refinement of the material is desired, which has not seemed necessary to many investigators, this is accomplished by redissolving the precipitate with weak alkali and reprecipitating with acetic acid, as often as thought necessary. Commonly, to facilitate extraction, the solvent is made slightly alkaline, and for obtaining the „nucleo-proteins“ of bacteria the Italians have commonly used solutions made strongly enough alkaline to disintegrate the bacterial membranes, i. e. 1 % KOH, or even stronger solutions.

The assumption that this precipitate represents pure nucleo-protein may well be questioned. Cells extracted with an alkaline solution would certainly yield a multitude of substances, many of which would be precipitated with acids. Not only would nucleo-proteins and nucleins be present in such a solution, but also mucin (which is said to be universally present as an intercellular cement), "nucleoalbumins", probably various glycoproteins besides the mucins, simple globulins and albumins, and alkali albumenate formed by the action of the alkali upon the native proteins. With slight acidification all these, with the exception of simple albumin, might be pre-

cipitated more or less completely, and such a mixture, together, probably, with many other undetermined cell constituents, would constitute the material which many investigators have called "nucleo-proteins".

It is indeed striking to observe the almost total lack of chemical control of the material used in work this sort. In his compilation of the literature, for example, Lustig merely states that hydrolysis of the "bacterial nucleo-proteins" with sulphuric acid causes a splitting off of purines, identified by precipitation with ammoniacal silver nitrate, copper sulphate etc., but gives no quantitative estimations as to how much of the material the purines constitute. This omission is important, since quantitative estimates of the phosphorus in bacterial nucleo-protein are said by him to show but 0.028 to 0.043 % of this element, whereas the best identified nucleo-proteins yield 0.5 to 1.6 % phosphorus (Hammarsten).

These figures would indicate, therefore, that the so-called bacterial nucleo-protein is in but a small part, at most, composed of true nucleo-proteins.

However, Galeotti¹⁾, in his original article¹⁾, which seems to be the foundation of the subsequent work on bacterial nucleo-proteins, reports finding 1.01—1.83 % of phosphorus, in his preparations, which agrees with the usual findings for nucleo-proteins, although the nitrogen content he gives is strikingly low. He describes only qualitative tests for purines, and found evidence of their presence. The only quantitative estimation of the purines of bacterial nucleoproteins of which I can find record is reported by Nishimura²⁾, who found 0.17 % of xanthine, 0.14 % guanine and 0.08 % adenine; but the value of these figures obtained by methods of twenty years ago, is open to question. Levene³⁾ has found thymine and uracil in the nucleic acid of tubercle bacilli, but made no study of their quantitative relations nor of the purines.

As for extractions made with distilled water or physiological salt solution, these can contain only such nucleo-proteins as are bound to bases, for the free nucleo-proteins are insoluble in water or weak salt solutions; and, for the same reason, such an extract will consist of much the same material as the alkaline extracts but in lower concentration.

Even if by repeated solution and reprecipitation a purification of the material is sought, it is extremely doubtful if anything like a pure nucleoprotein will be obtained. In the

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 25, 1898, p. 48.

2) Arch. f. Hyg., Bd. 18, 1893, p. 318.

3) Journ. med. Res., Vol. 12, 1904, p. 256.

first place, the various substances enumerated above will behave much the same as the nucleoproteins and accompany them in greater or less amount as long as the purification is continued. Secondly, the action of the acid and alkali will undoubtedly greatly alter the character of the original nucleoprotein, chiefly by denaturalizing the proteins so that they become insoluble, leaving the nucleins and nucleic acid in increasingly large proportions.

But most important of all is the question of the nature of the nucleoproteins themselves. The substances which have been isolated and designated under this title are, undoubtedly, salts of protein and nucleic acids. As pointed out by Osborne and Harris¹⁾, the nucleic acids are multibasic, e. g. salmon and wheat nucleic acid are 6-basic, so that they can unite with from one to six molecules of protein, which might be all either the same or different. Furthermore, as all protein molecules have the ability to unite with several acid radicals, the possible complexity is increased. It seems probable, therefore, that in the living cell the nucleic acids must exist bound to protein molecules, but that these compounds are the same as those which are precipitated from either neutral or alkaline extracts of the cells or tissues, is highly doubtful, a fact universally recognized by physiological chemists. With an abundance of proteins of all sorts and conditions present in such extracts and in view of the easy dissociation of the compounds of nucleic acid and proteins, it is to be supposed that the nature and proportion of the protein which is thrown down with the nucleic acid will depend entirely upon the conditions existing at the time. Variations in the concentration and character of the proteins, in the proportion of nucleic acid, of the concentration of salts and other solutes, of the degree of acidity and alkalinity of the solution, and perhaps even of the temperature, will all serve to cause variations in the composition of the precipitate which contains the nucleic acid. If the precipitation is repeated, more and more of the protein becomes insoluble in the form of albuminates, while the resulting material (as shown by Bang)²⁾ becomes richer

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 36, 1902, p. 122.

2) Hofmeisters Beitr., Bd. 4, 1904, p. 115.

and richer in phosphorus, until it becomes of the same character as the "nucleins" which are formed by peptic digestion of nucleoproteins or of tissues containing them.

Neither is there any evidence that the nucleoproteins have for their protein elements any special and characteristic sort of proteins. Osborne and Harris state that nucleic acids may combine with simple albumin and globulins, and that the resulting compounds behave as do the corresponding proteins when combined with any acids. They also say:

„Ob alle die vielen Nucleoproteide, die aus den verschiedensten Zellen und Geweben erhalten worden sind, nukleinsaures Eiweiß sind, kann natürlich ohne besondere Untersuchung der einzelnen Substanzen nicht entschieden werden, aber es ist durchaus nicht unwahrscheinlich, daß es so ist, und es ist sehr wohl möglich, daß die Nucleinsäure in der Zelle in salzähnlicher Bindung vorkommt. Der Mangel an Uebereinstimmung in der Zusammensetzung der vielen Präparate, die von den verschiedenen Untersuchern erhalten worden sind, besonders die großen Schwankungen im Phosphorgehalt, weisen deutlich auf solchen Zusammenhang hin. Wenn dem so ist, so müssen die aus den Zellen isolierten Produkte nicht auch notwendigerweise innerhalb der Zelle existieren, denn die Verhältnisse, in welchen Eiweiß und Nucleinsäure sich miteinander verbinden, hängen von den jeweils gegebenen Umständen ab. Da diese Bedingungen nun während des Lebens fortwährend wechseln, so muß sich auch das nukleinsaure Eiweiß in einem fortwährenden Wechsel befinden, und hierauf beruht zweifellos zu einem großen Teil ihre hervorragende physiologische Bedeutung. Die große Basizität der Nucleinsäure macht es möglich, daß sie eine Menge chemisch verschiedener Produkte bildet, indem sie viele verschiedene Salze nicht nur mit einem und demselben Eiweißkörper, sondern mit allen basischen Körpern liefert, ebensowohl als komplizierte Salze mit verschiedenen gerade vorhandenen Basen.“

„Uns scheint die Bildung von Nuclein sehr leicht erklärbar, wenn man die Beziehung von Eiweiß zu Säuren ins Auge faßt. Die Eiweißkörper vereinigen sich mit kleinen Mengen Säure zu Salzen, in denen das Eiweißmolekül seine ursprünglichen Eigenschaften unverändert beibehält. Da die Nucleine immer aus Lösungen erhalten werden, die relativ reich an Säure sind, so ist es sehr wahrscheinlich, daß die Säurekapazität des Eiweißes dadurch stark vermehrt wird, und folglich verbindet sich jedes Molekül mit mehreren der Nucleinsäure und bildet so die als Nucleine bekannten Verbindungen. Nichts schließt bei dieser Betrachtung die Möglichkeit aus, daß die Nucleinsäure auch in einer anderen Bindungsform als Salz in der Zelle vorkommt. Es ist sehr wohl möglich, daß auch Ester vorkommen, aber dies ist bisher noch nicht bewiesen.“

Realizing the uncertainty of the material furnished by "isolated nucleoproteins", **A b d e r h a l d e n** and **K a s h i**

wado¹⁾ have gone back to the entire thymus cell to investigate the nucleoproteins.

They found the phosphorus compound to be in a very labile state, simple boiling in water causing a considerable proportion of the phosphorus to be split off as inorganic phosphates or phosphoric acid, which "es erklärlich erscheinen läßt, weshalb Nucleoproteide unter Umständen einen verschieden hohen Gehalt an Phosphor je nach der Darstellungsart enthalten können". They question the prevailing idea that by simple cleavage of nucleoproteins "nucleins" and proteins are separated, and believe that the process is more complicated, the phosphoric acid apparently acting as the binding substance between different components.

From these considerations of the nature of nucleoproteins it seems evident that we have to deal with three sorts of substances, as regards immunity reactions. One, the nucleic acid itself, which is non-protein, practically a glucoside in fact; the nucleins, which are compounds of doubtful character, but which seem to consist of nucleic acid bound firmly to proteins, especially to the most basic of the proteins, the histones, and sometimes, perhaps, to protamines; third, the nucleoproteins, which would seem to be very indefinite and loose compounds of any or all the proteins of the cell with either nucleic acid itself, or with the nucleins.

Obviously, if the nucleoproteins as such are considered, we are dealing with artificial substances which are of most uncertain and doubtful character, probably never alike in any two different preparations, and owing their antigenic character chiefly if not entirely to the abundant and loosely bound proteins. To ascribe to these mixtures any particular cell- or organ-specificity would seem to be preposterous, for they must react as do the proteins they contain, in so far as these proteins have not been denaturalized by manipulation. That any particular protein is specifically combined with nucleic acid to form nucleoproteins there is no evidence whatever, but, on the contrary, there is evidence that many sorts of proteins may be thus united; undoubtedly this is the case in the living cell.

Perhaps the nearest thing we have to definite protein-nucleic acid compounds are the protamin and histon nucle-

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 81, 1912, p. 285.

nates. On account of the high content of diamino acids in protamines and histones they are strongly basic, and therefore should be particularly firmly bound by such a polyatomic acid as nucleic acid, and some at least of the nucleins are of this nature. Therefore, the question arises — can a compound of nucleic acid and a histon or a protamin exist, which possess specific antigenic properties, characteristic of the cell from which they are derived?

Nucleic acid, containing no protein, would not be expected to act as antigen.

To be sure, Ford claims that by immunizing with a hemolytic glucoside from *Amanita* he obtains specific antisera, but beyond this the evidence in favor of any antigenic action by other than protein molecules is far from strong. I have prepared sodium nucleinate from the sperm of the cod, and found that guinea pigs injected with this material were not sensitized so the same nucleinate nor yet to the albumin of the cod sperm¹). A. E. Taylor also was unable to obtain any evidence of the formation of a cytolytic immune body by injecting rabbits with nucleic acid prepared from the sperm of salmon²). Abderhalden and Kashiwado³) also failed to secure anaphylactic reactions with nucleic acid from thymus nucleoproteins.

These are all the experiments with which I am familiar concerning the antigenic action of nucleic acid, but, in view of the improbability of positive results being obtained with substances of this chemical character it is doubtful if further work along this line is required.

As to the histones, I have found that the "Gadus histone" of Kossel and Kutscher, prepared from cod sperm, is of itself highly toxic, and that its toxicity is not decreased by heating at 56° for 30 minutes; however, guinea-pigs previously injected with this histone showed no increased sensitivity to a second injection. Likewise Taylor⁴) found no evidence of the formation of a cytolytic antibody in rabbits immunized with the protamine of salmon sperm, although immunization with entire sperm produces an antibody.

Schittenhelm and Weichardt⁴) have recently called attention to the fact that a toxic histon becomes non-toxic when united with nucleic

1) Journ. infect. Dis., Vol. 9, 1911, p. 166.

2) Journ. Biol. Chem., Vol. 5, 1908, p. 311.

3) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 81, 1912, p. 285.

4) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther., Bd. 11, 1912, p. 69; Münch. med. Wochenschr., Bd. 59, 1912, p. 67.

acid to form nucleohistone, as is also the case when toxic globin is combined in the form of hemoglobin. Gay and Robertson¹⁾ who found that the protamin salmin is highly toxic, and that this toxicity is removed by union of the salmin with casein, also found that salmin has no antigenic power as tested by the complement fixation test, and that it did not alter the specificity or antigenic power of casein to which it is bound. Likewise they found the histon globin to be non-antigenic, both as regards anaphylaxis and complement fixation, and globin caseinate showed no properties other than those of casein, except that globin-caseinate antiserum gives a fixation reaction with globin²⁾.

If, then, histones, protamines and nucleic acid are not antigenic, it is not to be expected that nucleins composed of these radicals will be antigenic, and, according to the best evidence that I can obtain, this is the case. Preparations after Woolridges method, but reprecipitated several times, consist practically of nucleins, the albumin being denaturated and removed in insoluble form by the manipulation involved in purification. Such preparations have been repeatedly tested in my laboratory, and found to be incapable of causing anaphylactic reactions in guinea pigs, but if the original first precipitates which are rich in proteins are used, strong reactions will be obtained. Even the most carefully purified preparations will however, in large doses sensitize to the serum of the animal from which the nucleoprotein is derived, indicating that a certain amount of serum protein or equivalent tissue protein is still present in our preparations.

From these observations it would seem that the antigenic properties of nucleoprotein preparations depend simply upon the proteins which may be present in these preparations, and which are not in any sense a characteristic integral part of a definite substance, nucleoprotein, but rather an adventitious impurity, the character and amount depending entirely upon the method, used in preparation. Such a conception serves best to harmonize the highly discordant results recorded in the literature. Thus, the strong antigenic properties of the bacterial "nucleoproteins" presumably depend upon the fact that preparations made as these are made, probably contain large proportions of the entire protein make up of the bac-

1) Journ. Exper. Med., Vol. 16, 1912, p. 479.

2) Journ. Exper. Med., Vol. 17, 1913, p. 535.

teria and preserve the species specificity of the bacteria in large measure. To call these bacterial preparations "nucleo-proteins", however, seems to be of doubtful justification from a chemical standpoint. With "nucleoproteins" of animal origin (see Table) we have on the one hand the reports of Beebe, Guerrini, and others, which indicate a high degree of tissue specificity, but with the admission by Beebe that the antigenic power is low, since but a very small proportion of the immunized animals develop active antisera. Most surprising are the results of Guerrini, who claims that by the anaphylaxis reaction nucleoproteins of the liver can be sharply differentiated from nucleoproteins of the spleen of the same animal. On the other hand, we find that Pearce and his associates, who have evidently done careful work, could demonstrate no organ specificity whatever for the "nucleoproteins" of animal tissues, although they did find them antigenic. Their conclusions are given in the following words:

"1. The sera of rabbits injected repeatedly with the nucleoproteins, globulins, and albumins of the liver and kidney of the dog, give evidence with in vitro or in vivo experiments of organ affinity. The precipitin test offers no proof of the specificity of these sera for the proteins employed as antigens.

2. The anaphylaxis reaction applied to the same proteins indicates a slight relative organ affinity but no specificity as far as the respective protein fractions are concerned. The relative organ affinity resides, rather, in the globulin and albumin fractions than in the nucleoprotein fraction. Dog serum used both as a sensitizing and an intoxicating agent gives rise to very active cross reactions with organ proteins, thus failing to support the theory of organ or of protein specificity.

3. These results do not support the view put forward that nucleoproteins play an important part in the course of production of cytotoxic immune sera."

My own experience with materials of this class is entirely in accord with that of Pearce as far as the so-called nucleoproteins are concerned. That is, the earlier precipitates, which contain nucleins and proteins, whether bound to one another or not we do not know, are unquestionably antigenic, but the antibodies which they engender are not definitely specific for this "nucleo-protein", nor even for the organ from which the material is derived, although, so far as tested, species specificity is evident. As we repeat the purification, removing more

and more of the proteins and approaching more and more the pure nucleins, our preparations lose the power of inciting anaphylactic shock in guinea pigs sensitized with these nucleins or with serum; however, if used in sufficient doses these purified nucleins will sensitize guinea pigs to the homologous serum and to tissue albumin or globulin, showing that they still contain traces of antigenic protein which is species specific but not organ or protein specific. In this purification the power to cause anaphylaxis reactions is lost before the antigenic power demonstrable by precipitin and complement fixation reactions, in spite of the fact that the protein element of nucleins is rich in the diamino acids which are supposedly the source of intoxication in anaphylaxis¹). This loss of antigenic power is to be expected, however, since neither of the components of nucleins — histone or protamine and nucleic acid, — possesses antigenic potentialities.

A series of experiments in this laboratory by G. C. Lake²) has shown that even when nucleoproteins or nucleins have lost their power of causing anaphylactic reactions, they may still be able to cause the development of precipitins and complement-fixing antibodies. These antibodies are not, however, specific for the nucleins or nucleoproteins, but react with isolated globulin and albumin of the same organ, as well as with the serum of the same species, and without even any quantitative difference in favor of the homologous nucleoprotein.

Summary of Statements in Literature concerning Biological Reactions with "Nucleoproteins" and "Nucleins".

Author	Material	Antigenic property	Specificity	Remarks
1. Ide and Malengreau (1902)	Nuclein, Thymus, Calves	0		
2. Marrassini (1903)	Nucleoprotein, rabbit liver	+ in vivo, cytotoxic	not specific	
3. Bierry and Pettit (1904)	Nucleoprotein dog kidney dog liver	cytotoxic in vivo	anti-liver serum had no effect on kidney	No tests in vitro

1) See Wohlgenuth, *Zeitschr. physiol. Chem.*, Bd. 44, 1905, p. 530; and Schittenhelm and Weichardt, *loc. cit.*

2) To be published in the *Journal of Infect. Diseases.*

Author	Material	Antigenic property	Specificity	Remarks
4. Beebe (1905)	Nucleoprotein, dog liver dog kidney dog pancreas Calf-thymus, nucleoprotein	precipitin (1-5) agglutinin " " precipitin (1-5)	specific also to calves nucleoprotein	Called nucleoprotein, but analysis indicates that they are nucleins
5. Pearce and Jackson (1906)	Nucleoprotein dog kidney dog pancreas cow pancreas nucleic acid dog kidney dog pancreas	cytotoxic in vivo	not specific	
6. Beebe (1906)	Nucleoprotein, human thyroid	+ agglutinins	specific	Of therapeutic value in exophthalmic goitre
7. Frank (1907)	Nucleoprotein human placenta	0 compl. fix. 0 Pptin		
8. Fiessinger (1908)	Nucleoprotein, rabbit liver	+ compl. fix. + cytotoxic		By saturation expt. showed presence of specific antibodies
9. Beebe (1910)	Nucleoproteins (human) Thyroid Kidney Spleen Liver Lymph gland	. + precipitin + agglutinin	strongly specific	Common antibodies can be removed by saturation expt. leaving specific antibodies
10. Taylor (1911)	Nucleoprotein, human thyroid	+ precipitin (1-10)	not stated	No therapeutic effect
11. Pearce, Karsner and Eisenbrey (1911)	Nucleoprotein dog kidney dog liver dog liver dog kidney	+ precipitin and agglutinin + anaphylaxis 0 " 0 "	not specific	No specific cytotoxic effect in vivo
12. Wells (1911)	Nucleic acid, cod sperm Histon, cod sperm Nucleoprotein, dog liver	0 anaphylaxis 0 " 0 "		
13. Abderhalden and Kashiwado (1912)	Nucleic acid, thymus Nuclein, yeast and pancreas	0 anaphylaxis + "	not tested	

Author	Material	Antigenic property	Specificity	Remarks
14. Guerrini (1912)	Nucleoprotein horse spleen horse liver dog spleen dog liver Animal parasites Bacterial	+ anaphylaxis	highly specific	Not only species but organ specificity shown sharply
15. Lake (1913)	Nucleoprotein or Nuclein (?) Liver, sheep Liver, dog Placenta-human	0 anaphylaxis 0 anaphylax.) + complem. fixation + precipitin	not specific	Antiserum for nucleoprotein gives stronger reaction with other human proteins than with nucleoprotein

Zusammenfassung.

Reine Nukleine sind wahrscheinlich nicht antigen, wenigstens nicht im gewöhnlichen Sinne des Ausdrucks, da keiner ihrer Bestandteile (Nukleinsäure und Histones oder Protamine) antigen ist. Deshalb hängt jede antigene Eigenschaft, die bei der Präparierung mit „Nucleoproteinen“ beobachtet wird, mehr oder weniger von den beigefügten Proteinen ab. Es ist also kein Grund zu der Annahme, daß diese Proteinnuclein-Komplexe einen Komplex darstellen, der in der Zelle besteht, oder daß die darin enthaltenen Proteine in irgendeinem Grade spezifisch oder charakteristisch sind, weder für die Zelle, aus der sie kommen, noch für den Nucleoprotein-Komplex. Obgleich über sichere experimentelle Resultate zu gunsten eines größeren oder geringeren Grades von Organ- oder Proteinspezifität für diese Nucleoproteine berichtet wird, so stehen diese doch im Gegensatz zu den negativen Resultaten anderer Forscher. Es ist möglich, daß die beobachtete Organspezifität, die am besten durch „Sättigungs“- oder Erschöpfungsversuche demonstriert ist (Fiessinger, Beebe), der Organspezifität der Zellproteine im allgemeinen zugeschrieben werden muß, welche wiederholt mit einfachen Organ-

extrakten unter Anwendung ähnlicher Sättigungsmethoden gezeigt wurde. Die chemischen Ueberlegungen und meine eigenen Erfahrungen stehen gegenwärtig der Annahme der Hypothese entgegen, daß „Nukleoproteine“ eine merkliche organspezifische, antigene Eigenschaft besitzen, die größer ist als die von Zellproteinen im allgemeinen.

References in Table.

- 1) Ide and Malengreau, Fortschr. d. Med., Bd. 20, 1902, p. 833.
- 2) Marrassini, Clin. Med., Vol. 9, 1903, p. 146; quoted by Pearce.
- 3) Bierry and Pettit, Compt. Rend. Soc. Biol., T. 56, 1904 p. 238.
- 4) Beebe, Journ. exp. Med., Vol. 7, 1905, p. 732.
- 5) Pearce and Jackson, Journ. Infec. Dis., Vol. 3, 1906, p. 742.
- 6) Beebe, Trans. Assoc. Amer. Phys., Vol. 21, 1906, p. 548.
- 7) Frank, Journ. exp. Med., Vol. 9, 1907, p. 263.
- 8) Fiessinger, Journ. de Physiol., T. 4, 1908, p. 657.
- 9) Beebe, Journ. Amer. Med. Assoc., Vol. 55, 1910, p. 1712.
- 10) Taylor, Journ. Amer. Med. Assoc., Vol. 56, 1911, p. 263.
- 11) Pearce, Karsner and Eisenbrey, Journ. exp. Med., Vol. 14, 1911, p. 44.
- 12) Wells, Journ. Infect. Dis., Vol. 9, 1911, p. 147.
- 13) Abderhalden und Kashiwado, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 81, 1912, p. 285.
- 14) Guerrini, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 14, 1912, p. 70.
- 15) Lake, Journ. Infect. Dis., 1913.

Nachdruck verboten.

Zur Toxizität heterologer Normalsera.

Ergänzung zu der in Bd. 19, Heft 3 dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit von R. Doerr und R. Pick.

Von Hermann Pfeiffer.

Bei ihren Studien über die primäre Toxizität der Antisera beschäftigten sich R. Doerr und R. Pick auch neuerlich mit der Giftigkeit heterologer Normalsera, insbesondere mit der Wirkung von normalem Rinderserum auf das Meerschweinchen. Daß die Autoren dabei zwei, dieses Thema betreffende Arbeiten des Verfassers aus den Jahren 1905 und 1906 (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 51 u. 54) übersehen und unter anderem angeben, die nekrotisierende Wirkung sei von Uhlenhuth, Doerr und Moldovan studiert worden, während der Verfasser als

erster nach Uhlenhuth eingehende und auch heute noch stichhaltige Untersuchungen über die Wesenheit dieser Wirkung veröffentlichte, hätte mich nicht veranlaßt, das Wort zu ergreifen. Die Autoren stellen aber dann als Novum fest, daß es (im Gegensatz zu manchen Organzellen des Meerschweinchens) nicht gelingt, durch Kälteabsättigung bei 0° nach Ehrlich-Morgenroth dem normalen Rinderserum seine toxische Allgemeinwirkung auf das Meerschweinchen zu nehmen. Solche Versuche wurden nun mit demselben Resultate von mir in den angegebenen Arbeiten (Bd. 54, p. 427—429) veröffentlicht und darauf hingewiesen, daß in demselben Ausmaße wie die allgemeine, so auch die lokale Wirkung in dem ambozeptorarmen Rinderserum erhalten blieb. Es sind demnach diese Feststellungen von R. Doerr und R. Pick als eine Bestätigung älterer eigener Resultate des Verfassers zu betrachten. Ich konnte aber auch weiter feststellen — und das mag zur weiteren Erörterung der die Autoren beschäftigenden Fragestellung nicht unwichtig sein! — daß im Gegensatz zur Kälteabsättigung durch eine Digerierung von Meerschweinchenerythrocysten mit aktivem Rinderserum bei 37°, also nach Eintritt der Lysis, sowohl die allgemeine als die lokale Toxizität (erstere intraperitoneal geprüft) dem Gemische verloren gegangen war. Es ist also eine Bindung des toxischen Faktors Komplement-Ambozeptor auch an die Erythrocyten — geeignete Versuchsbedingungen vorausgesetzt! — wohl möglich, so daß in weiteren Versuchsreihen experimentell die Frage zu entscheiden wäre, ob die von R. Doerr und R. Pick aufgedeckten Differenzen zwischen Gewebs- und Blutzellen des Meerschweinchens dem Rinderserum (und vielleicht auch dem Antiserum) gegenüber nicht qualitativer, sondern nur quantitativer Natur seien.

Nachdruck verboten.

Zur Toxizität heterologer Normalsera.

Erwiderung auf die vorstehende Notiz von
H. Pfeiffer.

Von **R. Doerr** und **R. Pick**.

Die Arbeiten von H. Pfeiffer über die primäre Toxizität der heterologen Normalsera haben wir nicht übersehen; sie sind — was Pfeiffer bekannt sein muß — in einer früheren, dasselbe Thema behandelnden und aus dem gleichen Institut hervorgegangenen Publikation (Doerr und Moldovan, diese Zeitschr., Bd. 7, H. 3) hervorgehoben und von Doerr in seinem Artikel „Anaphylaxie und Allergie“ (Kolle-Wassermanns Handb., 2. Aufl., Bd. 2) entsprechend gewürdigt worden. Wenn wir daher Pfeiffer nicht neuerlich erwähnten, so geschah das mit Rücksicht auf diesen Umstand, und kann um so weniger als Versehen oder Unterlassung

gedeutet werden, als wir ausdrücklich betonen, den Stand der Frage nicht ausführlich schildern, sondern nur in einer für das Verständnis unserer Versuchsanordnungen erforderlichen Form kurz skizzieren zu wollen. Die Angabe, „daß die nekrotisierende Wirkung der Normalsera von Uhlenhuth, Doerr und Moldovan studiert worden sei“, haben wir übrigens nirgends gemacht; sie wäre schon deshalb unrichtig, weil Doerr und Moldovan Experimente in dieser Richtung gar nicht angestellt haben. Offenbar ist H. Pfeiffer ein Irrtum bei der Lektüre unterlaufen; an der von ihm inkriminierten Stelle ziehen wir eine Parallele zwischen toxischen Normal- und Immunsera und nennen Uhlenhuth als den ersten, der die nekrotisierenden Effekte für Normalsera beschrieben, Doerr und Moldovan als diejenigen, welche sie zuerst beim Immunserum, speziell beim Hammelhämolyse, beobachtet haben. Ferner berichten wir nicht als „Novum“, daß die toxische Komponente des Rinderserums bei 0° C durch Meerschweinchenerythrocyten nicht gebunden wird; neu oder richtiger bemerkenswert schien uns nur, daß die Organe diese Komponente unter bestimmten Bedingungen fixieren, Erythrocyten dagegen nicht, daß sich das Phänomen für Rinderserum ebenso wie für Aalserum feststellen und für die Zellen des Meerschweinchens in derselben Art wie für die des Pferdes, Kaninchens und des Huhnes nachweisen ließ. Ebenso wie die negativ verlaufenen Kälteabsättigungen von Pfeiffer waren uns natürlich auch seine Entgiftungen von Rinderserum mit Meerschweinchenblut bei 37° C bekannt; wir sind darauf nicht eingegangen, weil wir Aalserum auch bei 37° C und durch Ablaufenlassen der Lyse nur mit Organen empfindlicher Tierspecies, nicht aber mit den korrespondierenden Erythrocyten entgiften konnten, und weil Zinsser ähnliche Erfahrungen bei der Entgiftung des für Kaninchen toxischen Ziegenserums durch Kaninchenblut publiziert hat. Daß möglicherweise, wie Pfeiffer meint, zwischen dem Bindungsvermögen von Erythrocyten und Organzellen gegenüber toxischem Normalserum nur quantitative bzw. Aviditätsdifferenzen bestehen, mag sein; es würde das aber durchaus nicht gegen die von uns gegebene Erklärung über den Mechanismus der Giftwirkung sprechen. Wie sich diese Verhältnisse bei den toxischen Immunsera gestalten, kann nicht mehr Gegenstand der Vermutung sein [vgl. den Passus „(und vielleicht dem Antiserum)“ in obigem Artikel Pfeiffers]; das ist durch die Experimente von Friedberger, Doerr und Moldovan, Doerr und Weinfurter, Forssman und Hintze und durch unsere Arbeiten längst entschieden.

Nachdruck verboten.

Erwiderung zu den Bemerkungen von Friedberger und Cederberg.

Diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, Heft 4.

Von **C. Moreschi** und **C. Vallardi**.

Alle von Friedberger und Cederberg oben angeführten Beweisführungen vermögen unsere feste Ueberzeugung nicht zu erschüttern, daß die partielle oder totale Kälteausfällung der Normalambozeptoren den Beweis für eine eventuelle Teilnahme der besagten Ambozeptoren bei der Anaphylatoxinbildung in vitro — ähnlich wie bei allen Reaktionen zwischen Antigen und Ambozeptor — liefern kann. Die minimalen Anaphylatoxinmengen, die sich nach einer Kälteausfällung bilden (so minimal, daß sie nur ausnahmsweise nachgewiesen werden können), verringern weder den Wert, noch verändern sie die Bedeutung, welche Moreschi und Vallardi den Resultaten ihrer Versuche zuschreiben.

Außerdem würde nach der Erwiderung Friedbergers und Cederbergs jedermann annehmen, daß die quantitative Uebereinstimmung zwischen dem toxinogenen Wert des nativen und des absorbierten Serums von uns in sehr unregelmäßiger Weise festgestellt worden sei; der Klarheit wegen müssen wir jedoch nochmals betonen, daß wir in allen unseren Versuchen über Kälteausfällung nur in einem Fall eine Verminderung (und zwar eine ganz geringe) des toxinogenen Wertes bei dem absorbierten Serum konstatiert haben [tödliche Minimaldosis des nativen Serums = 2,0 ccm, schwere Anaphylaxie bei 2,5 ccm des absorbierten Serums, Tabelle II, Versuch X]. Die in Tabelle A, Versuch II zusammengestellten Werte weisen überhaupt nicht, wie Friedberger und Cederberg behaupten, auf eine Verminderung des toxinogenen Wertes des absorbierten Serums gegenüber dem des nativen Serums hin, sondern nur auf Sensibilitätsunterschiede des Meerschweinchens für Friedbergers Anaphylatoxin; dieses geht aus obengenanntem Versuch klar hervor, wie schon vorher von uns betont wurde.

Nachdruck verboten.

[Aus Statens Seruminstitut (Direktor: Dr. med. Th. Madsen)
und Rudolph Berghs Hospital (Oberarzt: Prof. Dr. med.
E. Pontoppidan).]

**Untersuchungen über eine Modifikation der Herman-
Perutzschen Reaktion (Ellermann: Methode 14).**

Von **W. Leschly** und **Harald Boas**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 26. August 1913.)

In der Deutschen medizinischen Wochenschrift, 1913, No. 5,
hat Ellermann eine Modifikation der Herman-Perutz-
schen Fällungsreaktion veröffentlicht, von der er sagt:

„Wenn man die Resultate bei Syphilis, wo die Methode der Herman-
Perutzschen ganz überlegen ist und wo sie mit der Wassermann-
schen Reaktion wetteifern kann, sowie den negativen Ausfall der Kontroll-
fälle in Betracht zieht, so glaube ich behaupten zu können, daß die Methode
den Forderungen an Empfindlichkeit, Spezifität und quantitativer Ge-
staltung entspricht. Es hat den Anschein, daß vereinzelt ganz schwache
unspezifische Reaktionen vorkommen können; ähnliches beobachtet man
aber auch mitunter bei der Wassermannschen Reaktion.“

Da bisherige Versuche, die Herman-Perutzsche Reak-
tion zu verändern, wohl die Anzahl positiver Reaktionen unter
den Syphilitikern, jedoch nur auf Kosten der Spezifität, ver-
mehrt haben, war eine Reaktion, die die obigen Versprechen
hielt, mit Freuden zu begrüßen. Teils ist es immer wertvoll,
zwei Reaktionen statt einer zu haben, auf die man in zweifel-
haften Fällen bauen kann, teils sind diese Fällungsreaktionen
bedeutend leichter als die Wassermannsche Reaktion aus-
zuführen.

Ganz so günstig, wie das Resumé, ist jedoch der Eindruck des
Materials nicht, auf das Ellermann es basiert, denn bei 31¹⁾ Kontroll-

1) Ellermanns einer Fall kann kaum als Kontrollfall gerechnet
werden, da der betreffende Patient latente Syphilis hatte.

fällen ist 1 positive Reaktion wohl kaum selten zu nennen. Mit der Herman-Perutzschen Reaktion (mit Natrium glykokol. puriss. Merck oder kontrollierten Präparaten) hatten Thomsen und Boas¹⁾ bei 182 Kontrollfällen 3 positive Reaktionen, Gammeltoft²⁾ bekam unter 85 Fällen 1 unspezifische Reaktion. Auch bei der Wassermannschen Reaktion kann man, freilich weit seltener, unspezifische Reaktionen bekommen, Boas³⁾ bekam so z. B. von 1033 Fällen nur 1.

Indessen lag ja die Möglichkeit vor, daß unspezifische Reaktionen bei einem größeren Material relativ seltener vorkommen würden, deswegen, und besonders, weil diese Methode im Gegensatz zu der ursprünglichen Herman-Perutzschen Reaktion eine quantitative Ausführung zuläßt, haben wir auf Ellermanns Ersuchen die Methode nachgeprüft.

Im ganzen haben wir 199 Sera untersucht, die im wesentlichen aus Rudolph Berghs Hospital stammen. In der Technik haben wir genau die von Ellermann angegebene befolgt. Die untersuchten Sera waren alle $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt. Die Herman-Perutzschen und Ellermannschen Reaktionen sind gleichzeitig und an demselben Tage, wo die Sera genommen sind, ausgeführt, und die Wassermannsche Reaktion an demselben oder am folgenden Tage.

Die klinischen Resultate finden sich in den untenstehenden Tabellen gesammelt.

Aus diesen geht hervor, daß die Ellermannsche Methode 14 mehr positive Erfolge als die Herman-Perutzsche Reaktion bei Syphilis und ebenfalls mehr als die Wassermannsche in latenten und behandelten Syphilisfällen, sowie bei Indurationen, dagegen etwas weniger bei frischen unbehandelten sekundären Fällen gibt. Andererseits aber gibt die Methode 14 mit Sera von Patienten, die klinisch absolut keinen Anhaltspunkt für Syphilis bieten, auch weit mehr positive Reaktionen. Mit 78 Kontrollsera gab die Wassermannsche Reaktion so z. B. in keinem Fall eine unspezifische Reaktion, die Herman-Perutzsche in 1; bei demselben Material hat Methode 14 dagegen 9 solche und in 5 anderen Fällen war der Erfolg zweifelhaft, da keine Reaktion in den

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, p. 391—410.

2) Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 41.

3) Die Wassermannsche Reaktion. Berlin, S. Karger, 1911.

Gläsern mit der größten Serummengung, wohl aber in einem oder mehreren der folgenden zustande kam.

Infolge dieses Resultats der Untersuchung der Sera von Nichtsyphilitikern scheint uns die Methode 14 deswegen zu klinischem Gebrauch nicht geeignet zu sein, da es hier vor allem auf eine spezifisch wirkende Reaktion ankommt. Wahrscheinlich wäre deswegen, wie Ellermann selbst es als eine eventuelle Möglichkeit anführt, die Menge des glykokolsauren Natrons zu vermehren.

Betreffs der quantitativen Verhältnisse nimmt die Stärke der Reaktion in den meisten der positiven Fälle mit fallenden Serummengen ab. In einer Reihe von Fällen (siehe die Tabellen) trifft man jedoch das von Fällungs- und anderen Reaktionen (Agglutination) nicht unbekanntes Phänomen, daß die Reaktion mit kleineren Serummengen stärker ist. Die ausgesprochensten Fälle dieser Art, wo mit der größten Serumdosis überhaupt kein Niederschlag ist, sind in Tabelle IX gesammelt. Mit den entsprechenden Erscheinungen mit Sera von Nichtsyphilitikern verglichen deutet dies darauf, daß die angewandte Verdünnungsflüssigkeit nicht genügend indifferent ist, da sich diese Niederschläge am natürlichsten als diejenigen entsprechend erklären lassen, die z. B. Ellermann bei einer Verdünnung von Serum mit verschiedenen Stoffen und Mischungen derselben wahrnahm.

Die Herman-Perutzsche Reaktion hat im Vergleich zur Wassermannschen Reaktion in dem vorliegenden Material sehr befriedigende Resultate gegeben, zur Entscheidung des Wertes derselben bei Syphilis ist das Material jedoch zu klein, die Häufigkeit der unspezifischen Reaktionen entspricht genau dem früher Gefundenen.

Zeichenerklärung: Bei der Wassermannschen Reaktion bezeichnen die angeführten Zahlen die erreichte Hämolyse, die erste Zahl mit 0,2 ccm Serum, die zweite Zahl mit 0,1 ccm, die dritte mit 0,05 ccm etc. 100 gibt an, daß sich keine Reaktion fand.

Sowohl für die Herman-Perutzsche als auch für die Ellermannsche Reaktion bedeuten +++ gesamten Niederschlag, ++ grobe Flocken, + bedeutende Flocken, (+) eine schwache Fällung (nicht als Reaktion gerechnet), — bezeichnet, daß die Reaktion nicht ausgeführt ist.

Tabelle I. Indurationen.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				Behandelt mit
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
0, 0, 100	++	++	—	—	—	Hg + 606
100	(+)	(+)	—	—	—	dgl.
100	0	0	—	—	—	nicht behandelt
60, 100	+	+	0	0	0	Hg + 606
0, 0, 20, 100	+++	+++	+	(+)	0	nicht behandelt
100	0	+	(+)	0	0	dgl.
100	0	0	0	0	0	dgl.
100	+	—	+	(+)	0	Hg + 606
100	0	0	0	0	0	dgl.
0, 60, 100	+++	+++	+	+	+	dgl.

Tabelle II. Nicht behandelte sekundäre Ausbrüche.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann			
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
50, 100	0	0	—	—	—
0, 0, 25, 100	++	++	—	—	—
0, 0, 0, 25	+++	+++	—	—	—
0, 6, 35	++	+	—	—	—
0, 10, 100	0	0	—	—	—
0, 0, 0, 25, 100	+++	+++	++	(+)	0
0, 0, 100	+++	+++	+++	++	+
0, 0, 60, 100	+++	+++	++	+	(+)
0, 0, 100	+++	+++	+++	+++	+++
0, 0, 8, 100	+++	+++	+++	+	(+)
0, 0, 100	+	+	(+)	0	0
0, 0, 10, 100	++	+++	++	(+)	0
0, 0, 0, 0, 60, 100	++	++	+	0	(+)
0, 0, 0, 0, 60, 100	+++	—	+++	+	(+)
0, 0, 0, 100	+++	+++	+++	+	0
0, 0, 25, 100	0	+++	++	+	(+)
0, 0, 0, 100	++	+++	++	+	(+)
0, 0, 100	++	++	+	(+)	0
0, 0, 0, 35, 100	+++	+++	+	+	0
0, 0, 100	(+)	++	+++	++	+
0, 0, 20, 100	++	+++	+++	++	+
0, 0, 100	++	+++	++	+	(+)

Tabelle III. Tertiäre nicht behandelte Syphilis.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann			
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
0, 0, 0, 0, 100	+++	—	+	0	0

Tabelle IV. Latente Syphilis.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann			
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
100	0	0	—	—	—
0, 0, 0, 20, 100	++	+	—	—	—
100	+	+	—	—	—
100	+	0	0	0	0
50, 100	(+)	+	(+)	0	0
100	0	0	0	(+)	0
100	+	++	+	+	0
100	0	0	0	0	0
100	0	+	0	0	0
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	(+)	0
0, 0, 25, 100	0	0	0	0	0
100	0	—	+	+	0
100	(+)	+	+	+	0
100	(+)	(+)	+	+	0
0, 0, 100	++	+++	+	+	0
100	0	0	0	+	0
25, 100	0	+	+	0	0
60, 100	0	+	+	+	0
100	0	0	+	+	0
100	0	+	+	+	0
100	0	+	+	+	0
100	0	+	+	+	0
60, 100	++	—	+	+	(+)
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
0, 0, 35, 100	++	—	+	+	0
100	++	+	+	+	0
100	0	0	+	(+)	+
100	+	++	+	+	+
100	+	++	+	+	+
100	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
0, 0, 0	++	++	—	—	—
0, 0, 0, 0, 10, 100	+++	+++	+++	+++	+++
0, 0, 0, 0, 60, 100	+++	+++	+++	+++	+++
100	(+)	—	+	+	(+)

Tabelle V. Behandelte Syphilisfälle.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
100	0	(+)	—	—	—	S. II, beh. mit Hg + 606 dgl.
100	+++	+++	++	(+)	—	
0, 0, 0	+++	+	—	—	—	„
0, 0, 10, 100	++	++	—	—	—	„

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
53, 100	(+)	(+)	—	—	—	Syph. malign., beh. mit 606
100	0	0	0	0	0	S. II, beh. mit Hg + 606
45, 100	+++	+++	++	+	+	dgl.
100	+	—	++	+	0	"
100	0	+	0	0	0	"
0, 60, 100	+++	+++	++	0	0	"
0	+++	—	++	(+)	—	S. II, beh. mit Hg
60, 100	(+)	(+)	0	0	0	dgl.
25, 100	+++	+++	+++	++	(+)	S. II, beh. mit Hg + 606
50, 100	+++	—	++	+	0	dgl.
100	+	+	0	0	0	S. II, beh. mit Hg
0, 0, 10, 100	+++	+	(+)	0	0	S. II, beh. mit Hg + 606
0, 0, 0, 100	+++	—	+++	+	(+)	dgl.
0, 0, 10, 100	+++	+++	++	+	(+)	"
0, 25, 100	+	++	0	(+)	0	"
0, 0, 100	0	0	0	0	0	"
100	0	+	+	++	++	"
100	++	++	(+)	+	—	Neurorezidiv, beh. mit Hg
0, 0, 100	(+)	0	—	—	—	S. cong., beh. m. Hg + Jk
100	0	0	—	—	—	S. lat., beh. mit 606
100	0	0	—	—	—	dgl.
10, 100	+	++	+	(+)	0	S., beh. mit Hg
100	+	—	++	+	0	S., beh. mit Hg + 606
100	+	—	+	0	0	S. lat., beh. mit Hg + 606
0, 0, 100	0	0	0	(+)	0	S. cong., beh. mit Hg + 606
0, 60, 100	0	0	0	0	0	dgl.
0, 0, 0, 0, 100	+++	+++	+	(+)	0	S., beh. mit Hg + 606
100	0	0	0	0	0	S. III, beh. mit Hg
100	0	0	0	0	0	S. II, beh. mit Hg + 606
0, 60, 100	+	++	0	(+)	0	dgl.

Tabelle VI. D. p.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann			
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
0, 0, 0, 100	+++	+++	+++	++	+

Tabelle VII.

Nicht behandelter Ausbruch von congenitaler Syphilis.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann			
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
0, 0, 0, 0, 10, 100	+++	+++	+++	+++	—

Tabelle VIII. Klinisch zweifelhafte Fälle.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
100	+++	(+)	—	—	—	Mutter eines syph. Kindes. 26 Jahre nach d. Infekt.
100	0	0	—	—	—	Vater eines syph. Kindes. do. do.
100	0	0	—	—	—	Vater eines syph. Kindes.
100	(+)	+	—	0	0	Hemiplegie, Syph.? (Gonorrépt. mit einer un- bedeutenden Epitheliosis linguae, die bei der ört- lichen Behandlung schwand. Kein Zeichen von Syphilis.
100	0	+++	+++	0	0	
100	0	+	(+)	0	0	

Tabelle IX. Fälle von Syphilis, wo die Reaktion nur positiv ist mit kleineren Serummengen.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
100	0	—	0	0	+	Lat. Syph.
100	0	(+)	+	(+)	0	dgl.
100	+	(+)	+	+	(+)	„
100	(+)	0	+	+	0	„
0, 0, 100	0	0	—	(+)	+	Lat. Syph. cong.
0, 0, 100	+	0	+	(+)	—	Beh. Syph. II.
25, 100	0	—	0	+	0	dgl.
100	0	(+)	+	(+)	0	„

Tabelle X. Kontrollfälle.

Im ganzen sind 78 Sera untersucht. Die klinische Diagnose war in 33 Fällen Gonorrhöe, in 10 Ulcus ven., in 2 Kondylom, in 2 Ulcus cruris, in 2 Bubonen, in 14 Tub. pulm., in 6 Cancer, in 1 Idiotie, in 1 Dem. praecox, in 2 Ekzem, in 1 Psoriasis; 4 Sera stammten von gesunden Individuen.

Von diesen reagierten 9 positiv mit Methode 14 (das eine derselben auch mit Herman-Perutz).

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				Klinische Diagnose
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
100	0	+	(+)	0	0	Gonorrhöe
100	0	+	0	0	0	dgl.
100	0	+	0	0	0	„
100	+	+	(+)	0	0	Tub. pulm.
100	0	+	(+)	0	(+)	Gonorrhöe
100	0	+	+	0	(+)	dgl.
100	0	++	++	+	(+)	„
100	0	+	(+)	0	0	„
100	0	+	+	+	+	Ekzem

Tabelle XI. In 5 Fällen gab die Methode 14 eine positive Reaktion, jedoch nicht mit der größten Serummengge.

Wa. R.	H.-P.	Ellermann				Klinische Diagnose
		0,4 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	
100	0	0	+	0	0	Ulcus ven.
100	0	0	0	+	(+)	Gonorrhöe
100	0	0	+	(+)	0	Ulcus ven.
100	0	(+)	+	(+)	(+)	Gonorrhöe
100	0	(+)	+	+	(+)	Tuberkulose

Uebersichtstabelle.

Die zweifelhaften Reaktionen nicht mitaufgenommen (siehe Tabelle IX) und für Methode 14 auch nicht Tabelle XI.

Wa. R.	Indurationen		Nicht beh. sek. Syphilis		Nicht beh. tertiäre Syphilis		Latente Syphilis		Beh. Syph.		D. p.		Cong. Syph.		Kontrollfälle		Zweifelhafte Fälle	
	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion	Reaktion	Keine Reaktion
W. R.	4	6	22	0	1	0	11	28	20	14	1	0	1	0	0	78	0	6
Herman-P.	5	5	18	4	1	0	13	26	20	14	1	0	1	0	1	77	1	5
Methode 14	6	4	20	2	1	0	21	18	22	12	1	0	1	0	9	64	3	3

Zusammenfassung.

Die Methode 14 gibt mit syphilitischen Sera mehr positive Reaktionen als die Herman-Perutzsche und die Wassermannsche Methode, da sich unter dem untersuchten Kontrollmaterial jedoch mehrere unspezifische Reaktionen zeigten, ist sie unserer Ansicht nach für die klinische Anwendung nicht zu empfehlen.

Nachdruck verboten.

Ueber die Beziehungen zwischen Anaphylaxie und Fieber¹⁾.

Von **C. Moreschi** und **A. Golgi**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. August 1913.)

In einer Mitteilung des vorigen Jahres teilten Moreschi und Tadini einige Untersuchungen über die pyrogene Wirkung des nach Friedberger hergestellten Typhusanaphylatoxins mit und stellten in Uebereinstimmung mit den genannten Autoren fest, daß die Digestion der bei 60° C getöteten Typhusbacillen durch frisches Meerschweinchennormalserum diesem eine sehr ausgesprochene pyrogene Wirkung verleiht. Sie bemerkten außerdem, daß die wiederholte Einspritzung, sei es von großen, sei es von kleinen Mengen von Typhusanaphylatoxin, anstatt bei den so behandelten Tieren eine thermische Ueberempfindlichkeit hervorzurufen, eine bemerkenswerte aktive Immunität erzeugt, durch welche sie ohne bedeutende Temperaturschwankungen Anaphylatoxinmengen vertragen, die 200 pyrogenen Einheiten entsprechen. Hierauf berichtete Moreschi auf dem Kongreß für innere Medizin zu Turin, daß das Serum der Immuntiere bedeutende Mengen des im Typhusanaphylatoxin enthaltenen pyrogenen Giftes in vitro zu neutralisieren vermag. — Diese Versuchsergebnisse waren unabhängig von entsprechenden, kurz zuvor auf der Naturforscherversammlung in Karlsruhe mitgeteilten Versuchen von E. Friedberger gewonnen. Dieser Autor stellte die Neutralisierung der die Temperatur beeinflussenden Komponente des Tuberkelbacillus durch Immunserum fest. Von da an hielten es Moreschi und Tadini für angemessen, darauf aufmerksam zu machen, daß sie unter der Bezeichnung „pyrogene Wirkung des Typhusanaphylatoxins“ nur diejenigen pyrogenen Stoffe verstanden, welche durch den Typhusbacillus mittels eines frischen Serums (in diesem Falle Meerschweinchennormalserum) in Freiheit gesetzt werden, ohne die Frage zu berühren, ob anaphylaktisches

1) Mitgeteilt in der Medizin. Gesellschaft zu Pavia am 12. Juni 1912.

Gift im eigentlichen Sinne des Wortes und pyrogenes Gift ein und dieselbe Substanz seien. Es ist bekannt, daß Friedbergers Theorie des Fiebers sich auf die Anschauung gründet, daß diese Gifte identisch seien. Der besondere Hinweis auf die Benennung „pyrogene Wirkung des Typhusanaphylatoxins“ war geboten, erstens, da systematische Forschungen fehlen, welche zu einem definitiven Urteil über diese Identität berechtigen, zweitens wegen der zweifelhaften oder negativen Resultate von Friedberger, Sachs und Ritz (die Besredka bestätigte) in bezug auf die aktive Immunität gegen das eigentliche Anaphylatoxin. Die von Moreschi und Tadini erhaltenen Resultate berechtigen dagegen vollständig zur Annahme, daß das pyrogene Gift eine antigene Wirkung besitze und daher spezifisch sei; diese Spezifität spricht Friedberger dem anaphylaktischen Gifte ab. Sicherlich gibt es gut begründete Argumente, welche für die Aspezifität des Anaphylatoxins sprechen, so z. B. gerade das Fehlen einer antigenen Fähigkeit und die Identität des symptomatischen und des anatomisch-pathologischen Bildes, welches die verschiedenen Anaphylatoxine hervorrufen. Es ist jedoch merkwürdig, daß Friedberger, der seine Auffassung von dieser Aspezifität streng aufrecht erhält, bei der Bildung des anaphylaktischen Giftes einen Mechanismus annimmt, welcher, wie schon Moreschi und Vallardi bemerkten, ausschließlich spezifische Eigenschaften darin voraussetzt.

Es ist nicht der Zweck dieser Mitteilung, das Problem der Bildung von Friedbergers Anaphylatoxin eingehend zu betrachten, wir bemerken nur, daß die Teilnahme von Antikörpern (wenigstens von normalen Antikörpern nach den Versuchen von Moreschi und Vallardi) nicht als sicher festgestellt werden konnte¹⁾.

1) Obgleich es beim Stande der heutigen Kenntnisse nicht möglich ist, eine komplementäre Tätigkeit, ohne das gleichzeitige Einwirken der Ambozeptoren zu verstehen, so ist es doch niemanden bis jetzt gelungen, bei der Bildung des Friedbergerschen Anaphylatoxins in vitro die Teilnahme des Komplementes oder wenigstens einer thermolabilen Substanz (die bei 55° C zerstörbar ist) auszuschließen. Auch die Versuche von Doerr und Russ, welche diese Tatsache ausschließen wollten, sind keineswegs beweiskräftig, wie auch Friedberger kürzlich bemerkt hat. Die

In bezug auf die aktive Immunität gegen das pyrogene Gift stellten Moreschi und Tadini die Frage auf, ob dasselbe sich mit der sogenannten endotoxischen Immunität im Sinne von Pfeiffer und Bessau decke, mit anderen Worten: ob die pyrogene Wirkung dem Pfeifferschen Endotoxin zuzuschreiben sei und ob die Neutralisierung derselben auf einer Zersetzung in einfachere atoxische Produkte im Sinne von Friedberger und Vallardi, Pfeiffer und Bessau beruhe, welche durch die bakteriolytischen Ambozeptoren und durch das Komplement hervorgerufen wird. Versuche dieser Art wurden in ausgiebigen Maße in diesem Institute ausgeführt und zwar mit Resultaten, die keinen Zweifel lassen über die Wirkung des Komplements, sowie des Ambozeptors bei der Neutralisierung des pyrogenen Giftes. Näheres werden wir in einer speziellen Mitteilung berühren; in der vorliegenden wollen wir eine Reihe systematischer Versuche vorausschicken, welche den Zweck haben, die Beziehungen zwischen dem pyrogenen Gift und dem eigentlichen Friedbergerschen Anaphylatoxin genauer festzustellen. Unter dieser Bezeichnung verstehen wir das Gift, welches Friedberger aus den verschiedenen Eiweißstoffen herstellt. Auch rechnen wir dazu das Produkt der in vitro mit frischem Meerschweinchen-normalserum digerierten bakteriellen Eiweißstoffe. Wir lassen hierbei zunächst wenigstens außer acht das Gift, welches aus den verschiedenen ebenfalls mit frischem Meerschweinchen-normalserum digerierten Antigen-Antikörperverbindungen gewonnen wird, wie z. B. die hämolytischen Systeme (Friedemann-Friedberger und Castelli), die spezifischen Präzipitate (Friedberger und Castelli, Friedberger und Vallardi, Doerr und Russ etc.), bakteriolytischen Systeme (Friedberger und seine Mitarbeiter, Neufeld und Dold, Moreschi und Vallardi etc.). Diese Scheidung ist momentan notwendig, da uns die Vorsicht davor zurückhält, Erscheinungen zu identifizieren, deren Entstehungsmechanismus trotz der scheinbar zwischen ihnen bestehenden Analogie nicht

Mischungen von Antigen-Antikörpern, die in vitro mit komplementfreiem Serum digeriert wurden, und die beim Tiere anaphylaktische Erscheinungen erzeugen, können durch das zirkulierende Komplement aktiviert worden sein.

sicher festgestellt ist. Der erste Zweck dieser Versuche war die Feststellung der

quantitativen Beziehungen zwischen dem pyrogenen Gift und Friedbergers Anaphylatoxin.

Es wurden Anaphylatoxine verschiedenen Ursprungs untersucht:

- I. Typhusanaphylatoxin,
- II. Tuberkuloseanaphylatoxin,
- III. Staphylokokkenanaphylatoxin.

Bei der Bereitung des Typhusanaphylatoxins haben wir uns an die Technik gehalten, deren sich Moreschi und Tadini bei früheren Versuchen bedienten; diese besteht in der Aufschwemmung von 4 Normalösen Typhusbakterien in 0,2 ccm NaCl-Lösung, 2 Stunden langer Abtötung bei 60° C, der Hinzufügung von 4 ccm frischen Meerschweinchenserums (Meerschweinchen wiegt 200—250 g) und schließlich 2 Stunden langer Verdauung bei 37° C. Nach dieser Behandlung wurden die Mischungen ungefähr 18 Stunden lang im Eisschrank gelassen und dann 15 Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 5000 Drehungen pro Minute zentrifugiert. Die zentrifugierte Flüssigkeit stellt Friedbergers Anaphylatoxin dar, deren pyrogene Minimaldosis (Temperaturerhöhung über 40° C in Meerschweinchen von ungefähr 300 g nach subkutaner Injektion des Anaphylatoxins) und tödliche Minimaldosis (sofort eintretender Tod mit klassischen anaphylaktischen Symptomen nach endovenöser Injektion von Anaphylatoxin in Meerschweinchen von ungefähr 200 g) bestimmt wurde. Zur Feststellung der pyrogenen Minimaldosis erhielten eine Reihe von Meerschweinchen subkutane Einspritzungen von Anaphylatoxinmengen, welche für das Typhusanaphylatoxin in den Dosen von 0,001—0,2 ccm, für das Tuberkulose- und Streptokokkenanaphylatoxin von 0,001—1 ccm lagen. Die Bereitung der Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphylatoxine geschah nach dem für das Typhusanaphylatoxin beschriebenen Verfahren. Wir bemerken nur, daß die Menge der menschlichen Tuberkelbacillen (aus dem Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.), die von uns auf glyzeriniertem Agar gezüchtet wurden, 0,005 g betrug und daß die Menge der Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*), der aus dem Blut eines Kranken mit staphylokokkischer Septikämiesäure isoliert wurde, 4 Normalösen betrug, wie dies auch beim Typhus der Fall war. Die Rektaltemperatur der Meerschweinchen wurde vor der Injektion und zweistündlich danach gemessen, und zwar mit einem Thermometer, welches nach unten hin leicht im stumpfen Winkel gebogen ist und welches stets gleich tief bis zu dieser Biegung in den After eingeführt wird.

Wir betrachten als Fieber Temperaturen von 40° C oder darüber, indem wir uns vergegenwärtigen, daß normaler-

Tabelle I. Typhusanaphylatoxin A: minimal tödliche Dosis = 2,5 ccm.

Meerschweinchen No.	170	177	175	171	168	167	178	179	176	173	169	172
Gewicht in g	280	280	290	290	330	330	290	290	320	310	280	290
Typhusanaphylatoxin	0,005	Kontr.	0,01	Kontr.	0,05	Kontr.	0,1	Kontr.	0,5	Kontr.	1,0	Kontr.
Normal-Meerschweinchenserum	.	0,005	.	0,01	.	0,05	.	0,1	.	0,5	.	1,0
Temperatur vor der Injekt. 16 ⁰⁰	38,8	39,0	38,4	38,8	38,6	38,4	38,6	38,6	38,8	39,2	38,4	38,6
Temperatur nach der Injekt. 17 ³⁰	39,6	39,2	39,2	39,0	40,6	38,8	40,8	38,8	40,8	38,6	40,6	39,0
18 ³⁰	38,8	39,0	40,2	39,0	40,4	38,8	40,8	38,6	40,8	38,6	40,6	39,0
20 ⁰⁰	40,2	39,4	41,0	39,2	40,6	39,2	41,0	38,8	41,0	39,0	40,4	39,0
21 ³⁰	39,7	39,5	40,6	39,2	40,0	39,0	40,0	38,8	39,8	39,0	39,8	39,0
24 ⁰⁰	39,2	39,4	39,2	39,0	39,2	39,0	40,4	38,6	39,8	38,8	40,3	39,0
9 ⁰⁰	38,8	39,2	38,8	38,8	38,8	38,6	39,4	38,6	39,3	38,6	39,4	39,2
14 ⁰⁰	38,8	39,0	38,8	39,0	38,8	38,8	39,4	38,8	39,4	38,8	39,2	39,0
19 ⁰⁰	30,2	39,2	38,8	39,0	39,0	38,8	39,1	38,6	39,4	38,8	39,6	39,2

Tabelle I a. Typhusanaphylatoxin B: minimal tödliche Dosis = 1,0 ccm.

Meerschweinchen No.	260	257	261	253	238	251
Gewicht in g	270	275	280	310	340	340
Typhusanaphylatoxin	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
Temperatur vor der Injekt. 18 ⁰⁰	39,2	39,1	39,2	39,3	39,2	39,2
10 ⁰⁰	38,2	38,6	39,0	38,4	39,2	38,4
Injektion 12 ⁰⁰						
Temperatur nach der Injekt. 14 ³⁰	39,2	39,2	38,6	39,2	37,7	39,2
16 ³⁰	38,4	39,2	38,6	40,2	34,4	39,4
18 ¹⁵	38,4	40,6	38,8	40,0	+	39,2
21 ⁰⁰	39,2	39,4	39,6	40,6	.	39,6
23 ³⁰	39,8	38,8	40,1	39,6	.	39,6
2 ¹⁵	38,0	38,4	39,2	38,9	.	38,8
10 ⁰⁰	39,2
15 ⁰⁰	39,2

weise bei Beobachtung einer konstanten Art der Ernährung die Temperatur des Meerschweinchens zwischen 38° C und 39,5° C schwankt, wie uns nunmehr eine längere Erfahrung gelehrt hat. Zur Kontrolle wurden einige Reihen von Meerschweinchen subkutan mit frischem Meerschweinchennormalserum inokuliert, und zwar mit Mengen, die zwischen 0,001 und 1 ccm schwankten.

In Tabelle I (p. 627) sind die verschiedenen pyrogenen Werte gesammelt, welche man aus zwei zu verschiedenen Zeiten bereiteten Typhusanaphylatoxinen erhielt; die tödliche Minimaldosis der einen (A) ist gleich 2,5 ccm, der zweiten (B) gleich 1,0 ccm. Trotz dieser Verschiedenheit der Giftigkeit ist es gerade das giftigere Anaphylatoxin B, welches einen geringen pyrogenen Wert aufweist (pyrogene Minimaldosis 0,01 ccm) im Gegensatz zu dem höheren pyrogenen Wert 0,0005 ccm, welche das Anaphylatoxin A aufweist. Auch die vergleichende Forschung über die Beziehungen zwischen pyrogenem und anaphylaktischem Wert der anderen drei Typhusanaphylatoxine bestätigt, daß gar kein Parallelismus zwischen den beiden besteht (siehe Tabelle II).

Tabelle II.

Vergleichende toxische und pyrogene Werte zwischen Typhus-, Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphylatoxin.

Typhus-anaphylatoxin		Tuberkulose-anaphylatoxin		Staphylokokken-anaphylatoxin	
Tödliche Dosis	Pyrogene Dosis	Tödliche Dosis	Pyrogene Dosis	Tödliche Dosis	Pyrogene Dosis
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
A 2,5	0,005	A 4,0	0,001—1,0	A 3,0	0,001—1,0
B 1,0	0,01	B 3,5	0,005—0,5	B 2,0	0,001—0,5
C 2,5	0,005	C 4,0	0,005—1,0	C 3,0	0,005—1,0
D 2,5	0,05				
E 2,0	0,05				

Man könnte hier einwenden, daß die von uns erhaltenen pyrogenen Werte keine absolute Bedeutung haben, angesichts der Verschiedenheit der individuellen Sensibilität des Meerschweinchens gegen das Typhusgift, welche aus den Versuchen von Pfeiffer und Bessau wie auch aus den unseren hervorgeht; in der Tat finden wir in Tabelle I, daß das Anaphyla-

toxin B bei Mengen von 0,5 ccm einen plötzlichen Temperatursturz mit darauffolgendem Tode verursacht, während eine doppelt so große Menge die Temperatur eines Meerschweinchens von demselben Gewicht nicht merklich verändert. Wenn der Tod des Meerschweinchens, welches 0,5 ccm erhielt, durch eine Ueberempfindlichkeit des Tieres gegen das Typhusgift im Sinne Pfeiffers und Bessaus erklärt wird¹⁾, so kommt der mangelnden thermischen Reaktion desjenigen Meerschweinchens, welches eine doppelt so große Menge (1 ccm) desselben Giftes erhalten hatte, eine ganz andere Erklärung zu. Aus den Versuchen von Friedberger und Mita über die Temperaturveränderungen bei Tieren, die mit artfremdem Eiweiß geimpft worden waren, geht hervor, daß die Injektion mit übergroßen Mengen Hypothermie, dagegen mit verhältnismäßig kleinen Mengen Hyperthermie hervorruft, während mittlere Dosen, welche zwischen hyperthermischen und hypothermischen Grenzdosen liegen, die Temperatur nicht wesentlich beeinflussen. Auch Moreschi und Tadini erhalten mit der Injektion von Anaphylatoxin, welches im Reagenzglas präpariert wurde, dieselben Resultate. So erklären wir die mangelnde Temperaturreaktion bei dem Tiere, welches eine Anaphylatoxinmenge erhalten hatte, die gewiß größer war als die pyrogene Minimaldosis. Das Tier, das Mengen von pyrogenem Typhusgift erhalten hatte, die größer waren als die Minimaldosis, weist keine merklichen thermischen Veränderungen auf, zeigt aber untrügliche Zeichen von schwerer Intoxikation, wie Zittern, Sträuben der Haare, allgemeines Erschlaffen der Muskulatur, Diarrhöe etc.

Wir glauben jedoch nicht, daß diese individuellen Unterschiede den Wert der erhaltenen Resultate beeinträchtigen: wenn man ihnen auch Rechnung tragen muß, um augenscheinlich paradoxe Resultate zu erklären, so zeigten doch unsere Erfahrungen wie auch die von Pfeiffer und Bessau, daß, wenn sie sich auf zahlreiche und wiederholte Reihen von Tieren beziehen, sie uns auch ein klares und regelmäßiges Bild liefern, indem nur ein verhältnismäßig kleiner Prozentsatz eine so

1) Die Autopsie des Tieres hat keine vorhergegangenen Krankheiten ergeben.

verschiedene individuelle Sensibilität des Meerschweinchens gegen das Typhusgift aufweist.

Vergleich des toxischen und des pyrogenen Wertes bei dem Typhus-, Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphylatoxin.

Noch mehr überzeugend, daß kein Parallelismus zwischen dem toxischen und dem pyrogenen Werte des Friedbergerschen Anaphylatoxins besteht, sind zweifellos die Resultate, die wir durch Tuberkuloseanaphylatoxin und Staphylokokkenanaphylatoxin erhielten und in Tabelle II zusammengestellt haben. Mit keinem der beiden Gifte gelang es uns, trotz eines hohen toxischen Wertes des Staphylokokkenanaphylatoxins (2,0 ccm tödliche Minimaldosis), bemerkenswerte Temperaturveränderungen herbeizuführen, selbst nicht mit verhältnismäßig großen Dosen bis zu 1,0 ccm.

Wir betrachten daher als Unterscheidungsmerkmal zwischen Friedbergers Anaphylatoxin und der pyrogenen Substanz: erstens die antigene Funktion der letzteren, die aus den Versuchen Moreschis und Tadinis hervorgeht, und zweitens die Abwesenheit von jeglichem quantitativen Parallelismus zwischen ihnen. Trotzdem wäre es ein Irrtum, zu glauben, daß das von uns bereitete Tuberkuloseanaphylatoxin absolut keine pyrogenen Substanzen enthalte; aller Wahrscheinlichkeit nach reagiert das Meerschweinchen, das selbst für sehr große Dosen von Tuberkulin wenig empfindlich ist, überhaupt nicht auf das pyrogene Gift. In der Tat genügt es, den Versuch auf den Menschen, der sicher viel empfindlicher gegen Tuberkulose ist, zu übertragen; hier bewirken Mengen von Tuberkuloseanaphylatoxin, welche für das Meerschweinchen indifferent sind, bei subkutaner Injektion eine intensive lokale Reaktion und eine mehr oder weniger intensive Fieberreaktion, besonders bei tuberkulösen Individuen (bis 41°), wie aus den in diesem Institut angestellten Versuchen von Moreschi und Masserini hervorgeht.

Die fehlende thermische Reaktion des Meerschweinchens auf das Staphylokokkenanaphylatoxin kann man als mangelnde Sensibilität des Tieres gegenüber dem darin enthaltenen pyrogenen Gifte erklären. Es fehlen uns jedoch in dieser Hinsicht

objektive Beweise, da die subkutane Injektion des Anaphylatoxins selbst bei Dosen von 2 ccm bei normalen Menschen und sogar in einem Fall von staphylokokkischer Septikämie weder eine lokale, noch eine nennenswerte thermische Reaktion hervorrief. Zur größeren Rechtfertigung der Scheidung zwischen pyrogener Substanz und Friedbergers Anaphylatoxin tragen die Versuche, welche in Tabelle III zusammengestellt wurden, bei; in derselben werden zwei Reihen Meerschweinchen aufgeführt; die eine wurde mit Typhusanaphylatoxin geimpft, das wie gewöhnlich mit frischem Meerschweinchennormalserum präpariert wurde, die andere Reihe dagegen mit „Anaphylatoxin“, welches mit inaktivem (56°) Serum (von demselben Tiere stammend) bereitet war.

Wir haben auch diese Substanz der Kürze halber „Anaphylatoxin“ genannt, obgleich es, wie aus den Versuchen Friedbergers und seiner Mitarbeiter hervorgeht, unmöglich ist, im Reagenzglas mit in der Wärme inaktiviertem Serum das anaphylaktische Gift herzustellen. Auch in diesem unserem Versuche stellen wir fest, daß das mit frischem Serum bereitete Anaphylatoxin bei Dosen von 2—5 ccm akut tötet und bei 1,5 ccm sehr schwere Symptome hervorruft, während das „Anaphylatoxin“, welches mit inaktiviertem Serum bereitet wurde, auch bei 4,5 ccm vom Tiere ohne die leiseste anaphylaktische Erscheinung vertragen wird; der Tod dieses letzteren erfolgt nur nach 36 Stunden, und zwar wahrscheinlich infolge der Wirkung des Endotoxins; dieses stimmt mit Lurà's Resultaten überein. In bezug auf die Anaphylaxie sind also die Symptome sehr verschieden, die man mit Anaphylatoxin, das aus frischem Serum, und andererseits mit „Anaphylatoxin“, das mit inaktiviertem Serum bereitet wurde, erhält. Dagegen herrscht vollkommene Uebereinstimmung in bezug auf die thermischen Erscheinungen, welche durch die beiden Gifte hervorgerufen werden; quantitativ sind diese vollkommen gleichwertig.

Mit Recht könnte man bemerken, daß in das Serum nur die Muttersubstanzen des pyrogenen Giftes übergegangen seien und dann in vivo durch das Komplement aktiviert worden seien. Dieser Einwand liefert jedoch keine Erklärung für die quantitative Gleichheit der pyrogenen Werte

Tabelle III.

Meerschweinchen No.	201	195	196	199	197	200	206	202	205	198	193	203
Gewicht in g	295	310	280	280	290	290	260	260	270	270	260	260
Typhus-Anaphylatoxin mit frischem Serum hergestellt	0,005	.	0,01	.	0,05	.	0,1	.	0,5	.	1,0	.
Typhus-Anaphylatoxin mit inaktiviertem Serum hergestellt	.	0,005	.	0,01	.	0,05	.	0,1	.	0,5	.	1,0
Temperatur vor der Injektion	18 ⁰⁰ 38,6 38,2 38,6	18 ⁰⁰ 39,0 38,8 39,0	18 ⁰⁰ 38,6 38,2 38,6	18 ⁰⁰ 39,0 38,2 38,0	18 ⁰⁰ 38,8 38,0 37,8	18 ⁰⁰ 38,6 38,4 38,2	18 ⁰⁰ 38,6 38,4 38,2	18 ⁰⁰ 39,2 39,0 38,8	18 ⁰⁰ 38,4 38,0 38,0	18 ⁰⁰ 39,0 38,6 38,6	18 ⁰⁰ 39,2 38,6 38,6	18 ⁰⁰ 38,8 38,2 37,8
Injektion 12 ⁰⁰												
Temperatur nach der Injektion	14 ⁰⁰ 38,6 39,4 40,0 39,4 38,6 39,2 38,8 39,0 39,2 38,8 38,6 39,0	14 ⁰⁰ 39,2 39,8 40,1 39,6 38,6 39,2 38,8 39,0 39,2 39,8 39,0 39,0	14 ⁰⁰ 39,0 39,2 40,0 39,6 39,6 39,4 39,6 39,0 39,4 39,5 38,4 39,0 39,0	14 ⁰⁰ 38,6 40,6 40,8 40,2 39,4 39,6 39,1 39,5 39,4 38,4 38,8 39,0	14 ⁰⁰ 39,8 40,4 40,9 40,6 39,8 40,0 39,5 40,5 39,6 39,5 39,0 39,4	14 ⁰⁰ 39,1 40,4 40,4 37,9 40,1 40,0 39,8 40,2 40,4 39,9 39,0 38,8 39,0	14 ⁰⁰ 39,1 40,0 40,4 40,6 40,2 40,3 40,4 40,5 40,2 39,9 39,0 38,4 39,0 38,8	14 ⁰⁰ 40,4 39,8 40,6 40,6 39,8 39,8 39,8 40,2 39,4 39,3 38,4 39,0 39,4	14 ⁰⁰ 39,6 39,8 40,0 39,0 39,8 39,8 39,8 39,8 39,4 39,3 38,8 39,4	14 ⁰⁰ 40,0 39,3 39,9 39,2 40,2 40,6 37,6 38,8 39,6 39,5 39,8 39,4	14 ⁰⁰ 38,4 38,6 39,2 39,0 39,8 38,3 40,0 39,9 39,6 38,8 39,9 39,4	14 ⁰⁰ 38,6 38,5 39,5 39,0 40,0 38,3 40,0 39,9 39,6 39,5 39,8 39,4

des mit frischem Serum bereiteten und des mit inaktiviertem Serum hergestellten Anaphylatoxins. Wir erwähnen jedenfalls diese Tatsachen, wenn auch nur zur Begründung einer eventuellen Trennung von Friedbergers Anaphylatoxin von den pyrogenen bakteriischen Giften, ohne ihnen einen absoluten Wert beizumessen.

Eine letzte Gruppe von Versuchen dient dagegen dazu, eine sichere Trennung zwischen den beiden Giften, dem pyrogenen Gift und Friedbergers Anaphylatoxin, zu schaffen; sie begründet sich auf die

Versuche der Filtration des pyrogenen Giftes und des Friedbergerschen Anaphylatoxins durch die Kerze von Chamberland.

Um ganz sicher die Beteiligung von Bacillen bei den durch das Typhusanaphylatoxin hervorgerufenen Reaktionen zu verhüten, haben wir das Typhusanaphylatoxin nicht zentrifugiert, sondern durch kleine Chamberlandkerzen filtriert (Marke F).

Das Filtrieren wurde durch leichte Saugung mittels einer Wasserpumpe erleichtert. Wir haben auf diese Weise festgestellt, daß zu wiederholten Malen bereitete Typhus-, sowie auch Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphylatoxine vollständig ihre Aktivität als anaphylaktisches Gift verlieren, wenn sie durch Chamberlandkerzen filtriert werden (s. Tabelle IV). Wenn auch das Typhusanaphylatoxin seine ganze Aktivität nach der Filtration verliert, so bleibt doch seine pyrogene Funktion quantitativ unverändert (Tabelle V). Es ist uns nicht gelungen, festzustellen, wieso das anaphylaktische Gift durch die Filtration verloren geht, es wurden bemerkenswerte Mengen von Typhusanaphylatoxin (in einem ersten Versuche 15 ccm, bei tödlicher Minimaldosis 1,5 ccm, in einem zweiten Versuche 20 ccm, bei tödlicher Minimaldosis 1,5 ccm) durch die Kerze filtriert; jedoch weder durch direkte Waschung der Kerze mit physiologischer Kochsalzlösung noch durch Zermahlen derselben nach der Filtration und durch Extrahieren dieses Pulvers mit 0,85-proz. NaCl-Lösung war es möglich, Spuren des Giftes nachzuweisen. Wir glaubten nicht, daß das Verschwinden des Giftes Aenderungen der Reaktion des Serums durch die

Tabelle IV.

Typhusanaphylatoxin			Tuberkuloseanaphylatoxin			Staphylokokkenanaphylatoxin		
Abzentrifugiert	Filteriert	Resultat	Abzentrifugiert	Filteriert	Resultat	Abzentrifugiert	Filteriert	Resultat
A 2,5 ccm	4 ccm	kein anaphylaktisches Symptom	3,5 ccm	5 ccm	kein Symptom	2 ccm	5 ccm	kein Symptom
B 1,0 "	4 "							
C 2,0 "	5 "							

Tabelle V.
 Typhusanaphylatoxin { abzentrifugiert: tödliche Minimaldosis = 2,0 ccm
 Filteriert: 5,0 ccm

Meerschweinchen No.	Pyrogener Wert des abzentrifugierten Typhusanaphylatoxins					Pyrogener Wert des filterierten Typhusanaphylatoxins						
	297	299	298	300	305	306	295	301	296	303	307	302
Gewicht in g	285	295	320	330	340	350	295	295	315	340	340	355
Anaphylatoxinmenge	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	0,005	0,01	0,01	0,1	0,5	1,0
Temp. vor der Inj. 9 ⁴⁵	39,4	38,6	39,0	38,8	39,0	39,4	38,8	38,8	39,0	39,0	39,0	38,8
Injektion 11 ³⁰												
Temp. nach der Injektion	13 ⁴⁵ 14 ⁴⁵ 17 ³⁰ 20 ³⁰ 23 ³⁰	39,2 39,8 39,6 39,2 38,8	39,8 39,6 39,4 39,2 39,0	39,5 40,2 40,0 39,2 38,6	40,0 40,2 39,9 40,2 39,8	40,4 40,6 40,4 40,4 40,7	39,2 39,8 39,6 39,0 38,4	39,9 40,0 39,8 39,0 38,4	39,4 40,2 40,0 39,2 39,2	39,6 40,6 40,5 39,2 39,2	40,2 40,4 40,1 40,4 40,2	40,0 41,0 40,0 40,2 39,8

2

Filtrierung zuzuschreiben sei, wie z. B. einer Zunahme an Alkalinität. Auch aus neueren Forschungen Friedbergers und A. Moreschis geht hervor, daß das Hinzufügen verhältnismäßig kleiner Mengen von Alkali das Anaphylatoxin inaktiviert. Um die Möglichkeit einer Alkalisierung des Serums durch die Chamberlandkerzen zu vermeiden, wurden die Kerzen vor der Filtrierung einer Waschung mit destilliertem Wasser unterzogen und dann ausgeglüht. Wahrscheinlich decken sich unsere Resultate eher mit denen von Friedberger und Jerusalem, Sachs und Ritz, welche eine Inaktivierung des Prodigiosus-B-Anaphylatoxins mittels der Tierkohle bzw. des Kaolins feststellten. Nachdem die Unabhängigkeit von Friedbergers Anaphylatoxin von dem pyrogenen bakteriischen Gift auf diese Weise experimentell begründet worden war, kann man sich fragen, ob trotz dieser Unabhängigkeit noch die Annahme von jenen Beziehungen zwischen Anaphylatoxin und Fieber möglich ist, welche besonders von Friedberger vertreten wird. Zweifellos muß die klinische Beobachtung im Fieber eine jener Erscheinungen sehen, welche das anaphylaktische Bild begleiten, wie uns die Symptomatologie der Serumkrankheit und die Tuberkulinreaktion, die dem Kliniker bekanntesten anaphylaktischen Erscheinungen, lehren; aber auch die experimentellen Resultate zeigen uns die Anaphylaxie als einen Faktor von größter Wichtigkeit bei den thermischen Störungen des Körpers, z. B. das Fallen der Temperatur unter die Norm, auf welches H. Pfeiffer als konstantes Symptom der schweren anaphylaktischen Intoxikation aufmerksam machte, und die Fieberreaktion, welche Friedberger und Mita als konstante Symptome der verhältnismäßig leichten anaphylaktischen Intoxikation erkannt haben.

Einerseits sind es die engen Beziehungen zwischen Anaphylaxie und Fieber, welche aus der klinischen experimentellen Beobachtung hervorgehen, andererseits der Mangel einer pyrogenen Funktion bei Friedbergers Anaphylatoxin, welche uns zu folgenden Hypothesen zwingen: Es ist entweder streng zu unterscheiden zwischen dem fiebererzeugenden Gift und demjenigen, welches die sehr schweren Symptome, die der Anaphylaxie eigen sind, verursacht, oder es ist in Wirklichkeit nicht das Anaphylatoxin, welches Friedberger in vitro

erhält, das die anaphylaktischen Erscheinungen hervorruft. Konkreterweise können wir nur folgendes feststellen:

Da die antigene Funktion sowohl in der Typhusleibes- substanz (R. Kraus, Besredka, Pfeiffer und Bessau) wie in den pyrogenen Substanzen des Typhusanaphylatoxins (Moreschi und Tadini) nachgewiesen ist und andererseits auch die Wirkung der Typhusantikörper und des Komplements bei der Entgiftung der obengenannten Sub- stanzen bewiesen ist, wird in uns die Ueberzeugung bestärkt, daß das Pfeiffersche Typhusendotoxin und die pyrogenen Substanzen des Friedbergerschen Typhusanaphylatoxins ein und dieselbe Substanz seien.

Zusammenfassung.

I. Es besteht kein Parallelismus zwischen pyrogenem und anaphylaktischem Wert des Typhusanaphylatoxins.

II. Mit Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphylatoxin gelingt es nicht, bemerkenswerte Temperaturveränderungen bei Meerschweinchen herbeizuführen, selbst nicht mit verhältnis- mäßig großen Dosen bis zu 1,0 ccm.

III. Die Digerierung der Typhusbakterien mit frischem oder mit inaktiviertem (56° C) Meerschweinchenserum liefert nach Zentrifugation Abgüsse, die in bezug auf die thermischen Erscheinungen quantitativ gleichwertig zu betrachten sind.

IV. Typhus-, Tuberkulose- und Staphylokokkenanaphyla- toxin verlieren vollständig ihre Aktivität als anaphylaktisches Gift, wenn sie durch Chamberlandkerzen filtriert werden. Wenn auch das Typhusanaphylatoxin seine ganze Aktivität nach der Filtration verliert, so bleibt doch seine pyrogene Funktion quantitativ unverändert.

Literatur.

- 1) Moreschi und Tadini, Il Policlinico, Sez. medica, 1911.
- 2) Moreschi, Atti del Congresso di medicina interna. Torino 1911.
- 3) Friedberger und Mita, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10, p. 216.
- 4) Sachs und Ritz, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 22.
- 5) Moreschi und Vallardi, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 31.
- 6) Pfeiffer, R., und Bessau, Centralbl. f. Bakt., Orig., 1911.
- 7) Friedberger und Castelli, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, p. 179.
- 8) Friedberger und Vallardi, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, p. 94.
- 9) Doerr und Russ, Centralbl. f. Bakt., Orig., 1912.

Nachdruck verboten.

[Aus der Tierimpfstoffgewinnungsanstalt des k. k. Ackerbau-
ministeriums Wien-Mödling.]

Ueber Rotlaufimmunität.

II. Mitteilung.

Die künstliche Erzeugung des Schweinerotlaufs.

Von Hans Ganslmayer.

Mit 7 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. September 1913.)

Die experimentelle Erzeugung des Schweinerotlaufs gilt noch immer im allgemeinen als eine Art Zufall. Man spricht von einer individuellen Disposition, von einer sehr variablen Empfänglichkeit und schreibt solchen scheinbar unbestimmbaren Momenten den guten oder schlechten Ausgang des Experimentes zu.

Wie verschieden die Ergebnisse der Forschung in dieser Frage sind, zeigt die Literatur. Bang konnte durch Impfung oder Fütterung mit erkrankten Herzklappen oder mit den herausgezüchteten Bacillen an 4 älteren Ferkeln Rotlauf nicht erzeugen. Er sagt: „Es gelingt keineswegs immer, Schweine durch Impfung und Fütterung mit bacillenhaltigem, für Mäuse virulentem Material von akuten Rotlauffällen zu infizieren.“ Er hatte mit Milz von Schweinen, die am akuten Rotlauf eingegangen waren, und mit Eingeweiden rotlaufkranker Mäuse in zwei Fällen negativen Erfolg. Ebenso konnte Jensen mit Nesselausschlagreinkulturen Ferkel nicht krank machen, wohl aber Tauben; Ferkel auch nicht durch Fütterung. Er hatte beim Versuche, Schweine mit Rotlaufbacillen zu infizieren, fast immer negative Resultate. Lorenz erwähnt einen Versuch, in welchem er ein Kontrolltier (Ferkel) anfangs Dezember 1891 impfte; das Tier zeigte anfangs keine Reaktion, erkrankte aber später an Rotlaufendocarditis und ging anfangs März 1892 daran zugrunde.

Löffler impfte 2 junge Schweine. Beide blieben gesund, wogegen die Kontrollmäuse nach 3 Tagen starben. Er verfütterte den Inhalt zweier mit Rotlaufbacillen infizierter Gelatineröhrchen, in Milch verteilt, nach 24-stündigem Stehen, gleichfalls ohne Erfolg. Nach weiteren 5 Tagen bekamen die Tiere Rotlaufbacillenbouillon, je eine Spritze an verschiedenen Körperstellen, injiziert. Bis auf etwas verminderte Freßlust während des nächsten Tages, blieben beide anscheinend gesund. Nach weiteren 3 Tagen

wurden beide mit der frischen Milz eines an Rotlauf verendeten Schweines am Bauche und am rechten Ohr geimpft. Beide Tiere blieben bis auf geringe Anschwellungen der Impfstellen gesund. Löffler impfte weiter mit 5-tägiger Serumrotlaufbacillen-Bouillonkultur ein ca. 8 Wochen altes Schwein subkutan am Bauche, in die Bauchhöhle, am After und am Hals. Von der gleichen, aber verdünnten Bouillon gab er einem bereits geimpften Tiere auch zum Fressen; je $\frac{1}{2}$ Liter gab er dem geimpften jungen Schweine, sowie einem zweiten Schweine von gleichem Alter in den Rachen mittels einer Flasche. Die Tiere erkrankten in wahrnehmbarer Weise nicht, blieben auch während einer mehrwöchigen Beobachtung munter und gesund. Löffler sagt: „Das negative Ergebnis der Infektionsversuche bei den Schweinen spricht anscheinend gegen die Annahme, daß die feinen Stäbchen das Rotlaufvirus darstellen.“ Er glaubte in den jungen Tieren, die er vor sich hatte, Tiere edlerer Rasse, welche für den Rotlauf empfänglich sind, zu haben; wie sie jedoch älter wurden, sah er, daß sie zu einem viel widerstandsfähigeren Landschlage gehören, der weniger empfänglich ist; aus diesem Grunde mißt er seinen negativen Infektionsresultaten keinen besonderen Wert zu.

Schütz hingegen konnte 2 gesunde, ca. 3 Monate alte Schweine halbenglischer Rasse nach 5–6 Tagen an akutem Rotlauf töten.

Preisz wieder gelang es, durch Einreiben von Bacillenkulturen in die oberflächlich geritzte Haut Ferkel zu töten.

Prettner impfte 2 Ferkel, hochveredelt, 2 Monate alt, subkutan, eines mit 3 g, das andere per venam auric. mit 3 g einer 2-tägigen Rotlaufkultur; die mit 0,5 subkutan geimpften 2 Mäuse verendeten am 3. Tage nach der Impfung; das subkutan geimpfte Ferkel erkrankte überhaupt nicht, das intravenös geimpfte fraß nur 2 Tage nach der Infektion weniger und fieberte ($40,4^{\circ}$), am 4. Tage nach der Impfung war es normal. Die Schweine waren aber für den Rotlauf empfänglich, da im gleichen Dorfe, aus welchem die Tiere stammten, zwei Stallgenossen erkrankten. Er impfte weiter einem Tiere 10 g intravenös ohne jeden Erfolg. Weiter eines mit 5 g zerriebener Rotlaufmilz intraperitoneal ohne jeden Erfolg; weiter einem 30 g Rotlaufbouillonkultur mit Sonde in den Magen ohne Erfolg. Milzbrei und Kultur tötete Kontrollmäuse binnen $1\frac{1}{2}$ Tagen. Weiter ein Ferkel, 2 Monate alt; es erkrankte ganz wenig, Fieber 41° durch 2 Tage, fraß weniger und zeigte eine Rötung der Haut an der inneren Seite des Schenkels und des Unterbauches. Binnen 6 Tagen schwanden diese Zustände und das Schwein war wieder normal. Er impfte weiter ein 6 Monate altes Tier; es erkrankte am zweiten Tag, fieberte stark, fraß nicht; am dritten Tage steigerten sich diese Symptome, am sechsten Tage war es an Rotlauf gefallen. Es gelang ihm noch so alte Tiere zu infizieren. Aus seinen Versuchen schließt Prettner: „Der Bac. erys. suis ist auf edle Schweinerrassen, und zwar auf ältere Individuen, über 5 Monate, experimentell leicht übertragbar, gar nicht auf unveredelte Rassen und Ferkel.“

Kitt sagt, daß die experimentelle Erzeugung des Rotlaufes gelingt, daß jedoch einzelne oder mehrere Tiere unter einer größeren Zahl ge-

impfter gesund bleiben können oder nur leicht erkranken, da ja die Disposition der Schweine individuell verschieden ist.

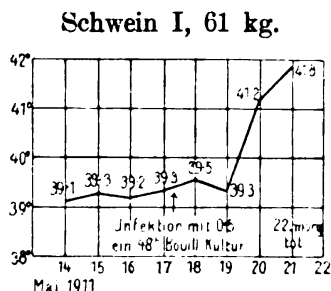
Im Jahre 1911 wurden am Institut größere Versuche zur Auswertung eines neuen, stärkeren Impfstammes gemeinsam mit Kirschik und Schnürer gemacht. Diese Versuche erforderten eine größere Anzahl Kontrolltiere, denen Rotlaufbacillen allein injiziert wurden. Der ungünstige Ausgang dieser Kontrollversuche hätte auf den Gang des großen Versuches mitunter störend einwirken können. Es wurden daher, wenn möglich, alle Tiere unter solchen Umständen infiziert, daß man annehmen konnte, sie werden der Infektion erliegen.

Die Schweine, die wir zu diesem Zwecke verwendeten, waren halb-englischer Rasse; sie stammten aus einem rotlauffreien Distrikt Oberösterreichs. Die Rotlaufkultur, die wir verwendeten, war eine Mischkultur, aus zwei Stämmen hergestellt, von welchen der eine Stamm bei intraperitonealer Applikation in den Dosen 0,05, 0,01 und 0,005 weiße Mäuse in 36–64 Stunden tötete und der andere Tauben in durchschnittlich 3–4 Tagen. Der aus diesen Stämmen durch Bouillonkulturmischung herausgezüchtete Stamm tötete 15 g schwere weiße Mäuse bei öfteren Auswertungen annähernd immer gleich bis zu der Dosis 0,005 ccm.

Zuerst stellten wir 2 Schweine als Kontrollen ein, das eine wog 61 kg, das andere 34 kg; beide wurden am 17. V. 1911 mit 0,5 ccm obiger Kultur subkutan infiziert. Das schwerere fiel am 22. V. an Rotlauf, das leichtere reagierte in gar keiner Weise; es hatte nach der Injektion immer gute Freßlust und keine Temperatursteigerung. Wir verwendeten von da ab nur noch im Gewichte höher stehende Tiere. Die Annahme, daß schwerere Tiere empfindlicher sind, fand in den weiteren Experimenten ihre Bestätigung. Im nachstehenden sind die Fälle aus unseren Versuchen verzeichnet.

Schwein I.

Halbenglisch veredeltes Tier, 61 kg schwer, am 17. V. 1911 (s. oben) mit 0,5 der 48-stündigen Rotlaufbouillonkultur subkutan geimpft. Nach 24 Stunden schlechte Freßlust, am 20. V. Temperatur 41,2°, am 21. Temperatur 41,8°, beginnende Verfärbung der Haut im Mittelfleische, am 22. tot. Rotlauf mikroskopisch und kulturell festgestellt. (Kurve 1.)

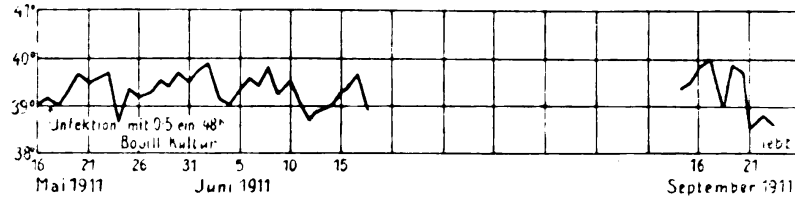


Kurve 1.

Schwein II.

Der gleichen Rasse wie I, 34 kg schwer, erhielt von der gleichen Kultur wie I am 17. V. 1911 (s. oben) 0,5 subkutan. Im Befinden des Tieres trat in den darauffolgenden Tagen gar keine Veränderung ein; es fraß, war recht munter und zeigte keinerlei Temperaturerhöhung. Am

Schwein II, 34 kg.



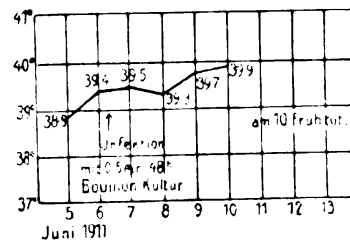
Kurve 2.

12. IX., nach also beiläufig 4 Monaten, erkrankte in der gleichen Abteilung ein anderes Schwein an Rotlauf; da reagierte nun auch Schwein II einerseits durch verminderte Freßlust, andererseits durch Steigerung der Temperatur. Es wurde später lebend und gesund ausgemustert. (Kurve 2.)

Schwein XVII.

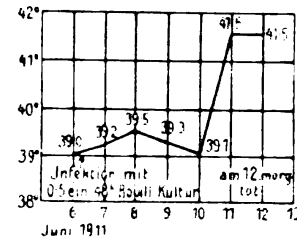
Der gleichen Rasse wie I und II, 53,5 kg schwer, erhielt am 6. VI. 1911 subkutan 0,5 der gleichen Kultur (48-stündig); am 7. VI. verminderte Freßlust; ohne daß es eine besondere Temperatursteigerung gezeigt hätte, fand man es am 10. VI. im Stalle tot. Rotlauf mikroskopisch und kulturell festgestellt. (Kurve 3.)

Schwein XVII, 53,5 kg.



Kurve 3.

Schwein XVIII, 70 kg.



Kurve 4.

Schwein XVIII.

Wie XVII, 70 kg schwer, erhielt am 6. VI. subkutan 0,5 ccm der gleichen Kultur, zeigte am 8. VI. stark verminderte Freßlust, am 10. und 11. hohe Temperatur und war am 12. tot. Rotlauf wurde mikroskopisch und kulturell festgestellt. (Kurve 4.)

Schwein XXI.

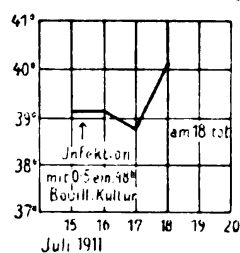
Wie oben, 75 kg schwer, bekam am 15. VII. subkutan 0,5 ccm der gleichen Kultur; am 17. VII. Freßlust schlecht, am 18. VII. Temperatur

40,1°; am 18. VII. tot. Rotlauf wurde mikroskopisch und kulturell festgestellt. (Kurve 5.)

Schwein XXXV.

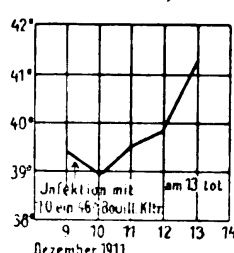
Wie oben, 71 kg schwer, erhielt am 9. XII. subkutan 1 ccm einer 48-stündigen, aus Schwein I herausgezüchteten Kultur; am 11. schlechte Freßlust, am 12./13. Temperatursteigerung, am 13. Auftreten roter Flecke in der Haut, am 13. tot. Rotlauf mikroskopisch und kulturell festgestellt. (Kurve 6.)

Schwein XXI, 75 kg.



Kurve 5.

Schwein XXV, 71 kg.



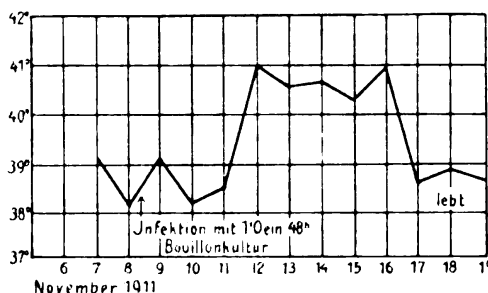
Kurve 6.

Schwein XXXVI.

Wie oben, 55 kg schwer, erhielt am 8. XI. subkutan wie XXXV 1 ccm. Am 4., 5., 6., 7., 8. und 9. Tage nach der Infektion höhere Temperaturen (bis 41°); am 9. Tage beginnt die Fieberkurve zu fallen, und von da ab ist das Tier gesund und wird als solches ausgemustert. (Kurve 7.)

Das Resultat ist also, daß von diesen 7 mit dieser Kultur (0,5 und 1,0) geimpften Schweinen 5 an Rotlauf zugrunde gegangen sind (I, XVII, XVIII, XXI, XXXV), eins sehr schwer erkrankte, aber nachher wieder gesund wurde (XXXVI), und eins trotz der Injektion von 0,5 ccm in keiner Weise reagierte (II), 4 Monate mit anderen Schweinen in der gleichen Abteilung verbrachte und nach dieser Zeit, als eines von den Stallgenossen an Rotlauf erkrankte, höhere Temperatur zeigte, ohne jedoch stärker zu erkranken.

Schwein XXXVI, 55 g.



Kurve 7.

Vergleicht man das Gewicht der einzelnen Tiere, so findet man, daß das leichteste (II, 34 kg) auf die Impfung überhaupt nicht reagierte, während die anderen (I 61 kg, XVII 53,5 kg, XVIII 70 kg, XXI 75 kg, XXXV 71 kg) in den nächsten Tagen nach der Impfung an Rotlauf eingingen.

Eins allerdings (XXXVI, 55 kg), in sehr kalter Jahreszeit geimpft (November 1911), erkrankte sehr schwer an Rotlauf, gesundete aber doch noch. Daß Jahreszeiten beim Rotlauf eine prädisponierende Rolle abgeben, wissen wir aus Erfahrung; gerade in den wärmsten Monaten sind die Schweine überaus empfindlich und weniger empfindlich in der kalten Jahreszeit. Möglicherweise besteht auch hier ein Zusammenhang.

Die Angaben in der Literatur sind bezüglich des Gewichtes der verwendeten Versuchstiere sehr mangelhaft; auffallend häufig wird über den negativen Versuchsausgang berichtet. Fast immer findet man in solchen Fällen die Angabe, daß Ferkel Verwendung fanden. Nach den Literaturangaben und diesen günstigen Versuchsergebnissen erhält man den Eindruck, daß Ferkel eine ganz bedeutende Unempfindlichkeit gegen den Rotlaufbacillus besitzen. Diese Unempfindlichkeit weicht später, wenn die Schweine durch übermäßigen Fettansatz in ihrer Konstitution verändert sind. Da sind die Tiere überaus empfindlich, man kann sie leicht künstlich infizieren.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Möglichkeit der künstlichen Erzeugung des Schweinerotlaufs berichtet. Bekanntlich gilt im allgemeinen noch, daß es nicht immer leicht ist, diese Krankheit künstlich zu erzeugen. Die Literaturangaben und die eigenen Versuche gestatten die Annahme, daß junge Schweine (Ferkel) gegen den Rotlaufbacillus sehr unempfindlich sind, und daß diese Unempfindlichkeit einer Ueberempfindlichkeit weicht, sobald die Tiere durch Verfettung in ihrer Konstitution verändert sind. Der experimentelle Arbeiter wird bei Versuchen dieser Art das Gewicht des Versuchstieres berücksichtigen müssen, wenn er auf guten

Erfolg rechnen will. Es empfiehlt sich, Schweine mit dem Gewichte über 50 kg zu verwenden.

Literatur.

- Bang, Deutsche Zeitschr. f. Tiermed. u. vergl. Pathol., Bd. 18.
Jensen, ebenda Bd. 20.
Kitt, Bakterienkunde u. path. Mikroskopie. 5. Aufl.
Löffler, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt Berlin, Bd. 1.
Lorenz, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 15.
Preisz, Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 11.
Schütz, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt Berlin, Bd. 1.

Nachdruck verboten.

[From the Bacteriological Laboratory. University College
Hospital Medical School. Dr. F. H. Thiele.]

Pathogenicity and Virulence of Bacteria.

By **F. H. Thiele** and **Dennis Embleton**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1913.)

Pathogenicity and Virulence.

In a previous communication¹⁾ we have demonstrated that the toxicity of a bacterium which does not possess an exotoxin depends upon the amount of toxic proteoclastic degradation body that can be liberated from the bacterial protein by the action of the normally present or acquired antibodies in the animal into which the organism has been inoculated; and not upon the secretion or liberation of a preformed specific endotoxin. We have been able to demonstrate that animals dying of bacterial toxæmia or septicæmia contain in their blood an intensely toxic substance, which when inoculated intravenously into a healthy guinea-pig produces acute death with the typical anaphylactic syndrome, so that the blood of animals dying from any form of bacterial toxæmia or septicæmia has an identical poison no matter what the organism, was to which the original infection was due. This toxic substance is present in large amount, several lethal doses, in the blood of animals dying from bacterial infection.

1) Proc. Royal Soc. Med., Jan. 1913.

We have also demonstrated that the blood of these animals contains proteoclastic cleavage bodies.

Now the capability of an organism to produce disease depends upon its toxicity; and this, according to our previous observations, depends upon the amount of toxic material that can be formed from the bacterial protoplasm by the antibodies in the body of the infected animal. Thus an organism will be pathogenic if the antibody activity relative to the bacterium is such that toxic substances, formed in the way described above, accumulate in such quantity so as to cause symptoms varying from fever and moderate toxaemia, to great fall of temperature and profound toxaemia, and death.

Such being the case, pathogenicity is relative; depending upon the antibody activity and the amount of bacterial protoplasm, that is to say upon the quantity originally inoculated and the rate of multiplication. Thus some organisms are pathogenic in small doses, others, only in large doses. In the case of the former the antibody activity is relatively low, so that the toxic substances formed are not rapidly further broken down to non-toxic ones and so accumulate; in the latter high, the bacterial protoplasm being rapidly degraded beyond the toxic stages and thus toxic substances only accumulate when the antibody activity is slowed, owing to the presence of a large quantity of antigen.

Bacteria may thus be divided into three groups.

- I. Those against which the antibody activity is so low that toxic substances can be liberated only very slowly from them, so slowly that they cannot accumulate in sufficient quantity to cause symptoms.
- II. Those against which the antibody activity is such that with moderately small doses of bacteria, toxic substances can be split off at such a rate that they accumulate in sufficient quantity to cause symptoms. These are the ordinary pathogenic bacteria.
- III. Those against which the antibody activity is so high that with ordinary doses no symptoms ensue because the toxic substances do not accumulate, but are rapidly further degraded into non toxic ones. Bacteria in this group are only pathogenic in massive doses.

Having in our previous work arrived at these conclusions we expected that the majority of non-pathogenic bacteria would fall into group I, that is these bacteria were non-pathogenic by reason of the relatively low antibody activity against them. We accordingly endeavoured to make these bacteria pathogenic by raising the antibody activity against them. For this purpose we obtained large quantities of various bacteria, ordinarily regarded as non-pathogenic to the guinea-pig. The bacteria were killed, dried in vacuo, weighed and suspended in sterile normal saline.

Doses of 20 mgr. dry weight of the various bacteria were then inoculated intraperitoneally into a series of normal guinea-pigs.

At the outset it became evident that all the non-pathogenic bacteria were not so, for the reason which we assumed; but, that certain of them really belonged to group III, that is, toxic symptoms were produced on their inoculation when the amount was sufficiently large.

The bacteria used were:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1. <i>B. mycoides</i> | 7. <i>B. fluorescens liquefaciens</i> |
| 2. <i>B. phlei</i> | 8. <i>B. proteus Zenkeri</i> |
| 3. <i>B. smegma</i> | 9. <i>Streptococcus</i> |
| 4. <i>Staphylococcus aureus</i> | 10. <i>Sarcina lutea</i> |
| 5. <i>B. prodigiosus</i> | 11. <i>B. Hoffmann</i> |
| 6. <i>B. cyanogenus</i> | |

Now the organisms which did not produce toxic symptoms in the dose inoculated were:

- | | |
|--------------------|--------------------------------------|
| <i>B. mycoides</i> | <i>Sarcina lutea</i> |
| <i>B. phlei</i> | <i>B. pseudodiphtheriae Hoffmann</i> |
| <i>B. smegma</i> | <i>B. proteus Zenkeri</i> |

The others all produced delayed death in from 18—36 hours. The symptoms were those noted in our previous papers on Bacterial Toxicity¹⁾, namely a fall of temperature, gradually spreading paresis, respiratory disturbance. P.M. right heart and veins distended, varying degrees of pulmonary emphysema. The blood of these animals when inoculated into normal guinea-pigs intravenously produced acute anaphylactic

1) Congress Public Health (Paris), 1913; Intern. med. Congress (London), 1913; Brit. Med. Ass. Congress (Brighton), 1913.

death. With some of these bacteria, smaller doses, 10 mgr. and even 5 mgr., produced delayed death. This was the case with *B. prodigiosus*, cyanogenus and *Staphylococcus aureus*. From this we concluded that the antibody activity against these organisms instead of being low, was high; high enough to prevent the accumulation of toxic substances, split off from the usual doses of the bacteria, but was not high enough to deal with such massive doses as those given. These bacteria are, therefore, naturally non-pathogenic, owing to the high antibody activity of the guinea-pig against them.

For the time being we considered *B. mycoides*, phlei, smegma, Hoffmann, and *Sarcina lutea* as belonging to group I.

We shall deal with these organisms in detail.

B. mycoides. Our first experiments with this organism were carried out with a well-known laboratory strain of this organism. A single colony was taken and this had all the classical characteristics of the organism. This bacterium was flagellated, had no capsule and would not grow at the body temperature. By repeated subcultures and gradually raising the temperature of incubation every few days, we succeeded in educating the organism to grow at the body temperature. The organism was only with great difficulty kept alive at this temperature. The organism in this state was incapable of producing disease in a normal guinea-pig in doses of one to six agar slopes.

A guinea-pig of 385 gr. which had been inoculated as mentioned above with 20 mgr. dry weight of the dead organism seven days previously received one agar slope of the 37° C growing homologous organism intraperitoneally. The animal died in 60 hours with the symptoms of bacterial toxæmia described above. P.M. Oedema of the abdominal wall, turbid, slightly viscid peritoneal effusion, congestion and great enlargement of the spleen, congestion of the liver and kidneys: pulmonary emphysema, slight pleural effusion. Distension of the right side of the heart and venous engorgement. The urinary and gall bladders were distended. The organism was obtained in pure culture from the oedema fluids and exudates, the heart's blood, spleen and other viscera, urine, bile and faeces. Microscopically the organism was present in huge quantities in the capillaries of all the viscera, not in the parenchyma. The appearances were indistinguishable from anthrax infection. The bacterium itself in the blood and organs had no spores and had developed a thick capsule. The bacteria appeared very granular when stained by Gram's method. (The organism now grew easily at the body temperature and spored freely and could not be distinguished from *B. anthrax*.) The blood contained an intensely toxic substance, which when inoculated intravenously into a normal guinea-pig produced acute anaphylactic death.

Numerous pigs have been similarly treated and in every case without exception an identical result has occurred.

We found that the optimum time for the inoculation of the second dose was from 5—10 days after the sensitising dose. In this time all trace of the original dose had disappeared and the peritoneum appeared perfectly normal. If the second dose (the living organism) was given at the time of the inoculation or on the second or third day after the primary inoculation death did not occur and the animal showed no obvious signs of illness. If the living dose was given 14 days or longer after the sensitising dose, death did not always occur, it being necessary, in order to be certain of producing septicaemic death, to give 2 agar slopes or more. After three weeks a very large dose had to be given to produce death and then death was not due to septicaemia, but to toxæmia, as the organism could not be recovered from the heart's blood.

Another strain of *B. mycoides*, isolated from garden soil, behaved in the same way, after it had been educated to grow at the body temperature, in which state it was non-pathogenic. Other strains isolated did not survive the process of education to grow at the body temperature.

While isolating the above-mentioned strains, we obtained several strains of very similar organisms both culturally and microscopically.

These organisms readily grew at the body temperature and were directly pathogenic to guinea-pigs in doses of $\frac{1}{2}$ an agar slope, death from this dose occurring in about 8 hours. The mode of death was similar to that described above. The postmortem appearances were the usual right-sided engorgement and congestion, pulmonary emphysema, some degree of enlargement of the spleen. The organisms were obtained in small number only, in other cases not at all, from the heart's blood and spleen. Microscopically a small number of organisms was seen in the capillaries of the various organs. The organism did not develop a capsule like the *B. mycoides*.

Experiments were then carried out to see if the pathogenicity could be raised and the organism made to develop a capsule and give rise to an anthrax-like disease.

A series of guinea-pigs was therefore inoculated with 20 mgr. dry weight of the dead bacteria and after intervals of 2, 3, 4 and 5 days successive members of each series were inoculated with a dose certainly fatal to the normal guinea-pig, i. e. $\frac{1}{2}$ —1 agar slope. The animals all recovered. With two or more agar slopes the animal died, but the organism did not develop a capsule and was present only in small quantities as before, and the disease did not resemble anthrax.

We have thus been able to obtain non-pathogenic strains of *B. mycoides*, which became pathogenic when the antibody activity against them was raised, and closely allied strains, which were primarily pathogenic, but were rendered non-pathogenic on increasing the antibody activity against them.

We will return to this subject later in our subsequent discussion.

B. phlei (Timothy Grass Bacillus). Cultures of this organism were obtained from a single colony of a well-known laboratory strain. The organism produced no progressive lesions in a guinea-pig intraperitoneally (in 20 mgr. dry weight of the dead organism or in 6 agar slopes of the live organism). A certain degree of plastic peritonitis occurred with a few purulent pseudotubercles, these eventually cleared up leaving the peritoneum quite normal. After sensitising normal guinea-pigs with 20 mgr. dry weight of this organism a subsequent inoculation of one agar slope was given to a guinea-pig of 340 gr. The animal began to waste, went off its feed and eventually died in 10 days. P. M. Marked wasting, in addition to the slight plastic peritonitis and pseudotubercles, the peritoneum was studded with small tubercles. There were miliary tubercles in the abdominal viscera and in the lungs. The organism was recovered from the heart's blood.

Microscopic examination: the miliary tubercles were quite different from the pseudo tubercles produced by the organism in the ordinary way. In the lungs the tubercles showed no necrosis, but marked epithelioid reaction. The alveolar walls were greatly thickened and the alveoli obliterated, so that the appearance in the lung was just like that produced in the early stage of grey miliary tubercles by the *B. tuberculosis*.

In the abdominal viscera the tubercles showed central granular necrosis.

Many other experiments were performed in the same way and death always ensued with the same gross postmortem and microscopical appearances in from 10—14 Tage.

B. smegmatis. This organism, obtained and injected into guinea-pigs with the same precautions as were used for the *B. phlei* gave rise to a fatal infection in from 10—14 days. The gross P. M. and microscopical findings were identical with those described under *B. phlei*.

Parallel to these is an experiment in which we were able to produce acute miliary tuberculosis in a rabbit with a very small quantity of human tubercle bacilli.

A rabbit of 2500 gr. was inoculated with 0.05 mgr. of human tubercle bacilli, 14 days after sensitisation with 50 mgr. of killed pulverised tubercle bacilli (Meister, Lucius & Brüning). The rabbit died in one week, having the postmortem appearances of acute miliary tuberculosis the only difference being large necrotic areas in the spleen.

The control rabbit of 2300 gr. received only a dose of 0.05 mgr. of the same tubercle culture as was used for the previous animal. Six months later it was alive and well and after killing it a postmortem examination revealed no signs of tuberculosis.

B. pseudo-diphtheriae Hoffmanni. A series of guinea-pigs were inoculated with 20 mgr. dry weight of a culture of *B. Hoffmanni*, which had the cultural, morphological, staining and fermentative characteristics of a classical *B. Hoffmanni* and was not pathogenic to guinea-pigs in doses of 10 agar slopes and more. Seven days later the guinea-pigs were inoculated with from 1—10 agar slopes and in no case did death occur. Because of this we thought that the antibody activity had by this time (one week) become too high. We accordingly inoculated the guinea-pigs with living *B. Hoffmanni* at the time of the sensitising dose, 1, 2, 3, and 4 days afterwards with 6 agar slopes and some even received daily doses of living bacteria after sensitising. In no case did the animal die of *B. Hoffmanni* septicaemia.

Table I. *B. Hoffmanni*.

Series 1. Guinea-pigs 250—300 gr. inoculated i.p. 20 mgr. dry weight *B. Hoffmanni*. 7 days after, inoculated with living bacteria, i.p.

Guinea-pig No.	1	2	3	4	5	6
Dose in agar slopes	1	2	4	6	8	10
Result	Nil	Nil	Nil	Nil	died 7 days*)	died 7 days*)

*) No *B. Hoffmanni*, P. M. anywhere, *B. chicken cholera* cause of death.

Series 2. Same sensitising dose: 4 agar slopes living *B. Hoffmanni* second dose.

Guinea-pig No.	1	2	3	4	5	6
Date of 2nd dose (living) in days after sensitising dose	0 simultaneously	1	2	3	4	5
Result	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

45*

Series 3. Same sensitising dose.

Days after inoculation	0	1	2	3	4	Result
	Number of slopes of living bacteria					
Guinea-pig 1	2	2	2	2	2	Nil
" 2	4	4	4	4	4	Nil
" 3	—	4	4	4	4	Nil
" 4	—	—	4	4	4	Nil
" 5	—	—	6	6	6	Nil
" 6	—	—	—	6	8	Nil

From these experiments it became obvious to us that the *B. Hoffmanni* was not non-pathogenic owing to the low antibody activity in the guinea-pig, i. e. that it is not a member of our group I, but is non-pathogenic owing to a very high antibody activity, that, is it is really a member of group III.

Sarcina lutea and *B. proteus* Zenkeri. Our results with *Sarcina lutea* and *B. proteus* Zenkeri were similar to our results with the *B. Hoffmanni* and so we would also place these organisms in group III.

Table II. *B. proteus* Zenkeri.

Series 1. Guinea-pigs 250–300 gr. i.p. 20 mgr. dry weight, 7 days after the following dose, were given.

Number of pig	1	2	3	4	5	6
Dose living bacteria agar slopes	1	2	3	4	5	6
Result	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

Series 2. Sensitisation as above. 6 agar slopes given at different intervals.

Number of pig	1	2	3	4	5	6
Days after sensitisation	0	1	2	3	4	5
Result	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

Series 3. Sensitisation as before.

Days after sensitising dose	0	1	2	3	4
	Number of slopes inoculated				
Guinea-pig 1	1	1	1	1	1
" 2	—	2	2	2	2
" 3	—	—	3	3	3
" 4	—	—	—	4	6

With *Sarcina lutea* the results are the same using 2–4, 48 hours thickly grown slopes.

We will now proceed to discuss the organisms we have placed under group III. These organisms we consider to be non-pathogenic to the guinea-pig, owing to the high antibody activity against them.

The organisms we have placed in this group are:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. <i>B. prodigiosus</i> | 5. <i>B. Hoffmanni</i> |
| 2. <i>B. cyanogenus</i> | 6. <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 3. <i>B. fluorescens liquefaciens</i> | 7. <i>Streptococcus erysipelatus</i> |
| 4. <i>B. proteus Zenkeri</i> | 8. <i>Sarcina lutea</i> |

If our surmise with regard to these bacteria is correct, it should be possible to produce septicaemia with all these organisms if the antibody activity be in some way or other inhibited.

In order to inhibit the antibody activity we made use of an observation of Friedberger, that hypertonic saline inhibits anaphylactic shock, by slowing the ferment activity.

We therefore inoculated emulsions of cultures of these organisms, raised from single colonies, in 2, 3, and 5 % saline. In all cases by this method we produced septicaemic death, the organisms being recovered in all cases from the heart's blood.

Table III.

		Number of slopes required to cause death from septicaemia
Saline 5 %		
<i>B. prodigiosus</i>		3-4 slopes
<i>B. cyanogenus</i>		6 slopes
<i>B. fluorescens liquefaciens</i>		8-10 slopes
<i>B. proteus Zenkeri</i>		more than 7 slopes*)
<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>		4 slopes
<i>Streptococcus erysipelatus</i>		8-10 slopes
<i>Sarcina lutea</i>		4 slopes
<i>B. Hoffmanni</i>		10-12 slopes
Gelatine 30 %		
<i>B. prodigiosus</i>		2-3 slopes
<i>B. cyanogenus</i>		6 slopes
<i>B. fluorescens liquefaciens</i>		8-10 slopes
<i>B. proteus Zenkeri</i>		8 slopes (4 slopes toxaemic death)
<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>		1 slope
<i>Streptococcus erysipelatus</i>		8 slopes
<i>Sarcina lutea</i>		4 slopes
<i>B. Hoffmanni</i>		10-12 slopes

*) 7 slopes did not produce death either from toxaemia or septicaemia.

With doses greater than the above suspended in normal saline recovery took place in all cases.

The mode of death and postmortem appearances were the same in all cases.

Another method by which we hoped to get a similar result was by inoculating the bacteria suspended in 15 and 30 % gelatine, so that the gelatine would delay the access of the ferment to the bacteria and also, by reason of its viscosity, the phagocytes; and further retain around the bacteria the degradation bodies of the ferment action on them. The accumulation of degradation bodies in the immediate neighbourhood of the bacterium would tend to slow the action of the antibodies on the bacteria, so that they would not be rapidly destroyed and would multiply. This accumulation of degradation bodies would also act aggressively in the sense of Bail, inhibiting phagocytosis.

The gelatine by itself in the quantities used, 10—15 c. c., is without obvious effect on the guinea-pig, but it might be thought that small amounts of degradation bodies are formed from the gelatine and that these would adjuvate the action of the toxic substances liberated from the bacteria, so that the summation of the two effects might possibly account for the results obtained in these cases.

That this is not the case is seen from the following experiments. We rendered a series of guinea-pigs hypersensitive to egg-albumen and determined the dose of egg-albumen which would just not produce death, but severe symptoms and a great fall of temperature. The remainder of the series was inoculated with this dose of egg-albumen and several slopes of *Staphylococcus*, in no case did the animal die, that is septicaemia or toxaemia was never produced.

Table IV.

Guinea-pig	Weight	Dose in grammes	Result
1	300 gr.	0.02 egg-albumen	Acute death
2	286 "	0.01 "	" "
3	304 "	0.005 "	Delayed death
4	298 "	0.002 "	Very ill. Fall of temperature to 94° F. Recovery

Guinea-pig	Weight	Dose in grammes	Result
5	280 gr.	0.002 + 1 agar slope Sta-phylococcus	the same
6	320 „	0.002 + 2 agar slopes Sta-phylococcus	„ „
7	288 „	0.002 + 3 agar slopes Sta-phylococcus	„ „
8	316 „	0.002 + 4 agar slopes Sta-phylococcus	„ „

Thus it appears that gelatine does not owe its effect to any degradation bodies which may be formed from it.

Apart from the fact that the gelatine method can be used for demonstrating that where large amounts of antibody are present, corresponding large amounts of bacterial substances are necessary to produce septicaemic death, we do not consider that it is an absolute method of gauging the antibody activity of the animal against the bacterium. Using this method we have been able to produce septicaemic death not only with members of group III, but also with members of group I. The amount of bacterial protoplasm required with the latter being very much smaller than with the former. Thus by this method we have been able to produce septicaemic death with *B. mycoides*, *phlei* and *smegma*, using only one agar slope. With the saline method this is not the case. Now the normal antibodies can degrade any foreign protein, and death is produced, if sufficient of the protein has been inoculated, when the toxic substances have accumulated in sufficient amount. With regard to the organisms of group I, the antibodies act very slowly, but in the viscid gelatine the liberated toxic substances are retained in the immediate vicinity of the bacterium, zones of ferment inhibition are established and these act as aggressins and so prevent phagocytosis when the delayed phagocytes arrive.

We must now discuss the mechanism by which the hypertonic saline is able to produce a septicaemia with the organisms of group III, in the guinea-pig. Besides inhibiting ferment action, the hypertonic saline when inoculated into the peritoneal cavity causes an osmosis of the watery constituents of the plasma. This watery exudate would have a low anti-

body content. The hypertonic saline also damages the endothelial cells, for the inoculation of the hypertonic saline causes intense peritoneal irritation.

The hypertonic saline interferes with the phagocytes, preventing phagocytosis until isotonicity has been established. Finally the bacteria would be also effected, and tend to extrude their watery constituents and with them their cytoplasm, thus forming an artificial capsule in which the ferment can become engaged and so lead to the protection of the bacterium and inhibition of phagocytosis.

Thus we have proved that the Pathogenicity of Bacteria depends upon the activity of the ferments in the animal host. If there is only slight activity the organism is non-pathogenic; if there is a high degree of activity, again the bacterium is non-pathogenic; and by either increasing or diminishing the ferment activity as the case may be such a bacterium may be rendered pathogenic.

The Virulence of Bacteria.

A virulent organism is one which will, in small quantities, rapidly produce septicaemia when inoculated into a susceptible animal. Now taking this definition; at the outset it will be seen that virulence is due to two sets of factors:

1. which can be regarded as true virulence. This is an acquired characteristic of the organism (it is well-known that animal passage exalts the virulence of a bacterium for animals of the same species);

2. which depends upon the degree of antibody activity of the infected animal. This must be such that sufficient toxic degradation bodies can be formed from small quantities of the bacterium to kill the animal.

Dealing with the latter first, a very good example of this is given by the organisms somewhat resembling the *B. mycoides*, but which grow readily at the body temperature (mentioned earlier in this paper). Here the antibody activity was not high, but was just high enough to form the necessary toxic substances readily, since $\frac{1}{2}$ an agar slope of a 24 hours culture could cause death in 8 hours. If now the antibody activity is only slightly raised the organism loses its "virulence".

Thus this organism is "virulent" solely because the relative ferment activity against its protoplasm is such, that the toxic substances split off can accumulate in sufficient amount to cause death.

Dealing with true virulence, we will first of all quote our experiments with the *B. mycoides*. After septicaemia had been produced in the sensitised animal it was found that cultures, from the heart's blood and organs, of this organism when inoculated into normal guinea-pigs would produce a septicaemia resembling anthrax, which was always fatal. This experiment has been repeated numerous times with always the same result, it is necessary only to give a single example.

A guinea-pig 300 gr. was inoculated intraperitoneally with 1 agar slope of a 24 hour culture of passed *B. mycoides* suspended in 2 c.c. of normal saline. (The culture of *B. mycoides* was obtained from the heart's blood of a guinea-pig sensitised with 20 mgr. of the dead organism, which one week later had been inoculated with 1 agar slope of the non-pathogenic, hot-growing, living *B. mycoides* intraperitoneally; the animal dying 60 hours later.) The guinea-pig died in 48 hours and at the postmortem there was oedema of the abdominal wall, slightly turbid effusion in the peritoneal cavity and haemorrhage in the suprarenals. The spleen was markedly enlarged and engorged as were the liver and kidneys. There was distension of the lungs.

Microscopically the tissues had appearances identical with those of anthrax tissues, the organism itself being also indistinguishable from the *B. anthracis*.

The organism was obtained in pure culture from the heart's blood, spleen and other abdominal viscera, bile and urinary bladders, and marrow.

The *B. mycoides* on subsequent passages became so virulent that $\frac{1}{10}$ of an agar slope would kill a 300 gr. guinea-pig in 12 hours, $\frac{1}{20}$ of an agar slope a rat in under 24 hours, $\frac{1}{2}$ an agar slope a rabbit in 24 hours; by intraperitoneal injection.

Eighteen guinea-pigs were placed in cages in which other animals had died from the infection; all died as the result of alimentary infection, and showed the typical anthrax-like lesions post-mortem. It is interesting to note that one guinea-pig of this group which was pregnant showed the organism in pure culture in the amniotic fluid.

The virulence of the *B. mycoides* was best maintained on an alkaline serum agar medium. The organism retained

its power of producing disease although allowed to dry in the incubator for 8 weeks, a considerable degree of its virulence was however lost.

The organism which previous to inoculation was motile having flagella and non-capsulated, became, after passage, non-motile and thickly capsulated. Beyond the fact that it grew extremely rapidly, after passage at body temperature, its cultural characteristics were not altered.

With regard to the *B. phlei* and smegma we found that it was difficult to obtain rapidly, cultures from the heart's blood in sufficient quantities for subsequent passage.

We therefore inoculated normal guinea-pigs with a saline emulsion of the ground up spleens of animals dying from *Phlei* or *Smegma* infections. These organisms had been rendered pathogenic by inoculating cultures of them into previously sensitised animals as mentioned above. Death occurred in these animals in from 4—20 days. P.M. There was marked wasting, especially in the animals which had taken the longest time to die. There was a peritoneal effusion and miliary tubercles were found scattered throughout the whole body. In the rapidly dying ones the tubercles were only seen microscopically. By repeated passage in this way or by inoculating cultures obtained after several passages we were able to produce a septicaemic death in 36 hours.

That the tubercles were due to these organisms was shown by the fact that no other organisms, such as the *B. pseudo-tuberculosis rodentium*, could be obtained on culture and the acid-fast bacilli were found in situ in the lesions.

The *Bacillus phlei* and the *Bacillus smegmatis*, after passage through the guinea-pig, either obtained from cultures of the heart's blood or by direct inoculation of emulsions of the spleens in normal saline from infected guinea-pigs, produced disease in normal rabbits. The animals died in from 7 to 20 days and post-mortem typical miliary tubercles were found scattered throughout the viscera and serous membranes. This is very important since the organisms directly do not cause fatal disease or tubercles (retrogressive) in these animals.

With regard to the organisms of group III; we found, that after the first passage in either hypertonic saline or gelatine, cultures of *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* obtained from the heart's blood of these animals, when inoculated into normal pigs would now produce septicaemia. It was necessary to use three slopes of streptococci and one to

two slopes of staphylococci to produce septicaemia on the first occasion. Subsequent passage, however, raised the virulence of the organisms, so that $\frac{1}{2}$ an agar slope of streptococcus and $\frac{1}{4}$ of an agar slope of staphylococcus would always produce septicaemic death in 24 hours.

By Muir's method and Giemsa we were able to demonstrate the presence of capsules around these bacteria when they had become very virulent.

We were similarly able to raise the virulence of the remaining members of this group, but not so rapidly. The method adopted was to obtain cultures from the heart's blood of the various animals and on each successive inoculation to diminish the dose of organisms incorporated in either the gelatine or the hypertonic saline.

For example with the *B. fluorescens liquifaciens*, on the first passage, 10 agar slopes were emulsified in 10 c. c. of 5% NaCl solution and inoculated intraperitoneally into a guinea-pig. The animal died in 14 hours. Cultures were made from the heart's blood and after 12 hours incubation were respread to obtain a uniform growth. Eight of these 24 hours cultures were emulsified as above and reinjected into another normal guinea-pig. On the death of the guinea-pig the above process was repeated, using successively 6, 4 and 2 slopes. As the result of the last passage the organisms had become so virulent that 2 agar slopes in normal saline would cause a septicaemic death in 24 hours. The organism eventually became so virulent that less than $\frac{1}{2}$ an agar slope would kill a guinea-pig in 20 hours.

The organism in this state was found to have developed a capsule. The *B. prodigiosus* and *B. Hoffmann* were also demonstrated to possess a capsule in this state. With regard to the *P. Zenkeri*, cyanogenus and *Sarcina lutea*, the experiments were not carried through to the end and although the virulence was raised so that one agar slope would produce septicaemic death in 24 hours the question of capsule formation was not pursued.

We noticed in the process of rendering virulent the *B. Hoffmann*, that it showed elongated and granular forms, which suggested types of the diphtheria bacillus frequently met with in clinical diphtheria. We were, however, unable to produce a typical diphtheria by this method so we employed the following technique.

An old laboratory strain of the *B. Hoffmann*, which was absolutely typical and showed no long forms, was plated and a single colony isolated. From this colony, which was typical morphologically and in its fermentative reactions and showed no metachromatism on staining, sub-cultures were made. Fourteen blood serum slopes were incorporated in 20 c. c. of 30 % gelatine at 37° C and were inoculated intraperitoneally into a guinea-pig of 285 gr. The guinea-pig died in 12 hours. The peritoneal exudate was removed aseptically and was mixed with an emulsion of 12 serum slopes of the living organism the whole being made up to about 30 c. c. with 30 % gelatine. This mixture was then immediately inoculated intraperitoneally into another normal guinea-pig. This procedure was repeated incorporating each time a smaller number of serum slopes of the living *B. Hoffmann*. The examination of the peritoneal exudate on each death revealed gradual elongation of the bacilli, metachromatism, at first irregular and diffuse, later becoming bipolar. When typical morphological diphtheria-like forms were present, the effusion and the heart's blood were plated on glycerine agar or successive strokes on blood serum made. The isolated colonies were sub-cultured and those showing the typical morphological bacteria were further examined. These organisms retained their morphological character on repeated sub-cultivation and showed typical involution forms. The organism, which previous to passage was typical of the *B. Hoffmann*, was now able to ferment the same sugars etc. as the Diphtheria Bacillus, glucose, galactose, levulose, maltose, glycerin, dextrin and produced acid in milk. The toxicity of these isolated colonies was tested by growing them for 48 hours in glycerine broth. It was found that 1 c. c. of this broth inoculated subcutaneously, killed a guinea-pig of 250 gr. in 48 hours, similar doses inoculated into guinea-pigs, which had received diphtheria antitoxin intraperitoneally all survived. 2 c. c. of the toxic broth also killed a rabbit in 48 hours, smaller doses producing delayed death with paralysis.

This has been repeated with several strains of the *B. Hoffmann* and other Diphtheroid bacilli. The post-mortem appearances of a guinea-pig dying from a subcutaneous inoculation of the toxic broth were as follows:

Haemorrhagic oedema and necrosis at the site of inoculation. Haemorrhage into the suprarenali, clear exudate into the serous cavities, in addition to the usual post-mortem appearances of a guinea-pig dying from toxæmia. The organism was recovered from the heart's blood, and from the site of inoculation.

The nature and function of the bacterial capsule.

Staining by Muir's method; in granular forms of the various bacteria mentioned above, the capsule has the same staining characteristics as the bacterial cytoplasm between the

granules. Toeniessen¹⁾, in his observations on bacteria having capsules when grown on artificial media as well as in the animal body, showed that in the former condition the capsule was very broad and contained very little albuminous material, whereas in the latter condition the capsule was narrower and was wholly albuminous. Other observers consider the capsules to be mucinous, even if this is so it is bacterial protoplasm and affected by the antibodies in the same way. So we would conclude that the capsule is really a halo of bacterial protoplasm. Now the *B. mycoides*, when it became virulent developed a capsule and lost its flagella, so that the capsule formation is intimately connected with the virulence of the organism. Not only was this noted in connection with this organism, but we were able to demonstrate the presence of a capsule in each organism that this was attempted with, namely, the *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *B. prodigiosus*, *B. fluorescens liquifaciens*, *B. Hoffmann* and a true *B. diphtheriae*.

So we would say that a bacillus owes its virulence to its power of developing a capsule, and this we consider true virulence.

When a ferment comes into contact with a solid albuminous substance, which it can attack, it will gradually penetrate it and if the ferment is not too powerful and the end products are not too quickly removed, the ferment action will be gradually slowed towards the centre of the substance, and if the products of the action are retained in the immediate neighbourhood, a state approximating to ferment equilibrium will be produced and maintained. If this be now applied to a bacterium with a capsule, this state will obtain in the capsule and the bacterium will be protected. And if the bacterium can make up by fresh extrusion the loss due to diffusion of the products of digestion of the outermost zones, the life of the bacterium will be unaffected. So that we believe that the function of the capsule is protective and that the protection occurs from the development of zones of ferment equilibrium around the bacterium. The capsule now

1) Centralbl. f. Bact., Orig., 1913.

containing the toxic degradation bodies will be aggressive to phagocytosis, thus preventing the phagocyte from taking up and destroying the bacterium.

Now if a bacterium has no capsule the ferment can penetrate and kill the bacterium outright and even if the ferment is insufficiently strong to kill the bacterium, degradation bodies are not retained around the bacterium, and so phagocytosis can occur. In the case of massive doses the destruction of some of the bacteria will ultimately give rise to sufficient degradation bodies to inhibit phagocytosis of the rest.

We are aided in this conception by the action of hypertonic saline, noted in our experiments. The hypertonic saline in addition to hindering the action of the ferments also appears to have an influence on the bacterium. The bacterium being in a hypertonic solution is subject to osmosis, the result of which is that diffusion of the bacterial cytoplasm occurs, thus forming a capsule in which the same condition of ferment equilibrium can be maintained in the presence of the weakly acting ferments.

In the case of the gelatin similar zones of equilibrium are maintained the bacterium in the gelatin. The gelatin prevents rapid removal of the degradation bodies produced, from around the bacteria. It is conceivable also that many bacteria exude a little protoplasm into the surrounding medium which may be more soluble than the capsules ordinarily demonstrable. This is kept in position by the gelatin, so that the necessary equilibrium zone can be maintained. This is seen in the case of our experiments with the *Proteus Zenkeri*, where an unpassed strain was injected in gelatin and in 5% saline. Seven agar slopes injected in 5% saline produced no result beyond a transitory fall of temperature, but four agar slopes in gelatin produced toxic death and eight slopes produced septicaemia. The difference in the two cases would appear to be due to the gelatin temporarily acting as a containing capsule preventing the removal of the aggressive substances formed.

We must now discuss why it is that an unpassed mycoïdes will only cause disease in a slightly immune animal, whe-

reas passed mycoides will cause disease in a normal animal. The only difference between the passed and unpassed mycoides is that the passed mycoides has developed the power of producing a capsule. It might be argued that this capsule by itself, without any further change is a defence on the part of the organism against phagocytosis. Now if we assume this, then death can only be caused by the organism secreting an endotoxin. So that a normal animal dying from a virulent mycoides infection must presumably die from mycoides endotoxin. Now an animal dying in this way contains in its blood and effusions toxic proteoclastic degradation bodies in sufficient quantities to have caused death by themselves. This then shows that in spite of the capsules the bacteria are broken up and secondly since there is enough toxic material present to cause death it is not necessary to introduce a hypothetical poison such as endotoxin. Another point in favour of the view that the bacteria are destroyed in the way mentioned and that the capsule is not an absolute protection, is that it requires a much larger dose of virulent mycoides to kill a partially immune animal than a normal. Now in the partially immune animal it might be said that the serum contains an anti-endotoxin, which would account for the difference. But against this is the fact that the animals were immunised with non-virulent mycoides, which possessed no endotoxin. Now since these Mycoides possessed no endotoxin they cannot have provoked the formation of an anti-endotoxin. So this argument falls to the ground.

We should then say that true virulence is an induced property of bacteria. It is due to the power possessed by the bacterium of producing a capsule from which toxic proteoclastic bodies can be liberated by the ferments present in the animal on the one hand, and an aggressive zone maintained against the phagocyte on the other hand.

We have so far dealt with organisms not possessing an exotoxin. Now it can be shown that guinea-pigs dying from diphtheria toxin, contain in their blood and effusions toxic proteoclastic degradation bodies, which when injected into a normal guinea-pig produce acute death, exactly as is the case with other bacteria.

If we take a guinea-pig and inject it intraperitoneally with Diphtheria toxin, the animal will die in about 48 hours from the so-called exotoxin poisoning and there will be a considerable peritoneal exudate. If now, 2—4 c.c. of this exudate be injected intravenously into another guinea-pig acute toxic death occurs.

This death might be due either to the presence of exotoxin or to the presence of proteoclastic degradation bodies. Now if the exudate be diffused it can be demonstrated that there is sufficient proteoclastic degradation substance to account for the acute death. This being so it is not necessary to assume that there is also exotoxin present. We would thus say that there is no reason to believe that such a substance as primarily toxic exotoxin exists, but that exotoxin is simply diffused soluble bacterial protoplasm. So we would regard **exotoxin as a variety of capsule formation** in which the capsule is not retained in situ, owing to its soluble nature. That this is probable can be seen from our experiments, in which by making a diphtheria bacillus very virulent it was shown to have developed a capsule. Now it is well known that very virulent diphtheria bacilli do not produce high grade exotoxin. This we would consider to be due to the relative indiffusibility of the capsule of a virulent organism. A non-virulent diphtheria bacillus does not produce good exotoxin either, so that we should believe that exotoxin production by a bacterium is really a stage in the formation of a capsule.

Though we have discussed so far pathogenicity and virulence separately, yet we have come to the conclusion that they must be considered together. Thus an organism by passage may become so altered that it is able to infect and multiply in an animal in which there is no specific ferment. The mycoides could only become pathogenic in the first instance on inoculation into a sensitised animal — that is, an animal that has acquired a certain amount of specific ferment. After passage this organism is capable of producing disease in a normal animal — that is, an animal which contains no specific ferment. Hence we must conclude that the bacterium has become so altered that it can be attacked by the normal ferment at such a rate that sufficient aggressive substances are formed to

prevent phagocytosis, and developed the property of extruding a capsule to form a protective zone in which ferment equilibrium occurs to prevent the enzyme from penetrating and destroying it. Thus we see that a bacterium which is virulent is also pathogenic.

Now we must consider the bacteria of group III. The first point we must discuss is the activity of the ferment. We have come to the conclusion that septicaemia is not produced by a process of general ferment equilibrium in the whole animal body; but that septicaemia occurs if the relation between the quantity of bacterial protoplasm and the ferment activity is such that aggressive substances are formed from the bacterial protoplasm by the ferment in sufficient amount and remain as such long enough so to inhibit phagocytosis.

Now first of all we can compare in vivo experiments with experiments carried out in the test tube. From theoretical considerations the quantity of ferment only influences the rate of degradation, not the amount. So that in vitro, no matter how much ferment is present, ferment equilibrium eventually takes place and the same amount of the undegraded material remains in the two cases; this would mean unaltered bacterial protoplasm. We know from experiments in vitro that under these conditions after ferment equilibrium has occurred the bacteria start to multiply again. Now, taking two guinea-pigs with the same quantity of ferment, if in one the ferment activity is unaffected and in the other the ferment activity is damped, and into each the same amount of living bacterial protoplasm is inoculated, ferment equilibrium should occur in both, and septicaemia, if it occurs in one should occur in the other, but a different times. But we find that where the ferment has been damped septicaemia occurs, and not in the other. Hence we must conclude that septicaemia is not produced by general ferment equilibrium alone in the animal body. Taking account also of rate of removal of end bodies in both cases, these are being gradually removed, in the one case more rapidly than the other; so that in both cases, theoretically, if the amount of ferment is sufficient, the primary substance should be completely broken down. Hence we must

conclude that the occurrence of a septicaemia depends upon the presence at any given time and the maintenance of early degradation products sufficient to prevent phagocytosis. Where the ferment activity is great, the accumulation of the aggressive early degradation bodies is temporary, so that the inhibition of phagocytosis is only temporary, and this ceases directly the bodies are further degraded.

Finally there remains for discussion the fact that these organisms, which by our methods have produced septicaemia, are now able when directly inoculated into a normal animal, and in much smaller doses, to produce septicaemia, as well. The fact they can do so is a great argument against fermentative equilibrium being the sole cause of septicaemia.

Taking two normal animals and inoculating the same quantity of passed and unpassed bacteria, in the former septicaemia occurs, in the latter nothing. Here the factors are the same: the same activity, the same weight of bacterial protoplasm; hence if septicaemia were solely due to general ferment equilibrium septicaemia should occur in both. Hence we conclude that the difference is due to the retention around the passed bacterium of bacterial protoplasm in various stages of degradation, forming on the one hand an aggressive shield against the phagocyte, and on the other against the ferment, so that the bacterium can multiply. Here again we believe that a bacterium which is virulent is so in virtue of its being able to exude and retain some of its cytoplasm around itself.

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit sind die Experimente genau beschrieben, wodurch es den Autoren gelungen ist, alle dem Meerschweinchen nicht pathogene Bakterien in pathogene zu verwandeln.

Aus diesen Experimenten kann man die folgenden Schlüsse ziehen:

1) Die Pathogenität eines Bakteriums hängt ab von der Erzeugung toxischer Spaltprodukte von dem Bakterieneiweiß, i. e. hängt ab von dem Grade der Antikörperaktivität gegen das Bakterium in dem damit infizierten Tiere.

2) Für jede Tierart kann man Bakterien in der folgenden Weise klassifizieren:

a) diejenigen, die nicht pathogen sind wegen der ihnen gegenüber niedrigeren Antikörper-(Ferment-)Aktivität;

b) diejenigen, die pathogen sind, weil die Antikörperaktivität ihnen gegenüber so ist, daß die toxischen Spaltprodukte von dem Bakterieneiweiß in genügender Menge erzeugt werden und sich anhäufen, so daß Symptome oder der Tod erfolgen;

c) zuletzt diejenigen, die wieder nicht pathogen sind, da die Antikörperaktivität ihnen gegenüber so hoch ist, daß die toxischen Spaltprodukte sich nicht ansammeln können, sondern in niedrigere, nicht toxische verwandelt werden.

3) Irgendein nicht pathogenes Bakterium kann pathogen gemacht werden, indem man die Antikörperaktivität in dem damit infizierten Tiere in entsprechender Weise verändert, i. e. entweder erhöht oder erniedrigt.

4) Die echte Virulenz eines Bakteriums hängt ab von dem Vermögen, das ein Bakterium besitzt, einen Saum seines eigenen Protoplasmas um sich herum zu bilden und zu erhalten, i. e. eine Kapsel zu bilden.

Spaltprodukte werden in dieser Kapsel erzeugt durch die Antikörperaktivität, und hierdurch wird ein Zustand von Fermentinhibition erzielt, wodurch das Bakterium vor der weiteren Wirkung der Fermente geschützt wird und auch vor den Phagocyten, da diese Spaltprodukte aggressiv im Sinne Bails wirken.

Nachdruck verboten.

[From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital
Medical School, London (Dr. F. H. Thiele).]

Bacterial "Endotoxin".

By **F. H. Thiele** and **Dennis Embleton**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1913.)

Endotoxin.

Bacteria are supposed to produce the symptoms of the disease they cause by means of their specific toxins. These toxins have been classed into two groups, exo- and endotoxins. Exotoxins are produced not only in the animal infected, but also under suitable conditions in artificial media, when they can be shown to exist apart from the bacterial body. Endotoxins, on the other hand, are produced only in the animal body and cannot be demonstrated when the organism is grown on artificial media.

Various views are held with regard to the mode of formation and liberation of these endotoxins. Thus:

(1) The toxin is secreted by the living bacteria. This is the view of Metchnikoff, who showed that living cholera bacilli in collodion sacs produced, in the peritoneal cavity of rabbits, death from toxæmia, whereas dead bacteria introduced in a similar way produced no effect.

(2) The toxic substance is preformed and is liberated by disintegration of the bacteria in the animal body. Efforts have been made to obtain these toxins from bacteria,

(a) by mechanical disintegration, such as the freezing and grinding process of Rowland and Macfayden (1), or by the grinding process of Hewlett (2), or by alternately freezing and thawing,

(b) by the action of chemicals.

1. Alcoholic potash Vaughan and Wheeler (3).

2. Watery soda by Schittenhelm and Weichardt (4).

(c) by the autolytic disintegration of the bacteria (Conradi etc.).

(3) The toxic substance may not really be secreted or liberated by disintegration of the bacteria, but may be produced by the fermentative action of complement (with or without specific antibodies) on the bacterial protoplasm. The toxic substance is thus a cleavage body of the bacterial protoplasm. This is suggested by the work of Friedberger (5) in the production of intensely toxic substances from pathogenic and non-patho-

genic bacteria, or foreign proteins, by digestion with complement alone or together with antibody. The bacterial protoplasm being non-toxic till it has undergone a change due to the action of the complement.

In this paper we propose to discuss the cause of the toxicity of bacteria not possessing an exotoxin.

Our investigations included:

I. The examination of the blood and effusions of animals dying from septicaemia or toxaemia; re toxicity, temperature effects when injected into normal animals.

II. The examination of the above fluids for proteolytic cleavage bodies.

III. The mode of death and post mortem appearances of animals dying from bacterial infection or toxaemia.

IV. The relation of the toxicity of bacterial protoplasm to its state of division.

V. The effect of autolysis on the toxicity of a bacterium.

VI. The effect of hydrolysis by chemical means on the toxicity of a bacterium.

VII. The toxicity of a bacterium in the animal body in its relation to the liberation of toxic degradation substances and its dependence upon the relative antibody activity.

I. The toxicity of the blood and effusions of animals dying from bacterial infection, etc.

(i.p. = intraperitoneal inoculation, i.v. = intravenous.)

Expt. 1. Rabbit inoculated 12 hours previously with $\frac{1}{2}$ agar slope of B. Chicken Cholera. Animal moribund, killed, bled, blood mixed with an equal part of 1.5% Sodium citrate solution.

Guinea-pig (a), 250 gr. 4 c.c. of blood and citrate inoculated intravenously, produced acute death with convulsions in 2 mins. P. m. marked emphysema of lungs.

Guinea-pig (b), 350 gr. 5 c.c. of blood and citrate i.v. acute death under 2 mins., convulsions. P. m. typical of acute anaphylaxis.

Guinea-pig (c), 200 gr. 2 c.c. of peritoneal exudate i.v. death in 2 mins. P. m. typical.

Five similar experiments were performed with the blood of rabbits dying from Chicken Cholera infection.

Expt. 2. Rabbit inoculated 24 hours previously with $\frac{1}{4}$ agar slope of B. Chicken Cholera. Animal bled at point of death. Blood whipped.

Guinea-pig (d), 300 gr. 2 c.c. of whipped blood intraperitoneally. Temperature at time of inoculation 102.4° F.; in 30 mins. had fallen to

94° F. The animal had convulsions, was restless, had urination and ruffling of coat. Animal did not die of acute anaphylaxis, but died of septicaemia in 24 hours.

Guinea-pig (e), 320 gr. 1 c.c. of whipped blood i.p. Temperature at time of inoculation 101.8° F, rapidly fell to below 94° F. Restless. Croaking noises. Urination. Temperature rose after 6 hours 104.2° F. Animal died next day of septicaemia.

Guinea-pig (f), 280 gr. 5 c.c. of whipped blood i.p. Temperature at time of inoculation 102.2° F. Fell below 94° F. rapidly. Clonic spasms. Paresis. Dead in 3 hours, P. m. lungs not markedly distended.

Guinea-pig (g), 300 gr. 2 c.c. of peritoneal fluid i.v. Convulsions. Respiratory difficulty, death in 10 mins. P. m. typical.

Expt. 3. Rabbit inoculated with $\frac{1}{2}$ agar slope of B. Chicken Cholera. Moribund 24 hours. Blood allowed to clot. Serum separated.

Guinea-pig (h), 292 gr. 5 c.c. inoculated i.v. The animal ceased breathing, then Cheyne Stokes, respiratory spasm, convulsion. Death in 10 mins. P. m. lungs distended.

Guinea-pig (i), 280 gr. 5 c.c. of same serum after filtration through a porcelain filter i.v. Temperature at time of inoculation 102° F; fell to 94° F in 30 mins. Animal had convulsions, difficulty in breathing, Cheyne Stokes, paresis. Recovery.

N.B. less toxic effect after filtrations. This was constantly noted and led to the abandoning of this method.

Expt. 4. Rabbit inoculated 72 hours previously intraperitoneally with part of the liver and spleen of a guinea-pig dying from an infection with Timothy grass bacilli. (v. Proc. Roy. Soc. Med., Jan. 22, 1913.)

Guinea-pig (j), 340 gr. i.p. 2 c.c. of peritoneal exudate; animal developed convulsions in 5 mins. Respiratory difficulty, dead in 10 mins. P. m. typical.

Guinea-pig (k), 295 gr. i.v. 2 c.c. of peritoneal exudate. Death just on completion of the inoculation. Tonic convulsions. Respiratory spasm. P. m. typical.

Guinea-pig (l), 280 gr. i.v. 2 c.c. of whipped blood. Death in 2 mins. P. m. typical.

Expt. 5. Rabbit inoculated 24 hours previously i.p. with one agar slope of the B. dysentery (Shiga). Bled on point of death. Blood whipped.

Guinea-pig (m), 315 gr. i.v. death on completion of inoculation of 3 c.c. of blood. P. m. typical.

Guinea-pig (n), 320 gr. i.v. 5 c.c. of peritoneal exudate. Tremors. Clonic convulsions; paralysis. Died in 20 mins. Respiratory spasm. P. m. typical.

Expt. 6. Rabbit inoculated 24 hours previously intraperitoneally with one agar slope of virulent B. coli. Animal very ill, killed. Blood whipped.

Guinea-pig (o), 280 gr. i.v. 4 c.c. of blood; acute death 3 mins. P. m. typical.

Guinea-pig (p), 310 gr. i.v. 5 c.c. blood. Convulsions after 3 mins. Respiratory spasm. Death. P. m. typical.

Expt. 7. Rabbit inoculated 18 hours previously with $\frac{1}{2}$ agar slope of *B. Danysz.* i.p. Animal very ill. Killed. Blood whipped.

Guinea-pig (q), 320 gr. i.v. 3 c.c. of blood. Convulsions. Frothy blood-stained mucus from nose. Cheyne Stokes breathing. Death 5 mins.

Expt. 8. Guinea-pig 280 gr. inoculated 36 hours previously i.p. with one agar slope of slightly virulent *B. mycoides.* (See Proc. Roy. Soc. Med. Thiele and Embleton. Jan. 1913.) Died.

Guinea-pig (r), 220 gr. i.v. 3 c.c. of peritoneal exudate. Acute death. Convulsions Respiratory spasm. P. m. marked emphysema of lungs.

Guinea-pig (s), 230 gr. i.p. 3 c.c. of peritoneal exudate. In 10 mins. convulsions, paresis, respiratory spasm. Dead in 30 mins. P. m. typical.

Expt. 9. Guinea-pig 400 gr. dying four weeks after an inoculation with human tubercle bacilli. Killed, blood whipped.

Guinea-pig (t), 220 gr. i.v. 6 c.c. of blood. Acute death, 5 mins. P. m. typical.

Expt. 10. Guinea-pig 320 gr. inoculated i.p. 18 hours previously with 3 agar slopes of *Proteus vulgaris.* Killed. Blood whipped.

Guinea-pig (u), 240 gr. i.v. 4 c.c. of blood. Death in 10 mins. Clonic convulsions. Cheyne Stokes, respiratory spasm. P. m. typical.

Expt. 11. Guinea-pig 300 gr. inoculated 24 hours, previously i.p. with 12 agar slopes of non-virulent *B. Hoffmann,* in 5 % saline. Died.

Guinea-pig (v), 265 gr. i.v. 6 c.c. peritoneal exsudate. Acute death. Convulsions. P. m. typical.

Expt. 12. Guinea-pig 280 gr. inoculated i.p. 18 hours previously with 1 agar slope of virulent *Staphylococcus aureus.* Dying. Blood whipped.

Guinea-pig (w), 180 gr. i.v. 3 c.c. of blood. Acute death in 5 mins. P. m. typical.

Expt. 13. Guinea-pig 328 gr. inoculated with 20 mgr. dry weight of autoclaved *Staphylococcus aureus.* Animal died in less than 24 hours from toxæmia. Lungs emphysematous. Blood mixed with an equal quantity of 1.5 % Sodium citrate.

Guinea-pig (x), 180 gr. i.v. 8 c.c. of blood and citrate. Acute death. Convulsions. Respiratory spasm. P. m. typical.

Expt. 14. Guinea-pig 280 gr. inoculated with 10 mgr. dry weight of autoclaved *B. prodigiosus.* Died 36 hours. Blood mixed with equal quantity of Sodium citrate solution.

Guinea-pig (y), 150 gr. i.v. 6 c.c. of blood and citrate. Dead 5 mins. P. m. typical.

Expt. 15. Guinea-pig 340 gr. inoculated with 100 mgr. of pulverised tubercle bacilli i.p. 24 hours. Dying. Blood whipped.

Guinea-pig (z), 180 gr. i.v. 6 c. c. of blood. Death 10 mins. Convulsions. Respiratory spasm. P. m. typical.

Expt. 16. Guinea-pig 220 gr. inoculated with 20 mgr. dry weight autoclaved *B. proteus*. 24 hours; very ill. Blood whipped.

Guinea-pig (a'), 192 gr. i.v. 4 c. c. of the whipped blood. Death in 5 mins. Respiratory spasm, convulsions. P. m. typical.

Expt. 17. Guinea-pig 336 gr. inoculated with 20 mgr., dry weight autoclaved *B. Danysz*. Died. Blood mixed with equal volume of Sodium citrate.

Guinea-pig (b'), 214 gr. i.v. 6 c. c. of mixture. Acute death in 5 mins. P. M. typical.

Expt. 18. Guinea-pig, 263 gr. inoculated with 20 mgr., dry weight autoclaved *B. coli*. Dying 18 hours. Blood whipped.

Guinea-pig (c'), 176 gr. 4 c. c. blood i.v. Death in 10 mins. Respiratory spasm, convulsions. P. m. typical.

Expt. 19. Normal guinea-pig 300 gr. inoculated i.p. with 5 gr. dried egg albumen suspended in saline and sterilised, at 60° C for one hour on 3 successive days. Dying 14 hours later. Killed. Blood whipped.

Guinea-pig (d'), 202 gr. i.v. 6 c. c. blood, animal very ill. Cheyne Stokes. Rigors, Urination. Temperature fall, below 94° F. Paresis but recovery.

Guinea-pig (e'), 176 gr. i.v. 5 c. c. peritoneal exudate. Animal died 3 mins. Convulsions. P. m. typical.

Similar experiments were performed on two other guinea-pigs, the blood and effusions of which produced similar toxic symptoms on injection into further normal guinea-pigs.

Expt. 20. Normal guinea-pig 410 gr. inoculated i.p. with 20 c. c. of carefully washed deposit of ox corpuscles. Animal very ill. Killed after 15 hours. Blood whipped.

Guinea-pig (f'), 175 gr. Inoculated i.v. with 8 c. c. of blood. Death 5 mins. Convulsions, respiratory spasm. P. m. typical.

Expt. 21. Sensitised guinea-pig 380 gr. inoculated i.p. with horse serum, 5 c. c., delayed death 12 hours. Blood whipped.

Guinea-pig. (g'), 180 gr. Inoculated i.v. with 6 c. c. of blood. Death 10 mins. P. m. typical.

In all the above experiments the blood and effusions were either sterile or only contained the organisms inoculated. The blood and effusions were never kept, but were always inoculated as soon as obtained.

Temperature variations due to the inoculations
of exudates from the above.

Exudate from rabbit dying from Chicken cholera infection.

Guinea pig	1	2	3	4	5	6	6	8	
Weight gr.	220	242	218	330	200	180	198	180	
Doses inoculated i.p. c. c.	2	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02	2 sal.	
All made up to 2 c. c. with sterile saline									
Temperature	0'	102.2	102.0	102.4	102.4	101.8	102.6	102.2	102.6° F.
	30'	94.0	98.2	100.4	101.8	102.8	102.8	103.6	102.2
	60'	below 94.0	95.8	99.8	103.6	104.2	103.6	102.4	102.8
	90'	paresis	94.0	101.6	104.2	105.0	101.8	102.6	102.6
	120'	death	94.0	103.2	104.0	103.8	102.2	101.8	102.6
	3h	—	99.2	103.8	102.4	101.6	102.6	102.2	102.2
	4h	—	104.6	102.6	101.6	101.8	102.8	—	—
	6h	—	103.2	101.8	100.8	102.2	—	—	—
			very ill. paresis	very ill. ruffling tremors urinat.	urination tremors				

Exudate of rabbit dying B. phlei septicaemia.

Guinea-pig	1	2	3	4	5	
Weight gr.	262	246	220	248	180	
Doses i.p. c. c.	1	0.5	0.1	0.05	0.01	
All made up to 2 c. c. of normal saline						
Temperature	0'	101.8	102.4	102.2	102.4	102.8° F.
	30'	97.6	99.8	100.4	101.8	103.6
	60'	94.0	96.0	101.6	104.2	104.6
	90'	94.0	99.0	103.2	105.6	103.0
	120'	99.2	103.2	102.8	103.2	102.2
	3h	103.6	104.6	101.8	101.8	101.6
	4h	105.2	102.8	102.6	102.6	102.4
	5h	103.8	100.8	—	—	—
		very ill. paresis, urination	ill.	ill.	ill.	—

From these experiments it appears that there are present in the blood and effusions of animals dying from toxæmia or septicaemia, toxic substances which are capable of producing a uniform mode of death when inoculated into normal guinea-pigs. In non-lethal doses the toxic substances give rise to either a great fall of temperature, followed by a rise, or fever, according to the dose.

II.

A series of experiments was undertaken to determine whether hydrolytic cleavage bodies could be demonstrated in the serum and effusions of animals dying from septicaemia or toxæmia.

The serum and effusions were obtained free from haemoglobin and centrifuged at a high speed, and were then diffused through carefully tested fish bladder membranes into 200 c. c. distilled water in the ice-chest at 3° C for 48 hours. Although diffusion takes place more slowly at this temperature autolytic processes in the serum and contained bacteria are avoided, as well as any possible further action of the bacteria on the serum. The diffusate was then concentrated on the water bath to 10 c. c. and to one half ninhydrin was added and treated as recommended by Abderhalden (6), the remainder was tested by the biuret reaction as recommended by Pfeiffer (7).

The following is a table of the results, the + indicating intensity of the reaction:

Organisms	Fluid	Ninhydrin	Biuret
Staphylococcus aureus septicaemia Guinea-pig	Serum	++	—
	Peritoneal effusion	+++	+
Mycoides septicaemia Guinea-pig	Serum	+++	+
	Peritoneal effusion	+++++	++
Mycoides septicaemia Guinea-pig	Serum	++	—
	Peritoneal effusion	+++++	++
*Hoffmann's pseudodiphth. Virulent septicaemia guinea-pig	Serum	+	—
	Peritoneal effusion	++	—
Diphtheria toxæmia from 10 slopes of living bacteria Guinea-pig i.p. No organisms in heart's blood on death	Serum	++	?+
	Pleural and peritoneal effusion mixed	+++	+
B. Chicken Cholera Septicaemia Rabbit	Serum	++	?+
	Peritoneal effusion	+++	+
B. Human tubercle death 4 weeks Guinea-pig	Serum	+	—
Staphylococcus toxæmia (after inoculation 20 mgr. dead bacteria) Guinea-pig	Serum	++	—
	Peritoneal effusion	+++++	+
Diphtheria "Exotoxin" produced in peptone free serum water (1-10) Guinea-pig	Serum	+	—
	Effusions	+++	+

Organisms	Fluid	Ninhydrin	Biuret
Hoffmann "Exotoxin" produced in peptone free serum water (1:10)	Serum	++	+
Guinea-pig	Effusions	+++	?+
Serum water inoculated alone	Peritoneal washing	—	—
Egg albumen i.p. Toxaemia	Serum (sterile)	++	+
Normal guinea-pig	Peritoneal effusion (sterile)	++++	++

The serum and effusions have been tested in a large number of animals dying from septicaemia or toxaemia, or, toxaemia from large doses of dead organisms, and in nearly all cases in has been possible to demonstrate the cleavage bodies by the ninhydrin test.

In addition to further experiments with the above-mentioned organisms, the following bacteria have been used, *B. prodigiosus* (alive and dead) *B. cyanogenus* (alive and dead) *B. Proteus* (alive and dead).

From the following experiment we get an idea of the quantity of degradation material, which is present in a toxic mixture sufficient to cause acute death in a guinea-pig:

20 cmm of horse serum were exposed to 8 c. c. of sterile normal guinea-pigs' serum for 2 hours at 37° C, and 12 hours at room temperature 4 c. c. of this mixture produced acute death in a guinea-pig of 220 gr. The remainder was diffused in the way mentioned above. The dialysate was concentrated to 10 c. c. and the ninhydrin added and treated in the usual way. The resulting blue tinge was not as deep as in most of the foregoing experiments. So that if this can be taken as an indicator of the total amount of toxic substance necessary to kill a guinea-pig then the total amount of toxic substance present in an animal dying of toxaemia or septicaemia is a considerable multiple of this.

Now it might be suggested that in the experiments, Section I, that the acute toxic death is really due to the action of the ferments of the second animal on the bacteria present in the material inoculated or on the macerated bacterial protoplasm, or on the partially sensitised bacteria. That it cannot be due to the action of the normal ferments of the guinea-pig on the bacteria or macerated bacteria will be brought out later in this paper, where we will show that even with large amounts of bacteria or macerated bacteria acute death never

occurs. With regard to the inoculation of sensitised bacterial protoplasm the following experiments tend to show that this cannot be the explanation.

Fifteen 24 hour agar slopes of *B. typhoid* were washed up in normal saline and excess of anti-typhoid serum added, the mixture was allowed to stand for 4 hours at room temperature, being shaken from time to time to allow complete saturation to occur. The emulsion, which had thoroughly agglutinated, was centrifugalised, the supernatant fluid withdrawn and the deposit made up to 5 c.c. with normal saline. $2\frac{1}{2}$ c.c. i. e. 7.5 agar slopes. were injected intravenously into a rabbit of 2000 gr. No immediate symptoms occurred. The animal went off its food, but eventually recovered. $1\frac{1}{2}$ c.c., nearly 4.5 slopes, of the mixture were inoculated intravenously into a guinea-pig of 220 gr. There was no immediate effect, the guinea-pig showed after half an hour slight ruffling of the coat and some symptoms of discomfort and died eight hours later with paralysis, fall of temperature. P. m. marked distension of the lungs, hyperaemia of the intestines.

Again 12 agar slopes of typhoid bacilli, grown for 24 hours at 37° C. were washed up in 10 c.c. of normal saline and 0.2 gr. of Urea and 0.1 gr. of Ammonium chloride were added, according to the method of Balthazard (8), for the maceration of the bacteria and liberation of the endotoxin. The mixture was incubated at 37° C. for 6 hours, and then several times alternately frozen and thawed. The bacteria were by this means thoroughly disintegrated.

5 c.c. of the mixture were inoculated i.v. into a guinea-pig of 310 gr. The animal was ill, ruffling of the coat, fall of temperature to 95° F., urination, rigors, animal recovered.

5 c.c. of the mixture were mixed with 5 c.c. of distilled water 0.25 c.c. of undiluted typhoid agglutinating serum (titre 1 in 10000) were added, the whole was allowed to remain at room temperature for three hours and was then centrifugalised at a high speed. The clear supernatant fluid was withdrawn, the deposit made up to 5 c.c. and inoculated i.v. into a guinea-pig of 180 gr. The animal became very ill and died in 3 hours with fall of temperature, paresis, rigors, urination, etc.

Thus we see that acute death caused by inoculating blood or effusions of animals, dying from septicaemia or toxæmia, cannot be due to the inoculation of bacteria or macerated bacterial protoplasm, or partially sensitised bacteria, or sensitised macerated bacterial protoplasm, but must be due to the inoculation of toxic substances already present as such in the blood and effusions of these animals. This toxic substance is formed from the bacterial protoplasm, and is a proteo-clastic cleavage body.

III.

As a result of a large number of examinations of guinea-pigs, dying from bacterial infections and toxaemias, we have noticed that there are certain constant post mortem findings no matter what organism the death may have been caused by.

1) Marked emphysema of the lungs in about 90 % of the cases. The lungs being pale rarely oedematous and showing haemorrhages.

2) Distension of the right heart and general venous engorgement.

3) Dilatation of the gall and urinary bladder.

With regard to the mode of death; guinea-pigs always die with a great fall of temperature below 94° C, ruffling of the coat, gradually spreading paresis and respiratory difficulty. The animals all have difficulty of air entry, just as in anaphylaxis, and if the heart be examined immediately after death it is seen to be still beating and continues to do so for some time; thus suggesting a parallelism between the mode of death in infection and toxaemia and anaphylactic death. Death being in all cases due to respiratory difficulty due to the action of the toxin on the bronchial musculature.

Though these symptoms and appearances are the outstanding features common to all toxaemias there are in addition other features which are regarded as classical in death from certain bacterial infections. Thus in diphtheria for example haemorrhage into the suprarenals is considered highly characteristic. This occurrence we have observed not only with diphtheria, but with virulent mycoides and other virulent organisms. Also with regard to other typical findings; for example, ecchymoses into intestine, hyperaemia of intestine, exudates into serous cavities, oedema of abdominal wall, haemorrhage and necroses at seat of inoculation; we have been able to demonstrate their production by the exhibition of numerous organisms. So that we would consider that these latter features depend upon the virulence of the organism and the relative resistance of the animal rather than upon the type of organism inoculated.

IV.

We have found that the toxicity of a bacterium depends upon its state of division. Thus the more finely divided a bacterium is the more toxic it is, but with rare exceptions it has been impossible to produce acute death by inoculating finely divided bacterial substance.

A) Tubercle Bacilli.

Expt. 1. Tubercle Bacilli. 20 mgr. dry weight inoculated i.v. into guinea-pig 320 gr., on recovery from anaesthetic is perfectly well and lived for 10 days dying from general miliary tuberculosis.

Expt. 2. Pulverised Tubercle Bacilli (Meister, Lucius and Brüning). Pulverised T. B. 20 mgr. inoculated i.v. into guinea-pig 310 gr. Animal on recovery from anaesthetic is ill, shivering, ruffling of coat, urination, after 4 hours temperature has risen from 101.8° F. to 104.2° F. Animal recovered.

Expt. 3. Tubercle Bacillary Emulsion.

- a) Tub. B. E. 20 mgr., inoculated i.v. into guinea-pig 320 gr. Acute death in 3 min. Convulsions. P. m. Emphysema.
- b) Tub. B. E. 12 mgr. inoculated i.v. into guinea-pig 200 gr. Acute death with convulsions, cyanosis. Emphysema.
- c) Tub. B. E. 12 mgr. inoculated i.v. into guinea-pig 180 gr. Acute death, convulsions. Emphysema.

B) *B. coli*.

100 mgr. moist *B. coli* from agar plates were emulsified in 10 c. c. of normal saline.

Expt. 4. 2 c. c., i. e. 20 mgr. inoculated i.v. into guinea-pig 265 gr. Inoculation produced no immediate results, animal appeared quite well for some hours after, but died in 24 hours from septicaemia.

The remainder of the emulsion was alternately frozen and thawed until on microscopic examination the bacteria showed marked disintegration. The emulsion in a test tube was placed in a freezing mixture at -15° C for $\frac{1}{2}$ hour and was then rapidly thawed by placing in a water bath at 60° C until the ice had just melted, the process being repeated frequently. Care was taken to prevent possible autolysis of the bacteria, the emulsion being kept in the ice-chest up to the moment of inoculation, when it was warmed to 37° C.

2 c. c. of this, i. e. 20 mgr., inoculated i.v. into a guinea-pig of 240 gr. Inoculation produced illness, shivering, urination, fall of temperature to below 94° F. in 2 hours animal died in 8 hours. P. m. some distension of

lungs, congestion of right side of heart and veins, haemorrhages into large intestine, peritoneal exudate.

6 c. c., i. e. 60 mgr., inoculated i.v. into guinea-pig 300 gr. Inoculation did not produce immediate death, symptoms were same as in preceding experiment. Animal died in 6 hours. P. m. as before.

Similar results were obtained with disintegrated *B. Shiga*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Typhoid* and *Prodigiosus*. The *B. typhosus* was also disintegrated by Balthazard's method, see end of Section II, and with this organism the results were as with the *B. coli*.

From these experiments we can conclude that the more finely divided bacterial protoplasm is, the more toxic it becomes. Acute toxic death never occurs with the inoculation of disintegrated bacteria, which have not autolysed, the only possible exception being with tubercle bacillary emulsion. The apparent discrepancy will be dealt with in section V.

Similar experiments led observers to conclude that bacteria contained a primarily toxic substance and that the toxic substance or endotoxin was liberated by disintegration of the bacterial bodies. Now in these experiments we have shown that the so-called endotoxin is never acutely toxic and unless autolysis has occurred massive doses have to be inoculated to produce death, even in a few hours; whereas in the serum and effusions of animals dying from bacterial infections or "endotoxin poisoning" there is present an intensely toxic substance which in very small quantities can cause the acute death of a healthy animal.

So the more finely bacterial protoplasm is divided, the more rapidly toxic it becomes.

V. The effect of autolysis on the toxicity of a bacterium.

Bacillus coli communis. 100 mgr. moist weight from same culture as used above (Section IV) was suspended in 10 c. c. of sterile normal saline. The suspension was placed in the incubator for 16 hours, the mixture being repeatedly shaken. The emulsion was then centrifuged at a high speed so that the supernatant fluid was only faintly opalescent, the whole of the supernatant fluid was made up to 20 c. c. with normal saline.

Guinea-pig 250 gr. was inoculated i.v. with 5 c. c. of the diluted autolysate. Death occurred in 10 minutes, with Cheyne Stokes, respiratory spasm, convulsions etc. P. m. Emphysema of lungs etc.

B. proteus vulgaris. 100 mgr. treated in exactly the same way as in the previous experiment.

Guinea-pig 300 gr. inoculated i.v. with 6 c. c. of diluted autolysate (as above): Cessation of breathing, then Cheyne Stokes, convulsions, died in 3 minutes. P. m. typical.

The same experiments with similar results were performed with *B. Shiga*, Typhoid, and Prodigiosus. *Staphylococcus aureus* treated in the same way when inoculated into a guinea-pig did not produce acute death in any of the experiments, the animals only showing illness, slight respiratory difficulty and paresis. Animal died in 24 hours from *Staphylococcic* septicæmia. In the above work not every experiment gave a positive result, the autolysates were not always equally toxic.

Thus it will be seen that bacteria which are allowed to undergo autolytic degradation become toxic. The toxicity being comparable to the toxin present in the serum and effusions of animals dying from toxæmia on bacterial invasion and is derived from the bacterial protoplasm by the action of the autolytic ferments. The reason why the Tubercle Bacillary Emulsion produced acute toxic death appears to us to be due to the occurrence of a certain degree of autolytic degradation during the process of manufacture. Thus when Bacillary Emulsion is diffused, proteolytic cleavage bodies can be demonstrated in the diffusate.

VI. The effect of chemical hydrolysis on the toxicity of a bacterium.

All the bacteria used for experiments in this section were grown on peptone free media, Asparagin agar or serum agar. Two slopes of a twenty four hour culture were washed up in 2 c. c. of sterile normal saline and 2.2 c. c. of N/1 caustic soda added. The mixture was incubated at 37° C for 48 hours, neutralised with the requisite amount of N/1 hydrochloric acid and the whole made up to 10 c. c. All the organism used, with the exception of the *Staphylococcus*, showed marked disintegration.

B. coli communis. This organism was treated in the way mentioned above.

A guinea-pig 265 gr. inoculated i.v. with 5 c. c. of the supernatant fluid. Death in 5 mins. Cheyne Stokes. Respiratory spasm. Convulsions.

P. m. Lungs emphysematous and hyperaemic not oedematous. Right side of the heart distended and pulsating.

B. proteus vulgaris. Treated in exactly the same way.

Guinea-pig 320 gr. inoculated i.v. 3 c.c. Death in under 5 min. Convulsions. Cheyne Stokes. Blood-stained mucus from nose. P. m. Emphysema.

B. dysentery (Shiga). Treated in exactly the same way.

(1) Guinea-pig 350 gr. inoculated i.v. 3 c.c. Very ill. Cheyne Stokes. Respiratory spasm. Convulsions, loss of reflexes, paresis animal recovered.

(2) Guinea-pig 250 gr. inoculated i.v. 5 c.c. Death 3 minutes. P. m. typical.

Staphylococcus aureus. Treated in exactly the same way.

Guinea-pig 300 gr. inoculated i.v. 5 c.c. cessation of breathing for short time, gradual recovery, convulsions, urination, great fall of temperature, paresis, animal just recovered.

B. prodigiosus. Treated in exactly the same way.

Guinea-pig 354 gr. inoculated i.v. 5 c.c. Cheyne Stokes, gradual recovery to normal; rigors, urination, defaecation, temperature dropped to below 94° F. Recovery.

Bacillus proteus vulgaris. Two agar slopes were suspended in 10 c.c. of absolute alcohol and 2 c.c. of N/1 Sodium hydrate solution added. The mixture was incubated at 37° C for 48 hours, neutralised, evaporated in vacuo, taken up in distilled water and centrifuged, the supernatant fluid was made up to 5 c.c.

Guinea-pig 295 gr. inoculated i.v. with 5 c.c. Animal died in 10 min. Respiratory spasm, convulsive movements.

From these experiments it can be seen that hydrolytic cleavage produced from bacterial protoplasm acutely toxic substances; which produce death in exactly the same way as, the toxic substance in the serum and effusions of animals dying from bacterial infections. The amount of toxic substance obtained by this hydrolytic cleavage is much greater than is obtained by autolysis of the bacteria.

Discussion.

The term endotoxin was coined to explain the toxic symptoms following the injection of certain bacteria, which, when grown on liquid media did not produce a toxic substance.

It was at first held that this endotoxin was a vital secretion by the bacterium, this appeared from experiments of Metchnikoff, who showed

that Cholera vibrios sealed up in a collodion sac placed in the peritoneal cavity of a rabbit produced death only if the bacteria were alive. He concluded from this that the toxic substance was secreted by the living organism and only in the animal body. Welch (9) held a similar view and regarded the toxic substance as free receptors budded off from the bacterial cell in response to the engagement of the fixed receptors of the bacterial cell by the antibodies of the host. It has, however, abundantly been shown that dead bacteria when inoculated into an animal may produce intensely toxic symptoms and even death. This led Pfeiffer (10) to formulate his idea that the toxic substance was preformed and locked up in the bacteria cell, being only liberated on destruction of the bacterium.

Following on this various observers devised means for the liberation of these toxic substances, such as intense pressure, mechanical, autolytic and chemical disintegration.

The next important advance in the idea of endotoxins was due to the observations of Vaughan and Wheeler (11), that repeated inoculation of egg albumen into rabbits produced fever, wasting, etc., and that intensely toxic substances could be obtained by treatment of proteins, whether bacterial or not with alcoholic potash. They believed that there was present in all proteins a preformed toxic molecule, which became liberated on disintegration by hydrolysis etc. Finally Friedberger (5) and his co-workers have now definitely proved that by the action of complement together with normal or specific antibodies, intensely toxic substances can be produced from all varieties of bacteria whether pathogenic or not, and also from proteins like those of egg albumen, horse serum, etc., that this toxic substance is not specific but that it is a degradation product of the protein subjected to such treatment. This toxic substance was produced not only in vitro but also when the experiment was performed in the peritoneal cavity of guinea-pig — using the peritoneal cavity as a test tube (*Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 9, p. 44). The also showed (*Centralblatt f. Bact., Ref., Beiheft 54*, p. 44) that extracts of dysentery bacilli exerted no action on the intestinal musculature till they had been acted upon by the serum for the production of anaphylatoxin.

Friedberger regards endotoxin as the matrix of the toxic substance formed in this way, but is not prepared to deny the possible existence of a specific toxic endotoxin. Several other observers, Cole (12), Rosenow (13), have compared the action of bacteria disintegrated by mechanical means or chemicals with their action when allowed to undergo autolysis. The results have been rather contradictory, Cole concluding that the pneumococcus contains a preformed endotoxin, Rosenow the opposite. Cole further showed that the peritoneal fluid of guinea-pigs infected with pneumococci contains a toxic substance acting like anaphylatoxin, but could not demonstrate it in the blood serum. That the endotoxin is not a vital secretion on the part of the bacterium has been abundantly proved by the work of Pfeiffer etc., but there still remains for explanation the fact that a small amount of living bacteria may produce intensely toxic

symptoms, whereas a much larger quantity of dead ones produce practically no symptoms at all. This may partly be explained by the multiplication of the living bacteria, so that there is gradually more and more bacterial protoplasm available from which the toxic substance can be liberated or formed by the action of the ferments in the animal on the bacterial protein.

We must next consider our experiments [Thiele and Embleton (14)] on the *B. mycoides*, where we have shown that the toxicity of the bacterium depends on the relative ferment activity of the animal against that bacterium and also on the presence of the capsule. The capsule is essentially bacterial protein in which the ferments can engage and produce toxic degradation bodies which act on the one hand as a shield against further ferment action, protecting the bacterium from destruction by means of the zones of ferment inhibition produced in it, and as an aggressin, on the other hand, to the action of the phagocytes. We have shown that an organism, a strain of the *B. mycoides*, which would not give rise to toxic symptoms under ordinary conditions in a normal animal, could do so if the ferment activity against that organism was increased by previously inoculating the animal with a quantity of the dead organism. So that the same quantity of the same organism could now produce intense toxaemia and death. The organism recovered from the animal, dying in this way, was then capable of producing toxaemia and death when inoculated into a normal guinea-pig in even very small doses.

Now dealing with the first part; we have an absolutely non-virulent strain of *B. mycoides*, producing intense toxaemia in one animal and not in another, the doses being the same. The difference between the two animals being that one had 20 mgr. of dead bacteria inoculated 7 days previously, the other was perfectly normal. The difference is, therefore, due to some change in the animal and is not due to the bacteria — the bacteria are absolutely the same in the two cases. If we enquire into the differences in the two animals there are two possibilities:

(1) the inoculated animal is in a „negative phase“ from the result of the large inoculation,

(2) that the inoculation has caused an increase in and a new formation of ferments against the bacterium.

Dealing with (1); if the inoculation caused a negative phase, then we ought to get the same results with other bacteria, but we do not, as will be seen in our previous paper, c. f. *B. mycoides* and *B. Hoffmann* (14).

The following experiments also show that this cannot be the case.

During our experiments on the *B. mycoides* we isolated from various soils several strains of closely allied motile bacilli, which grew readily at the body temperature and we found that these were directly pathogenic to guinea-pigs in doses of $\frac{1}{2}$ an agar slope. Some guinea-pigs were inoculated with 20 mgr. dry weight of these strains of dead bacteria and after 2, 3, 4 and 5, days respectively were given $\frac{1}{2}$ an agar slope of the living organism — a dose which was fatal in 8 hours to a normal animal — the animals all recovered and also from larger doses.

We have thus a contrasting series of experiments.

(1) A non-pathogenic mycoides being made pathogenic and toxic by inoculating it into an animal inoculated 5—7 days previously with 20 mgr. dry weight of dead mycoides.

(2) A pathogenic closely allied bacterium rendered non-toxic and being killed off in an animal which had been treated in exactly the same way. So that if the inoculation produced a negative phase we should have the peculiarity of a certainly fatal dose of a pathogenic organism being destroyed in an animal in a negative phase, whereas we know that the reverse should be the case. In a negative phase septicaemia should more readily occur. Hence we must conclude that the toxicity of a bacterium depends not on the living organism secreting a toxic substance but on the relation between the ferment activity and "attackability" of the bacterial protoplasm. Experiments with red cells show the rate of formation of ferment. Thus if 20 mgr. dry weight of sheeps red cells be inoculated i.p. into a guinea-pig, in a week the antibody activity will be such that 60 cmm. and even less will cause haemolysis of 1 c.c. of a 1% suspension of the homologous red cells.

That the bacterial toxicity is not due to the liberation of a preformed toxic substance liberated during the process

of bacteriolysis is abundantly seen from the experiments quoted above, where without exception it is impossible to kill an animal acutely by inoculating finely disintegrated bacterial protoplasm.

The bacterial protein, i. e. the "endotoxin" only becomes acutely toxic when it has been acted upon by

- a) complement,
- b) complement and antibodies,
- c) chemical hydrolytic agents,
- d) autolytic ferments.

Taking in addition the *B. mycoides* again, 20 mgr. dry weight of finely disintegrated bacillary emulsion produce no symptoms beyond some temperature variation in a normal animal, the "endotoxin" has by this procedure been liberated; 20 mgr. of the same strain made virulent has also no effect, but either inoculated into a previously sensitised animal produces intense toxic symptoms.

Hence we cannot regard the bacterial protoplasm as primarily toxic, but that it becomes so when acted upon by ferments or other hydrolytic agents.

In the above experiments we have been able to demonstrate the presence of acutely toxic substances in the blood and effusions of animals dying of septicaemia or toxaemia. The mode of action is exactly the same as that of those produced from the bacteria by hydrolytic cleavage whether autolytic, chemical or fermentative by antibodies. Finally we were in almost all able to demonstrate degradation bodies. Hence we conclude that these acutely toxic substances present in the blood and effusions of animals dying from septicaemia or toxaemia are produced by the action of the ferments in the animal body on the bacteria and are formed during the process of proteoclastic cleavage of the bacterial protoplasm.

Now we have just shown that a bacterium which was non-toxic in a normal animal becomes pathogenic and toxic in an animal where the degree of ferment activity is suitable, so that we are driven to the conclusion that a bacterium is non-toxic unless the degree of ferment activity is suitable and that the toxicity is due to the production from its protoplasm of toxic degradation bodies by the ferment activity. So that

the toxicity of a bacterium depends on the rate of accumulation of these toxic degradation substances. If the formation is slow then the accumulation is slow and the bacterium is relatively non-toxic: if, however, the rate of formation is more rapid, the accumulation will be more rapid, unless the ferment activity is sufficiently great to break the toxic substance down to lower non-toxic degradation bodies, and the bacterium is pathogenic and toxic.

Having demonstrated that (a) the bacterial protoplasm is not directly acutely toxic even in very large doses but (b) becomes toxic when acted on, so that it undergoes hydrolytic degradation and (c) that acutely toxic substances having identically similar effects can be demonstrated in the blood etc., of animals dying of bacterial infections (d) as well as showing that the blood of these animals contains hydrolytic degradation bodies, we must conclude that the death of the animal is due to these toxic substances formed in the way already discussed, and there is absolutely no evidence of a primarily toxic specific endotoxin. Now if in a dead animal a large amount of Strychnine is found in the blood and organs, it is unnecessary to theorize on the question of any other toxic substance having been responsible for the death of the animal. Having in the above cases of bacterial poisoning demonstrated the presence of an acutely toxic substance quite sufficient in amount to kill the animal, it seems quite needless to seek for another toxic substance of so highly theoretical a nature as the endotoxin to explain the cause of death. The endotoxin of various authors is either finely divided bacterial protoplasm, and is thus in an ideal state for rapid ferment action; or hydrolytic degradation bodies of the bacterial protoplasm.

The fact that the various organisms produce in the majority of cases definite types of disease is taken as evidence of the presence of a specific toxic endotoxin; the endotoxin having special affinities producing its effects in certain groups of cells or organs.

This is merely evidence that the bacterial protoplasm is degraded in certain cells or organs at such a rate that toxic substances accumulate in sufficient amount to produce the necessary symptoms.

The real points in the causation of the specificity of the types of bacterial invasion, are the portal of entry, the number, virulence and rate of multiplication of the organism, and the varying degrees of local ferment activity. Bacterial protoplasm "Endotoxin" may have specific affinities for certain special organs and cells, and so according to these and the rate of liberation of the toxic material the special symptoms of the disease are produced. There is no evidence of a primarily toxic endotoxin.

Zusammenfassung.

1) Das Blut und die Exsudate der an bakterieller Toxämie oder Septikämie sterbenden Tiere enthalten ein intensives Gift, das bei intravenöser Zufuhr in ein normales Meerschweinchen dieses akut tötet. Die Art des Todes und die Sektionsergebnisse sind identisch für alle Bakterien, und der Symptomkomplex sowie die Sektionsbefunde sind denen des akuten anaphylaktischen Shocks gleich.

2) In solchem Blute und Exsudate kann man durch Diffusion hydrolytische Spaltprodukte nachweisen.

3) Die Toxizität eines Bakteriums hängt von dem relativen Grade der Antikörperaktivität gegen das Bakterium in dem infizierten Tierkörper ab. Diese Toxizität beruht auf dem Vermögen der Antikörper (die proteoklastische Fermente sind), von den Bacillenleibern toxische Spaltprodukte zu erzeugen.

4) Das Endotoxin anderer Forscher ist entweder

a) Bacilleneiweiß so fein zerkleinert, daß es leicht und schnell von den Fermenten angegriffen und so toxisch gemacht werden kann;

b) hydrolytische Spaltprodukte des Bacilleneiweißes; entweder durch chemische oder autolytische Spaltung zustande gebracht.

5) Ein primär toxisches spezifisches „Endotoxin“ scheint nicht zu existieren.

References.

- 1) Rowland and Mac Fadyean, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 34, p. 618.
- 2) Howlett, Proc. Roy. Soc. Med. (Path. Sect.), 1911.
- 3) Vaughan and Wheeler, Journ. Amer. Assoc., 1904.

- 4) Schittenhelm and Weichardt, *Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap.*, 1912.
- 5) Friedberger, *Zeitschr. f. Immunitätsf.* Numerous papers.
- 6) Abderhalden, *Die Schutzfermente*, 1912.
- 7) Pfeiffer, *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 17, 1913.
- 8) Balthazard, *Besson Bacteriology*, 379, 1913.
- 9) Welch, *Advances in Physiology* (Hill etc.), Vol. 1.
- 10) Pfeiffer, *Kolle und Wassermann, Handbuch* 1912.
- 11) Vaughan and Wheeler, *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 1.
- 12) Cole, *Journ. Exp. Med.*, Vol. 16, p. 644.
- 13) Rosenow, *Journ. Inf. Disease*, Vol. 9, 1911.
- 14) Thiele and Embleton, *Zeitschr. f. Immunitätsf.* (Dieses Heft.)

Addition on correction of proof.

Since writing the above a paper has appeared in the *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 19, Heft 1, p. 31 on the relation of Endotoxin to Anaphylotoxin by Dold and Hanau.

The authors conclude that both play a part in the causation of the toxic symptoms in an infected animal.

The experiments were made by comparing the toxicity of disanaphylotoxinised bacteria with that of ordinary bacteria. The latter were more toxic than the former roughly in the proportion of 2:1. The authors also state that they were unable to obtain evidence of the formation in vivo from bacteria that had been disanaphylotoxinised in vitro.

The criticism against this work can be summarised:

1) By treating bacteria in vitro to disanaphylotoxinise them, large quantities of the more easily attackable bacterial protein have been removed, so that much larger quantities must be used to produce the same effect. This would explain the difference in the so called toxicity.

2) The failure to demonstrate anaphylotoxin formation in vivo from bacteria disanaphylotoxinised in vitro is due:

- a) the small quantity of bacteria used for the purpose;
- b) the rapid removal of the bacteria from the peritoneal cavity;
- c) the most easily attackable part of the bacterium having been removed in previously disanaphylotoxinising them in vitro.

Now since it took 7—9 slopes of the disanaphylotoxinised bacteria to cause death and only 4—5 of the ordinary ones, the authors conclude that a toxic dose of endotoxin is contained in the former quantity of bacteria, whereas the toxic effect of 4—5 ordinary slopes of the bacteria is due to roughly $\frac{1}{2}$ a dose of endotoxin and to anaphylotoxin.

So that on this 4—5 ordinary slopes never at any time in the infected animal give rise to the accumulation of a lethal dose of anaphylotoxin and yet the authors expected to demonstrate a toxic dose from $\frac{1}{2}$ an agar slope of disanaphylotoxinised bacteria.

The paper thus does not prove the existence of endotoxin.

Nachdruck verboten.

[Royal Institute of Public Health, London.]

Versuche, die menschliche Darmflora durch Zufuhr fremder Mikroben umzuwandeln.

I. Ueber das Schicksal der per os eingeführten Bakterien.

Von **A. Distaso.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 14. September 1913.)

Der Zweck dieser Studien ist, uns Rechenschaft zu geben, unter welchen Bedingungen die Umwandlung der normalen Darmflora des Menschen stattfinden kann.

Das Problem ist eins der verlockendsten in der Biologie und wahrscheinlich auch therapeutisch sehr aussichtsvoll in bezug auf die Darmkrankheiten.

In einer früheren Arbeit¹⁾ haben wir *in vitro* zu beweisen versucht, welche Bedingungen nötig sind, um die fremden Mikroben im Dickdarm zu akklimatisieren.

Danach haben wir dies Problem *in vivo* verfolgt.

Da von mancher Seite behauptet wird, daß der Dünndarm eine bakterizide Kraft besitzt, ist es wünschenswert, zu erfahren, ob die per os geschickten Mikroben wirklich im

1) Diese Zeitschr., 1912.

Dünndarm vernichtet werden; zweitens, ob das Verschwinden der eingeführten Mikroben nicht durch eine einfache Konkurrenzerscheinung, die im Dickdarm stattfindet, zu erklären ist. Zur Lösung der Frage bieten das geeignetste Material Menschen bzw. Tiere, die eine Fistel über dem Coecum besitzen. Wir haben das Glück gehabt, drei Fälle zur Verfügung zu haben.

In dieser Mitteilung beschäftigen wir uns mit der ersten der oben genannten Fragen; aber vor Auseinandersetzung unserer Experimente scheint es uns unerlässlich, so kurz wie möglich auf die verschiedenen Meinungen über die sogenannte bakterizide Kraft des Magens und Dünndarmes zurückzukommen.

Bienstock, behauptete, wie man weiß, daß das HCl des Magens die Fähigkeit besitzt, alle Mikroben, mit Ausnahme der Kokken und Sporen, zu vernichten, und daß in dieser Kraft die Ursache liegt, warum wir wenig Mikroben im Duodenum finden. Andere Verfasser dagegen neigen dazu, anzunehmen, daß die Wirkung des HCl auf die Mikroben, die eingeführt werden, sie zu latentem Leben veranlaßt [Macfadyen, Nencki und Sieber¹⁾]. Hier muß man hinzufügen, daß es physiologisch bekannt ist, daß ein Teil des im Magen vorhandenen freien HCl sich mit den Basen verbindet; und es scheint ferner unwiderruflich, daß das freie HCl des Magens nur die äußere Schicht des Nährbodens badet. Es sind dies zwei Tatsachen von großer Wichtigkeit, wenn wir die sogenannte bakterizide Kraft des HCl im Magen richtig beurteilen wollen.

Andererseits ist gezeigt worden, daß der *Bac. coli*, der einer der wenig widerstandsfähigen Mikroben ist, in 0,5-proz. sauren Zuckernährboden ein latentes Leben führt [Distaso²⁾, Cannata³⁾].

Kohlbrugge⁴⁾ ist der erste, der von der Sterilität des Dünndarmes spricht. Seine Behauptung begründet er mit der Tatsache, daß aus dem Inhalte des Duodenums sehr selten Mikroben zu isolieren sind. Infolgedessen schloß er, es müsse da irgendeine Kraft vorhanden sein, die das Wachsen der Mikroben in diesem Teil des Darmes nicht zuläßt. Diese Kräfte waren für ihn zuerst die Verdauungssäfte. Um seiner Theorie eine experimentelle Basis zu geben, stützt sich Kohlbrugge auf die Resultate Brotzus⁵⁾. Dieser Autor ließ 2 Hunde fasten, den einen 5 Tage, den anderen 8 Tage, und fand in dem letzteren eine viel größere Anzahl Mi-

1) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1891.

2) Centralbl. f. Bakt., Orig., 1911.

3) Centralbl. f. Bakt., Orig., 1911.

4) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 29.

5) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 17.

kroben. Kohlbrugge schloß nun, wenn die bakterizide Kraft durch den Hunger vermindert ist, nehmen die Mikroben zu. Auf dieselbe Weise müssen auch die Versuche Kleskis¹⁾ erklärt werden. Er schnitt einen Teil des Ileum heraus und fand ein außerordentliches Wachstum der Mikroben. Allein diese Schlüsse können ebenso leicht beweisen, daß der Mangel an Nahrung eine Stasis hervorrief, die ein Anwachsen der Anzahl der Mikroben verursachte, oder daß der Hunger eine sehr starke Sekretion bzw. seröse Exsudate bewirkte, die ein gutes Nährsubstrat für die Mikroben bildeten.

Es hat sich eine ganze Literatur über die Streitfrage gehäuft. Wir brauchen nur die Hauptschriften zu nennen, um uns von der Richtigkeit des soeben Gesagten zu überführen. Wir lassen die Arbeiten außer acht, deren Schlüsse an Leichenbefunden gemacht wurden (sie sind leicht zu kritisieren), und halten uns an die Beobachtungen, die an frisch getöteten Tieren gemacht worden sind, um die erste Annahme von Kohlbrugge zu widerlegen.

Nencki²⁾ findet in dem Duodenum des Hundes Mikrokokken in geringer Anzahl.

Rahner³⁾ findet in dem Dünndarm des Hundes den Bacillus coli, dessen Anzahl zunimmt, je mehr man sich dem unteren Teile des Darmes nähert.

Heucick⁴⁾ studiert das Schwein und findet den Bacillus coli im Dünndarm.

Popoff⁵⁾ hat niemals, weder im Magen noch im Darm des Milchkalbes Mikroben gefunden.

Diese Beobachtungen sind ganz denen von Ankersmith⁶⁾ entgegengesetzt, der in dem Labmagen vorherrschend Milchsäuremikroben findet. Es kommen in der Tat der Bac. coli, der Bac. Güntheri und der Bac. putrificus vor.

Bei unseren Untersuchungen an der Fledermaus⁷⁾ waren die Tiere bei vollständiger Lebenstätigkeit getötet. Aus dem Dünndarm haben wir ständig den Coccus banani und den Bac. coli isoliert und häufig noch Anaërobienkeime. Ich verweise auf meine Arbeit für die genaue Beschreibung dieser verschiedensten Tatsachen.

1) Ann. Inst. Pasteur, 1895.

2) l. c.

3) Arch. f. Hyg., Bd. 74.

4) In Ankersmith, Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 1905.

5) Ebenda.

6) Ebenda.

7) In Metchnikoff etc., Roussette et microbes. Ann. Institut Pasteur, 1909.

Trotz der feststehenden Tatsache, daß der Dünndarm steril ist, muß man indessen eingestehen, daß der obere Teil des Dünndarmes nur eine geringe Menge Mikroben enthält. Das ist leicht aus der ständigen Bewegung des Dünndarmes zu erklären, welche die Stasis, die dem Wachstum der Mikroben günstig ist, zu bilden verhindert. Was den zweiten Punkt anbetrifft, d. h. die Fähigkeit der Verdauungssäfte, den Dünndarminhalt zu sterilisieren, so haben die Experimente *in vitro* gezeigt, daß die bakterizide Kraft, die den Darmsäften zugeschrieben wird, durch keine Experimente begründet worden ist.

In der Tat ließ Sondermann die Darmsäfte wirken und bemerkte, daß der Choleravibrio sich entwickelt. Ballner¹⁾ machte ein ähnliches Experiment. Er filtrierte den Darminhalt, mischte ihn mit Gelatine und impfte Choleravibrionen. Der Mikrob entwickelte sich sehr gut.

Ueberzeugend gegen die bakterizide Kraft der Verdauungssäfte sind die Experimente von Buerger, Sherman und F. Schreiber²⁾. Die Bakterien verhalten sich hinsichtlich der Auflösungserscheinungen folgendermaßen.

Hauptsächlich wird in der genannten Arbeit bestätigt, daß lebende grampositive Bakterien vom Trypsin nicht angegriffen werden, während die gramnegativen mehr oder weniger aufgelöst werden.

Was die Pepsinsalzsäureverdauung anbetrifft, so beweisen die Verfasser, daß lebende Bakterien gar nicht oder nur sehr mäßig von der Pepsinsalzsäurelösung angegriffen werden, und zwar sind es mit Ausnahme der Pneumokokken nur die empfindlichsten die gramnegativen.

Außerdem, wenn die Verdauungssäfte die Ursache dieser Erscheinung sein sollen, könnte man sich nicht erklären, warum in der Periode der Verdauung die Mikroben im Dünndarm sich in größerer Anzahl vorfinden müssen.

Was die bakterizide Kraft des Dünndarmes im Sinne des Schutzes anbetrifft, so nehmen wir vorläufig davon Abstand.

Es fehlt nicht an Versuchen, fremde Mikroben in den Darm einzuführen, aber die Sache wird kompliziert, wenn der Dickdarm nicht ausgeschaltet wird, weil hier die Erscheinungen meiner Ansicht nach unter anderen Gesichtspunkten betrachtet werden müssen.

Bienstock schluckt Sporen des Starrkrampfbacillus unter und gibt sie nicht in dem Stuhl aus.

1) Arch. f. Hyg., 1906.

2) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, Bd. 70, 1911.

Piazza fütterte Tiere mit Rauchbrand und Milzbrand und fand diese Mikroben mit unveränderter Virulenz in dem Kot wieder. Diesen beiden Versuchen kann man entgegensetzen, daß es sich um sporentragende Mikroben handelt und man gibt allseits zu, daß sie durch den Darm gehen.

Unter dieselbe Kategorie muß man die Experimente von Popoff reihen, der, trotzdem er die bakterizide Kraft des Dünndarms anerkennt, doch zugibt, daß dieselbe gewissen pathogenen Anaëroben gegenüber unwirksam ist¹⁾.

Medowikow²⁾ nahm 2 Hunde: der eine hatte eine Fistel über der Bauhinschen Klappe, der andere zwei davon, die eine im Duodenum, die andere im Ileum. Er fand bei Beginn der Digestion sehr wenig Mikroben, die so lange immer mehr abnahmen, als er Fett durch den Darm gehen ließ; denn das Fett ruft eine Sekretion hervor, die bakterizid ist. Außerdem, wenn er mit einer Sonde die Nahrung direkt in den Magen einführte, verminderten sich die eingeführten Bakterien (2 Millionen an Stelle von 16). Der Mund sollte also ein wahrer Brütöfen für die Bakterien sein. Die Versuche mit kleinen Tieren zeigten ihm gleichfalls, daß bei ihnen eine bakterizide Substanz im Blinddarm vorhanden ist.

Dieser Arbeit kann man hauptsächlich einwenden, daß eine bestimmte Menge von Mikroben sich in der fäkalen Masse ausbreitet, von der wir nur eine kleine Menge wahrnehmen können, und zweitens, daß höchstens ein Teil der Mikroben verschwindet. Es scheint also, als wenn die bakterizide Kraft des Dünndarmes noch nicht aus der Phantasie der Forscher verschwunden ist, trotzdem die Experimente der Anhänger das Gegenteil beweisen. Gegen diese Ansicht bewiesen andere Verfasser, daß sehr wenig widerstandslose Mikroben ganz ungestört durch den Darmkanal durchgehen und im Kot wiederzufinden sind. Seiffert³⁾ machte Experimente und gab Malachitgrün widerstehender Rassen des *Bac. coli*. Durch diese Eigenschaft ist es sehr leicht, diese Mikroben im Kot wiederzufinden. Er gibt diese Mikroben durch den Mund und findet sie nur während 1 Tages im Darne des Meerschweinchens, 4 Tage lang bei der Katze, 12 Tage lang bei der Maus und nur 4 Tage lang beim Menschen. Nach dieser Zeit sind die Mikroben vollständig verschwunden.

Adolf F. Hecht⁴⁾ versuchte, den Metabolismus der Darmflora durch Einführen von *B. coli*-Rassen, die der Darmflora fremd sind, zu ändern, und es gelang ihm, die betreffenden Mikroben im Kot wiederzufinden.

Wir müssen noch die Experimente mit der Fledermaus, einem Tier, das fast ohne Dickdarm ist, nachholen. Wenn ich

1) Warum die anaëroben Mikroben eine Ausnahme machen sollten, kann ich nicht begreifen.

2) Wratch, 1909 (nicht im Original gelesen).

3) Deutsche med. Wochenschr., 1911.

4) Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 41.

diese Tiere mit dem *Bac. bulgaricus* fütterte, fand ich ihn ständig im Kot. Die ersten hierauf bezüglichen Experimente wurden vor langer Zeit gemacht. Unser Mikrob ging durch den ganzen Verdauungskanal, kam zuerst mit den Magensäften in Berührung, passierte den Dünndarm und trat unberührt in dem Kot zutage¹⁾.

Wir bedienten uns eines sehr zarten Mikroben, dessen Sporen noch niemand beschrieben hat und der auf alkalischem Nährboden nicht wächst; also waren die Bedingungen unserer ersten Experimente für unsere Mikroben ganz ungünstig, und trotzdem waren die Mikroben im Kot der Fledermaus wiederzufinden.

Es ist im Grunde das einzige Experiment, welches uns über die Phänomene, die im Darm vor sich gehen, Rechnung ablegen kann. Wenn eine bakterizide Kraft wirklich vorhanden ist, warum sollten wir nicht wissen, warum sie sich nicht auf die fremden Mikroben, die wir einführen und die den Weg bis zum Rectum gehen müssen, überträgt. Die Erfahrungen der vorhin erwähnten Autoren machten uns von vornherein klar, daß wir, um überzeugende Resultate aufweisen zu können, wieder wie in den Experimenten mit der Fledermaus Mikroben anwenden müssen, die keine Sporen besitzen und überhaupt leicht zu finden sind.

Die folgenden Experimente suchen diesen Bedingungen beim Menschen gerecht zu werden²⁾.

Es handelt sich im ersten Falle um ein Kind von 12 Jahren, an Tuberkuloseperitonitis leidend, das an einer Fistel oberhalb des Blinddarmes operiert worden war. Das Kind mußte bedauerlicherweise das Spital schnell verlassen, so daß wir es nur wenige Tage zu unserer Beobachtung hatten.

Wir untersuchten zuerst seine Flora in den aus der Fistel ausfließenden Substanzen. Sie enthielt keine Mikroben, die dem *Bac. bulgaricus* glichen.

Das Mädchen bekommt 200 g saurer Milch mit *Bac. bulgaricus* während der Mittagsmahlzeit. Nach 6 Stunden erhalten wir den ersten

1) loc. cit.

2) Sie wurden in einem kurzen Resumé in *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1911 mitgeteilt.

Verband. Der *Bac. bulgaricus* zeigt sich in großer Menge. Es gibt 12—15 Mikroben auf einem Gesichtsfeld. Die Mikroben sind lang und erscheinen sehr tätig. Die darauf gemachten Kulturen sind positiv¹⁾. Der Verband des folgenden Tages zeigt um 11 Uhr auf den Präparaten einige kurze seltene Formen, die denjenigen des *Bac. bulgaricus* gleichen. Die Einimpfung ergibt die Gegenwart des *Bac. bulgaricus*.

Dies Experiment ist mit gleichen Erfolgen noch zweimal wiederholt worden.

Am 3. Tage gibt man mittags mit der Mahlzeit eine Kultur von 200 g saurer Milch des *Bac. bulgaricus*, die 48 Stunden alt ist. Der Verband um 6 Uhr zeigt kurze, weniger kräftige Formen des *Bac. bulgaricus*, die kränklich aussehen. Die in die Milch eingepflichte Kultur ist positiv.

Der Verband am folgenden Morgen zeigt keine Spur des *Bacillus bulgaricus*.

Wir können ihn auch nicht isolieren.

Dies Experiment ist noch einmal mit denselben Resultaten wiederholt worden.

Nach diesen Versuchen gaben wir dem Kinde 2 Tage lang dieselbe Menge sterile Milch unter denselben Bedingungen. Resultat: Wir haben nie mehr den *Bac. bulgaricus* in dem Verband gefunden, auch nicht einmal Formen, die in den Präparaten ihm morphologisch ähneln.

Hiermit waren unsere Experimente beendet, denn das Kind verließ das Spital. Es gelang uns durch die Freundlichkeit des Dr. Lane, einen anderen Fall mit einer Fistel zu bekommen: ein Kind von 12 Jahren, das an ulcerativer Colitis litt.

Wieder haben wir uns zuerst vergewissert, ob seine Flora Mikroben enthält, die dem *Bac. bulgaricus* ähnlich sind, da man behauptet hat, daß die Darmflora ständig den *Bac. bulgaricus* beherbergt.

Es ist dies ein Irrtum, ein Verwechseln des *Bulgaricus* mit anderen Mikroben, die ihm wohl ähneln, aber leicht zu unterscheiden sind. Wir mußten uns aber nicht nur über diese Tatsache Rechenschaft ablegen, sondern auch sehen, ob

1) Die sicherste Methode, um den *Bac. bulgaricus* vom Kote zu isolieren, ist das Einimpfen in Milch, die man im Wärmeschrank von 40° aufbewahrt. Auf diese Weise ist es uns möglich gewesen, den Mikroben zu entdecken, selbst wenn er in sehr wenigen Exemplaren auf den Präparaten war.

die sterile Milch an und für sich und Produkte des Metabolismus der Kulturen des *Bac. bulgaricus* nicht fähig wären, das Vorherrschen von Mikroben zu verursachen, die dem *Bac. bulgaricus* ähnlich sind. Das haben wir mit den folgenden Experimenten klargelegt.

Wir gaben 3 Tage lang auf nüchternen Magen 200 g sterile Milch und haben absolut keine Aenderung in der Darmflora bemerkt. Darauf haben wir 3 Tage lang zur selben Zeit 200 g saure Milch mit dem *Bac. bulgaricus* gegeben, deren Mikroben durch die Hitze getötet worden waren. (Natürlich haben wir uns vorher vergewissert, daß die Kultur wirklich getötet worden war.) Auch diesmal war keine Aenderung der Flora zu bemerken.

Nachdem wir uns durch diese Experimente überführt hatten, daß in den Versuchen die Elemente nicht enthalten waren, über die wir uns getäuscht haben könnten, haben wir dem Kind 3 Tage lang saure Milch mit dem *Bac. bulgaricus* gegeben.

Diesmal zeigte sich der sehr charakteristische *Bacillus* unter denselben Bedingungen, die wir beim ersten Falle beschrieben haben.

Zwei Punkte scheinen sich klar aus diesem Experiment zu ergeben: 1) daß ein Mikrob ohne Sporen, welcher der Darmflora fremd ist, unverändert bis in das Coecum gelangt, 2) daß derselbe, auf leeren Magen oder während der Mahlzeit gegeben, durch den Darm bis zum Coecum hindurchgeht.

Man kann bei unseren Experimenten einwenden, daß es schwer ist, von einer bakteriziden Kraft, die ihre Wirkung ausübt, zu sprechen bei der Menge von Mikroben, die man gegeben hat. Doch glauben wir diesen Einwand durch folgende Experimente widerlegen zu können:

Wir gaben dem Kinde 4 Tage lang 10 ccm von Kulturen des *Bac. bulgaricus* in Laktoserum; in den ersten 2 Tagen sind die Kulturen auf nüchternen Magen gegeben worden. Der *Bacillus* trat durch die Fistel schön und kräftig nach 6 Stunden heraus. Nach 24 Stunden enthielt der Verband deren weniger. Die Kulturen in der Milch waren in beiden Fällen positiv.

Die folgenden 2 Tage haben wir die Kulturen um 3 Uhr gegeben, d. h. zwischen der Mittags- und Abendmahlzeit. Die Resultate waren die gleichen wie vorher.

In der letzten Zeit ist es uns gelungen, einen Fall von Cöcalfistel zur Beobachtung zu bekommen. Eine Dame, die eine intestinale Operation durchgemacht hat, 37 Jahre alt und jetzt sehr gesund ist, hat sich unseren Experimenten freiwillig unterzogen.

Ich wiederholte bei ihr die gleichen Experimente wie beim Kind No. 2. Die Resultate stimmen mit den oben beschriebenen überein.

Außerdem wurde ihr später das Sediment einer 24-stündigen Kultur von *B. bulgaricus* in Molken, mit einem Stück Banane von der Größe eines Teelöffels vermischt, um 11 Uhr morgens verabreicht.

Abends bekam ich den ersten Verband. Die Präparate zeigten den *Bac. bulgaricus* in großer Anzahl. Am nächsten Morgen, 24 Stunden später, waren die betreffenden Mikroben selten zu finden, aber die Kultur in der Milch war positiv.

Zusammenfassung.

Die Experimente über den Durchgang der Mikroben durch den Verdauungskanal bis über den Blinddarm haben uns gezeigt, daß sie bei leerem Magen oder in der regsten Verdauungsperiode hindurchgehen.

Die Mikroben treten während 24 Stunden aus. Nach dieser Zeit kann man sie nicht mehr finden.

Zwei Einwände kann man gegen diese Experimente machen:

1) Da es sich um Kranke handelt, ist es leicht möglich, daß diese bakterizide Kraft geschwächt ist.

Dieser Einwand wird durch den Fall 3 widerlegt.

2) Daß wir nicht wahrnehmen können, wie viele Mikroben hindurchgehen.

Dieser letzte Einwand ist ganz berechtigt. Aber vor allen Dingen müssen wir beachten, daß wir nur einen Teil der Exkrete zur Beobachtung bekommen, und zweitens, daß die Exkretion der Mikroben 24 Stunden dauert.

Ich sollte hier eigentlich das große Problem der Akklimatisation der Mikroben im Dickdarm berücksichtigen, doch bedürfen wir noch weiterer Untersuchungen, um uns dies Gebiet zugänglich zu machen.

Hier müssen wir das Problem mehr vom biologischen botanischen Gesichtspunkt als von dem bakteriologischen betrachten. Es ist im Grunde nichts anderes als die alltägliche Naturerscheinung, weshalb der fremde Samen im dichten Gras untergeht.

Nachdruck verboten.

Einige Bemerkungen über die Arbeit von O. Stiner „Ueber die Modifikationen der Wassermannschen Reaktion nach Mintz und Rossi“.

(Diese Zeitschrift, Bd. 18, Heft 4, p. 378.)

Von **O. Rossi** (Sassari).

Ich bin Herrn Stiner sehr dankbar, daß er meine Methode zwecks Absorption der im Menschen Serum normalerweise enthaltenen Ambozeptoren gegen rote Hammelblutkörperchen nachgeprüft hat und bin auch zufrieden, daß eine Arbeit, welche aus einem wohlberühmten Institute stammt, zu dem Schlusse kommt, daß mein Verfahren eine Verfeinerung der Wassermannschen Reaktion bedeuten kann.

Nur die Praxis ist imstande, den Wert einer Methode zu messen und auch die eventuell nötigen Vervollkommnungen oder Verbesserungen zu zeigen. Ich selbst betonte in meiner Arbeit, daß es wünschenswert gewesen wäre, mein Verfahren nachzuprüfen, besonders weil mir in einer psychiatrischen Klinik nur besondere Kategorien von Kranken zur Verfügung standen.

Ich will nur auf zwei Punkte der wichtigen und sorgfältigen Arbeit von Stiner eingehen.

1) Stiner fand, daß mein Verfahren manchmal die Ausschläge der originalen Wassermannschen Reaktion abgeschwächt hat. Dieser Fall ist in meinen Versuchen nie vorgekommen: trotzdem will ich die Stinerschen Resultate als vollkommen gültig und beweisend betrachten. Nur will ich betonen, daß in meiner Arbeit von einem Verfahren, welches in dem Komplementablenkungsluesnachweise immer zu verwenden wäre, nie die Rede war; nur jene Sera, welche große Mengen von normalen Ambozeptoren enthalten und gleichzeitig mit der Wassermannschen Reaktion ein negatives Resultat geben, sollten

von Ambozeptoren befreit und dann neuerdings der Wassermannschen Probe unterstellt werden. Unter dieser Voraussetzung bilden die Beobachtungen von Stiner, welchen eine theoretische Wichtigkeit beigemessen werden kann, von dem praktischen diagnostischen Standpunkt keinen Einwand gegen meinen Vorschlag.

2) Stiner fand in 5 Sera von Luetikern, welche mit der originalen Wassermannschen Reaktion negativ reagiert hatten, daß dieselben nach meinem Verfahren vorbehandelt und in der Dosis von 0,2 ccm für die Komplementablenkungsprobe angewandt negative Resultate gaben, während sie in geringer Menge wie 0,1, 0,05 ccm positiv reagierten, und schlägt infolgedessen vor, der Ausführung der Proben auch Röhren mit dieser Menge einzureihen.

Gegen den Vorschlag von Stiner habe ich nichts einzuwenden. Meine Versuche jedoch führten mich zur Ueberzeugung, daß die am besten geeignete Serummenge 0,2 ccm war. Tatsachen bleiben trotz aller Besprechungen Tatsachen; sich aber nur darauf beschränken, die eine gegen die andere anzuführen wäre, unklug und unfruchtbar.

Deshalb, die Bedeutung der Stinerschen Resultate gleichzeitig vollkommen anerkennend, erlaube ich mir, die Ursachen der verschiedenen Befunde möglichst nachzusuchen.

a) Stiner gibt in seiner Arbeit keinerlei Andeutung über die Menge der normalen Ambozeptoren dieser 5 Sera, und aus seiner Mitteilung ist nicht ersichtlich, ob er nach meiner Behandlung geprüft hat, ob die Sera ihrer Ambozeptoren vollkommen verlustig gegangen waren; wäre das nicht der Fall gewesen, könnte man denken, daß wegen der Größe ihrer Menge manche Ambozeptoren zurückgeblieben seien und bei der Wassermannschen Reaktion stärker wirken konnten mit 0,2 ccm von Serum als mit 0,1 oder 0,05 ccm.

Dieser Möglichkeit liegen meine Gedanken näher, um so mehr, da 4 Sera aus Patienten stammten, welche eine intravenöse Behandlung (3 davon mit Salvarsan) durchgemacht hatten, und wir wissen, daß die Behandlung die Menge der normalen Ambozeptoren sehr erhöhen kann.

Jedoch kam ich in meiner Arbeit zu dem Schlusse, daß mein Verfahren alle Ambozeptoren absorbiert, wenn auch in großen Mengen vorhanden; das kann aber nicht ausschließen, daß es teilweise versagen kann, wenn außerordentlich große Mengen von Ambozeptoren auftreten.

b) Stiner und ich arbeiten mit verschiedenen Antigenen, während ich wässriges Extrakt syphilitischer Leber benützte, wandte Stiner Alkohol oder Acetonextrakte an.

c) Wir benützten das Antigen in verschiedener Dosis: Stiner in der Dosis von 0,1 ccm, ich in jener von 0,2 ccm.

Ob der Unterschied der Resultate zwischen meinen und den Stinerschen Versuchen tatsächlich in einer dieser Ursachen liegt, werden vielleicht andere Proben erklären, die ich leider in meiner jetzigen Stellung nicht zu machen imstande bin.

698 O. Rossi, Einige Bemerkungen über die Arbeit von O. Stiner etc.

Diesen Bemerkungen möchte ich noch hinzufügen, daß mein Verfahren immer in der Klinik für Nerven- und Geisteskrankheiten in Florenz, besonders bei Tabikern, und im hiesigen Institute für Hygiene mit gutem Erfolge angewandt wird und daß Dr. Gasbarrini dasselbe mit befriedigendem Resultat in seinen Versuchen über Komplementbindung bei Malaria benutzt hat. Dieser Forscher fand, daß die Sera bei akuter Malaria, welche viele normale Ambozeptoren enthalten, nur wenn von diesen befreit, positiv mit Komplementablenkungsprobe reagieren.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 4332.

DATE DUE SLIP
UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW**

571 1928

1m 8, '27

v.19 Zeitschrift für Immuni-
1913 tätsforschung. 1. Teil.
Originale. 20584

Dr. Jordan

AUG 25 1928
SEP 6 - 1928

Truswell

